



**Tesina de grado Carrera de Ciencias Biológicas  
Facultad de Ciencias Exactas, Física y Naturales  
Universidad Nacional de Córdoba**

**Estudio del rol de los receptores AT<sub>1</sub> de Angiotensina II en la  
inflamación cerebral y alteraciones vasculares en un modelo  
animal de esquizofrenia**

**Tesinista**

Samanta ArmonelliFiedler

Firma:.....

**Director**

Dr. Gustavo Baiardi

Firma:.....

**Co-Directora**

Dra. Claudia Bregonzio

Firma:.....

**Instituto de Investigaciones Biológicas y Tecnológicas Facultad de Ciencias Exáctas Físicas y  
Naturales Universidad Nacional de Córdoba IIBYT-CONICET  
Dpto. de Farmacología, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba  
IFEC-CONICET**

**Córdoba, Argentina.**

**Año: 2018**

**Estudio del rol de los receptores AT<sub>1</sub> de Angiotensina II en la inflamación cerebral y alteraciones vasculares en un modelo animal de esquizofrenia**

**Tribunal examinador:**

Dra. María Angélica Rivarola

Firma:.....

Dra. Nancy A. Salvatierra

Firma:.....

Dr. Franco Nicolás Nazar

Firma:.....

Calificación:.....

Fecha:.....

## INDICE

<b>INDICE</b> .....	3
RESUMEN.....	4
INTRODUCCIÓN.....	5
La esquizofrenia: conceptos generales y epidemiología.....	5
Hipótesis dopaminérgica .....	5
Modelo animal de esquizofrenia: sensibilización a amfetamina.....	6
Sustrato neuroanatómico y fisiológico .....	8
Núcleo accumbens septi.....	8
Corteza somatosensorial .....	9
Alteraciones vasculares, neuroquímicas e inflamatorias .....	9
Sistema renina angiotensina .....	11
Hipótesis.....	14
Objetivo general.....	14
Objetivos específicos .....	14
Materiales y métodos.....	14
Animales .....	14
Drogas, dosis y vías de administración .....	14
Diseño experimental.....	15
Obtención de las muestras.....	15
Inmunohistoquímica .....	16
Anticuerpos para la Inmunomarcación de astroglia, microglia y microvasculatura .....	16
Obtención y digitalización de las imágenes .....	17
Análisis estadístico.....	18
RESULTADOS .....	18
Astroglia y microglia en el núcleo accumbens septi.....	18
Astroglia en la corteza somatosensorial de barril y troncal .....	18
Microglia en la corteza somatosensorial de barril y troncal.....	21
Estructura microvascular en la corteza somatosensorial de barril y troncal .....	23
DISCUSIÓN.....	27
CONCLUSIÓN.....	29
BIBLIOGRAFÍA.....	31

## RESUMEN

La esquizofrenia es una enfermedad psiquiátrica severa que afecta a aproximadamente el 1% de la población mundial con un alto índice de refractariedad a los tratamientos disponibles (20 a 30%) y genera un gran impacto socioeconómico. Esta patología es multifactorial y está asociada a procesos neuroinflamatorios y alteraciones vasculares a lo largo del neurodesarrollo, afectando el sistema de neurotransmisión dopaminérgica. El modelo de sensibilización inducido por exposición repetida a anfetamina en roedores, permite recrear los síntomas positivos, algunos aspectos de los síntomas negativos y disfunciones cognitivas asociadas a la esquizofrenia. Dado el rol de la angiotensina II cerebral a través de sus receptores  $AT_1$  (R- $AT_1$ ) en la modulación de la neurotransmisión dopaminérgica, en la respuesta inflamatoria y en los cambios neurovasculares, nos propusimos estudiar el rol de estos receptores en la respuesta de las células gliales y en los cambios de la microvasculatura en un modelo animal de esquizofrenia por exposición repetida a anfetamina.

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar (250-320g), las que recibieron un antagonista de R- $AT_1$  candesartan (3 mg/kg vía oral, día 1 al 10), anfetamina (2,5 mg/kg i.p. día 6 al 10). El día 21 posterior a la última administración de anfetamina, los cerebros se perfundieron y se prepararon para determinar astrogliosis, microgliosis y alteraciones en la red vascular por inmunohistoquímica.

Nuestros resultados muestran que la administración repetida de anfetamina indujo cambios duraderos que involucraron alteraciones en astroglia y microglia en la corteza cerebral somatosensorial de barril y troncal, áreas involucradas en la percepción de estímulos sensoriales táctiles. En cuanto a la microvasculatura sólo se observaron cambios estructurales significativos en respuesta a la exposición al psicoestimulante, en la corteza somatosensorial de barril. Todas las alteraciones inducidas por anfetamina fueron prevenidas por el bloqueo de los R- $AT_1$ .

Sugerimos que la exposición a anfetamina genera una respuesta neuroinflamatoria de larga duración y procesos de angiogénesis en áreas cerebrales susceptibles, eventos que requieren de la activación de R- $AT_1$ .

## **INTRODUCCIÓN**

### **La esquizofrenia: conceptos generales y epidemiología**

Es una enfermedad psiquiátrica severa, que presenta actualmente un alto índice de refractariedad a los tratamientos clínicos (20 a 30%) y un gran impacto socioeconómico por la discapacidad, estigmatización, ansiedad y depresión asociada (1). De allí, la necesidad de comprender su fisiopatogenia, con el fin de desarrollar nuevas estrategias terapéuticas que permitan mejorar la calidad de vida de los pacientes.

Los estudios epidemiológicos realizados a nivel mundial, como en América Latina, muestran una prevalencia de aproximadamente el 1% de la población, afectando de igual manera a hombres y mujeres. En Argentina, durante el relevamiento realizado en el año 2011, el 22,4% del total de ingresos a hospitales por trastornos mentales y de comportamiento, correspondió a esquizofrenia, trastornos esquizotípicos y trastornos delirantes, constituyendo así el grupo de mayor incidencia (2).

El espectro clínico se puede dividir en síntomas positivos (delirios y alucinaciones), síntomas negativos (embotamiento afectivo, anhedonia, alogia, falta de interacción social y motivación), disfunciones cognitivas (déficit de atención, alteración en la memoria de trabajo y en la función ejecutiva) y déficit en la cognición social (imposibilidad de interpretar y comprender gestos, comportamientos, comunicación verbal y no verbal) (1, 3).

El diagnóstico según los criterios del DSM-V se basa en la aparición concomitante de al menos dos de los síntomas mencionados durante un periodo de al menos 6 meses.

Generalmente, la aparición del primer episodio psicótico ocurre en el adulto joven o en la adolescencia tardía, precedido de un periodo prodrómico de alto riesgo y difícil de detectar (1, 4).

Si bien, varios estudios muestran una predisposición genética debido a la heredabilidad asociada a esta patología, se considera que la misma se desencadena por múltiples factores, tanto genéticos como ambientales (3). La interacción de los mismos, conduce a un proceso dinámico de desequilibrio de diversos sistemas de neurotransmisión cuyo deterioro es crónico (1, 3).

La complejidad clínica ha dado lugar a la generación de distintas hipótesis sobre las causas y mecanismos relacionados tales como la adición o potenciación de grupos específicos de genes, alteraciones del neurodesarrollo, inmunológicas y neuroquímicas (dopaminérgicas, glutamatérgicas y GABAérgicas) (5, 6).

### **Hipótesis dopaminérgica**

Actualmente, es una de las hipótesis más ampliamente aceptada, y postula que los síntomas positivos ocurren como consecuencia de un exceso en la neurotransmisión dopaminérgica,

principalmente a nivel estriatal y mesolímbico, mientras que los síntomas negativos ocurrirían debido a una hipofunción de este neurotransmisor en la corteza prefrontal.

Su conocimiento y desarrollo ha surgido principalmente de la terapéutica farmacológica (5) dado que el desarrollo de los antipsicóticos que intervienen sobre receptores de dopamina  $D_2$  impulsó la investigación de los mecanismos neuroquímicos implicados en esta vía. Por esta razón, los antipsicóticos que actúan directa o indirectamente principalmente sobre los receptores  $D_2$  se denominan “típicos” o de primera generación, existiendo una correlación entre la afinidad de estos neurolépticos por los receptores  $D_2$  y la concentración de las dosis clínicamente eficiente (7), mientras que los antipsicóticos “atípicos” o de segunda generación, están representados por un grupo heterogéneo de fármacos que actúa sobre los receptores  $D_1$ ,  $D_2$  y  $D_3$  así como de combinaciones de antagonistas de receptores de serotonina/dopamina (DA). Actualmente son muy empleados porque el tratamiento crónico con estos antipsicóticos provoca una menor incidencia de efectos extrapiramidales indeseables (8, 9).

Evidencia adicional muestra que los agonistas indirectos de la DA (L-DOPA, cocaína y anfetamina) pueden inducir en individuos sanos psicosis cuando se la administra en dosis altas, mientras que con el empleo de dosis bajas, el episodio psicótico se manifiesta con la administración repetida. Además, se ha observado que dosis bajas de estos psicoestimulantes pueden provocar o exacerbar los síntomas psicóticos (10-12).

### **Modelo animal de esquizofrenia: sensibilización a anfetamina**

La D-anfetamina es un psicoestimulante que promueve el incremento de la liberación de monoaminas (DA, noradrenalina y serotonina) con mayor afinidad por los receptores de DA. El mecanismo es dependiente de la concentración. En bajas concentraciones, la anfetamina extracelular es intercambiada por DA citosólica mediante el transportador de dopamina (DAT). En altas concentraciones, difunde dentro de los terminales nerviosos e inhibe la actividad de la enzima monoamino oxidasa (MAO) generando acumulación intracelular de DA y posteriormente, se libera DA al espacio extracelular mediante transporte reverso mediado por el DAT (13, 14). A su vez, promueve la actividad de la enzima tirosina hidroxilasa (TH) que cataliza la síntesis de dihidroxifenilalanina (DOPA), que luego será transformada a dopamina y posteriormente a noradrenalina.

Estos procesos, conducen a que se incremente la concentración de DA en el espacio extracelular y por lo tanto, a una sobre-estimulación de sus receptores.

Los cambios fisiopatológicos pueden ser reproducidos en roedores por la administración crónica de anfetamina que induce sensibilización del comportamiento, expresándose como un

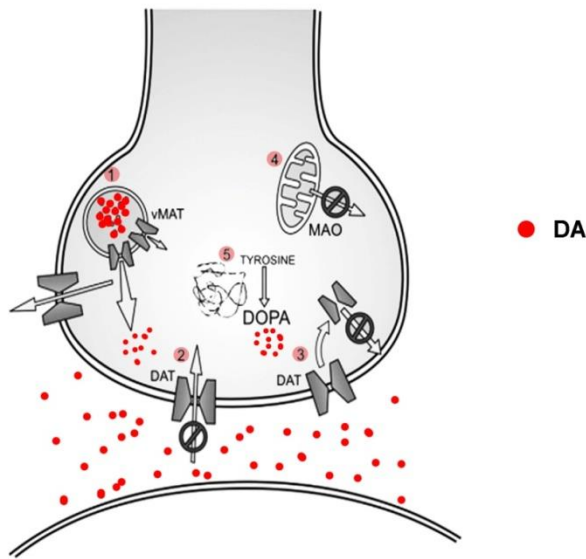
incremento de la actividad locomotora en respuesta a una segunda exposición a la anfetamina, estrés u otra droga de abuso (15, 16).

También se observa un deterioro en la percepción sensorial evidenciado por la alteración en la inhibición por pre-pulso (PPI) (17).

Este modelo de sensibilización, aunque se describió hace varios años, continúa vigente y presenta mecanismos comunes con el desarrollo de las psicosis en humanos (17-19). Reproduce fundamentalmente los síntomas positivos, observándose una exacerbación en la liberación de DA como consecuencia de cambios neuroadaptativos perdurables.

Además, reproduce algunos aspectos de los síntomas negativos y de las disfunciones cognitivas (20).

En concordancia con los efectos mencionados previamente, la anfetamina produce un daño neuronal e induce neurotoxicidad a través de la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS), así como de quinonas de dopamina, induciendo estrés oxidativo y desencadenando una respuesta inflamatoria que afecta a neuronas, microglia, astrogliá, células endoteliales y células progenitoras (21).



**Figura 1.** Mecanismo de acción de Anfetamina en la terminal dopaminérgica. Redistribución de monoaminas desde vesículas sinápticas al citosol (1), transporte inverso de neurotransmisores a través de transportadores de membrana plasmática. Además, bloquean la actividad de los transportadores de dopamina (DAT) (2) y disminuyen la expresión de transportadores de dopamina en la superficie celular (3). Las Anfetaminas pueden aumentar los niveles citosólicos de monoaminas al inhibir la actividad de la monoaminoxidasa (MAO) (4) y aumentar la actividad y la expresión de la tirosina hidroxilasa (5). DA: dopamina; VMAT: transportador vesicular de monoaminas; MAO: monoamino oxidasa; DAT: trasportador de dopamina. Imagen modificada (44).

## Sustrato neuroanatómico y fisiológico

### Núcleo accumbens septi

Este núcleo se halla dividido en una zona central (core) y una zona cortical (shell). Esta última, se encuentra relacionada con el sistema límbico, debido a que recibe un elevado número de aferencias glutamatérgicas desde el hipocampo y la amígdala centromedial y dopaminérgicas desde el área tegmental ventral.

De este modo, a la zona cortical se la vincula con las emociones. Además, también contiene importantes aferencias provenientes del lóbulo frontal, que se encargan de enviar la información recogida del tálamo a la zona central (core). Esta última, está conectada con los ganglios basales, la sustancia nigra y la corteza motora (22). Estas áreas cerebrales se activan en el momento de realizar acciones con un contenido emocional dirigidas a lograr una meta específica (23, 24).

Durante las actividades placenteras, tales como comer o durante las relaciones sexuales, se activan las neuronas dopaminérgicas (entre otras) en el área tegmental ventral.



Aunque, cabe destacar, que los niveles de DA se relacionan tanto con estímulos reforzantes como aversivos: aumentan como respuesta a estímulos reforzantes y descienden drásticamente con los aversivos (25). Por esta razón, este núcleo es un centro de integración clave en la esquizofrenia porque interviene en la integración fisiológica que involucra tanto a los síntomas negativos como a los positivos de la enfermedad (24).

### Corteza somatosensorial

Entre las áreas de corteza cerebral se encuentra el lóbulo parietal que aloja a la corteza somatosensorial primaria con función sensitiva. Recibe las aferencias sensitivas táctiles provenientes de todo el cuerpo, y las redirige hacia las áreas de asociación, como el sistema límbico, la corteza prefrontal y hacia la corteza motora. También, recibe aferencias nociceptivas de todo el organismo vía el núcleo lateral del tálamo.

Se divide en tipo 1 ( $S_1$ ) que participa en los procesos de discriminación del dolor, y la tipo 2 ( $S_2$ ) que participa en el reconocimiento, aprendizaje y memoria relacionada con el dolor.

Estas áreas, emiten aferencias dopaminérgicas hacia la corteza insular, lo que constituye la conexión entre las vías nociceptivas y el sistema límbico, permitiendo la discriminación de un estímulo doloroso del que no lo es y la asociación del componente afectivo que lo acompaña. La corteza de barril, como parte de la corteza somatosensorial primaria ( $S_1$ ), es una estructura de gran importancia en la percepción somestésica de la mayor parte de los roedores, ya que esta estructura recibe y procesa información procedente de las vibrisas, que constituyen el elemento sensorial táctil más especializado de los roedores.

Estudios previos en nuestro laboratorio mostraron evidencias de alteraciones vasculares y muerte neuronal en la corteza somatosensorial acompañado de alteraciones en la percepción de estímulos nociceptivos, siete días posteriores a la administración de amfetamina (26).

### **Alteraciones vasculares, neuroquímicas e inflamatorias**

En condiciones normales, el proceso inflamatorio cumple una función de protección frente a la exposición a agentes infecciosos, noxas químicas o traumas físicos, ayudando a la reparación del tejido dañado. Sin embargo, la respuesta inflamatoria puede ejercer una acción neuroprotectora o neurotóxica, como resultado de la interacción de un conjunto de mediadores neuroquímicos.

Estudios epidemiológicos, muestran que las infecciones severas y los desórdenes autoinmunes son factores de riesgo en esta patología, así como otras líneas de evidencia describen la coexpresión de altos niveles de citoquinas proinflamatorias en sangre y fluido cerebro espinal.

Desde la perspectiva del neurodesarrollo, se la ha asociado a una serie de factores predisponentes y/o causales que determinarían la expresión del cuadro clínico.

En las etapas iniciales de la vida, complicaciones durante el embarazo y nacimiento (anoxia, trauma o infecciones en la madre) estarían asociadas a la desregulación de procesos neuroinflamatorios y vasculares que generarían en el SNC las condiciones que favorecen la expresión de los episodios psicóticos (29), de esta manera, a la neuroinflamación se la estudia como un proceso complejo asociado a esta patología y a diversos trastornos neurodegenerativos tales como, la enfermedad de Parkinson, Alzheimer, Esclerosis múltiple y otras (30-32).

La vasculatura no solamente es el sitio de intercambio de oxígeno y nutrientes, además, es el centro de control del tono vascular y las respuestas inflamatorias (33, 34). En la unidad neurovascular, los astrocitos se ponen en contacto con las células del endotelio (principal tipo celular de los vasos parenquimales) mediante extensiones denominadas pies perivasculares.

Los cambios en la unidad neurovascular alteran la entrega de nutrientes y la remoción de metabolitos en las áreas activas provocando un desequilibrio en la regulación de mediadores vasoconstrictores tales como la endotelina-1, prostaglandinas, ROS y angiotensina II (Ang II) y vasodilatadores como el óxido nítrico.

En la respuesta inflamatoria derivada del endotelio, también se produce síntesis de moléculas de adhesión de membrana y la liberación de citoquinas atrayendo y guiando a las células inflamatorias circulantes hacia el sitio de la injuria.

En los componentes de la glía, la astrogliosis, cumple un rol fundamental en el mantenimiento de la homeostasis del SNC mediante la estrecha comunicación que existe entre astrocitos, neuronas y vasculatura (células endoteliales) a nivel espacial y temporal.

En condiciones fisiológicas, los astrocitos modulan la neurotransmisión glutamatérgica y gabaérgica, promueven la recaptación de glutamato potencialmente excitotóxico, regulan el tono vascular por liberación de mediadores vasoactivos, mantienen el suministro de energía y la homeostasis extracelular (35-39).

La reactividad astrocitaria o astrogliosis implica un cambio morfológico que involucra proteínas del citoesqueleto, como la proteína ácida fibrilar de glía (GFAP), la cual se ve aumentada tras la injuria del SNC y es empleada como indicador de este proceso (40).

Al igual que en otros casos, se observa sobreexpresión de especies reactivas del oxígeno (ROS) y citoquinas proinflamatorias acompañado por un incremento en el factor de crecimiento endotelial vascular 1 (VEGF-1) y glutamato en concentraciones excitotóxicas afectando al conjunto de células vecinas (41, 42).

La microglia, compuesta por macrófagos residentes del SNC, es uno de los principales componentes involucrados en el sistema inmune innato. Bajo condiciones fisiológicas, ejerce una función neuroprotectora, mientras que la activación o microgliosis, puede iniciar procesos neuroinflamatorios y exacerbar la degeneración celular mediante la liberación de productos citotóxicos tales como ROS, citoquinas proinflamatorias y proteasas (43). La microgliosis se acompaña de cambios estructurales que trascurren desde una morfología celular ramificada (en el estado latente) a una morfología ameboide (cuando está activada) y a la migración de las células hacia el sitio de la injuria (44).

Durante este proceso, se expresan también diferentes proteínas y marcadores de superficie, como el CD11b, cuya expresión aumentada se considera un marcador del incremento de las funciones fagocíticas y de mediadores pro-inflamatorios (45).

En relación con los antecedentes anteriormente expuestos, en la actualidad, se propone que la disfunción vascular cumple un rol preponderante en el desarrollo y la progresión de enfermedades crónicas y progresivas, tales como hipertensión, accidentes cerebro-vasculares, demencias por trastornos vasculares, diabetes mellitus, enfermedades neurodegenerativas, envejecimiento y en la patología objeto de nuestro estudio (46-51).

### **Sistema renina angiotensina**

Su principal péptido activo, la Angiotensina II (Ang II), fue descubierto y estudiado inicialmente por investigadores Argentinos y Norteamericanos en el año 1940 y descrito como una hormona periférica moduladora del sistema autónomo (52, 53). El sistema renina angiotensina (SRA) está involucrado en el control del sistema nervioso autónomo (54), de la presión arterial, regulación del flujo sanguíneo cerebral, fluidos corporales y balance mineral (55, 56) y a conductas relacionadas con la homeostasis osmorreguladora como la sed y la ingesta de sodio(57-60).

En el sistema nervioso central (SNC), se la estudia como un neuropéptido que es sintetizado localmente y se une principalmente a los receptores AT<sub>1</sub> (R-AT<sub>1</sub>) y AT<sub>2</sub> (R-AT<sub>2</sub>) conformando el sistema renina angiotensina cerebral. Los principales efectos descritos están mediados por los receptores AT<sub>1</sub>, los que se presentan con amplia distribución en el SNC de los mamíferos. Esta distribución, explica en parte, la multiplicidad de funciones en las que participa la Ang II en el SNC. Estas incluyen: el control autonómico y neuroendócrino de la presión arterial (61, 62), la respuesta a estrés (63-70) y a estímulos de recompensa, la modulación de procesos de memoria, aprendizaje, el control motor y las respuestas inflamatorias en la neurodegeneración (71-78). En este sentido, se conoce que el neuropéptido Ang II actúa como modulador de la neurotransmisión dopaminérgica,

glutamatérgica y gabaérgica entre otras a través de R-AT<sub>1</sub> (79-82). Siendo de destacar que cumple un rol clave en el inicio del proceso inflamatorio y remodelación tisular (83, 84).

Numerosos autores han propuesto la existencia de una estrecha relación entre la esquizofrenia, los procesos fisiopatológicos como la inflamación cerebral (31), los cambios vasculares asociados a angiogénesis durante el neurodesarrollo y la modulación del flujo sanguíneo cerebral (85).

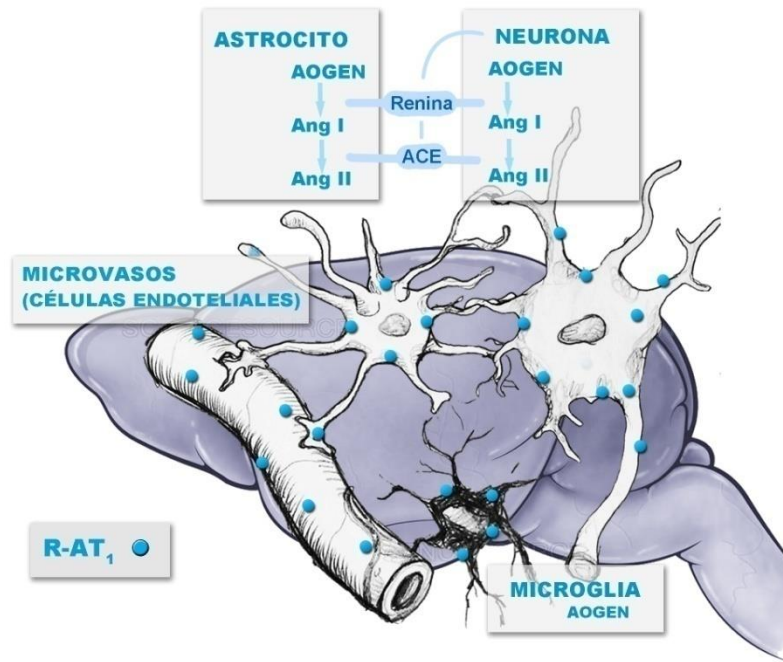
Nuestro grupo de trabajo ha mostrado que el bloqueo de los R-AT<sub>1</sub> previene el desarrollo de cambios duraderos inducidos por la administración de anfetamina en pruebas conductuales y neuroquímicas que involucran la activación del sistema dopaminérgico (86-88).

Además, hemos observado que la exposición a anfetamina induce cambios en los componentes del sistema renina angiotensina cerebral (aumento de la expresión de R-AT<sub>1</sub>) en el núcleo caudado, putamen y accumbens septi (89, 90) y alteraciones a nivel de áreas corticales asociadas al procesamiento de estímulos sensoriales empleando este modelo animal de esquizofrenia (26).

Se ha descrito que en condiciones basales, los R-AT<sub>1</sub> son sintetizados de manera activa por neuronas, astrocitos, microglía y células endoteliales. Mientras que, durante la respuesta inflamatoria su expresión aumenta en estos tipos celulares con la consecuente inducción de astrogliosis y microgliosis, acompañada de alteraciones funcionales de la microvasculatura cerebral y de estrés oxidativo neuronal (91-94).

Dado que se han descrito alteraciones en la regulación neurovascular e inflamación cerebral en ratas expuestas a anfetamina y sus derivados (21, 95-97), consideramos que la intervención farmacológica sobre los R-AT<sub>1</sub> de Ang II, permitiría un abordaje alternativo general de los desórdenes involucrados en la esquizofrenia, dado que estos receptores modulan la neurotransmisión dopaminérgica, participan en eventos inflamatorios y en la angiogénesis.

**Figura 2.** Esquema representativo de los tipos celulares (astrocitos, microglia, neuronas y células endoteliales) que expresan componentes del SRA. Receptores AT<sub>1</sub> (R-AT<sub>1</sub>), Angiotensinógeno (AOGEN), Angiotensina I (Ang I), Angiotensina II (Ang II), Enzima convertidora de Angiotensina (ECA).



**Figura 2.** Esquema representativo de los tipos celulares (astrocitos, microglia, neuronas y células endoteliales) que expresan componentes del SRA. Receptores AT<sub>1</sub> (R-AT<sub>1</sub>), Angiotensinógeno (AOGEN), Angiotensina I (Ang I), Angiotensina II (Ang II), Enzima convertidora de Angiotensina (ECA).

## **Hipótesis**

Los receptores AT<sub>1</sub> participan en los procesos inflamatorios y en las alteraciones de la vasculatura a nivel cerebral inducidas por la exposición repetida a anfetamina en un modelo animal de esquizofrenia.

## **Objetivo general**

Dado el rol de angiotensina II a través de sus receptores en la modulación de la neurotransmisión dopaminérgica, en la respuesta inflamatoria y en los cambios neurovasculares, se propone estudiar el rol de los receptores AT<sub>1</sub> en las alteraciones de relevancia en el estudio de la esquizofrenia relacionadas con la exposición repetida a anfetamina.

## **Objetivos específicos**

1. Analizar la participación de los receptores AT<sub>1</sub> en la reactividad astrogliar y microglial en el núcleo accumbens septi y corteza somatosensorial (de barril y troncal) inducidos por exposición repetida a anfetamina.
2. Evaluar el rol de los receptores AT<sub>1</sub> en los cambios en la estructura de la red vascular a nivel de corteza somatosensorial (de barril y troncal) inducidos por exposición repetida a anfetamina.

## **Materiales y métodos**

### **Animales**

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar con peso de 250 - 320 g. mantenidas bajo un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas (desde las 8:00 hasta las 20:00 horas) a 22 ± 1 °C con libre acceso a comida y agua. Los animales se asignaron al azar a los distintos grupos experimentales.

Todos los experimentos se realizaron de acuerdo a la reglamentación de la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de la Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina, Resolución 270/2018.

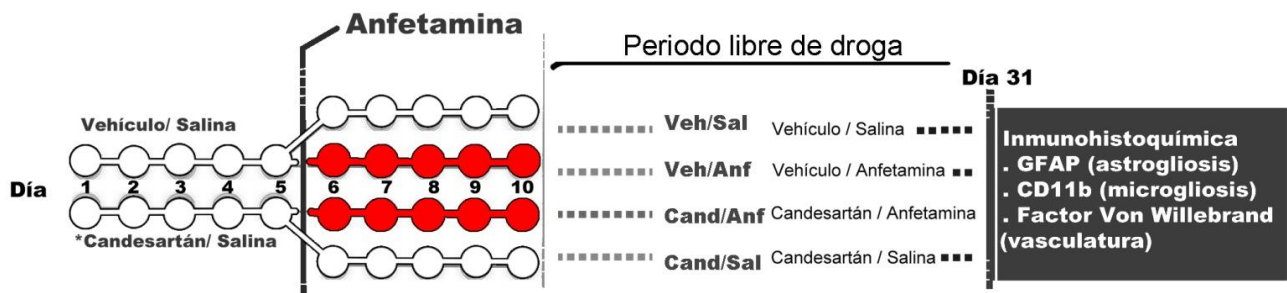
### **Drogas, dosis y vías de administración**

D-anfetamina Sigma Chemical (Anf), 2,5 mg/kg intra peritoneal (i.p).

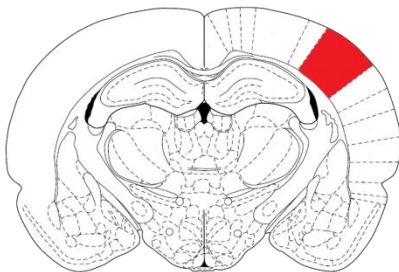
Candesartan cilexetil Phoenix (Cand) antagonista AT<sub>1</sub>. 3 mg/kg por vía oral.

## Diseño experimental

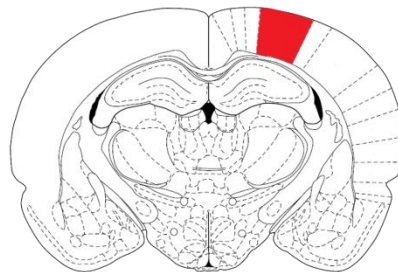
A



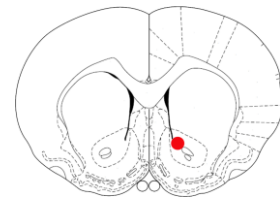
B



C



D



**Figura 3.** (A) Protocolo experimental para la evaluación de la participación de los receptores AT<sub>1</sub> de Angiotensina II. Los números indican los días en los cuales se desarrollaron los distintos tratamientos, desde el día 1 hasta el día 32, en el que se lleva a cabo la inmunohistoquímica, n=6-8. (B-D) Esquema de la sección coronal señalando la ubicación del área cerebral en estudio. (B) Corteza somatosensorial, área de barril (CxS1 Barril). (C) Corteza somatosensorial, área troncal (CxS1 Troncal. (D) Núcleo accumbens septi (NAcc).

## Obtención de las muestras

Luego de 3 semanas de la última inyección de anfetamina, los animales fueron anestesiados con hidrato de cloral (400 mg/kg i.p.) para ser perfundidos intracardiácamente.

Una vez anestesiados, se expuso la cavidad torácica y se obstruyó el flujo sanguíneo por la aorta descendente. Se perfundió inicialmente con 100 ml de solución salina (Na Cl 0,9%) adicionada con heparina 500 UI/ml, seguido por 200 ml de solución fijadora de paraformaldehído al 4% en buffer fosfato 0,1 M (pH 7,4).

Posteriormente, se extrajeron los cerebros y se conservaron en solución de sucrosa al 30% a 4°C hasta el momento del procedimiento inmunohistoquímico.

Los cerebros fueron retirados de la sucrosa, congelados con freón en aerosol y adheridos a un soporte con “Tissue-freezing-medium”. A los fines de estabilizar la temperatura en todo el tejido y el soporte, las muestras de cerebros permanecieron durante 20 minutos a -20°C, para luego obtener

secciones coronales mediante un criostato Leica CM. Se tomaron muestras de tejido a nivel de la corteza somatosensorial (bregma: -2.92a -3.24) y núcleo accumbens septi (bregma: 1.20 – 1.00) en secciones consecutivas de 20 µm de espesor para el objetivo 1 y de 40 µm de espesor para el objetivo 2.

### **Inmunohistoquímica**

En primer lugar, se llevó a cabo el bloqueo de la peroxidasa endógena incubando las secciones flotantes en una solución de 10% de metanol y 10% de agua oxigenada en agua destilada.

Luego de 2 horas, los cortes fueron lavados en tres intervalos de 5 minutos con buffer PBS 0,01 M. A continuación, se realizó el bloqueo de las uniones inespecíficas con suero normal de cabra (NGS) 10%. Posteriormente, se realizó la incubación de las secciones flotantes con el anticuerpo primario específico para cada objetivo planteado. La solución de incubación estuvo compuesta por: 2% de NGS y 0,3% de Tritón X-100 (Flucka Analytical) en buffer PBS 0,1 M. La marcación fue amplificada utilizando un anticuerpo secundario biotinilado en una solución con NGS 2%.

El revelado se llevó a cabo a través de la reacción del complejo avidina-biotina-peroxidasa (Vector laboratories Inc.) utilizando peróxido de hidrógeno como sustrato de la enzima y diaminobenzidina (3,3´ -diaminobenzidinetetrahydrochloride; Sigma Chemical Co.) como cromógeno.

La reacción se intensificó con solución de cloruro de cobalto 1% y de sulfato de níquel 1% que se agregaron al medio de revelado el cual contenía peróxido de hidrógeno. De este modo, las zonas marcadas adquirieron un color violeta oscuro.

Una vez finalizada la marcación, se realizaron 3 lavados de 5 min con buffer PBS 0,01 M. Las secciones fueron posteriormente montadas con gelatina de Albrecht (1,5% gelatina / 80% alcohol) en portaobjetos gelatinizados. Estos se dejaron secar a temperatura ambiente para luego ser deshidratados con xilol y cubiertos con un cubreobjetos usando como medio de montaje DPX (Flucka Analytical).

### **Anticuerpos para la Inmunomarcación de astroglia, microglia y microvasculatura**

Para la inmunomarcación de GFAP (astroglia reactiva) y CD11b (microglia reactiva) se utilizó una solución de anticuerpo primario monoclonal anti-GFAP o anti-CD11b obtenido de ratón (Sigma-Aldrich) en dilución 1:1000. Como anticuerpo secundario, se utilizó un anticuerpo biotinilado anti ratón obtenido de cabra (Jackson) en dilución 1:3000 para GFAP y en dilución 1:2000 para CD11b.

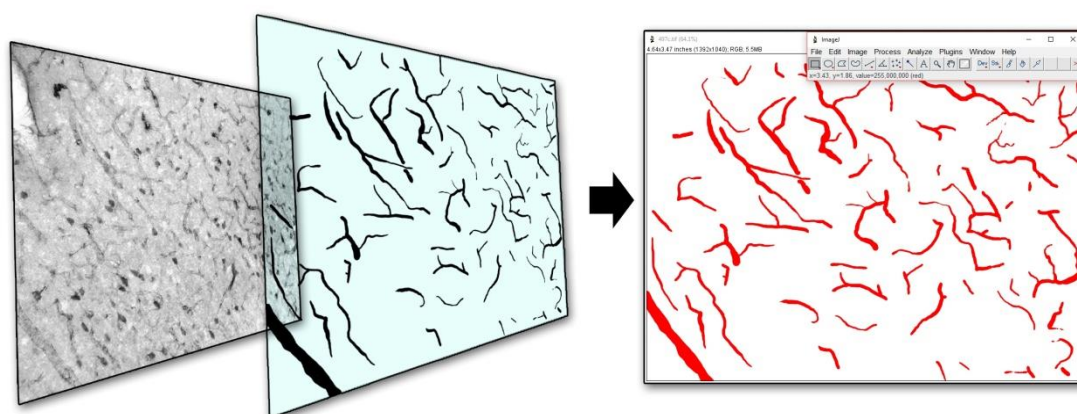


Para evaluar la estructura vascular, los cortes fueron expuestos al anticuerpo policlonal contra la glicoproteína endotelial factor de Von Willebrand obtenido en conejo (Dako), en dilución 1:200. Como anticuerpo secundario se usó el anti-conejo (Vector) en dilución 1:500.

### Obtención y digitalización de las imágenes

La visualización del tejido se llevó a cabo a través de un microscopio óptico Leica DM 4000B acoplado a una cámara digital Leica DFC que permitió capturar y digitalizar las imágenes. En todos los casos, se obtuvieron cuatro fotografías por muestra. Se tomaron dos láminas de cada área cerebral y en cada caso se fotografió ambos hemisferios.

Las imágenes obtenidas, se transfirieron a una capa de transparencia utilizando la tableta digitalizadora “Wacom intuos pen and touch medium”. Posteriormente, los microvasos se analizaron con el programa Image J.



**Figura 4.** Obtención de imágenes para análisis de vasculatura mediante el copiado de los microvasos sobre una capa de transparencia utilizando la tableta digitalizadora “Wacom intuos pen and touch médium” y posteriormente analizado en Image J.

Para el análisis de la astrogliya y microglia (objetivo 1), se usó una magnificación de 400x, lo que corresponde a un área de 0,09204 mm<sup>2</sup>. Se determinó el área ocupada por la astrogliya reactiva, es decir el área GFAP positiva. Se repitió el procedimiento para el área ocupada por microglia reactiva mediante el área CD11b positiva.

Para el análisis de la vasculatura (objetivo 2), se usó una magnificación de 200x, correspondiente a un área de 0,4332 mm<sup>2</sup>. Con el fin de evaluar los cambios en la estructura de la red vascular se analizaron cuatro parámetros. A) porcentaje de área ocupada por la vasculatura (área positiva para factor de Von Willebrand). B) número de ramificaciones (nº de ramificaciones/porcentaje de área). C) índice de tortuosidad de los vasos, tomando la longitud total

del vaso entre dos ramificaciones consecutivas sobre la longitud en línea recta entre dichos puntos de ramificación (varía de 1 a infinito). D) diámetro medio (mm) de los vasos.

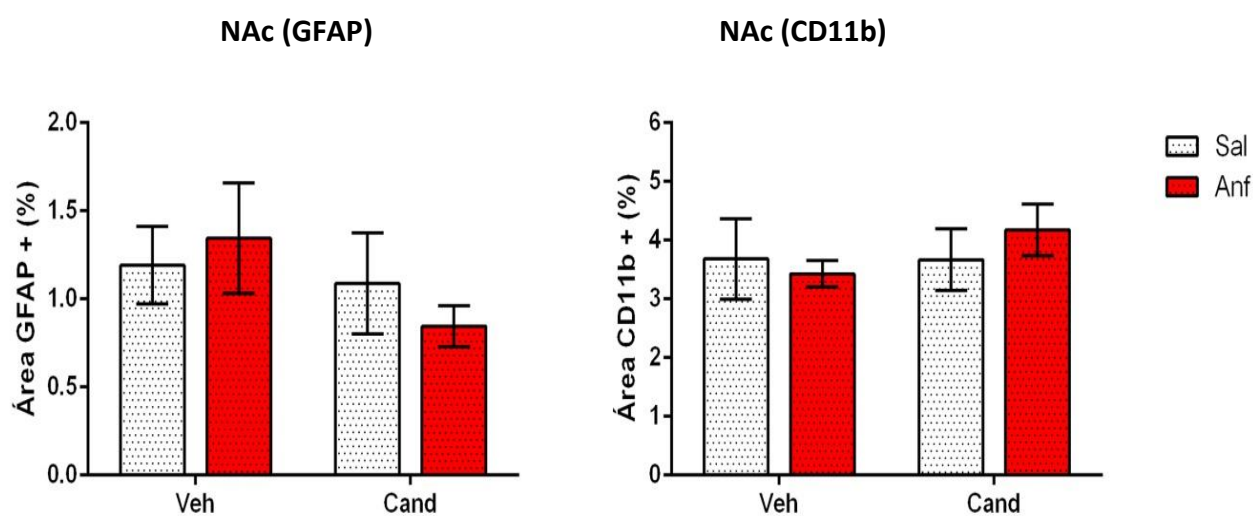
### Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron sometidos a pruebas de normalidad y analizados mediante análisis de varianza a dos vías (ANOVA II), seguido de la prueba de Bonferroni. Las fuentes de variación consideradas fueron: pretratamiento (Vehículo; Candesartan) y droga (Salina; Anfetamina). En todos los casos, los resultados se expresaron como la media  $\pm$  error estándar (ES) considerando un valor de  $P < 0,05$  estadísticamente significativo.

## RESULTADOS

### Astroglía y microglía en el núcleo accumbens septi

La administración repetida de anfetamina no produjo cambios adaptativos en el núcleo accumbens septi (NAcc) a nivel astrocitario y microglial (Figura 11).



**Figura 5.** Porcentaje de área GFAP positiva (NAcc GFAP) y porcentaje de área CD11b positiva (NAcc CD11b) en núcleo accumbens septi. La altura de las barras indican la media  $\pm$  error estándar.

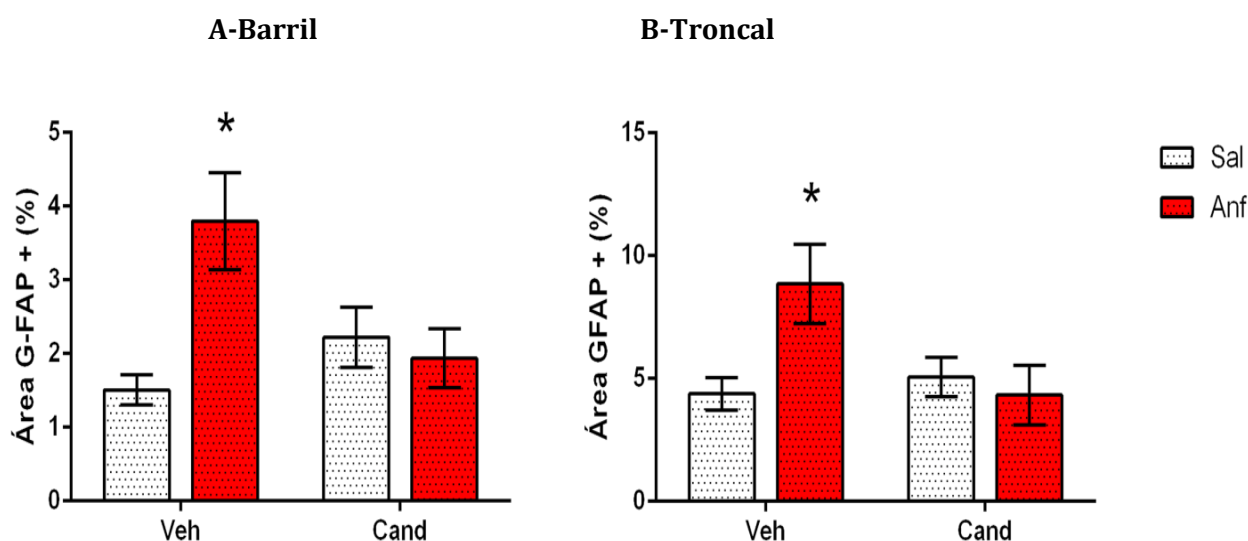
### Astroglía en la corteza somatosensorial de barril y troncal

El análisis de los datos en la corteza somatosensorial de barril mediante ANOVA II mostró diferencias significativas entre los tratamientos ( $F_{(1,27)} = 4.70$ ;  $P < 0,04$ ). Además, se encontró interacción significativa entre el pretratamiento (Vehículo; Candesartan) y droga (Salina; Anfetamina),  $F_{(1,27)} = 7.79$ ;  $P < 0.01$ ). La prueba de Bonferroni indicó que en el grupo Veh/Anf la

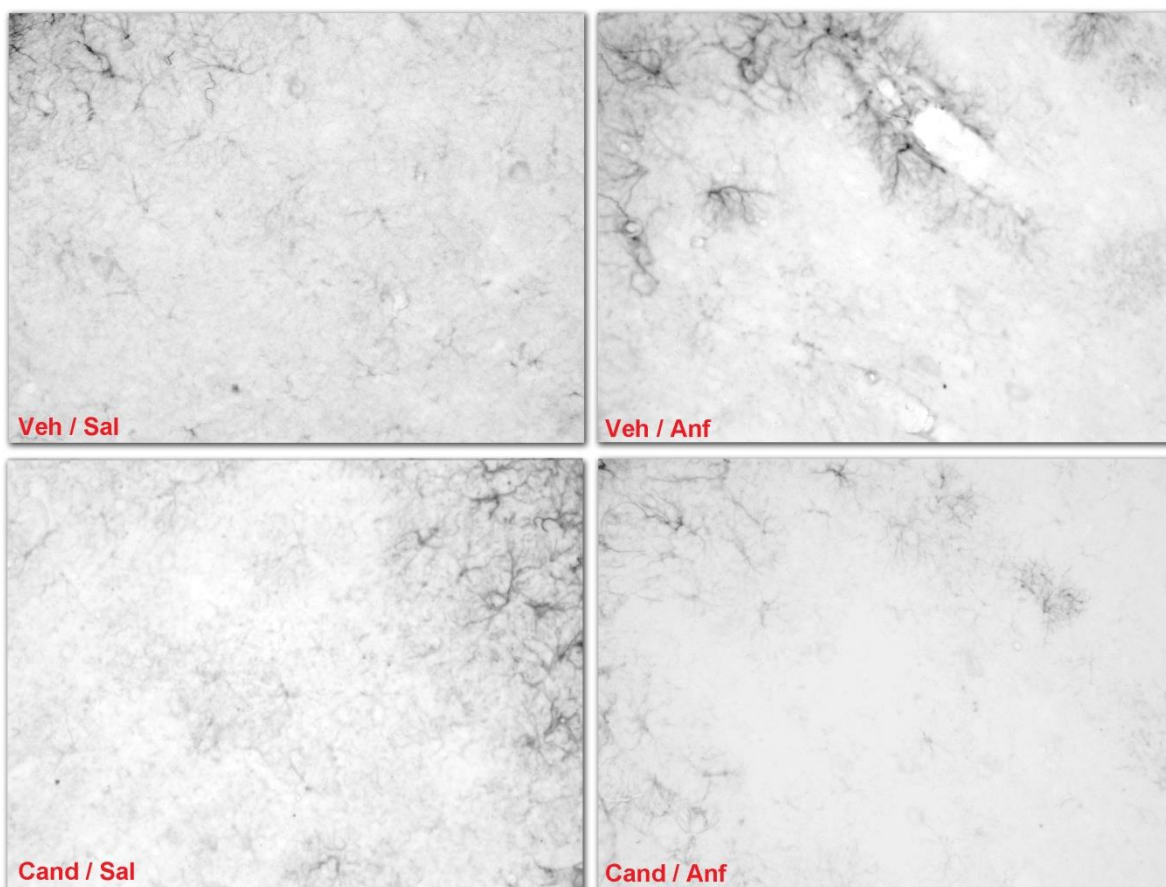
expresión de la astroglia expresada como porcentaje del área GFAP positiva es significativamente mayor con respecto a los controles (Veh/Sal y Cand/Sal) y a Cand/Anf ( $P < 0,05$ ), (Figura 6A).

Un patrón similar se obtuvo analizando los datos correspondientes a la corteza somatosensorial troncal en donde el ANOVA II mostró una interacción estadísticamente significativa entre ambos factores (pretratamiento x droga),  $F_{(1,27)} = 5.254$ ;  $P < 0,03$ . Con la prueba de Bonferroni, se evidenció un aumento significativo en la expresión de la astroglia con respecto a los grupos Veh/Sal y Veh/Anf,  $P < 0,02$  y entre los grupos Veh/Anf y Cand/Anf,  $P < 0,03$ . En los grupos control, no se hallaron diferencias entre sí ni con respecto a Cand/Anf (Figura 6B).

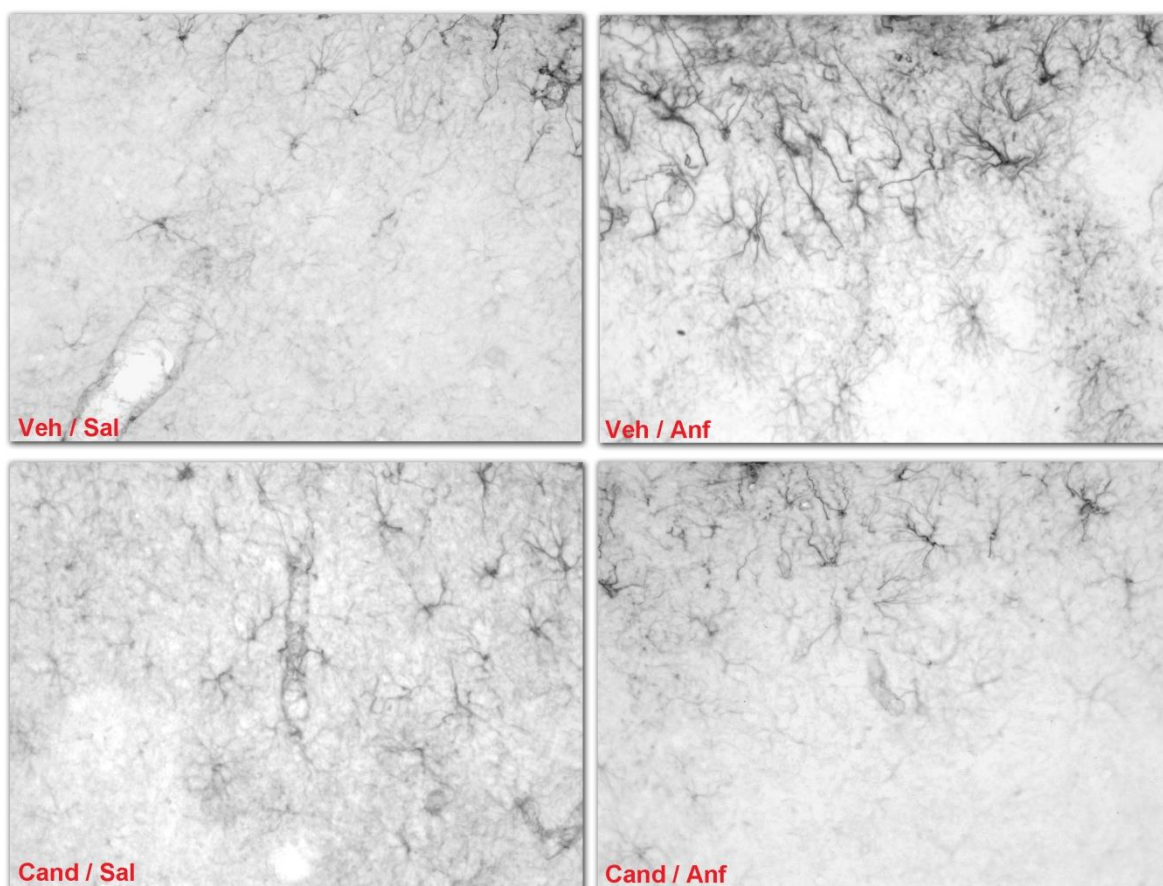
En conjunto, se evidencia que la exposición repetida a anfetamina indujo un incremento en la astroglia reactiva expresado como porcentaje de área GFAP positiva, en ambas cortezas sensoriales y que el bloqueo de receptores  $AT_1$  mediante el tratamiento con Candesartán previno dicho aumento (Figuras 6A y 6B).



**Figura 6.** Porcentaje de área GFAP positiva en corteza somatosensorial de barril (A) y troncal (B). \* Diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) con respecto a los otros grupos experimentales; Veh (vehículo); Cand (candesartan cilexetil); Sal (salina); Anf (anfetamina). Las alturas de las barras representa la media  $\pm$  ES;  $n=8$ .



**Figura 7:** Microfotografías representativas de inmunomarcación GFAP positiva en la corteza somatosensorial, área barril, obtenidas mediante microscopio óptico a 400x. Veh (vehículo); Cand (candesartan cilexetil); Sal (salina); Anf (anfetamina).



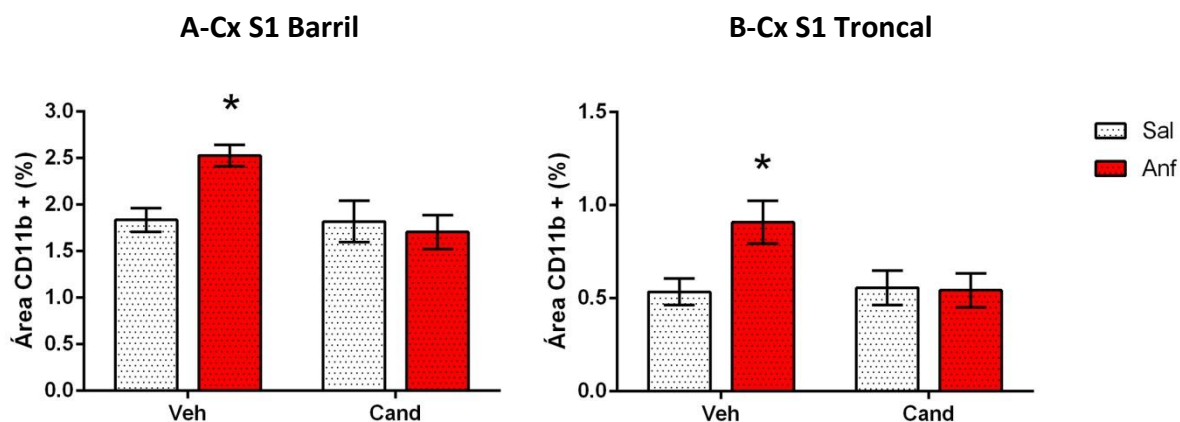
**Figura 8:** Inmunomarcación GFAP positiva en corteza somatosensorial, área troncal. Microfotografías obtenidas mediante microscopio óptico a 400x. Veh (vehículo); Cand (candesartan cilexetil); Sal (salina); Anf (anfetamina).

### Microglia en la corteza somatosensorial de barril y troncal

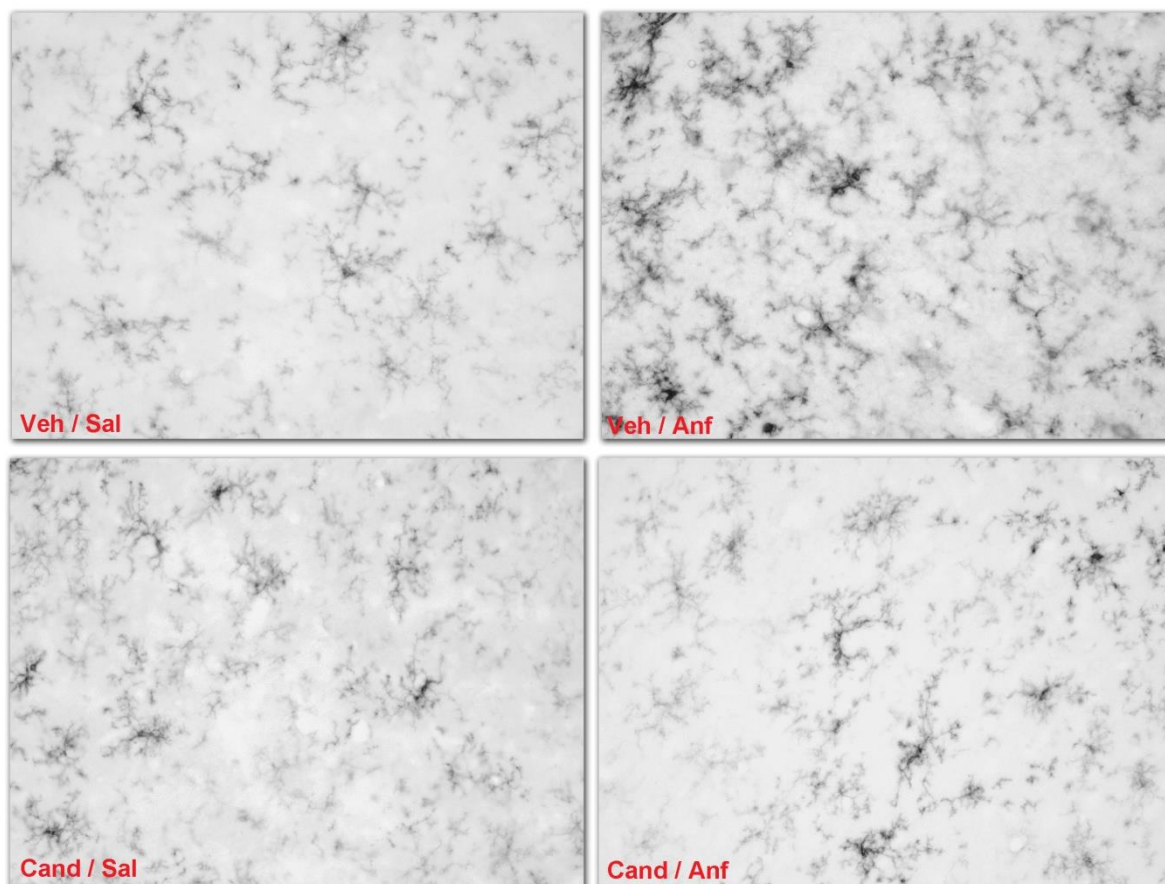
El análisis de la microglia en la corteza somatosensorial de barril mediante ANOVA II, reveló una interacción significativa, entre ambos factores (pretratamiento x droga).  $F_{(1,20)} = 5.739$ ;  $P < 0,03$ . Mediante la prueba de Bonferroni se determinó que el grupo Veh/Anf es significativamente diferente  $P < 0,05$  de los grupos Cand/Anf, Cand/Sal y Veh/Sal y a su vez, estos últimos no presentaron diferencias entre sí. En la corteza somatosensorial troncal se halló un patrón similar, encontrándose interacción significativa entre los factores (pretratamiento x droga) en el ANOVA II,  $F_{(1,26)} = 4.404$ ;  $P < 0,05$ . Con el uso del post test de Bonferroni se hallaron diferencias significativas entre los grupos Veh/Sal y Veh/Anf,  $P < 0,05$  y entre Veh/Anf y Cand/Anf,  $P < 0,05$ . Los grupos control no presentaron diferencias entre sí y tampoco cuando se compararon con respecto al grupo Cand/Anf.

En conjunto, se evidencia que en la corteza somatosensorial de barril y troncal el tratamiento con anfetamina incrementó la reactividad microglial evaluada como porcentaje del área CD11b positiva y

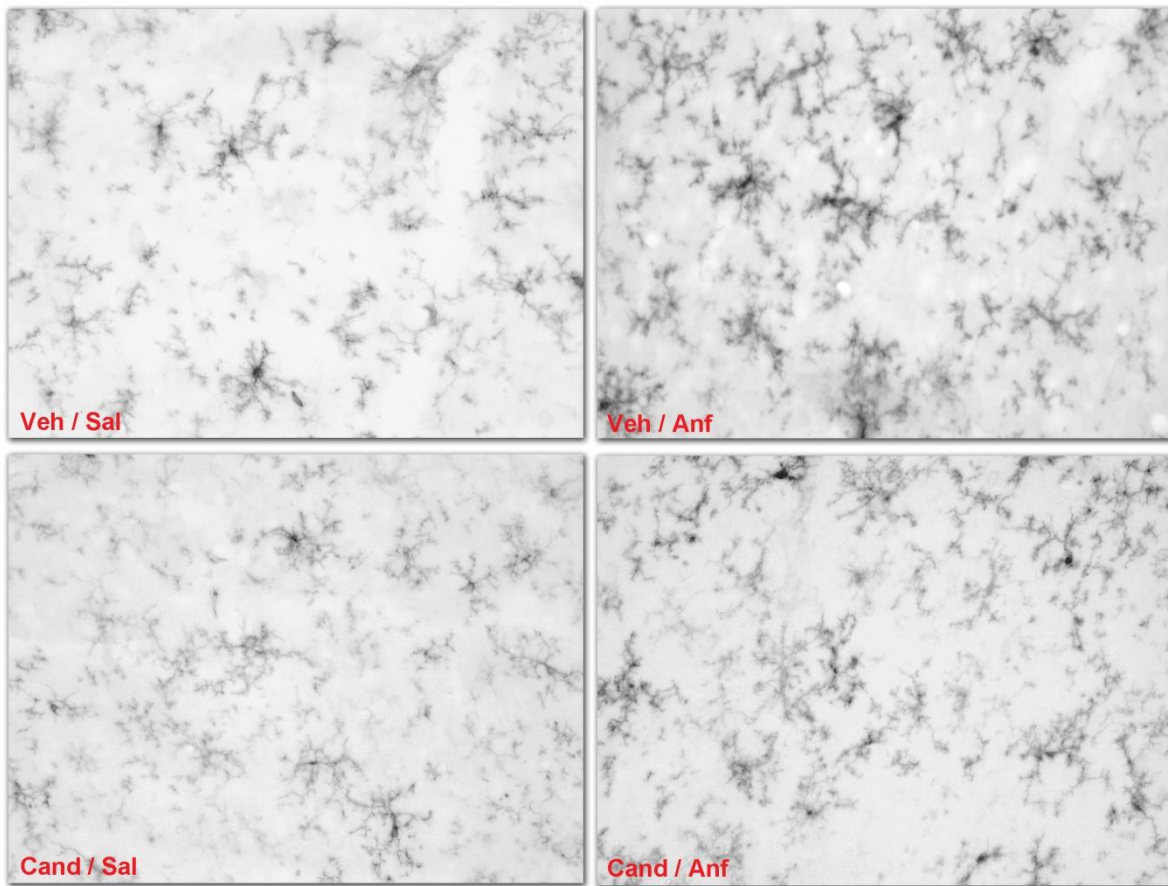
que éste efecto se previno por el tratamiento con el antagonista del receptor AT<sub>1</sub> candesartán, Figuras 9A y 9B.



**Figura 9.** Porcentaje de área CD11b positiva en corteza somatosensorial de barril (CxS1 barril) (A) y troncal (CxS1 troncal) (B). \*Diferencias significativas con respecto a los otros grupos experimentales  $P < 0,05$ , Veh (vehículo); Cand (candesartan cilexetil); Sal (salina); Anf (anfetamina). Las alturas de las barras representa la media  $\pm$  ES;  $n=8$ .



**Figura 10:** Inmunomarcación CD11b positiva en corteza somatosensorial, área barril. Inmunohistoquímica para CD11b. Microfotografías obtenidas mediante microscopio óptico a 400x. Veh (vehículo); Cand (candesartan cilexetil); Sal (salina); Anf (anfetamina).



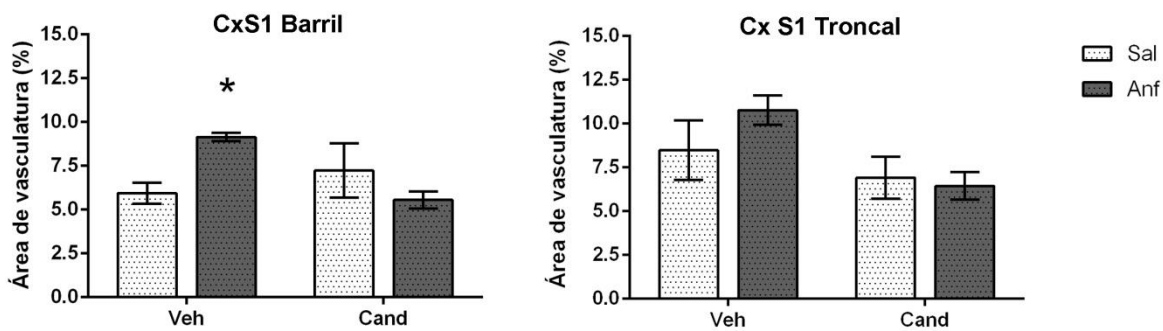
**Figura 11:** Inmunomarcación CD11b positiva en corteza somatosensorial, área troncal. Inmunohistoquímica para CD11b. Microfotografías obtenidas mediante microscopía óptica a 400x. Veh (vehículo); Cand (candesartan cilexetil); Sal (salina); Anf (anfetamina).

### **Estructura microvascular en la corteza somatosensorial de barril y troncal**

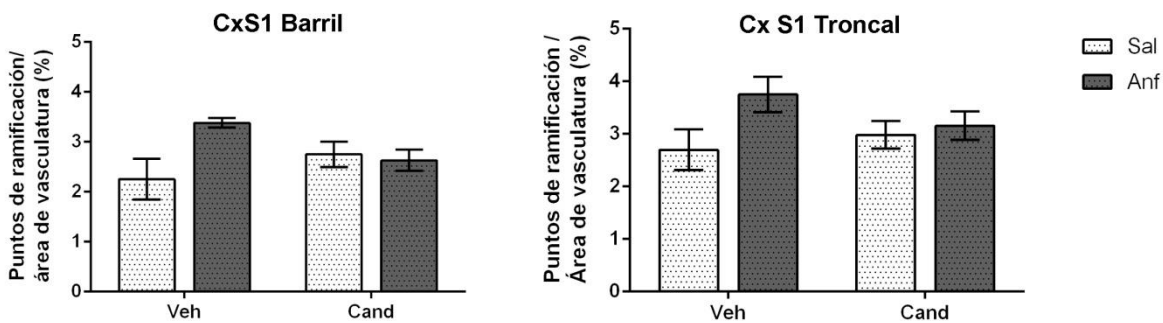
En el análisis de la estructura microvascular en la corteza somatosensorial de barril mediante ANOVA II, se encontró interacción estadísticamente significativa entre los factores (pretratamiento x droga),  $F_{(1,10)} = 9.401$ ;  $P < 0,02$ . Mediante el test Bonferroni se determinó que el grupo Veh/Anf fue significativamente diferente del grupo Cand/Anf.

La estructura de la red vascular sufrió modificaciones, destacándose que el tratamiento con amfetamina incrementó el área ocupada por la vasculatura en CxS1 de barril.

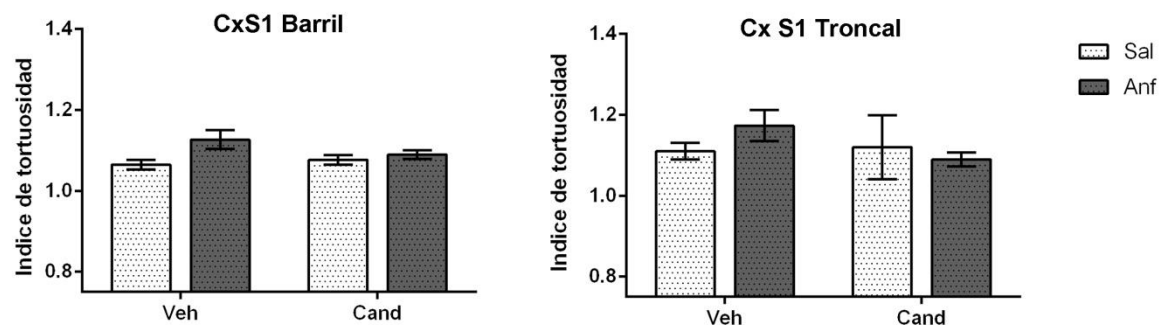
Los parámetros analizados de la estructura microvascular sufrieron cambios similares en CxS1 de barril y troncal: se produciría junto con el aumento del área vascular, un incremento de puntos de ramificación por área de vasculatura junto con una disminución del diámetro medio de vasculatura frente a la exposición a amfetamina (Figura 12-15).



**Figura 12:** Porcentaje de área ocupada por la vasculatura en corteza somatosensorial, área de barril (CxS1 Barril) y área troncal (CxS1 Troncal). \* Diferencia significativa con respecto a Cand/Anf,  $P < 0,05$ . Veh (vehículo); Cand (candesartan cilexetil); Sal (salina); Anf (anfetamina). La altura de las barras indica la media  $\pm$  error estándar.  $n=3-4$ .

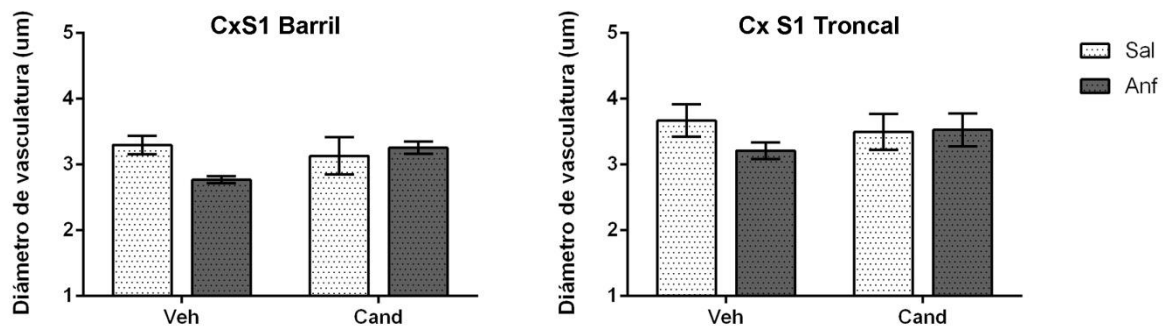


**Figura 13:** Número de ramificaciones de los vasos sanguíneos en relación al porcentaje de área ocupada por vasculatura en corteza somatosensorial, área de barril (CxS1 Barril) y área troncal (CxS1 Troncal). Veh (vehículo); Cand (candesartan cilexetil); Sal (salina); Anf (anfetamina). La altura de las barras indica la media  $\pm$  error estándar.  $n=3-4$ .

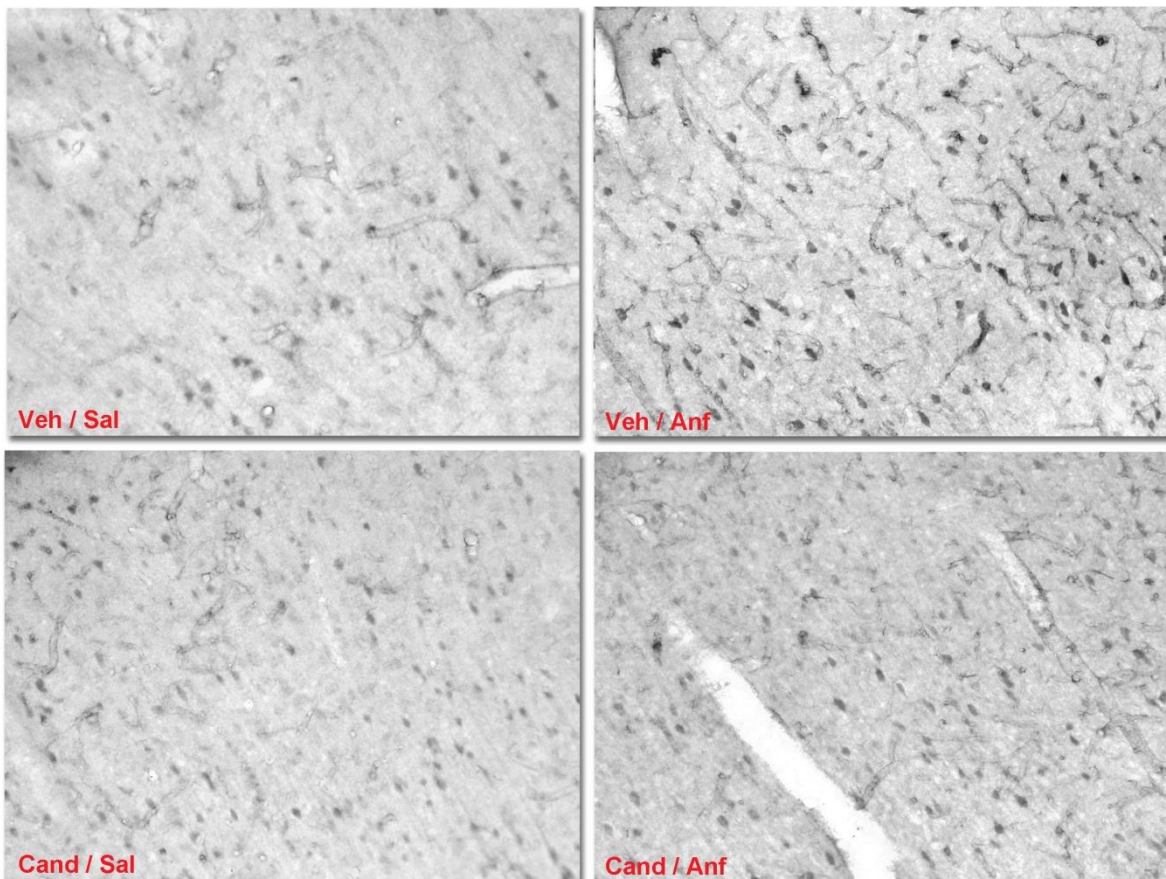


**Figura 14:** Índice de tortuosidad en corteza somatosensorial, área de barril (CxS1 Barril) y área troncal (CxS1 Troncal). Veh (vehículo); Cand (candesartan cilexetil); Sal (salina); Anf (anfetamina). La altura de las barras indica la media  $\pm$  error estándar.  $n=3-4$ .

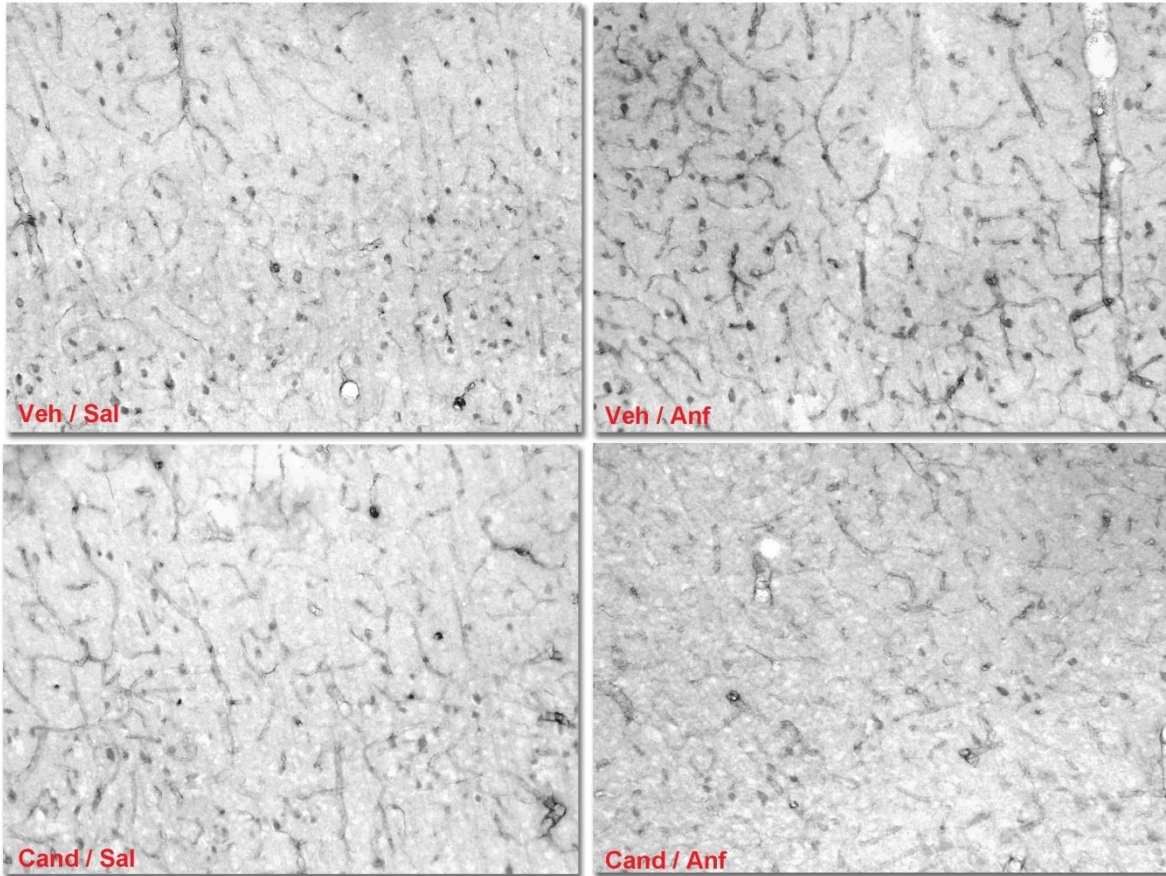




**Figura 15:** Diámetro medio de vasculatura ( $\mu\text{m}$ ) en corteza somatosensorial, área de barril (CxS1 Barril) y área troncal (CxS1 Troncal). Veh (vehículo); Cand (candesartan cilexetil); Sal (salina); Anf (anfetamina). La altura de las barras indica la media  $\pm$  error estándar.  $n=3-4$



**Figura 16:** Inmunomarcación del área ocupada por vasculatura en corteza somatosensorial de barril. Inmunohistoquímica para factor de Von Willebrand. Microfotografías obtenidas mediante microscopía óptica a 200x. Veh (vehículo); Cand (candesartan cilexetil); Sal (salina); Anf (anfetamina).



**Figura 17:** Inmunomarcación del área ocupada por vasculatura en corteza somatosensorial de barril. Inmunohistoquímica para Factor de Von Willebrand. Microfotografías obtenidas mediante microscopio óptico a 200x. Veh (vehículo); Cand (candesartan cilexetil); Sal (salina); Anf (anfetamina).

## DISCUSIÓN

En el presente trabajo se encontró que la exposición repetida a anfetamina induce astrogliosis, microgliosis y alteraciones en la arquitectura microvascular a nivel de la corteza somatosensorial. Los efectos neuroinflamatorios y las alteraciones vasculares se encontraron usando un protocolo de administración de anfetamina que induce sensibilización conductual y déficit cognitivo (a consecuencia de la neuroadaptación inducida por el psicoestimulante), y alteraciones conductuales que también involucran la participación de los R-AT<sub>1</sub> (Basmadjian et al, Forum FENS, 2018). La administración de anfetamina permitió recrear un escenario común a diversas enfermedades neurodegenerativas y en especial en la esquizofrenia (30-32).

Nuestros resultados mostraron que la administración repetida de anfetamina indujo cambios duraderos que involucraron alteraciones en la astroglia y microglia de la corteza cerebral somatosensorial de barril y troncal, áreas involucradas en la percepción de estímulos sensoriales táctiles. En cuanto a la microvasculatura, sólo se observaron cambios estructurales significativos en respuesta a la exposición al psicoestimulante en la corteza somatosensorial de barril. Todas las alteraciones inducidas por anfetamina en los parámetros estudiados, fueron prevenidas por el bloqueo de los R-AT<sub>1</sub>. En este sentido, el aumento en la expresión de GFAP (astrogliosis) puede deberse a hipertrofia (aumento en la cantidad de astrocitos que expresan GFAP) o incluso proliferación de los mismos según la gravedad de la injuria (98, 99). En nuestro caso, se cuantificaron los astrocitos que expresaron la proteína GFAP, metodología que nos permitió cuantificar la reactividad astrocitaria y no número total de astrocitos (reactivos y no reactivos). Se ha descrito que cuando la activación de la astroglia excede la capacidad neuroprotectora, cambia la expresión génica y comienza a secretar neurotransmisores (también precursores) y mediadores pro-inflamatorios (100). En estas condiciones, los astrocitos tienen la potencialidad de afectar la función neuronal a través de la regulación del flujo sanguíneo, la provisión de energía o la regulación de la actividad y la plasticidad sináptica (41), afectando en su totalidad funciones como homeostasis, entrega de nutrientes y remoción de metabolitos y contribuyendo así, al efecto deletéreo sobre las neuronas.

El incremento en la reactividad astrocitaria inducido por anfetamina en la corteza somatosensorial, está de acuerdo con resultados previos, donde la astrogliosis estuvo asociada a apoptosis neuronal y alteraciones en la percepción sensorial (26). Cabe destacar, que el proceso neuroinflamatorio inducido por este psicoestimulante es un evento de larga duración dado que los resultados de Occhieppo et al. fueron obtenidos una semana posterior a la administración de la anfetamina, mientras que en el presente trabajo, el análisis se realizó luego de tres semanas,

observándose además, microgliosis. Estos resultados están en concordancia con evidencias que muestran que la comunicación entre los mediadores pro-inflamatorios liberados por la astroglia reactiva y aquellos resultantes del estrés oxidativo en neuronas dopaminérgicas, llevarían a un estado inflamatorio que se mantendría en el tiempo (101-103).

En el modelo experimental usado, la administración del antagonista R-AT<sub>1</sub> previno la reactividad glial en la corteza somatosensorial de barril y troncal. Estos resultados concuerdan con las evidencias que muestran que la activación de R-AT<sub>1</sub> es mediadora del efecto proinflamatorio de la Ang II a nivel astrocitario. Es importante destacar, que los astrocitos son la principal fuente de angiotensinógeno y Ang II en el SNC y expresan en su superficie celular R-AT<sub>1</sub>. Se ha observado que por exposición a una injuria, este tipo celular incrementa la expresión de angiotensinógeno, tanto *in vivo* como *in vitro* (104), así como se evidencia que hay un aumento de la expresión de R-AT<sub>1</sub> en astrocitos asociado a eventos inflamatorios (91). A su vez, la activación de R-AT<sub>1</sub> puede tener un efecto indirecto sobre la reactividad astrocitaria, como consecuencia de su rol estimulador en la microglia (105, 106). De acuerdo con estas evidencias, en el presente trabajo, se observó que la exposición a la anfetamina produjo un incremento de la microglia reactiva en la corteza somatosensorial de barril y troncal. El antagonismo de los R-AT<sub>1</sub> previno la reactividad de la microglia por lo que evitaría sus efectos proinflamatorios.

Las evidencias señalan que las neurotoxinas producen un efecto directo sobre los astrocitos y que los efectos sobre la microglia serían indirectos, mediados por factores astrocíticos o neuronales. Por otro lado, se postula que en asociación con el incremento en la expresión de los R-AT<sub>1</sub> (descrito en células de la microglia frente a la injuria o daño neuronal), la Ang II es el principal factor pro-inflamatorio que activa a estas células (104).

Es importante resaltar, que la astrogliosis y microgliosis inducida por la anfetamina no se observó a nivel del núcleo accumbens septi, esto puede deberse a diferencias en la reactividad y vulnerabilidad de las distintas regiones cerebrales a la injuria mediada por el psicoestimulante. En este aspecto, las áreas corticales con gran inervación dopaminérgica son más vulnerables que las áreas subcorticales, debido a que por sus características histológicas se genera un microambiente particular que afecta a su microvasculatura. Esta particularidad explicaría la mayor susceptibilidad que también presentan estas áreas corticales frente a distintos estímulos nocivos (107).

En relación a la arquitectura de la red microvascular, se observó que la exposición a la anfetamina indujo un aumento en el área ocupada por la vasculatura a nivel de la corteza somatosensorial de barril, este resultado complementa lo observado por Occhieppo et al, a una semana posterior a la administración del psicoestimulante. Sin embargo, en el presente trabajo, realizado tres semanas posteriores, no se observaron cambios en la tortuosidad y número de

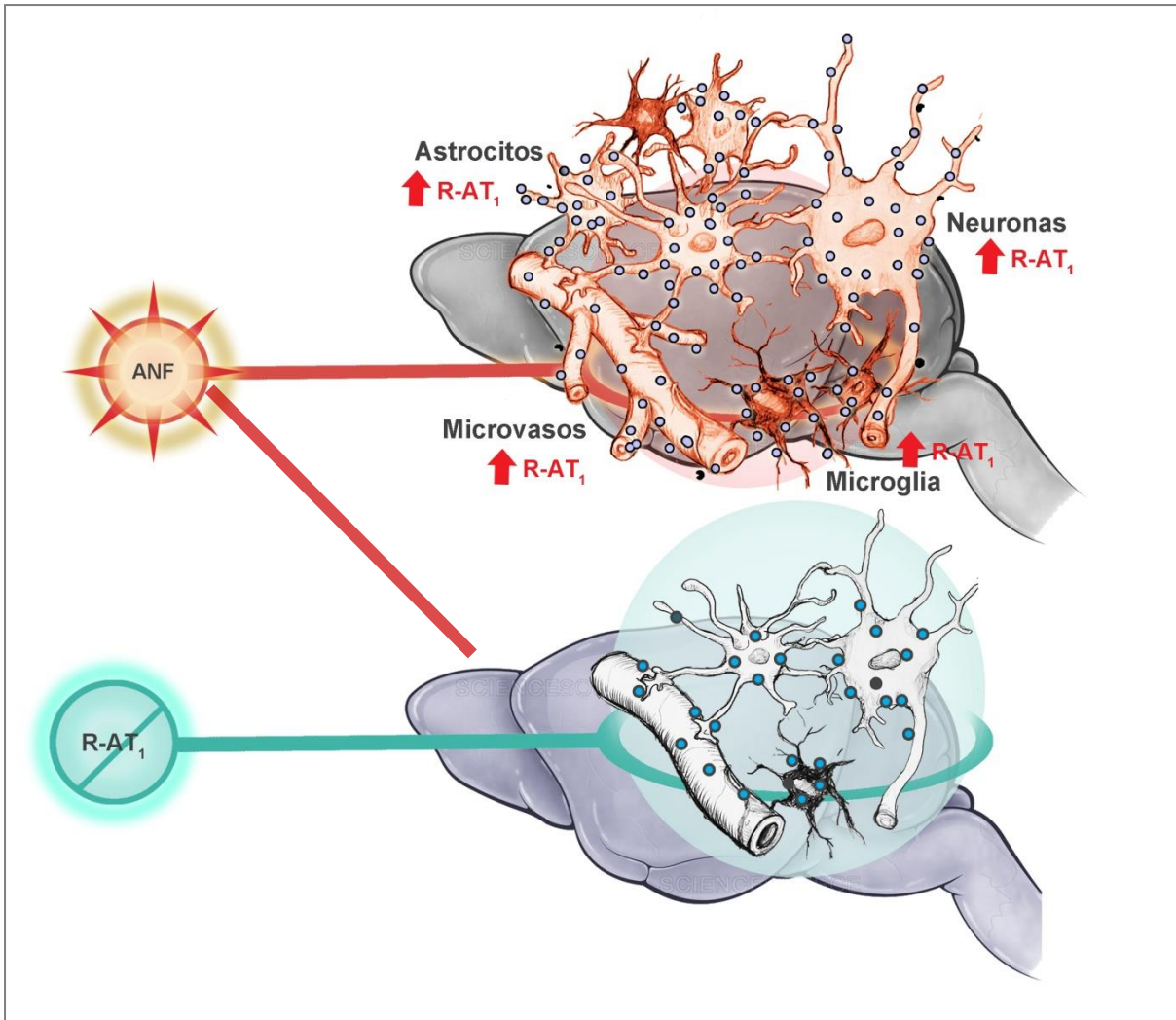
ramificaciones por la exposición a la anfetamina. Más aún, se observó una posible disminución en el diámetro de la microvasculatura.

Los resultados obtenidos en este trabajo, sugieren que la exposición a la anfetamina estimularía la angiogénesis, lo que se observa como aumento del área ocupada por la vasculatura. Este proceso se observó previamente a la semana de la administración de anfetamina, como un aumento del área vascular, aumento de la tortuosidad y disminución del número de ramificaciones. En el presente trabajo, se observó aumento del área ocupada por la vasculatura sin disminución del número de ramificaciones ni alteraciones en la tortuosidad de los vasos. Esto último, se puede atribuir a un proceso de intususcepción (división de vasos de mayor calibre en vasos de menor calibre) que explicaría la tendencia a la disminución del diámetro vascular. Estas alteraciones se interpretan como angiogénesis estimulada por la exposición a la anfetamina, la cual estaría mediada por la activación del R-AT<sub>1</sub> dado que las mismas se previnieron con la administración del antagonista de R-AT<sub>1</sub>.

## **CONCLUSIÓN**

En base a los resultados obtenidos y las evidencias disponibles podemos sugerir que la exposición a la anfetamina genera una respuesta neuroinflamatoria de larga duración que desencadena procesos de angiogénesis, estos eventos se producen en áreas cerebrales susceptibles y requieren de la activación de los R-AT<sub>1</sub>.

Considerando que el antagonista de los R-AT<sub>1</sub> utilizado en este estudio es bien tolerado y no afecta la presión arterial en pacientes normotensos, nuestras evidencias sustentan la potencialidad de su uso en el diseño y estrategia terapéutica para la prevención del desarrollo de un conjunto de alteraciones neurobiológicas asociadas al uso de psicoestimulantes o durante la esquizofrenia. En particular, debido a la evolución tórpida de esta patología hacia un deterioro cognitivo generalizado.



**Figura 18.** Resumen esquemático de las alteraciones inducidas por anfetamina, en corteza somatosensorial, evidenciando el rol de los R-AT<sub>1</sub> (receptores AT<sub>1</sub>) en un modelo animal de esquizofrenia con ANF (anfetamina).

## BIBLIOGRAFÍA

1. Millan MJ, Fone K, Steckler T, Horan WP. Negative symptoms of schizophrenia: clinical characteristics, pathophysiological substrates, experimental models and prospects for improved treatment. *European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology*. 2014;24(5):645-92.
2. Epidemiología en salud mental y adicciones. In: Adicciones DNdSMY, editor. Argentina 2011.
3. Lewis DA, Lieberman JA. Catching up on schizophrenia: natural history and neurobiology. *Neuron*. 2000;28(2):325-34.
4. Bell CC, Sowers W, Thompson KS. American Association of Community Psychiatrists' views on general features of DSM-IV. *Psychiatr Serv*. 2008;59(6):687-9.
5. Lang UE, Puls I, Muller DJ, Strutz-Seebohm N, Gallinat J. Molecular mechanisms of schizophrenia. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*. 2007;20(6):687-702.
6. Frohlich J, Van Horn JD. Reviewing the ketamine model for schizophrenia. *Journal of psychopharmacology*. 2014;28(4):287-302.
7. Flórez J. *Farmacología Humana*. 6 ed. Flórez Beledo J, Armijo Simón JA, editors: Elsevier Masson; 2013 16 Dec 2013. 1216 p.
8. Leucht S, Wahlbeck K, Hamann J, Kissling W. New generation antipsychotics versus low-potency conventional antipsychotics: a systematic review and meta-analysis. *Lancet*. 2003;361(9369):1581-9.
9. Mortimer AM. How do we choose between atypical antipsychotics? The advantages of amisulpride. *The international journal of neuropsychopharmacology*. 2004;7 Suppl 1:S21-5.
10. Carlsson A. The current status of the dopamine hypothesis of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*. 1988;1(3):179-86.
11. Farren CK, Hameedi FA, Rosen MA, Woods S, Jatlow P, Kosten TR. Significant interaction between clozapine and cocaine in cocaine addicts. *Drug and alcohol dependence*. 2000;59(2):153-63.
12. Bramness JG, Gundersen OH, Guterstam J, Rognli EB, Konstenius M, Loberg EM, et al. Amphetamine-induced psychosis--a separate diagnostic entity or primary psychosis triggered in the vulnerable? *BMC psychiatry*. 2012;12:221.
13. Cheng MH, Block E, Hu F, Cobanoglu MC, Sorkin A, Bahar I. Insights into the Modulation of Dopamine Transporter Function by Amphetamine, Orphenadrine, and Cocaine Binding. *Frontiers in neurology*. 2015;6:134.
14. Martins T, Burgoyne T, Kenny BA, Hudson N, Futter CE, Ambrosio AF, et al. Methamphetamine-induced nitric oxide promotes vesicular transport in blood-brain barrier endothelial cells. *Neuropharmacology*. 2013;65:74-82.
15. Paz MC, Marchese NA, Bregonzio C, Baiardi G. Brain Renin-Angiotensin System: A Novel Therapeutic Target for Psychostimulant and Alcohol Related Disorders? *Psychiatry and Neuroscience Update: Springer*; 2015. p. 79-88.
16. Bregonzio C, Casarsa B, Marchese N, Baiardi G. New roles for the neuropeptide Angiotensin II: Stress and drug abuse. In: Sôta H, Itsuki M, editors. *Angiotensin: New Research*. New York. USA.: Nova Science Publishers; 2012. p. 61-78.
17. Segal DS, Mandell AJ. Long-term administration of d-amphetamine: progressive augmentation of motor activity and stereotypy. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*. 1974;2(2):249-55.
18. Ujike H. Stimulant-induced psychosis and schizophrenia: the role of sensitization. *Current psychiatry reports*. 2002;4(3):177-84.

19. Featherstone RE, Kapur S, Fletcher PJ. The amphetamine-induced sensitized state as a model of schizophrenia. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*. 2007;31(8):1556-71.
20. Steeds H, Carhart-Harris RL, Stone JM. Drug models of schizophrenia. *Therapeutic advances in psychopharmacology*. 2015;5(1):43-58.
21. Silva AP, Martins T, Baptista S, Goncalves J, Agasse F, Malva JO. Brain injury associated with widely abused amphetamines: neuroinflammation, neurogenesis and blood-brain barrier. *Current drug abuse reviews*. 2010;3(4):239-54.
22. Lopez LH, Caif F, Fraile M, Tinnirello B, de Gargiulo AI, Lafuente JV, et al. Differential behavioral profile induced by the injection of dipotassium chlorazepate within brain areas that project to the nucleus accumbens septi. *Pharmacological reports : PR*. 2013;65(3):566-78.
23. Gargiulo API, Gargiulo De Aranda MP, Gargiulo MML, Gargiulo AJM, Acuna A, Baiardi GC, et al. Effects of dizocilpine-induced glutamatergic blockade in the nucleus accumbens septi on the plus maze test. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*. 2018;29(3):241-6.
24. Baiardi G, Ruiz AM, Beling A, Borgonovo J, Martinez G, Landa AI, et al. Glutamatergic ionotropic blockade within accumbens disrupts working memory and might alter the endocytic machinery in rat accumbens and prefrontal cortex. *Journal of neural transmission*. 2007;114(12):1519-28.
25. Volman SF, Lammel S, Margolis EB, Kim Y, Richard JM, Roitman MF, et al. New insights into the specificity and plasticity of reward and aversion encoding in the mesolimbic system. *J Neurosci*. 2013;33(45):17569-76.
26. Occhieppo VB, Marchese NA, Rodriguez ID, Basmadjian OM, Baiardi G, Bregonzio C. Neurovascular unit alteration in somatosensory cortex and enhancement of thermal nociception induced by amphetamine involves central AT1 receptor activation. *The European journal of neuroscience*. 2017;45(12):1586-93.
27. Muller N, Weidinger E, Leitner B, Schwarz MJ. The role of inflammation in schizophrenia. *Frontiers in neuroscience*. 2015;9:372.
28. Serhan CN, Brain SD, Buckley CD, Gilroy DW, Haslett C, O'Neill LA, et al. Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2007;21(2):325-32.
29. Hanson DR, Gottesman, II. Theories of schizophrenia: a genetic-inflammatory-vascular synthesis. *BMC medical genetics*. 2005;6:7.
30. Heneka MT, Carson MJ, El Khoury J, Landreth GE, Brosseron F, Feinstein DL, et al. Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *The Lancet Neurology*. 2015;14(4):388-405.
31. Potvin S, Stip E, Sepehry AA, Gendron A, Bah R, Kouassi E. Inflammatory cytokine alterations in schizophrenia: a systematic quantitative review. *Biological psychiatry*. 2008;63(8):801-8.
32. Gelders G, Baekelandt V, Van der Perren A. Linking Neuroinflammation and Neurodegeneration in Parkinson's Disease. *Journal of immunology research*. 2018;2018:4784268.
33. Cipolla MJ, Bishop N, Vinke RS, Godfrey JA. PPAR $\gamma$  activation prevents hypertensive remodeling of cerebral arteries and improves vascular function in female rats. *Stroke*. 2010;41(6):1266-70.
34. Tesfamariam B, DeFelice AF. Endothelial injury in the initiation and progression of vascular disorders. *Vascular pharmacology*. 2007;46(4):229-37.
35. Diniz LP, Tortelli V, Garcia MN, Araujo AP, Melo HM, Silva GS, et al. Astrocyte transforming growth factor beta 1 promotes inhibitory synapse formation via CaM kinase II signaling. *Glia*. 2014;62(12):1917-31.
36. Diniz LP, Almeida JC, Tortelli V, Vargas Lopes C, Setti-Perdigao P, Stipursky J, et al. Astrocyte-induced synaptogenesis is mediated by transforming growth factor beta signaling through modulation of D-serine levels in cerebral cortex neurons. *The Journal of biological chemistry*. 2012;287(49):41432-45.
37. Haydon PG, Carmignoto G. Astrocyte control of synaptic transmission and neurovascular coupling. *Physiological reviews*. 2006;86(3):1009-31.



38. Ni Y, Malarkey EB, Parpura V. Vesicular release of glutamate mediates bidirectional signaling between astrocytes and neurons. *Journal of neurochemistry*. 2007;103(4):1273-84.
39. Bush TG, Puvanachandra N, Horner CH, Polito A, Ostensfeld T, Svendsen CN, et al. Leukocyte infiltration, neuronal degeneration, and neurite outgrowth after ablation of scar-forming, reactive astrocytes in adult transgenic mice. *Neuron*. 1999;23(2):297-308.
40. Brenner M. Role of GFAP in CNS injuries. *Neuroscience letters*. 2014;565:7-13.
41. Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes: biology and pathology. *Acta neuropathologica*. 2010;119(1):7-35.
42. Burda JE, Sofroniew MV. Reactive gliosis and the multicellular response to CNS damage and disease. *Neuron*. 2014;81(2):229-48.
43. Streit WJ, Walter SA, Pennell NA. Reactive microgliosis. *Progress in neurobiology*. 1999;57(6):563-81.
44. Kettenmann H, Hanisch UK, Noda M, Verkhratsky A. Physiology of microglia. *Physiological reviews*. 2011;91(2):461-553.
45. Loane DJ, Byrnes KR. Role of microglia in neurotrauma. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*. 2010;7(4):366-77.
46. del Zoppo GJ. Stroke and neurovascular protection. *The New England journal of medicine*. 2006;354(6):553-5.
47. El Assar M, Angulo J, Rodriguez-Manas L. Oxidative stress and vascular inflammation in aging. *Free radical biology & medicine*. 2013;65:380-401.
48. Girouard H, Iadecola C. Neurovascular coupling in the normal brain and in hypertension, stroke, and Alzheimer disease. *Journal of applied physiology*. 2006;100(1):328-35.
49. Gorelick PB, Scuteri A, Black SE, Decarli C, Greenberg SM, Iadecola C, et al. Vascular contributions to cognitive impairment and dementia: a statement for healthcare professionals from the american heart association/american stroke association. *Stroke*. 2011;42(9):2672-713.
50. Iadecola C. The overlap between neurodegenerative and vascular factors in the pathogenesis of dementia. *Acta neuropathologica*. 2010;120(3):287-96.
51. Zacchigna S, Lambrechts D, Carmeliet P. Neurovascular signalling defects in neurodegeneration. *Nature reviews Neuroscience*. 2008;9(3):169-81.
52. Page IH, Helmer OM. A Crystalline Pressor Substance (Angiotonin) Resulting from the Reaction between Renin and Renin-Activator. *J Exp Med*. 1940;71(1):29-42.
53. Braun-Menendez E, Fasciolo JC, Leloir LF, Munoz JM. The substance causing renal hypertension. *J Physiol*. 1940;98(3):283-98.
54. Macova M, Armando I, Zhou J, Baiardi G, Tyurmin D, Larrayoz-Roldan IM, et al. Estrogen reduces aldosterone, upregulates adrenal angiotensin II AT2 receptors and normalizes adrenomedullary Fra-2 in ovariectomized rats. *Neuroendocrinology*. 2008;88(4):276-86.
55. Hoe KL, Armando I, Baiardi G, Sreenath T, Kulkarni A, Martinez A, et al. Molecular cloning, characterization, and distribution of the gerbil angiotensin II AT2 receptor. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2003;285(6):R1373-83.
56. Baiardi G, Macova M, Armando I, Ando H, Tyurmin D, Saavedra JM. Estrogen upregulates renal angiotensin II AT1 and AT2 receptors in the rat. *Regulatory peptides*. 2005;124(1-3):7-17.
57. Weisinger RS, Blair-West JR, Denton DA, Tarjan E. Role of brain angiotensin II in thirst and sodium appetite of sheep. *The American journal of physiology*. 1997;273(1 Pt 2):R187-96.
58. Fitzsimons JT. Angiotensin, thirst, and sodium appetite. *Physiological reviews*. 1998;78(3):583-686.
59. Alova LG, Stancheva SL, Matsoukas J, Georgiev VP. Effects of peptide and non-peptide antagonists of angiotensin II receptors on drinking behavior in rats. *Journal of physiology, Paris*. 1999;93(3):219-24.

60. de Gasparo M. New basic science initiatives with the angiotensin II receptor blocker valsartan. *Journal of the renin-angiotensin-aldosterone system : JRAAS*. 2000;1(2 Suppl):S3-5.
61. Marchese NA, Paz MC, Caeiro X, Dadam FM, Baiardi G, Perez MF, et al. Angiotensin II AT1 receptors mediate neuronal sensitization and sustained blood pressure response induced by a single injection of amphetamine. *Neuroscience*. 2017;340:521-9.
62. Seltzer A, Bregonzio C, Armando I, Baiardi G, Saavedra JM. Oral administration of an AT1 receptor antagonist prevents the central effects of angiotensin II in spontaneously hypertensive rats. *Brain research*. 2004;1028(1):9-18.
63. Bregonzio C, Marinzalda MdlA, Baiardi G. Role of the Neuropeptide Angiotensin II in Stress and Related Disorders. In: Gargiulo PÁ, Mesones Arroyo HL, editors. *Psychiatry and Neuroscience Update: Bridging the Divide*. Cham: Springer International Publishing; 2015. p. 89-99.
64. Marinzalda M, Perez PA, Gargiulo PA, Casarsa BS, Bregonzio C, Baiardi G. Fear-potentiated behaviour is modulated by central amygdala angiotensin II AT1 receptors stimulation. *Biomed Res Int*. 2014;2014(10):183248.
65. Llano Lopez LH, Caif F, Garcia S, Fraile M, Landa AI, Baiardi G, et al. Anxiolytic-like effect of losartan injected into amygdala of the acutely stressed rats. *Pharmacological reports : PR*. 2012;64(1):54-63.
66. Baiardi G, Bregonzio C, Jezova M, Armando I, Saavedra JM. Angiotensin II AT1 receptor blockade prolongs the lifespan of spontaneously hypertensive rats and reduces stress-induced release of catecholamines, glucocorticoids, and vasopressin. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2004;1018:131-6.
67. Armando I, Jezova M, Bregonzio C, Baiardi G, Saavedra JM. Angiotensin II AT1 and AT2 receptor types regulate basal and stress-induced adrenomedullary catecholamine production through transcriptional regulation of tyrosine hydroxylase. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2004;1018:302-9.
68. Saavedra JM, Ando H, Armando I, Baiardi G, Bregonzio C, Jezova M, et al. Brain angiotensin II, an important stress hormone: regulatory sites and therapeutic opportunities. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2004;1018:76-84.
69. Saavedra JM, Ando H, Armando I, Baiardi G, Bregonzio C, Juorio A, et al. Anti-stress and anti-anxiety effects of centrally acting angiotensin II AT1 receptor antagonists. *Regulatory peptides*. 2005;128:237-38.
70. Bregonzio C, Armando I, Ando H, Jezova M, Baiardi G, Saavedra JM. Angiotensin II AT1 receptor blockade prevents gastric ulcers during cold-restraint stress. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2004;1018:351-5.
71. Albrecht D. Angiotensin-(1-7)-induced plasticity changes in the lateral amygdala are mediated by COX-2 and NO. *Learning & memory*. 2007;14(3):177-84.
72. Labandeira-Garcia JL, Garrido-Gil P, Rodriguez-Pallares J, Valenzuela R, Borrajo A, Rodriguez-Perez AI. Brain renin-angiotensin system and dopaminergic cell vulnerability. *Frontiers in neuroanatomy*. 2014;8:67.
73. Labandeira-Garcia JL, Rodriguez-Pallares J, Rodriguez-Perez AI, Garrido-Gil P, Villar-Cheda B, Valenzuela R, et al. Brain angiotensin and dopaminergic degeneration: relevance to Parkinson's disease. *American journal of neurodegenerative disease*. 2012;1(3):226-44.
74. Maul B, Krause W, Pankow K, Becker M, Gembardt F, Alenina N, et al. Central angiotensin II controls alcohol consumption via its AT1 receptor. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2005;19:1474-81.
75. McKinley MJ, Albiston AL, Allen AM, Mathai ML, May CN, McAllen RM, et al. The brain renin-angiotensin system: location and physiological roles. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2003;35(6):901-18.
76. Moore N, Dicker P, O'Brien JK, Stojanovic M, Conroy RM, Treumann A, et al. Renin gene polymorphisms and haplotypes, blood pressure, and responses to renin-angiotensin system inhibition. *Hypertension*. 2007;50(2):340-7.

77. Wright JW, Kawas LH, Harding JW. A Role for the Brain RAS in Alzheimer's and Parkinson's Diseases. *Frontiers in endocrinology*. 2013;4:158.
78. Appel LJ, Wright JT, Jr., Greene T, Kusek JW, Lewis JB, Wang X, et al. Long-term effects of renin-angiotensin system-blocking therapy and a low blood pressure goal on progression of hypertensive chronic kidney disease in African Americans. *Archives of internal medicine*. 2008;168(8):832-9.
79. Mendelsohn FA, Jenkins TA, Berkovic SF. Effects of angiotensin II on dopamine and serotonin turnover in the striatum of conscious rats. *Brain research*. 1993;613(2):221-9.
80. Brown DC, Steward LJ, Ge J, Barnes NM. Ability of angiotensin II to modulate striatal dopamine release via the AT1 receptor in vitro and in vivo. *British journal of pharmacology*. 1996;118(2):414-20.
81. Georgiev V, Gyorgy L, Getova D, Markovska V. Some central effects of angiotensin II. Interactions with dopaminergic transmission. *Acta physiologica et pharmacologica Bulgarica*. 1985;11(4):19-26.
82. Tchekalarova J, Georgiev V. Angiotensin peptides modulatory system: how is it implicated in the control of seizure susceptibility? *Life sciences*. 2005;76(9):955-70.
83. Bregonzio C, Armando I, Ando H, Jezova M, Baiardi G, Saavedra JM. Anti-inflammatory effects of angiotensin II AT1 receptor antagonism prevent stress-induced gastric injury. *Am J Physiol*. 2003;285:G414-23.
84. Negro R. Endothelial effects of antihypertensive treatment: focus on irbesartan. *Vascular health and risk management*. 2008;4(1):89-101.
85. Lopes R, Soares R, Coelho R, Figueiredo-Braga M. Angiogenesis in the pathophysiology of schizophrenia - a comprehensive review and a conceptual hypothesis. *Life sciences*. 2015;128:79-93.
86. Marchese NA, Artur de laVillarmois E, Basmadjian OM, Perez MF, Baiardi G, Bregonzio C. Brain Angiotensin II AT1 receptors are involved in the acute and long-term amphetamine-induced neurocognitive alterations. *Psychopharmacology*. 2016;233(5):795-807.
87. Casarsa BS, Marinzalda MA, Marchese NA, Paz MC, Vivas L, Baiardi G, et al. A previous history of repeated amphetamine exposure modifies brain angiotensin II AT1 receptor functionality. *Neuroscience*. 2015;307:1-13.
88. Paz MC, Marchese NA, Stroppa MM, Gerez de Burgos NM, Imboden H, Baiardi G, et al. Involvement of the brain renin-angiotensin system (RAS) in the neuroadaptive responses induced by amphetamine in a two-injection protocol. *Behav Brain Res*. 2014;272:314-23.
89. Paz MC, Marinzalda MdlA, Bregonzio C, Baiardi G. Renin-Angiotensin System Modulating Functions in the Cpu. In: Costa A, Villalba E, editors. *Horizons in Neuroscience Research*. 7. New York. USA: Nova Science Publishers; 2012. p. 141-58.
90. Paz MC, Assis MA, Cabrera RJ, Cancela LM, Bregonzio C. The AT angiotensin II receptor blockade attenuates the development of amphetamine-induced behavioral sensitization in a two-injection protocol. *Synapse*. 2011;65(6):505-12.
91. de Kloet AD, Liu M, Rodriguez V, Krause EG, Summers C. Role of neurons and glia in the CNS actions of the renin-angiotensin system in cardiovascular control. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2015;309(5):R444-58.
92. Haack KK, Mitra AK, Zucker IH. NF-kappaB and CREB are required for angiotensin II type 1 receptor upregulation in neurons. *PloS one*. 2013;8(11):e78695.
93. Mitra AK, Gao L, Zucker IH. Angiotensin II-induced upregulation of AT(1) receptor expression: sequential activation of NF-kappaB and Elk-1 in neurons. *American journal of physiology Cell physiology*. 2010;299(3):C561-9.
94. Schulman IH, Zhou MS, Raj L. Nitric oxide, angiotensin II, and reactive oxygen species in hypertension and atherogenesis. *Current hypertension reports*. 2005;7(1):61-7.

95. Delgado-Marín L, Basmadjian O, Occhieppo V, Marchese N, Bregonzio C, Baiardi G. Vascular alterations in mental disorders: focus in Angiotensin II role. In: Luis MA, Gargiulo PÁ, editors. *Psychiatry and Neuroscience Update*. Springer International Publishing 2018.
96. Marchese N, Casarsa B, Baiardi G, Bregonzio C. Neurovascular cognitive alterations: implication of brain renin-angiotensin system (RAS), therapeutic opportunities and risk factors. In: Arroyo LM, Gargiulo PA, editors. *Psychiatry and Neuroscience Update*. Switzerland: Springer International Publishing Switzerland; 2015.
97. Kousik SM, Napier TC, Ross RD, Sumner DR, Carvey PM. Dopamine receptors and the persistent neurovascular dysregulation induced by methamphetamine self-administration in rats. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2014;351(2):432-9.
98. Pu C, Vorhees CV. Developmental dissociation of methamphetamine-induced depletion of dopaminergic terminals and astrocyte reaction in rat striatum. *Brain research Developmental brain research*. 1993;72(2):325-8.
99. Anderson MA, Ao Y, Sofroniew MV. Heterogeneity of reactive astrocytes. *Neuroscience letters*. 2014;565:23-9.
100. Permpoonputtana K, Mukda S, Govitrapong P. Effect of melatonin on D-amphetamine-induced neuroglial alterations in postnatal rat hippocampus and prefrontal cortex. *Neuroscience letters*. 2012;524(1):1-4.
101. Fuchtbauer L, Groth-Rasmussen M, Holm TH, Lobner M, Toft-Hansen H, Khorrooshi R, et al. Angiotensin II Type 1 receptor (AT1) signaling in astrocytes regulates synaptic degeneration-induced leukocyte entry to the central nervous system. *Brain, behavior, and immunity*. 2011;25(5):897-904.
102. Morales I, Yanos C, Rodriguez-Sabate C, Sanchez A, Rodriguez M. Striatal glutamate degenerates thalamic neurons. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 2013;72(4):286-97.
103. Whiteford JR, De Rossi G, Woodfin A. Mutually Supportive Mechanisms of Inflammation and Vascular Remodeling. *International review of cell and molecular biology*. 2016;326:201-78.
104. Dominguez-Meijide A, Rodriguez-Perez AI, Diaz-Ruiz C, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL. Dopamine modulates astroglial and microglial activity via glial renin-angiotensin system in cultures. *Brain, behavior, and immunity*. 2017;62:277-90.
105. Benicky J, Sanchez-Lemus E, Honda M, Pang T, Orecna M, Wang J, et al. Angiotensin II AT1 receptor blockade ameliorates brain inflammation. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*. 2011;36(4):857-70.
106. Rodriguez-Perez AI, Borrajo A, Diaz-Ruiz C, Garrido-Gil P, Labandeira-Garcia JL. Crosstalk between insulin-like growth factor-1 and angiotensin-II in dopaminergic neurons and glial cells: role in neuroinflammation and aging. *Oncotarget*. 2016;7(21):30049-67.
107. Sofuoglu M. Cognitive enhancement as a pharmacotherapy target for stimulant addiction. *Addiction*. 2010;105(1):38-48.