

Neurobiología de la nicotina y el óxido nítrico: Una revisión

E. Weruaga, J. Aijón, J.R. Alonso

Departamento de Biología Celular y Patología, Instituto de Neurociencias de Castilla y León, Universidad de Salamanca.

INTRODUCCIÓN

La literatura que presenta el tabaquismo como una de las principales lacras de la salud pública mundial es cada vez más extensa¹⁻³, como lo es también aquella que identifica a la nicotina como una de las principales drogas de abuso^{4,5}. En la actualidad, las terapias farmacológicas disponibles contra esta dependencia son limitadas, estando entre las más estudiadas la administración controlada de nicotina y el bupropión. La primera consiste en una aportación de la misma droga que produce la adicción pero en dosis controladas, de manera que no llegue a provocar la abstinencia típica de todos los fármacos que producen habituación, y con unos medios de administración menos lesivos para el organismo que el humo del tabaco^{6,7}. El bupropión tiene su actuación en el otro extremo de la cadena de eventos neuroquímicos que tienen lugar en este fenómeno adictivo, y que es común a otras drogas de abuso: la liberación de dopamina^{6,8}. Tanto la eficacia como los problemas derivados de estos dos tratamientos han sido explícitamente probados^{6,9-11}, pero la heterogeneidad de los resultados es bastante patente en los estudios clínicos, con rasgos diferenciales debidos al grado de adicción, la edad, sexo, el estado psicológico o factores genéticos¹²⁻¹⁶.

Los procesos moleculares y celulares que se producen en un cerebro adicto a la nicotina están lejos de conocerse con detalle, pero es plausible que la cadena que liga la nicotina y la liberación incrementada de dopamina tenga más eslabones que aquéllos que son hoy dianas terapéuticas. Por

ejemplo, se ha demostrado que el nuevo neurotransmisor óxido nítrico está implicado en procesos adictivos inducidos por otras drogas de abuso¹⁷⁻²⁰, precisamente en procesos biológicos comunes a todas ellas. Sin embargo, el papel exacto de este neurotransmisor no está todavía claro; la comprensión de la neurobiología subyacente cimentará las bases de futuras acciones terapéuticas.

En los siguientes apartados comentaremos las acciones de la nicotina en ciertos aspectos de la neurobiología de los procesos adictivos, las principales funciones del óxido nítrico como neurotransmisor y molécula neuromoduladora, y las relaciones existentes entre ellos.

EL ÓXIDO NÍTRICO: UN MENSAJERO BIOLÓGICO ATÍPICO

El NO (óxido nítrico) a temperatura y presión atmosférica ambiente es un gas, pero exceptuando en el aire de los pulmones y los senos paranasales, en los que sí se presenta en tal estado²¹, esta molécula actúa como un soluto no-cargado en la mayoría de los procesos biológicos²². Esta característica química ha hecho por una parte que su aislamiento en sistemas biológicos haya sido bastante tardío y, por otra, que presente características muy peculiares, como la difusión libre en una solución de proteínas y membranas desde su lugar de producción²³. Contrariamente a lo que se postulaba en los últimos años, al ser más soluble en agua que en fases de lípidos y membranas, estas últimas pueden actuar como una verdadera barrera y reservorio de NO²². Además, su propiedad de ser un transportador relativamente estable de electrones no apareados es aprovechada por numerosos sistemas biológicos, convirtiéndose así en un nuevo tipo de mensajero, distinto a los clásicos²⁴. De manera natural, el NO reacciona con diversas especies moleculares formando dos metabolitos estables solubles, nitritos y nitra-

Correspondencia: Dr. José Ramón Alonso. Departamento de Biología Celular y Patología. Instituto de Neurociencias de Castilla y León. Universidad de Salamanca. Campus Miguel de Unamuno. Avda. Alfonso X el Sabio 1. 37007 Salamanca. e-mail: jralonso@usal.es

Recibido: 20 de enero de 2002. *Aceptado:* 13 de febrero de 2002
[Prev Tab 2002; 4(2): 95-103]

tos, que se utilizan como método indirecto para la valoración bioquímica de la producción de esa molécula en extractos de tejidos o en suero^{25,26}.

El óxido nítrico se forma a partir de L-arginina por la actividad enzimática de la sintasa del óxido nítrico (NOS) con la obtención de L- citrulina como co-producto. Gracias a experimentos de clonación molecular, se han identificado tres genes diferentes que codifican tres isoformas distintas de la NOS, la NOS I o NOS neuronal (nNOS), que se aisló primero en el cerebelo²⁷; la NOS II o inmunológica (iNOS)²⁸ y la NOS III, presente principalmente en los endotelios favoreciendo su relajación (eNOS)²⁹. Las tres isoformas se han identificado en tejidos distintos en los que originalmente fueron aislados y las tres se pueden expresar en el sistema nervioso central, aunque la nNOS es la mayoritaria en poblaciones específicas de neuronas y de glía³⁰⁻³².

La inhibición farmacológica de las NOS se ha empleado para conocer sus propiedades enzimáticas, aunque todavía con un uso terapéutico incipiente³³. La actividad catalítica de la sintasa del óxido nítrico se puede regular farmacológicamente con análogos del sustrato (L-arginina). Estos inhibidores presentan diferentes afinidades para las distintas isoformas de la enzima. Entre los más empleados experimentalmente encontramos: a) sin especificidad por ninguna isoforma: la N^ω-metil-L-arginina (L-NMA), la N^ω-nitro-L-arginina (L-NNA), el metil éster de N^ω-nitro-L-arginina (L-NAME)³⁴⁻³⁸; b) inhibidores selectivos de la iNOS: la L- N^ω-(1-iminoetil)-lisina y la aminoguanidina^{39,40}; c) inhibidores específicos de la nNOS: el 7-nitroindazol (7-NI), el compuesto ARL17477 o la s-metil-isotioureido-L-norvalina⁴¹⁻⁴³.

La función del NO en sistemas biológicos debemos buscarla en sus dianas moleculares, muchas de ellas perfectamente caracterizadas, como la guanilato ciclasa soluble (para una revisión ver Yun et al.²²). La localización celular de los sistemas de producción del NO son también herramientas útiles para dilucidar funciones específicas. Hasta el momento no se dispone de una técnica apropiada para localizar *in situ* y con resolución histológica el propio NO, sin embargo, se puede deducir su lugar de producción por la localización de sus sintasas. Esto puede realizarse por medio de técnicas inmunohistoquímicas con anticuerpos específicos para cada una de las isoformas o empleando una reacción histoquímica, la NADPH-diaforasa, que tiñe los elementos positivos con una resolución tan fina que los resultados histológicos se asemejan a las clásicas tinciones de Golgi^{44,45}. Más aún, esta técnica puede darnos información cualitativa del grado de activación de la NOS⁴⁶⁻⁴⁸. La localización de los elementos productores de NO en el cerebro ha sido estudiada con detalle, y las células marcadas se distribuyen con patrones más o menos conservados a lo largo de la escala

filogenética³². Esta técnica no es aplicable en la preparación de tejidos de rutina en los laboratorios de Patología, pero sí se ha conseguido emplear con éxito en tejido nervioso humano normal y patológico en muestras post-mórtem⁴⁹⁻⁵¹.

ACCIÓN DEL ÓXIDO NÍTRICO EN EL CEREBRO

La primera noticia de que el NO actúa como un verdadero neurotransmisor NANC (no-adrenérgico no-colinérgico) tiene relación con el tracto gastrointestinal^{38,52}. También la nNOS se halla en altas concentraciones en procesos axonales del plexo pélvico, incluyendo los plexos y nervios cavernosos, demostrándose su acción directa sobre la erección del pene^{53,54}. Como hemos comentado, la eNOS está presente también en los vasos cerebrales, pero los axones que inervan la adventicia de estas estructuras dentro del tejido nervioso expresan también nNOS: la vasodilatación de las arterias cerebrales se controla de esta manera no sólo por el NO como factor derivado del endotelio⁵⁵, sino también por un mecanismo NANC^{56,57}, y es el responsable de la denominada “respuesta vascular evocada”⁵⁸. Aparte de numerosos mecanismos neuroendocrinos⁵⁹ y funciones autónomas^{60,61}, el NO está implicado directamente en ciertos comportamientos. Por ejemplo, la inhibición farmacológica de la NOS atenúa el consumo de alcohol y previene la adquisición de tolerancia a los efectos atáxicos del alcohol en un modelo experimental de ratas alcohólicas⁶². También este neurotransmisor está involucrado en ritmos circadianos⁶³ y en la ingesta en modelos de ratas obesas, esto último a través de un incremento del metabolismo de la serotonina⁶⁴. En ratones *knock-out* que carecen de la isoforma neuronal de la NOS, los machos exhiben un comportamiento sexual inapropiado, ya que carecen de inhibición y montan de manera indiscriminada a las hembras, además de luchar incesantemente cuando se encuentran juntos⁶⁵. Lo más importante es que en estos ratones no hay cambios en la morfología encefálica, tienen la misma concentración de testosterona en la sangre, y presentan una plasticidad sináptica normal en el hipocampo y el cerebelo⁶⁶⁻⁶⁸, lo que indica que el óxido nítrico está real y directamente involucrado en la agresión y el comportamiento sexual.

EL ÓXIDO NÍTRICO Y LA LIBERACIÓN DE OTROS NEUROTRANSMISORES

El NO influye en la liberación de otros neurotransmisores, presumiblemente a través de la activación de proteínas dependientes de GMPc, aumentando la fosforilación

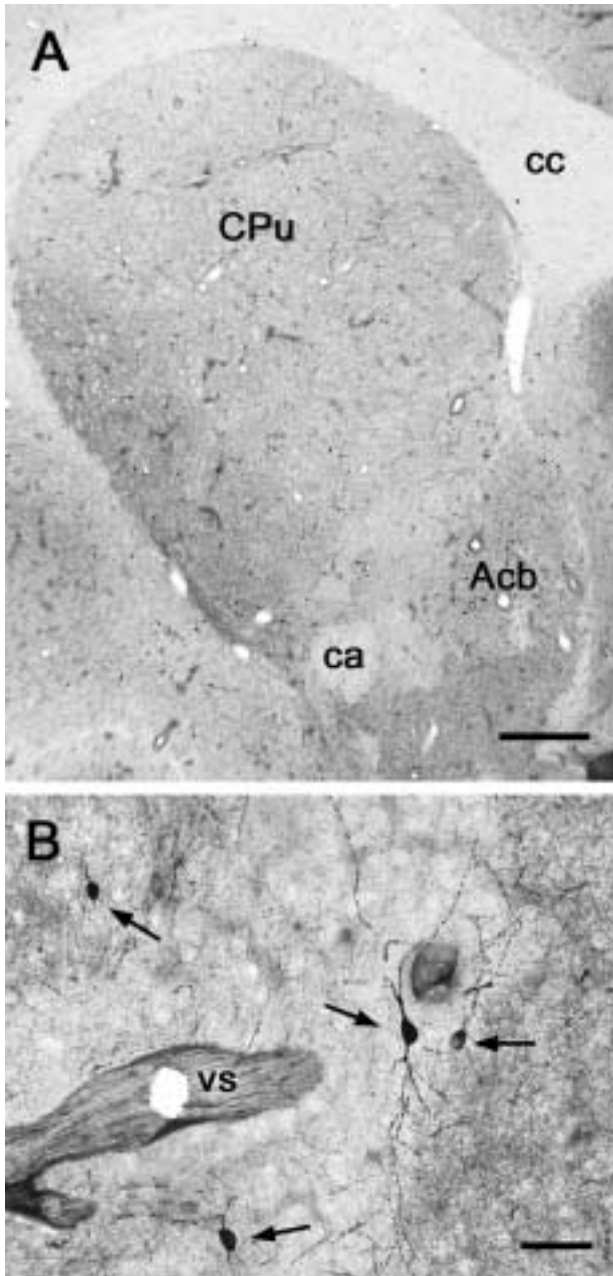


FIGURA 1. Secciones de encéfalo de rata teñidas con la técnica histoquímica para la NADPH-diaforasa. En la micrografía **A** podemos ver una panorámica de una sección coronal que contiene regiones en las que la producción de óxido nítrico se ve afectada tras un tratamiento crónico con nicotina: el estriado dorsal (caudado putamen, CPu) y ventral (núcleo acumbens, ACb). Para la orientación neuroanatómica señalamos el cuerpo calloso (cc) y la comisura anterior (ca). La micrografía **B** es un aumento en la región del núcleo acumbens. Las flechas indican neuronas marcadas con la técnica histoquímica, en las que se puede distinguir su arborización dendrítica, lo que permite su caracterización histológica y cuantificación. También se teñen con esta técnica otros elementos productores de óxido nítrico como los vasos sanguíneos (vs). Barras de escala = 500 μ m para A y 50 μ m para B.

de las proteínas de las vesículas sinápticas asociadas con la liberación del neurotransmisor^{22,69,70}. Lo más evidente es que el NO se encuentra en la cadena que liga la activación de los receptores para glutamato del tipo NMDA (N-metil-D-aspartato) a la liberación de neurotransmisor en la corteza cerebral o en el estriado^{71,72}. También se ve involucrado en la liberación de neuropéptidos desde el hipotálamo y la hipófisis⁷³, mediando la acción inhibitoria de la dopamina⁷⁴. Es un activador de la liberación del factor liberador de corticotropina^{75,76} y regula la liberación de acetilcolina⁷⁷⁻⁸⁰, de histamina⁸¹, de la hormona luteinizante^{82,83}, y de la hormona liberadora de la hormona luteinizante⁸⁴. Además de regular la liberación de ciertos neurotransmisores, también controla la recaptura del glutamato y de la dopamina⁸⁵⁻⁸⁷.

Las funciones que lleva a cabo el NO sintetizado por cada una de las isoformas se han visto mejor tipificadas con los últimos modelos de exclusión génica utilizando animales *knock-out* para cada una de las isoformas. En la Tabla I se puede ver un resumen de las funciones de cada una de las isoformas de la NOS²².

LA NICOTINA Y LA NEUROTRANSMISIÓN

La nicotina ejerce sus funciones en el sistema nervioso central regulando los flujos catiónicos a través de receptores nicotínicos para acetilcolina en neuronas que utilizan tanto acetilcolina, dopamina, norepinefrina, serotonina, glutamato o ácido gamma-amino butírico (GABA) como transmisores^{89,90}. Los receptores nicotínicos colinérgicos están presentes, pre- y post-sinápticamente, en regiones críticas para funciones cognitivas y de adicción, como la corteza prefrontal, el cuerpo estriado y el área tegmental ventral^{91,92}. Aunque está establecido que la activación de receptores nicotínicos puede dar lugar a una entrada de Na^+ en la célula, hay evidencias que apoyan la idea de que estos receptores colinérgicos específicos dan paso también a una entrada masiva de calcio extracelular⁹³. A través de este efecto, la droga también puede modificar algunos mecanismos subyacentes a estos receptores nicotínicos, incluyendo la regulación de la síntesis de NO⁹⁴. En la última década, algunas evidencias relacionan de manera intuitiva la acción de la nicotina y el óxido nítrico, según se resume en la Tabla II.

RELACIÓN ENTRE EL NO Y LA NICOTINA

En el sistema nervioso, la primera prueba de las interacciones entre la nicotina y la síntesis de NO se logró en el sistema periférico. En el sistema gastrointestinal, la nico-

	nNOS tipo I	iNOS tipo II	eNOS tipo III
Dependencia de Ca ²⁺	Dependiente	Independiente	Independiente
Principal tipo celular	Neuronas y glía	Macrófagos	Células endoteliales
Cromosoma (humano)	12q24.2	17cen-q12	7q35-36
Transcripción	Constitutiva Inducible en casos	Inducible Inducible en casos	Constitutiva
Fenotipos del ratón mutante <i>knock-out</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Estenosis pilórica • Resistente al infarto vascular • Resistente al MPTP* • Comportamientos agresivo y sexual excesivos • Plasticidad sináptica en el hipocampo y el cerebelo normales 	<ul style="list-style-type: none"> • Incrementa la susceptibilidad a la infección por <i>Listeria</i> y <i>Leishmania</i> • Incrementa la susceptibilidad a linfomas • Resistente a hipotensión por endotoxina y a la inflamación carrageniana 	<ul style="list-style-type: none"> • Deficiencias en la vasodilatación por acetilcolina • Presión arterial media elevada • Hipotensión inducida por el L-NAME
* MPTP es un contaminante y un análogo “callejero” del opioide meperidina (Demerol) que, una vez metabolizado, afecta como una toxina a las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra, causando algunos casos de enfermedad de Parkinson ⁸⁸ .			

TABLA I. Principales características de las tres isoformas de sintasa del óxido nítrico.

Nicotina	Óxido nítrico
<ul style="list-style-type: none"> • Aumenta la entrada de Ca²⁺ a la célula.⁹³ • Provoca liberación de glutamato.⁹⁴ • Relaja las arterias cerebrales.⁹⁵ • Aumenta el flujo sanguíneo cerebral.⁹⁶ • Facilita los procesos de memoria.⁹⁹ • Favorece procesos cognitivos.¹⁰⁰ • Es adictiva. • Provoca la liberación de dopamina en el núcleo acumbens.¹⁰² • Hay diferencias sexuales en sus receptores, y en sus acciones farmacológicas y de comportamiento.¹⁰⁴⁻¹⁰⁶ 	<ul style="list-style-type: none"> • Síntesis mediada por aumento del Ca²⁺ intracelular.³⁸ • En algunos casos, se libera por la actuación de receptores de glutamato.⁷² • Es el Factor Relajante Derivado del Endotelio.⁹⁷ • Causa vasodilatación.⁹⁸ • Está implicado en la memoria y el aprendizaje.¹⁰¹ • Está implicado en la dependencia a opiáceos y a cocaína.^{17,19} • Inhibe la recaptura y aumenta la liberación de dopamina.^{86,103} • Existen diferencias sexuales en el contenido de NO₂/NO₃⁻ en el cerebro.²⁶

TABLA II. Características coincidentes de la nicotina y del óxido nítrico.

tina hace liberar NO de nervios tipo NANC involucrados en la relajación del esfínter de Oddi, donde se ha podido probar la existencia de numerosas neuronas que sintetizan NO, ya que expresan la actividad histoquímica NADPH-diaforasa¹⁰⁷. En ratas que han sido expuestas crónicamente al humo de cigarrillos, no se ven afectados ni la respuesta eréctil ni los niveles proteicos de eNOS, pero la actividad enzimática general de la NOS –y por tanto la producción de NO– se encuentra bastante reducida; más aún, la nicotina disminuye substancialmente la isoforma neuronal de la NOS en esta situación¹⁰⁸.

En el sistema nervioso central, también se han demostrado interacciones entre el NO y la nicotina. Stevens *et*

*al.*¹⁰⁹ demostraron que la nicotina puede modular las afecciones inhibitorias al hipocampo de la rata a través del NO, donde se han demostrado la existencia de receptores colinérgicos del tipo de la bungarotoxina¹¹⁰. Más recientemente¹¹¹, se ha llegado a concluir que la puerta de entrada auditiva al hipocampo está efectivamente mediada por la liberación de NO, a través de la activación de los receptores colinérgicos del tipo $\alpha 7$.

Hay relativamente pocos estudios de comportamiento de la mediación del NO en los efectos de la nicotina. Por ejemplo, un tratamiento crónico con nicotina induce el temblor de la cola en la rata, que se atenúa cuando previamente inhibimos la NOS o cuando aplicamos MK-801 (bloque-

ante específico de los receptores NMDA), sugiriendo que en esta respuesta de comportamiento a la nicotina está implicada la formación de NO a través de receptores de glutamato del tipo NMDA. De manera paralela, se ha mostrado que el MK-801 causa un impedimento en la memoria de trabajo en las ratas, y que este bloqueo se ve atenuado por la nicotina⁹². En esta serie de experimentos que relacionan experimentalmente la nicotina con efectos comportamentales muy estandarizados, se encuentran estudios que prueban que la nicotina induce un progreso en el aprendizaje por evitación activa en las ratas, mejora que se bloquea cuando inhibimos previamente la NOS¹¹².

Las coincidencias reseñadas en la Tabla II y estos resultados exigían una comprobación experimental directa entre la droga y el neurotransmisor. Pögiun y colaboradores¹¹³ llegan a demostrar que una administración aguda (0,4 mg·kg⁻¹ s.c., una vez) o crónica (repetidamente durante al menos 15 días), incrementa los niveles de producción de NO en la corteza cerebral, el cerebelo, el hipocampo y el cuerpo estriado, medido por la concentración de sus metabolitos estables NO₂⁻/NO₃⁻ en extractos frescos de tejido. Además, se han podido probar diferencias en esta respuesta a la nicotina en relación no sólo al grado de estimulación o a la duración del tratamiento (agudo vs. crónico), sino también a las regiones cerebrales afectadas y al sexo.

Estos hallazgos nos hicieron proponer la hipótesis de que el tratamiento experimental crónico con nicotina (el de mayor semejanza a los fenómenos que inducen a la habituación a esta droga) no sólo aumentaría la expresión bioquímica de NO, sino que también modificaría a largo plazo la expresión histológica de la producción de este neurotransmisor. La técnica histoquímica de la NADPH-diaforasa, combinada con técnicas inmunohistoquímicas para la isoenzima nNOS, es capaz de poner en evidencia la localización *in situ* de las neuronas que producen el neurotransmisor. En experimentos diseñados con tal propósito, procesamos ratas de ambos sexos tratadas con nicotina durante 15 días, de manera que en un grupo se valoró bioquímicamente la producción de NOS mediante la medición de NO₂⁻/NO₃⁻, mientras que otro grupo se fijó debidamente para el procesamiento histológico, y se contabilizaron cuantitativamente las neuronas que producían NO en el núcleo acumbens, el caudado putamen y la corteza prefrontal¹¹⁴. Los animales tratados con nicotina mostraban niveles de NO₂⁻/NO₃⁻ significativamente más altos que los controles, y de una manera mucho más marcada las hembras en el núcleo acumbens. Sin embargo, el número de neuronas marcadas no presentaba cambios estadísticamente significativos en ninguna región, ni siquiera en las hembras. Estos resultados inducen a pensar que, en regiones del

encéfalo relacionadas con la adicción, el aumento de la producción de NO inducido por la nicotina no se lleva a cabo por el reclutamiento de nuevas neuronas para su sobreproducción o bien que la fuente de este aumento sea otra que la neuronal. El origen de este aumento de neurotransmisor puede deberse al menos a tres causas: i) La superproducción puede tener lugar en otros elementos neurales, como los astrocitos, en los que se ha podido detectar tanto la nNOS como la eNOS, pero cuya expresión histológica es de difícil demostración^{31,115}. Tampoco debemos olvidar que se han localizado receptores nicotínicos funcionales en astrocitos en cultivo^{117,118} y que la activación de los receptores de glutamato del tipo NMDA puede transferirse de neuronas a las células gliales adyacentes^{119,120}. ii) El incremento de la síntesis de NO puede ser realizado por las células endoteliales de los vasos sanguíneos cerebrales. Se ha comprobado que la nicotina incrementa la actividad enzimática de la eNOS más que la nNOS¹¹⁶, pero la cuantificación histológica de los elementos endoteliales también está lejos de ser estandarizada. iii) Es también posible que la nicotina produzca un aumento del NO por sobreactivación de las neuronas que normalmente lo producen, aunque hoy por hoy éste es un concepto difícil de traducir a parámetros histológicos cuantitativos.

CONCLUSIONES Y PROSPECTIVA

Las evidencias mostradas en esta revisión dejan claro que la nicotina ejerce parte de sus acciones en el cerebro mediante el NO, principalmente al aumentar su producción. De esta manera, además de los tratamientos existentes, la inhibición farmacológica de la NOS o la administración de compuestos que liberan NO se erigen como posibles estrategias terapéuticas contra el tabaquismo. Según lo expuesto, es necesario determinar primero cuáles son las isoformas de la enzima realmente implicadas, ya que, aunque existen inhibidores *inespecíficos* de distintas combinaciones de isoformas de NOS, sería más conveniente una actuación precisa sobre la isoforma o isoformas más moduladas por la nicotina (Tabla I). La inhibición específica de cada una de las isoformas por separado es posible, y será una herramienta experimental para determinar con exactitud la vía de actuación de la nicotina. Otros instrumentos de investigación los constituyen los animales transgénicos y *knock-out*, a los que se les ha eliminado cada uno de los genes que codifican para cada una de la isoformas de la NOS. Tanto los tests de comportamiento, como las medidas bioquímicas e histológicas de la producción de óxido nítrico modificados por la administración de nicotina se podrían reno-

var en estos modelos animales carentes de una sola de las fuentes de NO, con el fin de determinar con exactitud la isoforma (o isoformas) responsable de la ruta neuroquímica y los cambios tras la aplicación de nicotina.

Por último, debemos recordar que el estudio de la neurobiología de la adicción a la nicotina mediada por NO no hace más que abrir nuevas puertas a otros sistemas neurológicos, ya que el óxido nítrico no es el final de una ruta metabólica, sino un verdadero mensajero celular que se liga a otros sistemas, incluidos los de otros neurotransmisores y neuromoduladores. Los horizontes farmacológicos se amplían así, proporcionando posibilidades terapéuticas contra el tabaquismo que, aunque muy complejas, son esperanzadoras.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos la financiación del Plan Nacional Sobre Drogas del Ministerio del Interior, la Junta de Castilla y León, la Fundación “Memoria de D. Manuel Solórzano Barruso”, la DGES (PM99-0068), el FEDER-CICYT (1FD97-1325), y el Programa de Ayudas a la Investigación de la OTAN.

BIBLIOGRAFÍA

- MacKenzie TD, Batecchi CE, Schrier RW. The human costs of tobacco use. *N Engl J Med* 1994; 330: 975-980.
- Jiménez Ruiz CA. ¿Es el tabaquismo una enfermedad? *Med Trab* 2000; 9: 233-236.
- Carión Valero F. El tabaquismo, la principal enfermedad de los países desarrollados. *Prev Tab* 2001; 3: 31-34.
- Robinson JH, Pritchard WS. The role of nicotine in tobacco use. *Psychopharmacology* 1992; 108: 397-407.
- Schelling TC. Addictive drugs: the cigarette experience. *Science* 1992; 255: 430-433.
- Romero Palacios PJ. Adicción a la nicotina. Tendencias actuales en el tratamiento del tabaquismo. *Prev Tab* 2001; 3: 26-30.
- McNeill A, Foulds J, Bates C. Regulation of nicotine replacement therapies (NRT): a critique of current practice. *Addiction* 2001; 96: 1757-1768.
- Glover ED, Glover PN. Pharmacologic treatments for the nicotine dependent smoker. *Am J Health Behav* 2001; 25: 179-182.
- Fiore MC, Bailey WC, Cohen SC. Smoking cessation. Clinical practice guideline n. 18. Rockville, Md: Agency for Health Care Policy and Research AHCPA publication 1996; 96-0692.
- Schuh KJ, Schuh LM, Henningfield JE, Stitzer ML. Nicotine nasal spray and vapor inhaler: abuse liability assesment. *Psychopharmacology* 1997; 130: 352-361.
- Jorenby DE, Leischow SJ, Nides MA, Rennard SI, Johnston JA, Hughes AR et al. A controlled trial of sustained-release bupropion, a nicotine patch, or both for smoking cessation. *N Engl J Med* 1999; 340: 685-691.
- Benowitz NL, Jacob P. Individual differences in nicotine kinetics and metabolism in humans. *NIDA Res Monogr* 1997; 173: 48-64.
- Ahijevych K. Nicotine metabolism variability and nicotine addiction. *Nicotine Tob Res* 1999; 1 Suppl 2: S59-62.
- Shiffman S, Paton SM. Individual differences in smoking: gender and nicotine addiction. *Nicotine Tob Res* 1999; 1 Suppl 2: S153-157.
- Munafò M, Johnstone E, Murphy M, Walton R. New directions in the genetic mechanisms underlying nicotine addiction. *Addict Biol* 2001; 6: 109-117.
- Tyndale RF, Sellers EM. Genetic variation in CYP2A6-mediated nicotine metabolism alters smoking behavior. *Ther Drug Monit* 2002; 24: 163-171.
- Vaupel DB, Kimes AS, London ED. Nitric oxide synthase inhibitors. Preclinical studies of potential use for treatment of opioid withdrawal. *Neuropsychopharmacology* 1995; 13: 315-322.
- Vaupel DB, Kimes AS, London ED. Further in vivo studies on attenuating morphine withdrawal: isoform-selective nitric oxide synthase inhibitors differ in efficacy. *Eur J Pharmacol* 1997; 324: 11-20.
- Itzhak Y, Ali SF, Martin JL, Black MD, Huang PL. Resistance of neuronal nitric oxide synthase-deficient mice to cocaine-induced locomotor sensitization. *Psychopharmacology* 1998; 140: 378-386.
- Tayfun Uzbay I, Oglesby MW. Nitric oxide and substance dependence. *Neurosci Biobehav Rev* 2001; 25: 43-52.
- Lundberg JO, Farkas-Szallasi T, Weitzberg E, Rinder J, Lidholm J, Anggaard A et al. High nitric oxide production in human paranasal sinuses. *Nat Med* 1995; 1: 370-373.
- Yun H-Y, Dawson VL, Dawson TM. Neurobiology of nitric oxide. *Crit Rev Neurobiol* 1996; 10: 291-316.
- Lancaster JRJ. Simulation of the diffusion and reaction of endogenously produced nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 8137-8141.
- Butler AR, Flitney FW, Williams DL. NO, nitrosonium ions, nitroxide ions, nitrosothiols and iron-nitrosyls in biology: a chemist's perspective. *Trends Pharmacol Sci* 1995; 16: 18-22.
- Bories PN, Bories C. Nitrate determination in biological fluids by an enzymatic one-step assay with nitrate reductase. *Clin Chem* 1995; 41: 904-907.
- Taskiran D, Kutay FZ, Sozmen E, Pöğün S. Sex differences in nitrite/nitrate levels and antioxidant defence in rat brain. *Neuroreport* 1997; 8: 881-884.
- Bredt DS, Glatt CE, Hwang PM, Fotuhi M, Dawson TM, Snyder SH. Nitric oxide synthase protein and mRNA are discretely localized in neuronal populations of the mammalian CNS together with NADPH-diaphorase. *Neuron* 1991; 7: 615-624.
- Löwenstein CJ, Glatt CS, Bredt DS, Snyder SH. Cloned and expressed macrophage nitric oxide synthase contrasts with

- the brain enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 6711-6715.
29. Lamas S, Marsden PA, Li GK, Tempst P, Michel T. Endothelial nitric oxide synthase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 6348-6352.
 30. Vincent SR, Kimura H. Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. *Neuroscience* 1992; 46: 755-784.
 31. Kugler P, Drenckhahn D. Astrocytes and Bergmann glia as an important site of nitric oxide synthase I. *Glia* 1996; 16: 165-173.
 32. Alonso JR, Arévalo R, Weruaga E, Porteros A, Briñón JG, Aijón J. Comparative and developmental neuroanatomical aspects of the nitric oxide system. En: Steinbusch HWM, De Vente J, Vincent SR (eds.). *Functional Neuroanatomy of the Nitric Oxide System. Handbook of Chemical Neuroanatomy* (Björklund A, Hökfelt T, eds.). pp. 51-109. Amsterdam: Elsevier; 2000.
 33. Clinical Trials Data Source of the National Institutes of Health. <http://clinicaltrials.gov/ct/gui/>; febrero 2002.
 34. Gross SS, Stuehr DJ, Aisaka K, Jaffe EA, Levi R, Griffith OW. Macrophage and endothelial cell nitric oxide synthesis: cell-type selective inhibition by N^ω-aminoarginine, N^ω-nitroarginine and N^ω-methylarginine. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 170: 96-103.
 35. Knowles RG, Palacios M, Palmer RMJ, Moncada S. Kinetic characteristics of nitric oxide synthase from rat brain. *Biochem J* 1990; 269: 207-210.
 36. Rees DD, Palmer RMJ, Schulz R, Hodson HF, Moncada S. Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol* 1990; 101: 746-752.
 37. Lambert LE, Whitten JP, Baron BM, Cheng HC, Doherty NS, McDonald IA. Nitric oxide synthesis in the CNS, endothelium and macrophages differs in its sensitivity to inhibition by arginine analogues. *Life Sci* 1991; 48: 69-75.
 38. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 1993; 329: 2002-2012.
 39. Moore WM, Webber RK, Jerome GM, Tjoeng FS, Misko TP, Currie MG. L-N⁶-(1-Iminoethyl)lysine: a selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase. *J Med Chem* 1994; 37: 3886-3888.
 40. Iadecola C, Zhang F, Casey R, Clark HB, Ross ME. Inducible nitric oxide synthase gene expression in vascular cells after transient focal cerebral ischemia. *Stroke* 1996; 27: 1373-1380.
 41. Moore PK, Babbidge RC, Wallace P, Gaffen ZA, Hart SL. 7-Nitro indazole, an inhibitor of nitric oxide synthase, exhibits anti-nociceptive activity in the mouse without increasing blood pressure. *Br J Pharmacol* 1993; 108: 296-297.
 42. Nagafuji T, Sugiyama M, Muto A, Makino T, Miyauchi T, Nabata H. The neuroprotective effect of a potent and selective inhibitor of type I NOS (L-MIN) in a rat model of focal cerebral ischaemia. *Neuroreport* 1995; 6: 1541-1545.
 43. Zhang ZG, Reif D, MacDonald J, Tang WX, Kamp D, Gentile RJ et al. ARL 17477, a potent and selective neuronal NOS inhibitor decreases infarct volume after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 1996; 16: 599-604.
 44. Dawson TM, Brecht DS, Fotuhi M, Hwang PM, Snyder SH. Nitric oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 7797-7801.
 45. Alonso JR, Arévalo R, Briñón JG, García-Ojeda E, Porteros A, Aijón J. NADPH-diaphorase staining in the central nervous system. *Neurosci Prot* 1995; 050-04: 1-11.
 46. DellaCorte C, Kalinoski DL, Huque T, Wysocki L, Restrepo D. NADPH diaphorase staining suggests localization of nitric oxide synthase within mature vertebrate olfactory neurons. *Neuroscience* 1995; 66: 215-225.
 47. Morris BJ, Simpson CS, Mundell S, MacEachern K, Johnston HM, Nolan AM. Dynamic changes in NADPH-diaphorase staining reflect activity of nitric oxide synthase: evidence for a dopaminergic regulation of striatal nitric oxide release. *Neuropharmacology* 1997; 36: 1589-1599.
 48. Weruaga E, Briñón JG, Porteros A, Arévalo R, Aijón J, Alonso JR. Expression of neuronal nitric oxide synthase/NADPH-diaphorase during olfactory deafferentation and regeneration. *Eur J Neurosci* 2000; 12: 1177-1193.
 49. Hyman BT, Marzloff K, Wenniger JJ, Dawson TM, Brecht DS, Snyder SH. Relative sparing of nitric oxide synthase-containing neurons in the hippocampal formation in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 1992; 32: 818-820.
 50. Ferrante RJ, Kowall NW, Beal MF, Richardson EPJ, Bird ED, Martin JB. Selective sparing of a class of striatal neurons in Huntington's disease. *Science* 1985; 230: 561-563.
 51. Briñón JG, Crespo C, Weruaga E, Alonso J, Sobreviela T, Aijón J et al. NADPH-diaphorase/nitric oxide synthase-positive elements in the human olfactory bulb. *Neuroreport* 1998; 9: 3141-3146.
 52. Vanderwinden JM, Mailleux P, Schiffmann SN, Vanderhaeghen JJ, De Laet MH. Nitric oxide synthase activity in infantile hypertrophic pyloric stenosis. *N Engl J Med* 1992; 327: 511-515.
 53. Burnett AL, Löwenstein CJ, Brecht DS, Chang TSK, Snyder SH. Nitric oxide: a physiologic mediator of penile erection. *Science* 1992; 257: 401-403.
 54. Burnett AL, Chang AG, Crone JK, Huang PL, Sezen SE. Noncholinergic penile erection in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *J Androl* 2002; 23: 92-97.
 55. Huang PL, Huang Z, Mashimo H, Bloch KD, Moskowitz MA, Bevan JA et al. Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature* 1995; 377: 239-242.
 56. Faraci FM. Regulation of the cerebral circulation by endothelium. *Pharmacol Ther* 1992; 56: 1-22.
 57. Iadecola C. Regulation of the cerebral microcirculation during neural activity: is nitric oxide the missing link? *Trends Neurosci* 1993; 16: 206-214.
 58. Gally JA, Montague PR, Reeke GNJ, Edelman GM. The NO hypothesis: possible effects of a short-lived, rapidly diffusible signal in the development and function of the nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 3547-3551.
 59. Brecht DS, Hwang PM, Snyder SH. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature* 1990; 347: 768-770.

60. Kolesnikov YA, Pick CG, Ciszewska G, Pasternak GW. Blockade of tolerance to morphine but not to kappa opioids by a nitric oxide synthase inhibitor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 5162-5166.
61. Meller ST, Gebhart GF. Nitric oxide (NO) and nociceptive processing in the spinal cord. *Pain* 1993; 52: 127-136.
62. Rezvani AH, Grady DR, Peek AE, Pucilowski O. Inhibition of nitric oxide synthesis attenuates alcohol consumption in two strains of alcohol-preferring rats. *Pharmacol Biochem Behav* 1995; 50: 265-270.
63. Ding JM, Chen D, Weber ET, Faiman LE, Rea MA, Gillette MU. Resetting the biological clock: mediation of nocturnal circadian shifts by glutamate and NO. *Science* 1994; 266: 1713-1717.
64. Squadrito F, Calapai G, Altavilla D, Cucinotta D, Zingarelli B, Arcoraci V, et al. Central serotonergic system involvement in the anorexia induced by N^o-nitro-L-arginine, an inhibitor of nitric oxide synthase. *Eur J Pharmacol* 1994; 255: 51-55.
65. Nelson RJ, Demas GE, Huang PL, Fishman MC, Dawson VL, Dawson TM et al. Behavioural abnormalities in male mice lacking neuronal nitric oxide synthase. *Nature* 1995; 378: 383-386.
66. Huang PL, Dawson TM, Brecht DS, Snyder SH, Fishman MC. Targeted disruption of the neuronal nitric oxide synthase gene. *Cell* 1993; 75: 1273-1286.
67. O'Dell TJ, Huang PL, Dawson TM, Dinerman JL, Snyder SH, Kandel ER et al. Endothelial NOS and the blockade of LTP by NOS inhibitors in mice lacking neuronal NOS. *Science* 1994; 265: 542-546.
68. Linden DJ, Dawson TM, Dawson VL. An evaluation of the nitric oxide/cGMP/cGMP-dependent protein kinase cascade in the induction of cerebellar long-term depression in culture. *J Neurosci* 1995; 15: 5098-5105.
69. Nei K, Matsuyama S, Shuntoh H, Tanaka C. NMDA receptor activation induces glutamate release through nitric oxide synthesis in guinea pig dentate gyrus. *Brain Res* 1996; 728: 105-110.
70. Bogdanov MB, Wurtman RJ. Possible involvement of nitric oxide in NMDA-induced glutamate release in the rat striatum: an in vivo microdialysis study. *Neurosci Lett* 1997; 221:197-201.
71. Hirsch DB, Steiner JP, Dawson TM, Mammen A, Hayek E, Snyder SH. Neurotransmitter release regulated by nitric oxide in PC-12 cells and brain synaptosomes. *Curr Biol* 1993; 3: 749-754.
72. Montague PR, Gancayco CD, Winn MJ, Marchase RB, Friedlander MJ. Role of NO production in NMDA receptor-mediated neurotransmitter release in cerebral cortex. *Science* 1994; 263: 973-977.
73. Seilicovich A, Duvilanski BH, Pisera D, Theas S, Gimeno M, Rettori V et al. Nitric oxide inhibits hypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone release by releasing gamma-aminobutyric acid. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 3421-3424.
74. Duvilanski BH, Zambruno C, Seilicovich A, Pisera D, Lasaga M, Díaz MC et al. Role of nitric oxide in control of prolactin release by the adenohypophysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 170-174.
75. Karanth S, Lyson K, McCann SM. Role of nitric oxide in interleukin 2-induced inwards currents in rat olfactory bulb neurons in cultured slices. *Neurosci Lett* 1993; 231: 167-170.
76. Siaud P, Mekaouche M, Ixart G, Balmefrezol M, Givalois L, Barbanel G et al. Assenmacher I. A subpopulation of corticotropin-releasing hormone neurosecretory cells in the paraventricular nucleus of the hypothalamus also contain NADPH-diaphorase. *Neurosci Lett* 1994; 170: 51-54.
77. Buxton IL, Cheek DJ, Eckman D, Westfall DP, Sanders KM, Keef KD. Nw-nitro-L-arginine methyl ester and other alkyl esters of arginine are muscarinic receptor antagonists. *Circ Res* 1993; 72: 387-395.
78. Guevara-Guzmán R, Emson PC, Kendrick KM. Modulation of in vivo striatal transmitter release by nitric oxide and cyclic GMP. *J Neurochem* 1994; 62: 807-810.
79. Prast H, Fischer HP, Prast M, Philippu A. In vivo modulation of histamine release by autoreceptors and muscarinic acetylcholine receptors in the rat anterior hypothalamus. *Naunyn-Schmiedeberg Arch Pharmacol* 1994; 350: 599-604.
80. Leonard TO, Lydic R. Nitric oxide synthase inhibition decreases pontine acetylcholine release. *Neuroreport* 1995; 6: 1525-1529.
81. Prast H, Lamberti C, Fischer H, Philippu A. Modulation of histamine release in the hypothalamus by nitric oxide. *Inflamm Res* 1997; 46: S41-42.
82. Okere CO, Higuchi T, Kaba H, Russell JA, Okutani F, Takahashi S, Murata T. Nitric oxide prolongs parturition and inhibits maternal behavior in rats. *Neuroreport* 1996; 7: 1695-1699.
83. Luckman SM, Huckett L, Bicknell RJ, Voisin DL, Herbison AE. Up-regulation of nitric oxide synthase messenger RNA in an integrated forebrain circuit involved in oxytocin secretion. *Neuroscience* 1997; 77: 37-48.
84. Rettori V, Canteros G, Renoso R, Gimeno M, McCann SM. Oxytocin stimulates the release of luteinizing hormone-releasing hormone from medial basal hypothalamic explants by releasing nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 2741-2744.
85. Pöğün S, Kuhar MJ. Regulation of neurotransmitter reuptake by nitric oxide. *Ann NY Acad Sci* 1994; 738: 305-315.
86. Pöğün S, Baumann MH, Kuhar MJ. Nitric oxide inhibits [³H]dopamine uptake. *Brain Res* 1994; 641: 83-91.
87. Pöğün S, Dawson V, Kuhar MJ. Nitric oxide inhibits 3H-glutamate transport in synaptosomes. *Synapse* 1994; 18: 21-26.
88. Schmidt N, Ferger B. Neurochemical findings in the MPTP model of Parkinson's disease. *J Neural Transm* 2001; 108: 1263-1282.
89. Kaiser S, Wonnacott S. Alpha-bungarotoxin-sensitive nicotinic receptors indirectly modulate [³H]dopamine release in rat striatal slices via glutamate release. *Mol Pharmacol* 2000; 58: 312-318.
90. Wonnacott S, Kaiser S, Mogg A, Soliakov L, Jones IW. Presynaptic nicotinic receptors modulating dopamine release in the rat striatum. *Eur J Pharmacol* 2000; 393: 51-58.
91. Levin ED. Nicotinic systems and cognitive function. *Psychopharmacology* 1992; 108: 417-431.
92. Levin ED, Simon BB. Nicotinic acetylcholine involvement in cognitive function in animals. *Psychopharmacology* 1998; 138: 217-230.
93. Rosecrans JA, Karan LD. Neurobehavioral mechanisms of nicotine action: role in the initiation and maintenance of tobacco dependence. *J Subst Abuse Treat* 1993; 10: 161-170.

94. Fedele E, Varnier G, Ansaldo MA, Raiteri M. Nicotine administration stimulates the in vivo N-methyl-D-aspartate receptor/nitric oxide/cyclic GMP pathway in rat hippocampus through glutamate release. *Br J Pharmacol* 1998; 125: 1042-1048.
95. Toda N. Nicotine-induced relaxation in isolated canine cerebral arteries. *J Pharmacol Exp Ther* 1975; 193: 376-384.
96. Uchida S, Kagitani F, Nakayama H, Sato A. Effect of stimulation of nicotinic cholinergic receptors on cortical cerebral blood flow and changes in the effect during aging in anesthetized rats. *Neurosci Lett* 1997; 228: 203-206.
97. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987; 327: 524-526.
98. Moncada S. Nitric oxide in the vasculature: physiology and pathophysiology. *Ann NY Acad Sci* 1997; 811: 60-67.
99. Warburton DM. Nicotine as a cognitive enhancer. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 1992; 16: 181-191.
100. Rezvani AH, Levin ED. Cognitive effects of nicotine. *Biol Psychiatry* 2001; 49: 258-267.
101. Böhme GA, Bon C, Stutzmann JM, Doble A, Blanchard JC. Possible involvement of nitric oxide in long-term potentiation. *Eur J Pharmacol* 1991; 199: 379-381.
102. Benwell ME, Balfour DJ. The effects of acute and repeated nicotine treatment on nucleus accumbens dopamine and locomotor activity. *Br J Pharmacol* 1992; 105: 849-856.
103. Hanbauer I, Wink D, Osawa Y, Edelman GM, Gally JA. Role of nitric oxide in NMDA-evoked release of [³H]-dopamine from striatal slices. *Neuroreport* 1992; 3: 409-412.
104. Koylu EO, Demirezen S, London ED, Pöğün S. Sex difference in up-regulation of nicotinic acetylcholine receptors in rat brain. *Life Sci* 1997; 61: PL185-190.
105. Yılmaz Ö, Kanit L, Okur BE, Pöğün S. Effects of nicotine on active avoidance learning in rats: sex differences. *Behav Pharmacol* 1997; 8: 253-260.
106. Kanit L, Stolerman IP, Chandler CJ, Saigusa T, Pöğün S. Influence of sex and female hormones on nicotine-induced changes in locomotor activity in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 1999; 62: 179-187.
107. Tanobe Y, Okamura T, Fujimura M, Toda N. Functional role and histological demonstration of nitric-oxide-mediated inhibitory nerves in dog sphincter of Oddi. *Neurogastroenterol Motil* 1995; 7: 219-227.
108. Xie Y, Garban H, Ng C, Rajfer J, González-Cadavid NF. Effect of long-term passive smoking on erectile function and penile nitric oxide synthase in the rat. *J Urol* 1997; 157: 1121-1126.
109. Stevens KE, Adams CE, David DJ, Gerhardt GA, Freedman R. Nitric oxide and nicotinic receptors: modulators of inhibitory gating in rat hippocampus. *Soc Neurosci Abs* 1997; 23: 669.
110. Adams CE, Stevens KE. Inhibition of nitric oxide synthase disrupts inhibitory gating of auditory responses in rat hippocampus. *J Pharmacol Exp Ther* 1998; 287: 760-765.
111. Adams CE, Stevens KE, Kem WR, Freedman R. Inhibition of nitric oxide synthase prevents alpha7 nicotinic receptor-mediated restoration of inhibitory auditory gating in rat hippocampus. *Brain Res* 2000; 877: 235-244.
112. Yılmaz Ö, Kanit L, Okur BE, London ED, Pöğün S. Nitric oxide synthetase inhibition hinders facilitation of active avoidance learning by nicotine in rats. *Behav Pharmacol* 2000; 11: 505-510.
113. Pöğün S, Demirezen S, Taskiran D, Kanit L, Yılmaz Ö, Koylu EO, et al. Nicotine modulates nitric oxide in rat brain. *Eur Neuropsychopharmacol* 2000; 10: 463-472.
114. Weruaga E, Balkan B, Koylu EO, Pöğün S, Alonso JR. Effects of chronic nicotine administration on nitric oxide synthase expression and activity in rat brain. *J Neurosci Res* 2002; 67: 689-697.
115. Wiencken AE, Casagrande VA. Endothelial nitric oxide synthetase (eNOS) in astrocytes: another source of nitric oxide in neocortex. *Glia* 1999; 26: 280-290.
116. Tonnessen BH, Severson SR, Hurt RD, Miller VM. Modulation of nitric-oxide synthase by nicotine. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 295: 601-606.
117. Hosli E, Ledergerber M, Kofler A, Hosli L. Evidence for the existence of galanin receptors on cultured astrocytes of rat CNS: colocalization with cholinergic receptors. *J Chem Neuroanat* 1997; 13: 95-103.
118. Hosli E, Ruhl W, Hosli L. Histochemical and electrophysiological evidence for estrogen receptors on cultured astrocytes: colocalization with cholinergic receptors. *Int J Dev Neurosci* 2000; 18: 101-111.
119. Pearce B. Glia as targets for neuroactive substances. *Ann NY Acad Sci* 1991; 633: 432-433.
120. Haydon PG. Neuroglial networks: neurons and glia talk to each other. *Curr Biol* 2000; 10: R712-714.