



INSTITUTO DE
NEUROCIENCIAS
CASTILLA Y LEÓN



VNiVERSiDAD
D SALAMANCA

FACULTAD DE BIOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR Y PATOLOGÍA

INSTITUTO DE NEUROCIENCIAS DE CASTILLA Y LEÓN

**Modulación del sistema nitrérgico por
nicotina: estudio con ratones mutantes**

-TESIS DOCTORAL-

AZUCENA RODRIGO MURIAS

2011



INSTITUTO DE
NEUROCIENCIAS
CASTILLA Y LEÓN



VNiVERSiDAD
D SALAMANCA

FACULTAD DE BIOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR Y PATOLOGÍA

INSTITUTO DE NEUROCIENCIAS DE CASTILLA Y LEÓN

**Modulación del sistema nitrérgico por ni-
cotina: estudio con ratones mutantes**

AZUCENA RODRIGO MURIAS

Salamanca, 2011



VNIVERSIDAD
D SALAMANCA

FACULTAD DE BIOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR Y PATOLOGÍA

INSTITUTO DE NEUROCIENCIAS DE CASTILLA Y LEÓN

Modulación del sistema nitrérgico por nicotina: estudio con ratones mutantes

Memoria presentada por *Azucena Rodrigo Murias* para optar al Título de Doctor

Directores:

Prof. Dr. D. José Aijón Noguera

Prof. Dr. D. Eduardo Weruaga Prieto

Salamanca, junio de 2011

José Aijón Noguera, Catedrático de Biología Celular de la Universidad de Salamanca, y Eduardo Weruaga Prieto, Profesor Titular de Biología Celular de la Universidad de Salamanca

HACEMOS CONSTAR:

Que la Tesis Doctoral titulada “**Modulación del sistema nitrérgico por nicotina: estudio con ratones mutantes**”, ha sido realizada por Dña. Azucena Rodrigo Murias en el Departamento de Biología Celular y Patología y el Instituto de Neurociencias de Castilla y León de la Universidad de Salamanca bajo nuestra dirección y, en nuestra opinión, reúne todos los requisitos científicos y formales para ser defendida y optar al Título de Doctor.

Para que así conste, lo firmamos en Salamanca, a 22 de junio de 2011

Fdo.: José Aijón Noguera

Fdo.: Eduardo Weruaga Prieto

Esta Tesis Doctoral no podría haberse llevado a cabo sin la ayuda de un gran número de personas.

En primer lugar, me gustaría agradecer al Dr. José Aijón Noguera y al Dr. Eduardo Weruaga Prieto, directores de esta Tesis Doctoral, por su ayuda y orientación en todo momento.

Al Dr. José Ramón Alonso Peña, por darme la oportunidad de pertenecer al grupo de investigación de Plasticidad Neuronal y Neuroreparación.

A la Dra. María Agustina García Sánchez, del Instituto de Bioquímica y Biomedicina "Vicente Villar i Palasí" de la Universidad Autónoma de Barcelona, y al Dr. John A. Dani, de la División of Neuroscience, Baylor College of Medicine del Texas Medical Center de Houston, por acogerme en sus respectivos laboratorios y enseñarme otra forma de ver la ciencia.

A los profesores del Área de Biología Celular del Departamento de Biología Celular y Patología, gracias por todo lo que me habéis enseñado, tanto en el campo de la investigación como en el de la docencia.

A mis compañeros del laboratorio 7 y del Instituto de Neurociencias de Castilla y León, tanto a los que están aquí como a los que se ya se fueron. De todos he aprendido y en todos me he apoyado. Un agradecimiento especial para Jorge, Carmela, Gloria, Conchí, Jimeno, Bivi, Marchi, Elena, Carmen, Javisán, Fernando, David y Marisán. Gracias por toda vuestra ayuda, tanto dentro como fuera del laboratorio. Sin vosotros, esta Tesis no habría sido posible.

A mis amigas, por estar ahí siempre, para lo bueno y para lo malo. Nunca podré agradecer lo suficiente el haberos conocido. A mis "sobris" porque con sus risas me quitan todos los males.

A toda mi familia, especialmente a mi padre y mis hermanos, por aguantarme y apoyarme cuando la Tesis podía conmigo. A mi madre, porque siempre está presente, aunque ya no esté aquí.

A todos, gracias.

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Investigación y Ciencia (BFU2010-18284), el Ministerio de Sanidad, Política Social e Igualdad (Plan Nacional Sobre Drogas), la Junta de Castilla y León (Grupos de Excelencia, GR-183), la Consejería de Educación y la Consejería de Sanidad de la Junta de Castilla y León, el Centro para la Medicina Regenerativa y Terapia Celular de Castilla y León, la Fundación Samuel Solórzano y la Universidad de Salamanca.

“El misterio de la vida sigue escapándosenos. Las sombras se agitan, pero no se disipan jamás por completo.”

Howard Carter

“Any newcomer to the NO field is confronted with a bewildering nomenclature that uses very similar sounding names to describe very distinct molecules, *e.g.* nitrous oxide (laughing gas) and nitric oxide (sometimes called crying gas by those working on it!).”

Hill *et al.*, 2010.

<u>Abreviaturas.....</u>	<u>21</u>
--------------------------	-----------

<u>Introducción.....</u>	<u>25</u>
--------------------------	-----------

Dependencia de las drogas de abuso	27
---	-----------

Circuitos de la adicción a las drogas	28
--	-----------

Adicción a la nicotina	30
-------------------------------------	-----------

Receptores de acetilcolina nicotínicos	31
---	-----------

Mecanismo de acción de la nicotina	32
---	-----------

Plasticidad neuronal en la sensibilización a la nicotina	34
---	-----------

El caudado-putamen y el núcleo accumbens.....	36
--	-----------

Elementos neuronales	37
-----------------------------------	-----------

Neuronas de proyección	38
------------------------------	----

Interneuronas.....	38
--------------------	----

Conexiones del estriado.....	42
-------------------------------------	-----------

Aferencias.....	42
-----------------	----

Eferencias.....	43
-----------------	----

Organización morfo-funcional del estriado	44
--	-----------

Óxido nítrico.....	46
---------------------------	-----------

Sintasas del óxido nítrico	47
---	-----------

Estructura de las sintasas del óxido nítrico.....	48
---	----

NOS1	50
------------	----

NOS2	52
------------	----

NOS3	52
------------	----

Acciones del óxido nítrico en el sistema nervioso	53
--	-----------

Reacción del óxido nítrico con proteínas.....	54
---	----

Desarrollo del sistema nervioso.....	55
Proliferación, migración, diferenciación y apoptosis en el adulto	55
Neurotoxicidad.....	56
Relación con otros neurotransmisores	57
Comportamiento	58
Adicción a nicotina	58
Estrés	59
Dimorfismo sexual	60
Objetivos.....	63
<u>Material y Métodos.....</u>	<u>65</u>
Animales de experimentación	67
Genotipado de los ratones	67
Extracción de ADN.....	67
PCR.....	68
Electroforesis.....	69
Tratamiento con drogas	70
Valoración del contenido de óxido nítrico	70
Determinación de nitratos y nitritos	71
Extracción de los metabolitos del óxido nítrico del tejido.....	71
Reducción de nitratos a nitritos.....	71
Reacción de Griess.....	72
Análisis estadístico de la producción de NO	73
Análisis histológico.....	73
Obtención del tejido.....	73
Inmunofluorescencia indirecta	73

Controles de las técnicas de inmunofluorescencia indirecta.....	75
Análisis cuantitativo de las secciones procesadas histológicamente	76
<u>Resultados</u>	<u>79</u>
Expresión de las principales isoformas de la NOS en el estriado.....	84
NOS1	84
NOS2	85
NOS3	86
1. Núcleo accumbens	88
1.1. Animales sin tratamiento	88
1.1.1. Comparación de la densidad de células NOS1+ y de la cantidad de nitratos y nitritos entre los machos y las hembras silvestres	88
1.1.2. Cotejo de la densidad de neuronas NOS1+ entre las zonas rostral y caudal, en cada uno de los sexos en los animales silvestres	89
1.1.3. Comparación de la densidad de células positivas a NOS1 en las zonas rostral y caudal de los animales silvestres, entre ambos sexos	89
1.1.4. Análisis de la cantidad de nitratos y nitritos entre los animales silvestres y <i>KO</i> , en cada uno de los sexos.....	90
1.1.5. Comparación de la cantidad de nitratos y nitritos entre ambos sexos en los ratones <i>KO</i>	91
1.2. Animales inyectados con solución salina.....	91
1.2.1. Comparación de la densidad de células NOS1+ y de la cantidad de nitratos y nitritos, entre los machos y las hembras silvestres	91
1.2.2. Cotejo de la densidad de neuronas NOS1+ entre las zonas rostral y caudal, en cada uno de los sexos, en los animales silvestres	92
1.2.3. Comparación entre ambos sexos de la densidad de células positivas a NOS1 en las zonas rostral y caudal de los animales silvestres	92
1.2.4. Análisis de la cantidad de nitratos y nitritos entre los animales silvestres y <i>KO</i> , en cada uno de los sexos.....	93
1.2.5. Comparación de la cantidad de nitratos y nitritos entre ambos sexos, en los ratones <i>KO</i>	94

1.3. Animales inyectados con nicotina	94
1.3.1. Comparación de la densidad de células NOS1+ y de la cantidad de nitratos y nitritos, entre los machos y las hembras silvestres	94
1.3.2. Comparación entre ambos sexos de la densidad de células positivas a NOS1 en las zonas rostral y caudal de los animales silvestres	95
1.3.3. Comprobación entre ambos sexos de las posibles diferencias en la densidad de células positivas a NOS1 en las zonas rostral y caudal de los animales silvestres.....	95
1.3.4. Análisis de la cantidad de nitratos y nitritos entre los animales silvestres y KO, en cada uno de los sexos.....	96
1.3.5. Comparación de la cantidad de nitratos y nitritos, entre ambos sexos, en los ratones KO.....	97
1.4. Efecto del estrés	97
1.4.1. Comparación de la densidad de las neuronas NOS1+ y la cantidad de nitratos y nitritos entre los animales <i>naives</i> y los inyectados con s. salina, en cada uno de los sexos, en los animales silvestres	97
1.4.2. Comparación de la densidad de neuronas NOS1+ en la zona rostral y en la caudal de los animales silvestres entre los ratones sin tratamiento y los inyectados con s. salina, en cada uno de los sexos	98
1.4.3. Comparación de la cantidad de nitratos y nitritos entre los animales <i>naives</i> y los inyectados con s. salina, en cada uno de los sexos, en los animales KO.....	99
1.5. Efecto de la nicotina	99
1.5.1. Comparación de la densidad de neuronas NOS1+ y la cantidad de nitratos y nitritos entre los animales inyectados con s. salina y los tratados con nicotina, en cada uno de los sexos, en los animales silvestres.....	99
1.5.2. Comparación de la densidad de neuronas NOS1+ en la zona rostral y en la caudal entre los ratones silvestres tratados con s. salina y los inyectados con nicotina, en cada uno de los sexos	100
1.5.3. Comparación de la cantidad de nitratos y nitritos entre los animales tratados con s. salina y los inyectados con nicotina, en cada uno de los sexos, en los ratones KO	101
Resumen.....	102
Animales sin tratamiento	102
Animales inyectados con solución salina	102

Animales inyectados con nicotina	103
Efecto del estrés	103
Efecto de la nicotina.....	103
Tabla.....	103
2. En el CP:	106
2.1. Animales sin tratamiento	106
2.1.1. Comparación de la densidad de células NOS1+ y la cantidad de nitratos y nitritos entre los machos y las hembras silvestres	106
2.1.2. Cotejo de la densidad de neuronas NOS1+ entre las distintas áreas, en cada uno de los sexos en los animales silvestres	107
2.1.3. Comparación de la densidad de células positivas a NOS1 en cada una de las áreas de los animales silvestres, entre ambos sexos	107
2.1.4. Análisis de la cantidad de nitratos y nitritos entre los animales silvestres y <i>KO</i> , en cada uno de los sexos.....	108
2.1.5. Comparación de la cantidad de nitratos y nitritos entre ambos sexos en los ratones <i>KO</i>	109
2.2. Animales inyectados con solución salina.....	109
2.2.1. Comparación de la densidad de células NOS1+ y la cantidad de nitratos y nitritos, entre los machos y las hembras silvestres	109
2.2.2. Cotejo de la densidad de neuronas NOS1+ entre las distintas áreas, en cada uno de los sexos, en los animales silvestres	110
2.2.3. Comparación entre ambos sexos de la densidad de células positivas a NOS1 en cada una de las áreas de los animales silvestres	111
2.2.4. Análisis de la cantidad de nitratos y nitritos entre los animales silvestres y <i>KO</i> , en cada uno de los sexos.....	111
2.2.5. Comparación de la cantidad de nitratos y nitritos entre ambos sexos, en los ratones <i>KO</i>	112
2.3. Animales inyectados con nicotina.....	112
2.3.1. Comparación de la densidad de células NOS1+ y la cantidad de nitratos y nitritos, entre los machos y las hembras silvestres	112
2.3.2. Cotejo de la densidad de neuronas NOS1+ entre las distintas áreas, en cada uno de los sexos, en los animales silvestres	113

2.3.3. Comparación entre ambos sexos de la densidad de células positivas a NOS1 en cada una de las áreas de los animales silvestres	114
2.3.4. Análisis de la cantidad de nitratos y nitritos entre los animales silvestres y KO, en cada uno de los sexos.....	114
2.3.5. Comparación de la cantidad de nitratos y nitritos, entre ambos sexos, en los ratones KO.....	115
2.4. Efecto del estrés	115
2.4.1. Comparación de la densidad de las neuronas NOS1+ y la cantidad de nitratos y nitritos entre los animales <i>naives</i> y los inyectados con s. salina, en cada uno de los sexos, en los animales silvestres	115
2.4.2. Comparación de la densidad de neuronas NOS1+ en cada una de las áreas de los animales silvestres entre los ratones sin tratamiento y los inyectados con s. salina, en cada uno de los sexos.....	117
2.4.3. Comparación de la cantidad de nitratos y nitritos entre los animales <i>naives</i> y los inyectados con s. salina, en cada uno de los sexos, en los animales KO.....	118
2.5. Efecto de la nicotina	118
2.5.1. Comparación de la densidad de las neuronas NOS1+ y la cantidad de nitratos y nitritos entre los animales inyectados con s. salina y los tratados con nicotina, en cada uno de los sexos, en los animales silvestres	118
2.5.2. Comparación de la densidad de neuronas NOS1+ en cada área estudiada entre los ratones silvestres tratados con s. salina y los inyectados con nicotina, en cada uno de los sexos	120
2.5.3. Comparación de la cantidad de nitratos y nitritos entre los animales tratados con s. salina y los inyectados con nicotina, en cada uno de los sexos, en los ratones KO.....	121
Resumen.....	121
Animales sin tratamiento	121
Animales inyectados con solución salina	121
Animales inyectados con nicotina	122
Efecto del estrés	122
Efecto de la nicotina.....	122
Tabla	123

Discusión..... 125

Localización de la NOS2 en el estriado de los ratones silvestres y knock-out para la NOS1127

Localización de la NOS3 en el estriado de los ratones silvestres y knock-out para la NOS1128

Localización de la NOS1 en el estriado de los ratones silvestres y knock-out para la NOS1129

Cuantificación de las neuronas NOS1 y producción de óxido nítrico en el estriado de los ratones naives130

Diferencias sexuales en el sistema nitrérgico de los ratones silvestres131

Producción del NO en el estriado de los ratones *knock-out* para la NOS1134

Efecto de las inyecciones con solución salina en la localización de la NOS1 y en la producción de NO en el estriado del ratón135

Efecto de las inyecciones con nicotina en la localización de la NOS1 y en la producción de NO en el estriado del ratón.....137

Efecto del sexo en la sensibilización a nicotina..... 139

Conclusiones 141

Bibliografía 145

Páginas en Internet.....170

Apéndice..... 171

Soluciones de uso común173

Sueros inmunológicos.....173

Abreviaturas

ACh: acetilcolina.

ACTH: hormona adrenocorticotropa.

AMPA: ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilisoxazole-4-propiónico.

AMPc: adenosín monofosfato cíclico.

ATV: área tegmental ventral.

BH₄: tetrahidrobiopterina.

Ca: comisura anterior.

CaM: calmodulina.

CB: calbindina D28-k.

Cc: cuerpo calloso.

CD: caudo-dorsal.

CL: caudo-lateral.

CP: caudado-putamen.

CR: calretinina.

CRE: elemento de respuesta al AMPc.

CREB: proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc.

CRF: factor liberador de corticotropina.

CYP: enzima de la familia de las citocromo P450.

DA: dopamina.

ES: estriado.

ESM: error estándar de la media.

FAD: flavín adenín-dinucleótido.

FMN: flavín mononucleótido.

GABA: ácido γ -amino-butírico.

GCs: guanilato ciclasa soluble.

Glu: glutamato.

GMPc: guanosin monofosfato cíclico.

KO: ratones *knock-out* para la NOS1.

LTP: potenciación a largo plazo.

LTD: depresión a largo plazo.

MAP2: proteína asociada a microtúbulos 2.

MSN: neuronas espinosas medianas.

N1: nivel rostral.

N2: nivel caudal.

NA: núcleo accumbens.

nAChR: receptor de acetilcolina nicotínico.

NADPH: nicotinamida adenín-dinucleótido fosfato reducido.

NMDAR: receptor de *N*-metil-D-aspartato.

NOS: enzima sintasa del óxido nítrico.

NOS1: enzima sintasa del óxido nítrico 1 o neuronal.

NOS2: enzima sintasa del óxido nítrico 2 o inducible.

NOS3: enzima sintasa del óxido nítrico 3 o endotelial.

pb: par de bases.

PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

PSD-95: proteína de densidad post-sináptica que contiene el dominio PDZ-95.

PV: parvalbúmina.

RD: rostro-dorsal.

RL: rostro-lateral.

RM: rostro-medial.

SIDA: síndrome de inmunodeficiencia adquirida.

SNC: sistema nervioso central.

S. salina: solución salina isotónica.

TF: tampón fosfato.

TFS: tampón fosfato salino.

TLD: núcleo tegmental laterodorsal.

TPP: núcleo tegmental pedunculopontino.

Introducción

El objetivo general de esta Tesis Doctoral es el estudio de la influencia de la nicotina en el sistema nitrérgico del ratón. Para ello emplearemos ratones silvestres y *knock-out* para la isoforma 1 de la enzima sintasa del óxido nítrico. En esta introducción comenzaremos por el análisis de los mecanismos generales de adicción. A continuación estudiaremos la acción de la nicotina en el sistema nervioso central. Posteriormente describiremos la organización de las zonas elegidas para nuestro estudio, los núcleos accumbens y caudado-putamen, así como sus conexiones con diferentes centros encefálicos. A continuación describiremos las tres isoformas principales de la sintasa del óxido nítrico responsables de la formación del óxido nítrico, para continuar con la función de dicho neurotransmisor en el sistema nervioso central, especialmente en relación con la adicción a nicotina y los mecanismos de estrés. Por último, estudiaremos las diferencias sexuales del encéfalo de roedor, centrándonos en la adicción a la nicotina y en el sistema nitrérgico. En el último apartado de esta sección se encuentran la hipótesis de trabajo y los objetivos concretos de esta Tesis Doctoral.

Dependencia de las drogas de abuso

El abuso de ciertas drogas y el consiguiente fenómeno de la adicción son dos de los problemas sociales más serios y de mayor impacto en la salud pública (Di Matteo *et al.*, 2007). La adicción a una droga se puede considerar como una enfermedad mental que afecta al sistema de recompensa del cerebro y produce una pérdida de control sobre el uso de la misma, lo que induce su búsqueda y consumo compulsivo a pesar de las consecuencias adversas que ello conlleva (Mohn *et al.*, 2004). Para que se produzca la adicción a una droga se requiere una exposición repetida a la misma. Este proceso está fuertemente influenciado por el contenido genético de la persona y por los contextos psicológico y social del sujeto que la consume. Una vez desarrollada la adicción, el individuo muestra un anhelo intenso de la droga de manera indefinida y un elevado riesgo de recaer de nuevo en su abuso, incluso años o décadas después de abstenerse de tomar dicha sustancia (Nestler, 2001). Esto implica que la droga produce cambios extremadamente estables en el cerebro, que son los responsables de dichas anormalidades de comportamiento a lo largo de toda la vida (Nestler, 2001).

Aunque las drogas de abuso como la cocaína, la heroína, el tabaco, etc. son químicamente diversas y tienen actividades iniciales muy diferentes, las adicciones muestran características muy similares (Nestler, 2001; Saal *et al.*, 2003). Las drogas de abuso activan las estructuras cerebrales de placer-recompensa de forma muy intensa, induciendo alteraciones duraderas en el comportamiento, que reflejan cambios en la fisiología y bioquímica neuronal (Mohn *et al.*, 2004). La más importante de estas acciones es la activación del sistema dopaminérgico meso-cortico-límbico o sistema de recompensa. Hay muchas evidencias de que este sistema es el principal sustrato tan-

to de la recompensa como del refuerzo producido por gratificantes naturales o por las drogas adictivas (Wise y Bozarth, 1987; Di Chiara e Imperato, 1988; Robbins y Everitt, 1996; Pidoplichko *et al.*, 2004; Di Matteo *et al.*, 2007). La activación de este sistema implica un aumento en la frecuencia de disparo de las neuronas dopaminérgicas en el área tegmental ventral (ATV). Ello conlleva un aumento en la liberación de dopamina (DA) en regiones del sistema límbico, principalmente en el núcleo accumbens (NA) y el caudado-putamen (CP) –ambas zonas pertenecientes al estriado (ES)– y en el córtex prefrontal (para una revisión, ver Nestler, 2001). De hecho, la mayoría de los cambios que tienen lugar en dicho sistema de recompensa durante la adicción a drogas implican procesos sinápticos dopaminérgicos y/o glutamatérgicos (Ungless *et al.*, 2001; Carlezon y Nestler, 2002).

Desde una perspectiva molecular y celular, la exposición repetida a las sustancias de abuso produce cambios estables en la expresión génica, en modificaciones post-transcripcionales de diversas proteínas, en la señalización intracelular y en la plasticidad sináptica (Ungless *et al.*, 2001; Carlezon y Nestler, 2002; Mohn *et al.*, 2004).

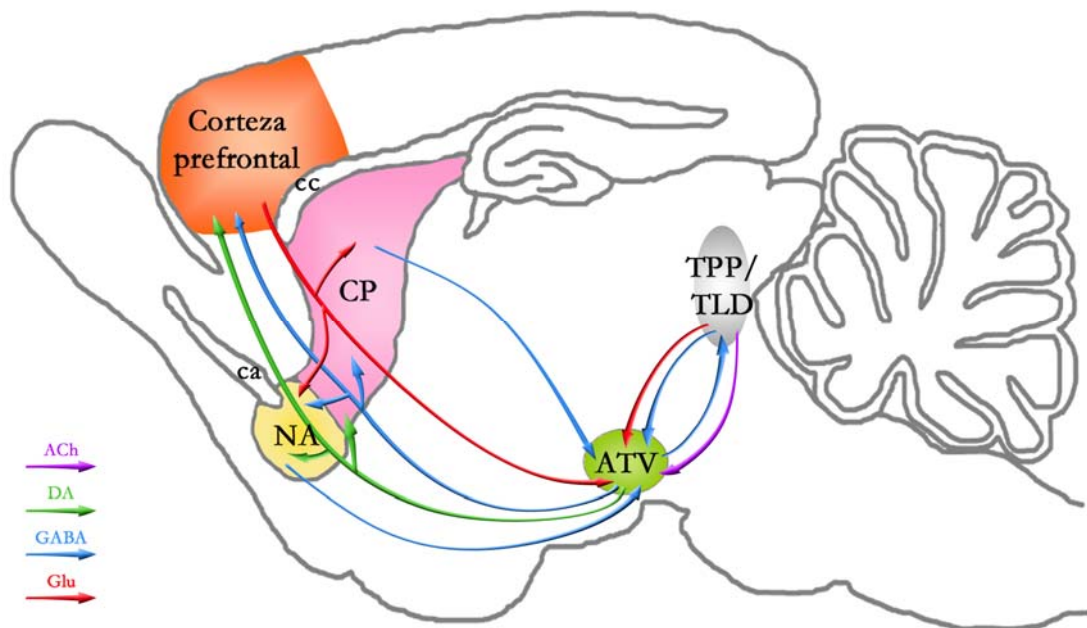
El uso crónico de la nicotina y de otras drogas conlleva diversas consecuencias: **tolerancia**, que es una disminución de la respuesta a la misma dosis de nicotina; **sensibilización**, o un incremento de la respuesta a la droga con una exposición repetida o prolongada a la misma; **dependencia física**, que es un cambio fisiológico neuroadaptativo debido al consumo prolongado, de tal forma que la ausencia de la droga produce el síndrome de abstinencia; así como **craving**, que es un deseo intenso por consumir la droga (Jain *et al.*, 2008a; Mao y MacGehee, 2010). Se ha sugerido que la sensibilización a esta droga podría ocasionar un cambio neuroadaptativo que originaría comportamientos asociados con la búsqueda de la droga, el síndrome de abstinencia y una posterior recaída en el tabaquismo (Robinson y Berridge, 1993; Vezina, 2004; Vezina *et al.*, 2007). El estudio de los cambios neurales que subyacen a la sensibilización por la nicotina es crucial, dado que su prevención o su reversión pueden ser una herramienta fundamental en el tratamiento de la adicción a la droga (Ulusu *et al.*, 2005). De estos cambios debidos al uso de la droga, en este Trabajo de Tesis Doctoral nos hemos centrado en el estudio de la sensibilización a nicotina mediante inyecciones repetidas de la misma.

Circuitos de la adicción a las drogas

Como se ha mencionado previamente, existen muchas evidencias de que el sistema dopaminérgico meso-cortico-límbico, que proyecta desde el ATV a diversas zonas encefálicas, es fundamental en el desarrollo de la recompensa y del refuerzo producido tanto por gratificantes naturales como por las drogas adictivas (Wise y Bozarth, 1987; Di Chiara e Imperato, 1988; Robbins y Everitt, 1996; Pidoplichko *et al.*, 2004; Di Matteo *et al.*, 2007). Cuando una acción determinada incrementa la libe-

ración de DA en este sistema meso-cortico-límbico, dicha acción tiende a ser repetida, tanto si está relacionada con la supervivencia (alimentación o reproducción), como si es debida a la ingesta de drogas (White, 1996).

En el sistema meso-cortico-límbico, los núcleos tegmental pedunculopontino (TPP) y tegmental laterodorsal (TLD) liberan acetilcolina (ACh) en el ATV. Este neurotransmisor, al igual que la nicotina, se une a los receptores de ACh nicotínicos (nAChR¹) y los activa, lo que produce una liberación de DA en las zonas encefálicas a las que proyecta el ATV, entre las que se encuentran el CP, el NA y la corteza prefrontal (Garzón *et al.*, 1999; Fagen *et al.*, 2003; Pidoplichko *et al.*, 2004; Janhunen y Ahtee, 2007; Fig. 1). Además, en el ATV existe otra población de neuronas de proyección que liberan ácido γ -amino-butírico (GABA) en el TPP, el TLD, el NA, el CP y la corteza prefrontal entre otras áreas cerebrales (Kalivas, 1993; Wonnacott *et al.*, 2005; Janhunen y Ahtee, 2007). A su vez, el TPP, además de las colinérgicas, envía proyecciones GABAérgicas al ATV, al igual que el NA y el CP (Kalivas, 1993; Fagen *et al.*, 2003; Janhunen y Ahtee, 2007). Las neuronas dopaminérgicas del ATV también reciben inputs glutamatérgicos procedentes de la corteza prefrontal y de los núcleos TPP y TLD (Kalivas, 1993; Garzón *et al.*, 1999; Janhunen y Ahtee, 2007; Fig. 1).



¹ Del inglés *nicotinic acetylcholine receptor*.

Figura 1. Áreas básicas del sistema dopaminérgico meso-cortico-límbico implicadas en la adicción a la nicotina y las conexiones entre ellas. Los núcleos tegmental laterodorsal (TLD) y tegmental pedunculopontino (TPP) liberan acetilcolina (ACh; flechas moradas), y glutamato (Glu; flechas rojas), en el área tegmental ventral (ATV). Además, existen conexiones en las que se produce una liberación de ácido γ -amino-butírico (GABA; flechas azules) entre los núcleos TPP/TLD y el ATV y viceversa. Asimismo, el ATV posee proyecciones que liberan dopamina (DA; flechas verdes), y GABA tanto en el núcleo accumbens (NA), como en el caudado-putamen (CP), como en el córtex prefrontal. A su vez, el córtex prefrontal envía axones al CP, al NA y al ATV, donde liberan Glu. El NA y el CP envían proyecciones GABAérgicas al ATV. ca: comisura anterior; cc: cuerpo calloso (modificado de Nestler *et al.*, 2001).

Adicción a la nicotina

El tabaquismo es un grave problema de salud pública mundial, ya que es la principal causa aislada de mortalidad prematura y evitable. Según los datos del Ministerio de Sanidad, Política Social e Igualdad de España (www.msc.es), el tabaquismo está implicado en 1,2 millones de las muertes al año en toda la región europea. De estos fallecimientos, 55.000 se producen en España, la mayoría de ellos como consecuencia de enfermedades pulmonares obstructivas crónicas y por arteriosclerosis coronaria. Asimismo, el hábito de fumar está relacionado con gran parte de los casos de cáncer de boca, tráquea y pulmón, y se cree que puede estar relacionado con el desarrollo de cáncer de colon, estómago, hígado y páncreas, entre otros. Según los datos del Ministerio de Sanidad, Política Social e Igualdad (www.msc.es), en los últimos años se ha detectado un aumento considerable en el número de mujeres adictas al tabaco, mientras que ha descendido de manera notable el número de hombres fumadores. Este hecho probablemente sea debido al cambio socio-cultural ocurrido en las últimas décadas, que podría haber puesto de manifiesto un comportamiento sexualmente dimórfico en la adicción a la nicotina.

Aunque en el tabaco hay gran cantidad de sustancias cuyo papel está solo parcialmente estudiado, está ampliamente aceptado que la nicotina es la principal molécula activa que produce y mantiene la adicción al tabaco (Stolerman y Jarvis, 1995). Por ello, el estudio de los efectos de la nicotina en las zonas cerebrales relacionadas con la adicción y de los diferentes sistemas de neurotransmisores implicados es de gran importancia para el desarrollo de terapias contra el tabaquismo.

La nicotina es un alcaloide psicoestimulante que se encuentra en una amplia variedad de plantas solanáceas, como son la patata, el tomate y el pimiento, y es especialmente abundante en el tabaco (*Nicotiana tabacum* L.1758; Doolittle *et al.*, 1995). Aunque la nicotina puede captarse a través de la mucosa oral, la piel, el tracto gastrointestinal y la vejiga, es en los pulmones donde su absorción es mayor (para una revisión, ver Mathieu-Kia *et al.*, 2002; Yildiz, 2004). La nicotina que se capta en los pulmones se transporta por la sangre, atraviesa la barrera hematoencefálica y llega a las neuronas cerebrales en unos pocos segundos, lo que es característico de las drogas con un elevado potencial de abuso (Quinn *et al.*, 1997). Una vez absorbida, la

nicotina es metabolizada en el hígado para facilitar su eliminación posterior. La expulsión de la nicotina se realiza principalmente mediante la orina, aunque también puede eliminarse por las heces, la bilis, la saliva, los jugos gástricos, el sudor y la leche materna (Yildiz, 2004).

La nicotina induce sensaciones generales de placer y recompensa pero, al igual que otras drogas, también produce potentes efectos desagradables y repulsivos (Shoaib y Stolerman; 1995; Laviolette y van der Kooy, 2004). Los primeros contactos con la nicotina suelen producir efectos nocivos como náuseas, toses y mareos (para una revisión, ver Laviolette y van der Kooy, 2004), mientras que la exposición continuada a la droga induce tolerancia a estos efectos repulsivos, lo que indica que se produce una alteración de los sistemas cerebrales que median los efectos de aversión y/o de recompensa producidos por ella (Iwamoto y Williamson, 1984; Shoaib y Stolerman; 1995; Laviolette y van der Kooy, 2004).

El consumo de nicotina a nivel sistémico produce una elevación del ritmo cardíaco, de la presión sanguínea y del pulso, además de producir un descenso en la temperatura de la piel (Yildiz, 2004). Asimismo, incrementa los ácidos grasos libres en el plasma, la movilización de hidratos de carbono y aumenta en la sangre el nivel de catecolaminas y de hormonas relacionadas con el estrés (Seyler *et al.*, 1984; Benowitz, 1988; Pickworth y Fant, 1998; Yildiz, 2004).

A nivel celular, la nicotina produce un aumento en la síntesis y liberación de adrenalina y noradrenalina en el hipotálamo (Goodman, 1974; Yoshida *et al.*, 1980). También promueve la activación de determinados factores de transcripción y de proteínas de respuesta a choque térmico, así como de la enzima limitante en la síntesis de catecolaminas, la tirosina hidroxilasa (Hahn *et al.*, 1991; Hiremagalur *et al.*, 1993; Slotkin *et al.*, 1997). Además, se ha comprobado que la nicotina induce estrés oxidativo, aberraciones en los cromosomas e intercambio entre cromátidas hermanas (Trivedi *et al.*, 1990, 1993; Maneckjee y Minna, 1994; Doolittle *et al.*, 1995). Asimismo, inhibe o activa tanto la proliferación celular como la apoptosis, dependiendo de la célula sobre la que actúa (Maneckjee y Minna, 1994; Aoshiba *et al.*, 1996; Sugano *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2002; Mudò *et al.*, 2007).

Receptores de acetilcolina nicotínicos

En el sistema nervioso central (SNC) la nicotina ejerce sus efectos mediante su interacción con los nAChR (para una revisión ver Yildiz, 2004; Wonnacott *et al.*, 2005). Estos receptores son canales iónicos de membrana pentaméricos, permeables principalmente al Na⁺, al K⁺ y al Ca²⁺ (Changeux *et al.*, 1984). Los nAChR se activan mediante la unión a un ligando, ya sea endógeno (ACh), o exógeno (p.e. nicotina; Changeux *et al.*, 1984). En el encéfalo de los mamíferos se han identificado hasta ahora seis subunidades α ($\alpha 2$ - $\alpha 7$) y tres β ($\beta 2$ - $\beta 4$) que puedan constituir los nAChR (para una revisión, ver Gotti *et al.*, 1997; Jones *et al.*, 1999; Wonnacott *et al.*, 2005;

Kalamida *et al.*, 2007). Los receptores son muy heterogéneos, y están formados por diferentes combinaciones de subunidades α y β , aunque $\alpha 7$ puede formar receptores homoméricos. Cada uno de los diferentes receptores que se forma tiene propiedades farmacológicas y biofísicas diferentes (Gotti *et al.*, 1997; Jones *et al.*, 1999; Quick y Lester, 2002; Wooltorton *et al.*, 2003; Kalamida *et al.*, 2007). Estas diferencias entre los nAChR, fundamentalmente la afinidad por el agonista y el tiempo de transición entre los diferentes estados conformacionales, son muy importantes en el desarrollo y mantenimiento de la adicción a nicotina (Laviolette y van der Kooy, 2004).

Cuando un agonista –como la ACh o la nicotina– se une al receptor en estado de reposo, induce una transición al modo activado, lo que permite el flujo de iones a través de él. Si la exposición del receptor al agonista es prolongada, aquél entra lentamente en el estado desensibilizado, siendo incapaz de responder al agonista (Krauss *et al.*, 2000).

Diversos estudios han comprobado que tanto los nAChR heteroméricos formados por las subunidades $\alpha 4$ y $\beta 2$, así como los homoméricos $\alpha 7$ son fundamentales en el proceso de adicción a la nicotina (para una revisión ver Laviolette y van der Kooy, 2004). Estos receptores presentan unas diferencias importantes: mientras que los formados por las subunidades $\alpha 4$ y $\beta 2$ tienen una afinidad alta por la nicotina y se desensibilizan rápidamente, los receptores constituidos exclusivamente por $\alpha 7$ tienen menos afinidad por la droga y un grado menor de desensibilización que aquéllos (Pidoplichko *et al.*, 1997; Mansvellder *et al.*, 2002; Wooltorton *et al.*, 2003). Esta divergencia es vital en los diferentes efectos de la nicotina a corto y a largo plazo (Laviolette y van der Kooy, 2004; Wonnacott *et al.*, 2005; ver más adelante).

Mecanismo de acción de la nicotina

En el ATV, tanto las neuronas como las proyecciones que llegan de las diversas zonas encefálicas presentan una gran variedad de nAChR (para una revisión ver Wonnacott *et al.*, 2005; Janhunen y Ahtee, 2007; Fig. 2). Los estudios de distribución de los nAChR del ATV han demostrado que, en las células GABAérgicas, están formados en su mayoría por las subunidades $\alpha 4$ y $\beta 2$ (Klink *et al.*, 2001; Keath *et al.*, 2007). Por el contrario, las células dopaminérgicas del ATV poseen una complejidad mayor en la composición de los nAChR: además de las subunidades $\alpha 4$ y $\beta 2$, los receptores pueden contener $\alpha 5$ y $\alpha 6$ (Klink *et al.*, 2001; Champtiaux *et al.*, 2003; Wooltorton *et al.*, 2003). También se han identificado receptores homoméricos formados por subunidades $\alpha 7$ tanto en las neuronas dopaminérgicas como en las GABAérgicas de esta región (Klink *et al.*, 2001; Wooltorton *et al.*, 2003). Asimismo, los terminales glutamatérgicos que proyectan en el ATV, en el NA y en el CP también

presentan los pentámeros de $\alpha 7$ presinápticamente (Kaiser y Wonnacott, 2000; Mansvelder y McGehee, 2000; Schilström *et al.*, 2000, 2003; Wonnacott *et al.*, 2005; Keath *et al.*, 2007).

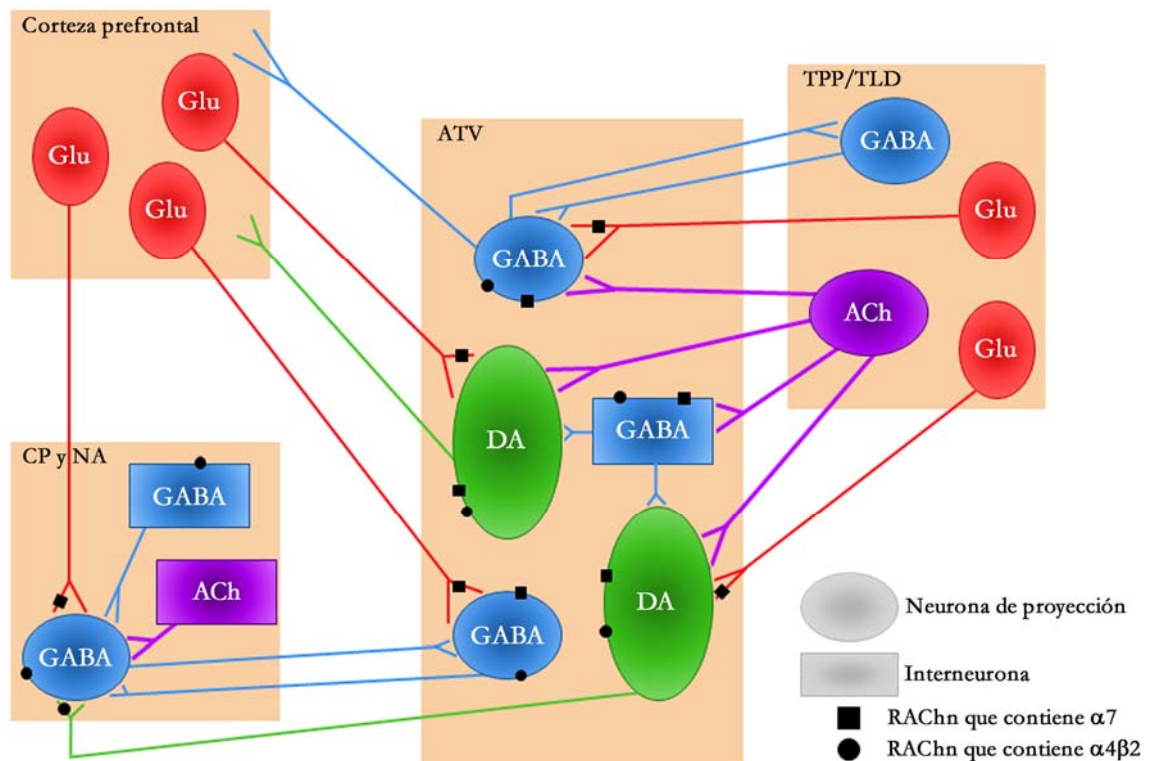


Figura 2. Esquema simplificado de las conexiones entre las principales zonas encefálicas implicadas en la adicción a la nicotina. Las conexiones más importantes entre estas áreas contienen acetilcolina (ACh), dopamina (DA), ácido γ -amino-butírico (GABA) o glutamato (Glu). Se incluye la localización de los receptores de ACh nicotínicos (nAChR) que contienen la subunidad $\beta 2$ y $\alpha 4$ (círculo negro) y los pentámeros de $\alpha 7$ (cuadrado negro), tanto en neuronas de proyección (somas ovalados), como en las interneuronas (somas rectangulares). Estos receptores pueden tener localización pre- o post-sináptica. ATV: área tegmental ventral; CP: caudado-putamen; NA: núcleo accumbens; TLD: núcleo tegmental laterodorsal; TPP: núcleo tegmental pedunculopontino (modificado de Wonnacott *et al.*, 2005).

Se ha comprobado que los efectos agudos de la nicotina en el ATV afectan predominantemente a las neuronas GABAérgicas. Como se ha mencionado previamente, en dichas neuronas los nAChR son mayoritariamente aquellos que contienen $\alpha 4$ y $\beta 2$, los cuales se desensibilizan rápidamente (Wooltorton *et al.*, 2003; Wonnacott *et al.*, 2005). Inicialmente, cuando estos receptores se activan, la neurona libera GABA, inhibiendo a las células post-sinápticas con las que contacta. Una vez que estos receptores localizados en las células GABAérgicas se desensibilizan y, por lo tanto, se elimina la influencia inhibitoria del GABA, se produce una excitación prolongada de las neuronas que liberan DA (Mansvelder *et al.*, 2002). Al mismo tiempo, se produce una potenciación de la señal mediada por glutamato (Glu) a las neuronas dopaminérgicas. Este hecho se debe a que los terminales presinápticos glutamatergicos que inervan el ATV también poseen los nAChR homoméricos de $\alpha 7$. Como se

ha mencionado, estos nAChR formados exclusivamente por la subunidad $\alpha 7$, muestran una menor afinidad por la nicotina y un menor grado de desensibilización después de la exposición a la droga que aquéllos formados por $\alpha 4$ y $\beta 2$ (Pidoplichko *et al.*, 1997; Mansvelder *et al.*, 2002; Wooltorton *et al.*, 2003).

Funcionalmente, en el ATV la activación de las interneuronas GABAérgicas al principio del contacto con la droga inhibe las neuronas de proyección dopaminérgicas. Con exposiciones continuadas a la nicotina y la consiguiente desensibilización de los nAChR localizados en las células GABAérgicas, la droga “evita” estas células inhibitorias y produce un cambio en el balance entre las señales GABAérgicas y dopaminérgicas en el ATV, activando la liberación de DA en las regiones a las que las neuronas dopaminérgicas envían los axones (Laviolette y van der Kooy, 2004).

Los terminales dopaminérgicos que llegan al NA y al CP interactúan en dichos núcleos con los axones de neuronas de proyección excitatorias procedentes de la corteza, el hipocampo y la amígdala, que proporcionan la mayor entrada de información a estos núcleos estriatales (Hyman y Malenka, 2001). Dichas proyecciones suministran información detallada sobre los estados fisiológicos y emocionales del individuo, por lo que la plasticidad sináptica en el NA y el CP contribuye a la adicción mediante la consolidación de los comportamientos de deseo, búsqueda e ingesta de la droga (Hyman y Malenka, 2001). Sin embargo, la codificación de la información específica sobre las señales no parece depender sólo de la DA. De hecho, hay gran cantidad de evidencias de que la DA interactúa con el Glu procedente de zonas corticales en el NA y el CP, induciendo cambios en el comportamiento (Kalivas, 1995; Hu y White, 1997; Kelley *et al.*, 1997; Wolf, 1998; Hyman y Malenka, 2001; Jain *et al.*, 2008a; Mao y MacGehee, 2010).

Plasticidad neuronal en la sensibilización a la nicotina

La adicción a las drogas es un fenómeno comportamental complejo, que se produce tanto en humanos como en animales como consecuencia de una exposición repetida a la droga, que modifica la actividad y el metabolismo de las neuronas y circuitos que son sensibles a ella (para una revisión ver Jain *et al.*, 2008a; Mao y MacGehee, 2010). Puesto que la adicción es un estado que se mantiene durante mucho tiempo, si no para siempre, gran cantidad de investigaciones se centran en el estudio de los mecanismos moleculares que pueden ser los responsables de su perdurabilidad (Hyman y Malenka, 2001).

La reorganización de los circuitos neurales producida por estímulos naturales o por drogas puede ocurrir por diversos mecanismos generales. La plasticidad sináptica puede ser el resultado de cambios en la tasa de liberación de neurotransmisores, en los receptores o en la señalización mediada por los receptores. Igualmente, los cambios en la excitabilidad de las neuronas podrían ser consecuencia de cambios en las propiedades o en la cantidad de los canales iónicos. Alternativamente, se pueden

producir cambios morfológicos, como son la generación de nuevas conexiones sinápticas o la eliminación de algunas preexistentes (Hyman y Malenka, 2001). En el desarrollo de la adicción es fundamental el estudio de la plasticidad en el mesencéfalo, el NA y el CP (Hyman y Malenka, 2001); y es en lo que nos vamos a centrar en esta Introducción.

Como se ha mencionado previamente, la administración puntual de nicotina provoca una activación de los receptores colinérgicos, tanto de las células del ATV como de las proyecciones que llegan a dicho núcleo y, como consecuencia, se induce la liberación de DA en los núcleos a los que proyecta el ATV. La sensibilización a nicotina con tratamientos de inyecciones diarias de la droga, como el empleado en este Trabajo de Tesis Doctoral, provocan un incremento gradual en la respuesta a la droga en exposiciones posteriores a la misma, manteniéndose esta sensibilización incluso después de un largo periodo de abstinencia (Mao y MacGehee, 2010). Tras un periodo de sensibilización, una nueva dosis de nicotina origina un aumento en la respuesta motora, así como un incremento en el número de neuronas del ATV y de la sustancia negra que disparan un potencial de acción. Como consecuencia, se produce una elevación de la DA liberada en sus áreas de proyección, incluidos el CP y el NA (para una revisión ver Balfour, 2004; Ulusu *et al.*, 2005; Jain *et al.*, 2008a; Mao y MacGehee, 2010). Asimismo, la nicotina también altera otros sistemas de neurotransmisores que, a su vez, pueden modificar la liberación de DA indirectamente, como es el caso del Glu (Hong *et al.*, 2006; Jain *et al.*, 2008a,b). De hecho, se ha comprobado que la estimulación de los receptores de *N*-metil-*D*-aspartato de Glu (NMDAR²) en las neuronas dopaminérgicas incrementa la cantidad de neuronas del ATV y de la sustancia negra que generan potenciales de acción (Chergui *et al.*, 1993). Asimismo, la administración de antagonistas del NMDAR previamente a la administración de nicotina no sólo atenúa o inhibe la liberación de DA en las zonas a las que proyectan dichos núcleos, sino que también previene la sensibilización a la misma (Shoaib *et al.*, 1994; Schilström *et al.*, 1998; Shim *et al.*, 2002; Hong *et al.*, 2006).

Además de su acción sobre el sistema dopaminérgico, el Glu puede aumentar la liberación de óxido nítrico (NO³) producido por la sintasa del óxido nítrico (NOS⁴). Cuando el Glu estimula los NMDAR se produce una elevación de Ca²⁺ intracelular que activa la isoforma neuronal de la NOS, la NOS1, estimulando la producción de NO lo que, a su vez, provoca un incremento en la concentración extracelular de Glu y DA (Hirsch *et al.*, 1993; Montague *et al.*, 1994; Pögün *et al.*, 1994a,b; Sequeira *et al.*, 1997; Kiss y Vizi, 2001; Hong *et al.*, 2006). Así, esta molécula también se ha relacionado con los cambios inducidos por la acción de la nicotina tanto a nivel encefálico como comportamental (para una revisión ver Hong *et al.*,

² Del inglés *N-metil-D-aspartate receptor*.

³ Del inglés *nitric oxide*.

⁴ Del inglés *nitric oxide synthase*.

2006; Jain *et al.*, 2008a,b). De hecho, el NO promueve la liberación de DA además de inhibir su recaptación, incrementando así la cantidad de DA extracelular (London *et al.*, 1996). Es más, se ha comprobado que el empleo de inhibidores de la NOS previamente a las inyecciones con nicotina, inhibe el desarrollo de sensibilización a la droga (Shim *et al.*, 2002).

Es decir, tanto la DA como el Glu y el NO son necesarios para inducir la sensibilización a la nicotina. Además, la variación de estos tres neurotransmisores en el ES se produce en el mismo sentido: una vez sensibilizado el animal a la nicotina, una nueva dosis de la droga provoca un aumento de DA y Glu. El Glu a su vez estimula la liberación de NO, incrementando así los niveles de DA y Glu extracelular (para una revisión ver Balfour, 2004; Ulusu *et al.*, 2005; Jain *et al.*, 2008a; Mao y MacGehee, 2010).

El caudado-putamen y el núcleo accumbens

El ES, junto con el globo pálido, la sustancia negra y el núcleo subtalámico conforman una estructura denominada ganglios basales. Se ha comprobado que los ganglios basales son muy importantes en el comportamiento motor, emocional, cognitivo y de recompensa. Además, cuando existen alteraciones en alguno de los núcleos que forman los ganglios basales se producen diferentes patologías, como las enfermedades de Parkinson y Huntington, distonías y desórdenes obsesivo-compulsivos, entre otros (para una revisión, ver Utter y Basso, 2008).

El ES está formado por varios núcleos encefálicos con características muy similares en su organización anatómica entre primates y roedores (Parent, 1986). La principal diferencia consiste en que el estriado de primates contiene un núcleo caudado y un núcleo putamen estructuralmente diferentes, en tanto que en los roedores esta división no existe, por lo que esta estructura se denomina neostriado o caudado-putamen en todo su conjunto (Parent, 1986). Además, tanto el estriado de los primates como el de los roedores posee una extensión ventral, el NA (Nauta, 1979).

La implicación del NA en los mecanismos de refuerzo y de recompensa de las drogas es bien conocido (para una revisión Berke y Hyman, 2000; Hyman y Malenka, 2001; Koob y Le Moal, 2001; Everitt y Wolf, 2002). Como previamente se ha mencionado, el NA y sus proyecciones recíprocas con el ATV son los componentes primarios de la vía dopaminérgica meso-cortico-límbica, que está implicada en la respuesta al carácter de recompensa producido por las drogas de abuso (Hyman y Malenka, 2001). Por el contrario, el CP o estriado dorsal es más conocido por su papel en la producción de movimientos y por su implicación en desórdenes motores (Albin *et al.*, 1995). Sin embargo, en los últimos años diversos estudios han mostrado que el CP está implicado en otras funciones motoras diferentes al control de los movimientos. Entre estas funciones se incluyen el control de la atención, el aprendizaje y la ejecución de secuencias de comportamiento que producen una respuesta

eficiente a un estímulo (Alexander *et al.*, 1986; Calabresi *et al.*, 1997; Berke y Hyman, 2000; 2001; Hyman y Malenka, 2001; Koob y Le Moal, Everitt y Wolf, 2002). De acuerdo con esta última función, se ha propuesto que el CP estaría implicado en las etapas más avanzadas en el desarrollo de la adicción, cuando el uso de la droga comienza a ser compulsivo. En este estado es cuando el individuo empieza a mostrar un comportamiento encaminado en su mayoría a la búsqueda de droga (Gerdeman *et al.*, 2003). Además, parece que las alteraciones en la función del NA inducidas por las drogas de abuso facilitan la plasticidad sináptica en el CP, debido a la modificación del flujo de información a través de los ganglios basales (Gerdeman *et al.*, 2003).

Aunque la naturaleza de las conexiones es diferente en el CP y el NA, la organización interna y la histología no varían entre ambas zonas (para una revisión, ver Mitchell *et al.*, 1999; Gerdeman *et al.*, 2003), por lo que las describiremos conjuntamente.

La organización anatómica y funcional del ES puede ser descrita desde varias perspectivas. Un nivel de organización se basa en la naturaleza topográfica de las aferencias corticales glutamatérgicas y mesencefálicas dopaminérgicas, que sinaptan sobre las células de proyección, las **neuronas espinosas medianas** (MSN⁵). Diversos circuitos, anatómicamente distintos y funcionalmente separados, unen áreas específicas de la corteza cerebral, los ganglios basales y el tálamo. Esto se lleva a cabo mediante la integración de sus señales por las MSN y las interneuronas modulatorias del ES (Mitchell *et al.*, 1999). Está aceptado que el córtex le suministra información específica del contexto temporal y espacial a las MSN mediante aferencias glutamatérgicas (Mitchell *et al.*, 1999). Por el contrario, las señales dopaminérgicas llevarían una información menos específica, funcionando como señales de refuerzo o señales de error (Servan-Schreiber *et al.*, 1990; Mitchell *et al.*, 1999).

Otro nivel de organización del ES se debe a la existencia de dos compartimentos interdigitalizados: la matriz, que ocupa el 85% del volumen del ES, y los parches o estriosomes (Johnston *et al.*, 1990). Estos dos compartimentos tienen una composición celular similar, pero se diferencian en sus aferencias y eferencias, además de en su contenido neuroquímico (Mitchell *et al.*, 1999).

Elementos neuronales

Está ampliamente aceptado que la composición neuronal del ES es de 90 – 95% de células de proyección, mientras que el restante 10 – 5% son interneuronas modulatorias (Mitchell *et al.*, 1999; Gerdeman *et al.*, 2003).

⁵ Del inglés *medium spiny neurons*.

Neuronas de proyección

Las neuronas de proyección del ES son las MSN. Estas células se caracterizan por ser GABAérgicas, tener un soma de 10 – 20 μm de diámetro y un árbol dendrítico amplio y con gran cantidad de espinas (Park *et al.*, 1980; Preston *et al.*, 1980). Además, se ha comprobado que las MSN pueden estar acopladas eléctricamente mediante uniones tipo *gap* (O'Donnell y Grace, 1993; Venance *et al.*, 2004). Estas neuronas muestran niveles muy bajos de descargas espontáneas y se mantienen en un estado hiperpolarizado. Dicho estado cambia principalmente al recibir señales excitatorias fuertes desde la corteza, cuando las MSN disparan y suprimen la actividad de las neuronas a las cuales proyectan (Kawaguchi *et al.*, 1995; Kawaguchi, 1997; Venance *et al.*, 2004).

En el ES se han identificado dos subtipos de MSN en base a sus proyecciones axonales (Kawaguchi *et al.*, 1990; Mitchell *et al.*, 1999):

- a) La “vía directa” o “estriato-peduncular” la constituye un tipo de neuronas que contactan con la sustancia negra y el núcleo entopeduncular (segmento interno del globo pálido en primates).
- b) La “vía indirecta” o “estriato-palidal” está formada por MSN que mandan sus proyecciones principalmente al globo pálido (llamado segmento externo del globo pálido en primates).

Aunque todas las MSN son GABAérgicas, aquellas MSN del CP que conectan con la sustancia negra y el núcleo entopeduncular emplean sustancia P y dinorfina además de GABA. Por otro lado las que proyectan al globo pálido también emplean encefalina como neuromodulador (Gerfen y Young, 1988; Graybiel, 1990, 1991).

El NA, además de contener las neuronas de proyección de las vías “directa” e “indirecta”, también contiene MSN que proyectan al globo pálido ventral, pero éstas pueden contener tanto sustancia P y dinorfina como encefalina (Haber *et al.*, 1990).

Interneuronas

Se han identificado cuatro clases principales de interneuronas estriatales en base a su morfología, su contenido neuroquímico y sus propiedades fisiológicas (Kawaguchi *et al.*, 1995). Estas interneuronas regulan la actividad de las MSN y carecen de espinas o son muy escasas. Se clasifican como: a) interneuronas colinérgicas; b) interneuronas GABAérgicas que contienen la proteína ligante de calcio parvalbúmina (PV); c) interneuronas GABAérgicas que contienen la NOS1 o la actividad enzimática nicotinamida adenín-dinucleótido fosfato reducido–diaforasa (NADPH) que está asociada ella; y d) interneuronas GABAérgicas que contienen la proteína ligante de calcio calretinina (CR).

a) **Interneuronas colinérgicas.** Son las mejor estudiadas del ES y se identifican por la presencia de la enzima colín-acetil transferasa (ChAT). Estas células forman el 1-3% de las neuronas estriatales. Tienen somas poligonales o fusiformes de un diámetro de 20 – 50 μm . Estas neuronas poseen de 2 – 5 dendritas primarias muy ramificadas que se extienden 600 μm en torno al soma (Kawaguchi, 1993). Las interneuronas colinérgicas se encuentran preferentemente en la matriz, donde se ramifican sus axones, en tanto que sus dendritas cruzan también a los estriosomas (Graybiel *et al.*, 1986; Kawaguchi, 1992). La mayoría de sus contactos sinápticos son con las MSN, aunque también reciben *inputs* dopaminérgicos (Kawaguchi *et al.*, 1995; Calabresi *et al.*, 2000). Este tipo de interneuronas expresa el receptor D₂ de DA, por lo que se inhiben cuando reciben señales dopaminérgicas (Kawaguchi *et al.*, 1995). Estas células también contienen el receptor NK-1 de sustancia P, por lo que pueden liberar ACh en respuesta a la emisión de dicho péptido por las fibras colaterales de las MSN (Kawaguchi *et al.*, 1995).

b) **Interneuronas GABAérgicas** que contienen la proteína ligante de calcio **PV**. Estas células constituyen el 3 – 5% de las neuronas estriatales (Cowan *et al.*, 1990; Kita *et al.*, 1990; Kita, 1993). Tienen un tamaño de 10 – 35 μm y dendritas que arborizan en un espacio de 200 – 300 μm alrededor del soma. Además, presentan gran cantidad de colaterales axónicos, algunos de los cuales forman cestas alrededor de los somas de las MSN (Kita *et al.*, 1990; Bennett y Bolam, 1994; Kawaguchi *et al.*, 1995, Kawaguchi, 1997). Los somas y las prolongaciones de este tipo de interneuronas se localizan tanto en la matriz como en los estriosomas (Cowan *et al.*, 1990; Kita *et al.*, 1990). Además de realizar sinapsis químicas inhibitorias entre ellas, también están conectadas por uniones tipo gap, lo que permite la despolarización sincronizada de las células que estén interconectadas (Chang y Kita, 1992; Kita, 1993). Asimismo, reciben *inputs* excitatorios de la corteza cerebral (Kita, 1993). Se considera que este tipo celular es el responsable de la mayor parte de la inhibición de las MSN (Kita 1993).

c) **Interneuronas GABAérgicas** que contienen la **NOS1** o la actividad enzimática NADPH-diaforasa que está asociada ella. Son el 1 – 2% de las neuronas del ES. Su diámetro varía entre 12 – 25 μm y su soma es poligonal o fusiforme. Estas neuronas poseen menos ramificaciones dendríticas que las colinérgicas, aunque sus prolongaciones se extienden por un campo más amplio (hasta 1000 μm ; Kawaguchi, 1993; Kawaguchi *et al.*, 1995; Hidaka y Totterdell, 2001). Además, estas células también contienen somatostatina y neuropéptido Y (Vincent *et al.*, 1983; Kawaguchi, 1997). También expresan el receptor NK-1 de sustancia P, por lo que pueden responder a la emisión de dicho neurotransmisor por los colaterales axónicos de las MSN de la “vía directa” (Kawaguchi *et al.*, 1995). Asimismo, un 20% de ellas contienen la proteína ligante de calcio calbindina D28-k (CB; Bennett y Bolam, 1993). Sus

somas se localizan tanto en la matriz como en los estriosomes y sus dendritas cruzan ambos compartimentos (Gerfen, 1984; Kawaguchi *et al.*, 1995).

Se ha comprobado que estas células realizan contactos sinápticos con terminales axónicos que contienen NOS1, pertenecientes probablemente a otras interneuronas productoras de NO (French *et al.*, 2005). También realizan contactos sinápticos con interneuronas estriatales colinérgicas y con las que contienen PV (Vuillet *et al.*, 1992; Morello *et al.*, 1997). Asimismo, se ha observado que también reciben señales glutamatérgicas desde la corteza, así como dopaminérgicas del ATV y la sustancia negra (Aoki y Pickel 1988; Vuillet *et al.*, 1989).

Además, las interneuronas del ES que expresan la NOS1 realizan sinapsis sobre las espinas dendríticas de las MSN que reciben *inputs* glutamatérgicos y dopaminérgicos (Hidaka y Totterdell, 2001). Es más, se ha comprobado que dichas MSN contienen niveles elevados de la principal diana del NO, la enzima guanilato ciclasa soluble (GCs), así como otros componentes del sistema de señalización por guanósil monofosfato cíclico (GMPc; Ariano, 1983; Hidaka y Totterdell, 2001). Esta gran proximidad sugiere que la transmisión nitrérgica puede jugar un papel muy importante en la modulación de la respuesta de las MSN a las aferencias que reciben dichas neuronas de proyección (para una revisión, ver West *et al.*, 2002). De hecho, se ha comprobado que la señalización por NO-GCs modula la plasticidad sináptica cortico-estriatal *in vitro* (Calabresi *et al.*, 1999) y la excitación inducida por Glu *in vivo* (Di Giovanni *et al.*, 2003). Asimismo, diversos estudios demuestran que las neuronas NOS1+ del ES reciben sinapsis asimétricas de terminales glutamatérgicos, y se ha comprobado que expresan tanto los NMDAR como los receptores de ácido α -amino-3-hidroxi-5-metiloxazol-4-propiónico (AMPA) y receptores metabotrópicos de glutamato (Vuillet *et al.*, 1989; Gracy y Pickle, 1997; Kawaguchi, 1997; Nishi *et al.*, 2005). De hecho, se ha comprobado que la estimulación eléctrica de las aferencias cortico-estriatales producen un aumento de NO en el ES mediante mecanismos dependientes de los NMDAR y la NOS1 (Sammur *et al.*, 2007b). Es más, la infusión de NMDA en el ES es capaz también de producir la liberación de NO en experimentos *in vivo* (Crespi y Rossetti, 2004; Rossetti y Crespi, 2004).

Una vez que se sintetiza el gas, éste difunde desde las interneuronas NOS1+ a las neuronas vecinas y a las células de los vasos sanguíneos, donde activa la GCs aumentando el GMPc (Garthwaite, 2008). Esta señalización mediada por NO-GMPc en el ES tiene gran cantidad de efectos sobre proteínas kinasas y fosfodiesterasas, incrementando la excitabilidad de las MSN y promoviendo la sincronización de su actividad, así como la transmisión cortico-estriatal (O'Donnell y Grace, 1997; Greengard *et al.*, 1999; West y Grace, 2004; Calabresi *et al.*, 2007). Es decir, el NO actuaría amplificando y sincronizando las señales glutamatérgicas procedentes de la corteza encefálica (Saul'skaya *et al.*, 2010).

Además de las señales glutamatérgicas, las interneuronas del ES que contienen la NOS1 están inervadas fuertemente por terminales dopaminérgicos (Hidaka y Totterdell 2001). De hecho, diversos experimentos muestran que esta población de interneuronas expresa los receptores de DA del tipo D₁/D₅ (Le Moine *et al.*, 1991; Rivera *et al.*, 2002; Centonze *et al.*, 2003a). Asimismo, la estimulación tanto eléctrica como química de la sustancia negra, así como la administración sistémica de agonistas de los receptores D₁/D₅, provocan un incremento en la liberación de NO por un mecanismo dependiente de dichos receptores y de la NOS1 (Sammur *et al.*, 2006).

Al contrario que los receptores D₁/D₅, los receptores D₂ no se han localizado en las neuronas NOS1+ del ES, sino en los terminales glutamatérgicos (García-Muñoz *et al.*, 1991; Wang y Pickel, 2002; Bamford *et al.*, 2004; Hoque *et al.*, 2010). Diversos estudios han comprobado que la activación del receptor D₂ disminuye tanto la excitabilidad de dichos terminales como la liberación de Glu (García-Muñoz *et al.*, 1991; Wang y Pickel, 2002; Bamford *et al.*, 2004; Hoque *et al.*, 2010). Además, la producción de NO en el ES inducida por agonistas de los receptores D₁/D₅ se ve atenuada por la administración de agonistas del receptor D₂ (Morris *et al.*, 1997; Sammur *et al.*, 2007a). Así, se ha propuesto que la DA modularía la actividad de la NOS1 en el ES mediante dos vías, una facilitadora, por la activación de los receptores tipo D₁/D₅, y otra inhibitoria por la activación de los receptores D₂ (Hoque *et al.*, 2010). Además, se ha comprobado que la activación de los receptores D₁/D₅ potencia las respuestas inducidas por NMDA en las neuronas del ES (Cepeda y Levine 1998; 2006). Asimismo, se ha propuesto que la acción facilitadora de los receptores D₁/D₅ sobre la actividad del NMDAR tendría un papel crítico en la regulación de la síntesis del NO en el ES (Hoque *et al.*, 2010).

Otra actuación importante del NO producido por estas interneuronas estriatales es regular la respuesta de las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas que proyectan al ES (Iravani *et al.*, 1998; West y Grace, 2000). Más aún, esta regulación del NO sobre el sistema dopaminérgico es diferente en distintas sub-regiones del ES (Iravani *et al.*, 1998).

En resumen, en el ES la producción de NO por las interneuronas que contienen NOS1 requiere tanto la activación de los NMDAR como de los receptores D₁/D₅, y disminuye cuando se estimulan los receptores D₂. A su vez, el NO liberado actuaría fundamentalmente regulando la actividad de las neuronas principales del ES (las MSN), incrementando su excitabilidad y sincronizándolas. Por lo tanto, cualquier cambio en la producción de NO modificaría la actividad de las MSN. Esto implica que la señalización por NO juega un papel importante en la integración de la información transmitida desde el ES a los centros a los cuales proyecta mediante las vías cortico-estriatales y las eferencias estriatales (West y Grace, 2000).

d) **Interneuronas GABAérgicas** que contienen **CR**. Esta población neuronal es muy escasa y está muy poco estudiada. Sólo se sabe que tienen un tamaño medio (entre 10 – 35 μm) y en la rata se localizan en las zonas rostro-mediales del CP (Jacobowitz y Winsky, 1991).

Conexiones del estriado

Aferencias

Las aferencias que llegan al ES proceden principalmente de tres áreas: el córtex, el mesencéfalo y el tálamo (Mitchell *et al.*, 1999; Mohn *et al.*, 2004). Tanto las proyecciones meso-límbicas dopaminérgicas como las glutamatérgicas procedentes de la corteza cerebral y del tálamo convergen y son integradas en las MSN del CP y del NA. El Glu proporciona la mayor parte del *input* excitatorio a las MSN, transmitiendo mensajes específicos regulados temporal y espacialmente. Por el contrario, la DA sirve como un modulador del tono excitatorio, sirviendo como señal de refuerzo (Mitchell *et al.*, 1999; Mohn *et al.*, 2004). Además de contactar con las MSN, dichas aferencias también contactan con distintas interneuronas del ES, lo que induce que éstas modulen la respuesta de las MSN a los distintos *inputs* de forma muy precisa y posibilitando diversos mecanismos de plasticidad sináptica, como la potenciación a largo plazo (LTP⁶) y la depresión a largo plazo (LTD⁷; Di Filippo *et al.*, 2009).

La mayor cantidad de información que le llega al ES procede de la **corteza cerebral**. Prácticamente todas las áreas corticales, incluido el hipocampo y el núcleo basal de la amígdala, proyectan a esta estructura (Nauta y Domesick, 1984; Goldman-Rakic y Selemon, 1990). Estas neuronas cortico-estriatales son glutamatérgicas y sinaptan principalmente sobre las MSN (Bouyer *et al.*, 1984). Las fibras cortico-estriatales están organizadas topográficamente, de manera que cada área estriatal recibe *inputs* procedentes preferentemente de un área determinada de la corteza (McGeorge y Faull, 1989). Sin embargo, existe un solapamiento considerable en los campos terminales de dichas aferencias, lo que “asegura” que cada área estriatal reciba información de más de una zona cortical (Selemon y Goldman-Rakic, 1985; Goldman-Rakic y Selemon, 1990).

Algunas neuronas dopaminérgicas del **mesencéfalo** también inervan todas las áreas del ES. En general, se piensa que el NA recibe *inputs* dopaminérgicos del ATV. Sin embargo, el CP es inervado principalmente por las neuronas que se encuentran en la *pars compacta* de la sustancia negra, aunque también reciba información del ATV (Nauta y Domesick, 1984; Oades y Halliday, 1987; Di Chiara e Imperato, 1988).

⁶ Del inglés *long-term potentiation*.

⁷ Del inglés *long-term potentiation*.

Una tercera fuente de aferencias al ES procede del **tálamo**. El CP recibe fibras desde los núcleos centromediano-parafascicular del complejo intralaminar y de los núcleos talámicos intralaminares rostrales. Por su parte, el NA también recibe *inputs* desde los núcleos intralaminares y de los núcleos de la línea media (Groenewegen *et al.*, 1980; Druga *et al.*, 1991). Además, el NA recibe información procedente de la amígdala (LeDoux, 2007)

Las interneuronas del ES también reciben información de otras zonas encefálicas. En el CP, las proyecciones del córtex realizan contactos sinápticos sobre las interneuronas que contienen PV, ACh y NOS1, mientras que el hipocampo contacta con las que expresan NOS1 (Vuillet *et al.*, 1989; Lapper y Bolam, 1992; Bennett y Bolam, 1994, French *et al.*, 2005). Además, se ha visto que los axones procedentes del tálamo también contactan con las células colinérgicas (Lapper y Bolam, 1992). Por otro lado, en el NA, tanto los *inputs* procedentes del hipocampo como del tálamo sinaptan sobre interneuronas colinérgicas, mientras que la amígdala proyecta sobre células que contienen PV (Meredith y Wouterlood, 1990). También se ha comprobado que hay fibras procedentes del hipocampo que contactan con las células del NA que contienen NOS1 (French *et al.*, 2005).

Eferencias

Las principales zonas de proyección de las MSN de los roedores son el globo pálido, el núcleo entopeduncular y la *pars reticulata* de la sustancia negra (Nauta, 1979). Se ha encontrado un patrón de inervación similar en los primates (Parent *et al.*, 1984).

Las MSN **estriato-pedunculares** y las **estriato-palidales** son dos vías complementarias mencionadas previamente, llamadas “directa” e “indirecta” respectivamente (Penney y Young, 1986). Esta terminología refleja el hecho de que el núcleo entopeduncular es la principal vía de eferencia de los ganglios basales hacia el tálamo. Por lo tanto, las neuronas estriato-pedunculares pueden influir en la salida de información de los ganglios basales directamente. Las MSN estriato-palidales también pueden alterar la salida de información desde el núcleo entopeduncular mediante una ruta indirecta. Estas MSN sinaptan primero con las neuronas palidales que proyectan al núcleo subtalámico, y éste a su vez realiza conexiones con el núcleo entopeduncular (Smith *et al.*, 1998).

El hecho de que existan diferentes vías es importante, puesto que las MSN expresan diferentes subtipos del receptor de DA dependiendo de la vía a la que pertenezcan. Las neuronas estriato-pedunculares expresan preferentemente receptores D₁/D₅, induciendo su excitación cuando reciben DA. Las estriato-palidales tienen receptores D₂, cuya activación por la DA produce la inhibición de la neurona (Gerfen *et al.*, 1990). Además, se ha demostrado que los receptores D₃, que también son inhibitorios, se encuentran en las MSN del NA pero no del CP (Kawaguchi, 1997).

Otra diferencia entre las dos vías es que responden de manera diferente ante una estimulación colinérgica: los agonistas colinérgicos estimulan las MSN estriato-palidales pero inhiben las estriato-pedunculares (Harrison *et al.*, 1996). Se ha postulado que esto se debe a una localización diferencial de diversos subtipos de receptores colinérgicos muscarínicos (Harrison *et al.*, 1996). Además, se ha comprobado que las neuronas de la “vía indirecta” expresan el subtipo A_{2a} del receptor de adenosina, mientras que las MSN de la “vía directa” no lo hacen (Ferré *et al.*, 1993).

Organización morfo-funcional del estriado

Tradicionalmente, la clasificación de diversas zonas del ES –tanto en el CP como en el NA– en matriz o estriosoma se basó en el contenido neuroquímico de estos dos compartimentos interdigitalizados: la matriz está enriquecida en la proteína CB, en somatostatina y en acetilcolinesterasa, mientras que el receptor de opiáceos μ sólo se encuentra en los estriosomas (Herkenham y Pert, 1981; Gerfen, 1984; Kawaguchi, 1997). Otra de las diferencias importantes entre ambos compartimentos son sus conexiones con otros centros encefálicos. Las proyecciones corticales que llegan a los estriosomas proceden principalmente de las cortezas prelímbica, infra-límbica, orbital y cingulada anterior; las que llegan a la matriz provienen de las áreas motoras, somatosensoriales y del córtex cingulado posterior (Gerfen, 1989; Bayer, 1990; Canales, 2005). Además, las proyecciones dopaminérgicas que llegan al ES también muestran una zonación: la información límbica proveniente de los ganglios basales se dirigen a los estriosomas, en tanto que la sensorimotora llega fundamentalmente a la matriz (Canales, 2005). De igual forma, las principales dianas de las MSN del estriosoma son las células dopaminérgicas de la sustancia negra, mientras que las de la matriz inervan el globo pálido, el núcleo entopeduncular y la *pars reticulata* de la sustancia negra (Gerfen *et al.*, 1985).

Además de tener los mismos compartimentos que el resto del ES, es decir la matriz y los parches, el NA posee una organización más compleja que el CP. El NA puede subdividirse en varios territorios principales: “el núcleo⁸” y “la cubierta⁹”. Ésta última tiene una extensión rostral también denominada “polo rostral”.

La división del NA en núcleo y cubierta se realiza fundamentalmente en base a sus conexiones, especialmente de sus proyecciones (Voorn *et al.*, 2004). Por ejemplo, las fibras hipocampales y parahipocampales inervan tanto el núcleo como la cubierta, pero mientras que las parahipocampales abundan más en el núcleo, las hipocampales lo hacen más en la cubierta (Voorn *et al.*, 2004). Igualmente, diversas zonas del ATV inervan preferencialmente ciertas áreas del núcleo o de la cubierta (Usuda *et al.*, 1998). En cuanto a sus proyecciones, el núcleo posee las inervaciones estriato-palidales y estriato-pedunculares (Usuda *et al.*, 1998). La cubierta, además de

⁸ Core en inglés.

⁹ Shell en inglés.

estas vías, proyecta a las áreas hipotalámica lateral y preóptica lateral, así como a diversas áreas mesencefálicas asociadas con funciones motoras (Usuda *et al.*, 1998). Sin embargo, las aferencias y eferencias del polo rostral muestran una combinación de las conexiones entre el núcleo y la cubierta y el resto de zonas encefálicas (para una revisión, ver Zahm y Brog, 1992).

Neuroquímicamente, el núcleo y la cubierta se pueden distinguir por su distinto contenido en CB y sustancia P: el núcleo tiene una inmunorreactividad alta contra CB y muy baja contra la sustancia P, mientras que en la cubierta hay gran cantidad de sustancia P y poca CB (Zahm y Brog, 1992). Sin embargo, aunque el núcleo y la cubierta son claramente visibles en la rata, no es así en todas las estirpes de ratón. Por ejemplo, estas subdivisiones están descritas en el ratón de la estirpe C57BL/6, pero no en el de la 129/Sv (Hof *et al.*, 2000), que son los empleados en este trabajo de Tesis Doctoral.

Funcionalmente, tanto el núcleo como la cubierta están implicados fundamentalmente en el aprendizaje, pero la cubierta está relacionada además con la expresión de ciertas conductas innatas, como el comportamiento maternal (Reynolds y Berridge, 2002). Además, se ha propuesto que las funciones de la cubierta potenciarían ciertas respuestas comportamentales que son coordinadas a través del núcleo, como las respuestas condicionadas a las drogas psicoestimulantes (Voorn *et al.*, 2004). Aunque existen claras diferencias entre ambas regiones del NA, se ha comprobado que tanto en el núcleo como en la cubierta existen MSN e interneuronas cuyos colaterales cruzan su compartimento y contactan con elementos neuronales de la otra zona. Este hecho indica que ni el núcleo ni la cubierta procesan la información de una manera completamente independiente (van Dongen *et al.*, 2005).

A pesar de que este modelo “clásico” de organización del ES ha estado vigente desde hace décadas, no explica la totalidad de las diferencias regionales en su funcionamiento, por lo que en los últimos años se ha desarrollado una nueva teoría sobre la organización funcional del ES (Haber *et al.*, 2000; Papa *et al.*, 2002; Voorn *et al.*, 2004; Yin y Knowlton, 2004; Wickens *et al.*, 2007; Yin *et al.*, 2009). Esta teoría se basa en el hecho de que en el NA y en el CP hay microcircuitos locales repetitivos, que incluyen tanto a las interneuronas como a las neuronas de proyección (las MSN), que tienen unas propiedades fisiológicas y unas interconexiones relativamente constantes (Wickens *et al.*, 2007). Dado que existe esta uniformidad en los microcircuitos del ES, Wickens y cols. (2007) han sugerido que las diferencias en el funcionamiento de distintas zonas del ES podrían deberse a las aferencias que reciben y a las áreas a las que proyectan. Además, estos autores han propuesto que otro factor importante en la heterogeneidad de la función del ES es la existencia de una gradación en la señalización debida a DA, puesto que existen diferencias regionales tanto en la densidad de terminales dopaminérgicos como en la capacidad de captación de dicho neurotransmisor.

El NA y el CP se han considerado clásicamente como dos estructuras independientes, a pesar de su similitud en la citoarquitectura y en la circuitería local y de no haber un límite anatómico claro entre ambos (Voorn *et al.*, 2004; Wickens *et al.*, 2007). Por el contrario, diversos estudios, que incluyen experimentos de comportamiento y de aprendizaje y refuerzo ante diversas situaciones o sustancias, combinados con las diferencias en las conexiones con diversos centros encefálicos, así como las divergencias en el sistema dopaminérgico, han llevado a reconsiderar esta clásica división dorso-ventral del ES (para una revisión, ver Haber *et al.*, 2000; Papa *et al.*, 2002; Voorn *et al.*, 2004; Yin y Knowlton, 2004; Wickens *et al.*, 2007; Yin *et al.*, 2009). En su lugar, se ha propuesto que la organización funcional del ES estaría basada en una zonación desde la zona dorso-lateral a la ventro-medial, teniendo también una variación rostro-caudal (Haber *et al.*, 2000; Papa *et al.*, 2002; Voorn *et al.*, 2004; Wickens *et al.*, 2007; Yin *et al.*, 2009). Así, la zona lateral del CP sería un área sensomotora relacionada con la formación de hábitos, correspondiente al núcleo putamen en primates (Wickens *et al.*, 2007). Por otra parte, las zonas dorsal y medial, son consideradas áreas asociativas, equivalentes al núcleo caudado en primates, y estarían relacionadas con el aprendizaje y en la expresión de las acciones dirigidas hacia una recompensa (Wickens *et al.*, 2007). Asimismo, a pesar de que se considera que el NA está dividido en tres sub-territorios principales interconectados entre sí, con funciones particulares pero relacionadas, dicho núcleo también muestra el mismo tipo de organización funcional (Haber *et al.*, 2000; Papa *et al.*, 2002; Voorn *et al.*, 2004; van Dongen *et al.*, 2005; Wickens *et al.*, 2007; Yin *et al.*, 2009). Esto se ha comprobado en paradigmas experimentales donde se estudiaba cómo modificaciones en los sistemas GABAérgico, glutamatérgico o dopaminérgico, a lo largo del eje rostro-caudal del NA, provocaban cambios graduales en comportamientos tales como el miedo, la agresión o la ingesta de alimentos (Reynolds y Berridge, 2002; Couppis *et al.*, 2008; Faure *et al.*, 2010). Además, en diversos experimentos de autoadministración de cocaína en ratas, se ha comprobado que la droga afecta a la actividad de las neuronas del NA de forma diferente, siguiendo un gradiente medio-lateral (Fabbricatore *et al.*, 2009, 2010).

Óxido nítrico

El descubrimiento de la función del NO como una molécula de señalización en el sistema nervioso ha cambiado radicalmente el concepto de comunicación neuronal (Esplugues, 2002). Las propiedades físicas del NO impiden su almacenamiento a largo plazo en vesículas celulares y su metabolismo mediante enzimas hidrolíticas. Por lo tanto, al contrario que los neurotransmisores “clásicos”, el NO no se almacena en vesículas sinápticas ni se libera mediante exocitosis puesto que puede atravesar con facilidad las membranas (para una revisión, ver Thomas *et al.*, 2008). El NO se sintetiza por la NOS dependiendo de su demanda y difunde desde las células donde se produce. La distancia de difusión del NO (entre 10 – 300 μm de

diámetro; Lancaster, 1994), conlleva que las estructuras en la vecindad de las células que lo producen, tanto neuronas como elementos no neuronales, estén influenciadas por su liberación. Esto implica que, además de actuar como un neurotransmisor, el NO tiene un papel neuromodulador (Garthwaite y Boulton, 1995). El NO difunde dentro de las células, donde interacciona con las dianas intracelulares que normalmente serían consideradas mensajeros secundarios. Otra diferencia con los neurotransmisores convencionales es que la actividad de éstos se acaba mediante mecanismos de recaptación o cuando son degradados enzimáticamente, mientras que la inactivación del NO se produce cuando éste reacciona con un sustrato (Esplugues, 2002).

Sintasas del óxido nítrico

La síntesis de NO es el resultado de varios eventos de óxido-reducción enzimática que necesitan una gran cantidad de cofactores, que tienen sitios de unión específicos en la proteína. Este proceso se lleva a cabo por la NOS en dos pasos sucesivos en los que se consume O_2 y NADPH y, como resultado, la L-arginina se transforma en L-citrulina (Fig. 3). Los cofactores para la reacción no tienen un papel secundario, sino que su disponibilidad es importante para la actividad de la enzima (Palmer *et al.*, 1988).

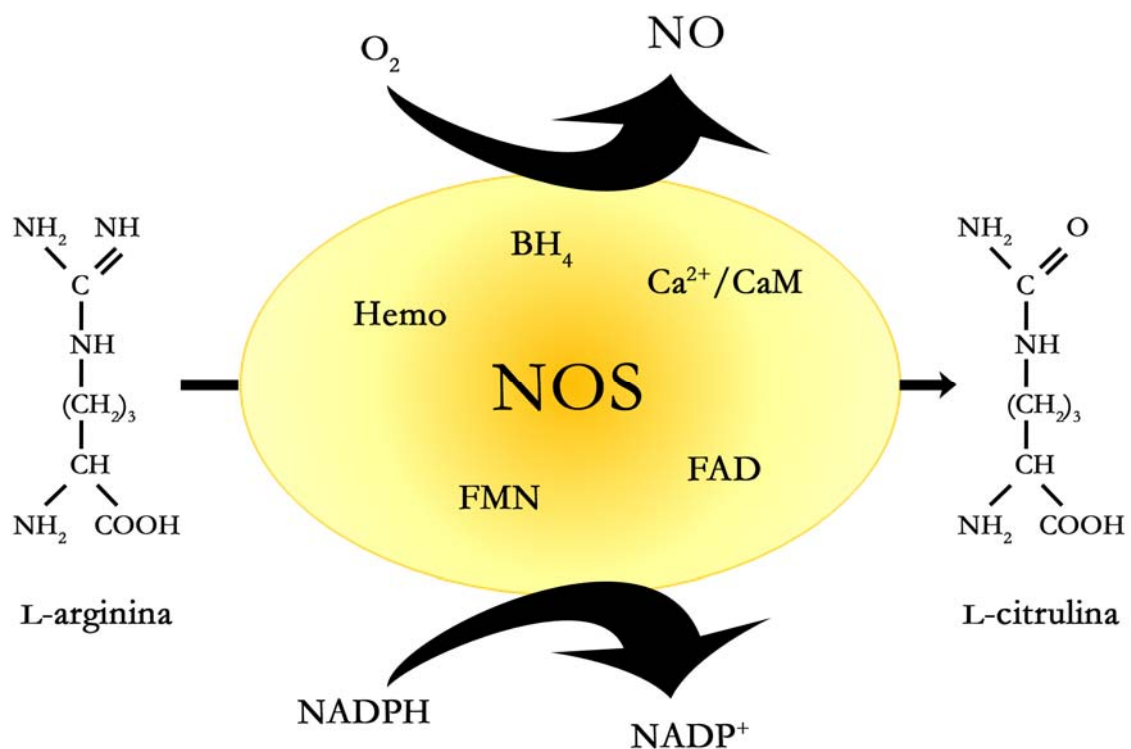


Figura 3. Síntesis de NO por la sintasa del óxido nítrico (NOS). Mediante la acción de la NOS la L-arginina se transforma en L-citrulina, liberando NO. Para ello se emplea nicotinamida adenín-dinucleótido fosfato reducido (NADPH) y O_2 , además de diversos cofactores como la calmodulina (CaM), el flavín-adenín-dinucleótido (FAD), el flavín-mononucleótido (FMN), la protoporfirina IX (el grupo hemo) y la tetrahidrobiopterina (BH_4).

Se han identificado 3 isoformas principales de la NOS que, dependiendo del orden cronológico en el que aislaron o el tejido en el que se localizan principalmente, se denominan NOS1 o neuronal y NOS3 o endotelial, ambas de expresión fundamentalmente constitutiva, y NOS2 o inmunológica, de expresión principalmente inducible (Knowles y Moncada, 1994). Sin embargo, a pesar de su nomenclatura, tanto la NOS1 como la NOS3 pueden ser expresadas bajo determinadas condiciones fisiológicas, mientras que la NOS2 puede encontrarse de forma constitutiva en algunos tipos celulares (Moncada *et al.*, 1997). Todas las isoformas de la NOS tienen las mismas propiedades catalíticas, pero difieren en la localización cromosómica de sus genes, en sus secuencias primarias, en la fortaleza de la unión entre los monómeros, en su dependencia de Ca^{2+} y en su regulación (Knowles y Moncada, 1994; Kone *et al.*, 2003).

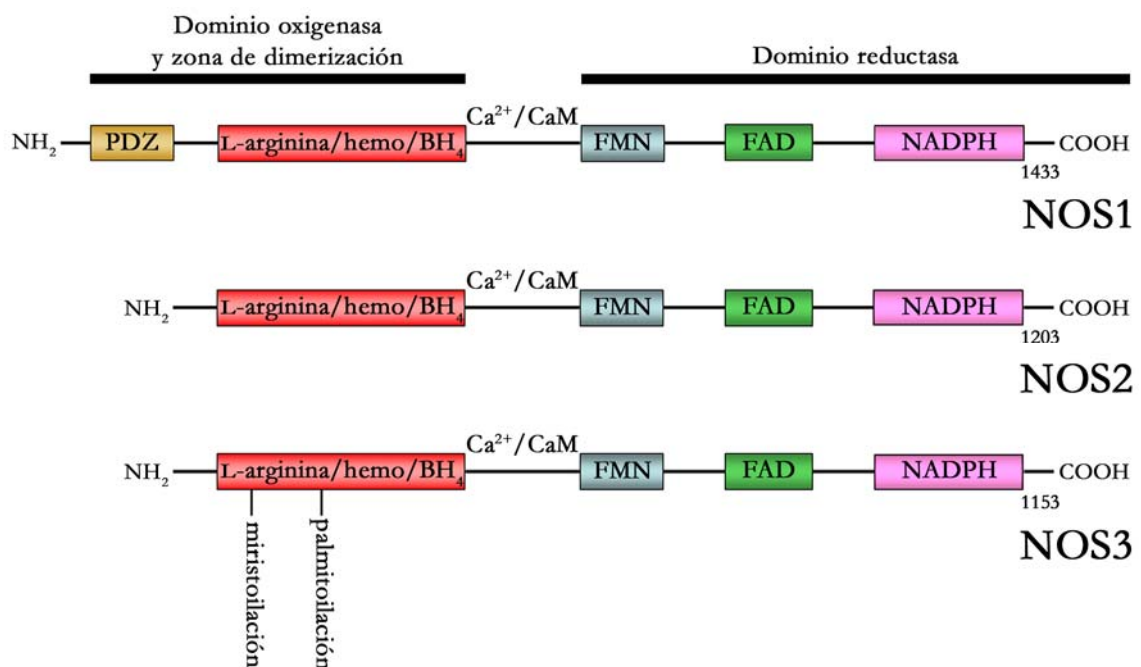
En el SNC, la isoforma de la NOS más característica es la NOS1, aunque tanto la isoforma inmunológica como la endotelial también están presentes (Esplugges, 2002). Además, todos los tipos celulares del SNC pueden contener la enzima: la NOS1 se expresa fundamentalmente en determinadas poblaciones neuronales y astrogiales; la NOS3, aparte de en el endotelio de los vasos sanguíneos, se puede localizar en ciertas neuronas y astrocitos, mientras que la expresión de la NOS2 se localiza en la microglía y los astrocitos. Además, la expresión de la NOS2 puede ser inducida tanto en neuronas como en las células gliales en determinadas condiciones patológicas (Knowles y Moncada, 1994; Loihl y Murphy, 1998; Heneka y Feinstein, 2001; Kone *et al.*, 2003).

Estructura de las sintasas del óxido nítrico

La NOS es una enzima dimérica que contiene un dominio oxigenasa y otro reductasa, cada uno con su propia actividad catalítica (Fig. 4). El dominio oxigenasa contiene los sitios de unión de la protoporfirina IX (el grupo hemo) y la tetrahydrobiopterina (BH_4), y tiene un sitio de unión a la calmodulina (CaM). Esta proteína ancla el dominio oxigenasa al reductasa, el cual contiene los sitios de unión del flavín-mononucleótido (FMN), del flavín-adenín-dinucleótido (FAD) y del NADPH (Alderton *et al.*, 2001; Bruckdorfer, 2005). Tanto la NOS1 como la NOS3 contienen un inserto en medio de la zona de unión a FMN que sirve de región autoinhibitoria, desestabilizando la unión de CaM a bajas concentraciones de Ca^{2+} y, como consecuencia, inhibiendo la transferencia de electrones desde el FMN al grupo hemo (Nishida y de Montellano, 2001). Por el contrario, los monómeros de NOS2 unen la calmodulina incluso a niveles muy bajos de Ca^{2+} intracelular (Cho *et al.*, 1992). Puesto que los cofactores que necesita la NOS2 se encuentran con abundancia en la mayoría de las células, una vez que se sintetiza la enzima se encuentra como un dímero catalíticamente activo (Yun *et al.*, 1996).

La NOS1 contiene además un dominio PDZ (Fig. 4) que participa en la formación de los dímeros, además de interactuar con diversas proteínas en regiones específicas de la célula (Kone *et al.*, 2003). Las proteínas que contienen los dominios PDZ se localizan típicamente en contactos célula a célula especializados y, usualmente, anclados a componentes de diversas vías de transducción de señales, formando complejos ternarios. Las interacciones del dominio PDZ con la NOS1 influyen en la actividad y/o en la distribución subcelular de la proteína (Kone, 2000). Entre las proteínas a las que puede anclarse por su dominio PDZ en las neuronas, se encuentra la proteína de densidad post-sináptica que contiene el dominio PDZ-95 (PSD-95)¹⁰. La proteína PSD-95 se une al NMDAR de Glu; cuando este receptor se activa, el flujo de Ca²⁺ que entra en la célula a través de él activa específicamente la NOS1 (Jaffrey *et al.*, 1998). Otra proteína a la que la NOS1 se puede unir es el ligando PDZ COOH-terminal de la NOS1 (CAPON)¹¹. Esta proteína, además de poder unirse a otras proteínas, se ancla a la NOS1 y la libera de su unión a PSD-95, regulando de esta forma la producción de NO (Jaffrey *et al.*, 1998).

La NOS3 tiene una zona de miristoilación y otra de palmitoilación (Fig. 4). La proteína es miristoilada co-traduccionally y de manera irreversible, mientras que la palmitoilación tiene lugar post-traduccionally y reversiblemente (Robinson y Michel, 1995). Esta doble acilación es requerida para su localización en la membrana celular (Robinson y Michel, 1995).



¹⁰ Del inglés *PDZ-containing post-synaptic density protein-95*.

¹¹ Del inglés *COOH-terminal PDZ ligand of NOS1*.

Figura 4. Estructura general de los monómeros de las tres isoformas principales de la enzima sintasa del óxido nítrico (NOS), con las zonas de unión de los diferentes cofactores: la calmodulina (CaM), el flavín-adenín-dinucleótido (FAD), el flavín-mononucleótido (FMN), el grupo hemo, el nicotinamida adenín-dinucleótido fosfato reducido (NADPH) y la tetrahidrobiopterina (BH₄). La NOS tiene un dominio reductasa y otro oxigenasa, por el que, además, se produce la dimerización, que es una condición imprescindible para su activación. La NOS1 posee una longitud de 1433 aminoácidos, la NOS2 tiene 1203 y la NOS3 1153. Además de las zonas de unión de los diferentes cofactores, la NOS1 contiene un dominio PDZ, mientras que la NOS3 tiene una zona de miristoilación y otra de palmitoilación (modificado de Bruckdorfer, 2005).

NOS1

Esta enzima se ha localizado en el sistema nervioso central y en el periférico, la musculatura lisa, esquelética y cardíaca, la mácula densa en el riñón, los testículos, la próstata, la uretra y el pene (Guix *et al.*, 2005; Zhou y Zhu, 2009). En el encéfalo, la NOS1 se ha localizado tanto en neuronas en desarrollo como maduras, en astrocitos y en la capa adventicia de algunos vasos cerebrales (Nozaki *et al.*, 1993; Bredt y Snyder, 1994; Arbonés *et al.*, 1996; Weruaga *et al.*, 2001, 2002).

El gen de la NOS1 es el más complejo de los descritos en humanos, tanto en su estructura como en la regulación de su expresión (para una revisión, Wang *et al.*, 1999). El análisis de la secuencia de ADN ha revelado que su transcripción puede ser regulada por gran cantidad de elementos, entre ellos la proteína de unión al elemento de respuesta al adenosín monofosfato cíclico (AMPC) o proteína CREB¹² (Sasaki *et al.*, 2000). Otro mecanismo general que regula la expresión del gen es el sexo, puesto que hormonas como el 17β-estradiol incrementan la cantidad de NOS1 en las neuronas en los humanos (Lee *et al.*, 2003).

En el ratón se han descrito seis variantes principales de la NOS1 (Fig. 5). La primera que se clonó se denomina NOS1α y es la responsable de la mayor parte de la actividad de la NOS1 en el sistema nervioso (Bredt *et al.*, 1991). Además, la NOS1α puede tener un procesamiento alternativo de su ARNm que dirige la proteína hacia la mitocondria, y por eso se le ha denominado NOS mitocondrial o NOSmt (Elfering *et al.*, 2002). Esta isoforma se ha encontrado en una amplia variedad de tejidos, entre ellos también el sistema nervioso. No se conoce su función exacta, pero se cree que podría estar implicada en la regulación del consumo de O₂ inhibiendo la función de la citocromo *c* oxidasa (Elfering *et al.*, 2002). Asimismo, existen otras cuatro NOS1 generadas por un procesamiento alternativo que se denominan NOS1β, NOS1γ, NOS1μ y NOS1-2, y se han localizado en distintas células y tejidos (para una revisión, ver Alderton *et al.*, 2001; Fig. 5). Sin embargo, se sabe muy poco acerca de los mecanismos que determinan los procesamientos alternativos y los eventos en los que están implicadas estas cuatro últimas isoformas de la NOS1 (Alderton *et al.*, 2001).

¹² Del inglés *cyclic-AMP-response-element-binding*.

Se ha comprobado que tanto la NOS1 β como la NOS1 γ carecen de la zona PDZ, por lo que no pueden anclarse a las membranas sinápticas (Alderton *et al.*, 2001). En el cerebro del ratón se ha detectado NOS1 β , mientras que la NOS1 γ se ha localizado en los testículos, pero no se conoce la función exacta de dichas isoformas (Alderton *et al.*, 2001). La NOS1 μ tiene un inserto entre los dominios de unión a FMN, y no se encuentra en el cerebro sino que se expresa selectivamente en el corazón, en el músculo esquelético, en la uretra y en el pene (Alderton *et al.*, 2001). La NOS1-2 tiene una delección de 105 aminoácidos entre los residuos 504-608 (Alderton *et al.*, 2001). Esta delección se encuentra en una zona altamente conservada que es fundamental para la unión de la L-arginina, por lo que se cree que es catalíticamente inactiva y podría funcionar como un regulador negativo de la actividad de la NOS1 (Alderton *et al.*, 2001).

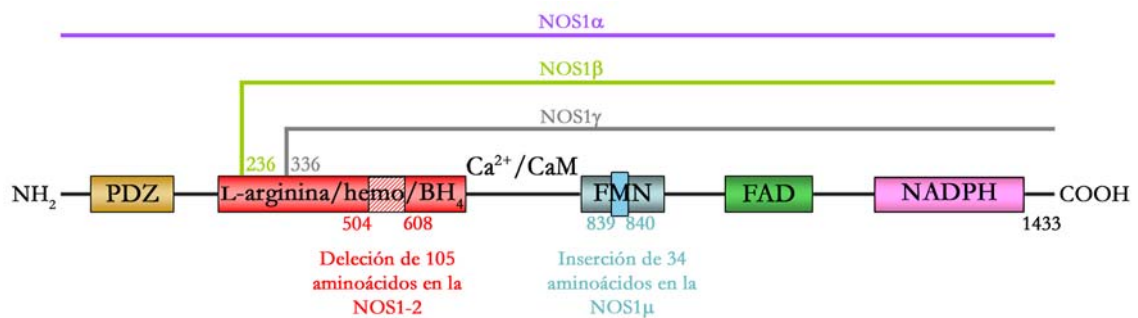


Figura 5. Estructura general de los monómeros de las principales variantes de la enzima sintasa del óxido nítrico 1 (NOS1), con las zonas de unión de los diferentes cofactores. Las 5 variantes están señaladas con diferentes colores. Morado: NOS1 α , contiene los aminoácidos 1-1433. Verde: NOS1 β , la enzima abarca los aminoácidos 236-1433. Gris: NOS1 γ , comprende los aminoácidos 336-1433. Rojo: NOS1-2, comprende los aminoácidos 1-1433, con una delección entre los aminoácidos 504-608. Azul: NOS1 μ , contiene los aminoácidos 1-1433, con un inserto en el aminoácido 839 de 34 aminoácidos. BH₄: tetrahidrobiopterina; CaM: calmodulina; FAD: flavin-adenín-dinucleótido; FMN: flavín-mononucleótido; NADPH: nicotinamida adenín-dinucleótido fosfato reducido (modificado de Alderton *et al.*, 2001.)

Los ratones *knock-out* para la NOS1 (*KO*) tienen deficiencias en el recambio de serotonina y en la función de los receptores 5-HT1A y 5-HT1B en las zonas cerebrales que regulan las emociones (Chiavegatto *et al.*, 2001). También muestran un comportamiento sexual alterado, puesto que se aparean con las hembras independientemente del ciclo estral. Además, cuando los machos están juntos en una jaula se pelean constantemente y no responden a las posturas de sumisión por parte de ratones silvestres ni muestran ellos mismos las posturas de sumisión en respuesta al ataque por otros ratones (Nelson *et al.*, 1995). Se cree que estos comportamientos son una consecuencia de la pérdida de la NOS1, puesto que los ratones *KO* no muestran anomalías aparentes en la estructura cerebral (Huang *et al.*, 1993), y tienen una plasticidad sináptica normal en el hipocampo y el cerebelo (O'Dell *et al.*,

1994; Linden *et al.*, 1995). Además, las concentraciones de testosterona en el plasma sanguíneo, que podrían contribuir tanto en la agresión como en el comportamiento sexual, no difieren entre los animales *KO* y los silvestres (Nelson *et al.*, 1995).

NOS2

Los estudios sobre la NOS2 indican que se expresa fundamentalmente en células inmunes y gliales (Galea *et al.*, 1992). También se ha localizado en el hígado, el músculo liso de los vasos sanguíneos y en los riñones (Guix *et al.*, 2005). Aunque la regulación transcripcional de esta enzima sea principalmente por estímulos inflamatorios, en el cerebro también se induce su expresión tras un trauma o daño. Asimismo, en el SNC se expresa en varias patologías como enfermedades desmielinizantes, isquemia cerebral, demencia asociada al síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) y en la enfermedad de Alzheimer (Heneka y Feinstein, 2001).

En células epiteliales y en macrófagos alveolares de humano se han identificado tres isoformas de la NOS2, debidas a un procesamiento alternativo del ARNm. Estas proteínas tienen delecciones en el dominio de unión al grupo hemo o en la región de anclaje de la FMN, pero se desconoce su función fisiológica (Alderton *et al.*, 2001).

La región promotora de la NOS2 contiene sitios de unión para gran cantidad de factores de transcripción. Entre los factores más importantes se encuentran CREB, heterodímeros de Fos y Jun y el factor nuclear $\kappa\beta$ (NF $\kappa\beta$), y otras proteínas que pertenecen a la vía de señalización del AMPc (Eberhardt *et al.*, 1996; Marks-Konczalik *et al.*, 1998; Hecker *et al.*, 1999). Además, dependiendo del tipo celular, su expresión puede ser potenciada por la tirosina cinasa, por proteínas cinasas C, o ser inhibida por tirosina fosfatasas (Jeohn *et al.*, 2002; Lahti *et al.*, 2002).

Los animales *knock-out* para la NOS2 no muestran grandes diferencias fenotípicas con los ratones silvestres. No obstante, se ha comprobado que tienen una vascularización menor en la retina tras un daño experimental, cuando se compara con animales de genotipo silvestre (Ando *et al.*, 2002).

NOS3

La NOS3 se expresa fundamentalmente en los endotelios (Marsden *et al.*, 1993). Además, se ha encontrado en neuronas de la médula espinal, astrocitos, células de la médula ósea, osteoblastos, osteoclastos, músculo cardiaco, hepatocitos y células intestinales (Guix *et al.*, 2005). Al igual que ocurre con las otras isoformas de la NOS, se han encontrado tres variantes de la NOS3 que son proteínas truncadas. Estas isoformas pueden dimerizar con la proteína NOS3 completa, regulándola negativamente (Lorenz *et al.*, 2007).

Varios estudios han mostrado que estímulos diversos, como el estrés por rozamiento en el endotelio o la acción de la hormona 17β -estradiol, producen una fosforilación de esta enzima, potenciando su unión a la CaM e incrementando su actividad hasta 3 veces (Marsden *et al.*, 1993; Chen *et al.*, 1999; Dimmeler *et al.*, 1999; Wu, 2002). Además, algunos compuestos como el factor de necrosis tumoral α (TNF α)¹³ regulan su expresión a la baja (Nishida *et al.*, 1992).

Los animales *knock-out* para la NOS3 tienen una gran mortalidad embrionaria y, además, los fetos muestran un retraso en el desarrollo y numerosas anomalías del sistema cardiovascular y del respiratorio (Han *et al.*, 2004).

Acciones del óxido nítrico en el sistema nervioso

El NO *in vivo* tiene una vida media de 0,01 - 0,1 s, que es muy corta en comparación con la de los neurotransmisores tradicionales (para una revisión, Thomas *et al.*, 2008). El NO pertenece a la clase de los óxidos de nitrógeno, y es un radical libre debido a su electrón desapareado. Una vez que se forma, el NO no permanece en este estado por mucho tiempo, dado que es rápidamente oxidado, reducido o acomplejado a diversas biomoléculas. El resultado final depende críticamente del microambiente local en el que se genera el NO (Yun *et al.*, 1996).

El NO puede reaccionar con O₂, CO₂, H₂O₂, ión superóxido y metales de transición (Stamler *et al.*, 1992; Koppenol, 1998). La mayoría de estas reacciones producen especies reactivas de nitrógeno, que aumentan la reactividad biológica del NO. A concentraciones moderadas, tanto las especies reactivas de nitrógeno como las de oxígeno mantienen una homeostasis, pero cuando hay un exceso de alguna de ellas se producen daños celulares (Dröge, 2002). Así, por ejemplo, los peroxinitritos, resultantes de la reacción del NO con los iones superóxido, son radicales oxidativos altamente nocivos y producen oxidaciones muy fuertes, S-nitrosilación, y nitración (Squadrito y Prior, 1998; Dröge, 2002). Todos estos radicales se han implicado en procesos de envejecimiento y en las patologías neurodegenerativas asociadas a ellos (Gautier-Sauvigné *et al.*, 2005).

En los fluidos biológicos el NO reacciona con O₂ y H₂O formando nitritos (NO₂) y nitratos (NO₃). Asimismo, se pueden formar otros productos intermedios como peroxinitritos, y radicales nitrito e hidroxilo (Beckman y Koppenol, 1996). Además, el NO puede ser transferido de un nitrosotiol a otro en un proceso llamado transnitrosación (Bruckdorfer, 2005). Los nitrosotioles existen de manera normal en el plasma sanguíneo, principalmente en la albúmina, de modo que la S-nitrosoalbúmina puede funcionar como reservorio de NO.

En el sistema nervioso, el NO se produce en una gran cantidad de tipos celulares, como en las células endoteliales de los vasos sanguíneos y en las neuronas del

¹³ Del inglés *tumoral necrosis factor α* .

plexo mientérico del sistema nervioso periférico, entre otros (Kone *et al.*, 2003; Guix *et al.*, 2005). Además, en el SNC es producido tanto por neuronas como por glía. En el SNC, el NO participa en distintos procesos, como en el desarrollo embrionario, en la neurotoxicidad asociada a diversos procesos neurodegenerativos y en la transmisión sináptica (Yun *et al.*, 1996; Bruckdorfer, 2005; Guix *et al.*, 2005).

Reacción del óxido nítrico con proteínas

Las acciones biológicas más significativas del NO se deben a su unión a metales de transición (Yun *et al.*, 1996). El NO se une con el hierro presente en los grupos hemo de gran cantidad de proteínas, regulando su actividad. Se ha comprobado que puede activar a la enzima ciclo-oxigenasa uniéndose a su grupo hemo y aumentando así el nivel de prostaglandinas (Salvemini *et al.*, 1993). También se ha comprobado que puede inhibir a diversas enzimas que emplean el grupo hemo para realizar su función, como la propia NOS, regulando de esta manera su producción (Assreuy *et al.*, 1993; Rengasamy y Johns, 1993). Otras proteínas diana que contienen el grupo hemo son la catalasa, la citocromo *c* oxidasa, la hemoglobina y la peroxidasa, además de la GCs, su principal diana biológica (Ignarro, 1991).

El NO se une al motivo hemo de la GCs de forma reversible e induce un cambio conformacional que activa la enzima, incrementando los niveles de GMPc (Yun *et al.*, 1996; Bruckdorfer, 2005). La actividad basal de la GCs puede incrementarse más de 200 veces por la unión de NO, aunque este complejo NO-GCs tiene una vida media de tan solo 0,2 s (Bruckdorfer, 2005).

A pesar de que se le denomine como “soluble”, se ha demostrado que la GCs también puede unirse a la proteína PSD-95, por lo que también está asociada a la membrana sináptica en el encéfalo (Russwurm *et al.*, 2001). Además, la PSD-95 puede unirse a los NMDAR y a la NOS1. Esto permite que la entrada de Ca^{2+} mediante el NMDAR active la NOS1, y el NO producido interaccione rápidamente con su principal diana fisiológica, la GCs (Christopherson *et al.*, 1999; Russwurm *et al.*, 2001). Por otro lado, también se ha visto que la GCs puede localizarse presinápticamente, mientras que la NOS1 está situada post-sinápticamente, por lo que el NO actuaría como un neurotransmisor retrógrado (Burette *et al.*, 2002). Además, la NOS1 puede localizarse en prolongaciones muy próximas a otras sinapsis, pudiendo modular tanto la liberación de neurotransmisor por parte del terminal presináptico como la respuesta de la célula post-sináptica (Kiss y Vizi, 2001; West *et al.*, 2002).

El GMPc es un segundo mensajero que activa diversas proteínas cinasas dependientes de él (PKG), facilitando la fosforilación de diversas proteínas y disminuyendo las concentraciones del Ca^{2+} intracelular por medio de diversos mecanismos (Murad, 1994). El GMPc también modula la actividad de ciertas fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos (PDE), como la fosfodiesterasa del AMPc (Lincoln, 1989; Guix *et al.*, 2005). Además, puede unirse directamente a canales iónicos y activarlos (Lin-

coln, 1989). Por lo tanto, la interacción del NO con la GCs puede influir en gran cantidad de procesos intracelulares.

Otras proteínas diana del NO incluyen a aquéllas que tienen residuos de cisteína y tirosina, sobre las que actúa por medio de nitrosilación (Yun *et al.*, 1996). Esta reacción puede inducir un cambio en la función de la proteína (Martínez-Ruiz y Lamas, 2004). Así, por ejemplo, se ha sugerido que el NO puede modular los NMDAR de Glu mediante su nitrosilación y disminuir su actividad (Lipton *et al.*, 1993).

Desarrollo del sistema nervioso

Se ha postulado que el NO tiene un papel clave en la morfogénesis y plasticidad sináptica del sistema nervioso (Edelman y Gally, 1992). La NOS1 se expresa de forma transitoria en determinadas neuronas durante el desarrollo embrionario, como en la placa cortical, y en los ganglios sensoriales (Bredt y Sneyder, 1994). Además, se cree que es necesario para la maduración de las motoneuronas de la médula espinal (Kalb y Agostini, 1993). Asimismo, se ha comprobado que la formación de las columnas de dominancia ocular en el córtex visual depende del NO (Williams *et al.*, 1994). El NO también es importante en el sistema olfatorio (Roskams *et al.*, 1994). Las neuronas en desarrollo del epitelio olfatorio, durante la migración y el establecimiento de las sinapsis primarias en el bulbo olfatorio, contienen NOS1 (Bredt y Sneyder, 1994). Además, la expresión de NOS1 se induce rápidamente en la regeneración de las neuronas receptoras olfatorias tras una bulbectomía (Roskams *et al.*, 1994) o tras desinervación olfatoria periférica (Weruaga *et al.*, 2000). Estos datos indican que el NO tiene un papel importante en el establecimiento de las conexiones de las neuronas en diversas zonas encefálicas (Roskams *et al.*, 1994; Weruaga *et al.*, 2000).

Proliferación, migración, diferenciación y apoptosis en el adulto

En el SNC de los mamíferos adultos hay dos zonas principales de formación de nuevas neuronas: la zona subgranular del giro dentado del hipocampo y la zona subventricular. El proceso de neurogénesis implica la proliferación de los precursores, la migración de los mismos, su diferenciación e integración y su supervivencia (para una revisión, ver Cárdenas *et al.*, 2005; Taupin 2006). Diversos estudios han demostrado que el NO está implicado en el proceso de formación de nuevas neuronas, aunque las respuestas al gas dependen del ambiente celular y de la cantidad de NO presente (Cárdenas *et al.*, 2005).

Aunque hay estudios contradictorios, se ha visto que, en general, el NO a concentraciones relativamente bajas tiende a favorecer la proliferación y a producir respuestas anti-apoptóticas, mientras que niveles elevados de NO inducen senescencia o apoptosis celular (Thomas *et al.*, 2008). Además, los datos sugieren que los

efectos del NO en la proliferación dependen de la zona estudiada: mientras que en la corriente migratoria rostral el NO inhibe la proliferación, en el giro dentado del hipocampo el NO tiene el efecto contrario (Cárdenas *et al.*, 2005; Hua *et al.*, 2008; Zhou y Zhu, 2009).

Otras de las funciones en las que está implicado el NO son la migración y la diferenciación celular. Se ha comprobado su intervención en la migración de los neuroblastos que se originan en la zona subventricular a través de la corriente migratoria rostral, probablemente por un mecanismo dependiente de la GCs (Gutiérrez-Mecinas *et al.*, 2007). Además, el NO puede desencadenar modificaciones en las células impidiendo que continúen proliferando y favoreciendo la diferenciación celular (Peunova y Enikolopov, 1995). Esta acción del NO no parece ser dependiente de la activación de la GCs, si no que está mediada por la vía de señalización de las proteínas Ras o por su interacción con diversos factores de transcripción (González-Zulueta *et al.*, 2000; Ignarro *et al.*, 2002; Vossen y Erard, 2002).

El NO tiene un papel controvertido en la apoptosis celular, como se ha señalado previamente, aunque los estudios más recientes tienden a asignarle un papel anti-apoptótico en condiciones fisiológicas (Guix *et al.*, 2005). Los principales efectos anti-apoptóticos han sido atribuidos a la nitrosilación de diversas proteínas, como las caspasas 1, 3 y 9, inhibiendo su actividad (Kim *et al.*, 1998; Mannick *et al.*, 1999) y activando la expresión de proteínas protectoras, como la HSP90 (Hao *et al.*, 1999). En condiciones fisiopatológicas, los efectos pro-apoptóticos del NO dependen del tipo celular, la concentración de NO y la coexistencia de otros agentes nocivos (Guix *et al.*, 2005). La inducción de la apoptosis por el NO se debe fundamentalmente a la formación de peroxinitritos, que producen daños en diversos sistemas celulares, como las mitocondrias y el ADN celular. Además, el NO también puede activar proteínas cinasas relacionadas con el daño debido al estrés oxidativo. Finalmente, estos procesos activan la vía de las proteínas caspasas, induciendo la apoptosis (Guix *et al.*, 2005).

Neurotoxicidad

El NO se ha relacionado con el desarrollo de diversas enfermedades neurodegenerativas, entre ellas los daños neurológicos asociados a la apoplejía, la esclerosis múltiple, las enfermedades de Alzheimer y Parkinson, y en la patogénesis de la demencia asociada al SIDA (Bo *et al.*, 1994; Yun *et al.*, 1996; Dawson y Dawson, 1998; Aliev *et al.*, 2009).

La acción neurotóxica más estudiada implica un exceso de Glu que, actuando por medio de los NMDAR, promueve la muerte celular (Edelman y Gally, 1992; Dawson, 1995; Bolaños *et al.*, 1997). En condiciones normales, el Glu activa los NMDAR, lo que produce un incremento de las concentraciones de Ca²⁺ intracelulares, activando la enzima NOS1 y la formación de NO (Hirsch *et al.*, 1993; Montague

et al., 1994). Una vez formado, el NO difunde rápidamente a los terminales adyacentes, influyendo en la liberación de otros neurotransmisores (Pögün *et al.*, 1994a,b; Hawkins *et al.*, 1998; Feldman y Weidenfeld, 2004; Guix *et al.*, 2005). Sin embargo, cuando el NO se encuentra en grandes concentraciones puede iniciar una cascada neurotóxica (Edelman y Gally, 1992; Dawson, 1995; Bolaños *et al.*, 1997). Además, la formación de peroxinitritos y otros radicales altamente reactivos y destructivos están implicados en la neurotoxicidad mediada por el NO (para una revisión, ver Forder y Tymianski, 2009; Roberts *et al.*, 2009).

Relación con otros neurotransmisores

El NO es un neurotransmisor y/o neuromodulador en el SNC que actúa fundamentalmente a través de mecanismos dependientes de GMPc, aunque también puede actuar mediante la S-nitrosilación de proteínas (Bredt y Snyder, 1994; Meffert *et al.*, 1996). Se ha comprobado que el NO inhibe la recaptación de DA, Glu y serotonina (Pögün *et al.*, 1994a,b). El NO también influye en la liberación de neurotransmisores, presumiblemente a través de la activación de PKGs. Esto produce un aumento de la fosforilación de diversas proteínas de las vesículas sinápticas asociadas con la liberación de dichos neurotransmisores (Yun *et al.*, 1996). Como hemos mencionado previamente, la participación del NO en la liberación de neurotransmisores mediada por el NMDAR ha sido estudiada desde la década de los 90 (Hirsch *et al.*, 1993; Montague *et al.*, 1994). Este mecanismo retrógrado es de gran importancia en los procesos de aprendizaje y memoria, como la LTP y la LTD (Nowicky y Bindman, 1993; Calabresi *et al.*, 1999, 2007; Centonze *et al.*, 2003b). Además, el efecto del NO en la liberación de Glu parece depender del nivel de NO: cuando la concentración es baja, se produce un descenso en la liberación de Glu aunque los niveles de GMPc sean elevados, en tanto que cuando el NO incrementa, la liberación de Glu también lo hace (Sequeira *et al.*, 1997).

El NO también influye en la liberación de otros neurotransmisores como el GABA, la ACh, la serotonina y la noradrenalina, entre otros (Guix *et al.*, 2005). Al igual que ocurre en el caso del Glu, el efecto del NO sobre la liberación de GABA es bifásico, dependiendo de la concentración de NO: niveles basales de NO inhiben la liberación de GABA, mientras que cantidades elevadas potencian su expulsión de la neurona (Getting *et al.*, 1996). Además, se ha propuesto que el NO modularía la liberación de DA en el ES (Zhu and Luo, 1992; Guevara-Guzman *et al.*, 1994). En el CP y en el NA, la transmisión colinérgica también está modulada por el NO (Prast *et al.*, 1998; Buchholzer y Klein, 2002). Esta liberación de ACh no se produce directamente por el NO, sino por la estimulación que produce éste sobre los terminales glutamatérgicos vecinos.

Asimismo, la liberación de serotonina también está influenciada por la formación de NO y por la activación del NMDAR en el ES (Trabace *et al.*, 2004). En el

hipocampo se ha visto que esta liberación también es bifásica: a baja concentración de NO disminuye la liberación de serotonina, mientras que una gran producción de NO induce la secreción de la misma (Kaehler *et al.*, 1999). Además, el NO también puede regular la liberación de noradrenalina por medio de los NMDAR (Feldman y Weidenfeld, 2004).

Comportamiento

El NO está relacionado con la modulación de una amplia variedad de comportamientos. Se ha visto que el NO está implicado en la nocicepción (Moore *et al.*, 1991), el aprendizaje y la memoria (Yamada *et al.*, 1995), los cambios entre las fases del ritmo circadiano (Ding *et al.*, 1994) y del sueño (Gautier-Sauvigné *et al.*, 2005). También se ha comprobado que puede regular la ingesta de bebida y comida (Calapai *et al.*, 1992; Squadrito, *et al.*, 1994), la agresión y el comportamiento sexual (Nelson *et al.*, 1995), además de influir en la ansiedad y el estrés (Yildiz *et al.*, 2000; Esch *et al.*, 2002).

También, se ha comprobado que el NO está involucrado en diversos aspectos de la adicción a drogas como la nicotina (Pögün *et al.*, 2000; Yilmaz *et al.*, 2000; Weruaga *et al.*, 2002; Sahraei *et al.*, 2004), el alcohol (Rezvani *et al.*, 1995), la cafeína (Kayir y Uzbay, 2004), la cocaína (Pudiak y Bozarth, 1993), las anfetaminas (Itzhak *et al.*, 2004), la morfina (Pryor *et al.*, 2005) y los cannabinoides (Azad *et al.*, 2001).

Adicción a nicotina

Diversos estudios han demostrado que existe una relación entre la administración de nicotina y la liberación de NO. Este fenómeno se ha comprobado tanto en el sistema vascular, como en el músculo esquelético y los sistemas gastrointestinal y reproductor (Pögün *et al.*, 2000). Asimismo, en la rata se ha comprobado que el sistema nitrérgico está implicado en el desarrollo de ciertos comportamientos inducidos por un tratamiento con nicotina, como la producción de temblores en la cola o la potenciación de la actividad locomotora (Suemaru *et al.*, 1997; Shim *et al.*, 2002). Es más, dicho incremento de la actividad locomotora parece estar mediado por las isoformas constitutivas de la NOS, mientras que la inducible no tiene prácticamente ningún efecto (Shim *et al.*, 2002).

En el SNC, se ha comprobado que el NO inhibe la recaptación de DA, además de facilitar su liberación, incrementando de esta forma su concentración en el espacio post-sináptico, lo que se considera básico en el mecanismo de acción de muchas drogas adictivas (London *et al.*, 1996).

En el encéfalo de la rata se ha demostrado que los tratamientos agudos y crónicos con nicotina incrementan la cantidad de metabolitos estables del NO (NO_3^- y NO_2^-) en la corteza, el cerebelo, el CP, el hipocampo y el NA. Esta variación en la producción de NO es dependiente de la duración del tratamiento, la re-

gión estudiada y sexo del animal (Pögün *et al.*, 2000; Weruaga *et al.*, 2002). Además, se ha demostrado que la inhibición de la NOS1 evita los efectos de la nicotina en todas las regiones cerebrales, por lo que se ha sugerido que la nicotina potencia la liberación de NO por medio de esta isoforma de la NOS (Pögün *et al.*, 2000). Asimismo, se ha propuesto que la NOS1 podría no ser la única isoforma de la NOS implicada en adicción, puesto que no se ha visto un incremento en el número de células que contienen dicha enzima en diversas áreas cerebrales relacionadas con la adicción como son el córtex, el CP y el NA (Weruaga *et al.*, 2002). Por otro lado, en la rata la liberación de NO parece ser dependiente de la estimulación de los NMDAR en función de la zona encefálica: en el córtex y el hipocampo el efecto de la nicotina está relacionado con el sistema glutamatérgico, mientras que parece ser independiente de él en el CP (Pögün *et al.*, 2000).

A pesar de las evidencias de la relación entre la administración de nicotina y la producción de NO en el encéfalo de la rata, hay pocos trabajos que estudien dicha conexión en las áreas cerebrales implicadas en la adicción a nicotina en el ratón, la especie de experimentación con más modelos genéticos.

Estrés

El efecto de los factores psicosociales y ambientales en el bienestar físico o mental se denomina estrés (Esch *et al.*, 2002). Por lo tanto, el estrés es producido por un estímulo que induce cambios fisiológicos, psicológicos y comportamentales (Esch *et al.*, 2002). El estímulo produce una respuesta compleja y coordinada de los sistemas nervioso, endocrino e inmune, que está encaminada a que el organismo pueda adaptarse a la situación (Tsigos y Chrousos, 2002).

Además de la liberación de adrenalina y noradrenalina por mediación del sistema nervioso simpático, en la respuesta al estrés es fundamental la activación de las estructuras que forman el eje hipotalámico-hipofisario-adrenal (Esch *et al.*, 2002; De Biasi y Dani, 2003; Smith y Vale, 2006). El estrés estimula la liberación del factor liberador de corticotropina (CRF)¹⁴ a la sangre desde el núcleo paraventricular del hipotálamo. A su vez, el CRF actúa sobre la hipófisis, induciendo la liberación de la hormona adrenocorticotropa (ACTH). La principal diana de la ACTH es la corteza adrenal, donde estimula la síntesis y la secreción de glucocorticoides (para una revisión, ver Smith y Vale, 2006). Éstos pueden regular los cambios fisiológicos a través de los receptores intracelulares distribuidos ubicuamente en el organismo, además de regular negativamente la activación del eje hipotalámico-hipofisario-adrenal (Smith y Vale, 2006). Los glucocorticoides tienden a producir un efecto encaminado a la adaptación del organismo al estímulo que produce el estrés, pero una activación inadecuada o excesiva de dicho eje puede contribuir al desarrollo de diversas patologías. Entre estas patologías se encuentran enfermedades inmunes –infecciones, in-

¹⁴Del inglés *corticotropin-releasing factor*

inflamación y procesos autoinmunes—; enfermedades cardiovasculares —hipertensión, aterosclerosis, alteraciones de las arterias coronarias, infarto de miocardio—; enfermedades neurodegenerativas —enfermedad de Alzheimer—; y desórdenes mentales —ansiedad, depresión— (para una revisión, ver Esch *et al.*, 2002).

La enzima NOS1 se ha localizado entre otras áreas, en el hipotálamo, la hipófisis y la glándula adrenal (López-Figueroa *et al.*, 1998a). Diversos estudios han demostrado que el NO está implicado en la regulación del eje hipotalámico-hipofisario-adrenal: el NO puede modular la liberación de la ACTH y la corticosterona, secretadas como respuesta al estrés. Además, la expresión y la actividad de la NOS1 disminuye después de la activación del eje debido probablemente a los glucocorticoides, como un mecanismo de retroalimentación negativa; sin embargo, no se conoce exactamente su forma de actuación (para una revisión, López-Figueroa *et al.*, 1998a).

El estrés es un factor importante en el uso de las drogas adictivas (De Biasi y Dani, 2003). Se ha comprobado que el estrés incrementa la motivación para el uso de la droga y la vulnerabilidad hacia ella (Goeders, 2002). Además, durante la fase de la adquisición de la dependencia, el estrés incrementa la sensibilidad a la droga, haciendo que el individuo sea más susceptible a la recompensa producida por la droga (De Biasi y Dani, 2003). De hecho, se ha comprobado que el estrés induce un incremento de DA extracelular *in vivo*, y que este es más pronunciado en el NA que en CP (Finlay y Zigmond, 1997). Es más, se ha comprobado que en ambas regiones del ES existen receptores de corticosteroides, por lo que el estrés podría estar modificando la función del ES actuando a través de ellos (Ahima y Harlan 1990). Además, se ha comprobado que existe una diferencia regional en las alteraciones provocadas en distintos experimentos de estrés en el CP. En dichos experimentos, la zona dorsal del CP es la más afectada, aumentando tanto la expresión de *c-fos* después de una inyección con solución salina como la apoptosis con una inyección de dexametasona. (Mitchell *et al.*, 1999)

En la rata, se ha comprobado que la nicotina estimula la liberación de la ACTH y de la corticosterona, que es revertida mediante la inhibición de la producción de NO (Gadek-Michalska y Bugajski, 2004). Asimismo, el estrés producido por inyecciones crónicas con solución salina altera la expresión de NOS1 y la cantidad de NO producida. Esta variación también depende de la zona estudiada y, además, muestra un dimorfismo sexual, siendo más pronunciada en hembras que en machos (Weruaga *et al.*, 2002).

Dimorfismo sexual

Se ha demostrado que entre el cerebro de los machos y el de las hembras de una amplia variedad de vertebrados, incluidos los humanos, existen diferencias cualitativas y cuantitativas en la bioquímica, la estructura y la función, lo que produce

diferencias en el comportamiento (De Vries y Boyle, 1998). Las diferencias sexuales en el cerebro y en el comportamiento son la consecuencia de las interacciones recíprocas entre los genes, las hormonas sexuales, los efectos de las hormonas en el cerebro, el aprendizaje, el ambiente social y otras influencias ambientales (Pögün, 2001).

A lo largo de toda la vida del animal las hormonas gonadales tienen un papel fundamental en el establecimiento de las diferencias sexuales en diversas estructuras cerebrales y en algunos comportamientos no implicados directamente en la reproducción, como las adicciones a drogas (De Vries y Boyle, 1998; Pögün, 2001). En los humanos, la adicción al tabaco muestra diferencias entre sexos: aunque se cree que las mujeres tienden a fumar tabaco con menos nicotina e inhalan menos humo que los hombres, tienen mayor dificultad en abandonar el hábito tabáquico (Perkins *et al.*, 1999). Los índices bioquímicos de la adicción, como los metabolitos de la nicotina en sangre y saliva y el CO expirado, también son menores en las mujeres que en los hombres. Además, aunque las mujeres fumen menos, muestran unos síntomas de abstinencia más severos que los hombres, lo que les hace más difícil dejar de fumar (Perkins *et al.*, 1999).

Se ha observado que, debido a los estrógenos y la progesterona, las ratas hembras son más sensibles que los machos a los efectos tóxicos y de refuerzo de las drogas psicoestimulantes, como la nicotina y la cocaína, que incrementan los niveles de DA en el espacio sináptico (Morishima *et al.*, 1993; Becker, 1999). Es más, se ha demostrado que dichas hormonas ováricas modulan la concentración de DA extracelular en el CP y el NA influyendo de esta forma en los efectos de la droga (Morishima *et al.*, 1993; Xiao y Becker, 1994; Becker, 1999). En el caso de la nicotina, también se ha comprobado que su administración incrementa tanto la cantidad de nA-ChR como la liberación de NO, en una pauta sexualmente dimórfica y dependiente de la zona encefálica (Koylu *et al.*, 1997; Pögün *et al.*, 2000; Weruaga *et al.*, 2002).

Diversos estudios han mostrado que en los mamíferos tanto el estrógeno y la progesterona como los andrógenos influyen directamente en la expresión de la enzima NOS1 (Para una revisión, Panzica *et al.*, 2006). Asimismo, se ha comprobado que la expresión de NOS3 puede regularse por los estrógenos (Chen *et al.*, 1999; Dimmeler *et al.*, 1999; Wu, 2002). Por otro lado, la influencia de las hormonas sexuales en el sistema nitrérgico no es igual en todo el SNC, sino que es específica de cada región encefálica (Panzica *et al.*, 2006). En estudios sobre la influencia de la nicotina en la liberación de NO se ha comprobado que también existe un dimorfismo sexual en la producción de esta molécula en respuesta a un tratamiento con nicotina. Además, esta variación también depende de la zona encefálica de la que se trata (Pögün *et al.*, 2000; Weruaga *et al.*, 2002).

Por todo ello, es primordial considerar la influencia de las hormonas sexuales en la respuesta a la nicotina. Es más, el estudio de la influencia del sexo en los diver-

Los sistemas de neurotransmisores implicados en la adicción, entre ellos el NO, es de gran importancia para el desarrollo de terapias de deshabituación específicas dependiendo del sexo y, por lo tanto, más efectivas para dejar de fumar.

Objetivos

A partir de la revisión bibliográfica realizada, podemos obtener las siguientes premisas:

- La nicotina afecta al sistema cerebral de placer-recompensa, modificando la función de determinados centros cerebrales implicados en su adicción, entre ellos el NA y el CP. Dicha alteración no es homogénea dentro de cada una de éstas dos estructuras.
- Entre las alteraciones que produce la nicotina en el NA y en el CP de la rata se encuentra la modificación de la liberación de diversos neurotransmisores, incluido el NO. Sin embargo, no se conoce con certeza qué isoformas de la NOS se ven afectadas en la adicción a nicotina.
- En la rata se ha comprobado que las variaciones en la producción de NO inducidas por un tratamiento con nicotina no son iguales entre machos y hembras y, además, dependen de la región encefálica de la que se trate.
- El NO está implicado en el desarrollo del estrés. En la rata se ha comprobado que existen diferencias en el contenido de los metabolitos estables del NO, y en la cantidad de neuronas que expresan NOS1 debido al estrés producido por inyecciones diarias con solución salina. Este fenómeno varía dependiendo del sexo y de la zona encefálica estudiada.

Por todo ello, nos hemos planteado la siguiente **hipótesis** de trabajo: “*En el ratón, la adicción a la nicotina y el estrés alteran la producción del NO del caudado-putamen y del núcleo accumbens, de manera dependiente de la presencia de la enzima NOS1 y de forma diferente según el sexo del animal.*”

Los objetivos concretos de la presente Tesis Doctoral son los siguientes:

- Determinar qué isoformas de la NOS se expresan en las neuronas del CP y del NA.
- Analizar cuantitativamente las poblaciones neuronales implicadas en la producción de NO de dichos centros cerebrales, así como las posibles diferencias intra-regionales en la distribución de las mismas. Este parámetro se evaluará en ausencia de tratamiento, en los ratones silvestres en ambos sexos.
- Contrastar la cantidad de metabolitos estables del NO en el CP y el NA en los ratones silvestres y en *knock-out* para la NOS1 en ausencia de tratamiento, para valorar la influencia de esta enzima en la liberación basal del NO en cada uno de los sexos, así como las potenciales diferencias sexuales entre los animales *knock-out*.

- Realizar los análisis anteriores tanto en los ratones tratados con solución salina como con nicotina, para comprobar el efecto del estrés de las inyecciones y el tratamiento con la droga en cada uno de los parámetros estudiados.
- Analizar el efecto del estrés debido a las inyecciones con solución salina en la producción de NO y en la cantidad y distribución de sus neuronas productoras, tanto en los ratones silvestres como en los *knock-out* para la NOS1, en ambos sexos y en las zonas estudiadas.
- Estudiar la respuesta del sistema nitrérgico del ratón en el CP y en el NA como consecuencia de un tratamiento crónico de nicotina, evaluando conjuntamente tanto los resultados bioquímicos como neurohistológicos.

Esperamos que los resultados obtenidos tras la consecución de este proyecto permitirán comprender mejor los mecanismos moleculares y celulares implicados en la adicción a la nicotina. Concretamente, creemos que este estudio proporcionará un conocimiento más profundo de la implicación del sistema nitrérgico en la sensibilización a la nicotina y en el estrés. El estudio de la fuente celular y la isoforma de la NOS implicadas en los efectos de la nicotina, así como la influencia del sexo, son fundamentales para una acción farmacológica adecuada, dirigida específicamente a la supresión de los efectos adictivos de la nicotina sin modificar otras funciones del NO en el cerebro y en el resto del organismo.

Material y Métodos

Animales de experimentación

La especie utilizada para la experimentación fue el ratón *Mus musculus*, L. 1758 (*Muridae*, *Rodentia*, *Mammalia*). Se emplearon ratones *KO* para la NOS1 de la estirpe B6; 129S4-*Nos1^{tm1Ptb}* (The Jackson Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, EEUU). En estos *KO*, el gen de resistencia a neomicina reemplaza al primer exón del gen *nos1*, el cual codifica para los aminoácidos 1–159 de la proteína (Huang *et al.*, 1993). Esta sustitución impide la generación de una proteína NOS1 funcional, además de permitir la selección de las células que carecen de dicha proteína durante el proceso de creación de los ratones *KO*.

Los ratones *KO* para la NOS1 se cruzaron con animales silvestres de la estirpe 129 para obtener los ratones silvestres (+/+) y los *KO* (*nos1⁻/nos1⁻*) empleados en esta Tesis Doctoral. Se utilizaron ratones de 70-90 días de edad postnatal y de ambos sexos. Para la realización de las técnicas bioquímicas se empleó 11 ratones de cada uno de los grupos experimentales. Para el análisis inmunohistológico se utilizó 4 animales de cada uno de dichos grupos. Los animales se criaron y mantuvieron en el Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Salamanca en grupos de 2-5 ratones, independientemente del grupo experimental al que se asignaron, a temperatura y humedad relativa constantes, fotoperiodo artificial de 12/12 horas y alimentados *ad libitum* con agua y pienso compuesto para roedores (T2014 Teklad Global 14% Protein Rodent Diet, Oxon, Reino Unido).

Todos los animales se mantuvieron, manipularon y sacrificaron según lo establecido en la directiva del Consejo de las Comunidades Europeas (86/609/ECC, directiva 2003/65/CE) y la legislación española (RD 1201/2005, ley 32/2007) vigentes para el uso y cuidado de animales de laboratorio.

Genotipado de los ratones

Puesto que los animales *KO* para la NOS1 no tienen un fenotipo aparente, se procedió a su genotipado. Para ello se tomó una muestra de la cola en el momento del destete tras su marcaje e identificación individual. De estas muestras se extrajo el ADN genómico total y se sometió a la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)¹⁵, utilizando oligonucleótidos específicos para detectar la mutación. Por último, las bandas de ADN se separaron por electroforesis en gel de agarosa con bromuro de etidio para su visualización bajo luz ultravioleta.

Extracción de ADN

Para la obtención del ADN, las colas se homogeneizaron a 55 °C durante una noche utilizando proteinasa K (16,4 U/ml, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri,

¹⁵ Del inglés: *polymerase chain reaction*.

EEUU) diluida en tampón fornace (ver Apéndice) con dodecil sulfato sódico (SDS) 0,9% (p/v) y ácido etilen-diamino-tetraacético (EDTA) 20 mM pH 8,0. A continuación se extrajo el ADN mediante la adición de acetato sódico 3 M en una proporción 1:10 (lo que facilita la separación de las fases orgánica y acuosa durante la extracción) y posteriormente se le añadió fenol en una razón de 1:1. Seguidamente, se extrajo la fase acuosa, a la que se le añadió cloroformo/isoamilalcohol (24:1). El ADN se precipitó con etanol 100% a -20° C durante 2 h y posteriormente se centrifugó durante 15 min a 4° C y 5.900 g. Por último, el precipitado se lavó con etanol 70% (v/v) y se resuspendió en agua destilada tratada con dietilpirocarbonato (H₂O_{DEPC}, Sigma-Aldrich).

PCR

La técnica de la PCR permite que en pocas horas y partiendo de una cantidad pequeña de muestra se obtenga un gran número de copias de un fragmento de ADN determinado (Mullis *et al.*, 1986). Para la determinación del genotipo de los ratones empleados en esta Tesis Doctoral se emplearon dos parejas de cebadores o iniciadores propuestos en la página web de The Jackson Laboratory (<http://jaxmice.jax.org>): el par de cebadores oIMR0013 y oIMR0014, así como la pareja oIMR406 y oIMR407. La primera pareja amplifica un fragmento de 280 pares de bases (pb) y permite detectar un fragmento del gen de resistencia a neomicina. El segundo par de iniciadores amplifican un tramo de 117 pb del gen de la *nos1* (Tabla 1).

Tabla 1. Secuencias de los cebadores empleados para el genotipado de los ratones.

Iniciador	Secuencia	Iniciador	Secuencia
oIMR0013	5'- CTT GGG TGG AGA GGC TAT TC -3'	oIMR406	5'- TCA GAT CTG ATC CGA GGA GG -3'
oIMR0014	5'- AGG TGA GAT GAC AGG AGA TC -3'	oIMR407	5'- TTC CAG AGC GCT GTC ATA GC -3'

El medio para la realización de la PCR contenía: tampón comercial de la Taq polimerasa (1x, Promega, Madison, Wisconsin, EEUU), desoxinucleótidos (0,2 mM, Promega), Taq polimerasa (0,1 U/μl, Promega), MgCl₂ (1 mM, Promega), cebadores (0,75 μM; Isogen, IJsselstein, Holanda), muestras de ADN (entre 100 y 500 ng/μl) y H₂O_{DEPC}. Como control positivo se incluyó una muestra de ADN de cada uno de los tres genotipos posibles (+/+, *nos1*⁻/*nos1*⁻ y +/*nos1*⁻) respectivamente, mientras que como control negativo se utilizó el medio anterior sustituyendo el volumen de ADN por H₂O_{DEPC}.

La PCR se llevó a cabo en una termocicladora (Primus, MWG- Biotech, Vernon Hills, Illinois, EEUU) con dos ciclos de temperatura diferentes (Tabla 2).

Tabla 2. Condiciones de tiempo y temperatura para la realización de la PCR.

Paso	Temperatura	Tiempo	Indicaciones
1	94° C	3 min	
2	94° C	35 s	
3	64° C *	45 s	*-0,5 °C por ciclo
4	72° C	45 s	Ir al paso 2, 12 veces
5	94° C	35 s	
6	54° C	30 s	
7	72° C	45 s	Ir al paso 5, 25 veces
8	72° C	2 min	
9	4° C	∞	

Electroforesis

Para comprobar los tamaños de los productos de la reacción de PCR, éstos se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa (Pronadisa, Madrid) al 1,5 % en tampón Tris-borato-EDTA (TBE) 0,5 X. En el gel se añadió 0,4 µg/ml de bromuro de etidio (Sigma-Aldrich). Como tampón de carga se empleó sacarosa al 40 %, EDTA 10 mM y el colorante Blue/Orange (Promega) al 20 % en tampón Tris-ácido acético-EDTA (TAE) 1 X. Como marcador de peso molecular se empleó PhiX 174 DNA/Hae III (Promega).

Los carriles en los que se obtuvo una única banda de 117 pb indicaban que el animal era silvestre (+/+). Cuando se observaba una única banda de 280 pb el animal era *KO* homocigoto (*nos1⁻/nos1⁻*). En el caso de que se obtuvieran ambas bandas, el ratón era heterocigoto (+/*nos1⁻*, Fig. 6).



Figura 6. Fotografía de las bandas obtenidas al realizar una electroforesis del producto de la PCR de ADN genómico de los ratones empleados en esta Tesis Doctoral. El primer carril corresponde al control negativo al que se ha añadido H_2O_{DEPC} en lugar de ADN. El segundo se ha obtenido del ADN de un ratón silvestre, el tercero pertenece a un *knock-out* y el cuarto a un heterocigoto. El último carril corresponde al marcador de pesos moleculares.

Tratamiento con drogas

Se utilizaron varios grupos experimentales y en cada uno de ellos se incluyeron animales silvestres y *KO* de ambos sexos:

- Animales inyectados con (-)-nicotina hidrógeno tartrato (Sigma-Aldrich) disuelto en solución salina isotónica (0.9 % p/v) pH 7,0. La dosis (4 mg/kg, s.c.) se calcula como la base (cantidad de nicotina libre del tartrato). Se aplicó una inyección simple y diaria de nicotina, a las 9.30 h, durante 14 días, y se sacrificaron 24 h después de la última inyección.
- Ratones inyectados con solución salina isotónica (s. salina), sometidos al mismo tratamiento que en el caso anterior, considerados como controles del tratamiento con la droga.
- Animales sin inyectar (animales *naive*).

Valoración del contenido de óxido nítrico

Los ratones que se emplearon para determinar la producción de NO se sacrificaron mediante dislocación cervical y decapitación posterior. A continuación se diseccionaron los encéfalos, se dividieron en dos bloques (parte rostral y parte caudal) a -4.00 mm del nivel Bregma usando una matriz cerebral de planos coronales (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, Pensilvania, EEUU) y se congelaron en N_2 líquido hasta su utilización. Posteriormente, se realizaron lonchas de tejido (200 μm de grosor) en planos coronales en un criostato y se tomaron las porciones de tejido correspondientes al CP y al NA, según el método de microdissección de Palkovits y Brownstein (1987). Los tubos en los que se almacenaron las muestras se pesaron en

frío en una balanza de precisión (Sartorius AG, Gotinga, Alemania) antes y después de contener la muestra, para conocer la cantidad de tejido obtenido. Las muestras cuyo peso era igual o inferior a 1 mg fueron desestimadas, puesto que en estudios previos comprobamos que no era posible detectar con precisión la cantidad de metabolitos del NO presente en el tejido. Las muestras se conservaron a -20 °C hasta su utilización.

Determinación de nitratos y nitritos

El NO es un gas inestable que, tras su formación en los medios biológicos, reacciona con H₂O dando lugar a metabolitos estables, mayoritariamente en nitratos (NO₃) y en nitritos (NO₂), que se pueden valorar en extractos de tejido. Los nitratos se pueden reducir a nitritos mediante la enzima nitrato reductasa y a continuación es posible valorar el contenido total de todos ellos mediante la reacción colorimétrica de Griess (Green *et al.*, 1982).

Extracción de los metabolitos del óxido nítrico del tejido

Para la detección del contenido de NO se siguió el protocolo descrito por Taskiran *et al.* (1997). Cada muestra de tejido se disgregó en 400 µl de tampón fosfato (TF) 0,1 M, pH 7,5 empleando un homogeneizador (Polytron, Kinematica, Lucerna, Suiza) y se centrifugó a 2.000 g durante 15 min a 4°C. Del sobrenadante se tomaron 100 µl y se incubaron con 900 µl de H₂O destilada y con 250 µl de NaOH 0,3 M durante 5 min. A continuación se añadieron 250 µl de ZnSO₄ 5% (p/v) y se incubaron durante 15 min para conseguir una desproteínización adecuada. La mezcla se centrifugó a 3.000 g durante 15 min a 4 °C y el sobrenadante se conservó a -20 °C hasta su utilización.

Reducción de nitratos a nitritos

Para valorar el contenido total de los metabolitos estables del NO en la muestra, los nitratos se redujeron primero a nitritos por la enzima nitrato reductasa según el método descrito por Bories y Bories (1995). Para ello, se realizaron incubaciones por duplicado de 50 µl de muestra en 20 µM de FAD (Sigma-Aldrich), 0,1 mg de β-NADPH (Sigma-Aldrich) y 98 U/µl de nitrato reductasa (Boehringer Mannheim GmbH, Alemania) en TF pH 7,5. La mezcla se incubó 90 min en oscuridad y agitación a temperatura ambiente. Como control negativo se sustituyó la muestra por H₂O destilada. Para poder realizar una recta patrón que permitiera valorar la cantidad de nitratos presentes en el tejido, se incluyeron soluciones de Na₂NO₃ de concentración 1, 2, 4, 5, 6, 25, 10, 12,5, 20, 25, 50 y 100 µM en H₂O destilada.

Reacción de Griess

Para valorar los nitritos presentes en el tejido se utilizó la reacción de Griess. Este método consiste en la combinación de los nitritos con sulfanilamida y N-(1-Naftil)-etilendiamina para formar un compuesto azoico soluble, violeta, detectable espectrofotométricamente (Fig. 7).

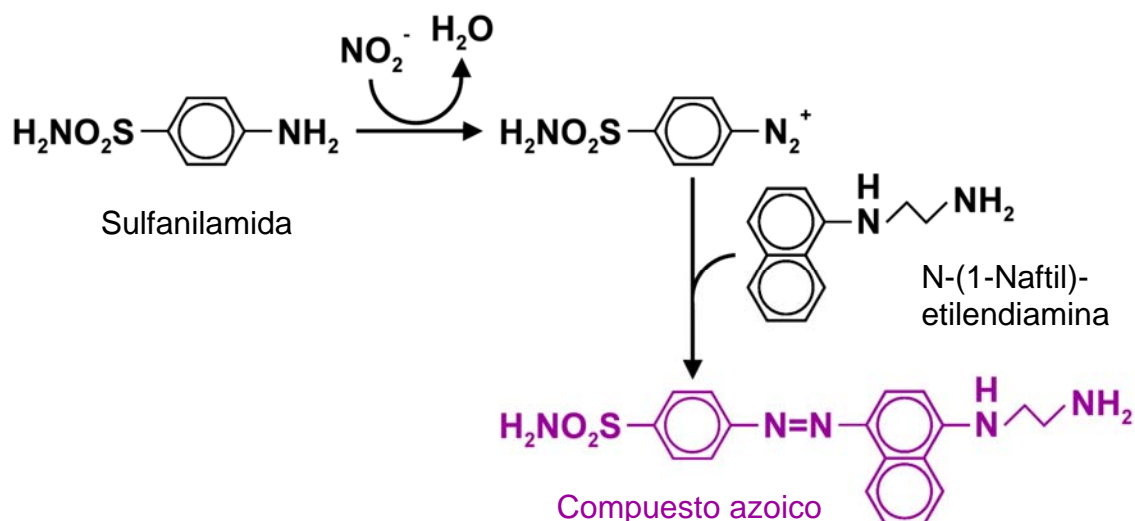


Figura 7: Reacción de Griess.

Para ello, se tomaron 100 μl de muestra y se incubaron con una solución 1:1 de Griess I y Griess II (ver Apéndice) durante 10 – 20 min a temperatura ambiente. Además, se incubaron en paralelo las soluciones patrón de Na_2NO_2 a las mismas concentraciones que las de Na_2NO_3 empleadas en el paso de los nitratos a nitritos, así como un control negativo en el que se sustituyó la muestra por H_2O destilada. Asimismo, una vez reducidos a nitritos los nitratos presentes en la muestra, se tomaron 100 μl de la solución resultante y se siguió el mismo procedimiento que para la valoración de los nitritos. Finalmente, se valoró la absorbancia de cada muestra a 550 nm. De esta forma, las muestras a las que se les realizó previamente la reducción de NO_3^- a NO_2^- mostraban la totalidad de metabolitos estables del NO, mientras que las muestras sobre las que se realizó únicamente la reacción de Griess indicaron la cantidad de NO_2^- presentes en el tejido. Todas las reacciones se hicieron por duplicado.

Las medidas del contenido de NO_2^- arrojaron valores de absorbancia muy próximos al control negativo, por lo que no se tuvieron en cuenta para el análisis de los resultados. De esta manera, se cuantificó el contenido total de los metabolitos de NO. Para homogeneizar los resultados, las cantidades resultantes se refirieron al peso del tejido del cual se obtuvieron.

Análisis estadístico de la producción de NO

El contenido de los metabolitos del NO se estudió de manera separada para el CP y el NA, puesto que son dos estructuras funcionalmente diferentes, empleando el test *t* de Student o el *U* de Mann-Whitney dependiendo de la homogeneidad de la varianza de las muestras.

Análisis histológico

Obtención del tejido

Los ratones destinados al análisis histológico se anestesiaron por vía intramuscular con una mezcla (3:4) de hidrocloreuro de ketamina (Ketolar; Parke-Davis, Barcelona) e hidrocloreuro de tiacina (Rompún; Bayer, Leverkusen, Alemania, 1 µl de la mezcla/g de peso corporal) y se sacrificaron mediante exanguinación por perfusión intracardiaca con una bomba peristáltica. Inicialmente se lavó la sangre con heparina sódica (7 U.I./ml) en solución salina isotónica (0,9 % p/v) y posteriormente se pasó una mezcla de fijador que contenía 4% paraformaldehído y 0,2% ácido pícrico en TF 0.1 M, pH 7,4 durante 15 min (125 ml aproximadamente). Los cerebros se diseccionaron y se dividieron en dos bloques (parte rostral y parte caudal) a -4.00 mm del nivel Bregma usando una matriz cerebral de planos coronales (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, Pensilvania, EEUU). Los bloques se postfijaron en la misma mezcla durante 2 h en agitación y a temperatura ambiente, y a continuación se lavaron en TF durante otras 2 h en agitación. Posteriormente, se crioprotegieron en sacarosa al 30 % (p/v), se congelaron con N₂ líquido, y se almacenaron a -80 °C hasta su utilización.

Los bloques rostrales se cortaron en secciones coronales de 30 µm de espesor con un microtomo de congelación. Las secciones se recogieron en TF y se ordenaron en 12 series consecutivas. A continuación, se lavaron en TF (3 x 10 min) para eliminar los restos de fijador y sacarosa y, por último, las secciones se almacenaron en mezcla congeladora (ver apéndice) a -30 °C hasta su procesamiento histológico.

Inmunofluorescencia indirecta

Se empleó la técnica de la inmunofluorescencia indirecta triple para la localización de las 3 isoformas principales de la NOS, (NOS1, NOS2 y NOS3) en el CP y el NA. Además, se empleó un marcador de células neuronales (proteína asociada a microtúbulos², MAP2¹⁶) para determinar la naturaleza neuronal de las células que expresaban las diferentes isoformas de la NOS. Se realizaron las siguientes inmunodetecciones múltiples con el objeto de determinar a) si los distintos elementos

¹⁶ Del inglés: *microtubule-associated protein 2*.

nitrérgicos eran de naturaleza neuronal, y b) si se co-expresaban en la misma célula distintas isoformas de la enzima:

1) NOS1 – NOS2 – MAP2

2) NOS1 – NOS3 – MAP2

Para realizar cada técnica de inmunomarcaje se empleó una de las series. Las secciones correspondientes se lavaron con TF (6 x 10 min) y se incubaron con una solución de SDS-EDTA durante 30 min para permitir una mejor penetración de los anticuerpos en el tejido. A continuación, las secciones se incubaron en NaBH₄ 0,13 M en TF 0,1 M, pH 7,4, durante 25 min para eliminar la autofluorescencia debida a los aldehídos (Weruaga-Prieto *et al.*, 1996).

Puesto que la localización de la NOS1 no se realiza correctamente cuando se incuba el anticuerpo para su detección conjuntamente con otros, se realizó primero la técnica simple para su inmunolocalización y, seguidamente, se realizó la inmunofluorescencia para la visualización de los restantes antígenos. Para ello, las secciones se incubaron 30 min en agitación y a temperatura ambiente y a continuación se dejaron a 4 °C y en agitación durante 12-18 h en un medio que contenía 5% de suero normal de asno (Sigma-Aldrich), 0,2% Triton X-100 y el antisuero primario diluido en tampón fosfato salino (TFS; Tabla 3). A continuación las secciones se incubaron a temperatura ambiente durante 25 min y, después de lavar con TFS (3 x 10 min), se les añadió el anticuerpo secundario anti-oveja unido al fluorocromo Cy5 durante 2 h (Jackson ImmunoResearch, Suffolk, Reino Unido). Seguidamente, las secciones se incubaron con los restantes antisueros primarios diluidos en suero normal de asno al 5% y TFS siguiendo los mismos patrones temporales que para la detección de NOS1. A continuación, el tejido se incubó durante 2 h con una mezcla de los anticuerpos secundarios de asno para la detección de las isoformas NOS2 ó NOS3 (inmunoglobulinas anti-ratón unidas a Cy2) y MAP2 (anticuerpos anti-conejo unidos a Cy3). Por último, las secciones se montaron en portaobjetos doblemente gelatinizados.

Una vez que las secciones se secaron (entre 30 min y 2 h), los portaobjetos se sumergieron en etanol de 70° y a continuación se tiñeron con una solución de Negro Sudán B (Panreac, Barcelona) al 1% en etanol de 70° durante 4 min para eliminar la fluorescencia inespecífica de origen lipídico presente en el tejido. Seguidamente, se introdujeron en etanol de 70° para eliminar el exceso de colorante, se lavaron en TF y se montaron con medio de montaje acuoso Gel mount (Sigma-Aldrich).

Tabla 3. Sueros inmunológicos

Antisuero primario			Antisuero secundario		
Antígeno	Especie de la que se obtiene la IgG	Concentración	Antígeno	Fluorocromo unido al anticuerpo	Concentración
NOS1	Oveja	1:10.000	IgG oveja	Cy5	1:400
NOS2	Ratón	1:150	IgG ratón	Cy2	1:500
NOS3	Ratón	1:150	IgG ratón	Cy2	1:500
MAP2	Conejo	1:150	IgG conejo	Cy3	1:750

Controles de las técnicas de inmunofluorescencia indirecta

En el caso de la detección de NOS2 se realizó un control positivo, dado que su expresión es muy baja en el tejido estudiado. Para ello se utilizaron secciones de cerebro de ratón obtenidas en experimentos de microinyección de un trazador realizados en nuestro laboratorio (Recio *et al.*, 2007). El periodo de supervivencia de estos animales desde la inyección al sacrificio era de 7 días, lo que permitía la detección de una gran cantidad de glía reactiva que expresaba NOS2 en las áreas adyacentes a la herida producida en el cerebro (Wada *et al.*, 1998). Estas secciones se procesaron de manera pareja a las secciones de cerebro objeto de estudio en esta Tesis Doctoral.

Además, se han utilizado los siguientes controles negativos para comprobar la especificidad de la técnica de inmunofluorescencia:

1. Omisión de los anticuerpos primarios, para detectar uniones inespecíficas de los secundarios.
2. Omisión de los anticuerpos primarios y secundarios, para detectar emisión de fluorescencia inespecífica.
3. Incubación con uno de los tres anticuerpos primarios y adición de cada uno de los otros anticuerpos secundarios, para detectar uniones cruzadas.

Tanto en el caso del anticuerpo de la NOS2 como el de la enzima NOS3 se observó una colocalización inespecífica con la NOS1. Cuando se omitió el anticuerpo contra la NOS1 no se visualizó ninguna célula positiva para la NOS2, excepto en el control positivo. En el caso de la NOS3, al no añadir el anticuerpo contra la NOS1, sólo se observaron vasos sanguíneos (ver resultados).

En el resto de los controles no se encontraron elementos marcados, aunque aparecía una ligera fluorescencia de fondo inespecífica.

Análisis cuantitativo de las secciones procesadas histológicamente

Según la literatura consultada (Burke y Karanas, 1990; Russell *et al.*, 1992; Voorn *et al.*, 2004; Hubert y Kuhar, 2005; Wickens *et al.*, 2007), el ES no puede considerarse una estructura homogénea. Por ello, hemos analizado distintas zonas de esta región encefálica lo suficientemente alejadas entre sí como para evitar solapamientos anatómicos, y que tuvieran una correspondencia funcional en respuesta a drogas de abuso.

La determinación de la densidad de neuronas inmunomarcadas se realizó mediante el análisis de dos niveles rostro-caudales en cada una de las regiones de estudio (nivel rostral, **N1**; y nivel caudal, **N2**). Para la elección de los niveles comparables se empleó la fórmula $s/2(0,5 + n)$, donde **s** es el número de secciones histológicas que contienen la región de interés en cada una de las series obtenidas, y **n** el nivel de estudio elegido (de 0 a 1; Weruaga *et al.*, 1999). El número entero resultante de la fórmula para cada nivel fue el orden que ocupaba la sección en el portaobjetos a partir de la primera considerada como válida; de esta manera, las diferentes secciones elegidas de cada animal fueron comparables rostro-caudalmente (Weruaga *et al.*, 1999). Para el NA, se consideró como la primera sección válida aquella en la que empiezan a aparecer los ventrículos laterales y la última aquella en la que la comisura anterior se localiza más medial que los ventrículos. En el CP, la primera sección también fue aquella en la que aparecen los ventrículos laterales, mientras que se consideró como la última válida aquella en la que el hipocampo ocupa más de la mitad de la zona dorsal de la sección. Para la determinación de las densidades de las células inmunomarcadas se tomaron planos focales de 0,14 mm² mediante un microscopio confocal (Leica Microsystems, Mannheim, Alemania).

Dado el pequeño tamaño del NA, se analizó un único plano focal en el nivel más rostral y otro en el más caudal. Este plano estaba siempre adyacente a la comisura anterior y ventrolateral a ella (Fig. 8); de esta manera nos asegurábamos de que no incluíamos otras regiones colindantes al NA, como la sustancia innominata y, especialmente las islas de Calleja, que contienen gran cantidad de neuronas productoras de NO (Cha *et al.*, 2000; Tong y Hamel, 2000; Gotti *et al.*, 2005).

En el caso del CP, se analizaron 3 planos focales en el nivel más rostral: rostro-dorsal (RD), rostral-lateral (RL), rostro-medial (RM). Puesto que la cápsula interna y el globo pálido ocupan gran parte de la zona medial en el nivel más caudal, allí sólo se tomaron 2 planos focales: caudo-dorsal (CD), caudo-lateral (CL; Fig. 8).

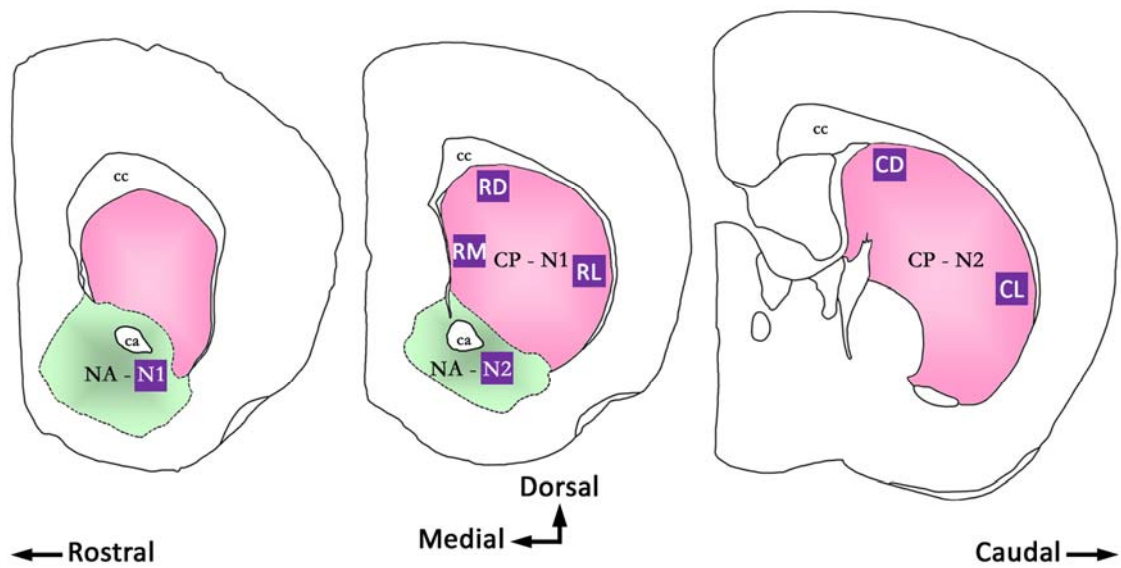


Figura 8. Localización de las zonas analizadas (cuadrados morados) en los niveles rostrales (N1) y caudales (N2) del núcleo accumbens (NA) y del caudado-putamen (CP). ca: comisura anterior; cc: cuerpo calloso, CD: zona caudo-dorsal; CL: zona caudo-lateral; RD: zona rostro-dorsal; RL: zona rostro-lateral; RM: zona rostro-medial (modificado de Hof *et al.*, 2000).

Para el análisis estadístico de las densidades neuronales en las distintas zonas del NA y CP se utilizó primeramente el test de Levene para determinar la homogeneidad de la varianza. Cuando las varianzas eran homogéneas se aplicaron análisis de la varianza univariante, ANOVA y test *post hoc* de Tukey, o test *t* de Student para estudios de parejas de datos, según el caso. Por el contrario, cuando las varianzas no eran homogéneas, se emplearon los análisis de Kruskal-Wallis y *U* de Mann-Whitney para la determinación de las diferencias entre los grupos analizados en cada caso.

Resultados

Las dos regiones del ES estudiadas (NA y CP) muestran una organización neurohistológica similar, como se ha comentado previamente (Mitchell *et al.*, 1999), por lo que primero describiremos la inmunolocalización de la NOS1, la NOS2 y la NOS3 conjuntamente para ambas estructuras. A continuación, dentro de cada uno de los centros cerebrales estudiados, analizaremos la densidad de neuronas productoras de NO –positivas a NOS1, puesto que es la única isoforma de la NOS que se localiza en el ES en dicho tipo celular (ver más adelante)– y la cantidad del neurotransmisor que se produce en cada una de las situaciones estudiadas.

Inicialmente para el NA, estudiaremos tanto la cantidad de células NOS1+ como la de nitratos y nitritos en los animales silvestres sin ningún tipo de tratamiento, para comprobar si existen diferencias entre machos y hembras. Además, ya que existen diferencias rostro-caudales en diferentes sistemas de neurotransmisores en el NA (Burke y Karanas, 1990; Hubert y Kuhar, 2005), comprobaremos si las neuronas productoras de NO siguen un patrón de distribución variable dependiendo de la localización anatómica de las mismas, así como sus posibles diferencias sexuales.

A continuación comprobaremos la influencia del genotipo analizando únicamente la liberación de NO, puesto que los *KO* no muestran neuronas positivas a NOS1. En este estudio se analizará dicha producción de NO tanto en machos como en hembras silvestres y *KO*, ampliando la búsqueda de las posibles diferencias sexuales en los ratones que carecen de NOS1.

Como objetivo principal de esta Tesis Doctoral, estudiaremos la influencia de los tratamientos con solución salina (s. salina) y nicotina en la densidad de células NOS1+ y en la producción de nitratos y nitritos presentes en el tejido. Para ello, realizaremos los mismos estudios que para los animales *naïves*, tanto en los animales inyectados con s. salina como en los tratados con nicotina.

Para comprobar los posibles efectos del estrés en el NA, se realizarán comparaciones de la densidad de células NOS1+ y de la cantidad de nitritos y nitratos entre los ratones silvestres sin tratar y los inyectados con s. salina, en cada uno de los sexos. También se analizará si hay diferencias en la densidad de neuronas positivas a NOS1 entre los ratones *naïves* y los tratados con s. salina en la zona rostral y en la caudal en cada uno de los sexos de los ratones silvestres. Del mismo modo, se estudiarán las posibles diferencias en la cantidad de nitratos y nitritos entre los animales *naïves* y los inyectados con s. salina en cada uno de los sexos en los animales *KO*.

Con el fin de investigar el efecto de la droga, se realizarán los mismos estudios que se establecieron para el análisis del estrés, pero comparando los grupos de ratones inyectados con s. salina con los animales tratados con nicotina.

Por último, se analizarán los mismos parámetros en el CP, excepto en el caso de las diferencias entre zonas rostrales y caudales, puesto que en esta región está

ampliamente comprobado que también existen gradientes latero-mediales además de rostro-caudales (Burke y Karanas, 1990; Russell *et al.*, 1992; Voorn *et al.*, 2004, Wickers *et al.*, 2007). Por ello, analizaremos las posibles diferencias en el contenido de células NOS1+ entre todas las áreas de estudio.

Para realizar dichos análisis, se seguirá el siguiente esquema:

1. En el NA:
 - 1.1. Animales sin tratamiento.
 - 1.1.1. Comparar la densidad de células NOS1+ y de la cantidad de nitratos y nitritos entre los machos y las hembras silvestres.
 - 1.1.2. En los animales silvestres, cotejar la densidad de neuronas NOS1+ entre la zona rostral y caudal en cada uno de los sexos.
 - 1.1.3. Comprobar si existen diferencias en la densidad de células positivas a NOS1 en la zona rostral y caudal de los animales silvestres entre ambos sexos.
 - 1.1.4. Contrastar la cantidad de nitratos y nitritos entre los animales silvestres y *KO* en cada uno de los sexos.
 - 1.1.5. Comprobar si existe una diferencia sexual en la cantidad de nitratos y nitritos en los ratones *KO*.
 - 1.2. Realizar los análisis anteriores (del punto 1.2.1 al 1.2.5) en los animales inyectados con s. salina y en los que fueron tratados con nicotina (del punto 1.3.1 al 1.3.5).
 - 1.3. Efecto del estrés.
 - 1.3.1. Comparar la densidad de las neuronas NOS1+ y la cantidad de nitratos y nitritos entre los animales *naives* y los inyectados con s. salina en cada uno de los sexos en los animales silvestres.
 - 1.3.2. Estudiar si existen cambios en la densidad de neuronas NOS1+ en la zona rostral y en la caudal de los animales silvestres, entre los ratones sin tratamiento y los inyectados con s. salina, en cada uno de los sexos.
 - 1.3.3. Comprobar si existen diferencias en la cantidad de nitratos y nitritos entre los animales *naives* y los inyectados con s. salina, en cada uno de los sexos en los animales *KO*.
 - 1.4. Efecto de la nicotina.
 - 1.4.1. En los animales silvestres, cotejar la densidad de las neuronas positivas a NOS1 y la cantidad de nitratos y nitritos entre los animales inyectados con s. salina y los tratados con nicotina, en cada uno de los sexos.

- 1.4.2. Analizar si existen cambios en la densidad de neuronas NOS1+ en la zona rostral y en la caudal entre los ratones silvestres tratados con s. salina y los inyectados con nicotina, en cada uno de los sexos.
- 1.4.3. Comprobar si existen diferencias en los ratones *KO* en la cantidad de nitratos y nitritos entre los animales tratados con s. salina y los inyectados con nicotina, en cada uno de los sexos.
2. En el CP:
 - 2.1. Animales sin tratamiento.
 - 2.1.1. Comparar la densidad de células NOS1+ y la cantidad de nitratos y nitritos entre los machos y las hembras silvestres.
 - 2.1.2. En los animales silvestres, cotejar la densidad de neuronas NOS1+ entre las distintas áreas en cada uno de los sexos.
 - 2.1.3. Comprobar si existen diferencias en la densidad de células positivas a NOS1 en cada una de las áreas de los animales silvestres, entre ambos sexos.
 - 2.1.4. Contrastar la cantidad de nitratos y nitritos entre los animales silvestres y *KO*, en cada uno de los sexos.
 - 2.1.5. Comprobar si existe una diferencia sexual en la cantidad de nitratos y nitritos en los ratones *KO*.
 - 2.2. Realizar los análisis anteriores (del punto 2.2.1 al 2.2.5) en los animales inyectados con s. salina y en los que fueron tratados con nicotina (del punto 2.3.1 al 2.3.5).
 - 2.3. Efecto del estrés.
 - 2.3.1. Comparar la densidad de las neuronas NOS1+ y la cantidad de nitratos y nitritos entre los animales *naïves* y los inyectados con s. salina, en cada uno de los sexos en los animales silvestres.
 - 2.3.2. Estudiar si existen cambios en la densidad de neuronas NOS1+ en cada una de las áreas de los animales silvestres entre los ratones sin tratamiento y los inyectados con s. salina, en cada uno de los sexos.
 - 2.3.3. Comprobar si existen diferencias en la cantidad de nitratos y nitritos entre los animales *naïves* y los inyectados con s. salina, en cada uno de los sexos en los animales *KO*.
 - 2.4. Efecto de la nicotina.
 - 2.4.1. En los animales silvestres, cotejar la densidad de las neuronas positivas a NOS1 y la cantidad de nitratos y nitritos entre los animales inyectados con s. salina y los tratados con nicotina, en cada uno de los sexos.

- 2.4.2. Analizar si existen cambios en la densidad de neuronas NOS1+ en cada área estudiada entre los ratones silvestres tratados con s. salina y los inyectados con nicotina, en cada uno de los sexos.
- 2.4.3. Comprobar si existen diferencias en los ratones *KO* en la cantidad de nitratos y nitritos entre los animales tratados con s. salina y los inyectados con nicotina, en cada uno de los sexos.

Expresión de las principales isoformas de la NOS en el estriado

NOS1

La inmunolocalización de NOS1 en el CP y en el NA de los animales silvestres se observa únicamente en células de fenotipo neuronal, como se comprueba mediante su coexpresión con la proteína MAP2, que marca típicamente neuronas maduras (Goedert *et al.*, 1991; Harada *et al.*, 2002; Fig.9). Dicha expresión neuronal se produce tanto en ausencia de tratamiento como en los animales sometidos a inyecciones de s. salina o nicotina. Las células positivas poseen la morfología típica de aquellas que contienen NOS1 en el ES; es decir, tienen un soma poligonal o fusiforme con 2-3 dendritas principales escasamente ramificadas (Fig. 10; Kawaguchi, 1993; Kawaguchi *et al.*, 1995). Por el contrario, en los animales *KO* no observamos ningún tipo de inmunomarcaje para la NOS1.

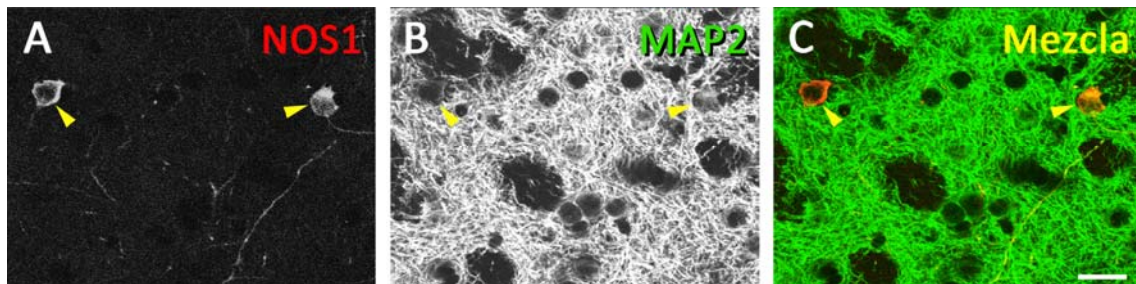


Figura 9: Imágenes de estriado de ratón realizadas con microscopía confocal. Las imágenes corresponden a un mismo plano focal donde se marca la NOS1 en A, la MAP2 en B, y su mezcla en C. En ellas se observa que las células positivas a NOS1 (puntas de flecha amarilla), también expresan el marcador neuronal MAP2. Barra de escala: 20 μm .

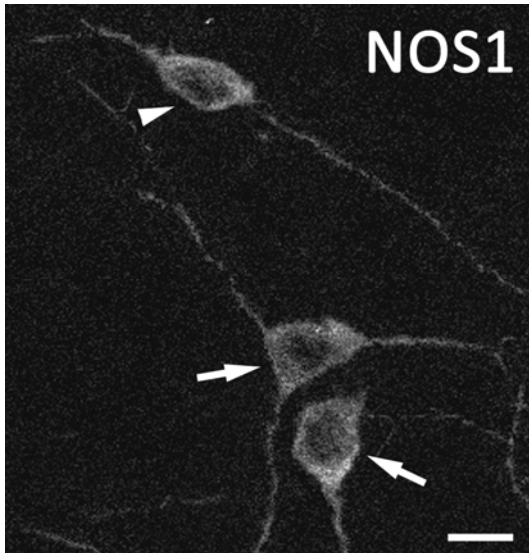


Figura 10: Imagen del estriado de ratón realizada con microscopía confocal. En una reconstrucción de varios planos focales se observa la morfología poligonal (flechas) o fusi-forme (punta de flecha blanca) de los somas de las neuronas que contienen NOS1, con 2 ó 3 dendritas principales

NOS2

La enzima NOS2 no se expresa en los ratones silvestres en ninguna de las condiciones analizadas; es decir, ni en los animales *naives* ni cuando se somete a los ratones a los tratamientos con s. salina o con nicotina. Tampoco se observa inmunomarcaje para la NOS2 en los animales *KO* en ninguna de las condiciones estudiadas (Fig. 11). Como hemos mencionado previamente, para comprobar que la falta de marcaje en las áreas estudiadas se debía a una ausencia de la enzima y no a un mal funcionamiento del anticuerpo contra la NOS2, siempre incluimos un control positivo, que consistía en secciones de encéfalo que tenían una herida causada por la introducción de una aguja capilar en el mismo. La zona que rodea a la herida muestra una gran cantidad de inmunomarcaje para NOS2. Dicha expresión disminuye hasta desaparecer en áreas alejadas de la herida (Fig. 11).

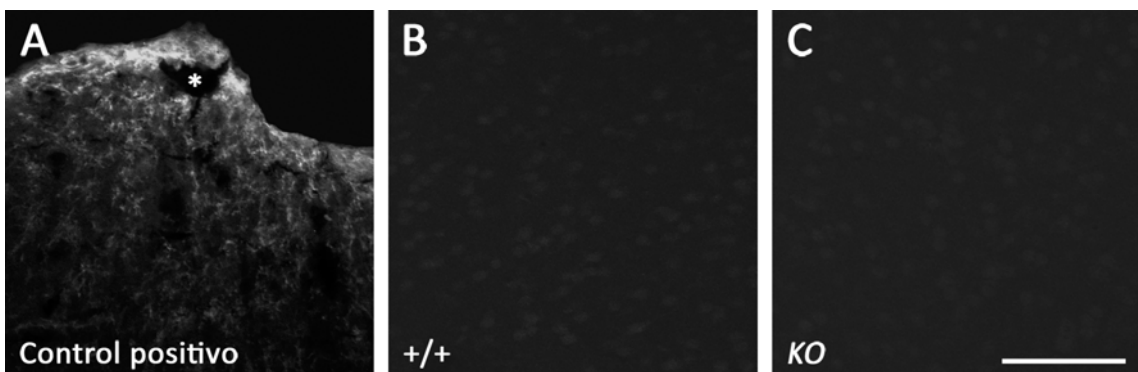


Figura 11: Planos focales de secciones de encéfalo inmunoteñidas para NOS2. En el control positivo (A) se observa gran cantidad de marcaje para NOS2 en la zona cercana a la herida producida por la microinyección (*). No se observa marcaje en el estriado de los ratones silvestres (+/+; B) ni en el de los ratones *knock-out* para la NOS1 (*KO*; C). Barra de escala: 75 μ m.

NOS3

El análisis de la expresión de la NOS3 en el ES de los ratones *naives* silvestres muestra localización en los vasos sanguíneos, como se había descrito previamente (Marsden *et al.*, 1993; Fig. 12). Además, no se observa ninguna célula positiva para NOS3 y MAP2; es decir, que la NOS3 no se localiza en las neuronas maduras, ni en el NA ni en el CP. La localización en los vasos sanguíneos se produce tanto en los machos como en las hembras *naives*. Lo mismo ocurre tanto en los animales tratados con s. salina y nicotina. Tampoco hemos encontrado neuronas que expresen esta proteína en ninguna de las condiciones estudiadas en los ratones *KO* (Fig. 12).

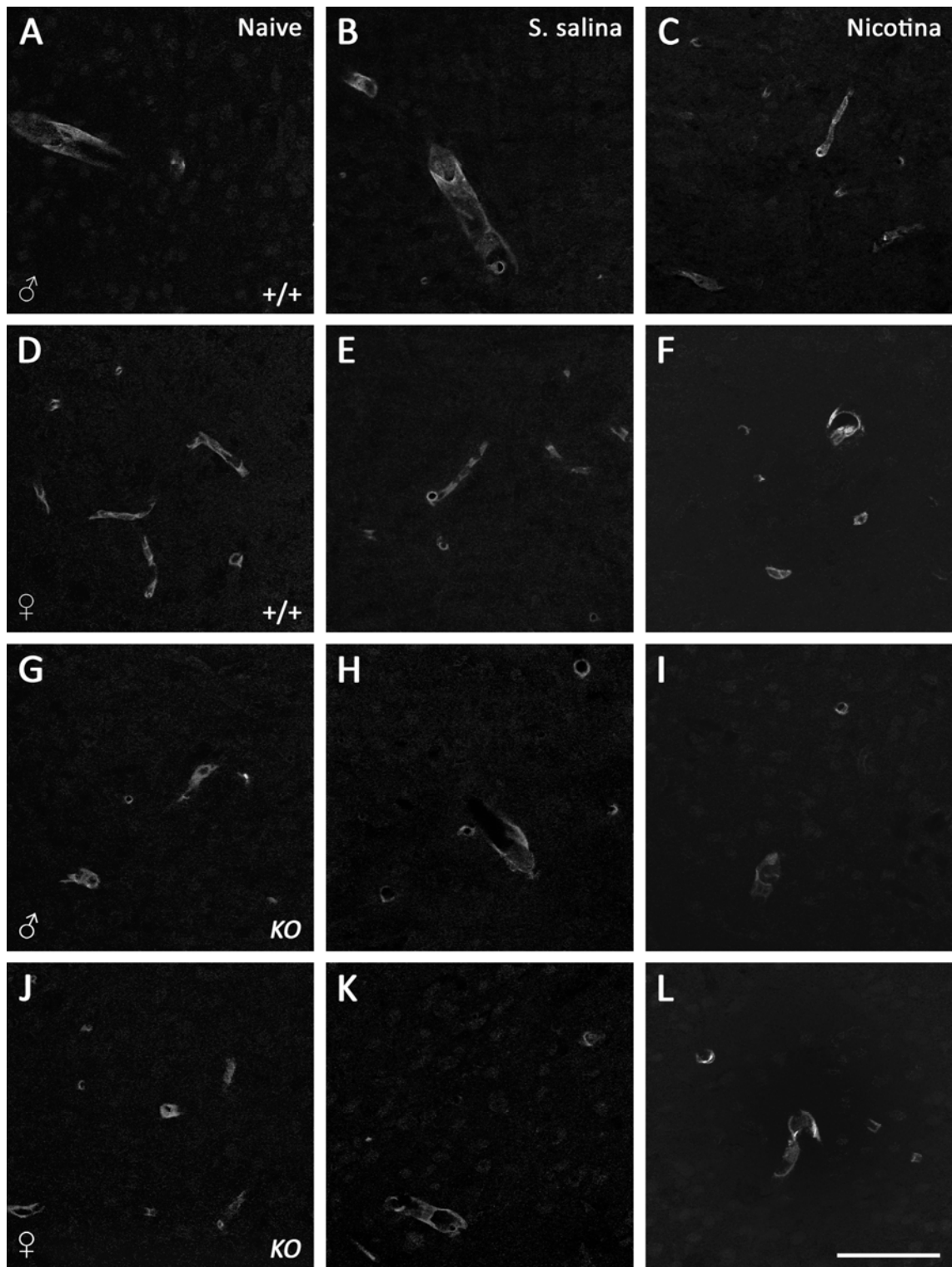


Figura 12: Planos focales de secciones de estríado inmunoteñidas para NOS3. Las imágenes de la primera fila (A-C) corresponden a machos silvestres y la segunda (D-F) a hembras silvestres (+/+), mientras que la tercera (G-I) y cuarta (J-L) pertenecen a machos y hembras *knock-out* (KO), respectivamente. La primera columna muestra imágenes de ratones naives, la segunda de animales tratados con solución salina (s. salina) y la tercera de ratones inyectados con nicotina. La NOS3 se expresa en todos los casos en los vasos sanguíneos y en ningún grupo estudiado se localiza en neuronas. Barra de escala: 75 μm .

1. Núcleo accumbens

1.1. Animales sin tratamiento

Como se ha mencionado previamente, la única isoforma de la NOS que hemos detectado en las neuronas es la NOS1. Además, puesto que en los *KO* tampoco hemos detectado esta proteína, los resultados de la cuantificación de las neuronas productoras de NO se centrarán en la cantidad de células NOS1+ en los animales silvestres.

Para comparar el contenido de las neuronas que contienen la NOS1 en cada una de las zonas estudiadas, los datos siempre se referirán al área. Así, tanto para el NA como para el CP, cuando se aluda a los valores de la densidad siempre será de la siguiente manera: el valor medio de la cantidad de neuronas que contienen NOS1/mm² ± el error estándar de la media (ESM).

Para estudiar la producción de NO, tanto para el NA como para el CP se cuantificará la cantidad de metabolitos estables del gas presentes en el tejido, medidos en µmol de nitratos y nitritos/g de peso húmedo del tejido. En el texto se expresará como el valor medio de dicha concentración ± ESM.

1.1.1. Comparación de la densidad de células NOS1+ y de la cantidad de nitratos y nitritos entre los machos y las hembras silvestres

En el NA de los animales silvestres, la densidad de neuronas que contienen NOS1 no exhibe diferencias significativas entre los machos y las hembras *naives* (Tabla 4; Fig. 13A). Al analizar las diferencias sexuales en la producción de NO en los ratones silvestres se comprueba que en los machos *naives* ésta es mayor que en las hembras (Tabla 4; Fig. 13B).

Tabla 4. Densidad de células positivas a NOS1 (nº células NOS1+/mm²), y concentración de metabolitos estables del NO (µmol/g de peso húmedo), en el núcleo accumbens de los ratones silvestres y la significación estadística de su comparación entre machos y hembras sin tratamiento (*U* de Mann-Whitney).

	Machos	Hembras	valor <i>p</i>
Densidad de células NOS1+	19,56±1,78	20,15±2,78	0,86
Concentración NO ₃ ⁻ +NO ₂ ⁻	26,46±6,19	8,95±1,63	0,03

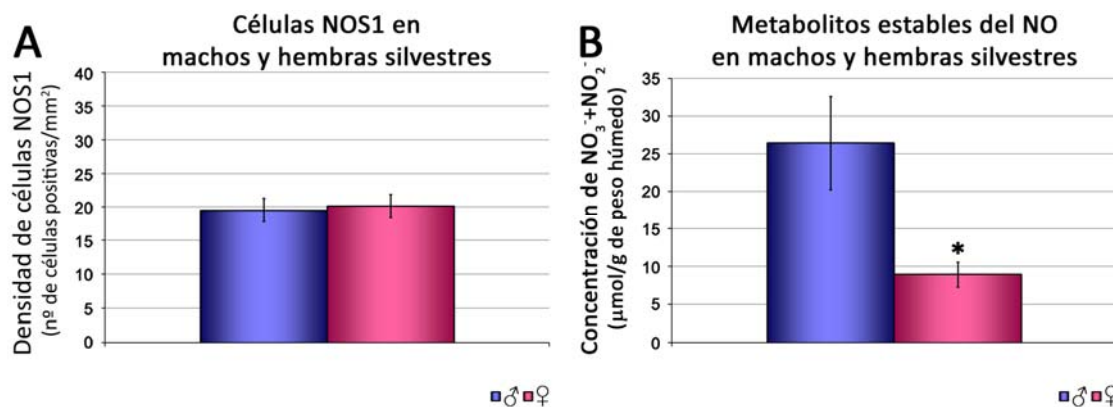


Figura 13: Densidad de células que contienen NOS1 (A) y contenido de los metabolitos estables del NO (B), en el núcleo accumbens de los machos y las hembras silvestres en ausencia de tratamiento. Mientras que no hay diferencias entre sexos en el contenido de células NOS1+, los machos contienen mayor cantidad de NO₃⁻ y NO₂⁻ que las hembras. * $p < 0,05$.

1.1.2. Cotejo de la densidad de neuronas NOS1+ entre las zonas rostral y caudal, en cada uno de los sexos en los animales silvestres

En ausencia de tratamiento, los ratones *naives* no exhiben diferencias significativas en el contenido de neuronas NOS1+ entre las regiones rostrales y caudales del NA, ya sean machos o hembras (Tabla 5).

Tabla 5. Densidad de células positivas a NOS1 (nº células NOS1+/mm²), en las zonas rostral y caudal del núcleo accumbens de los ratones silvestres *naives* y la significación estadística de la comparación de ambas en cada sexo (*t* de Student).

	Rostral	Caudal	valor <i>p</i>
Machos	20,15±2,37	18,96±3,14	0,78
Hembras	24,89±2,51	16,00±3,70	0,09

1.1.3. Comparación de la densidad de células positivas a NOS1 en las zonas rostral y caudal de los animales silvestres, entre ambos sexos

En el NA, cuando se contrasta la densidad de neuronas positivas a NOS1 en ausencia de tratamiento no se observan diferencias entre sexos ni en la zona rostral y ni en la caudal (Tabla 6).

Tabla 6. Densidad de células positivas a NOS1 (nº células NOS1+/mm²), en las zonas rostral y caudal del núcleo accumbens de los ratones silvestres sin tratamiento y la significación estadística de la comparación de cada una de ellas entre ambos sexos (*t* de Student).

	Machos	Hembras)	valor <i>p</i>
Rostral	20,15±2,37	24,89±2,51	0,24
Caudal	18,96±3,14	16,00±3,70	0,59

1.1.4. Análisis de la cantidad de nitratos y nitritos entre los animales silvestres y *KO*, en cada uno de los sexos

Cuando se estudia el efecto de la carencia de la enzima NOS1 en los machos, se comprueba que no hay diferencias en la liberación de NO en ausencia de tratamiento entre los ratones silvestres y los *KO* (Tabla 7; Fig. 14A). Por el contrario, en condiciones *naives*, las hembras silvestres exhiben una menor liberación de NO con respecto a las *KO* de forma muy altamente significativa (Tabla 7; Fig. 14B).

Tabla 7. Concentración de metabolitos estables del NO ($\mu\text{mol/g}$ de peso húmedo), en el núcleo accumbens de los ratones silvestres y *knock-out* (*KO*) *naives* y la significación de su comparación estadística en cada uno de los sexos (*t* de Student, *U* de Mann-Whitney).

	Silvestres	<i>KO</i>	valor <i>p</i>
Machos	26,46±6,19	16,10±2,45	0,15 (<i>U</i>)
Hembras	8,95±1,63	22,67±2,56	<0,001 (<i>t</i>)

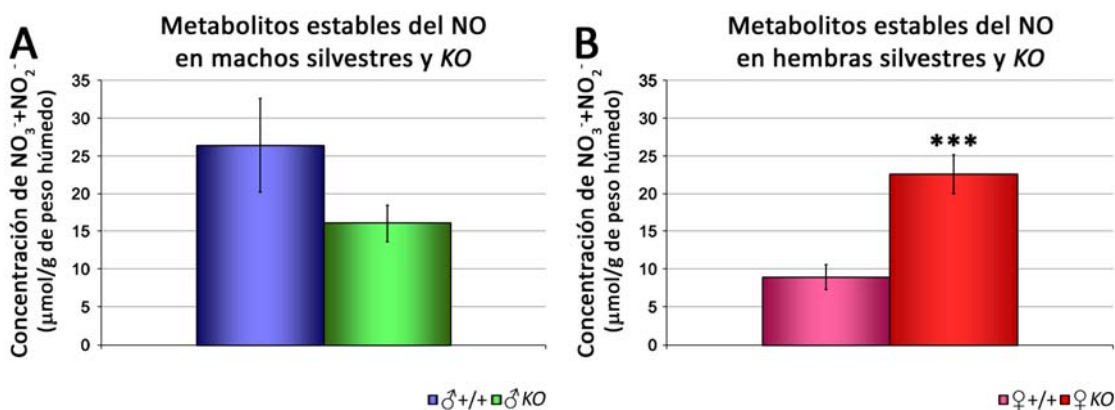


Figura 14: Contenido de los metabolitos estables del NO en el núcleo accumbens de los ratones silvestres (+/+) y *knock-out* (*KO*) en ausencia de tratamiento. Los machos no muestran diferencias en la cantidad de metabolitos estables del NO entre ambos genotipos (A). Sin embargo, las hembras silvestres contienen menor cantidad de NO_3^- y NO_2^- que las *KO* (B). *** $p < 0,001$.

1.1.5. Comparación de la cantidad de nitratos y nitritos entre ambos sexos en los ratones *KO*

No existen diferencias sexuales en la producción de NO en los ratones *KO* en ausencia de cualquier tratamiento (Tabla 8).

Tabla 8. Concentración de metabolitos estables del NO ($\mu\text{mol/g}$ de peso húmedo), en el núcleo accumbens de los ratones *knock-out* en ausencia de tratamiento y la significación estadística de su comparación entre machos y hembras (*t* de Student).

	Machos	Hembras	valor <i>p</i>
Concentración $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$	16,10 \pm 2,45	22,67 \pm 2,57	0,08

1.2. Animales inyectados con solución salina

1.2.1. Comparación de la densidad de células NOS1+ y de la cantidad de nitratos y nitritos, entre los machos y las hembras silvestres

En los animales silvestres tratados con s. salina no hay diferencias sexuales en la densidad de las neuronas que contienen NOS1, al igual que ocurre en ausencia de tratamiento (Tabla 9; Fig. 15A). Sin embargo, la liberación de NO sí muestra diferencias sexuales, pero en sentido contrario que en los animales *naives*: los machos contienen menos metabolitos estables del NO que las hembras (Tabla 9; Fig. 15B).

Tabla 9. Densidad de células positivas a NOS1 (n° células NOS1+/ mm^2), y concentración de metabolitos estables del NO ($\mu\text{mol/g}$ de peso húmedo), en el núcleo accumbens de los ratones silvestres y la significación estadística de su comparación entre machos y hembras inyectados con solución salina (*t* de Student, *U* de Mann-Whitney).

	Machos	Hembras	valor <i>p</i>
Densidad de células NOS1+	24,00 \pm 3,29	25,48 \pm 3,14	0,76 (<i>t</i>)
Concentración $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$	7,57 \pm 2,00	21,37 \pm 4,20	0,01 (<i>U</i>)

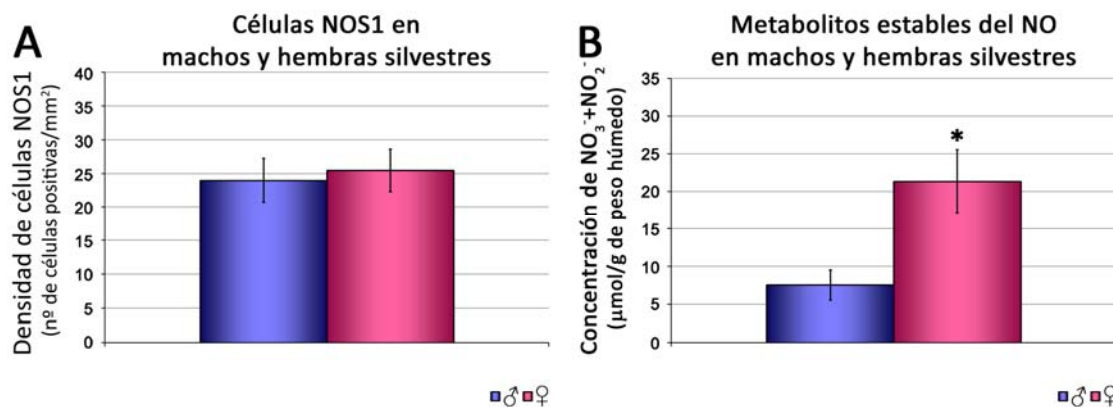


Figura 15: Densidad de las células que contienen NOS1 (A) y contenido de los metabolitos estables del NO (B) en el núcleo accumbens de los machos y las hembras silvestres en animales inyectados con solución salina. Mientras que no hay diferencias entre sexos en el contenido de células NOS1+, los machos contienen menor cantidad de NO₃⁻ y NO₂⁻ que las hembras. * $p < 0,05$.

1.2.2. Cotejo de la densidad de neuronas NOS1+ entre las zonas rostral y caudal, en cada uno de los sexos, en los animales silvestres

Los ratones tratados con s. salina no muestran diferencias en la densidad de neuronas que expresan la NOS1 entre la zona rostral y la caudal del NA, ni en los machos ni en las hembras (Tabla 10).

Tabla 10. Densidad de células positivas a NOS1 (nº células NOS1+/mm²), en las zonas rostral y caudal del núcleo accumbens de los ratones silvestres inyectados con solución salina y la significación estadística de la comparación de ambas en cada sexo (*t* de Student, *U* de Mann-Whitney).

	Rostral	Caudal	valor <i>p</i>
Machos	22,22±2,67	25,78±5,87	0,61 (<i>U</i>)
Hembras	24,89±5,43	26,07±1,19	0,84 (<i>t</i>)

1.2.3. Comparación entre ambos sexos de la densidad de células positivas a NOS1 en las zonas rostral y caudal de los animales silvestres

Los animales sometidos a las inyecciones con s. salina no muestran diferencias sexuales en la densidad de neuronas NOS1+, ni en la zona rostral ni en la caudal del NA (Tabla 11).

Tabla 11. Densidad de células positivas a NOS1 (nº células NOS1+/mm²), en las zonas rostral y caudal del núcleo accumbens de los ratones silvestres tratados con solución salina y la significación estadística de la comparación de cada una de ellas entre ambos sexos (*t* de Student, *U* de Mann-Whitney).

	Machos	Hembras	valor <i>p</i>
Rostral	22,22±2,67	24,89±5,43	0,65 (<i>t</i>)
Caudal	25,78±5,87	26,07±1,19	0,98 (<i>U</i>)

1.2.4. Análisis de la cantidad de nitratos y nitritos entre los animales silvestres y *KO*, en cada uno de los sexos

El estudio del contenido de metabolitos estables del NO muestra que los ratones machos *KO* contienen mayor concentración de aquéllos que los machos silvestres cuando están sometidos a las inyecciones con s. salina (Tabla 12; Fig. 16A). Las hembras silvestres y *KO*, por el contrario, no muestran diferencias en dicha concentración de metabolitos de NO (Tabla 12; Fig. 16B).

Tabla 12. Concentración de metabolitos estables del NO ($\mu\text{mol/g}$ de peso húmedo), en el núcleo accumbens de los ratones silvestres y *knock-out* (*KO*) inyectados con solución salina y la significación de su comparación estadística en cada uno de los sexos (*t* de Student).

	Silvestres	<i>KO</i>	valor <i>p</i>
Machos	7,67±2,00	17,56±2,88	0,03
Hembras	21,37±4,20	22,85±3,83	0,84

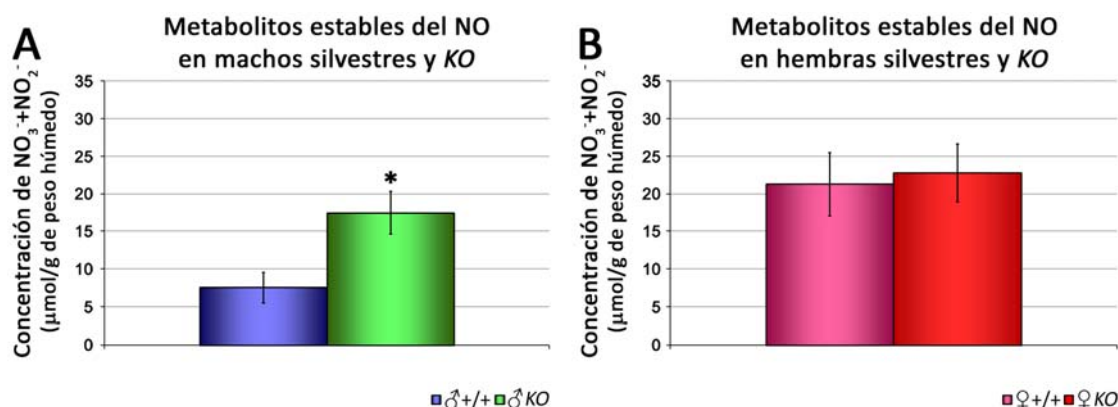


Figura 16: Contenido de metabolitos estables del NO en el núcleo accumbens de los ratones silvestres (+/+) y *knock-out* (*KO*) tratados con solución salina. Los machos silvestres contienen menor cantidad de NO_3^- y NO_2^- que los *KO* (A). Sin embargo, las hembras no muestran diferencias en la cantidad de metabolitos estables del NO entre ambos genotipos (B). * $p < 0,05$.

1.2.5. Comparación de la cantidad de nitratos y nitritos entre ambos sexos, en los ratones *KO*

Al igual que ocurre en los ratones *naives*, no se observan diferencias significativas en la producción de NO entre los machos y las hembras *KO* inyectados con s. salina (Tabla 13).

Tabla 13. Concentración de metabolitos estables del NO ($\mu\text{mol/g}$ de peso húmedo), en el núcleo accumbens de los ratones *knock-out* inyectados con solución salina y la significación estadística de su comparación entre machos y hembras (*t* de Student).

	Machos	Hembras	valor <i>p</i>
Concentración $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$	$17,56 \pm 2,88$	$22,85 \pm 3,83$	0,28

1.3. Animales inyectados con nicotina

1.3.1. Comparación de la densidad de células NOS1+ y de la cantidad de nitratos y nitritos, entre los machos y las hembras silvestres

Los ratones silvestres tratados con nicotina no muestran diferencias sexuales en la cantidad de neuronas que contienen NOS1 (Tabla 14; Fig. 17A). Asimismo, tampoco muestran distinta concentración de los metabolitos del NO en relación con el sexo del animal (Tabla 14; Fig. 17B).

Tabla 14. Densidad de células positivas a NOS1 (n° células NOS1+/ mm^2), y concentración de metabolitos estables del NO ($\mu\text{mol/g}$ de peso húmedo), en el núcleo accumbens de los ratones silvestres y la significación estadística de su comparación entre machos y hembras inyectados con nicotina (*t* de Student, *U* de Mann-Whitney).

	Machos	Hembras	valor <i>p</i>
Densidad de células NOS1+	$17,78 \pm 1,78$	$19,56 \pm 2,05$	0,56 (<i>t</i>)
Concentración $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$	$11,32 \pm 1,45$	$17,76 \pm 3,58$	0,13 (<i>U</i>)

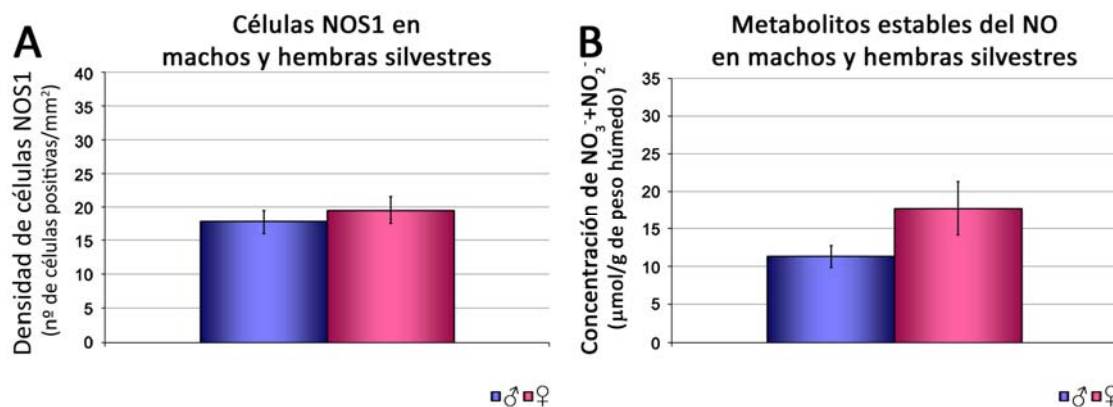


Figura 17: Densidad de células que contienen NOS1 (A) y contenido de los metabolitos estables del NO (B) en el núcleo accumbens de los machos y las hembras silvestres, en animales inyectados con nicotina. No hay diferencias significativas entre ambos sexos, ni en el contenido de células NOS1+ ni en la cantidad de NO_3^- y NO_2^- .

1.3.2. Comparación entre ambos sexos de la densidad de células positivas a NOS1 en las zonas rostral y caudal de los animales silvestres

Los animales sometidos al tratamiento con nicotina no exhiben diferencias rostro-caudales en la población neuronal NOS1+ del NA, ni en los machos ni en las hembras (Tabla 15).

Tabla 15. Densidad de células positivas a NOS1 (nº células NOS1+/mm²), en las zonas rostral y caudal del núcleo accumbens de los ratones silvestres inyectados con nicotina y la significación estadística de la comparación de ambas en cada sexo (*t* de Student, *U* de Mann-Whitney).

	Rostral	Caudal	valor <i>p</i>
Machos	20,15±1,19	15,41±3,14	0,23 (<i>t</i>)
Hembras	24,89±6,49	14,22±2,90	0,21 (<i>U</i>)

1.3.3. Comprobación entre ambos sexos de las posibles diferencias en la densidad de células positivas a NOS1 en las zonas rostral y caudal de los animales silvestres

Los animales silvestres tratados con la droga no muestran diferencias en la densidad de células positivas a NOS1 entre los machos y las hembras, ni en la zona rostral ni en la caudal del NA (Tabla 16).

Tabla 16. Densidad de células positivas a NOS1 (nº células NOS1+/mm²), en las zonas rostral y caudal del núcleo accumbens de los ratones silvestres tratados con nicotina y la significación estadística de la comparación de cada una de ellas entre ambos sexos (*t* de Student, *U* de Mann-Whitney).

	Machos	Hembras	valor <i>p</i>
Rostral	20,15±1,19	24,89±6,49	0,52 (<i>U</i>)
Caudal	15,41±3,14	14,22±2,90	0,80 (<i>t</i>)

1.3.4. Análisis de la cantidad de nitratos y nitritos entre los animales silvestres y *KO*, en cada uno de los sexos

Los ratones machos tratados con nicotina muestran diferente concentración de los metabolitos del NO dependiendo del genotipo del animal: en los animales silvestres es menor que en los machos que carecen de la NOS1 (Tabla 17; Fig. 18A). Sin embargo, dichas diferencias no aparecen entre las hembras silvestres y las *KO* (Tabla 17; Fig. 18B).

Tabla 17. Concentración de metabolitos estables del NO ($\mu\text{mol/g}$ de peso húmedo), en el núcleo accumbens de los ratones silvestres y *knock-out* (*KO*) inyectados con nicotina y la significación de su comparación estadística en cada uno de los sexos (*t* de Student).

	Silvestres	<i>KO</i>	valor <i>p</i>
Machos	11,32±1,45	21,79±1,89	<0,001
Hembras	17,76±3,58	25,05±3,23	0,15

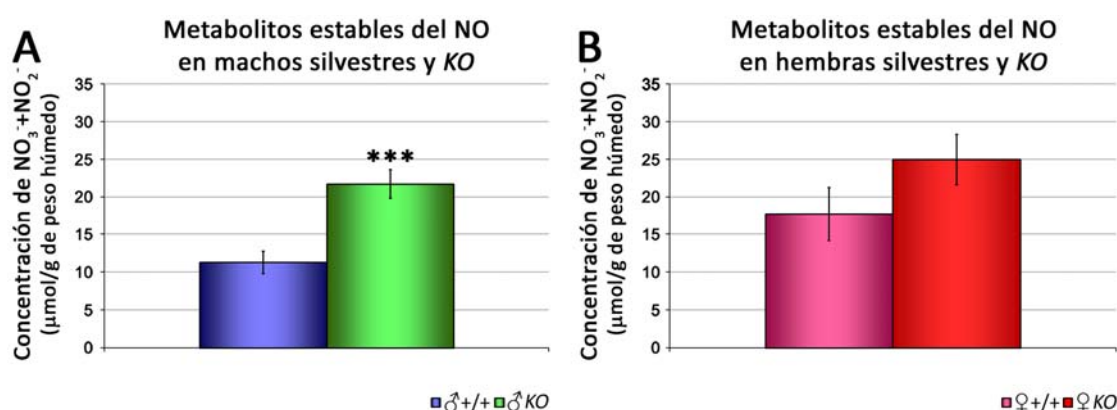


Figura 18: Contenido de los metabolitos estables del NO en el núcleo accumbens de los ratones silvestres (+/+) y *knock-out* (*KO*) tratados con nicotina. Los machos silvestres contienen menor cantidad de NO_3^- y NO_2^- que los *KO* (A). Sin embargo, las hembras no muestran diferencias en la cantidad de metabolitos estables del NO entre ambos genotipos (B). *** $p < 0,001$.

1.3.5. Comparación de la cantidad de nitratos y nitritos, entre ambos sexos, en los ratones *KO*

El estudio de la producción de NO entre los machos y las hembras *KO* tratados con la droga, no muestra diferencias en el contenido de los metabolitos del NO (Tabla 18).

Tabla 18. Concentración de metabolitos estables del NO en el núcleo accumbens de los ratones *knock-out* inyectados con solución nicotina y la significación estadística de su comparación entre machos y hembras (*t* de Student).

	Machos	Hembras	valor <i>p</i>
Concentración NO ₃ ⁻ +NO ₂ ⁻	21,79±1,89	25,05±3,32	0,41

1.4. Efecto del estrés

1.4.1. Comparación de la densidad de las neuronas NOS1+ y la cantidad de nitratos y nitritos entre los animales *naïves* y los inyectados con s. salina, en cada uno de los sexos, en los animales silvestres

Cuando se analiza la cantidad de células NOS1+ se observa que no hay diferencias significativas entre los ratones *naïves* y los inyectados con s. salina, ni en los machos ni en las hembras (Tabla 19; Fig.19A,C). Sin embargo, al estudiar la producción de NO dependiendo del tratamiento aplicado, se comprueba que en los machos *naïves* hay una cantidad de metabolitos estables del NO mayor que en los tratados con s. salina (Tabla 19; Fig.19B). Al contrario de lo que ocurre en los machos, las hembras *naïves* contienen una cantidad significativamente menor de metabolitos del NO que las inyectadas con s. salina (Tabla 19; Fig.19D).

Tabla 19. Densidad de células positivas a NOS1 (nº células NOS1+/mm²), y concentración de metabolitos estables del NO (µmol/g de peso húmedo), en el núcleo accumbens de los ratones silvestres machos y hembras y la significación estadística de su comparación (*t* de Student, *U* de Mann-Whitney), entre los animales sin tratar (*naïves*) y los inyectados con solución salina (s. salina).

	Densidad de células NOS1+			Metabolitos estables del NO		
	<i>Naïves</i>	S. salina	valor <i>p</i>	<i>Naïves</i>	S. salina	valor <i>p</i>
Machos	19,56±1,78	24,00±3,29	0,33 (<i>t</i>)	26,46±6,19	7,57±2,00	0,02 (<i>U</i>)
Hembras	20,15±2,78	25,48±3,14	0,26 (<i>t</i>)	8,95±1,63	21,36±4,20	0,02 (<i>U</i>)

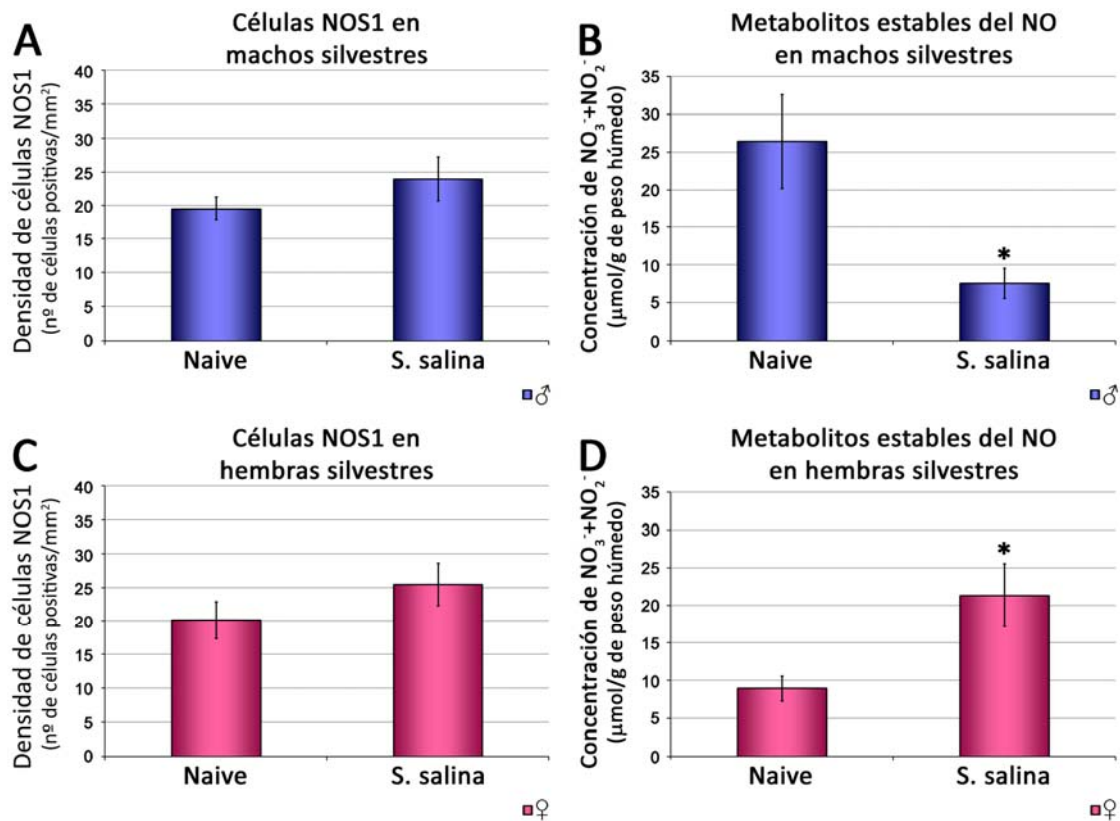


Figura 19: Densidad de células que contienen NOS1 (A y C) y contenido de los metabolitos estables del NO (B y D) en el núcleo accumbens de los machos (A y B) y las hembras silvestres (C y D). No existen diferencias en el contenido de células NOS1+ entre los ratones *naïves* y los inyectados con solución salina (s. salina,) ni en los machos ni en las hembras. Por el contrario, la cantidad de NO_3^- y NO_2^- , varía dependiendo de si los animales fueron tratados con inyecciones con s. salina. Además, dicha variación es diferente según el sexo del animal: el contenido de los metabolitos del NO disminuye en los machos, mientras que en las hembras aumenta. * $p < 0,05$.

1.4.2. Comparación de la densidad de neuronas NOS1+ en la zona rostral y en la caudal de los animales silvestres entre los ratones sin tratamiento y los inyectados con s. salina, en cada uno de los sexos

Al analizar del efecto del el estrés de las inyecciones en la densidad de células que contienen NOS1 en el NA, se comprueba que los ratones sometidos a las inyecciones con s. salina no alteran dicha densidad con respecto a los animales *naïves*, ni en la zona rostral ni en la caudal. Esto sucede tanto en los machos como en las hembras (Tabla 20).

Tabla 20. Densidad de células positivas a NOS1 (n° células NOS1+/mm²), en las zonas rostral y caudal del núcleo accumbens de los ratones silvestres *naïves* y los tratados con solución salina (s. salina) y la significación estadística de la comparación entre ambos tratamientos en cada sexo (*t* de Student, *U* de Mann-Whitney).

	Rostral			Caudal		
	<i>Naives</i>	S. salina	<i>valor p</i>	<i>Naives</i>	S. salina	<i>valor p</i>
Machos	20,15±2,37	22,22±2,67	0,60 (<i>t</i>)	18,96±3,14	25,78±5,87	0,47 (<i>U</i>)
Hembras	24,89±2,51	24,89±5,43	1 (<i>t</i>)	16,00±3,70	26,07±1,19	0,07 (<i>t</i>)

1.4.3. Comparación de la cantidad de nitratos y nitritos entre los animales *naives* y los inyectados con s. salina, en cada uno de los sexos, en los animales *KO*

El análisis de la influencia del sexo en la producción de NO en los ratones *KO*, muestra que no hay alteraciones en dicha liberación entre los machos *naives* y los inyectados con s. salina. Igualmente, en las hembras *KO* el contenido de metabolitos del NO es igual en ambos casos (Tabla 21).

Tabla 21. Concentración de metabolitos estables del NO ($\mu\text{mol/g}$ de peso húmedo), del núcleo accumbens de los ratones *knock-out naive* y los tratados con solución salina (s. salina) y la significación estadística de la comparación entre ambos tratamientos en cada sexo (*U* de Mann-Whitney).

	<i>Naives</i>	S. salina	<i>valor p</i>
Machos	16,10±2,45	17,56±2,89	0,71
Hembras	22,67±2,56	22,85±3,83	0,97

1.5. Efecto de la nicotina

1.5.1. Comparación de la densidad de neuronas NOS1+ y la cantidad de nitratos y nitritos entre los animales inyectados con s. salina y los tratados con nicotina, en cada uno de los sexos, en los animales silvestres

El contraste de la densidad de células que contienen la NOS1 entre los ratones silvestres tratados con s. salina y los inyectados con nicotina no muestra diferencias significativas, ni en los machos ni en las hembras (Tabla 22). Por otro lado, tampoco se observan diferencias en la producción de NO debido al efecto de la droga, ya sea en machos o en hembras (Tabla 22).

Tabla 22. Densidad de células positivas a NOS1 (nº células NOS1+/mm²), y concentración de metabolitos estables del NO (µmol/g de peso húmedo), en el núcleo accumbens de los ratones silvestres machos y hembras y la significación estadística de su comparación entre los animales inyectados con solución salina (s. salina) y los tratados con nicotina (*t* de Student).

	Densidad de células NOS1+			Metabolitos estables del NO		
	S. salina	Nicotina	valor <i>p</i>	S. salina	Nicotina	valor <i>p</i>
Machos	24,00±3,29	17,78±1,78	0,20	7,57±2,00	11,32±1,45	0,14
Hembras	25,48±3,14	19,56±2,05	0,16	21,36±4,20	17,76±3,58	0,52

1.5.2. Comparación de la densidad de neuronas NOS1+ en la zona rostral y en la caudal entre los ratones silvestres tratados con s. salina y los inyectados con nicotina, en cada uno de los sexos

En los ratones silvestres macho, la nicotina no altera la densidad de las neuronas NOS1+ con respecto a sus controles tratados con s. salina, ni en la zona rostral ni en la caudal del NA (Tabla 23; Fig. 20A,B). En las hembras, el tratamiento con nicotina tampoco modifica dicha densidad respecto a las tratadas con s. salina en la zona rostral (Tabla 23; Fig. 20C). Por el contrario, la zona caudal sí muestra una respuesta a la droga, disminuyendo significativamente el contenido las células que expresan la NOS1 (Tabla 23; Fig. 20D).

Tabla 23. Densidad de células positivas a NOS1 (nº células NOS1+/mm²), en las zonas rostral y caudal del núcleo accumbens de los ratones silvestres tratados con solución salina (s. salina) y los inyectados con nicotina y la significación estadística de la comparación entre ambos tratamientos en cada sexo (*t* de Student, *U* de Mann-Whitney).

	Rostral			Caudal		
	S. salina	Nicotina	valor <i>p</i>	S. salina	Nicotina	valor <i>p</i>
Machos	22,22±2,67	20,15±1,19	0,52 (<i>U</i>)	25,78±5,87	15,41±3,14	0,19 (<i>U</i>)
Hembras	24,89±5,43	24,89±6,49	1 (<i>t</i>)	26,07±1,19	14,22±2,90	0,02 (<i>t</i>)

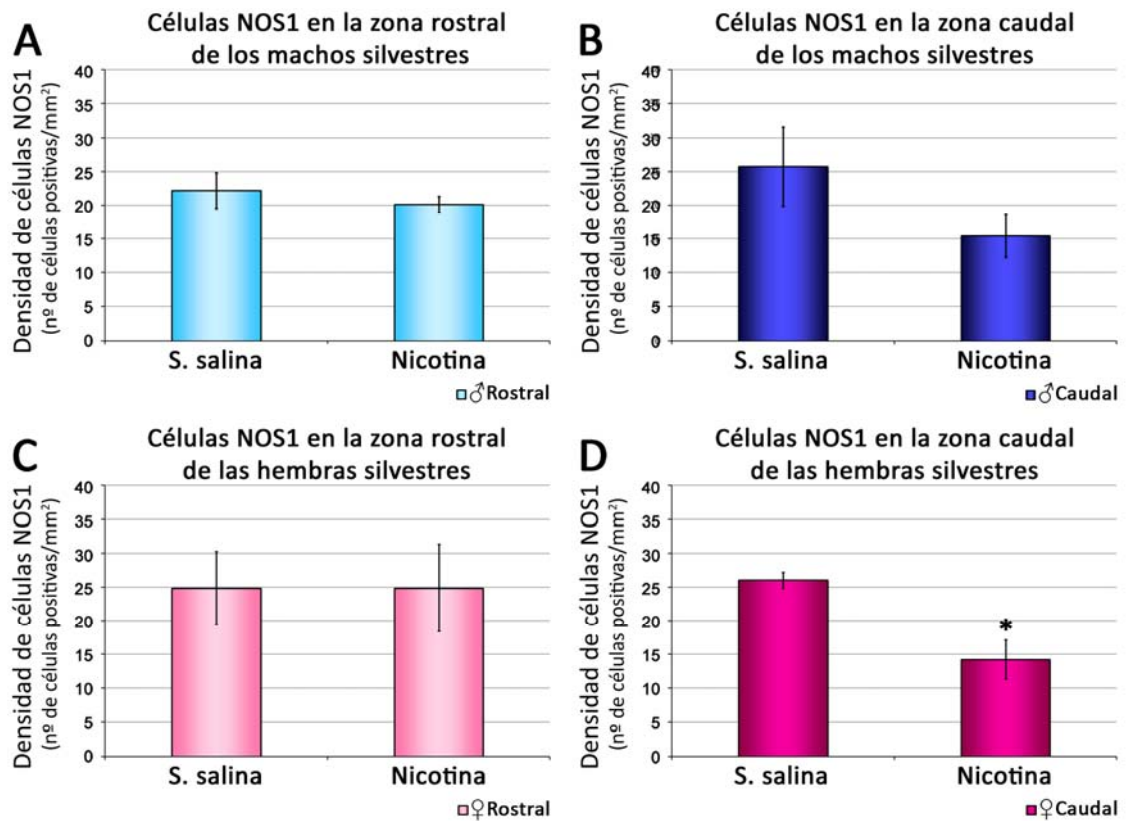


Figura 20: Densidad de las células que contienen NOS1 en las zonas rostral (A y C) y caudal (B y D) del núcleo accumbens de los machos (A y B) y las hembras silvestres (C y D). No hay diferencias en el contenido de células NOS1+entre los ratones inyectados con solución salina (s. salina) y los tratados con nicotina, ni en la zona rostral ni en la caudal de los machos. En las hembras, tampoco se observan cambios debidos a la droga en la zona rostral. Por el contrario, en la zona caudal la densidad de neuronas NOS1+ disminuye debido a la nicotina con respecto a las hembras tratadas con s. salina. * $p < 0,05$.

1.5.3. Comparación de la cantidad de nitratos y nitritos entre los animales tratados con s. salina y los inyectados con nicotina, en cada uno de los sexos, en los ratones *KO*

Al contrastar la concentración de metabolitos del NO en el NA, no se observan diferencias en ésta entre los machos *KO* sometidos a las inyecciones de s. salina y los tratados con nicotina (Tabla 24). Lo mismo ocurre entre las hembras que carecen de la NOS1 tratadas con s. salina y las inyectadas con la droga (Tabla 24).

Tabla 24. Concentración de metabolitos estables del NO ($\mu\text{mol/g}$ de peso húmedo), en el núcleo accumbens de los ratones *knock-out* tratados con solución salina (s. salina) e inyectados con nicotina y la significación estadística de la comparación entre ambos tratamientos en cada sexo (*t* de Student).

	S. salina	Nicotina	valor <i>p</i>
Machos	17,56±2,89	21,79±1,89	0,25
Hembras	22,85±3,83	25,05±3,23	0,68

Resumen

Animales sin tratamiento

Los animales *naïves* silvestres no muestran diferencias sexuales en la densidad de neuronas que contienen NOS1 en el NA. Asimismo, no hay diferencias rostro-caudales en la distribución de éstas ni en los machos ni en las hembras; es más, tampoco hay diferencias sexuales en la zona rostral o la caudal del NA. Por el contrario, la producción de NO es mayor en los machos que en las hembras. Más aún, cuando se estudia cómo influye la carencia de la enzima NOS1 en la liberación de NO en los ratones *naïves*, las hembras silvestres muestran una menor cantidad de metabolitos estables del NO que las hembras *KO*. Sin embargo, no se observan diferencias en la cantidad de éstos entre los machos silvestres y *KO*. Además, al contrario de lo que ocurre en los ratones silvestres, no existen diferencias sexuales en la producción de NO entre los machos y las hembras *KO*.

Animales inyectados con solución salina

Al igual que ocurre en los ratones *naïves*, los animales silvestres tratados con s. salina no exhiben diferencias entre sexos en la densidad de neuronas NOS1+ en el NA. Asimismo, tampoco muestran diferencias rostro-caudales en dicha densidad, ni en los machos ni en las hembras. Además, tampoco presentan diferencias sexuales ni en la zona rostral ni en la caudal del NA. Sin embargo, los animales silvestres tratados con s. salina muestran diferencias sexuales en la cantidad de los metabolitos estables del NO en el NA, pero en sentido inverso de lo que sucede en los animales *naïves*: los machos tienen una menor liberación de NO que las hembras. Asimismo, al comparar el contenido de metabolitos estables del NO entre los animales silvestres y los ratones que carecen de NOS1, se observa que en los ratones tratados con s. salina ocurre lo contrario que en los *naïves*: Es decir, los machos silvestres poseen una menor concentración de NO₂⁻/NO₃⁻ que los machos *KO*, mientras que no hay diferencias entre las hembras de ambos genotipos. Además, no existen diferencias sexuales en la producción de NO en los *KO* inyectados con s. salina.

Animales inyectados con nicotina

En el NA, no existen diferencias sexuales en la densidad de células NOS1+ en los ratones tratados con nicotina. Asimismo, tampoco se observan diferencias en la densidad de neuronas nitrérgicas entre las zonas rostral y caudal del NA, ni en los machos ni en las hembras. Igualmente, no hay diferencias sexuales en dicha densidad ni en la zona rostral ni en la caudal. Además, los ratones silvestres tratados con nicotina no exhiben diferencias en la concentración de los metabolitos estables del NO entre sexos, al contrario de lo que ocurría en los animales *naïves* y en los que fueron sometidos a inyecciones con s. salina. Además, al igual que ocurre en los animales inyectados con s. salina, en los ratones tratados con nicotina la liberación de NO es menor en los machos silvestres que en los machos *KO*. De igual forma, no se aprecia cambios en el contenido de los metabolitos del NO entre las hembras de ambos genotipos, así como tampoco hay diferencias sexuales en los ratones *KO*.

Efecto del estrés

En el NA de los ratones silvestres, la densidad de neuronas que expresan NOS1 no se ve alterada por las inyecciones de s. salina con respecto a los ratones *naïves*, ni en los machos ni en las hembras. Además, al estudiar la zona rostral y la caudal por separado, tampoco se observan cambios en dicha densidad. Por el contrario, el contenido de metabolitos del NO en los animales silvestres sí varía como consecuencia del estrés de las inyecciones con s. salina, disminuyendo en los machos y aumentando en las hembras. Por el contrario, en los ratones *KO*, la concentración de los metabolitos estables del NO no se ve alterada por las inyecciones de s. salina.

Efecto de la nicotina

La nicotina no modifica la densidad global de células NOS1+ en el NA de los ratones silvestres respecto a la de los animales tratados con s. salina, en ninguno de los dos sexos. Sin embargo, existen divergencias en la respuesta al tratamiento con la droga entre las zonas rostral y caudal, dependiendo del sexo del animal: mientras que en los machos no hay un efecto significativo en ninguna de las dos zonas estudiadas, las hembras muestran un descenso significativo de las neuronas nitrérgicas en el nivel caudal. Por otro lado, tanto en los animales silvestres como en los *KO*, la concentración de los metabolitos del NO no cambia con respecto a los animales inyectados con s. salina ni en los machos ni en las hembras.

Tabla

En la siguiente tabla se resumen los resultados obtenidos del análisis del contenido de las neuronas NOS1+ en el NA de los animales machos (♂) y hembras (♀) silvestres, tanto de la densidad media de todo el NA (total), como de las dos zonas estudiadas en cada una de las situaciones analizadas. Además, se resume el análisis de la concentración de los metabolitos estables del NO (NO_2^- / NO_3^-) tanto en los

ratones silvestres como en los *KO* machos (♂) y hembras (♀). También se muestran las diferencias sexuales en cada genotipo (♂ *vs* ♀), así como las diferencias por genotipo entre los ratones silvestres y *KO*. C: zona caudal. N: *naïves*. Nic: nicotina. R: zona rostral. SS: solución salina. =: no existen diferencias.

Núcleo accumbens

Efecto de la nicotina			Efecto del estrés			Nicotina			Solución salina			Naive				
NO ₂ ⁻ / NO ₃ ⁻	Células NOS1+		NO ₂ ⁻ / NO ₃ ⁻	Células NOS1+		NO ₂ ⁻ / NO ₃ ⁻	Células NOS1+		NO ₂ ⁻ / NO ₃ ⁻	Células NOS1+		NO ₂ ⁻ / NO ₃ ⁻	Células NOS1+			
	Zonas	Total		Zonas	Total		Zonas	Total		Zonas	Total		Zonas	Total	Zonas	Total
SS=Nic	R:SS=Nic C:SS=Nic	SS=Nic	N>SS	R:N=SS C:N=SS	N=SS		=			=			=		♂	♀
SS=Nic	R:SS=Nic C:SS>Nic	SS=Nic	N<SS	R:N=SS C:N=SS	N=SS		=			=			=		♂ vs ♀	♀
							♂=♀			♂<♀			♂>♀		♂ vs ♀	♀
							♂=♀			♂=♀			♂=♀		♂ vs ♀	♀
SS=Nic			N=SS												♂	♀
SS=Nic			N=SS												♂ vs ♀	♀
							♂=♀			♂=♀			♂=♀		♂ vs ♀	♀
															♂	♀
							♂<♂			♂<♂			♂=♂		♂	♀
							♂<♀			♂<♀			♀<♀		♀	♀

2. En el CP:

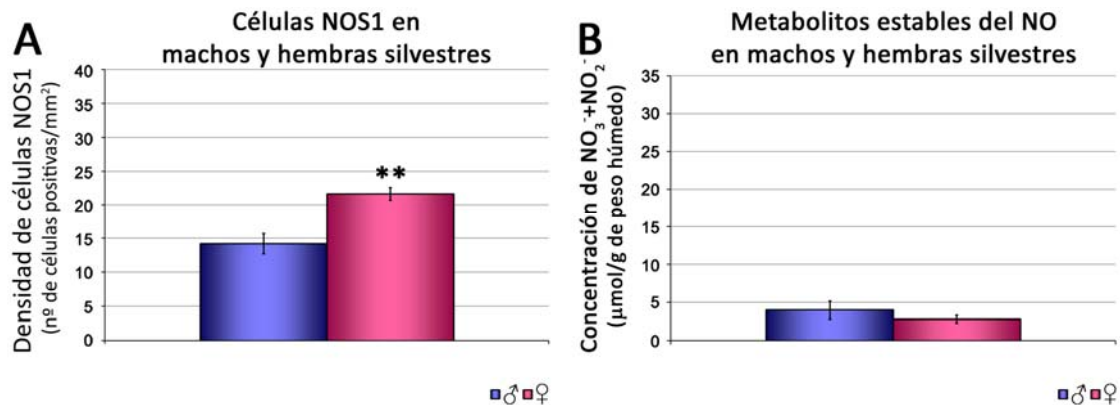
2.1. Animales sin tratamiento

2.1.1. Comparación de la densidad de células NOS1+ y la cantidad de nitratos y nitritos entre los machos y las hembras silvestres

En los animales *naïves*, la cantidad de neuronas que contienen la enzima NOS1 es significativamente menor en los machos que en las hembras (Tabla 25, Fig. 21A). Por el contrario, la liberación de NO en ausencia de tratamiento es similar en los machos y en las hembras silvestres (Tabla 25, Fig. 21B).

Tabla 25. Densidad de células positivas a NOS1 (nº células NOS1+/mm²), y concentración de metabolitos estables del NO (µmol/g de peso húmedo), en el caudado-putamen de los ratones silvestres y la significación estadística de su comparación entre machos y hembras sin tratamiento (*t* de Student y *U* de Mann-Whitney).

	Machos	Hembras	valor <i>p</i>
Densidad de células NOS1+	14,22±1,48	21,69±0,94	0,007 (<i>t</i>)
Concentración NO ₃ ⁻ +NO ₂ ⁻	4,04±1,19	2,81±0,51	0,37 (<i>U</i>)



2.1.2. Cotejo de la densidad de neuronas NOS1+ entre las distintas áreas, en cada uno de los sexos en los animales silvestres

En los animales *naives*, el contraste de las densidades de neuronas NOS1+ no refleja diferencias entre las cinco áreas estudiadas en el CP de los machos silvestres (Tabla 26). Además, tampoco existen diferencias significativas entre las áreas analizadas en las hembras (Tabla 26).

Tabla 26. Densidad de células positivas a NOS1 (nº células NOS1+/mm²), en las zonas rostro-dorsal, rostro-lateral, rostro-medial, caudo-dorsal y caudo-lateral del caudado-putamen de los ratones silvestres *naives* y la significación estadística de la comparación de dichas zonas en cada sexo (ANOVA; Kruskal-Wallis, K-W).

	Rostro-dorsal	Rostro-lateral	Rostro-medial	Caudo-dorsal	Caudo-lateral	valor p
Machos	16,59±3,14	14,22±3,56	13,04±1,19	11,85±1,19	15,41±4,27	0,80 (ANOVA)
Hembras	28,44±1,45	20,44±7,17	24,00±3,67	20,44±2,67	15,11±3,94	0,22 (K-W)

2.1.3. Comparación de la densidad de células positivas a NOS1 en cada una de las áreas de los animales silvestres, entre ambos sexos

El análisis de la cantidad de células que expresan la NOS1 en las cinco áreas estudiadas en el CP de los ratones *naives*, muestra que las hembras tienen una mayor abundancia de dichas células que los machos en las áreas RD, RM y CD (Tabla 27; Fig. 22A,C,D). Sin embargo, esta diferencia no se observa en las áreas RL y CL (Tabla 27; Fig. 22B,E).

Tabla 27. Densidad de células positivas a NOS1 (nº células NOS1+/mm²), en las zonas rostro-dorsal, rostro-lateral, rostro-medial, caudo-dorsal y caudo-lateral del caudado-putamen de los ratones silvestres sin tratamiento y la significación estadística de la comparación de cada una de ellas entre ambos sexos (*t* de Student, *U* de Mann-Whitney).

	Machos	Hembras)	valor p
Rostro-dorsal	16,59±3,14	28,44±1,45	0,013 (<i>t</i>)
Rostro-lateral	14,22±3,56	20,44±7,17	0,52 (<i>t</i>)
Rostro-medial	13,04±1,19	24,00±3,67	0,03 (<i>U</i>)
Caudo-dorsal	11,85±1,19	20,44±2,67	0,046 (<i>U</i>)
Caudo-lateral	15,41±4,27	15,11±3,94	0,96 (<i>t</i>)

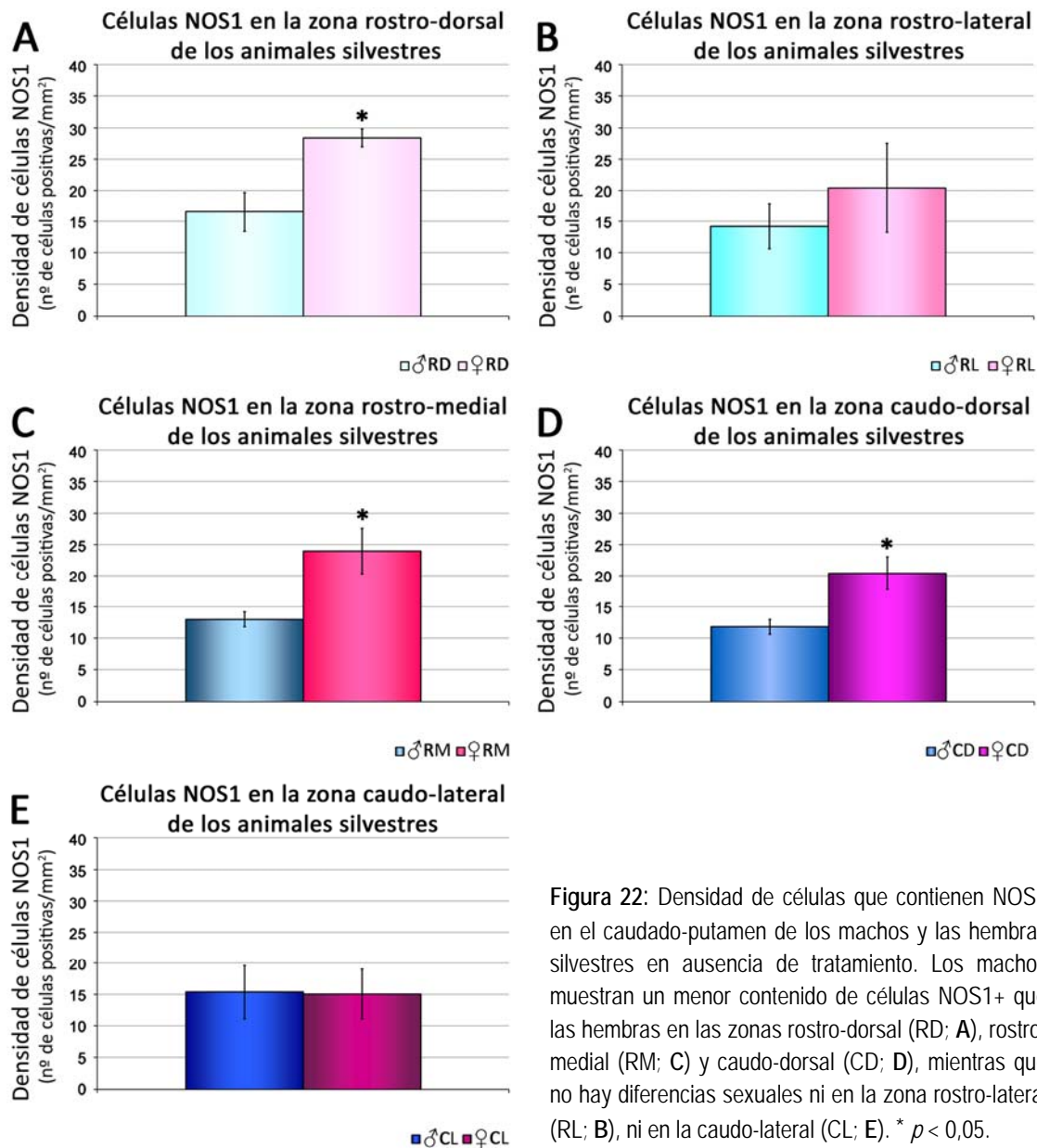


Figura 22: Densidad de células que contienen NOS1 en el caudado-putamen de los machos y las hembras silvestres en ausencia de tratamiento. Los machos muestran un menor contenido de células NOS1+ que las hembras en las zonas rostro-dorsal (RD; A), rostro-medial (RM; C) y caudo-dorsal (CD; D), mientras que no hay diferencias sexuales ni en la zona rostro-lateral (RL; B), ni en la caudo-lateral (CL; E). * $p < 0,05$.

2.1.4. Análisis de la cantidad de nitratos y nitritos entre los animales silvestres y *KO*, en cada uno de los sexos

El estudio de la influencia de la NOS1 en la liberación de NO en los machos, muestra que no hay diferencias significativas entre silvestres y *KO* en ausencia de tratamiento (Tabla 28). Asimismo, tampoco se aprecian divergencias en la cantidad de metabolitos del NO entre las hembras de ambos genotipos (Tabla 28).

Tabla 28. Concentración de metabolitos estables del NO ($\mu\text{mol/g}$ de peso húmedo), en el caudado-putamen de los ratones silvestres y *knock-out* (*KO*) naives y la significación de su comparación estadística en cada uno de los sexos (*t* de Student, *U* de Mann-Whitney).

	Silvestres	KO	valor <i>p</i>
Machos	4,04±1,19	1,95±0,54	0,15 (<i>U</i>)
Hembras	2,81±0,51	1,86±0,48	0,22 (<i>t</i>)

2.1.5. Comparación de la cantidad de nitratos y nitritos entre ambos sexos en los ratones *KO*

El estudio de la producción de NO en los ratones *KO naïves* de ambos sexos, muestra que ésta es similar entre machos y hembras (Tabla 29).

Tabla 29. Concentración de metabolitos estables del NO ($\mu\text{mol/g}$ de peso húmedo), en el caudado-putamen de los ratones *knock-out* en ausencia de tratamiento y la significación estadística de su comparación entre machos y hembras (*t* de Student).

	Machos	Hembras	valor <i>p</i>
Concentración $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$	1,95±0,54	1,89±0,48	0,89

2.2. Animales inyectados con solución salina

2.2.1. Comparación de la densidad de células NOS1+ y la cantidad de nitratos y nitritos, entre los machos y las hembras silvestres

Contrariamente a lo que sucede en los ratones *naïves*, el CP de los animales silvestres tratados con s. salina no muestra diferencias sexuales en la cantidad de células NOS1+ (Tabla 30; Fig. 23A). Sin embargo, sí que existe un dimorfismo sexual en la producción de NO: en los machos, el CP contiene mayor concentración de metabolitos del NO que las hembras (Tabla 30; Fig. 23B).

Tabla 30. Densidad de células positivas a NOS1 (n° células NOS1+/ mm^2), y concentración de metabolitos estables del NO ($\mu\text{mol/g}$ de peso húmedo), en el caudado-putamen de los ratones silvestres y la significación estadística de su comparación entre machos y hembras tratados con solución salina (*t* de Student).

	Machos	Hembras	valor <i>p</i>
Densidad de células NOS1	14,58±0,94	17,78±1,09	0,07
Concentración $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$	6,28±0,98	3,49±0,70	0,03

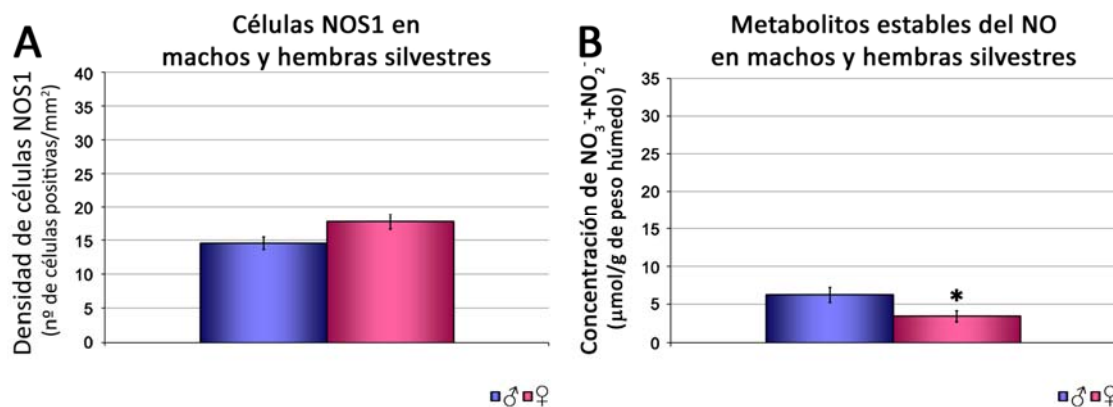


Figura 23: Densidad de células que contienen NOS1 (A) y contenido de los metabolitos estables del NO (B), en el caudado-putamen de los machos y las hembras silvestres tratados con s. salina. No hay diferencias sexuales en el contenido de células NOS1+ (A). Por el contrario, los machos muestran una concentración de NO₃⁻ y NO₂⁻ mayor que las hembras (B). * $p < 0,05$.

2.2.2. Cotejo de la densidad de neuronas NOS1+ entre las distintas áreas, en cada uno de los sexos, en los animales silvestres

Los ratones macho sometidos a las inyecciones con s. salina contienen una densidad de células que expresan NOS1 similar en todas las áreas analizadas (Tabla 31). Asimismo, las hembras sometidas a este tratamiento tampoco tienen diferencias significativas en la cantidad de neuronas NOS1+ entre las distintas áreas estudiadas en el CP (Tabla 31).

Tabla 31. Densidad de células positivas a NOS1 en las zonas rostro-dorsal, rostro-lateral, rostro-medial, caudo-dorsal y caudo-lateral del caudado-putamen de los ratones silvestres inyectados con solución salina y la significación estadística de la comparación de dichas zonas en cada sexo (ANOVA; Kruskal-Wallis, K-W).

	Rostro-dorsal	Rostro-lateral	Rostro-medial	Caudo-dorsal	Caudo-lateral	valor p
Machos	18,67±1,70	17,78±2,90	12,44±4,23	12,44±3,70	11,56±1,70	0,34 (ANOVA)
Hembras	23,70±1,19	10,67±2,05	23,70±3,14	21,33±7,40	9,48±1,19	0,13 (K-W)

2.2.3. Comparación entre ambos sexos de la densidad de células positivas a NOS1 en cada una de las áreas de los animales silvestres

Los animales inyectados con s. salina no muestran diferencias sexuales en el contenido de neuronas NOS1+ en el CP en ninguna de las áreas estudiadas, al contrario de lo que sucedía en los ratones *naïves* (Tabla 32).

Tabla 32. Densidad de células positivas a NOS1 (nº células NOS1+/mm²), en las áreas analizadas del caudado-putamen de los ratones silvestres tratados con solución salina y la significación estadística de la comparación de cada una de ellas entre ambos sexos (*t* de Student).

	Machos	Hembras	valor <i>p</i>
Rostro-dorsal	18,67±1,70	23,70±1,19	0,08
Rostro-lateral	17,78±2,90	10,67±2,05	0,12
Rostro-medial	12,44±4,23	23,70±3,14	0,10
Caudal-dorsal	12,44±3,70	21,33±7,40	0,30
Caudal-lateral	11,56±1,70	9,48±1,19	0,40

2.2.4. Análisis de la cantidad de nitratos y nitritos entre los animales silvestres y *KO*, en cada uno de los sexos

Los ratones inyectados con s. salina muestran una producción de NO diferente dependiendo del genotipo y del sexo: en los machos silvestres ésta es mayor que en los *KO* (Tabla 33; Fig. 24A), mientras que no hay diferencias entre las hembras de ambos genotipos (Tabla 33; Fig. 24B).

Tabla 33. Concentración de metabolitos estables del NO (µmol/g de peso húmedo), en el caudado-putamen de los ratones silvestres y *knock-out* (*KO*) tratados con s. salina y la significación de su comparación estadística en cada uno de los sexos (*t* de Student, *U* de Mann-Whitney).

	Silvestres	<i>KO</i>	valor <i>p</i>
Machos	6,28±0,98	2,02±0,37	0,002 (<i>U</i>)
Hembras	3,49±0,70	2,08±0,55	0,18 (<i>t</i>)

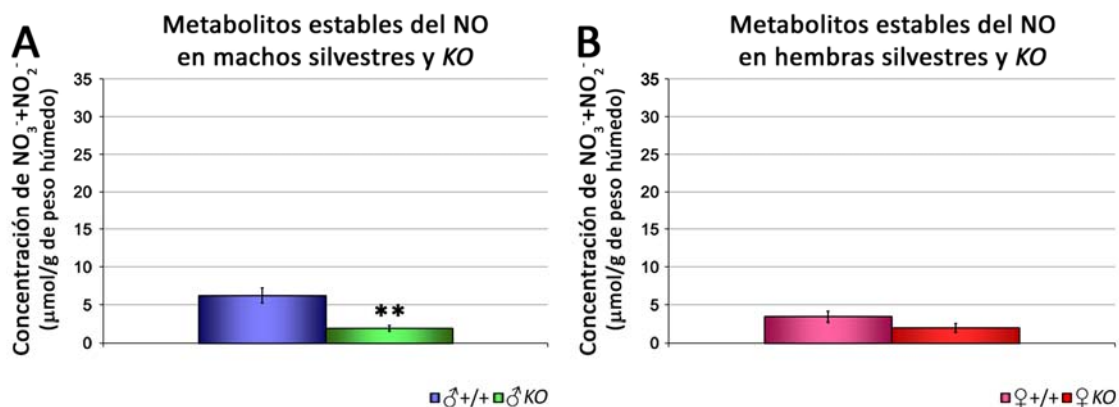


Figura 24: Contenido de metabolitos estables del NO en el caudado-putamen de los ratones silvestres (+/+) y *knock-out* (KO) tratados con solución salina. Los machos silvestres contienen mayor cantidad de NO_3^- y NO_2^- que los KO (A). Sin embargo, las hembras no muestran diferencias en la cantidad de metabolitos estables del NO entre ambos genotipos (B). ** $p < 0,01$.

2.2.5. Comparación de la cantidad de nitratos y nitritos entre ambos sexos, en los ratones KO

El estudio de la producción de NO en los ratones KO de ambos sexos, muestra que ésta es similar entre los machos y las hembras sometidos a las inyecciones de s. salina (Tabla 34).

Tabla 34. Concentración de metabolitos estables del NO ($\mu\text{mol/g}$ de peso húmedo), en el caudado-putamen de los ratones *knock-out* tratados con solución salina y la significación estadística de su comparación entre machos y hembras (*t* de Student).

	Machos	Hembras	valor <i>p</i>
Concentración $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$	$2,02 \pm 0,37$	$2,08 \pm 0,55$	0,93

2.3. Animales inyectados con nicotina

2.3.1. Comparación de la densidad de células NOS1+ y la cantidad de nitratos y nitritos, entre los machos y las hembras silvestres

El estudio del CP de los ratones silvestres tratados con nicotina no revela diferencias sexuales, ni en la densidad de neuronas que expresan la NOS1, ni en la producción de metabolitos del NO en estos animales (Tabla 35).

Tabla 35. Densidad de células positivas a NOS1 (n° células NOS1+/ mm^2), y concentración de metabolitos estables del NO ($\mu\text{mol/g}$ de peso húmedo), en el caudado-putamen de los ratones silvestres y la significación estadística de su comparación entre machos y hembras tratados con nicotina (*t* de Student).

	Machos	Hembras	valor <i>p</i>
Densidad de células NOS1	14,22±0,89	19,91±1,84	0,06
Concentración NO ₃ ⁻ +NO ₂ ⁻	2,91±0,47	1,75±0,38	0,08

2.3.2. Cotejo de la densidad de neuronas NOS1+ entre las distintas áreas, en cada uno de los sexos, en los animales silvestres

En los machos silvestres tratados con la droga hay diferencias significativas en el contenido de células NOS1+: la zona CD posee una menor densidad de éstas que las áreas RD, RL y RM (Tabla 36; Fig. 25A). No hay diferencias en dicha densidad entre el resto de áreas en los machos (Tabla 36; Fig. 25A). En las hembras, no observamos diferencias significativas en el contenido de neuronas que expresan NOS1 entre las áreas analizadas (Tabla 36; Fig. 25B).

Tabla 36. Densidad de células positivas a NOS1 (nº células NOS1+/mm²), en las zonas rostro-dorsal, rostro-lateral, rostro-medial, caudo-dorsal y caudo-lateral del caudado-putamen de los ratones silvestres tratados con nicotina y la significación estadística de la comparación de dichas zonas en cada sexo (ANOVA y test *post hoc* de Tukey). † *p* < 0,05 respecto a la zona caudo-dorsal.

	Rostro-dorsal	Rostro-lateral	Rostro-medial	Caudo-dorsal	Caudo-lateral	valor <i>p</i>
Machos	17,78±2,05 [†]	18,96±1,86 [†]	17,78±2,05 [†]	7,11±3,56	9,48±1,19	0,008
Hembras	25,78±6,22	12,44±3,08	27,56±5,50	14,22±3,84	19,56±4,23	0,14

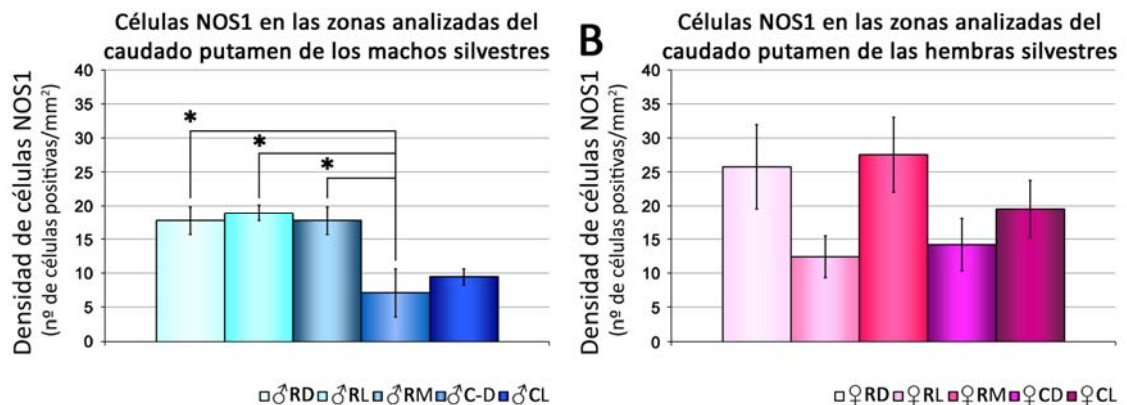


Figura 25: Densidad de células que contienen NOS1 en el caudado-putamen (CP) de los machos (A) y las hembras silvestres (B) tratados con nicotina. En los machos, las zonas rostro-dorsal (RD), rostro-lateral (RL) y rostro-medial (RM) muestran un contenido de células NOS1+ significativamente mayor que la zona caudo-dorsal (CD), mientras que no hay diferencias significativas entre el resto de las áreas del CP analizadas. Por el contrario, las hembras no muestran diferencias entre ninguna de las áreas del CP. * $p < 0,05$.

2.3.3. Comparación entre ambos sexos de la densidad de células positivas a NOS1 en cada una de las áreas de los animales silvestres

Los animales tratados con nicotina no muestran diferencias entre sexos en el contenido de células NOS1+ en ninguna de las zonas del CP analizadas (Tabla 37).

Tabla 37. Densidad de células positivas a NOS1 (nº células NOS1+/mm²), en las áreas rostro-dorsal, rostro-lateral, rostro-medial, caudo-dorsal y caudo-lateral del caudado-putamen de los ratones silvestres tratados con nicotina y la significación estadística de la comparación de cada una de ellas entre ambos sexos (*t* de Student, *U* de Mann-Whitney).

	Machos	Hembras	valor <i>p</i>
Rostro-dorsal	17,78±2,05	25,78±6,22	0,34 (<i>t</i>)
Rostro-lateral	18,96±1,86	12,44±3,08	0,15 (<i>t</i>)
Rostro-medial	17,78±2,05	27,56±5,50	0,21 (<i>t</i>)
Caudo-dorsal	7,11±3,56	14,22±3,84	0,25 (<i>t</i>)
Caudo-lateral	9,48±1,19	19,56±4,23	0,09 (<i>U</i>)

2.3.4. Análisis de la cantidad de nitratos y nitritos entre los animales silvestres y *KO*, en cada uno de los sexos

El estudio de la liberación de NO entre los animales silvestres y *KO*, no refleja diferencias en la concentración de los metabolitos del gas, ni entre los machos ni entre las hembras de ambos genotipos (Tabla 38).

Tabla 38. Concentración de metabolitos estables del NO (µmol/g de peso húmedo), en el caudado-putamen de los ratones silvestres y *knock-out* (*KO*) tratados con nicotina y la significación de su comparación estadística en cada uno de los sexos (*t* de Student).

	Silvestres	KO	valor <i>p</i>
Machos	2,91±0,47	3,06±0,52	0,83
Hembras	1,75±0,38	1,86±0,44	0,85

2.3.5. Comparación de la cantidad de nitratos y nitritos, entre ambos sexos, en los ratones *KO*

El estudio de la producción de NO en los ratones *KO* de ambos sexos, muestra que ésta es similar en los machos y las hembras tratados con la droga (Tabla 39).

Tabla 39. Concentración de metabolitos estables del NO ($\mu\text{mol/g}$ de peso húmedo), en el caudado-putamen de los ratones *knock-out* en ausencia de tratamiento y la significación estadística de su comparación entre machos y hembras (*t* de Student).

	Machos	Hembras	valor <i>p</i>
Concentración $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$	3,06±0,52	1,86±0,44	0,10

2.4. Efecto del estrés

2.4.1. Comparación de la densidad de las neuronas NOS1+ y la cantidad de nitratos y nitritos entre los animales *naïves* y los inyectados con s. salina, en cada uno de los sexos, en los animales silvestres

Los machos no muestran cambios en la densidad de neuronas NOS1+ entre los animales no sometidos a ningún tratamiento y los inyectados con s. salina (Tabla 40; Fig.26A). Por el contrario, en las hembras sí observamos diferencias significativas: la inyección de s. salina provoca un descenso en la densidad de células que contienen NOS1, respecto a sus controles *naïves* (Tabla 40; Fig.26C).

El estudio del efecto del estrés en la liberación de NO en los ratones silvestres demuestra que, ni en los machos ni en las hembras, hay diferencias entre los *naïves* y los tratados con s. salina (Tabla 40; Fig.26B,D).

Tabla 40. Densidad de células positivas a NOS1 (n° células NOS1/ mm^2), y concentración de metabolitos estables del NO ($\mu\text{mol/g}$ de peso húmedo), en el caudado-putamen de los ratones silvestres machos y hembras y la significación estadística de la comparación (*t* de Student) entre los animales sin tratar (*naïves*) y los inyectados con solución salina (s. salina).

	Densidad de células NOS1			Metabolitos estables del NO		
	<i>Naives</i>	S. salina	valor <i>p</i>	<i>Naives</i>	S. salina	valor <i>p</i>
Machos	14,22±1,49	14,58±0,94	0,84	4,04±1,90	6,28±2,91	0,17
Hembras	21,67±0,93	17,78±1,09	0,04	2,81±0,51	3,49±0,70	0,44

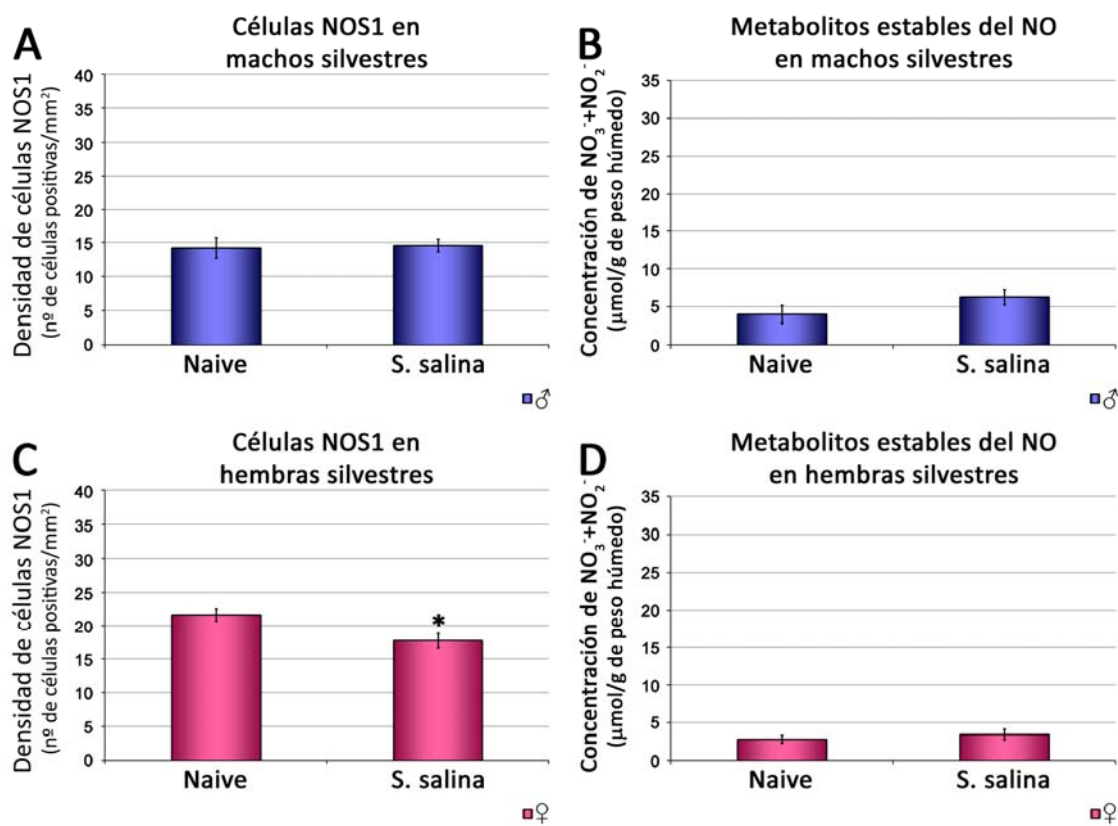


Figura 26: Densidad de células que contienen NOS1 (A y C) y contenido de los metabolitos estables del NO (B y D), en el caudado-putamen de los machos (A y B) y las hembras silvestres (C y D). En los machos no se aprecian diferencias en el contenido de células NOS1+ entre los ratones *naives* y los inyectados con solución salina (s. salina). Sin embargo, en las hembras *naives* hay una mayor densidad de las neuronas positivas para NOS1 que en las tratadas con s. salina. Por el contrario, la cantidad de NO_3^- y NO_2^- no sufre alteraciones en los ratones inyectados con s. salina, con respecto a los *naives*, ni en los machos ni en las hembras. * $p < 0,05$.

2.4.2. Comparación de la densidad de neuronas NOS1+ en cada una de las áreas de los animales silvestres entre los ratones sin tratamiento y los inyectados con s. salina, en cada uno de los sexos

Al realizar el análisis de la influencia del estrés de las inyecciones en la densidad de células NOS1+ en diversas regiones del CP, no se observan modificaciones con respecto a los ratones *naives*. Esto sucede tanto en los machos como en las hembras (Tabla 41).

Tabla 41. Densidad de células positivas a NOS1 (n° células NOS1+/mm²), en las zonas rostro-dorsal, rostro-lateral, rostro-medial, caudo-dorsal y caudo-lateral del caudado-putamen de los ratones silvestres *naives* y los tratados con solución salina (s. salina) y la significación estadística de la comparación entre ambos tratamientos en cada sexo (*t* de Student, *U* de Mann-Whitney).

Rostro-dorsal	<i>Naives</i>	S. salina	valor <i>p</i>
Machos	16,59±3,14	18,67±1,70	0,56 (<i>t</i>)
Hembras	28,44±1,45	23,70±1,19	0,06 (<i>t</i>)
Rostro-lateral	<i>Naives</i>	S. salina	valor <i>p</i>
Machos	14,22±3,56	17,78±2,90	0,75 (<i>t</i>)
Hembras	20,44±7,17	10,67±2,05	0,27 (<i>U</i>)
Rostro-medial	<i>Naives</i>	S. salina	valor <i>p</i>
Machos	13,04±1,19	12,44±4,23	0,91 (<i>U</i>)
Hembras	24,00±3,67	23,70±3,14	0,96 (<i>t</i>)
Caudo-dorsal	<i>Naives</i>	S. salina	valor <i>p</i>
Machos	11,85±1,19	12,44±3,70	0,90 (<i>t</i>)
Hembras	20,44±2,67	21,33±7,40	0,90 (<i>t</i>)
Caudo-lateral	<i>Naives</i>	S. salina	valor <i>p</i>
Machos	15,41±4,27	11,56±1,70	0,39 (<i>t</i>)
Hembras	15,11±3,94	9,48±1,19	0,29 (<i>t</i>)

2.4.3. Comparación de la cantidad de nitratos y nitritos entre los animales *naïves* y los inyectados con s. salina, en cada uno de los sexos, en los animales *KO*

Al analizar la importancia del estrés de las inyecciones en el contenido de metabolitos estables del NO del CP de los ratones *KO*, se observa que la producción de dichos metabolitos no se modifica por las inyecciones de s. salina respecto a los animales *naïves*, ni en los machos ni en las hembras (Tabla 42).

Tabla 42. Concentración de metabolitos estables del NO ($\mu\text{mol/g}$ de peso húmedo), del caudado-putamen de los ratones *knock-out naïves* y los tratados con solución salina (s. salina) y la significación estadística de la comparación entre ambos tratamientos en cada sexo (*t* de Student).

	<i>Naïves</i>	S. salina	valor <i>p</i>
Machos	1,95 \pm 0,54	2,02 \pm 0,37	0,92
Hembras	1,86 \pm 0,48	2,08 \pm 0,55	0,77

2.5. Efecto de la nicotina

2.5.1. Comparación de la densidad de las neuronas NOS1+ y la cantidad de nitratos y nitritos entre los animales inyectados con s. salina y los tratados con nicotina, en cada uno de los sexos, en los animales silvestres

El estudio de la influencia de la nicotina en la densidad de neuronas que expresan NOS1 muestra que la droga no modifica dicha densidad, con respecto a sus controles inyectados con s. salina, ni en los machos ni en las hembras (Tabla 43, Fig. 27A,C). Sin embargo, al analizar la cantidad de metabolitos de NO producidos, se comprueba que los machos inyectados con nicotina producen menos cantidad que los tratados con s. salina (Tabla 43, Fig. 27B). Por el contrario, no hay diferencias entre las hembras sometidas a cada uno de los tratamientos (Tabla 43, Fig. 27D).

Tabla 43. Valores de la densidad de células positivas a NOS1 (n° células NOS1+/ mm^2), y de la concentración de metabolitos estables del NO ($\mu\text{mol/g}$ de peso húmedo), en el caudado-putamen de los ratones silvestres machos y hembras y la significación estadística de su comparación entre los animales inyectados con solución salina (s. salina) y los tratados con nicotina (*t* de Student, *U* de Mann-Whitney).

	Densidad de células NOS1			Metabolitos estables del NO		
	S. salina	Nicotina	valor <i>p</i>	S. salina	Nicotina	valor <i>p</i>
Machos	14,58±0,94	14,22±0,82	0,80 (<i>t</i>)	6,28±0,98	2,91±0,47	0,01 (<i>U</i>)
Hembras	17,78±1,09	19,91±1,84	0,41 (<i>t</i>)	3,49±0,70	1,75±0,38	0,07 (<i>t</i>)

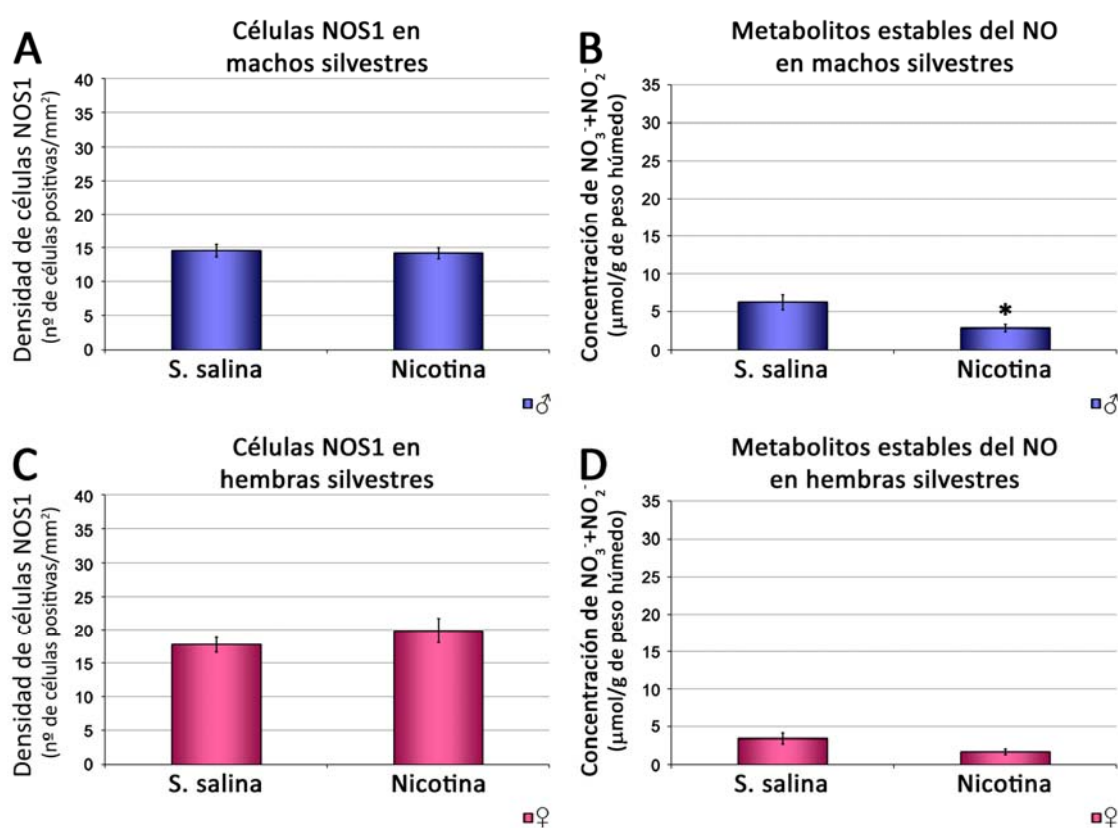


Figura 27: Densidad de células que contienen NOS1 (A y C) y contenido de los metabolitos estables del NO (B y D), en el caudado-putamen de los machos (A y B) y las hembras silvestres (C y D). No hay diferencias en el contenido de células NOS1+ entre los ratones inyectados con solución salina (s. salina) y los tratados con nicotina, en ninguno de los dos sexos. Sin embargo, en los machos tratados con s. salina hay una mayor cantidad de NO₃⁻ y NO₂⁻ que en los inyectados con nicotina. Por el contrario, las hembras no sufren alteraciones en la liberación de NO debidas al tratamiento con la droga. * *p* < 0,05.

2.5.2. Comparación de la densidad de neuronas NOS1+ en cada área estudiada entre los ratones silvestres tratados con s. salina y los inyectados con nicotina, en cada uno de los sexos

El análisis del efecto del tratamiento con la droga sobre la densidad de neuronas NOS1+, no señala diferencias en ninguna de las cinco áreas analizadas entre los animales tratados con nicotina y los inyectados con s. salina, ya sean machos o hembras (Tabla 44).

Tabla 44. Densidad de células positivas a NOS1 (n° células NOS1+/mm²), en las zonas rostro-dorsal, rostro-lateral, rostro-medial, caudo-dorsal y caudo-lateral del caudado-putamen de los ratones silvestres inyectados con solución salina (s. salina) y los tratados con nicotina y la significación estadística de la comparación entre ambos tratamientos en cada sexo (*t* de Student, *U* de Mann-Whitney).

Rostro-dorsal	S. salina	Nicotina	valor <i>p</i>
Machos	18,67±1,70	17,78±2,05	0,56 (<i>t</i>)
Hembras	23,70±1,19	25,78±6,22	0,76 (<i>U</i>)
Rostro-lateral	S. salina	Nicotina	valor <i>p</i>
Machos	17,78±2,90	18,96±1,19	0,47 (<i>t</i>)
Hembras	10,67±2,05	12,44±3,08	0,68 (<i>U</i>)
Rostro-medial	S. salina	Nicotina	valor <i>p</i>
Machos	12,44±4,23	17,78±2,05	0,32(<i>U</i>)
Hembras	23,70±3,14	27,56±5,50	0,61 (<i>t</i>)
Caudo-dorsal	S. salina	Nicotina	valor <i>p</i>
Machos	12,44±3,70	7,11±3,56	0,36 (<i>t</i>)
Hembras	21,33±7,40	14,22±3,84	0,40 (<i>t</i>)
Caudo-lateral	S. salina	Nicotina	valor <i>p</i>
Machos	11,56±1,70	9,48±1,19	0,40 (<i>t</i>)
Hembras	9,48±1,19	19,56±4,23	0,09 (<i>U</i>)

2.5.3. Comparación de la cantidad de nitratos y nitritos entre los animales tratados con s. salina y los inyectados con nicotina, en cada uno de los sexos, en los ratones *KO*

Al contrario de lo que sucede en los machos silvestres, en los ratones macho *KO* no se modifica la cantidad de metabolitos estables del NO por efecto del tratamiento con la droga, respecto a los animales inyectados con s. salina (Tabla 45). Asimismo, en las hembras *KO* tampoco se modifica la liberación de NO por efecto de las inyecciones con nicotina (Tabla 45), al igual que ocurre con las hembras silvestres.

Tabla 45. Concentración de metabolitos estables del NO ($\mu\text{mol/g}$ de peso húmedo), en el caudado-putamen de los ratones *knock-out* tratados con solución salina (s. salina) e inyectados con nicotina y la significación estadística de la comparación entre ambos tratamientos en cada sexo (*t* de Student).

	S. salina	Nicotina	valor <i>p</i>
Machos	2,02±0,37	3,06±0,52	0,12
Hembras	2,08±0,54	1,86±0,44	0,76

Resumen

Animales sin tratamiento

En el CP, la densidad de neuronas que expresan NOS1 en los ratones *naives* silvestres es menor en los machos que en las hembras. Es más, cuando se analizan las áreas del CP elegidas en esta Tesis Doctoral, se comprueba que dichas diferencias se producen en las áreas RD, la RM y la CD, mientras que no existen dimorfismos ni en la zona RL ni en la CL. Sin embargo, ni en los machos ni en las hembras hay diferencias significativas en el contenido de las células NOS1+ entre las cinco áreas estudiadas. Además, no hay diferencias en la producción de $\text{NO}_2^- / \text{NO}_3^-$ entre machos y hembras silvestres. Más aún, la falta de la enzima NOS1 no afecta a la cantidad de metabolitos estables del NO, que se produce en el CP de los ratones *naives KO* respecto a los animales silvestres, en ninguno de los dos sexos. Del mismo modo, la liberación de NO es similar entre los machos y las hembras *KO*.

Animales inyectados con solución salina

Los animales silvestres tratados con s. salina no muestran diferencias sexuales en la densidad de neuronas NOS1+, ni cuando se valora el conjunto del CP ni cuando se analizan las diferentes áreas estudiadas en este Trabajo, al contrario de lo que sucede en los animales *naives*. Además, no hay diferencias en el contenido de las

neuronas que expresan la NOS1 entre las cinco áreas analizadas, ni en los machos ni en las hembras. Por el contrario, mientras que en los ratones silvestres sin tratar el sexo no parece influir la producción de NO, en los inyectados con s. salina sí es determinante: en los machos es mayor que en las hembras. Es más, el estudio del efecto del genotipo en la producción de NO en los ratones demuestra que, mientras que en los machos silvestres ésta es mayor que en los *KO*, en las hembras no hay diferencias entre ambos genotipos. Además, en los animales *KO* no existen diferencias sexuales en la concentración de los metabolitos del NO, al contrario que en los ratones silvestres sometidos a este tratamiento.

Animales inyectados con nicotina

Los animales silvestres tratados con la droga no tienen diferencias sexuales significativas en la densidad de las neuronas NOS1+, ni analizando el CP total ni estudiando las diferentes áreas de CP por separado. Además, en las hembras no se observan diferencias en la distribución de dichas neuronas entre las distintas áreas del CP analizadas. Sin embargo, en los machos silvestres tratados con la nicotina sí se producen cambios: en la zona CD hay una menor densidad de las células que contienen NOS1 que en las áreas RD, RL y RM. Por el contrario, no hay diferencias sexuales significativas en la producción de los metabolitos del NO en estos animales silvestres. Es más, esta producción es similar entre los ratones silvestres y los *KO* que carecen de la enzima NOS1, tanto en los machos como en las hembras. Además, tampoco hay diferencias sexuales en la concentración de los metabolitos estables del NO en el CP de los ratones *KO*.

Efecto del estrés

El estrés de las inyecciones con s. salina no produce un cambio en la densidad de neuronas NOS1+ respecto a los ratones *naïves* en los machos silvestres, ni en el conjunto del CP ni cuando se analizan las diferentes áreas por separado. Por el contrario, el estrés de las inyecciones disminuye dicha densidad en las hembras de manera global, pero no específicamente en un área concreta del CP. Sin embargo, ni los machos ni las hembras silvestres muestran una alteración significativa en la concentración de los metabolitos estables del NO. Igualmente, en los ratones *KO* tampoco se observan alteraciones en la liberación de NO entre los animales tratados con s. salina y los *naïves*, en ninguno de los dos sexos.

Efecto de la nicotina

En los ratones silvestres, no se observan cambios significativos en la densidad de neuronas NOS1+ debidos a la influencia de la droga, ni en el conjunto del CP ni en ninguna de las áreas estudiadas en esta estructura encefálica, ya sean machos o hembras. Es más, en éstas tampoco hay una alteración de la cantidad de metabolitos estables del NO entre las inyectadas con s. salina y las tratadas con la nico-

tina. Por el contrario, en los machos la liberación de NO disminuye por efecto de la droga. Sin embargo, ni en los machos ni en las hembras *KO* se observan cambios en dicha liberación como consecuencia del tratamiento con la nicotina.

Tabla

En la siguiente tabla se resumen los resultados obtenidos del análisis del contenido de las neuronas NOS1+ en el CP de los animales machos (♂) y hembras (♀) silvestres, tanto de la densidad media de todo el CP (total), como de las cinco zonas estudiadas en cada una de las situaciones analizadas. También se esquematiza el análisis de la concentración de los metabolitos estables del NO ($\text{NO}_2^- / \text{NO}_3^-$) tanto en los ratones silvestres como en los *KO* machos (♂) y hembras (♀). Además, se muestran las diferencias sexuales en cada genotipo (♂ *vs* ♀), así como las diferencias por genotipo entre los ratones silvestres y *KO*. CD: zona caudo-dorsal. N: *naives*. Nic: nicotina. RD: zona rostro-dorsal. RL: zona rostro-lateral. RM: zona rostro-medial. SS: solución salina. =: no existen diferencias.

Caudado-Putamen

Efecto de la nicotina			Efecto del estrés			Nicotina			Solución salina			Naive				
NO ₂ ⁻ / NO ₃ ⁻	Células NOS1+		NO ₂ ⁻ / NO ₃ ⁻	Células NOS1+		NO ₂ ⁻ / NO ₃ ⁻	Células NOS1+		NO ₂ ⁻ / NO ₃ ⁻	Células NOS1+		NO ₂ ⁻ / NO ₃ ⁻	Células NOS1+			
	Zonas	Total		Zonas	Total		Zonas	Total		Zonas	Total		Zonas	Total	Zonas	Total
SS>Nic	SS=Nic	SS=Nic	N=SS	N=SS	N=SS		RD>CD RI>CD RM>CD			=			=		♂	♀
SS=Nic	SS=Nic	SS=Nic	N=SS	N=SS	N>SS		=			=			=		♂ vs ♀	♀
						♂=♀	♂=♀	♂=♀	♂>♀	♂=♀	♂=♀	♂=♀	RD: ♂<♀ RM: ♂<♀ CD: ♂<♀	♂<♀		
SS=Nic			N=SS												♂	♀
SS=Nic			N=SS												♂ vs ♀	♀
						♂=♀										
						♂=♀									♂	♀
						♂=♀									♂ vs Knock-out	♀

Discusión

En este apartado discutiremos los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral. Para ello, comenzaremos por el estudio de la inmunolocalización de las isoformas inducible y endotelial de la NOS en el ES. Seguidamente, analizaremos la densidad de las células que contienen NOS1 y la producción de NO en el ES en ausencia de tratamiento. Por último, examinaremos las consecuencias del estrés y del tratamiento con nicotina en el ES, tanto en los ratones silvestres como en los *KO* y en ambos sexos.

Localización de la NOS2 en el estriado de los ratones silvestres y knock-out para la NOS1

En nuestro Trabajo no hemos observado células inmunopositivas para la NOS2 ni en los ratones silvestres ni en los *KO* en ninguna de las situaciones estudiadas. Sin embargo, sí encontramos dichas células en las secciones empleadas como control positivo.

En la rata se ha demostrado que, en condiciones normales, ni el ARNm de la NOS2 ni su proteína se localizan en el ES de los animales adultos (López-Figueroa *et al.*, 1998b; La Porta y Comolli, 1999; Del Moral *et al.*, 2004). Sin embargo, en los ratones sí se ha detectado su expresión mediante la técnica de *western blot*, tanto en los ratones silvestres como en los *KO* que carecen de la NOS1 (Martínez-Lazcano *et al.*, 2007). Además, se ha demostrado que la NOS2 se expresa en los mismos niveles y tiene la misma actividad tanto en los animales silvestres como en los *KO* (Martínez-Lazcano *et al.*, 2007).

En el encéfalo, la expresión de NOS2 se puede inducir fundamentalmente en los astrocitos y la microglía y, de manera mucho menos frecuente, en neuronas. Este cambio en la expresión de la NOS2 se produce como consecuencia de la actuación de agentes inflamatorios o de diversas patologías, como la esclerosis lateral amiotrófica o la enfermedad de Alzheimer (para una revisión, ver Heneka y Feinstein, 2001). La expresión de esta isoforma de la NOS también se puede inducir mediante lesiones o traumas encefálicos (Heneka y Feinstein, 2001), como en el caso del control positivo de la inmunohistoquímica para la NOS2 que hemos empleado.

La mayoría de los estudios sobre la influencia del estrés y de las hormonas sexuales en la expresión de NOS2 en el sistema nervioso de animales silvestres han sido realizados en cultivos de neuronas, astrocitos y microglía activados por lipopolisacárido (LPS). En estos estudios se ha demostrado que la expresión de NOS2 es inhibida por noradrenalina (Feinstein *et al.*, 1993; Madrigal *et al.*, 2006), así como por las hormonas sexuales femeninas estríol, β -estradiol y progesterona (Drew y Chavis, 2000). Asimismo, en estudios *in vivo* se ha observado que un pre-tratamiento con nicotina disminuye la producción de NOS2 después de un daño en la médula espinal (Lee *et al.*, 2009).

No podemos descartar que la carencia de marcaje positivo contra la NOS2 en los animales estudiados podría deberse a que la expresión de dicha proteína no es lo suficientemente elevada como para que pueda visualizarse con el protocolo seguido para su inmunolocalización.

Localización de la NOS3 en el estriado de los ratones silvestres y knock-out para la NOS1

El análisis inmunohistoquímico de las células positivas a NOS3 muestra que esta enzima se localiza en los vasos sanguíneos, pero no en células neurales ni del NA ni del CP. Esta localización es la misma tanto en los ratones silvestres como en los KO en todos los grupos de animales analizados en este Trabajo.

Los estudios de la expresión encefálica de la NOS3 en animales silvestres muestran que esta enzima se localiza esencialmente en los vasos sanguíneos, tanto en el encéfalo en desarrollo como en el de los adultos (Seidel *et al.*, 1997; Töpel *et al.*, 1998; Blackshaw *et al.*, 2003; Kaur *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2007), lo que coincide con los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral. Por el contrario, su expresión en neuronas y astrocitos es muy discutida (Dinerman *et al.*, 1994; Doyle y Slater, 1997; Seidel *et al.*, 1997; Töpel *et al.*, 1998; Blackshaw *et al.*, 2003; Kaur *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2007). Aunque algunos investigadores han visualizado la NOS3 en neuronas hipocámpales humanas y de rata en condiciones basales (Dinerman *et al.*, 1994; Doyle y Slater, 1997), otros estudios no muestran una expresión neuronal de la NOS3 en condiciones normales, sino sólo como consecuencia de daños en el sistema nervioso (Seidel *et al.*, 1997; Töpel *et al.*, 1998; Leker *et al.*, 2001; Blackshaw *et al.*, 2003; Kaur *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2007). Por otro lado, la localización de la NOS3 en los astrocitos también es controvertida, debido probablemente a la diferente metodología empleada para su visualización (Seidel *et al.*, 1997; Töpel *et al.*, 1998; Blackshaw *et al.*, 2003; Kaur *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2007).

La influencia del estrés en la expresión de la NOS3 se ha evaluado principalmente mediante la administración de hormonas glucocorticoides. Los estudios demuestran que estas hormonas disminuyen la cantidad de NO en el suero sanguíneo y la expresión de la NOS3 tanto en células endoteliales como en órganos como el corazón, el riñón y el hígado (Wallerath *et al.*, 2004). Además, López-Figueroa y cols. (1998b) han observado que no hay expresión de la NOS3 en las neuronas hipocámpales de la rata, ni en condiciones normales ni después del tratamiento de animales adrenalectomizados con glucocorticoides. Asimismo, se ha comprobado que los tratamientos con extractos de tabaco o con nicotina disminuyen tanto la cantidad de NOS3 como su actividad en las células endoteliales (Su *et al.*, 1998; Mayhan y Sharpe, 1999; Gerzanich *et al.*, 2001). Sin embargo, no se han documentado datos sobre su influencia en la expresión de esta isoforma de la NOS en las neuronas.

El análisis de la influencia del 17β -estradiol sobre la NOS3 ha demostrado que esta hormona incrementa la actividad y la expresión de la NOS3 en las células endoteliales, pero no se ha evidenciado que provoque una expresión neuronal de la misma (Marsden *et al.*, 1993; Chen *et al.*, 1999; Dimmeler *et al.*, 1999; Wu, 2002; Duckles y Krause, 2007; Uji *et al.*, 2007).

En el ratón *KO* para la NOS1, los estudios sobre la NOS3 en el encéfalo se basan fundamentalmente en el análisis de la expresión y actividad de la enzima. Dichas investigaciones muestran que la NOS3 se expresa sólo en las células endoteliales de los vasos sanguíneos, al igual que en los animales silvestres (Blackshaw *et al.*, 2003). Además, no hay cambios en la cantidad del ARNm ni de la proteína NOS3 con respecto a los animales silvestres (Blackshaw *et al.*, 2003; Martínez-Lazcano *et al.*, 2007). Es más, se ha comprobado que estos ratones *KO* tienen un flujo sanguíneo cerebral similar al de los silvestres (Atochin *et al.*, 2003). Estos datos indican que no hay alteraciones aparentes ni en la localización ni en la función de la NOS3 como consecuencia de la falta de la NOS1 en condiciones normales. Todo ello está de acuerdo con los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral para la expresión de la NOS3 en los vasos sanguíneos tanto en los animales silvestres como en los *KO*.

Localización de la NOS1 en el estriado de los ratones silvestres y knock-out para la NOS1

El análisis de la expresión de NOS1 en el ES de los animales silvestres, muestra que ésta se localiza en células de fenotipo neuronal, como se había descrito previamente (Kawaguchi, 1993; Kawaguchi *et al.*, 1995). Por el contrario, no se observa inmunomarcaje para la NOS1 en el ES de animales *KO*.

Diversos estudios muestran que la variante de la NOS1 que se expresa de forma predominante en el ES de los animales silvestres es la NOS1 α (Putzke *et al.*, 2000; Blackshaw *et al.*, 2003; Langnaese *et al.*, 2007). Además, la expresión de NOS1 β es muy escasa e indetectable mediante técnicas inmunohistoquímicas, y la de NOS1 γ es prácticamente inexistente (Putzke *et al.*, 2000; Blackshaw *et al.*, 2003; Langnaese *et al.*, 2007). Por su parte, los ratones *KO* no muestran expresión de la isoforma NOS1 α , y la de NOS1 γ está en los mismos niveles que en el ratón silvestre. Por el contrario, la isoforma NOS1 β aumenta ligeramente su expresión, siendo detectables inmunohistoquímicamente somas celulares, débilmente marcados y en muy bajo número (Putzke *et al.*, 2000; Blackshaw *et al.*, 2003; Langnaese *et al.*, 2007). Por lo tanto, a pesar de que el anticuerpo policlonal empleado detectaría todas las variantes de la NOS1, la ausencia de inmunomarcaje para dicha enzima en los ratones *KO* probablemente se deba a que la expresión de NOS1 β es tan baja que no es posible su visualización con la técnica empleada. Tampoco se puede descartar que se deba al método de fijación empleado, puesto que Langnaese y cols. (2007) compro-

baron que la detección de la NOS1 β varía dependiendo de la fijación y postfijación empleadas. Es más, dichos investigadores lograban una mejor visualización de los escasos somas positivos para la NOS1 β , mediante una perfusión con paraformaldehído al 4 % y una postfijación de 20 h, mientras que en este trabajo de Tesis Doctoral hemos empleado un tiempo de postfijación de 2 h. Por lo tanto, dado que la expresión de NOS2 también es muy baja en el ES de estos animales, aunque exista una pequeña liberación de NO a partir de la NOS1 β y la NOS2, la mayor parte de la producción de dicho neurotransmisor en los animales *KO* se debe a la NOS3.

Cuantificación de las neuronas NOS1 y producción de óxido nítrico en el estriado de los ratones naïves

El NA y el CP no son núcleos homogéneos ni en su función ni en sus conexiones (para una revisión, ver Haber *et al.*, 2000; Papa *et al.*, 2002; Voorn *et al.*, 2004; Yin y Knowlton, 2004; Wickens *et al.*, 2007; Yin *et al.*, 2009; ver Introducción); por esa razón, en este Trabajo se han escogido distintas zonas de estudio en ambos núcleos. De esta forma fue posible realizar un análisis más exhaustivo de la localización de las células nitrérgicas en las distintas situaciones seleccionadas. Sin embargo, en la valoración bioquímica de la producción de NO se emplearon los núcleos enteros: el pequeño tamaño de las zonas escogidas para el estudio inmunohistoquímico no permite una valoración correcta de los metabolitos del NO.

Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral muestran que, en ausencia de tratamiento, en el NA de los animales silvestres de ambos sexos, tanto la densidad de neuronas NOS1+ como su distribución rostro-caudal son similares. Ello no obstante, la producción de NO sí muestra diferencias sexuales, siendo mayor en los machos que en las hembras. Esta variación en la liberación de NO está influenciada por la presencia de la NOS1, puesto que entre los *KO* no apreciamos dimorfismo sexual.

Al contrario de lo que sucede en el NA, en ausencia de tratamiento el CP de los ratones silvestres sí muestra un dimorfismo sexual en la densidad de neuronas NOS1+, siendo mayor en las hembras que en los machos. Además, dicha diferencia se localiza de manera específica en las zonas RD, RM y CD. Sin embargo, la cantidad de los metabolitos del NO es similar en machos y hembras silvestres, al igual que en los *KO*.

El análisis de los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral muestra que, en los ratones silvestres *naïves*, el NA y el CP no son estructuras homogéneas ni en cuanto a las neuronas que contienen la NOS1 ni en la producción de NO. Es más, nosotros observamos modificaciones en el sistema nitrérgico de ambos núcleos dependiendo del sexo del animal. Ello concuerda con las teorías más actuales que consideran que, a pesar de que son dos núcleos homogéneos histológicamente, no lo

son en cuanto a su fisiología (Haber *et al.*, 2000; Papa *et al.*, 2002; Voorn *et al.*, 2004; Yin y Knowlton, 2004; Wickens *et al.*, 2007; Yin *et al.*, 2009, ver Introducción). Como hemos mencionado previamente en la Introducción, en la última década se ha propuesto que el ES estaría organizado funcionalmente en distintas zonas desde la región dorso-lateral a la ventro-medial, teniendo además una variación rostro-caudal (Haber *et al.*, 2000; Papa *et al.*, 2002; Voorn *et al.*, 2004; Wickens *et al.*, 2007; Yin *et al.*, 2009). Concretamente, en el CP diversos estudios han mostrado que la zona lateral sería un área sensomotora relacionada con la formación de hábitos, que correspondería al núcleo putamen en primates (Wickens *et al.*, 2007). Por el contrario, a las zonas dorsal y medial, equivalentes al núcleo caudado en primates, se les considera áreas asociativas, implicadas en el aprendizaje y en la expresión de las acciones dirigidas hacia una recompensa (Wickens *et al.*, 2007). Es más, el área más caudal de dichas zonas dorsal y medial estaría implicada en la integración de la información espacial del ambiente para poder alcanzar el objetivo deseado (Yin y Knowlton, 2004; Wickens *et al.*, 2007). Es precisamente en estas dos zonas del CP, la dorsal y la medial, donde se localizan las diferencias en el contenido de neuronas NOS1+ entre machos y hembras observadas en este Trabajo y que discutiremos en el siguiente apartado.

Diferencias sexuales en el sistema nitrérgico de los ratones silvestres

En el NA de los ratones *naives* silvestres no hay diferencias sexuales en el contenido de las neuronas NOS1+; sin embargo, las hembras liberan menos NO que los machos. Además, este dimorfismo sexual en cuanto al NO es dependiente de la presencia de la NOS1, puesto que en los *KO* no se observa. Por el contrario, en el CP de los ratones sin tratamiento la densidad de las células NOS1+ es mayor en las hembras que en los machos, de manera específica en las zonas RD, RM y CD, aunque no hay diferencias sexuales en la producción de NO. Dado que en los animales *KO* tampoco hay diferencias sexuales en la liberación de este neurotransmisor en el CP, es posible que no sea la NOS1 sino la NOS3 la principal enzima productora de NO en este centro encefálico.

Durante décadas se ha considerado que las únicas diferencias en el encéfalo entre machos y hembras se producían en el hipotálamo, la región que regula la producción de las hormonas relacionadas con los comportamientos reproductivos en los mamíferos (Gillies y McArthur, 2010). Por otra parte, las primeras diferencias sexuales comprobadas en procesos de aprendizaje y cognición fueron atribuidas a factores ambientales y socioculturales (Carey, 1958). Sin embargo, en los últimos años se han demostrado numerosas diferencias entre sexos en el encéfalo tanto a nivel estructural como celular y molecular, que pueden ser explicadas como verdaderos dimorfismos (para una revisión, ver Gillies y McArthur, 2010). Tanto en los humanos como en otros animales, se han descrito diferencias sexuales en zonas relacionadas con la cognición, la memoria y las emociones, así como en los sistemas sensomotores y de recompensa (Becker, 1999; Cahill, 2006; Gillies y McArthur, 2010).

Aunque algunos dimorfismos sexuales pueden desembocar en diferencias en funciones cerebrales específicas, como aquellas reguladas por el hipotálamo, estudios recientes apoyan la idea de que otras diferencias entre sexos serían resultado de un mecanismo para preservar comportamientos y funciones encefálicas básicas, mediante la compensación fisiológica de las diferencias sexuales primarias (De Vries, 2004; Cahill, 2006). Esto es debido a que, en ambos sexos, el encéfalo trata de alcanzar una función óptima en dichas funciones básicas, pero debe hacerlo en ambientes hormonales y genéticos muy diferentes, que son necesarios para asegurar la procreación y la supervivencia de la especie (Gillies y McArthur, 2010). Por lo tanto, los dimorfismos sexuales en funciones no reproductivas permitirían alcanzar los mismos objetivos, pero por mecanismos diferentes, en machos y hembras (De Vries y Boyle, 1998).

En el encéfalo se han descrito dimorfismos sexuales en gran cantidad de sistemas de neurotransmisores, como el serotoninérgico, el GABAérgico, el colinérgico, el opioide, el vasopresinérgico, el dopaminérgico y el nitrérgico (Madeira y Lieberman, 1995; Taskiran *et al.*, 1997; Craft, 2003; Cahill, 2006). De hecho, se ha comprobado que el sexo influye en el sistema nitrérgico modificando la expresión de la NOS1 y/o la producción de NO, de manera dependiente de la región encefálica y de la especie estudiada (Taskiran *et al.*, 1997; Scordalakes *et al.*, 2002). Por ejemplo, se ha observado que, en condiciones normales, las ratas macho producen más cantidad de NO que las hembras en el córtex y en el hipocampo (Taskiran *et al.*, 1997). Además, en las ratas macho castradas, se produce un aumento de las células NOS1+ en el hipotálamo pero no en el área preóptica, que es revertido cuando se trata a los animales con testosterona (Singh *et al.*, 2000). Por el contrario, el estradiol incrementa la actividad de la NOS en el área preóptica en el conejillo de indias (Warembourg *et al.*, 1999), así como el ARNm de la NOS1 en la subdivisión ventrolateral del núcleo ventromedial del hipotálamo en ratas hembra (Ceccatelli *et al.*, 1996). Es más, en cultivos de neuronas del área preóptica de la rata, se ha comprobado que los estrógenos estimulan la producción del NO promoviendo cambios en las interacciones proteína-proteína entre el NMDAR, la proteína PSD-95 y la NOS1 (d'Anglemont de Tassigny *et al.*, 2009). Así los estrógenos facilitarían la unión de dicho complejo proteico, permitiendo el acoplamiento entre la señal glutamatérgica y la producción de NO (d'Anglemont de Tassigny *et al.*, 2009).

Por otra parte, además del dimorfismo en el sistema nitrérgico, se sabe que en el ES la inervación dopaminérgica desde el ATV y la sustancia negra es sexualmente dimórfica (para una revisión ver, Becker, 2009). También, se ha comprobado que, en las hembras, el CP tienen una cantidad de transportadores de DA mayor que los machos (Rivest *et al.*, 1995). Además, en la rata se ha observado que tanto en el CP como en el NA hay más de receptores de DA tipo D₁/D₅ en los machos que en las hembras (Becker, 2009). Por el contrario, los datos sobre el contenido de los receptores D₂ en el ES son más controvertidos y no hay una uniformidad de criterios en cuanto a si existen diferencias sexuales en este tipo de receptores (Becker, 2009).

En el ES, la liberación de DA basal es mayor en los machos que en las hembras, pero en general los machos responden menos a ciertos estímulos, como a tratamientos con drogas, que las hembras (Becker, 2009). Así, se ha sugerido que aunque la liberación tónica de DA en el ES es mayor en los machos, esta señal crónica

dopaminérgica elevada produce una disminución de la actividad de dicha zona encefálica a través de una retroalimentación negativa, mediante un descenso de la actividad de las MSN (Becker, 2009). Por lo tanto, cuando se estimula la liberación de DA, su incremento es proporcionalmente menor en los machos que en las hembras y, en consecuencia, su respuesta comportamental a tratamientos con drogas también es proporcionalmente menor (Becker, 2009). Se ha sugerido que estas diferencias entre machos y hembras en el sistema dopaminérgico pueden deberse a un control de los autorreceptores de DA diferente en cada sexo, pero el mecanismo exacto de dichas divergencias no se conoce con seguridad (Becker, 2009). Como hemos mencionado en la Introducción, en el ES los sistemas dopaminérgico y nitrérgico están muy relacionados. Así, la DA puede alterar la producción de NO, lo que modificaría la actividad de las MSN (Hoque *et al.*, 2010).

Los datos obtenidos en esta Tesis Doctoral muestran que hay más células NOS1+ en el **CP** de las hembras que en el de los machos y, concretamente, en las zonas asociativas del **CP** relacionadas con el aprendizaje y la recompensa. Este mayor contenido de neuronas que pueden producir NO en respuesta a un incremento en la liberación de DA puede ser un factor que compense las diferencias entre sexos en el sistema dopaminérgico; es decir, aunque la liberación de DA sea menor en las hembras, ante un estímulo determinado este neurotransmisor puede dar lugar a una mayor producción de NO en éstas que en los machos en dichas zonas del **CP**. Por lo tanto, la actuación del NO sobre las MSN y, por consiguiente una respuesta comportamental, sería mayor en las hembras que en los machos.

Al contrario que la densidad de neuronas NOS1+, no hay dimorfismo sexual en producción de NO en el **CP**. Como hemos mencionado previamente, una posible explicación es que dado que en el **CP** de los animales *KO* tampoco existen diferencias sexuales en los metabolitos del NO, la producción de NO en este núcleo podría deberse fundamentalmente a la acción de la NOS3. Por último, tampoco es descartable el que sí exista un dimorfismo sexual en la producción de NO en determinadas regiones del **CP**, pero que al ser un núcleo tan grande, las diferencias en el contenido de los metabolitos del NO entre las diferentes zonas se diluyan en el conjunto.

En el **NA**, por el contrario, no hemos apreciado diferencias sexuales en la cantidad de neuronas que contienen NOS1, pero es claro que las hembras producen una cantidad significativamente menor de NO que los machos. Puesto que en los animales *KO* no se observan diferencias en la producción de NO, el dimorfismo sexual en los animales silvestres debe achacarse a la acción de la NOS1. Dado que el **CP** y el **NA** no tienen las mismas conexiones, ni el sistema dopaminérgico es homogéneo en ambos núcleos (ver la sección “Organización morfo-funcional del estriado”), la diferencia en el sistema nitrérgico entre ellos puede ser un reflejo de dichas divergencias. El hecho de que las hembras contengan menos metabolitos del NO que los machos puede ser debido a que en éstos la principal enzima productora de NO sea la NOS3, puesto que no hay diferencias en dicha producción con los machos que carecen de la NOS1. Sin embargo, en las hembras silvestres, la producción

de los metabolitos del NO se debe fundamentalmente a la NOS1, puesto las hembras silvestres liberan menos NO que las *KO*.

Producción del NO en el estriado de los ratones *knock-out* para la NOS1

En el NA de los ratones *naives* no hay diferencias en la producción de NO entre los machos silvestres y los *KO*. Sin embargo, las hembras silvestres contienen menos metabolitos del NO que las *KO*. En el CP, por el contrario, no hay diferencias en la liberación de NO ni entre los machos de ambos genotipos ni entre las hembras silvestres y *KO*.

Como se ha mencionado previamente, los ratones *KO* carecen de la isoforma NOS1 α , mientras que la isoforma NOS1 β aumenta ligeramente su expresión (Putzke *et al.*, 2000; Blackshaw *et al.*, 2003; Langnaese *et al.*, 2007), aunque en nuestro estudio no hemos podido detectarla. Por lo tanto no podemos descartar que, en los ratones *KO*, una pequeña parte de la producción de NO en las zonas analizadas podría deberse a la acción de esta isoforma NOS1 β .

Los ratones *knock-out* para la NOS1 no muestran anomalías evidentes en la estructura cerebral (Huang *et al.*, 1993). Además, tampoco muestran alteraciones en la plasticidad sináptica en zonas como el hipocampo o el cerebelo (O'Dell *et al.*, 1994; Linden *et al.*, 1995). También se ha comprobado que estos ratones *KO* no tienen alteraciones en los sistemas noradrenérgico, dopaminérgico, glutamatérgico o GABAérgico (Kano *et al.*, 1998; Chiavegatto *et al.*, 2001). Sin embargo, sí tienen el sistema serotoninérgico modificado, especialmente en las zonas encefálicas que regulan las emociones (Chiavegatto *et al.*, 2001).

Cuando se analiza el tejido nervioso de estos animales no se observan cambios ni en el contenido ni en la distribución de la NOS3, con respecto a los animales silvestres (Blackshaw *et al.*, 2003; Martínez-Lazcano *et al.*, 2007). No obstante, se ha postulado que en los animales *KO* podrían existir mecanismos compensatorios por parte de la NOS3 para paliar la carencia de producción de NO debida a la NOS1 (Son *et al.*, 1996). Esto se ha demostrado en experimentos donde se valoraba la LTP en el hipocampo (Son *et al.*, 1996). En dichos análisis, los animales *knock-out* para la NOS1 o para la NOS3 mostraban una LTP normal, mientras que los dobles *knock-out* para ambas isoformas de la NOS, tenían una LTP alterada (Son *et al.*, 1996). Por lo tanto, la ausencia de diferencias que detectamos en la liberación de NO en el CP entre los ratones *KO* y los silvestres podría deberse a un incremento en la actividad de la NOS3 debido a esta función compensatoria, para tratar de suplir la falta de NO producido por la NOS1 (Son *et al.*, 1996, Huang, 1999). Tampoco puede descartarse que la fuente principal de producción de los nitritos y nitratos en el CP en los animales silvestres *naives* sea debida a la NOS3.

En el NA de los machos silvestres podría ocurrir algo similar a lo que sucede en el CP. Sin embargo, en las hembras *KO* sí que se produce un incremento exacerbado de la producción de NO respecto a las silvestres, llegando a alcanzar los mismos niveles que los machos. Por lo tanto, en el NA, la producción de NO está regulada por la presencia de la NOS1 y por el sexo del animal.

Efecto de las inyecciones con solución salina en la localización de la NOS1 y en la producción de NO en el estriado del ratón

En los animales silvestres el estrés de las inyecciones con s. salina no altera ni la densidad ni la distribución de las neuronas que expresan NOS1 en el NA. Por el contrario, la producción de NO en el NA de los animales silvestres disminuye en los machos y aumenta en las hembras.

El CP de los machos silvestres no muestra cambios en la densidad de las neuronas que contienen NOS1 en respuesta al estrés de las inyecciones con s. salina. Por el contrario, en las hembras silvestres sí se produce una disminución de dicha densidad. Sin embargo, no hay cambios significativos en la cantidad de metabolitos del NO entre los ratones *naïves* y los inyectados con s. salina en ninguno de los dos sexos. No obstante, dicho tratamiento altera de manera sutil la producción de NO en los machos silvestres, aumentándola ligeramente respecto a los controles *naïves*. Así, aunque el incremento en la liberación de NO no es significativo entre estos dos grupos experimentales, sí es lo suficiente elevado como para ser diferente entre los machos y las hembras silvestres. Además, también es superior a la de los *KO* inyectados con s. salina.

En los ratones *KO*, no se producen alteraciones debidas al estrés por las inyecciones de s. salina en la cantidad de metabolitos del NO en ninguna de las dos zonas del ES estudiadas con respecto a los controles *KO naïves*. Igualmente, tampoco hay diferencias sexuales en la liberación de NO en los ratones inyectados con s. salina. Estos datos indican que tanto las alteraciones en la liberación de NO en respuesta al estrés, observadas en los animales silvestres, como las diferencias sexuales en dichos animales, se deben a la presencia de la enzima NOS1.

Como se ha mencionado en la Introducción, el CRF y los glucocorticoides son dos de las sustancias liberadas por el eje hipotalámico-hipofisario-adrenal con gran influencia en la actividad de distintos centros encefálicos implicados en la adicción (Wanat *et al.*, 2008; Sinha, 2008; Corominas *et al.*, 2010). De hecho, se han localizado receptores de CRF y de glucocorticoides en diversas áreas del sistema límbico, como la corteza prefrontal, el NA, el CP y el ATV entre otras (Ahima y Harlan 1990; Van Pett *et al.*, 2000; Sauvage y Steckler, 2001; Ungless *et al.*, 2003). De este modo, los cambios que se producen en el sistema nitrérgico del CP y del NA como

consecuencia del estrés de las inyecciones con s. salina pueden ser resultado de la acción directa de CRF y/o de los glucocorticoides en ambos centros encefálicos.

En diversos estudios también se ha comprobado que tanto los tratamientos agudos con CRF como con glucocorticoides potencian la liberación de Glu en el ATV, lo que produce un aumento en la actividad de las neuronas del ATV (Overton *et al.*, 1996; Ungless *et al.*, 2003). Este aumento en su actividad modifica la liberación de DA en las zonas a las que proyecta pero no de una manera homogénea, alterando así su funcionamiento de manera específica en cada una de ellas (Wanat *et al.*, 2008; Corominas *et al.*, 2010). Así, se ha comprobado que, en las ratas macho, la exposición aguda a un estímulo estresante o un aumento de glucocorticoides aumentan la liberación de DA en el NA y en la corteza prefrontal, mientras que apenas tiene efectos en el CP (para una revisión, ver Finlay y Zigmond, 1997; Sinha, 2008). Sin embargo, los resultados de tratamientos a más largo plazo muestran una inhibición de la síntesis y el recambio de DA en el NA pero no en la corteza prefrontal (Pacak *et al.*, 2002; Sinha, 2008). Estos datos indican que el estrés afecta a la liberación de dopamina de forma diferente en las distintas dianas del ATV, lo que explicaría las diferencias en los cambios del sistema nitrérgico en el NA y el CP ante un estrés prolongado que observamos en nuestros experimentos. De hecho, previamente nuestro grupo ha comprobado que, en la rata, el estrés debido a un tratamiento durante 14 días con inyecciones de s. salina altera la expresión de la NOS1 y la cantidad de NO liberado, de distinta forma dependiendo de la zona encefálica estudiada y del sexo del animal (Weruaga *et al.*, 2002). Es más, este tratamiento modifica la producción de NO de forma significativa en la corteza prefrontal de las hembras, pero sin alterar la densidad de neuronas que lo producen (Weruaga *et al.*, 2002). Sin embargo, en el CP no se observan cambios en la liberación de NO pero sí disminuyen las células NOS1+ en las hembras de forma exclusiva (Weruaga *et al.*, 2002); lo que concuerda con los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral.

Al contrario de lo que ocurre con el CP y la corteza prefrontal, en el NA de la rata no se observan alteraciones ni en la liberación de NO ni en la cantidad de neuronas que lo producen (Weruaga *et al.*, 2002). De hecho, ésta es la primera vez que se describen alteraciones debidas al estrés en el sistema nitrérgico en el NA. Como se ha mencionado previamente, aunque en la rata se diferencien claramente tanto el núcleo como la cubierta, no ocurre lo mismo en todas las estirpes de ratón, como en la empleada en este estudio (Hof *et al.*, 2000). Por lo tanto, si existen diferencias en la organización de este núcleo entre distintas estirpes de una misma especie, es más probable aún que las haya entre dos especies diferentes y, como consecuencia, su respuesta ante diferentes estímulos puede variar entre ellas (ver más adelante).

Los ratones sometidos al tratamiento con s. salina también muestran diferencias en la respuesta del sistema nitrérgico al estrés entre ambos sexos. Así, en el NA

aumenta la liberación de NO en las hembras y disminuye en los machos. Por otra parte, en el CP de las hembras se produce una disminución de la densidad de neuronas NOS1+ hasta igualar a la densidad en los machos. Sin embargo, en los machos aumenta la producción de NO respecto a las hembras. Estas diferencias sexuales en la respuesta del sistema nitrérgico al estrés podrían estar reflejando la influencia del sexo no sólo en el sistema dopaminérgico, como comentamos en el apartado anterior, sino también en el eje hipotalámico-hipofisario-adrenal. La influencia de las hormonas sexuales sobre este eje en los roedores está ampliamente estudiada, aunque los mecanismos por los que se produce no son muy conocidos (Rivier, 1999; Miller *et al.*, 2004). Los datos obtenidos analizando el efecto de diferentes tipos de estrés en la rata, indican que la actividad de este eje es diferente en cada sexo, pero hay pocas evidencias consistentes del papel de las hormonas sexuales sobre él (Rivier, 1999). Esto puede deberse a las diferencias en la elaboración de los distintos experimentos, las distintas zonas encefálicas analizadas, y especies o estirpes animales empleadas (Rivier, 1999).

Por lo tanto, además de la acción de las hormonas sexuales sobre el sistema nitrérgico en distintas zonas encefálicas (ver sección anterior, Taskiran *et al.*, 1997; Scordalakes *et al.*, 2002), el balance entre dichas hormonas y los glucocorticoides podría estar afectando a la expresión y/o a la actividad de la NOS1 en distinta forma en cada uno de los núcleos estudiados. Esta influencia podría ser directa en el NA y el CP o mediante la distinta modulación de los centros que conectan con estas zonas encefálicas, puesto que no sólo el eje hipotalámico-hipofisario-adrenal contiene receptores de CRF y de glucocorticoides, sino que éstos también están presentes en diversas núcleos de la “vía del placer” (Ahima y Harlan 1990; Van Pett *et al.*, 2000; Sauvage y Steckler, 2001; Ungless *et al.*, 2003).

Efecto de las inyecciones con nicotina en la localización de la NOS1 y en la producción de NO en el estriado del ratón

El tratamiento con nicotina no modifica de forma significativa la densidad de neuronas NOS1+ en el NA de los ratones macho silvestres. Por el contrario, en las hembras silvestres se produce un pequeño descenso en dicha densidad en la zona caudal respecto a la misma zona de las hembras inyectadas con s. salina. Ello no obstante, no apreciamos diferencias significativas en la liberación de NO entre los animales sometidos a las inyecciones con s. salina o con la droga, ya sean machos o hembras. El tratamiento con nicotina “elimina” las diferencias sexuales en la cantidad de los metabolitos del NO que se observan en los ratones inyectados con s. salina.

En el CP de los animales silvestres, la densidad de células que contienen la NOS1 no cambia en los animales tratados con nicotina respecto a sus controles inyectados con s. salina, ni en los machos ni en las hembras. Por otra parte, los anima-

les silvestres tratados con nicotina muestran un descenso en la liberación de NO en esta zona encefálica, con respecto a los que sólo recibieron inyecciones con s. salina. Si bien dicha disminución no llega a ser significativa en las hembras ($p= 0,07$), sí lo es en los machos. Además, de la misma forma que en el caso del NA, las inyecciones con nicotina eliminan las diferencias sexuales observadas en los animales que fueron tratados sólo con s. salina.

En los ratones *KO* no hay cambios en la liberación de NO debidos al tratamiento con nicotina respecto a los controles *KO* inyectados con s. salina, ni en el NA ni en el CP; ni hay diferencias sexuales. Es más, en el NA de los ratones tratados con nicotina, la producción de NO es menor en los machos silvestres que en los *KO*, al igual que ocurría entre los machos inyectados con s. salina de ambos genotipos. Por el contrario, en el CP, el tratamiento con nicotina elimina las diferencias en la liberación de NO entre los machos silvestres y *KO*, que se producían debido al estrés de las inyecciones con s. salina. Estos resultados sugieren que, en los animales silvestres, los cambios en la cantidad de metabolitos estables del NO en respuesta a las inyecciones de nicotina podrían deberse a la actividad de la enzima NOS1.

Como se ha mencionado previamente, tanto la DA como el Glu y el NO son necesarios para inducir la sensibilización a la nicotina. Es más, en el ES estos tres neurotransmisores varían en el mismo sentido, es decir que cuando un animal está sensibilizado a la nicotina, una nueva dosis de la misma provoca un aumento transitorio de DA y Glu. A su vez el Glu provoca la liberación de NO, elevando la concentración extracelular de DA y Glu. La mayoría de estos estudios en los que se comprueba dicho incremento en los neurotransmisores se realizan en un periodo tiempo corto después de suministrar la última dosis de la droga (para una revisión ver Balfour, 2004; Ulusu *et al.*, 2005; Jain *et al.*, 2008a; Mao y MacGehee, 2010). Sin embargo, en estudios de sensibilización a nicotina en el mono *Macaca mulatta*, se ha comprobado que, después de un régimen de una dosis diaria de nicotina durante 9 días, una noche de abstinencia previa a una nueva dosis de nicotina induce una liberación de DA en el ES menor que en los monos control inyectados con s. salina (Domino y Tsukada, 2009; Domino *et al.*, 2009). Ya que la la variación de la DA y del NO se produce en el mismo sentido, esta disminución de la DA en el mono concuerda con la menor de la liberación de NO en el CP que se advierte tras un día de abstinencia a la droga en los ratones silvestres empleados en el presente estudio.

Contrariamente a lo que sucede en el NA, no observamos cambios en la cantidad de nitritos y nitratos debidos al tratamiento con nicotina. Ello no obstante, en la zona más caudal del NA, correspondiente al territorio del “núcleo”, se puede comprobar que hay una disminución de las células positivas a la NOS1, especialmente significativa en las hembras. Esto puede deberse a que, dado que el análisis del contenido de los metabolitos estables del NO se ha empleado todo el NA, se

podrían estar enmascarando alteraciones en la liberación del NO en dicha región en concreto.

Al igual que lo observado en este Trabajo, un estudio realizado en la rata muestra que un tratamiento de inyecciones diarias de nicotina no induce variaciones en la densidad de células que contienen la NOS1 cuando se valoran en la totalidad del NA o del CP (Weruaga *et al.*, 2002). Sin embargo, y a diferencia de lo observado en nuestro trabajo de Tesis Doctoral, ese régimen de inyecciones produce un aumento de la producción de NO en ambos núcleos encefálicos (Pögün *et al.*, 2000; Weruaga *et al.*, 2002). La diferencia en la producción de NO puede deberse tanto a la metodología empleada, como a la utilización de distintas especies de experimentación. De hecho, numerosos estudios muestran diferencias en los resultados obtenidos tras un régimen de administración de nicotina, que pueden achacarse a diversos factores, como la dosis de la droga, la ruta de administración de la nicotina, el tiempo de tratamiento, la metodología empleada, el sexo y/o la edad de los animales, la especie e incluso la estirpe de los animales utilizados (Balfour, 2004; Marttila *et al.*, 2006; Matta *et al.*, 2007; Jain *et al.*, 2008a). Es más, las enzimas responsables de la metabolización de la nicotina en las distintas especies son diferentes, aunque pertenecen todas a la familia de las citocromo P450 (CYP; para una revisión ver Matta *et al.*, 2007). En los ratones, la CYP2A5, es homóloga a la de humanos, la CYP2A6. Sin embargo, en la rata, la CYP2A6 es inactiva y el metabolismo de la nicotina se realiza a través de la CYP1B1/2 (Hammond *et al.*, 1991; Nakayama *et al.*, 1993). Estas enzimas que metabolizan la nicotina no sólo difieren en la velocidad de la degradación de la droga sino que los productos principales de dicha metabolización son diferentes (Matta *et al.*, 2007). Resumiendo, algunas especies animales como los monos, el perro, el conejo y el ratón metabolizan la nicotina de forma similar a los humanos (Matta *et al.*, 2007). Por el contrario en otras especies como la cobaya y la rata la degradación es diferente (Matta *et al.*, 2007). Así, aunque los tratamientos con la droga sean similares entre dos especies tan próximas como la rata y el ratón, e incluso entre distintas estirpes de una misma especie, y los mecanismos básicos de actuación de la nicotina sean similares, determinados cambios encefálicos inducidos por la droga pueden variar. Ello podría deberse al distinto metabolismo de la nicotina, así como a las diferencias innatas entre los diferentes animales y a variaciones en los efectos encefálicos producidos por la droga (Marttila *et al.*, 2006; Matta *et al.*, 2007).

Efecto del sexo en la sensibilización a nicotina

Los efectos de la nicotina, además de variar entre diferentes especies o estirpes, también pueden diferir entre sexos (Pögün *et al.*, 2000; Weruaga *et al.*, 2002; Andreasen y Redrobe, 2009; Torres *et al.*, 2009). Así, en este Trabajo de Tesis Doctoral hemos comprobado que la nicotina afecta al sistema nitrérgico de manera diferente dependiendo del sexo y de la zona encefálica analizada. Este efecto sexualmente dimórfico de la nicotina se ha observado previamente en estudios de sensibiliza-

ción con nicotina en la rata (Pögün *et al.*, 2000; Weruaga *et al.*, 2002). Asimismo, en diversos estudios en roedores se ha comprobado que la nicotina tiene diferentes efectos comportamentales dependiendo del sexo del animal. Entre estos comportamientos se incluyen la ingesta de comida y la actividad física (Bowen *et al.*, 1986); la anti-nocicepción inducida por la droga (Craft y Milholland, 1998; Damaj, 2001); y la actividad locomotora entre otros (Kanyt *et al.*, 1999). Es más, en la rata, se ha comprobado que las hembras adquieren antes el comportamiento de auto-administrarse la nicotina por vía intravenosa a dosis bajas de la droga que los machos (Donny *et al.*, 2000). Además, esto se produce independientemente de la fase del ciclo ovárico de las hembras, lo que sugiere que los efectos de recompensa de la nicotina no se ven influenciados por las fluctuaciones hormonales durante el ciclo estral (Donny *et al.*, 2000). Asimismo, se ha comprobado que las hembras son menos sensibles a los efectos aversivos de la nicotina y más susceptibles a los de recompensa que los machos, lo que favorecería su adicción a la droga (Torres *et al.*, 2009). Se ha sugerido que las hormonas sexuales femeninas podrían modular la activación de los nAChR $\alpha_4\beta_2$ (Damaj, 2001). Sin embargo, los mecanismos que subyacen a las diferencias sexuales tras una exposición prolongada a nicotina, tanto en el comportamiento como en el sistema nitrérgico del ratón, no se conocen con exactitud (Weruaga *et al.*, 2002). En consecuencia, son necesarios nuevos estudios, tanto fisiológicos como farmacológicos, que permitan dilucidar más concretamente el papel de las hormonas sexuales en los cambios inducidos por la nicotina.

Conclusiones

De acuerdo con los objetivos planteados en este Trabajo de Tesis Doctoral y como consecuencia de los resultados obtenidos, hemos llegado a las siguientes conclusiones:

- I. En el núcleo accumbens y en el caudado-putamen de los ratones silvestres, la NOS1 se expresa únicamente en neuronas. La NOS1 no se detecta por métodos inmunohistoquímicos en el estriado de los ratones *knock-out*. La NOS2 no se visualiza en ningún tipo celular, ni en los ratones silvestres ni en los *knock-out* para la NOS1. La NOS3 se expresa exclusivamente en los vasos sanguíneos en los ratones de ambos genotipos. No hay modificaciones de la inmunolocalización de estas isoformas de la NOS en ninguna de las condiciones estudiadas.
- II. En el núcleo accumbens la producción de NO está influenciada por el sexo del animal y por la presencia de la NOS1, siendo ésta especialmente importante en las hembras.
- III. En el caudado-putamen, al contrario que en el núcleo accumbens, el sexo del animal y la presencia de la NOS1 no parecen ser tan determinantes para la liberación de NO, o bien la actividad de dicha enzima se ve compensada por la actividad de la NOS3.
- IV. El estrés de las inyecciones con solución salina provoca un cambio de la producción de NO en el núcleo accumbens, de manera dependiente del sexo del animal y de la enzima NOS1, sin que cambie la densidad de las neuronas que la expresan.
- V. En el caudado-putamen, el estrés de las inyecciones modifica el sistema nitrérgico de manera diferente dependiendo del sexo: en las hembras altera la cantidad de neuronas que contienen la NOS1 sin modificar la producción de NO; mientras que en los machos sucede lo contrario. Más aún, en los machos estresados por el tratamiento, la variación en la liberación de NO depende de la presencia de la NOS1, mientras que en las hembras no.
- VI. En el núcleo accumbens, la sensibilización con nicotina provoca un cambio en la distribución de las neuronas productoras de NO, así como en la actividad de la NOS1, de manera dependiente del sexo del animal.
- VII. En el caudado-putamen de los ratones silvestres, la sensibilización con nicotina afecta a la producción de NO especialmente en los machos, y con dependencia de la presencia de la NOS1.

Como **conclusión final** podemos afirmar que, en el modelo de ratón estudiado, el sistema nitrérgico está regulado de manera diferente en el núcleo accumbens y en caudado-putamen. Esta regulación es muy compleja y está influenciada de distinta forma tanto por el sexo del animal, como por los mecanismos de estrés.

Además, la sensibilización a la nicotina induce cambios en ambos núcleos estudiados, reflejando modificaciones en los sistemas de neurotransmisores implicados en la adicción a la droga en dichas zonas. Por lo tanto, la prevención de alteraciones en el sistema nitrérgico puede ser el fundamento una terapia efectiva tanto para evitar el hábito tabáquico como para una deshabituación a la droga más eficiente.

Bibliografía

- Ahima RS y Harlan RE (1990). Charting of type II glucocorticoid receptor-like immunoreactivity in the rat central nervous system. *Neuroscience* 39:579-604.
- Albin RL, Young AB y Penney JB (1995). The functional anatomy of disorders of the basal ganglia. *Trends Neurosci* 18:63-64.
- Alderton WK, Cooper CE y Knowles RG (2001). Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 357:593-615.
- Alexander GE, DeLong MR y Strick PL (1986). Parallel organization of functionally segregated circuits linking basal ganglia and cortex. *Annu Rev Neurosci* 9:357-381.
- Aliev G, Palacios HH, Lipsitt AE, Fischbach K, Lamb BT, Obrenovich ME, Morales L, Gasimov E y Bragin V (2009). Nitric Oxide as an Initiator of Brain Lesions During the Development of Alzheimer Disease. *Neurotox Res*.
- Ando A, Yang A, Mori K, Yamada H, Yamada E, Takahashi K, Saikia J, Kim M, Melia M, Fishman M, Huang P y Campochiaro PA (2002). Nitric oxide is proangiogenic in the retina and choroid. *J Cell Physiol* 191:116-124.
- Andreasen JT y Redrobe JP (2009). Antidepressant-like effects of nicotine and mecamylamine in the mouse forced swim and tail suspension tests: role of strain, test and sex. *Behav Pharmacol* 20:286-295.
- Aoki C y Pickel VM (1988). Neuropeptide Y-containing neurons in the rat striatum: ultrastructure and cellular relations with tyrosine hydroxylase-containing terminals and with astrocytes. *Brain Res* 459:205-225.
- Aoshiba K, Nagai A, Yasui S y Konno K (1996). Nicotine prolongs neutrophil survival by suppressing apoptosis. *J Lab Clin Med* 127:186-194.
- Arbonés ML, Ribera J, Agulló L, Baltrons MA, Casanovas A, Riveros-Moreno V y García A (1996). Characteristics of nitric oxide synthase type I of rat cerebellar astrocytes. *Glia* 18:224-232.
- Ariano MA (1983). Distribution of components of the guanosine 3',5'-phosphate system in rat caudate-putamen. *Neuroscience* 10:707-723.
- Assreuy J, Cunha FQ, Liew FY y Moncada S (1993). Feedback inhibition of nitric oxide synthase activity by nitric oxide. *Br J Pharmacol* 108:833-837.
- Atochin DN, Demchenko IT, Astern J, Boso AE, Piantadosi CA y Huang PL (2003). Contributions of endothelial and neuronal nitric oxide synthases to cerebrovascular responses to hyperoxia. *J Cereb Blood Flow Metab* 23:1219-1226.
- Azad SC, Marsicano G, Eberlein I, Putzke J, Zieglgänsberger W, Spanagel R y Lutz B (2001). Differential role of the nitric oxide pathway on Δ^9 -THC-induced central nervous system effects in the mouse. *Eur J Neurosci* 13:561-568.
- Balfour DJ (2004). The neurobiology of tobacco dependence: a preclinical perspective on the role of the dopamine projections to the nucleus accumbens [corrected]. *Nicotine Tob Res* 6:899-912.
- Bamford NS, Zhang H, Schmitz Y, Wu NP, Cepeda C, Levine MS, Schmauss C, Zakharenko SS, Zablow L y Sulzer D (2004). Heterosynaptic dopamine neurotransmission selects sets of corticostriatal terminals. *Neuron* 42:653-663.
- Bayer SA (1990). Neurogenetic patterns in the medial limbic cortex of the rat related to anatomical connections with the thalamus and striatum. *Exp Neurol* 107:132-142.

- Becker JB (1999). Gender differences in dopaminergic function in striatum and nucleus accumbens. *Pharmacol Biochem Behav* 64:803-812.
- Becker JB (2009). Sexual differentiation of motivation: a novel mechanism? *Horm Behav* 55:646-654.
- Beckman JS y Koppenol WH (1996). Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol* 271:C1424-C1437.
- Bennett BD y Bolam JP (1993). Two populations of calbindin D28k-immunoreactive neurones in the striatum of the rat. *Brain Res* 610:305-310.
- Bennett BD y Bolam JP (1994). Synaptic input and output of parvalbumin-immunoreactive neurons in the neostriatum of the rat. *Neuroscience* 62:707-719.
- Benowitz NL (1988). Nicotine and smokeless tobacco. *CA Cancer J Clin* 38:244-247.
- Berke JD y Hyman SE (2000). Addiction, dopamine, and the molecular mechanisms of memory. *Neuron* 25:515-532.
- Blackshaw S, Eliasson MJ, Sawa A, Watkins CC, Krug D, Gupta A, Arai T, Ferrante RJ y Snyder SH (2003). Species, strain and developmental variations in hippocampal neuronal and endothelial nitric oxide synthase clarify discrepancies in nitric oxide-dependent synaptic plasticity. *Neuroscience* 119:979-990.
- Bo L, Dawson TM, Wesselingh S, Mork S, Choi S, Kong PA, Hanley D y Trapp BD (1994). Induction of nitric oxide synthase in demyelinating regions of multiple sclerosis brains. *Ann Neurol* 36:778-786.
- Bolaños JP, Almeida A, Stewart V, Peuchen S, Land JM, Clark JB y Heales SJ (1997). Nitric oxide-mediated mitochondrial damage in the brain: mechanisms and implications for neurodegenerative diseases. *J Neurochem* 68:2227-2240.
- Bories PN y Bories C (1995). Nitrate determination in biological fluids by an enzymatic one-step assay with nitrate reductase. *Clin Chem* 41:904-907.
- Bouyer JJ, Park DH, Joh TH y Pickel VM (1984). Chemical and structural analysis of the relation between cortical inputs and tyrosine hydroxylase-containing terminals in rat neostriatum. *Brain Res* 302:267-275.
- Bowen DJ, Eury SE y Grünberg NE (1986). Nicotine's effects on female rats' body weight: caloric intake and physical activity. *Pharmacol Biochem Behav* 25:1131-1136.
- Bredt DS, Hwang PM, Glatt CE, Lowenstein C, Reed RR y Snyder SH (1991). Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature* 351:714-718.
- Bredt DS y Snyder SH (1994). Transient nitric oxide synthase neurons in embryonic cerebral cortical plate, sensory ganglia, and olfactory epithelium. *Neuron* 13:301-313.
- Bruckdorfer R (2005). The basics about nitric oxide. *Mol Aspects Med* 26:3-31.
- Buchholzer ML y Klein J (2002). NMDA-induced acetylcholine release in mouse striatum: role of NO synthase isoforms. *J Neurochem* 82:1558-1560.
- Burette A, Zabel U, Weinberg RJ, Schmidt HH y Valtschanoff JG (2002). Synaptic localization of nitric oxide synthase and soluble guanylyl cyclase in the hippocampus. *J Neurosci* 22:8961-8970.

Burke RE y Karanas AL (1990). Demonstration of a medial to lateral gradient in the density of cholinergic neuropil in the rat striatum. *Neurosci Lett* 108:58-64.

Cahill L (2006). Why sex matters for neuroscience. *Nat Rev Neurosci* 7:477-484.

Calabresi P, De Murtas M y Bernardi G (1997). The neostriatum beyond the motor function: experimental and clinical evidence. *Neuroscience* 78:39-60.

Calabresi P, Gubellini P, Centonze D, Sancesario G, Morello M, Giorgi M, Pisani A y Bernardi G (1999). A critical role of the nitric oxide/cGMP pathway in corticostriatal long-term depression. *J Neurosci* 19:2489-2499.

Calabresi P, Centonze D, Gubellini P, Marfia GA, Pisani A, Sancesario G y Bernardi G (2000). Synaptic transmission in the striatum: from plasticity to neurodegeneration. *Prog Neurobiol* 61:231-265.

Calabresi P, Picconi B, Tozzi A y Di Filippo M (2007). Dopamine-mediated regulation of corticostriatal synaptic plasticity. *Trends Neurosci* 30:211-219.

Calapai G, Squadrito F, Altavilla D, Zingarelli B, Campo GM, Cilia M y Caputi AP (1992). Evidence that nitric oxide modulates drinking behaviour. *Neuropharmacology* 31:761-764.

Canales JJ (2005). Stimulant-induced adaptations in neostriatal matrix and striosome systems: transitioning from instrumental responding to habitual behavior in drug addiction. *Neurobiol Learn Mem* 83:93-103.

Carey GL (1958). Sex differences in problem-solving performance as a function of attitude differences. *J Abnorm Psychol* 56:256-260.

Carlezon WA Jr. y Nestler EJ (2002). Elevated levels of GluR1 in the midbrain: a trigger for sensitization to drugs of abuse? *Trends Neurosci* 25:610-615.

Cárdenas A, Moro MA, Hurtado O, Leza JC y Lizasoain I (2005). Dual role of nitric oxide in adult neurogenesis. *Brain Res Brain Res Rev* 50:1-6.

Ceccatelli S, Grandison L, Scott RE, Pfaff DW y Kow LM (1996). Estradiol regulation of nitric oxide synthase mRNAs in rat hypothalamus. *Neuroendocrinology* 64:357-363.

Centonze D, Grande C, Saulle E, Martin AB, Gubellini P, Pavon N, Pisani A, Bernardi G, Moratalla R y Calabresi P (2003a). Distinct roles of D₁ and D₅ dopamine receptors in motor activity and striatal synaptic plasticity. *J Neurosci* 23:8506-8512.

Centonze D, Gubellini P, Pisani A, Bernardi G y Calabresi P (2003b). Dopamine, acetylcholine and nitric oxide systems interact to induce corticostriatal synaptic plasticity. *Rev Neurosci* 14:207-216.

Cepeda C y Levine MS (1998). Dopamine and N-methyl-D-aspartate receptor interactions in the neostriatum. *Dev Neurosci* 20:1-18.

Cepeda C y Levine MS (2006). Where do you think you are going? The NMDA-D1 receptor trap. *Sci STKE* 2006:e20.

Cha CI, Sohn SG, Chung YH, Shin C y Baik SH (2000). Region-specific changes of NOS-IR cells in the basal ganglia of the aged rat. *Brain Res* 854:239-244.

Champtiaux N, Gotti C, Cordero-Erausquin M, David DJ, Przybylski C, Lena C, Clementi F, Moretti M, Rossi FM, Le Novere N, McIntosh JM, Gardier AM y Changeux JP (2003).

- Subunit composition of functional nicotinic receptors in dopaminergic neurons investigated with knock-out mice. *J Neurosci* 23:7820-7829.
- Chang HT y Kita H (1992). Interneurons in the rat striatum: relationships between parvalbumin neurons and cholinergic neurons. *Brain Res* 574:307-311.
- Changeux JP, Devillers-Thierry A y Chemouilli P (1984). Acetylcholine receptor: an allosteric protein. *Science* 225:1335-1345.
- Chen Z, Yuhanna IS, Galcheva-Gargova Z, Karas RH, Mendelsohn ME y Shaul PW (1999). Estrogen receptor α mediates the nongenomic activation of endothelial nitric oxide synthase by estrogen. *J Clin Invest* 103:401-406.
- Chergui K, Charlety PJ, Akaoka H, Saunier CF, Brunet JL, Buda M, Svensson TH y Chouvet G (1993). Tonic activation of NMDA receptors causes spontaneous burst discharge of rat midbrain dopamine neurons *in vivo*. *Eur J Neurosci* 5:137-144.
- Chiavegatto S, Dawson VL, Mamounas LA, Koliatsos VE, Dawson TM y Nelson RJ (2001). Brain serotonin dysfunction accounts for aggression in male mice lacking neuronal nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:1277-1281.
- Cho HJ, Xie QW, Calaycay J, Mumford RA, Swiderek KM, Lee TD y Nathan C (1992). Calmodulin is a subunit of nitric oxide synthase from macrophages. *J Exp Med* 176:599-604.
- Christopherson KS, Hillier BJ, Lim WA y Brecht DS (1999). PSD-95 assembles a ternary complex with the *N*-methyl-D-aspartic acid receptor and a bivalent neuronal NO synthase PDZ domain. *J Biol Chem* 274:27467-27473.
- Corominas M, Roncero C y Casas M (2010). Corticotropin releasing factor and neuroplasticity in cocaine addiction. *Life Sci* 86:1-9.
- Couppis MH, Kennedy CH y Stanwood GD (2008). Differences in aggressive behavior and in the mesocorticolimbic DA system between A/J and BALB/cJ mice. *Synapse* 62:715-724.
- Cowan RL, Wilson CJ, Emson PC y Heizmann CW (1990). Parvalbumin-containing GABAergic interneurons in the rat neostriatum. *J Comp Neurol* 302:197-205.
- Craft RM y Milholland RB (1998). Sex differences in cocaine- and nicotine-induced antinociception in the rat. *Brain Res* 809:137-140.
- Craft RM (2003). Sex differences in opioid analgesia: "from mouse to man". *Clin J Pain* 19:175-186.
- Crespi F y Rossetti ZL (2004). Pulse of nitric oxide release in response to activation of *N*-methyl-D-aspartate receptors in the rat striatum: rapid desensitization, inhibition by receptor antagonists, and potentiation by glycine. *J Pharmacol Exp Ther* 309:462-468.
- D**amaj MI (2001). Influence of gender and sex hormones on nicotine acute pharmacological effects in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 296:132-140.
- d'Anglemont de Tassigny X, Campagne C, Steculorum S y Prevot V (2009). Estradiol induces physical association of neuronal nitric oxide synthase with NMDA receptor and promotes nitric oxide formation via estrogen receptor activation in primary neuronal cultures. *J Neurochem* 109:214-224.
- Dawson VL (1995). Nitric oxide: role in neurotoxicity. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 22:305-308.
- Dawson VL y Dawson TM (1998). Nitric oxide in neurodegeneration. *Prog Brain Res* 118:215-229.

- De Biasi M y Dani JA (2003). Stress hormone enhances synaptic NMDA response on dopamine neurons. *Neuron* 39:387-388.
- De Vries GJ y Boyle PA (1998). Double duty for sex differences in the brain. *Behav Brain Res* 92:205-213.
- De Vries GJ (2004). Minireview: Sex differences in adult and developing brains: compensation, compensation, compensation. *Endocrinology* 145:1063-1068.
- Del Moral ML, Esteban FJ, Hernández R, Blanco S, Molina FJ, Martínez-Lara E, Siles E, Viedma G, Ruiz A, Pedrosa JA y Peinado MA (2004). Immunohistochemistry of neuronal nitric oxide synthase and protein nitration in the striatum of the aged rat. *Microsc Res Tech* 64:304-311.
- Di Chiara G e Imperato A (1988). Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:5274-5278.
- Di Filippo M, Picconi B, Tantucci M, Ghiglieri V, Bagetta V, Sgobio C, Tozzi A, Parnetti L y Calabresi P (2009). Short-term and long-term plasticity at corticostriatal synapses: implications for learning and memory. *Behav Brain Res* 199:108-118.
- Di Giovanni G, Ferraro G, Sardo P, Galati S, Esposito E y La Grutta V (2003). Nitric oxide modulates striatal neuronal activity via soluble guanylyl cyclase: an *in vivo* microiontophoretic study in rats. *Synapse* 48:100-107.
- Di Matteo V, Pierucci M, Di Giovanni G, Benigno A y Esposito E (2007). The neurobiological bases for the pharmacotherapy of nicotine addiction. *Curr Pharm Des* 13:1269-1284.
- Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R y Zeiher AM (1999). Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* 399:601-605.
- Dinerman JL, Dawson TM, Schell MJ, Snowman A y Snyder SH (1994). Endothelial nitric oxide synthase localized to hippocampal pyramidal cells: implications for synaptic plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:4214-4218.
- Ding JM, Chen D, Weber ET, Faiman LE, Rea MA y Gillette MU (1994). Resetting the biological clock: mediation of nocturnal circadian shifts by glutamate and NO. *Science* 266:1713-1717.
- Domino EF y Tsukada H (2009). Nicotine sensitization of monkey striatal dopamine release. *Eur J Pharmacol* 607:91-95.
- Domino EF, Tsukada H y Harada N (2009). Positron emission tomographic measure of brain dopamine dependence to nicotine as a model of drugs of abuse. *Psychopharmacology (Berl)* 204:149-153.
- Donny EC, Caggiula AR, Rowell PP, Gharib MA, Maldovan V, Booth S, Mielke MM, Hoffman A y McCallum S (2000). Nicotine self-administration in rats: estrous cycle effects, sex differences and nicotinic receptor binding. *Psychopharmacology (Berl)* 151:392-405.
- Doolittle DJ, Winegar R, Lee CK, Caldwell WS, Hayes AW y de Bethizy JD (1995). The genotoxic potential of nicotine and its major metabolites. *Mutat Res* 344:95-102.
- Doyle CA y Slater P (1997). Localization of neuronal and endothelial nitric oxide synthase isoforms in human hippocampus. *Neuroscience* 76:387-395.
- Drew PD y Chavis JA (2000). Female sex steroids: effects upon microglial cell activation. *J Neuroimmunol* 111:77-85.

- Dröge W (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82:47-95.
- Druga R, Rokyta R y Benes V Jr. (1991). Thalamocaudate projections in the macaque monkey (a horseradish peroxidase study). *J Hirnforsch* 32:765-774.
- Duckles SP y Krause DN (2007). Cerebrovascular effects of oestrogen: multiplicity of action. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 34:801-808.
- E**berhardt W, Kunz D, Hummel R y Pfeilschifter J (1996). Molecular cloning of the rat inducible nitric oxide synthase gene promoter. *Biochem Biophys Res Commun* 223:752-756.
- Edelman GM y Gally JA (1992). Nitric oxide: linking space and time in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:11651-11652.
- Elfering SL, Sarkela TM y Giulivi C (2002). Biochemistry of mitochondrial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* 277:38079-38086.
- Esch T, Stefano GB, Fricchione GL y Benson H (2002). Stress-related diseases - a potential role for nitric oxide. *Med Sci Monit* 8:RA103-RA118.
- Esplugues JV (2002). NO as a signalling molecule in the nervous system. *Br J Pharmacol* 135:1079-1095.
- Everitt BJ y Wolf ME (2002). Psychomotor stimulant addiction: a neural systems perspective. *J Neurosci* 22:3312-3320.
- F**abbricatore AT, Ghitza UE, Prokopenko VF y West MO (2009). Electrophysiological evidence of mediolateral functional dichotomy in the rat accumbens during cocaine self-administration: tonic firing patterns. *Eur J Neurosci* 30:2387-2400.
- Fabbricatore AT, Ghitza UE, Prokopenko VF y West MO (2010). Electrophysiological evidence of mediolateral functional dichotomy in the rat nucleus accumbens during cocaine self-administration II: phasic firing patterns. *Eur J Neurosci* 31:1671-1682.
- Fagen ZM, Mansvelder HD, Keath JR y McGehee DS (2003). Short- and long-term modulation of synaptic inputs to brain reward areas by nicotine. *Ann N Y Acad Sci* 1003:185-195.
- Faure A, Richard JM y Berridge KC (2010). Desire and dread from the nucleus accumbens: cortical glutamate and subcortical GABA differentially generate motivation and hedonic impact in the rat. *PLoS One* 5:e11223.
- Feinstein DL, Galea E y Reis DJ (1993). Norepinephrine suppresses inducible nitric oxide synthase activity in rat astroglial cultures. *J Neurochem* 60:1945-1948.
- Feldman S y Weidenfeld J (2004). Involvement of endogenous glutamate in the stimulatory effect of norepinephrine and serotonin on the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Neuroendocrinology* 79:43-53.
- Ferré S, O'Connor WT, Fuxe K y Ungerstedt U (1993). The striopallidal neuron: a main locus for adenosine-dopamine interactions in the brain. *J Neurosci* 13:5402-5406.
- Finlay JM y Zigmond MJ (1997). The effects of stress on central dopaminergic neurons: possible clinical implications. *Neurochem Res* 22:1387-1394.
- Forder JP y Tymianski M (2009). Postsynaptic mechanisms of excitotoxicity: Involvement of postsynaptic density proteins, radicals, and oxidant molecules. *Neuroscience* 158:293-300.

- French SJ, Ritson GP, Hidaka S y Totterdell S (2005). Nucleus accumbens nitric oxide immunoreactive interneurons receive nitric oxide and ventral subicular afferents in rats. *Neuroscience* 135:121-131.
- Gadek-Michalska A y Bugajski J (2004). Role of nitric oxide in the nicotine-induced pituitary-adrenocortical response. *J Physiol Pharmacol* 55:443-455.
- Galea E, Feinstein DL y Reis DJ (1992). Induction of calcium-independent nitric oxide synthase activity in primary rat glial cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:10945-10949.
- García-Muñoz M, Young SJ y Groves PM (1991). Terminal excitability of the corticostriatal pathway. I. Regulation by dopamine receptor stimulation. *Brain Res* 551:195-206.
- Garthwaite J y Boulton CL (1995). Nitric oxide signaling in the central nervous system. *Annu Rev Physiol* 57:683-706.
- Garthwaite J (2008). Concepts of neural nitric oxide-mediated transmission. *Eur J Neurosci* 27:2783-2802.
- Garzón M, Vaughan RA, Uhl GR, Kuhar MJ y Pickel VM (1999). Cholinergic axon terminals in the ventral tegmental area target a subpopulation of neurons expressing low levels of the dopamine transporter. *J Comp Neurol* 410:197-210.
- Gautier-Sauvigné S, Colas D, Parmantier P, Clement P, Gharib A, Sarda N y Cespuoglio R (2005). Nitric oxide and sleep. *Sleep Med Rev* 9:101-113.
- Gerdeman GL, Partridge JG, Lupica CR y Lovinger DM (2003). It could be habit forming: drugs of abuse and striatal synaptic plasticity. *Trends Neurosci* 26:184-192.
- Gerfen CR (1984). The neostriatal mosaic: compartmentalization of corticostriatal input and striatonigral output systems. *Nature* 311:461-464.
- Gerfen CR, Baimbridge KG y Miller JJ (1985). The neostriatal mosaic: compartmental distribution of calcium-binding protein and parvalbumin in the basal ganglia of the rat and monkey. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:8780-8784.
- Gerfen CR y Young WSI (1988). Distribution of striatonigral and striatopallidal peptidergic neurons in both patch and matrix compartments: an *in situ* hybridization histochemistry and fluorescent retrograde tracing study. *Brain Res* 460:161-167.
- Gerfen CR (1989). The neostriatal mosaic: striatal patch-matrix organization is related to cortical lamination. *Science* 246:385-388.
- Gerfen CR, Engber TM, Mahan LC, Susel Z, Chase TN, Monsma FJ Jr. y Sibley DR (1990). D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science* 250:1429-1432.
- Gerzanich V, Zhang F, West GA y Simard JM (2001). Chronic nicotine alters NO signaling of Ca²⁺ channels in cerebral arterioles. *Circ Res* 88:359-365.
- Getting SJ, Segieth J, Ahmad S, Biggs CS y Whitton PS (1996). Biphasic modulation of GABA release by nitric oxide in the hippocampus of freely moving rats *in vivo*. *Brain Res* 717:196-199.
- Gillies GE y McArthur S (2010). Estrogen actions in the brain and the basis for differential action in men and women: a case for sex-specific medicines. *Pharmacol Rev* 62:155-198.
- Goeders NE (2002). Stress and cocaine addiction. *J Pharmacol Exp Ther* 301:785-789.

- Goedert M, Crowther RA y Garner CC (1991). Molecular characterization of microtubule-associated proteins tau and MAP2. *Trends Neurosci* 14:193-199.
- Goldman-Rakic PS y Selemon LD (1990). New frontiers in basal ganglia research. Introduction. *Trends Neurosci* 13:241-244.
- González-Zulueta M, Feldman AB, Klesse LJ, Kalb RG, Dillman JF, Parada LF, Dawson TM y Dawson VL (2000). Requirement for nitric oxide activation of p21^{ras}/extracellular regulated kinase in neuronal ischemic preconditioning. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:436-441.
- Goodman FR (1974). Effects of nicotine on distribution and release of ¹⁴C-norepinephrine and ¹⁴C-dopamine in rat brain striatum and hypothalamus slices. *Neuropharmacology* 13:1025-1032.
- Gotti C, Fornasari D y Clementi F (1997). Human neuronal nicotinic receptors. *Prog Neurobiol* 53:199-237.
- Gotti S, Sica M, Viglietti-Panzica C y Panzica G (2005). Distribution of nitric oxide synthase immunoreactivity in the mouse brain. *Microsc Res Tech* 68:13-35.
- Gracy KN y Pickel VM (1997). Ultrastructural localization and comparative distribution of nitric oxide synthase and N-methyl-D-aspartate receptors in the shell of the rat nucleus accumbens. *Brain Res* 747:259-272.
- Graybiel AM, Baughman RW y Eckenstein F (1986). Cholinergic neuropil of the striatum observes striosomal boundaries. *Nature* 323:625-627.
- Graybiel AM (1990). Neurotransmitters and neuromodulators in the basal ganglia. *Trends Neurosci* 13:244-254.
- Graybiel AM (1991). Basal ganglia -input, neural activity, and relation to the cortex. *Curr Opin Neurobiol* 1:644-651.
- Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS y Tannenbaum SR (1982). Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 126:131-138.
- Greengard P, Allen PB y Nairn AC (1999). Beyond the dopamine receptor: the DARPP-32/protein phosphatase-1 cascade. *Neuron* 23:435-447.
- Groenewegen HJ, Becker NE y Lohman AH (1980). Subcortical afferents of the nucleus accumbens septi in the cat, studied with retrograde axonal transport of horseradish peroxidase and bisbenzimid. *Neuroscience* 5:1903-1916.
- Guevara-Guzman R, Emson PC y Kendrick KM (1994). Modulation of *in vivo* striatal transmitter release by nitric oxide and cyclic GMP. *J Neurochem* 62:807-810.
- Guix FX, Uribealgo I, Coma M y Muñoz F (2005). The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain. *Prog Neurobiol* 76:126-152.
- Gutiérrez-Mecinas M, Crespo C, Blasco-Ibáñez JM, Nácher J, Varea E y Martínez-Guijarro FJ (2007). Migrating neuroblasts of the rostral migratory stream are putative targets for the action of nitric oxide. *Eur J Neurosci* 26:392-402.
- Haber SN, Lynd E, Klein C y Groenewegen HJ (1990). Topographic organization of the ventral striatal efferent projections in the rhesus monkey: an anterograde tracing study. *J Comp Neurol* 293:282-298.
- Haber SN, Fudge JL y McFarland NR (2000). Striatonigrostriatal pathways in primates form an ascending spiral from the shell to the dorsolateral striatum. *J Neurosci* 20:2369-2382.

- Hahn GM, Shiu EC y Auger EA (1991). Mammalian stress proteins HSP70 and HSP28 coinduced by nicotine and either ethanol or heat. *Mol Cell Biol* 11:6034-6040.
- Hammond DK, Bjercke RJ, Langone JJ y Strobel HW (1991). Metabolism of nicotine by rat liver cytochromes P-450. Assessment utilizing monoclonal antibodies to nicotine and cotinine. *Drug Metab Dispos* 19:804-808.
- Han RN, Babaei S, Robb M, Lee T, Ridsdale R, Ackerley C, Post M y Stewart DJ (2004). Defective lung vascular development and fatal respiratory distress in endothelial NO synthase-deficient mice: a model of alveolar capillary dysplasia? *Circ Res* 94:1115-1123.
- Hao W, Myhre AP y Palmer JP (1999). Nitric oxide mediates IL-1 β stimulation of heat shock protein but not IL-1 β inhibition of glutamic acid decarboxylase. *Autoimmunity* 29:93-101.
- Harada A, Teng J, Takei Y, Oguchi K y Hirokawa N (2002). MAP2 is required for dendrite elongation, PKA anchoring in dendrites, and proper PKA signal transduction. *J Cell Biol* 158:541-549.
- Harrison MB, Tissot M y Wiley RG (1996). Expression of m1 and m4 muscarinic receptor mRNA in the striatum following a selective lesion of striatonigral neurons. *Brain Res* 734:323-326.
- Hawkins RD, Son H y Arancio O (1998). Nitric oxide as a retrograde messenger during long-term potentiation in hippocampus. *Prog Brain Res* 118:155-172.
- Hecker M, Cattaruzza M y Wagner AH (1999). Regulation of inducible nitric oxide synthase gene expression in vascular smooth muscle cells. *Gen Pharmacol* 32:9-16.
- Heneka MT y Feinstein DL (2001). Expression and function of inducible nitric oxide synthase in neurons. *J Neuroimmunol* 114:8-18.
- Herbison AE, Simonian SX, Norris PJ y Emson PC (1996). Relationship of neuronal nitric oxide synthase immunoreactivity to GnRH neurons in the ovariectomized and intact female rat. *J Neuroendocrinol* 8:73-82.
- Herkenham M y Pert CB (1981). Mosaic distribution of opiate receptors, parafascicular projections and acetylcholinesterase in rat striatum. *Nature* 291:415-418.
- Hidaka S y Totterdell S (2001). Ultrastructural features of the nitric oxide synthase-containing interneurons in the nucleus accumbens and their relationship with tyrosine hydroxylase-containing terminals. *J Comp Neurol* 431:139-154.
- Hill BG, Dranka BP, Bailey SM, Lancaster JR, Jr. y Darley-Usmar VM (2010). What part of NO don't you understand? Some answers to the cardinal questions in nitric oxide biology. *J Biol Chem* 285:19699-19704.
- Hiremagalur B, Nankova B, Nitahara J, Zeman R y Sabban EL (1993). Nicotine increases expression of tyrosine hydroxylase gene. Involvement of protein kinase A-mediated pathway. *J Biol Chem* 268:23704-23711.
- Hirsch DB, Steiner JP, Dawson TM, Mammen A, Hayek E y Snyder SH (1993). Neurotransmitter release regulated by nitric oxide in PC-12 cells and brain synaptosomes. *Curr Biol* 3:749-754.
- Hof PR, Young WG, Bloom FE, Belichenko PV, Celio MR (2000). Comparative cytoarchitectonic atlas of the C57BL/6 and 129/Sv mouse brains. Amsterdam: Elsevier Science, B.V.
- Hong SK, Jung IS, Bang SA y Kim SE (2006). Effect of nitric oxide synthase inhibitor and NMDA receptor antagonist on the development of nicotine sensitization of nucleus accumbens dopamine release: an *in vivo* microdialysis study. *Neurosci Lett* 409:220-223.

- Hoque KE, Indorkar RP, Sammut S y West AR (2010). Impact of dopamine-glutamate interactions on striatal neuronal nitric oxide synthase activity. *Psychopharmacology (Berl)* 207:571-581.
- Hu XT y White FJ (1997). Dopamine enhances glutamate-induced excitation of rat striatal neurons by cooperative activation of D1 and D2 class receptors. *Neurosci Lett* 224:61-65.
- Hua Y, Huang XY, Zhou L, Zhou QG, Hu Y, Luo CX, Li F y Zhu DY (2008). DETA/NONOate, a nitric oxide donor, produces antidepressant effects by promoting hippocampal neurogenesis. *Psychopharmacology (Berl)* 200:231-242.
- Huang PL, Dawson TM, Bredt DS, Snyder SH y Fishman MC (1993). Targeted disruption of the neuronal nitric oxide synthase gene. *Cell* 75:1273-1286.
- Huang PL (1999). Neuronal and endothelial nitric oxide synthase gene knockout mice. *Braz J Med Biol Res* 32:1353-1359.
- Hubert GW y Kuhar MJ (2005). Colocalization of CART with substance P but not enkephalin in the rat nucleus accumbens. *Brain Res* 1050:8-14.
- Hyman SE y Malenka RC (2001). Addiction and the brain: the neurobiology of compulsion and its persistence. *Nat Rev Neurosci* 2:695-703.
- I**gnarro LJ (1991). Signal transduction mechanisms involving nitric oxide. *Biochem Pharmacol* 41:485-490.
- Ignarro LJ, Sisodia M, Trinh K, Bedrood S, Wu G, Wei LH y Buga GM (2002). Nebivolol inhibits vascular smooth muscle cell proliferation by mechanisms involving nitric oxide but not cyclic GMP. *Nitric Oxide* 7:83-90.
- Iravani MM, Millar J y Kruk ZL (1998). Differential release of dopamine by nitric oxide in subregions of rat caudate putamen slices. *J Neurochem* 71:1969-1977.
- Itzhak Y, Anderson KL y Ali SF (2004). Differential response of nNOS knockout mice to MDMA ("ecstasy")- and methamphetamine-induced psychomotor sensitization and neurotoxicity. *Ann N Y Acad Sci* 1025:119-128.
- Iwamoto ET y Williamson EC (1984). Nicotine-induced taste aversion: characterization and preexposure effects in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 21:527-532.
- J**acobowitz DM y Winsky L (1991). Immunocytochemical localization of calretinin in the forebrain of the rat. *J Comp Neurol* 304:198-218.
- Jaffrey SR, Snowman AM, Eliasson MJ, Cohen NA y Snyder SH (1998). CAPON: a protein associated with neuronal nitric oxide synthase that regulates its interactions with PSD95. *Neuron* 20:115-124.
- Jain R, Mukherjee K y Balhara YP (2008a). The role of NMDA receptor antagonists in nicotine tolerance, sensitization, and physical dependence: a preclinical review. *Yonsei Med J* 49:175-188.
- Jain R, Mukherjee K y Mohan D (2008b). Effects of nitric oxide synthase inhibitors in attenuating nicotine withdrawal in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 88:473-480.
- Janhunen S y Ahtee L (2007). Differential nicotinic regulation of the nigrostriatal and mesolimbic dopaminergic pathways: implications for drug development. *Neurosci Biobehav Rev* 31:287-314.

- Jeohn GH, Cooper CL, Wilson B, Chang RC, Jang KJ, Kim HC, Liu B y Hong JS (2002). p38 MAP kinase is involved in lipopolysaccharide-induced dopaminergic neuronal cell death in rat mesencephalic neuron-glia cultures. *Ann N Y Acad Sci* 962:332-346.
- Johnston JG, Gerfen CR, Haber SN y van der Kooy D (1990). Mechanisms of striatal pattern formation: conservation of mammalian compartmentalization. *Dev Brain Res* 57:93-102.
- Jones S, Sudweeks S y Yakel JL (1999). Nicotinic receptors in the brain: correlating physiology with function. *Trends Neurosci* 22:555-561.
- Kaehler ST, Singewald N, Sinner C y Philippu A (1999). Nitric oxide modulates the release of serotonin in the rat hypothalamus. *Brain Res* 835:346-349.
- Kaiser S y Wonnacott S (2000). α -bungarotoxin-sensitive nicotinic receptors indirectly modulate [3 H]dopamine release in rat striatal slices via glutamate release. *Mol Pharmacol* 58:312-318.
- Kalamida D, Poulas K, Avramopoulou V, Fostieri E, Lagoumintzis G, Lazaridis K, Sideri A, Zouridakis M y Tzartos SJ (2007). Muscle and neuronal nicotinic acetylcholine receptors. Structure, function and pathogenicity. *FEBS J* 274:3799-3845.
- Kalb RG y Agostini J (1993). Molecular evidence for nitric oxide-mediated motor neuron development. *Neuroscience* 57:1-8.
- Kalivas PW (1993). Neurotransmitter regulation of dopamine neurons in the ventral tegmental area. *Brain Res Brain Res Rev* 18:75-113.
- Kalivas PW (1995). Interactions between dopamine and excitatory amino acids in behavioral sensitization to psychostimulants. *Drug Alcohol Depend* 37:95-100.
- Kano T, Shimizu-Sasamata M, Huang PL, Moskowitz MA y Lo EH (1998). Effects of nitric oxide synthase gene knockout on neurotransmitter release *in vivo*. *Neuroscience* 86:695-699.
- Kanyt L, Stolerman IP, Chandler CJ, Saigusa T y Pögün S (1999). Influence of sex and female hormones on nicotine-induced changes in locomotor activity in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 62:179-187.
- Kaur C, Sivakumar V, Singh G, Singh J y Ling EA (2005). Response of Purkinje neurons to hypobaric hypoxic exposure as shown by alteration in expression of glutamate receptors, nitric oxide synthases and calcium binding proteins. *Neuroscience* 135:1217-1229.
- Kawaguchi Y, Wilson CJ y Emson PC (1990). Projection subtypes of rat neostriatal matrix cells revealed by intracellular injection of biocytin. *J Neurosci* 10:3421-3438.
- Kawaguchi Y (1992). Large aspiny cells in the matrix of the rat neostriatum in vitro: physiological identification, relation to the compartments and excitatory postsynaptic currents. *J Neurophysiol* 67:1669-1682.
- Kawaguchi Y (1993). Physiological, morphological, and histochemical characterization of three classes of interneurons in rat neostriatum. *J Neurosci* 13:4908-4923.
- Kawaguchi Y, Wilson CJ, Augood SJ y Emson PC (1995). Striatal interneurons: chemical, physiological and morphological characterization. *Trends Neurosci* 18:527-535.
- Kawaguchi Y (1997). Neostriatal cell subtypes and their functional roles. *Neurosci Res* 27:1-8.
- Kayir H y Uzbay IT (2004). Evidence for the role of nitric oxide in caffeine-induced locomotor activity in mice. *Psychopharmacology (Berl)* 172:11-15.

- Keath JR, Iacoviello MP, Barrett LE, Mansvelder HD y McGehee DS (2007). Differential modulation by nicotine of substantia nigra versus ventral tegmental area dopamine neurons. *J Neurophysiol* 98:3388-3396.
- Kelley AE, Smith-Roe SL y Holahan MR (1997). Response-reinforcement learning is dependent on N-methyl-D-aspartate receptor activation in the nucleus accumbens core. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:12174-12179.
- Kim YM, Talanian RV, Li J y Billiar TR (1998). Nitric oxide prevents IL-1 β and IFN- γ -inducing factor (IL-18) release from macrophages by inhibiting caspase-1 (IL-1 β -converting enzyme). *J Immunol* 161:4122-4128.
- Kiss JP y Vizi ES (2001). Nitric oxide: a novel link between synaptic and nonsynaptic transmission. *Trends Neurosci* 24:211-215.
- Kita H, Kosaka T y Heizmann CW (1990). Parvalbumin-immunoreactive neurons in the rat neostriatum: a light and electron microscopic study. *Brain Res* 536:1-15.
- Kita H (1993). GABAergic circuits of the striatum. *Prog Brain Res* 99:51-72.
- Klink R, de Kerchove DA, Zoli M y Changeux JP (2001). Molecular and physiological diversity of nicotinic acetylcholine receptors in the midbrain dopaminergic nuclei. *J Neurosci* 21:1452-1463.
- Knowles RG y Moncada S (1994). Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* 298 (Pt 2):249-258.
- Kone BC (2000). Protein-protein interactions controlling nitric oxide synthases. *Acta Physiol Scand* 168:27-31.
- Kone BC, Kunczewicz T, Zhang W y Yu ZY (2003). Protein interactions with nitric oxide synthases: controlling the right time, the right place, and the right amount of nitric oxide. *Am J Physiol Renal Physiol* 285:F178-F190.
- Koob GF y Le Moal M (2001). Drug addiction, dysregulation of reward, and allostasis. *Neuropsychopharmacology* 24:97-129.
- Koppenol WH (1998). The basic chemistry of nitrogen monoxide and peroxynitrite. *Free Radic Biol Med* 25:385-391.
- Koylu E, Demirgoren S, London ED y Pöğün S (1997). Sex difference in up-regulation of nicotinic acetylcholine receptors in rat brain. *Life Sci* 61:L-90.
- Krauss M, Korr D, Herrmann A y Hucho F (2000). Binding properties of agonists and antagonists to distinct allosteric states of the nicotinic acetylcholine receptor are incompatible with a concerted model. *J Biol Chem* 275:30196-30201.
- L**a Porta CA y Comolli R (1999). Age-dependent modulation of PKC isoforms and NOS activity and expression in rat cortex, striatum, and hippocampus. *Exp Gerontol* 34:863-874.
- Lahti A, Kankaanranta H y Moilanen E (2002). P38 mitogen-activated protein kinase inhibitor SB203580 has a bi-directional effect on iNOS expression and NO production. *Eur J Pharmacol* 454:115-123.
- Lancaster JR Jr. (1994). Simulation of the diffusion and reaction of endogenously produced nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:8137-8141.
- Langnaese K, Richter K, Smalla KH, Krauss M, Thomas U, Wolf G y Laube G (2007). Splice-isoform specific immunolocalization of neuronal nitric oxide synthase in mouse and rat

- brain reveals that the PDZ-complex-building nNOS α β -finger is largely exposed to antibodies. *Dev Neurobiol* 67:422-437.
- Lapper SR y Bolam JP (1992). Input from the frontal cortex and the parafascicular nucleus to cholinergic interneurons in the dorsal striatum of the rat. *Neuroscience* 51:533-545.
- Lavolette SR y van der Kooy D (2004). The neurobiology of nicotine addiction: bridging the gap from molecules to behaviour. *Nat Rev Neurosci* 5:55-65.
- Le Moine C, Normand E y Bloch B (1991). Phenotypical characterization of the rat striatal neurons expressing the D₁ dopamine receptor gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:4205-4209.
- Ledoux J (2007). The amygdala. *Curr Biol* 17:R868-R874.
- Lee MY, Chen L y Toborek M (2009). Nicotine attenuates iNOS expression and contributes to neuroprotection in a compressive model of spinal cord injury. *J Neurosci Res* 87:937-947.
- Lee SY, Andoh T, Murphy DL y Chiueh CC (2003). 17 β -estradiol activates ICI 182,780-sensitive estrogen receptors and cyclic GMP-dependent thioredoxin expression for neuroprotection. *FASEB J* 17:947-948.
- Leker RR, Teichner A, Ovadia H, Keshet E, Reinherz E y Ben Hur T (2001). Expression of endothelial nitric oxide synthase in the ischemic penumbra: relationship to expression of neuronal nitric oxide synthase and vascular endothelial growth factor. *Brain Res* 909:1-7.
- Lin LH, Taktakishvili O y Talman WT (2007). Identification and localization of cell types that express endothelial and neuronal nitric oxide synthase in the rat nucleus tractus solitarii. *Brain Res* 1171:42-51.
- Lincoln TM (1989). Cyclic GMP and mechanisms of vasodilation. *Pharmacol Ther* 41:479-502.
- Linden DJ, Dawson TM y Dawson VL (1995). An evaluation of the nitric oxide/cGMP/cGMP-dependent protein kinase cascade in the induction of cerebellar long-term depression in culture. *J Neurosci* 15:5098-5105.
- Lipton SA, Choi YB, Pan ZH, Lei SZ, Chen HS, Sucher NJ, Loscalzo J, Singel DJ y Stamler JS (1993). A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature* 364:626-632.
- Loihl AK y Murphy S (1998). Expression of nitric oxide synthase-2 in glia associated with CNS pathology. *Prog Brain Res* 118:253-267.
- London ED, Grant SJ, Morgan MJ y Zukin SR (1996). Neurobiology of drug abuse. In: *Neuropsychiatry: A comprehensive textbook*. Fogel BS, Schiffer RB, Rao SM, editors. Baltimore, MD, EEUU: Williams and Wilkins. pp. 635-678.
- Lorenz M, Hewing B, Hui J, Zepp A, Baumann G, Bindereif A, Stangl V y Stangl K (2007). Alternative splicing in intron 13 of the human eNOS gene: a potential mechanism for regulating eNOS activity. *FASEB J* 21:1556-1564.
- López-Figueroa MO, Day HE, Akil H y Watson SJ (1998a). Nitric oxide in the stress axis. *Histol Histopathol* 13:1243-1252.
- López-Figueroa MO, Itoi K y Watson SJ (1998b). Regulation of nitric oxide synthase messenger RNA expression in the rat hippocampus by glucocorticoids. *Neuroscience* 87:439-446.
- Madeira MD y Lieberman AR (1995). Sexual dimorphism in the mammalian limbic system. *Prog Neurobiol* 45:275-333.

- Madrigal JL, Dello RC, Gavrilyuk V y Feinstein DL (2006). Effects of noradrenaline on neuronal NOS2 expression and viability. *Antioxid Redox Signal* 8:885-892.
- Maneckjee R y Minna JD (1994). Opioids induce while nicotine suppresses apoptosis in human lung cancer cells. *Cell Growth Differ* 5:1033-1040.
- Mannick JB, Hausladen A, Liu L, Hess DT, Zeng M, Miao QX, Kane LS, Gow AJ y Stamler JS (1999). Fas-induced caspase denitrosylation. *Science* 284:651-654.
- Mansvelder HD y McGehee DS (2000). Long-term potentiation of excitatory inputs to brain reward areas by nicotine. *Neuron* 27:349-357.
- Mansvelder HD, Keath JR y McGehee DS (2002). Synaptic mechanisms underlie nicotine-induced excitability of brain reward areas. *Neuron* 33:905-919.
- Mao D y McGehee DS (2010). Nicotine and behavioral sensitization. *J Mol Neurosci* 40:154-163.
- Marks-Konczalik J, Chu SC y Moss J (1998). Cytokine-mediated transcriptional induction of the human inducible nitric oxide synthase gene requires both activator protein 1 and nuclear factor $\kappa\beta$ -binding sites. *J Biol Chem* 273:22201-22208.
- Marsden PA, Heng HH, Scherer SW, Stewart RJ, Hall AV, Shi XM, Tsui LC y Schappert KT (1993). Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem* 268:17478-17488.
- Martínez-Lazcano JC, Pérez-Severiano F, Escalante B, Ramírez-Emiliano J, Vergara P, González RO y Segovia J (2007). Selective protection against oxidative damage in brain of mice with a targeted disruption of the neuronal nitric oxide synthase gene. *J Neurosci Res* 85:1391-1402.
- Martínez-Ruiz A y Lamas S (2004). S-nitrosylation: a potential new paradigm in signal transduction. *Cardiovasc Res* 62:43-52.
- Marttila K, Raattamaa H y Ahtee L (2006). Effects of chronic nicotine administration and its withdrawal on striatal FosB/ Δ FosB and c-Fos expression in rats and mice. *Neuropharmacology* 51:44-51.
- Mathieu-Kia AM, Kellogg SH, Butelman ER y Kreek MJ (2002). Nicotine addiction: insights from recent animal studies. *Psychopharmacology (Berl)* 162:102-118.
- Matta SG, Balfour DJ, Benowitz NL, Boyd RT, Buccafusco JJ, Caggiula AR, Craig CR, Collins AC, Damaj MI, Donny EC, Gardiner PS, Grady SR, Heberlein U, Leonard SS, Levin ED, Lukas RJ, Markou A, Marks MJ, McCallum SE, Parameswaran N, Perkins KA, Picciotto MR, Quik M, Rose JE, Rothenfluh A, Schafer WR, Stolerman IP, Tyndale RF, Wehner JM y Zirger JM (2007). Guidelines on nicotine dose selection for in vivo research. *Psychopharmacology (Berl)* 190:269-319.
- Mayhan WG y Sharpe GM (1999). Chronic exposure to nicotine alters endothelium-dependent arteriolar dilatation: effect of superoxide dismutase. *J Appl Physiol* 86:1126-1134.
- McGeorge AJ y Faull RL (1989). The organization of the projection from the cerebral cortex to the striatum in the rat. *Neuroscience* 29:503-537.
- Meffert MK, Calakos NC, Scheller RH y Schulman H (1996). Nitric oxide modulates synaptic vesicle docking fusion reactions. *Neuron* 16:1229-1236.

- Meredith GE y Wouterlood FG (1990). Hippocampal and midline thalamic fibers and terminals in relation to the choline acetyltransferase-immunoreactive neurons in nucleus accumbens of the rat: a light and electron microscopic study. *J Comp Neurol* 296:204-221.
- Miller WJ, Suzuki S, Miller LK, Handa R y Uht RM (2004). Estrogen receptor (ER) β isoforms rather than ER α regulate corticotropin-releasing hormone promoter activity through an alternate pathway. *J Neurosci* 24:10628-10635.
- Mitchell IJ, Cooper AJ y Griffiths MR (1999). The selective vulnerability of striatopallidal neurons. *Prog Neurobiol* 59:691-719.
- Mohn AR, Yao WD y Caron MG (2004). Genetic and genomic approaches to reward and addiction. *Neuropharmacology* 47 Suppl 1:101-110.
- Moncada S, Higgs A y Furchgott R (1997). International Union of Pharmacology Nomenclature in Nitric Oxide Research. *Pharmacol Rev* 49:137-142.
- Montague PR, Gancayco CD, Winn MJ, Marchase RB y Friedlander MJ (1994). Role of NO production in NMDA receptor-mediated neurotransmitter release in cerebral cortex. *Science* 263:973-977.
- Moore PK, Olyuyomi AO, Babbedge RC, Wallace P y Hart SL (1991). L-N^G-nitro arginine methyl ester exhibits antinociceptive activity in the mouse. *Br J Pharmacol* 102:198-202.
- Morello M, Reiner A, Sancesario G, Karle EJ y Bernardi G (1997). Ultrastructural study of nitric oxide synthase-containing striatal neurons and their relationship with parvalbumin-containing neurons in rats. *Brain Res* 776:30-39.
- Morishima HO, Abe Y, Matsuo M, Akiba K, Masaoka T y Cooper TB (1993). Gender-related differences in cocaine toxicity in the rat. *J Lab Clin Med* 122:157-163.
- Morris BJ, Simpson CS, Mundell S, Maceachern K, Johnston HM y Nolan AM (1997). Dynamic changes in NADPH-diaphorase staining reflect activity of nitric oxide synthase: evidence for a dopaminergic regulation of striatal nitric oxide release. *Neuropharmacology* 36:1589-1599.
- Mudò G, Belluardo N, Mauro A y Fuxe K (2007). Acute intermittent nicotine treatment induces fibroblast growth factor-2 in the subventricular zone of the adult rat brain and enhances neuronal precursor cell proliferation. *Neuroscience* 145:470-483.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G y Erlich H (1986). Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1:263-273.
- Murad F (1994). The nitric oxide-cyclic GMP signal transduction system for intracellular and intercellular communication. *Recent Prog Horm Res* 49:239-248.
- N**akayama H, Okuda H, Nakashima T, Imaoka S y Funae Y (1993). Nicotine metabolism by rat hepatic cytochrome P450s. *Biochem Pharmacol* 45:2554-2556.
- Nauta HJ (1979). A proposed conceptual reorganization of the basal ganglia and telencephalon. *Neuroscience* 4:1875-1881.
- Nauta WJ y Domesick VB (1984). Afferent and efferent relationships of the basal ganglia. *Ciba Found Symp* 107:3-29.

- Nelson RJ, Demas GE, Huang PL, Fishman MC, Dawson VL, Dawson TM y Snyder SH (1995). Behavioural abnormalities in male mice lacking neuronal nitric oxide synthase. *Nature* 378:383-386.
- Nestler EJ (2001). Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction. *Nat Rev Neurosci* 2:119-128.
- Nishi A, Watanabe Y, Higashi H, Tanaka M, Nairn AC y Greengard P (2005). Glutamate regulation of DARPP-32 phosphorylation in neostriatal neurons involves activation of multiple signaling cascades. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:1199-1204.
- Nishida CR y de Montellano PR (2001). Control of electron transfer in nitric-oxide synthases. Swapping of autoinhibitory elements among nitric-oxide synthase isoforms. *J Biol Chem* 276:20116-20124.
- Nishida K, Harrison DG, Navas JP, Fisher AA, Dockery SP, Uematsu M, Nerem RM, Alexander RW y Murphy TJ (1992). Molecular cloning and characterization of the constitutive bovine aortic endothelial cell nitric oxide synthase. *J Clin Invest* 90:2092-2096.
- Nowicky AV y Bindman LJ (1993). The nitric oxide synthase inhibitor, *N*-monomethyl-L-arginine blocks induction of a long-term potentiation-like phenomenon in rat medial frontal cortical neurons *in vitro*. *J Neurophysiol* 70:1255-1259.
- Nozaki K, Moskowitz MA, Maynard KI, Koketsu N, Dawson TM, Brecht DS y Snyder SH (1993). Possible origins and distribution of immunoreactive nitric oxide synthase-containing nerve fibers in cerebral arteries. *J Cereb Blood Flow Metab* 13:70-79.
- Oades RD y Halliday GM (1987). Ventral tegmental (A10) system: neurobiology. 1. Anatomy and connectivity. *Brain Res* 434:117-165.
- O'Dell TJ, Huang PL, Dawson TM, Dinerman JL, Snyder SH, Kandel ER y Fishman MC (1994). Endothelial NOS and the blockade of LTP by NOS inhibitors in mice lacking neuronal NOS. *Science* 265:542-546.
- O'Donnell P y Grace AA (1993). Dopaminergic modulation of dye coupling between neurons in the core and shell regions of the nucleus accumbens. *J Neurosci* 13:3456-3471.
- O'Donnell P y Grace AA (1997). Cortical afferents modulate striatal gap junction permeability via nitric oxide. *Neuroscience* 76:1-5.
- Overton PG, Tong ZY, Brain PF y Clark D (1996). Preferential occupation of mineralocorticoid receptors by corticosterone enhances glutamate-induced burst firing in rat midbrain dopaminergic neurons. *Brain Res* 737:146-154.
- Pacak K, Tjurmina O, Palkovits M, Goldstein DS, Koch CA, Hoff T y Chrousos GP (2002). Chronic hypercortisolemia inhibits dopamine synthesis and turnover in the nucleus accumbens: an *in vivo* microdialysis study. *Neuroendocrinology* 76:148-157.
- Palkovits M y Brownstein M (1987). Maps and guide to microdissection of the rat brain. Elsevier, editor. Amsterdam.
- Palmer RM, Rees DD, Ashton DS y Moncada S (1988). L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. *Biochem Biophys Res Commun* 153:1251-1256.
- Panzica GC, Viglietti-Panzica C, Sica M, Gotti S, Martini M, Pinos H, Carrillo B y Collado P (2006). Effects of gonadal hormones on central nitric oxide producing systems. *Neuroscience* 138:987-995.

- Papa M, Diewald L, Carey MP, Esposito FJ, Gironi Carnevale UA y Sadile AG (2002). A rostro-caudal dissociation in the dorsal and ventral striatum of the juvenile SHR suggests an anterior hypo- and a posterior hyperfunctioning mesocorticolimbic system. *Behav Brain Res* 130:171-179.
- Parent A, Bouchard C y Smith Y (1984). The striatopallidal and striatonigral projections: two distinct fiber systems in primate. *Brain Res* 303:385-390.
- Parent A (1986). Comparative neurobiology of the basal ganglia. Wiley J, editor. Nueva York.
- Park MR, Lighthall JW y Kitai ST (1980). Recurrent inhibition in the rat neostriatum. *Brain Res* 194:359-369.
- Penney JB Jr. y Young AB (1986). Striatal inhomogeneities and basal ganglia function. *Mov Disord* 1:3-15.
- Perkins KA, Donny E y Caggiula AR (1999). Sex differences in nicotine effects and self-administration: review of human and animal evidence. *Nicotine Tob Res* 1:301-315.
- Peunova N y Enikolopov G (1995). Nitric oxide triggers a switch to growth arrest during differentiation of neuronal cells. *Nature* 375:68-73.
- Pickworth WB, Fant RV (1998). Endocrine effects of nicotine administration, tobacco and other drug withdrawal in humans. *Psychoneuroendocrinology* 23:131-141.
- Pidoplichko VI, DeBiasi M, Williams JT y Dani JA (1997). Nicotine activates and desensitizes mid-brain dopamine neurons. *Nature* 390:401-404.
- Pidoplichko VI, Noguchi J, Areola OO, Liang Y, Peterson J, Zhang T y Dani JA (2004). Nicotinic cholinergic synaptic mechanisms in the ventral tegmental area contribute to nicotine addiction. *Learn Mem* 11:60-69.
- Pöğün S, Baumann MH y Kuhar MJ (1994a). Nitric oxide inhibits [³H]dopamine uptake. *Brain Res* 641:83-91.
- Pöğün S, Dawson V y Kuhar MJ (1994b). Nitric oxide inhibits ³H-glutamate transport in synaptosomes. *Synapse* 18:21-26.
- Pöğün S, Demireören S, Taskiran D, Kanit L, Yilmaz O, Koylu EO, Balkan B y London ED (2000). Nicotine modulates nitric oxide in rat brain. *Eur Neuropsychopharmacol* 10:463-472.
- Pöğün S (2001). Sex differences in brain and behavior: emphasis on nicotine, nitric oxide and place learning. *Int J Psychophysiol* 42:195-208.
- Prast H, Tran MH, Fischer H y Philippu A (1998). Nitric oxide-induced release of acetylcholine in the nucleus accumbens: role of cyclic GMP, glutamate, and GABA. *J Neurochem* 71:266-273.
- Preston RJ, Bishop GA y Kitai ST (1980). Medium spiny neuron projection from the rat striatum: an intracellular horseradish peroxidase study. *Brain Res* 183:253-263.
- Pryor SC, Zhu W, Cadet P, Bianchi E, Guarna M y Stefano GB (2005). Endogenous morphine: opening new doors for the treatment of pain and addiction. *Expert Opin Biol Ther* 5:893-906.
- Pudiak CM y Bozarth MA (1993). L-NAME and MK-801 attenuate sensitization to the locomotor-stimulating effect of cocaine. *Life Sci* 53:1517-1524.
- Putzke J, Seidel B, Huang PL y Wolf G (2000). Differential expression of alternatively spliced isoforms of neuronal nitric oxide synthase (nNOS) and N-methyl-D-aspartate receptors

- (NMDAR) in knockout mice deficient in nNOS α (nNOS $\alpha^{\Delta/\Delta}$ mice). *Brain Res Mol Brain Res* 85:13-23.
- Quick MW y Lester RA (2002). Desensitization of neuronal nicotinic receptors. *J Neurobiol* 53:457-478.
- Quinn DI, Wodak A y Day RO (1997). Pharmacokinetic and pharmacodynamic principles of illicit drug use and treatment of illicit drug users. *Clin Pharmacokinet* 33:344-400.
- Rrecio JS, Weruaga E, Gómez C, Valero J, Briñón JG y Alonso JR (2007). Changes in the connections of the main olfactory bulb after mitral cell selective neurodegeneration. *J Neurosci Res*.
- Rengasamy A y Johns RA (1993). Regulation of nitric oxide synthase by nitric oxide. *Mol Pharmacol* 44:124-128.
- Reynolds SM y Berridge KC (2002). Positive and negative motivation in nucleus accumbens shell: bivalent rostrocaudal gradients for GABA-elicited eating, taste "liking"/"disliking" reactions, place preference/avoidance, and fear. *J Neurosci* 22:7308-7320.
- Rezvani AH, Grady DR, Peek AE y Pucilowski O (1995). Inhibition of nitric oxide synthesis attenuates alcohol consumption in two strains of alcohol-preferring rats. *Pharmacol Biochem Behav* 50:265-270.
- Rivera A, Alberti I, Martín AB, Narvaez JA, de la Calle A y Moratalla R (2002). Molecular phenotype of rat striatal neurons expressing the dopamine D₅ receptor subtype. *Eur J Neurosci* 16:2049-2058.
- Rivest R, Falardeau P y Di Paolo T (1995). Brain dopamine transporter: gender differences and effect of chronic haloperidol. *Brain Res* 692:269-272.
- Rivier C (1999). Gender, sex steroids, corticotropin-releasing factor, nitric oxide, and the HPA response to stress. *Pharmacol Biochem Behav* 64:739-751.
- Robbins TW y Everitt BJ (1996). Neurobehavioural mechanisms of reward and motivation. *Curr Opin Neurobiol* 6:228-236.
- Roberts RA, Laskin DL, Smith CV, Robertson FM, Allen EM, Doorn JA y Slikker W (2009). Nitritative and Oxidative Stress in Toxicology and Disease. *Toxicol Sci*.
- Robinson LJ y Michel T (1995). Mutagenesis of palmitoylation sites in endothelial nitric oxide synthase identifies a novel motif for dual acylation and subcellular targeting. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:11776-11780.
- Robinson TE y Berridge KC (1993). The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. *Brain Res Brain Res Rev* 18:247-291.
- Roskams AJ, Brecht DS, Dawson TM y Ronnett GV (1994). Nitric oxide mediates the formation of synaptic connections in developing and regenerating olfactory receptor neurons. *Neuron* 13:289-299.
- Rossetti ZL y Crespi F (2004). Inhibition of nitric oxide release *in vivo* by ethanol. *Alcohol Clin Exp Res* 28:1746-1751.
- Russell VA, Allin R, Lamm MC y Taljaard JJ (1992). Regional distribution of monoamines and dopamine D₁- and D₂-receptors in the striatum of the rat. *Neurochem Res* 17:387-395.

- Russwurm M, Wittau N y Koesling D (2001). Guanylyl cyclase/PSD-95 interaction: targeting of the nitric oxide-sensitive $\alpha 2\beta 1$ guanylyl cyclase to synaptic membranes. *J Biol Chem* 276:44647-44652.
- Saal D, Dong Y, Bonci A y Malenka RC (2003). Drugs of abuse and stress trigger a common synaptic adaptation in dopamine neurons. *Neuron* 37:577-582.
- Sahraei H, Falahi M, Zarrindast MR, Sabetkasaei M, Ghoshooni H y Khalili M (2004). The effects of nitric oxide on the acquisition and expression of nicotine-induced conditioned place preference in mice. *Eur J Pharmacol* 503:81-87.
- Salvemini D, Misko TP, Masferrer JL, Seibert K, Currie MG y Needleman P (1993). Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:7240-7244.
- Sammur S, Dec A, Mitchell D, Linardakis J, Ortiguera M y West AR (2006). Phasic dopaminergic transmission increases NO efflux in the rat dorsal striatum via a neuronal NOS and a dopamine D_{1/5} receptor-dependent mechanism. *Neuropsychopharmacology* 31:493-505.
- Sammur S, Bray KE y West AR (2007a). Dopamine D₂ receptor-dependent modulation of striatal NO synthase activity. *Psychopharmacology (Berl)* 191:793-803.
- Sammur S, Park DJ y West AR (2007b). Frontal cortical afferents facilitate striatal nitric oxide transmission *in vivo* via a NMDA receptor and neuronal NOS-dependent mechanism. *J Neurochem* 103:1145-1156.
- Sasaki M, Gonzalez-Zulueta M, Huang H, Herring WJ, Ahn S, Ginty DD, Dawson VL y Dawson TM (2000). Dynamic regulation of neuronal NO synthase transcription by calcium influx through a CREB family transcription factor-dependent mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:8617-8622.
- Saul'skaya NB, Fofonova NV y Sudorgina PV (2010). Activation of the Noergic system of the nucleus accumbens on presentation of contextual danger signals. *Neurosci Behav Physiol* 40:907-912.
- Sauvage M, Steckler T (2001). Detection of corticotropin-releasing hormone receptor 1 immunoreactivity in cholinergic, dopaminergic and noradrenergic neurons of the murine basal forebrain and brainstem nuclei-potential implication for arousal and attention. *Neuroscience* 104:643-652.
- Schilström B, Nomikos GG, Nisell M, Hertel P y Svensson TH (1998). N-methyl-D-aspartate receptor antagonism in the ventral tegmental area diminishes the systemic nicotine-induced dopamine release in the nucleus accumbens. *Neuroscience* 82:781-789.
- Schilström B, Fagerquist MV, Zhang X, Hertel P, Panagis G, Nomikos GG y Svensson TH (2000). Putative role of presynaptic $\alpha 7^*$ nicotinic receptors in nicotine stimulated increases of extracellular levels of glutamate and aspartate in the ventral tegmental area. *Synapse* 38:375-383.
- Schilström B, Rawal N, Mamedi-Engvall M, Nomikos GG y Svensson TH (2003). Dual effects of nicotine on dopamine neurons mediated by different nicotinic receptor subtypes. *Int J Neuropsychopharmacol* 6:1-11.
- Scordalakes EM, Shetty SJ y Rissman EF (2002). Roles of estrogen receptor α and androgen receptor in the regulation of neuronal nitric oxide synthase. *J Comp Neurol* 453:336-344.
- Seidel B, Stanarius A y Wolf G (1997). Differential expression of neuronal and endothelial nitric oxide synthase in blood vessels of the rat brain. *Neurosci Lett* 239:109-112.

- Selemon LD y Goldman-Rakic PS (1985). Longitudinal topography and interdigitation of corticostriatal projections in the rhesus monkey. *J Neurosci* 5:776-794.
- Sequeira SM, Ambrosio AF, Malva JO, Carvalho AP y Carvalho CM (1997). Modulation of glutamate release from rat hippocampal synaptosomes by nitric oxide. *Nitric Oxide* 1:315-329.
- Servan-Schreiber D, Printz H y Cohen JD (1990). A network model of catecholamine effects: gain, signal-to-noise ratio, and behavior. *Science* 249:892-895.
- Seyler LE Jr., Fertig J, Pomerleau O, Hunt D y Parker K (1984). The effects of smoking on ACTH and cortisol secretion. *Life Sci* 34:57-65.
- Shim I, Kim HT, Kim YH, Chun BG, Hahm DH, Lee EH, Kim SE y Lee HJ (2002). Role of nitric oxide synthase inhibitors and NMDA receptor antagonist in nicotine-induced behavioral sensitization in the rat. *Eur J Pharmacol* 443:119-124.
- Shoaib M, Benwell ME, Akbar MT, Stolerman IP y Balfour DJ (1994). Behavioural and neurochemical adaptations to nicotine in rats: influence of NMDA antagonists. *Br J Pharmacol* 111:1073-1080.
- Shoaib M y Stolerman IP (1995). Conditioned taste aversions in rats after intracerebral administration of nicotine. *Behav Pharmacol* 6:375-385.
- Singh R, Pervin S, Shryne J, Gorski R y Chaudhuri G (2000). Castration increases and androgens decrease nitric oxide synthase activity in the brain: physiologic implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:3672-3677.
- Sinha R (2008). Chronic stress, drug use, and vulnerability to addiction. *Ann N Y Acad Sci* 1141:105-130.
- Slotkin TA, McCook EC y Seidler FJ (1997). Cryptic brain cell injury caused by fetal nicotine exposure is associated with persistent elevations of *c-fos* protooncogene expression. *Brain Res* 750:180-188.
- Smith SM y Vale WW (2006). The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in neuroendocrine responses to stress. *Dialogues Clin Neurosci* 8:383-395.
- Smith Y, Bevan MD, Shink E y Bolam JP (1998). Microcircuitry of the direct and indirect pathways of the basal ganglia. *Neuroscience* 86:353-387.
- Son H, Hawkins RD, Martin K, Kiebler M, Huang PL, Fishman MC y Kandel ER (1996). Long-term potentiation is reduced in mice that are doubly mutant in endothelial and neuronal nitric oxide synthase. *Cell* 87:1015-1023.
- Squadrito GL y Pryor WA (1998). Oxidative chemistry of nitric oxide: the roles of superoxide, peroxynitrite, and carbon dioxide. *Free Radic Biol Med* 25:392-403.
- Stamler JS, Singel DJ y Loscalzo J (1992). Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science* 258:1898-1902.
- Stolerman IP y Jarvis MJ (1995). The scientific case that nicotine is addictive. *Psychopharmacology (Berl)* 117:2-10.
- Su Y, Han W, Giraldo C, De Li Y y Block ER (1998). Effect of cigarette smoke extract on nitric oxide synthase in pulmonary artery endothelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 19:819-825.
- Suemaru K, Kawasaki H, Gomita Y y Tanizaki Y (1997). Involvement of nitric oxide in development of tail-tremor induced by repeated nicotine administration in rats. *Eur J Pharmacol* 335:139-143.

- Sugano N, Minegishi T, Kawamoto K e Ito K (2001). Nicotine inhibits UV-induced activation of the apoptotic pathway. *Toxicol Lett* 125:61-65.
- T**askiran D, Kutay FZ, Sozmen E y Pöğün S (1997). Sex differences in nitrite/nitrate levels and antioxidant defense in rat brain. *Neuroreport* 8:881-884.
- Taupin P (2006). Neurogenesis in the adult central nervous system. *C R Biol* 329:465-475.
- Thomas DD, Ridnour LA, Isenberg JS, Flores-Santana W, Switzer CH, Donzelli S, Hussain P, Vecoli C, Paolucci N, Ambs S, Colton CA, Harris CC, Roberts DD y Wink DA (2008). The chemical biology of nitric oxide: implications in cellular signaling. *Free Radic Biol Med* 45:18-31.
- Tong XK y Hamel E (2000). Basal forebrain nitric oxide synthase (NOS)-containing neurons project to microvessels and NOS neurons in the rat neocortex: cellular basis for cortical blood flow regulation. *Eur J Neurosci* 12:2769-2780.
- Torres OV, Natividad LA, Tejeda HA, Van Weelden SA y O'Dell LE (2009). Female rats display dose-dependent differences to the rewarding and aversive effects of nicotine in an age-, hormone-, and sex-dependent manner. *Psychopharmacology (Berl)* 206:303-312.
- Töpel I, Stanarius A y Wolf G (1998). Distribution of the endothelial constitutive nitric oxide synthase in the developing rat brain: an immunohistochemical study. *Brain Res* 788:43-48.
- Trabace L, Cassano T, Tucci P, Steardo L, Kendrick KM y Cuomo V (2004). The effects of nitric oxide on striatal serotonergic transmission involve multiple targets: an *in vivo* microdialysis study in the awake rat. *Brain Res* 1008:293-298.
- Trivedi AH, Dave BJ y Adhvaryu SG (1990). Assessment of genotoxicity of nicotine employing *in vitro* mammalian test system. *Cancer Lett* 54:89-94.
- Trivedi AH, Dave BJ y Adhvaryu SC (1993). Genotoxic effects of nicotine in combination with arecoline on CHO cells. *Cancer Lett* 74:105-110.
- Tsigos C y Chrousos GP (2002). Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *J Psychosom Res* 53:865-871.
- U**ji M, Yoshida K, Shintani-Ishida K y Morimoto K (2007). Sex difference in norepinephrine surge in response to psychological stress through nitric oxide in rats. *Life Sci* 80:860-866.
- Ulus U, Uzbay IT, Kayir H, Alici T y Karakas S (2005). Evidence for the role of nitric oxide in nicotine-induced locomotor sensitization in mice. *Psychopharmacology (Berl)* 178:500-504.
- Ungless MA, Whistler JL, Malenka RC y Bonci A (2001). Single cocaine exposure *in vivo* induces long-term potentiation in dopamine neurons. *Nature* 411:583-587.
- Ungless MA, Singh V, Crowder TL, Yaka R, Ron D y Bonci A (2003). Corticotropin-releasing factor requires CRF binding protein to potentiate NMDA receptors via CRF receptor 2 in dopamine neurons. *Neuron* 39:401-407.
- Usuda I, Tanaka K y Chiba T (1998). Efferent projections of the nucleus accumbens in the rat with special reference to subdivision of the nucleus: biotinylated dextran amine study. *Brain Res* 797:73-93.
- Utter AA y Basso MA (2008). The basal ganglia: an overview of circuits and function. *Neurosci Biobehav Rev* 32:333-342.
- V**an Dongen YC, Deniau JM, Pennartz CM, Galis-de Graaf Y, Voorn P, Thierry AM y Groenewegen HJ (2005). Anatomical evidence for direct connections between the shell and core

- subregions of the rat nucleus accumbens. *Neuroscience* 136:1049-1071.
- Van Pett K, Viau V, Bittencourt JC, Chan RK, Li HY, Arias C, Prins GS, Perrin M, Vale W y Sawchenko PE (2000). Distribution of mRNAs encoding CRF receptors in brain and pituitary of rat and mouse. *J Comp Neurol* 428:191-212.
- Venance L, Glowinski J y Giaume C (2004). Electrical and chemical transmission between striatal GABAergic output neurones in rat brain slices. *J Physiol* 559:215-230.
- Vezina P (2004). Sensitization of midbrain dopamine neuron reactivity and the self-administration of psychomotor stimulant drugs. *Neurosci Biobehav Rev* 27:827-839.
- Vezina P, McGehee DS y Green WN (2007). Exposure to nicotine and sensitization of nicotine-induced behaviors. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 31:1625-1638.
- Vincent SR, Staines WA y Fibiger HC (1983). Histochemical demonstration of separate populations of somatostatin and cholinergic neurons in the rat striatum. *Neurosci Lett* 35:111-114.
- Voorn P, Vanderschuren LJ, Groenewegen HJ, Robbins TW y Pennartz CM (2004). Putting a spin on the dorsal-ventral divide of the striatum. *Trends Neurosci* 27:468-474.
- Vossen C y Erard M (2002). Down-regulation of nuclear receptor DNA-binding activity by nitric oxide-HNF4 as a model system. *Med Sci Monit* 8:RA217-RA220.
- Vuillet J, Kerkerian L, Kachidian P, Bosler O y Nieoullon A (1989). Ultrastructural correlates of functional relationships between nigral dopaminergic or cortical afferent fibers and neuropeptide Y-containing neurons in the rat striatum. *Neurosci Lett* 100:99-104.
- Vuillet J, Dimova R, Nieoullon A y Kerkerian-Le Goff L (1992). Ultrastructural relationships between choline acetyltransferase- and neuropeptide y-containing neurons in the rat striatum. *Neuroscience* 46:351-360.
- Wada K, Chatzipanteli K, Kraydieh S, Busto R, Dietrich WD y Dalton W (1998). Inducible nitric oxide synthase expression after traumatic brain injury and neuroprotection with aminoguanidine treatment in rats. *Neurosurgery* 43:1427-1436.
- Wallerath T, Gödecke A, Molojavyi A, Li H, Schrader J y Förstermann U (2004). Dexamethasone lacks effect on blood pressure in mice with a disrupted endothelial NO synthase gene. *Nitric Oxide* 10:36-41.
- Wanat MJ, Hopf FW, Stuber GD, Phillips PE y Bonci A (2008). Corticotropin-releasing factor increases mouse ventral tegmental area dopamine neuron firing through a protein kinase C-dependent enhancement of I_h . *J Physiol* 586:2157-2170.
- Wang H y Pickel VM (2002). Dopamine D2 receptors are present in prefrontal cortical afferents and their targets in patches of the rat caudate-putamen nucleus. *J Comp Neurol* 442:392-404.
- Wang Y, Newton DC y Marsden PA (1999). Neuronal NOS: gene structure, mRNA diversity, and functional relevance. *Crit Rev Neurobiol* 13:21-43.
- Warembourg M, Leroy D y Jolivet A (1999). Nitric oxide synthase in the guinea pig preoptic area and hypothalamus: distribution, effect of estrogen, and colocalization with progesterone receptor. *J Comp Neurol* 407:207-227.
- Weruaga-Prieto E, Egli P y Celio MR (1996). Topographic variations in rat brain oligodendrocyte morphology elucidated by injection of Lucifer Yellow in fixed tissue slices. *J Neurocytol* 25:19-31.

- Weruaga E, Briñón JG, Barbado V, Aijón J y Alonso JR (1999). A standardized model for the anatomical division of the rodent olfactory bulb. *Eur J Anat* 3:27-34.
- Weruaga E, Briñón JG, Porteros A, Arévalo R, Aijón J y Alonso JR (2000). Expression of neuronal nitric oxide synthase/NADPH-diaphorase during olfactory deafferentation and regeneration. *Eur J Neurosci* 12:1177-1193.
- Weruaga E, Briñón JG, Porteros A, Arévalo R, Aijón J y Alonso JR (2001). A sexually dimorphic group of atypical glomeruli in the mouse olfactory bulb. *Chem Senses* 26:7-15.
- Weruaga E, Balkan B, Koçlu EO, Pöğün S y Alonso JR (2002). Effects of chronic nicotine administration on nitric oxide synthase expression and activity in rat brain. *J Neurosci Res* 67:689-697.
- West AR y Grace AA (2000). Striatal nitric oxide signaling regulates the neuronal activity of mid-brain dopamine neurons *in vivo*. *J Neurophysiol* 83:1796-1808.
- West AR, Galloway MP y Grace AA (2002). Regulation of striatal dopamine neurotransmission by nitric oxide: effector pathways and signaling mechanisms. *Synapse* 44:227-245.
- West AR y Grace AA (2004). The nitric oxide-guanylyl cyclase signaling pathway modulates membrane activity States and electrophysiological properties of striatal medium spiny neurons recorded *in vivo*. *J Neurosci* 24:1924-1935.
- White NM (1996). Addictive drugs as reinforcers: multiple partial actions on memory systems. *Addiction* 91:921-949.
- Wickens JR, Budd CS, Hyland BI y Arbuthnott GW (2007). Striatal contributions to reward and decision making: making sense of regional variations in a reiterated processing matrix. *Ann N Y Acad Sci* 1104:192-212.
- Williams CV, Nordquist D y McLoon SC (1994). Correlation of nitric oxide synthase expression with changing patterns of axonal projections in the developing visual system. *J Neurosci* 14:1746-1755.
- Wise RA y Bozarth MA (1987). A psychomotor stimulant theory of addiction. *Psychol Rev* 94:469-492.
- Wolf ME (1998). The role of excitatory amino acids in behavioral sensitization to psychomotor stimulants. *Prog Neurobiol* 54:679-720.
- Wonnacott S, Sidhpura N y Balfour DJ (2005). Nicotine: from molecular mechanisms to behaviour. *Curr Opin Pharmacol* 5:53-59.
- Wooltorton JR, Pidoplichko VI, Broide RS y Dani JA (2003). Differential desensitization and distribution of nicotinic acetylcholine receptor subtypes in midbrain dopamine areas. *J Neurosci* 23:3176-3185.
- Wu YP, Kita K y Suzuki N (2002). Involvement of human heat shock protein 90 α in nicotine-induced apoptosis. *Int J Cancer* 100:37-42.
- Xiao L y Becker JB (1994). Quantitative microdialysis determination of extracellular striatal dopamine concentration in male and female rats: effects of estrous cycle and gonadectomy. *Neurosci Lett* 180:155-158.
- Yamada K, Noda Y, Nakayama S, Komori Y, Sugihara H, Hasegawa T y Nabeshima T (1995). Role of nitric oxide in learning and memory and in monoamine metabolism in the rat brain. *Br J Pharmacol* 115:852-858.

- Yildiz D (2004). Nicotine, its metabolism and an overview of its biological effects. *Toxicol* 43:619-632.
- Yildiz F, Ulak G, Erden BF y Gacar N (2000). Anxiolytic-like effects of 7-nitroindazole in the rat plus-maze test. *Pharmacol Biochem Behav* 65:199-202.
- Yilmaz O, Kanit L, Okur BE, London ED y Pöğün S (2000). Nitric oxide synthetase inhibition hinders facilitation of active avoidance learning by nicotine in rats. *Behav Pharmacol* 11:505-510.
- Yin HH y Knowlton BJ (2004). Contributions of striatal subregions to place and response learning. *Learn Mem* 11:459-463.
- Yin HH, Mulcare SP, Hilario MR, Clouse E, Holloway T, Davis MI, Hansson AC, Lovinger DM y Costa RM (2009). Dynamic reorganization of striatal circuits during the acquisition and consolidation of a skill. *Nat Neurosci* 12:333-341.
- Yoshida K, Kato Y e Imura H (1980). Nicotine-induced release of noradrenaline from hypothalamic synaptosomes. *Brain Res* 182:361-368.
- Yun H-Y, Dawson VL y Dawson TM (1996). Neurobiology of nitric oxide. *Crit Rev Neurobiol* 10:291-316.
- Zahm DS y Brog JS (1992). On the significance of subterritories in the "accumbens" part of the rat ventral striatum. *Neuroscience* 50:751-767.
- Zhou L y Zhu DY (2009). Neuronal nitric oxide synthase: structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications. *Nitric Oxide* 20:223-230.
- Zhu XZ y Luo LG (1992). Effect of nitroprusside (nitric oxide) on endogenous dopamine release from rat striatal slices. *J Neurochem* 59:932-935.

Páginas en Internet

Ministerio de Sanidad, Política Social e Igualdad de España. www.msc.es

The Jackson Laboratory. <http://jaxmice.jax.org>

Apéndice

Soluciones de uso común

Fijador paraformaldehído al 4 % tamponado: está compuesto por un 4% (p/v) de paraformaldehído despolimerizado tamponado a pH 7,4 con TF 0,1 M.

Mezcla congeladora: está formada por 30 % (v/v) de glicerol y 30 % (v/v) de etilenglicol en TF 0,2 M.

Solución Griess I: es una disolución de 0,2 % (p/v) de *N*-(1-Naftil-) etilendiamina dihidrocloruro en H₂O destilada.

Solución Griess II: se obtiene mezclando 2 % (p/v) de sulfanilamida en 10 % (v/v) de ácido ortofosfórico en H₂O destilada.

Solución SDS-EDTA: Está formado por 0,2 % de SDS, 1,5 mM de EDTA, 30 mM de NaCl y 20 mM de Trizma-base en H₂O destilada, ajustando el pH a 7,4.

Tampón fornace: está compuesto de un 8,56 % (p/v) de sacarosa, Tris 50 mM pH 8,0, 25 mM KCl y 5 mM MgCl₂.

Tampón fosfato 0,1 M pH 7,4 (25°C, TF): se prepara diluyendo 1:1 la solución de tampón fosfato 0,2 M en H₂O destilada.

Tampón fosfato 0,1 M pH 7,5 (25°C, TF pH 7,5) para estudios bioquímicos: se obtiene mezclando soluciones 0,1 M de Na₂HPO₄ y NaH₂PO₄ adecuadas para análisis bioquímicos hasta obtener un pH de 7,5.

Tampón fosfato 0,2 M, pH 7,4 (25°C): se obtiene mezclando soluciones 0,2 M de Na₂HPO₄ y NaH₂PO₄ hasta alcanzar el pH deseado.

Tampón fosfato salino 0,1 M, pH 7,4 (25°C, TFS): este tampón está constituido por el 0,8 % de NaCl, el 0,02 % de KCl, el 0,144 % de Na₂HPO₄ y el 0,021 % de KH₂PO₄ en H₂O destilada.

Tampón Tris-borato-EDTA 0,5 X, pH 8,3 (25 °C, TBE): se obtiene mezclando Tris base 0,54 %, ácido bórico 0,275 % y EDTA 1mM a pH 8, en agua destilada.

Tampón Tris-ácido acético-EDTA 1X, pH 7,6 (25 °C, TAE): está compuesto por tris base 0,484 %, ácido acético glacial 0,1142 % y EDTA 1 mM a pH 8, en agua destilada.

Sueros inmunológicos

Anti-óxido nítrico sintasa neuronal (anti-NOS1). IgG de oveja anti-NOS1. El antisuero policlonal K205 fue cedido por los Drs. Emson y Charles (Cambridge, Reino Unido). Está dirigido contra la NOS1 recombinante de rata expresada en un sistema celular de insecto/baculovirus (Herbison *et al.*, 1996).

Anti-óxido nítrico sintasa neuronal (anti-NOS2). IgG de ratón anti-NOS2, BD Trasdution Laboratories, San José, California, EEUU. Está dirigida contra la zona carboxilo terminal de la NOS2 de ratón. Reconoce la NOS2 de humano, rata y ratón.

Anti-óxido nítrico sintasa neuronal (anti-NOS3). IgG de ratón anti-NOS3, BD Trasdution Laboratories, San José, California, EEUU. Está dirigida contra la zona carboxilo terminal de la NOS3 de humano. Reconoce la NOS3 de humano, rata y ratón.

Anti-proteína asociada a microtúbulos 2 (anti-MAP2). IgG de conejo anti-MAP2, Chemicon, Temecula, California, EEUU. Está dirigido contra la proteína asociada a microtúbulo purificada de cerebro de rata. Reconoce todas las isoformas de la MAP2 en humano, rata y ratón. En el encéfalo, esta proteína se expresa en las neuronas maduras, principalmente en sus dendritas y, en menor medida, en su soma (Goedert *et al.*, 1991; Harada *et al.*, 2002).