

TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**PARTICIPACIÓN DEL SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA EN LAS
RESPUESTAS NEUROQUÍMICAS E INFLAMATORIAS A NIVEL
CEREBRAL INDUCIDAS POR ANFETAMINA**

por

Bioquímica Casarsa Brenda Solange

Directora: Dra. Bregonzio Claudia

Director asociado: Dr. Baiardi Gustavo

**Laboratorio de Neurofarmacología. Facultad de Ciencias Químicas,
Universidad Católica de Córdoba-Instituto de Investigaciones Biológicas
y Tecnológicas (IIByT-CONICET), Universidad Nacional de Córdoba**



Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales

Universidad Nacional de Córdoba

Córdoba, Argentina

2015

COMISIÓN ASESORA

Dra. Laura Vivas. Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales. INIMEC-CONICET-UNC.

Dr. Marcelo Sergio Vatta. Facultad de Farmacia y Bioquímica. IQUIMEFA-CONICET-UBA.

Dra. Claudia Bregonzio. Departamento de Farmacología, Facultad de Cs. Químicas. IFEC-CONICET-UNC

DEFENSA ORAL Y PÚBLICA

Lugar y Fecha:

Calificación:

TRIBUNAL

Firma:

Aclaración:

Firma:

Aclaración:

Firma:

Aclaración:

PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS

Papers:

Casarsa Brenda Solange, Marinzalda María de los Angeles, Marchese Natalia Andrea, Paz María Contanza, Vivas Laura, Baiardi Gustavo, Bregonzio Claudia. A previous history of repeated amphetamine exposure modified the brain angiotensin II AT₁ receptors functionality. Enviado a publicar en Neuroscience. Manuscrito NSC-15-426.

María de los Angeles Marinzalda, Pablo A. Pérez, Pascual Gargiulo, **Brenda Casarsa**, Claudia Bregonzio, and Gustavo Baiardi. Fear-potentiated behaviour is modulated by central amygdala angiotensin II AT₁ receptors stimulation. Biomed International Research. Volume 2014, Article ID 183248, 7 pages.

Capítulos de libro:

Marchese, NA; **Casarsa, BS**; Baiardi, G; Bregonzio, C. Neurovascular cognitive alterations: Implication of brain renin-angiotensin system (RAS). Therapeutic opportunities and risk factors. In Psychiatry and Neuroscience: Bridging the Divide. Editors: Luis Mesones Arroyo and Pascual Angel Gargiulo. Springer. Volumen 2014. 27 pages.

Bregonzio C., **Casarsa B.**, Marchese N., Baiardi G. New roles for the neuropeptide Angiotensin II: Stress and drug abuse. In Angiotensin new research. Editors: Sota Harada and Itsuki Moi. Nova Science Publishers. Book ID: 101568994. 2011.

El presente trabajo de tesis ha sido realizado en el Laboratorio de Neurofarmacología, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Católica de Córdoba. Instituto de Investigaciones Biológicas y Tecnológicas (IIByT-CONICET).

Durante la ejecución, la autora fue becaria del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) entre los años 2010 y 2015. Para la realización de la tesis contó con subsidios otorgados por CONICET y por el ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva (MINCyT).

“Tengamos ideales elevados y pensemos en alcanzar grandes cosas, porque como la vida rebaja siempre y no se logra sino una parte de lo que se ansía, soñando muy alto alcanzaremos mucho más”

Bernardo A. Houssay (1987-1971)

A mis padres y hermanos, mi fuerza

A David, mi gran amor

A Dios, mi todo

”En medio del invierno, me pareció que había, dentro de mí, un invencible verano”

Albert Camus (1913-1960)

AGRADECIMIENTOS

A Dios

Por darme la vida todos los días y haberme permitido llegar a este momento. Por su infinito amor y misericordia y por la bendición de una familia maravillosa.

A mi esposo David

Mi amigo y compañero, por sostenerme en cada momento. Su paciencia, amor y comprensión hizo que esta tesis lleve mucho de él.

A mi mamá

Mi pilar, mi ejemplo a seguir, por creer en mí y darme tanto amor.

A mi papá

Por su apoyo silencioso y siempre presente. Por valorarme y regalarme todos los días su cariño.

A mis hermanos,

Tere, Aye, Dara, Luigi, Giuliana, Agustina y Stefano, por permitirme amarlos tanto. Por ser incondicionales y brindarme mucho amor y fuerza para seguir adelante.

A Marian

Por ser mi ancla, mi oído y mi gran amiga. Sin su apoyo nunca hubiese llegado tan lejos.

A la Dra. Claudia Bregonzio

Directora de esta tesis, por su aliento constante, profesionalismo y pasión. Mi sostén en la ciencia.

A mis amigas

Lauri, Pame, Maru, Euge, July, Fer y Sole, son las mejores amigas que uno puede anhelar. Siempre con una palabra de apoyo, una sonrisa, supieron darle alegría y paz a mi vida.

A mis abuelos

Abuelo José, abuela Delia, abuela Magdalena y a la memoria de mi abuelo Luigi, que siempre fueron mis grandes ejemplos, por su amor y cariño permanentes.

A Tony

Mi tío del alma, un ser de luz.

A mis suegros, cuñados y sobrinos

Por sus rezos y por ser soporte en todo momento, mi segunda familia.

A quienes hicieron posible este trabajo

A mi co-director, a Naty y Coty siempre dispuestas y alegres, al laboratorio de la Dra. Laura Vivas, Jime, Andi y Flor, por su excelente disposición y por darme la oportunidad de aprender. Al IIByT por formar parte del instituto.

Al Dr. Vatta, Dra. Vivas y Dra. Ciuffo

Por su interés, respeto y valiosos aportes. Son grandes personas.

A la Facultad de Ciencias Químicas de la UCC

Por brindarme el espacio para realizar esta tesis y sobre todo por el cariño y apoyo de sus docentes, personal administrativo, maestranza y técnico. Mis compañeros de lucha.

A CONICET

Por el apoyo económico de todos estos años.

A Alicia

Por ser siempre tan profesional, atenta y cariñosa.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	8
RESUMEN	12
SUMMARY	14
INTRODUCCIÓN	16
1. ANFETAMINA	16
2. EL SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA	18
2.1. Síntesis, Metabolismo y Receptores de Angiotensina II	19
2.2. Receptor AT ₁	20
2.3. Antagonistas no peptídicos de los receptores de Angiotensina II: Candesartan cilexetilo	23
2.4. Sistema renina-angiotensina cerebral	25
2.4.1. <i>Angiotensina II cerebral y regulación del sodio</i>	26
2.4.2. <i>Distribución de Receptores de Angiotensina II en el cerebro</i>	27
3. ESTRÉS	28
3.1. Bloqueo de R-AT ₁ cerebrales: Efectos anti-estrés	28
3.2. Estrés y drogas psicoestimulantes	30
3.3. Relación entre la Angiotensina II cerebral y las drogas psicoestimulantes: Sistema dopaminérgico	31
4. INFLAMACIÓN	33
4.1. Angiotensina II, inflamación y especies reactivas del oxígeno	33
4.2. Bloqueantes de los R-AT ₁ : Rol neuroprotector y anti-inflamatorio	37
4.3. Drogas psicoestimulantes e inflamación	38
5. MEMORIA	39
5.1. Angiotensina II y memoria	39
6. EXPRESIÓN DE FOS	40
7. SISTEMA OXITOCINÉRGICO	41
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	43
1. HIPÓTESIS GENERAL	43
2. OBJETIVO GENERAL	43
3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	43
3.1. Objetivo 1	43
3.2. Objetivo 2	43
3.3. Objetivo 3	44
MATERIALES Y MÉTODOS	45
1. ANIMALES	45
2. DROGAS	45

3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	45
4. GRUPOS Y DISEÑO EXPERIMENTAL.....	46
4.1. Justificación del modelo experimental	46
4.2. Objetivo 1	47
4.3. Objetivo 2	48
4.4. Objetivo 3	49
TÉCNICAS	50
1. Cirugía Estereotáxica.....	50
2. Inyección intracerebroventricular.....	50
3. Ingesta de sodio y agua.....	51
4. Recolección de orina y obtención de plasma.....	51
5. Actividad de la renina plasmática.....	51
6. Perfil bioquímico en orina y plasma.....	51
7. Test de Ansiedad: <i>Plus Maze</i>	52
8. Test de memoria de trabajo: <i>Hole Board</i>	53
9. Extracción de LCR a nivel craneal	54
10. Determinación de TNF- α en LCR	54
11. Determinación de IL-6 en LCR y plasma	55
12. Aislamiento de microvasos cerebrales.....	55
13. Estrés oxidativo en microvasos cerebrales	56
14. Inmunohistoquímica de Fos y Fos-OT	57
15. Inmunohistoquímica de ICAM-1 y R-AT ₁	59
15.1. <i>ICAM-1</i>	59
15.2. <i>R-AT₁</i>	60
16. Inmunofluorescencia de R-AT ₁ y HSP-70 en microvasos cerebrales	60
RESULTADOS	62
1. OBJETIVO 1	62
1.1. Efecto de Ang II icv. sobre: Ingesta de sodio y agua, excreción de sodio y potasio urinario, actividad de la renina plasmática, IR-Fos, memoria de trabajo, respuesta de ansiedad e inflamatoria.....	62
1.2. Efecto de la exposición repetida a anfetamina sobre la ingesta de agua y sodio inducido por Ang II icv.	66
1.3. Efecto de la exposición repetida a anfetamina sobre la excreción de sodio y potasio urinario inducida por Ang II icv.	68
1.3.1. <i>Natriuresis</i>	68
1.3.2. <i>Kaliuresis</i>	68
1.4. Efecto de la exposición repetida a anfetamina sobre la actividad de la renina plasmática, luego de Ang II icv.	71
1.5. Efecto de la exposición repetida a anfetamina sobre parámetros bioquímicos urinarios y plasmáticos, luego de Ang II icv.	72
1.6. Efecto de la exposición repetida a anfetamina sobre la distribución de Fos inducida por Ang II icv. en CPU, NAc core, NAc shell, PVN, NTS y SFO.	75

1.6.1. CPu.....	75
1.6.2. NAc core	75
1.6.3. NAc shell.....	76
1.6.4. PVN.....	76
1.6.5. NTS	76
1.6.6. SFO.....	77
2. OBJETIVO 2	81
2.1. Efecto de la exposición repetida a anfetamina sobre la respuesta de ansiedad, inducida por Ang II icv.....	81
2.1.1. Tiempo de permanencia en el brazo abierto	81
2.1.2. Entradas Totales.....	82
2.2. Efecto de la exposición repetida a anfetamina sobre la memoria de trabajo, evaluada en el test de <i>Hole Board</i> , luego de Ang II icv.	84
2.2.1. Exploración Total.....	84
2.2.2. Head Dipping	85
2.2.3. Sniffing.....	85
2.3. Efecto de la exposición repetida a anfetamina sobre la distribución de Fos inducida por Ang II icv. en CeA, BLA y en regiones hipocampales (CA-1, CA-3 y giro dentado).	87
2.3.1. CeA	87
2.3.2. BLA	87
2.3.3. CA-1.....	88
2.3.4. CA-3.....	88
2.3.5. Giro Dentado	89
2.4. Efecto de la exposición repetida a anfetamina sobre la inmunomarcación de Fos-OT inducida por Ang II icv. en SON y PVN.....	93
2.4.1. SON.....	93
2.4.2. PaMM.....	93
2.4.3. PeM.....	93
2.4.4. PaAM.....	93
2.4.5. PaDC	94
2.4.6. PaLM.....	94
2.5.7. PaPo	94
3. OBJETIVO 3	100
3.1. Aislamiento de microvasos cerebrales.	100
3.2. Efectos de la exposición repetida a anfetamina sobre la expresión de TNF- α en LCR, en respuesta a Ang II icv.	101
3.3. Efectos de la exposición a anfetamina sobre la expresión de IL-6 en plasma y LCR	102
3.3.1. Plasma	102
3.3.2. LCR.....	102
3.4. Efecto de la exposición repetida a anfetamina sobre la inmunofluorescencia de R-AT ₁ (IF-R-AT ₁) en la microvasculatura cerebral, en respuesta a Ang II icv.	104

3.5. Efecto de la exposición previa a anfetamina sobre la inmunofluorescencia de HSP-70 (IF-HSP-70) en la microvasculatura cerebral, en respuesta a Ang II icv.	107
3.6. Efecto de la exposición repetida a anfetamina sobre la inmunomarcación de R-AT ₁ y ICAM-1 en la vasculatura cerebral.....	109
3.7. Efecto de la exposición repetida a anfetamina sobre el estrés oxidativo en la microvasculatura cerebral.....	112
3.7.1. <i>Challenge Salina</i>	112
3.7.2. <i>Challenge Anfetamina</i>	112
DISCUSIÓN	115
1.1. Uso de Ang II icv. para evidenciar los cambios en el RAS cerebral, inducido por exposición repetida a anfetamina	115
1.2. Ingesta de Sodio y Agua.....	116
1.3. Expresión de Fos y Fos-oxitocina	118
1.4. Natriuresis y actividad de la renina plasmática	119
1.5. Memoria	120
1.6. Ansiedad.....	122
1.7. Inflamación.....	124
CONCLUSIONES	126
RELEVANCIA Y PROYECCIONES	129
1. Futuras investigaciones derivadas de este trabajo de tesis	129
BIBLIOGRAFÍA	130

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1: Distribución de los receptores AT₁ y AT₂.

Tabla 2: Parámetros bioquímicos urinarios y plasmáticos, 7 días post-Anf.

Tabla 3: Parámetros bioquímicos urinarios y plasmáticos, 21 días post-Anf.

Tabla 4: Resumen de los resultados del objetivo 1 y 2.

Tabla 5: Resumen de los resultados del objetivo 3.

Figura 1: Síntesis y sinapsis dopaminérgica en estado basal. Estructura química y mecanismo de acción de la anfetamina.

Figura 2: Síntesis y metabolismo de las angiotensinas circulantes.

Figura 3: Secuencia consenso y estructura secundaria de los R-AT₁ de Ang II en mamíferos.

Figura 4: Características de los principales receptores de Ang II.

Figura 5: Estructura química de candesartan cilexetilo.

Figura 6: Angiotensina II y su rol inflamatorio.

Figura 7: Rol neuroprotector y anti-inflamatorio de los bloqueantes de R-AT₁.

Figura 8: Rol anti-inflamatorio del bloqueo de R-AT₁.

Figura 9: Diseño experimental del objetivo 1.

Figura 10: Diseño experimental del objetivo 2.

Figura 11: Diseño experimental del objetivo 3.

Figura 12: Aparato de *Plus Maze*.

Figura 13: Aparato de *Hole Board*.

Figura 14: Extracción de líquido cefaloraquídeo a nivel craneal en rata.

Figura 15: Determinación de: Ingesta de Agua y sodio, natriuresis, kaliuresis y actividad de renina plasmática, luego de inyección de salina ó de Ang II icv.

Figura 16: Determinación de: n° de neuronas IR-Fos en CA-3 y girus dentado del hipocampo, N° de *head dipping* en el test de *Hole Board*, tiempo de permanencia en el brazo abierto del *Plus Maze*, n° de neuronas IR-Fos en NAc core y niveles de TNF- α en LCR, luego de inyección de salina ó de Ang II icv.

Figura 17: Ingesta de agua y sodio, luego de inyección de Ang II icv., 7 y 21 post-Anf.

Figura 18: Natriuresis y Kaliuresis, luego de inyección de Ang II icv., 7 y 21 días post-Anf.

Figura 19: Actividad de renina plasmática, en respuesta a Ang II icv., 7 y 21 días post-Anf.

Figura 20: Microfotografía y número de neuronas IR-Fos en CPu y NAc core, en respuesta a Ang II icv., 7 y 21 días post-Anf.

Figura 21: Número de neuronas IR-Fos en NAc shell, en respuesta a Ang II icv., 7 y 21 días post-Anf.

Figura 22: Número de neuronas IR-Fos en PVN, NTS y SFO, en respuesta a Ang II icv., 7 y 21 días post-Anf.

Figura 23: Índice de ansiedad y de locomoción en el test de *Plus Maze*, luego de Ang II icv., 7 y 21 días post-Anf.

Figura 24: Exploración total, número de *head dipping* y número de *sniffing* en el test de *Hole Board*, en respuesta a Ang II icv., 7 y 21 días post-Anf.

Figura 25: Microfotografía y número de neuronas IR-Fos en CeA y BLA, en respuesta a Ang II icv., 7 y 21 días post-Anf.

Figura 26: Número de neuronas IR-Fos en CA-1, CA-3 y girus dentado, en respuesta a Ang II icv., 7 y 21 días post-Anf.

Figura 27: Microfotografía y número de neuronas IR-Fos-OT en PaMM del PVN, en respuesta a Ang II icv., 7 post-Anf.

Figura 28: Microfotografía y número de neuronas IR-Fos-OT en SON, en respuesta a Ang II icv., 7 post-Anf.

Figura 29: Número de neuronas IR-Fos-OT en diferentes núcleos del PVN (PeM, PaAM, PaDC, PaLM, PaPo), en respuesta a Ang II icv., 7 post-Anf.

Figura 30: Microfotografía de microvasos cerebrales aislados.

Figura 31: Niveles de TNF- α en el LCR de ratas, luego de Ang II icv., 7 y 21 días post-Anf.

Figura 32: Niveles de IL-6 en plasma y LCR de ratas, en respuesta a Ang II icv., 7 y 21 días post-Anf.

Figura 33: Intensidad de Inmunofluorescencia del R-AT₁ en microvasos cerebrales aislados de ratas, 7 y 21 días post-Anf, en respuesta a Ang II icv.

Figura 34: Microfotografías representativas de la inmunofluorescencia para R-AT₁ en microvasos cerebrales aislados de ratas controles y expuestas a anfetamina (7 y 21 días antes), en respuesta a Ang II icv.

Figura 35: Intensidad de Inmunofluorescencia de la HSP-70 en microvasos cerebrales aislados de ratas, 7 y 21 días post-Anf, en respuesta a Ang II icv.

Figura 36: Microfotografías representativas de la inmunofluorescencia para HSP-70 en microvasos cerebrales aislados de ratas controles y expuestas a anfetamina (7 y 21 días antes), en respuesta a Ang II icv.

Figura 37: Microfotografías representativas de la inmunohistoquímica de ICAM-1 en cortes de arteria cerebral posterior, media y arteria de menor calibre, en animales tratados con Veh-Sal ó Veh-Anf (7 días antes) y una hora posterior a un challenge de anfetamina.

Figura 38: Microfotografías representativas de la inmunohistoquímica de R-AT₁ en cortes de arteria cerebral posterior, media y arteria de menor calibre, en animales tratados con Veh-Sal ó Veh-Anf (7 días antes) y una hora posterior a un challenge de anfetamina.

Figura 39: Niveles de MDA, como medida de estrés oxidativo -peroxidación lipídica-, en los microvasos cerebrales de ratas, luego de challenge de salina ó anfetamina, 7 y 21 días post-Anf.

Figura 40: Esquema representativo de las respuestas descriptas a Ang II icv.

Figura 41: Efecto de la exposición repetida a anfetamina sobre las respuestas a Ang II icv.

Figura 42: Esquema representativo de las respuestas inflamatorias inducidas por exposición repetida a anfetamina y la participación de los R-AT₁ en dicha respuesta.

ABREVIATURAS

ACE: enzima convertidora de angiotensina
ACh: acetilcolina
AChe: acetilcolinoesterasa
ACTH: hormona adrenocorticotrofina
AMPc: adenosín monofosfato cíclico
Anf: anfetamina
Ang: angiotensina
APA: aminopeptidasa A
APN: aminopeptidasa N
ARB: bloqueantes del receptor AT₁
AVP: vasopresina
BHE: barrera hematoencefálica
BLA: amígdala basolateral
CA-1: cuerno de Amón 1-región hipocampal
CA-3: cuerno de Amón 3 -región hipocampal
Cand: candesartan
Cand-Anf: candesartan-anfetamina
Cand-Sal: candesartan-salina
Carb-P: carboxi-peptidasa-P
CeA: amígdala central
CmPF: corteza media prefrontal
COMT: catecol O-metiltransferasa
COX-2: ciclooxigenasa-2
CPu: caudado putamen
CRH: hormona liberadora de corticotrofina
CVO: órganos circunventriculares
D₁: receptor dopaminérgico D₁
D₂: receptor dopaminérgico D₂
DA: dopamina
DAB: diaminobencidina
DAG: diacilglicerol

DAT: transportador de dopamina
DOCA: acetato de desoxicorticosterona
DOPA: dihidroxifenilalanina
FDA: Food and Drug Administration
GABA: ácido gama amino butírico
GMPC: guanosín monofosfato cíclico
HPA: eje hipotálamo-hipofiso-adrenal
HSP: proteína de golpe de calor
I-ACE: inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina
ICAM-1: molécula de adhesión intercelular-1
icv.: intracerebroventricular
IF-R-AT₁: inmunofluorescencia de R-AT₁
IF-R-HSP-70: inmunofluorescencia de HSP-70
IGEs: genes de expresión inmediata temprana
IL-1: interleuquina-1
IL-10: interleuquina-10
IL-1β: interleuquina-1 beta
IL-2: interleuquina-2
IL-6: interleuquina-6
iNOS: óxido nítrico sintasa inducible
ip.: intraperitoneal
IP₃: inositol-1,4,5-trifosfato
IR-Fos: inmunoreactividad a Fos
IR-Fos-OT: inmunoreactividad a Fos-Oxitocina
JAK: janus quinasa
LCR: líquido cefaloraquídeo
MAO: monoamino oxidasa
MAPK: proteína quinasa activada por mitógeno
MCP-1: proteína quimiotáctica de monocitos-1
MDA: malondialdehído
ME: eminencia media
MWM: laberinto de Morris
NA: noradrenalina
NAc: núcleo accumbens

NAcSh: núcleo accumbens shell
NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NF- κ B: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
NIH: National Institute of Health
NGS: suero normal de cabra
NHS: suero normal de caballo
NO: óxido nítrico
NTS: núcleo del tracto solitario
OT: oxitocina
OVL: órgano vasculoso de la lamina terminal
PaAM: paraventricular anterior magnocelular
PaDC: paraventricular dorsal cap
PaLM: paraventricular lateral magnocelular
PaMM: paraventricular medial magnocelular
PaPo: paraventricular parvocelular posterior
PeM: magnocelular periventricular
PGE₂: prostaglandina E₂
PIP₂: fosfatidilinositol-4,5-difosfato
PKC: proteína quinasa C
PO: prolyl-oligopeptidasa
Post-Anf: post-anfetamina
PRA: actividad de la renina plasmática
PTP: proteína tirosina fosfatasa
PVN: núcleo paraventricular
RAS: sistema renina-angiotensina
R-AT₁: receptor AT₁ de angiotensina II.
R-AT₂: receptor AT₂ de angiotensina II
ROS: especies reactivas del oxígeno
RSNA: actividad del nervio simpático renal
SFO: órgano subfornical
SNC: sistema nervioso central
SON: núcleo supraóptico
SRH: ratas espontáneamente hipertensas
STAT: proteína transductora de señales y activadora de la transcripción

TBA: tiempo de permanencia en el brazo abierto del *Plus Maze*
TBARS: ensayo de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
TDHA: trastorno de déficit de atención con hiperactividad
TGF- β : factor de crecimiento transformante beta
TH: tirosina hidroxilasa
TMB: tetrametil bencidina
TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa
TSP-1: trombospondina proteasa-1
VCAM-1: molécula de adhesión celular vascular-1
VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular
Veh-Anf: vehículo-anfetamina
Veh-Sal: vehículo-salina
VMAT₂: transportador vesicular de monoaminas
vo.: vía oral

RESUMEN

El sistema renina-angiotensina (RAS), a través de la estimulación de sus receptores AT₁ (R-AT₁), participa en las respuestas de estrés y ansiedad, en la activación del sistema dopaminérgico mesocorticolímbico y está relacionado con alteraciones cognitivas, así como asociado a respuestas inflamatorias. La exposición a noxas ambientales o farmacológicas desencadena cambios duraderos en el tiempo en el Sistema Nervioso Central, fenómeno conocido como neuroplasticidad. Esta respuesta neuroadaptativa permite modificar la eficiencia de futuras respuestas a estímulos basándose en la experiencia previa. En este sentido, la exposición a anfetamina no sólo genera una respuesta sensibilizada de los circuitos de recompensa, sino que también modifica la conducta a través de procesos de aprendizaje y memoria. El objetivo de este trabajo de tesis fue evaluar el impacto a largo plazo de la exposición repetida a anfetamina sobre el RAS cerebral y el rol de los R-AT₁. Con este propósito se utilizó la administración de Ang II icv. ó challenge de anfetamina ip., como herramienta para develar los cambios neuroadaptativos a nivel del RAS cerebral, inducidos por la exposición al psicoestimulante. Se usaron ratas Wistar macho (250-320 g), pretratadas con bloqueante de los R-AT₁ -candesartan- (3 mg/kg vo.)/vehículo por 10 días e inyectadas con anfetamina (2,5 mg/kg ip.)/salina del día 5 al 10. El día 10 ó 26, se colocaron cánulas intracerebroventriculares (icv.). El día del experimento (18 ó 32), los animales recibieron Ang II (400 pmol icv.) o challenge de anfetamina (0,5 mg/kg ip.). En los animales que recibieron Ang II icv. se evaluó: la ingesta de agua y sodio, la excreción de sodio y potasio urinario, la función renal y la situación general del animal, la actividad de la renina plasmática (PRA), la memoria de trabajo y la respuesta de ansiedad. Los animales fueron sacrificados y los cerebros procesados para la inmunomarcación de Fos en áreas cerebrales relacionadas con la recompensa, la osmoregulación, la ansiedad y la memoria (NAc, CPu, SFO, PVN, NTS, BLA, CeA, CA-1, CA-3, giro dentado del hipocampo). Además, se determinó la doble inmunomarcación de Fos-oxitocina en el PVN y SON. También se determinaron marcadores de inflamación periférica y central, IL-6, TNF- α (en LCR y plasma), HSP-70 y R-AT₁ en la microvasculatura cerebral.

En los animales que recibieron un challenge de anfetamina se evaluó: inmunomarcación de ICAM-1 y R-AT₁ en vasculatura cerebral y niveles de daño oxidativo (peroxidación lipídica) en la microvasculatura.

Resultados: Los animales expuestos a anfetamina, no respondieron a la administración de Ang II icv. de la manera clásica. Estos animales mostraron una menor ingesta de sodio, una mayor excreción de sodio y potasio urinario, una disminución más marcada de la PRA, no manifestaron deterioro en la memoria de trabajo, ni conducta ansiogénica, en respuesta a Ang II icv. Además, estos animales mostraron un perfil de activación neuronal diferente al control y expresaron una activación oxitocinérgica central potenciada en respuesta a Ang II icv. También se observó que la exposición repetida a anfetamina incrementó significativamente todos los marcadores de inflamación a nivel periférico, central y vascular, además de incrementar el daño oxidativo en la microvasculatura. El pre-tratamiento con candesartan, restableció la respuesta a Ang II icv. en la mayoría de los parámetros estudiados a los 21 días post-anfetamina. La respuesta inflamatoria a nivel vascular se previno con el tratamiento de candesartan a los 7 y 21 días post-anfetamina. Mientras que la respuesta ansiogénica a Ang II icv. no se recuperó a ninguno de los dos 2 tiempos estudiados.

Los resultados obtenidos podrían explicarse por la desensibilización/inactivación de los R-AT₁ como consecuencia de una sobre-estimulación del RAS cerebral. En este sentido, el RAS cerebral mantiene una estrecha relación con el sistema oxitocinérgico. En los animales expuestos a anfetamina la desensibilización/inactivación de los R-AT₁ se expresaría como una mayor activación oxitocinérgica en respuesta a Ang II icv. Este aumento también podría explicar la ausencia de respuesta frente a Ang II en relación a la ingesta de sodio, memoria y respuesta de ansiedad. Del mismo modo explicaría la mayor natriuresis y kaliuresis en respuesta a Ang II icv. Así mismo la desensibilización/inactivación de los R-AT₁, por exposición repetida a anfetamina se manifiesta en el perfil de activación neuronal en respuesta a Ang II icv.

Los resultados de este trabajo de tesis muestran claramente que los cambios neuroadaptativos inducidos por anfetamina implican alteraciones en el RAS cerebral. Además, soportan la visión de que la duración de estos cambios involucra la activación de los R-AT₁, dado que las respuestas a Ang II icv. se restablecen con el bloqueo previo de los R-AT₁, 21 días post-anfetamina. Por otro lado, los resultados obtenidos ponen en evidencia el efecto inflamatorio de anfetamina y el rol clave de los R-AT₁ en este fenómeno.

SUMMARY

The renin-angiotensin system (RAS), through the AT₁ receptor (AT₁-R) stimulation is involved in the stress and anxiety responses, in the activation of the mesocorticolimbic dopaminergic system, associated with cognitive impairment, and associated with inflammatory responses. The exposition to environmental and pharmacological insults triggers long-term changes in the Central Nervous System, phenomenon known as neuroplasticity. This neuroadaptation enable to modify the efficiency of future responses to stimuli based on previous experience. Moreover, amphetamine exposure induces a sensitized response in the reward circuitry concomitantly with changes in learning and memory processes. The principal aim of this thesis was to evaluate the impact of the long-term effects of repeated amphetamine exposure on brain RAS and the role of the R-AT₁. For this purpose, it was used intracerebroventricular (icv) administration of Ang II or amphetamine challenge ip. as a tool to unmask the neuroadaptive changes in the brain RAS, induced by repeated amphetamine exposure. Wistar male rats (250-320 g) pretreated with AT₁-R blocker -candesartan- (3 mg/kg po.) / Vehicle for 10 days and injected with amphetamine (2,5 mg/kg ip.) / Saline (day 5 to 10) were used. The brain cannulae were implanted on the day 10 or 26. The day of the experiment (18 or 32), the animals received Ang II (icv 400 pmol.) or amphetamine challenge (0,5 mg/kg ip.). In the animals that received Ang II icv. the responses evaluated were: water and sodium intake, sodium and potassium excretion, biochemical parameters, plasma renin activity (PRA), working memory and anxiety. The animals were sacrificed and the brains were processed for immunostaining for Fos in brain areas related to reward, osmoregulation, anxiety and memory (NAc, CPu, SFO, PVN, NTS, BLA, CeA, CA-1, CA-3, gyrus dentate). In addition, the double immunostaining for Fos-oxytocin in the PVN and SON were also determined. Peripheral and central inflammation markers, IL-6, TNF- α in plasma and CSF; HSP-70 and AT₁-R in the cerebral microvasculature were determined. In animals that received amphetamine challenge the evaluated parameters were: immunostaining for ICAM-1 and AT₁-R in cerebral vasculature, and oxidative level damage (lipid peroxidation) in the microvasculature.

Results: The animals exposed to amphetamine did not respond in the classical way to Ang II icv administration. These animals showed reduced sodium intake, increased of sodium and potassium excretion, a more marked decrease in PRA, lack of working memory impairment nor anxiogenic behavior in response to Ang II icv. Furthermore, these animals

showed a different neuronal activation profile and enhanced oxytocinergic activation from controls in response to Ang II icv. It was also found, that repeated amphetamine exposure increased significantly the peripheral, central and vascular markers of inflammation and oxidative damage in the microvasculature. Candesartan pre-treatment restored the response to Ang II icv. in most of the studied parameters 21 days post-amphetamine. Meanwhile, candesartan blunted the vascular inflammatory response 7 and 21 days post-amphetamine. In contrast, the angiogenic response to Ang II icv. was not recovered in the period of time studied.

Our results could be explained by desensitization/inactivation of AT₁-R as a result of overstimulation of brain RAS. In this sense, the brain RAS maintains a close relationship with oxytocinergic system; the absence or desensitization/inactivation of AT₁-R could be expressed as increased oxytocinergic activation, as observed in animals exposed to amphetamine. This increase could also explain the lack of response to Ang II in relation to sodium intake, memory and anxiety response. Moreover, the increased oxytocinergic responses agree with the augmented natriuresis and kaliuresis induced by Ang II in amphetamine exposure animals. Furthermore, the AT₁-R desensitization/inactivation due to repeated amphetamine exposure could explain the neuronal activation profile in response to Ang II icv.

The results of this thesis clearly show that the neuroadaptive changes induced by amphetamine involve alterations in brain RAS. They also support the view that the duration of these changes involves the AT₁-R activation. Moreover, our results show the inflammatory effects of amphetamine and the key role of the AT₁-R in this phenomenon.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. ANFETAMINA

Actualmente, el uso de drogas psicoestimulantes como cocaína, anfetamina y sus derivados se ha incrementado notablemente, representando un problema sanitario serio para nuestra sociedad, según el informe 2013 de la ONU. Los efectos clásicos de estas drogas son: el aumento del ritmo cardíaco y de la presión arterial, además de alteraciones en el comportamiento, como la vigilia, mejor desempeño en tareas ejecutivas y euforia.

En particular, la anfetamina es un derivado químico de la efedrina, que fue sintetizado por primera vez en 1887. Las investigaciones preliminares se enfocaron en sus efectos a nivel periférico, describiéndola como una amina simpaticomimética con propiedades broncodilatadoras. Las acciones sobre el sistema nervioso central (SNC) no se reportaron hasta 1933. En este sentido, se ha descrito que la anfetamina es una de las aminas simpaticomiméticas más potentes para estimular el SNC [7]. La anfetamina puede modular la plasticidad sináptica a través de la modulación de los sistemas glutamatérgicos y dopaminérgicos. La actividad funcional de estos sistemas está implicado en la regulación de procesos conductuales que incluyen la cognición, el estado de ánimo, la conducta motivada, procesos hedónicos, adicción y excitación [8]. Por la capacidad de anfetamina para influir sobre estos sistemas, se la utilizó para el tratamiento de diferentes afecciones como la narcolepsia, la obesidad, la depresión, el trastorno de déficit de atención con hiperactividad (TDAH), en casos de sobredosis por sedantes e incluso en la rehabilitación del alcoholismo y hábito de otras drogas de abuso [9]. La venta indiscriminada del producto, asociada al desconocimiento público respecto de sus peligros potenciales y a la ausencia de un sistema idóneo de farmacovigilancia, desencadenó fenómenos de abuso y adicción. En 1971, la anfetamina fue sometida a control internacional en el marco de la Convención Internacional de Psicotrópicos. Actualmente, es una sustancia controlada sujeta a fiscalización, pero accesible en la mayoría de los países, su uso se encuentra aprobado por la FDA (Food and Drug Administration) sólo para el tratamiento del TDHA y de la narcolepsia [10, 11].

La anfetamina, es un agente adrenérgico de acción indirecta que produce liberación central de monoaminas, como la dopamina (DA) y noradrenalina (NA). Estimula también

la liberación de serotonina e inhibe, asimismo, su recaptación. En su calidad de amina simpaticomimética con actividad estimulante sobre el SNC, inhibe la recaptación y aumenta la liberación de monoaminas a través de: redistribución de las catecolaminas de las vesículas presinápticas al citosol, transporte inverso de los neurotransmisores a través de los transportadores de membrana y bloqueo de la actividad de esos transportadores, disminución en la expresión de los transportadores de DA en la superficie celular, aumento de los niveles citosólicos de monoaminas por la inhibición de la activación de la monoamino oxidasa (MAO), y un aumento en la expresión de la enzima tirosina hidroxilasa (TH), que permite la formación de dihidroxifenilalanina (DOPA) (Figura 1) [12]. Las vías dopaminérgicas son las que participan en los efectos producidos por la exposición aguda a psicoestimulantes y en el fenómeno de sensibilización (tolerancia inversa) [13].

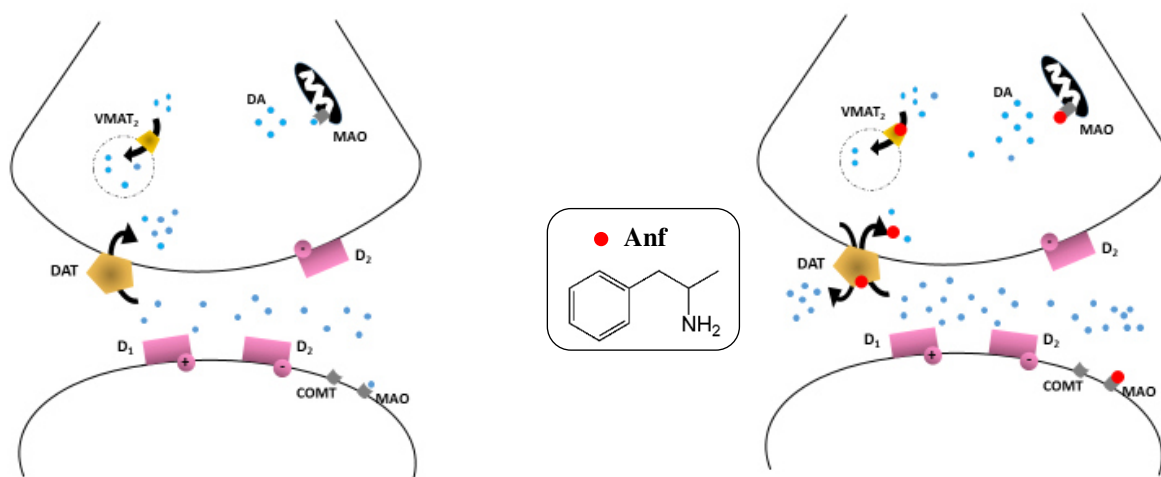


Figura 1: *Izquierda:* Síntesis y sinapsis dopaminérgica en estado basal; se esquematizan la síntesis, almacenamiento, liberación, recaptación y metabolismo de DA, además de sus receptores. *Derecha:* Estructura química y mecanismo de acción de la anfetamina en la trasmisión dopaminérgica; los círculos rojos indican los sitios de acción de anfetamina. DA: dopamina; VMAT₂: transportador vesicular de monoaminas; MAO: monoamino oxidasa; DAT: trasportador de dopamina; COMT: catecol O-metiltransferasa; D₁: receptor dopaminérgico D₁; D₂: receptor dopamnérnico D₂; Anf: anfetamina.

2. EL SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA

El Sistema Renina-Angiotensina (RAS), participa en el control del balance hidroelectrolítico y en la regulación de la presión arterial, ejerciendo sus efectos a nivel del músculo liso vascular, la corteza adrenal, el riñón, el corazón, el sistema simpático y del SNC. Tigerstedt y Bergman (1898) [14], descubrieron un agente presor extraído del riñón que fue llamado renina. Cuarenta y dos años más tarde, este hallazgo condujo a Braun-Menéndez y colaboradores al aislamiento de un agente vasoconstrictor de los riñones isquémicos de perros hipertensos Goldblatt [15], un octapéptido que fue llamado de varias maneras sustrato de la renina, angiotonina, e hipertensina y finalmente angiotensina II (Ang II). El mismo año Page y Helmer (1940), de forma independiente aislaron el mismo agente después de una inyección de renina en animales y también se identificó un “activador de la renina”, el angiotensinógeno [16].

El principal efector del RAS es la Ang II, que produce vasoconstricción, liberación de aldosterona, retención de sodio y agua, estimulación del consumo de líquido y posee un rol clave en la regulación de la presión arterial y la homeostasis de fluidos [17, 18]. Las múltiples funciones de Ang II están mediadas por complejos sistemas de transducción de señales que se inician cuando este péptido se une a su receptor fisiológicamente activo, AT₁ (R-AT₁) y produce activación de proteínas intracelulares que intervienen en diversas respuestas biológicas. La Ang II se une principalmente a dos tipos de receptores, AT₁ y AT₂ (R-AT₂), ambos pertenecientes a la familia de receptores de siete dominios transmembrana acoplados a proteína G. La estimulación de los R-AT₁ produce vasoconstricción y aumento de la presión arterial, aumento en la ingesta de agua y sodio, liberación de aldosterona, vasopresina, oxitocina (OT), catecolaminas y proliferación celular vascular [19, 20]. La activación de R-AT₂ regula efectos opuestos y suelen asociarse con diferenciación celular y procesos de apoptosis [21].

Los componentes del RAS se encuentran en las paredes de los vasos sanguíneos [22]. Además, hay sistemas tisulares de renina-angiotensina, en ojos, porción exocrina del páncreas, corazón, tejido adiposo, corteza suprarrenal, testículo, ovario, hipófisis y cerebro. Numerosos estudios mostraron que la Ang II es sintetizada de forma local y regulada selectivamente en distintos órganos, indicando que la Ang II tisular juega un importante rol en distintos tejidos del organismo [23-25].

2.1. Síntesis, Metabolismo y Receptores de Angiotensina II

La renina (proteasa secretada por las células yuxtaglomerulares del riñón) actúa sobre el angiotensinógeno, una alfa₂- globulina, liberando un decapeptido inactivo, la angiotensina I (angiotensina-[1-10]). Este decapeptido es clivado por una ectoenzima, la enzima convertidora de angiotensina (ACE), que hidroliza a la Ang I en su región carboxi-terminal, produciendo la Ang II activa (angiotensina-[1-8] octapéptido). La Ang II es la encargada de generar la mayoría de respuestas en las células blanco; ésta a su vez es hidrolizada por una aminopeptidasa A, convirtiéndose en angiotensina III (angiotensina-[2-8] heptapéptido), y ésta a su vez es convertida a Ang IV por la aminopeptidasa N. Alternativamente la Ang IV también puede ser formada por aminopeptidasas que actúan sobre la Ang I, antes de ser ésta convertida a Ang II por la ACE. Existe además la Ang (1-7), otro fragmento neuroactivo, que puede ser formado por clivaje de la Ang I vía prolyl-endopeptidasas o por el clivaje de la Ang II vía ACE-2 o vía carboxi-peptidasa-P. Además, Ang IV se puede convertir en Ang (3-7) por la carboxi-peptidasa-P y por prolyl-oligopeptidasa (Figura 2) [26].

Existen cuatro subtipos de receptores de Ang reconocidos [27]: R-AT₁, R-AT₂, receptor subtipo AT₄ (R-AT₄) y receptor Mas. Los subtipos principales, AT₁ y AT₂ están acoplados a proteínas G, y presentan una conformación de siete dominios transmembrana [28-30], mientras que el subtipo AT₄ es una proteína más insensible a los nucleótidos de guanina, lo que sugiere que no está ligado a la proteína G [17, 31].

Se ha descrito que la Ang I es biológicamente inactiva, mientras que Ang II y Ang III son agonistas totales de los R-AT₁ y R-AT₂. En tanto que la Ang IV se une con baja afinidad a los R-AT₁ y R-AT₂, pero con alta afinidad y selectividad al R-AT₄. La Ang (3-7) también se une al R-AT₄, mientras que la Ang (1-7) se une al receptor Mas [26] (Figura 2).

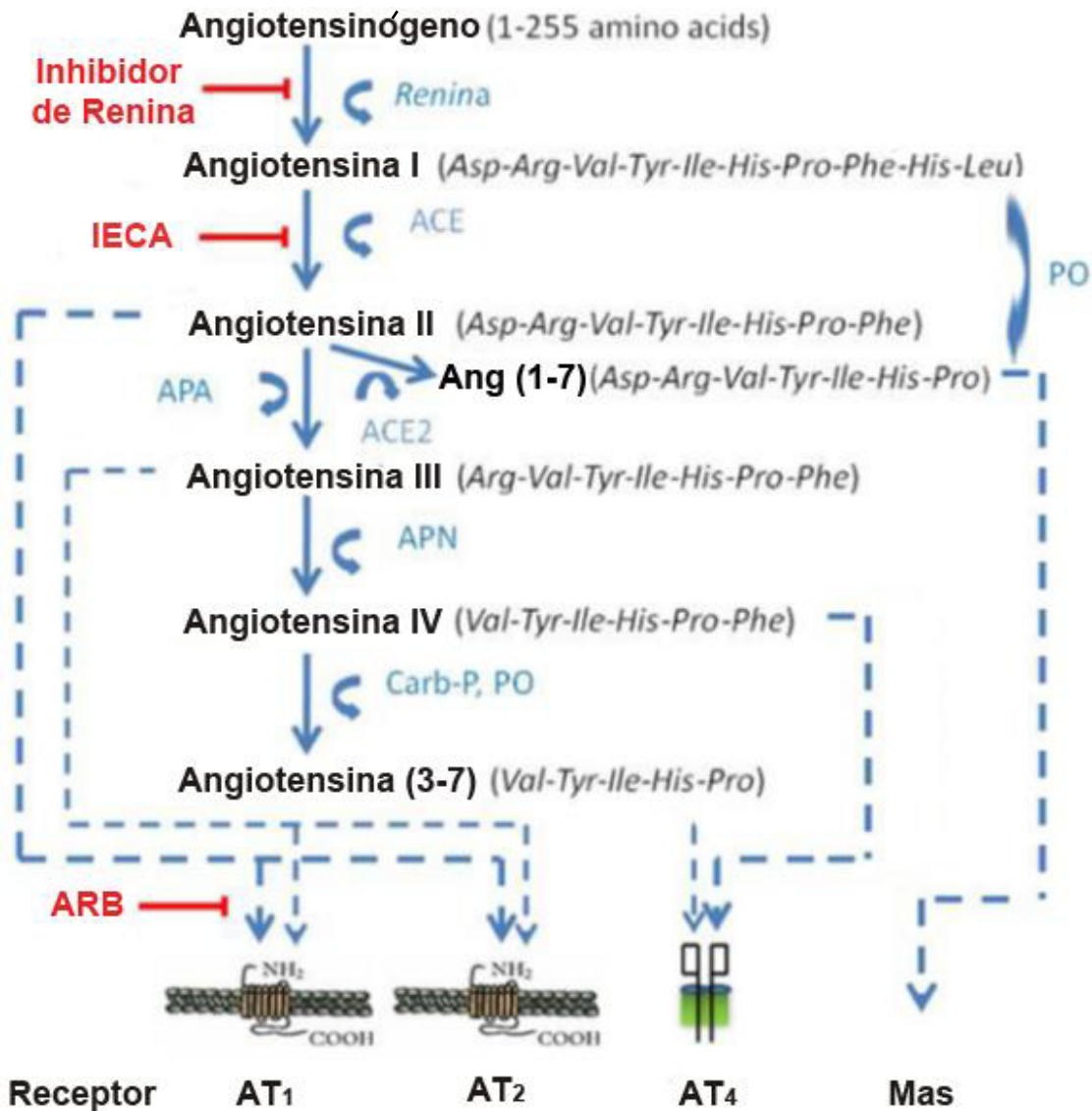


Figura 2: Síntesis y metabolismo de las angiotensinas circulantes. Ang: angiotensina; ACE: enzima convertidora de angiotensina; APA: aminopeptidasa A; APN: aminopeptidasa N; Carb-P: carboxi-peptidasa P; PO: propyl-oligopeptidasa; ARB: bloqueante del receptor de angiotensina II (modificado de Wright y col, 2013) [26].

2.2. Receptor AT₁

El subtipo R-AT₁, se encuentra principalmente en animales adultos [32], es reconocido por mediar la mayor parte de las acciones atribuidas a la Ang II [22]. Está constituido por 359 aminoácidos y tiene una masa molecular de 41 kDa (Figura 3). El genoma humano contiene un único gen que codifica para dicho receptor, localizado en el cromosoma 3 [33]. En su dominio extracelular se encuentran localizados cuatro residuos

cisteína, los cuales conforman su estructura terciaria (Figura 3). Al igual que la mayoría de los receptores acoplados a proteína G, el R-AT₁ también está sujeto a internalización cuando es estimulado por Ang II [17, 34-36], presenta señalización a través de la fosfolipasa C y del Ca²⁺. Así, el ligando Ang II se une a éste e induce un cambio conformacional del receptor que activa a la proteína G, y a su vez, media la traducción de señales. Esto implica varios mecanismos de transducción de la membrana plasmática incluyendo fosfolipasa C, D, A2 y de adenilato ciclasa, además de canales de Ca²⁺ sensibles al voltaje tipo T y tipo L [17, 37]. Se conoce que la activación de la fosfolipasa A2 y D, estimula la liberación del ácido araquidónico, precursor de la generación de prostaglandinas.

Más específicamente, la estimulación del R-AT₁ permite el acoplamiento con proteína G_q, promoviendo la hidrólisis del fosfatidilinositol-4,5-difosfato (PIP₂) por acción de la fosfolipasa C, generando inositol-1,4,5-trifosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG). El IP₃ permite la salida masiva del ión Ca²⁺ del retículo endoplásmico al citoplasma, incrementa su concentración intracelular y favorece la activación de proteína quinasa C (PKC). La acción sinérgica de IP₃/Ca²⁺ y DAG promueve la vasoconstricción. El DAG activa a PKC y unido al ión Ca²⁺ en altas concentraciones intracitoplasmáticas, favorece la expresión de factores de transcripción que promueven la proliferación y el crecimiento celular [21]. En cambio, la estimulación del R-AT₁ acoplado a proteína G_i, inhibe la adenilato ciclasa en varios tejidos, hígado, riñón y glándula adrenal, disminuyendo la formación del segundo mensajero adenosín monofosfato cíclico (AMPC), lo que favorece el efecto de vasoconstricción. El R-AT₁ también ejerce su acción mediante la apertura de canales de Ca²⁺, y provoca el influjo de cationes hacia el interior de la célula. Este mecanismo se ha vinculado a la estimulación de Ang II, quien regula la producción y secreción de aldosterona y la vasoconstricción [17]. Se postula, que el R-AT₁ activaría otras vías, independientes a proteína G, como por ejemplo la que media la respuesta de ingesta de sodio inducida por administración de Ang II intracerebroventricular (icv.). [38, 39]. Otro camino independiente de proteína G, es el que involucra la activación de proteínas, que incluyen proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPK), janus quinasas (JAK) y proteínas transductoras de señales y activadoras de la transcripción (STAT) [40]. Por medio de β-arrestinas o por acción de una gran variedad de proteínas, se promueve la desensibilización del R-AT₁ por internalización [41].

La activación del R-AT₁ induce contracción del músculo liso, esteroidogénesis adrenal, secreción de aldosterona, activación neuronal, neurosecreción, transporte de

iones, crecimiento y proliferación celular [17]. Un espectro funcional más complejo y generalizado para los R-AT₁ de Ang II, indica la participación en el control central del sistema endócrino y funciones autonómicas, además de estar involucrado en respuestas conductuales [32, 42-47].

En los roedores se han identificado dos isoformas del R-AT₁, los AT_{1A} y AT_{1B}, que son codificados en diferentes genes, pero presentan una gran semejanza en su localización, afinidad por el ligando y propiedades de activación [17]. El subtipo AT_{1A} se encuentra en las paredes de los vasos sanguíneos, cerebro, hígado, riñón, aorta, útero, ovario, bazo y pulmón, media la mayoría de los efectos conocidos de la Ang II y parece ser responsable de las funciones clásicas asociadas al RAS cerebral. El receptor AT_{1B} se encuentra expresado en hipófisis, glándula adrenal, riñón, útero e hígado, y está ausente en el corazón, bazo y cerebro [48]. Los receptores AT_{1A} están predominantemente involucrados en la regulación del tono vascular y reabsorción de sodio en la periferia, así como en la respuesta presora de Ang II en el SNC, mientras que los AT_{1B} son necesarios para la respuesta dipsogénica inducida por la hormona en el SNC [49].

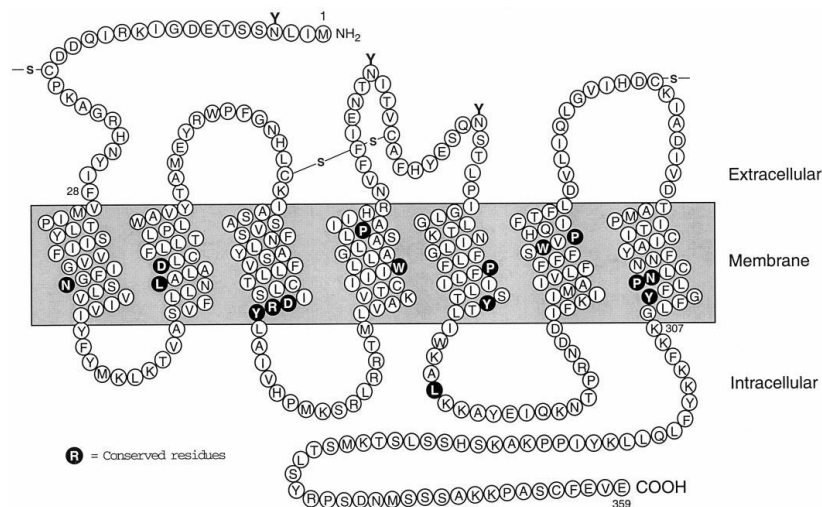


Figura 3: Secuencia consenso y estructura secundaria de R-AT₁ de Ang II en mamíferos [17].

Se ha reportado que la estimulación del R-AT₂ antagoniza varios de los efectos inducidos por la activación del R-AT₁, ya que promueven la apoptosis, inhibición de la proliferación celular, diferenciación y regeneración celular [17]. Actúan mediante proteína G_i para activar fosfatasas, abren canales de potasio y carecen de internalización y desensibilización. Los R-AT₂ son más abundantes en la etapa fetal (etapa de desarrollo

cerebral), disminuyen drásticamente luego del nacimiento, quedando en el adulto recluidos a algunos tejidos, como el cerebro [32].



Subtipos	AT _{1A} y AT _{1B}	-
Estructura	7-TM 359 aa	7-TM 364 aa
Tamaño molecular	41-42 KDa	40-41 KDa
Mayor Afinidad	Ang II	Ang III
Señalización	Proteína G IP ₃ , Ca ²⁺ MAPK JAK/STAT...	Proteína G PTP bradiquinina NO/GMPc...
Localización	Riñón, hígado, corazón, vasos, adrenales y cerebro	
Acciones	Vasoconstricción ↑ Hipertensión ↑ Reabsorción de sodio ↑ Sed y apetito por sodio ↑ Hipertrofia, remodelación cardíaca y vascular ↑ Depósito de colágeno, y la fibrosis Estimulación simpática ↑ Inflamación ↑ Secreción de: aldosterona, endotelina, vasopresina y ACTH...	Vasodilatación Anti-hipertensión ↑ Diuresis y natriuresis Anti-proliferación Anti-fibrosis Anti-crecimiento vascular Anti-inflamación Participación en la embriogénesis...

Figura 4: Características de los principales receptores de Ang II. Abreviaturas: 7-TM: 7 dominios transmembrana; IP₃: inositol-1,4,5-trifosfato; PTP: proteína tirosina fosfatasa; MAPK: proteína quinasa activada por mitógeno; JAK: janus quinasa; STAT: proteína transductora de señales y activadora de la transcripción; ACTH: hormona adrenocorticotrofina; GMPc: guanosín monofosfato cíclico; NO: óxido nítrico (modificado de Jugdutt, 2006 y de Zhuo y Li, 2011;).[27, 50]

2.3. Antagonistas no peptídicos de los receptores de Angiotensina II: Candesartan cilexetilo

El candesartan cilexetilo es un antagonista no peptídico selectivo de los R-AT₁ de Ang II (Figura 5), es el antagonista de R-AT₁ que presenta mayor afinidad al receptor y una selectividad 10.000 veces más fuerte para AT₁ que para AT₂. Inhibe todos los efectos

de Ang II mediada por estos receptores [22], por ende su acción es independiente de las vías de síntesis de la Ang II. Se encuentra en el mercado como candesartan cilexetilo, prodroga, que al ser administrada por vía oral (vo.), se absorbe en el tracto gastrointestinal y se convierte en candesartan (Cand) mediante la hidrólisis del éster. Es ampliamente utilizado como anti-hipertensivo. Su biodisponibilidad absoluta es aproximadamente del 15% y no se ve afectada por los alimentos. Las concentraciones máximas de candesartan se alcanzan 3-4 h después de una dosis oral. Posee una alta unión a proteínas plasmáticas (>99%) y no penetra en los eritrocitos. La semivida de eliminación es de 9-12 h y se realiza por vía urinaria y biliar [22]. La administración periférica de candesartan bloquea no sólo los R-AT₁ periféricos sino también los cerebrales, ya que atraviesa la barrera hematoencefálica (BHE) [2, 51]. Se ha demostrado, que se une de manera competitiva al receptor, que se disocia de forma lenta (antagonista insalvable) y una vez disociado se vuelve a unir al receptor, prolongando de esta manera su acción [52]. Se ha descrito, que la administración oral de candesartan en ratas, antagoniza la respuesta hipertensiva inducida por una inyección intravenosa de Ang II en un 75%, hasta 24 h después. Todo esto, representaría una ventaja terapéutica, dado que se evita el efecto rebote frente a la interrupción del tratamiento [52]. También se conoce, que el tratamiento prolongado con candesartan vo. causa una disminución de la densidad de los R-AT₁ en distintas áreas cerebrales, hipófisis y glándula adrenal, además de bloquear los efectos de Ang II icv. [51].

La inhibición central del R-AT₁ por la administración periférica de candesartan, permitió esclarecer el rol de estos receptores en el cerebro en condiciones fisiológicas y patológicas [2], así como también sus consecuencias.

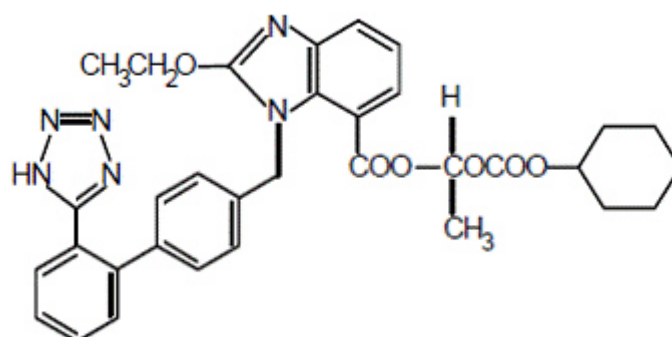


Figura 5: Estructura química del candesartan cilexetilo.

2.4. Sistema renina-angiotensina cerebral

La presencia del RAS cerebral, se confirmó inicialmente en estructuras ubicadas fuera de la BHE, en los órganos circunventriculares (CVO): órgano vasculoso de la lámina terminal (OVLT), órgano subfornical (SFO) y eminencia media (ME) [32]. La Ang II periférica no atraviesa la BHE en condiciones fisiológicas, pero estimula los R-AT₁ de CVO, aumentando la ingesta de sodio y agua, la presión arterial y la secreción de hormonas (vasopresina, OT, hormona adrenocorticotrofina -ACTH-), indicando de esta manera la acción central de la Ang II periférica. [25, 32, 53-55]. Posteriormente, las evidencias permitieron establecer la existencia de un RAS cerebral endógeno o sistema de Ang II “central”, que origina Ang II propia-endógena que estimula los receptores dentro de la BHE [22, 25, 32]. Además, mediante métodos autoradiográficos se determinó la localización neuroanatómica de los receptores de Ang II, hallándose en astrocitos y oligodendrocitos y principalmente en neuronas [32, 49, 56]. También se demostró una conexión fisiológica entre la acción de Ang II periférica y la Ang II central, a través de la estimulación de los R-AT₁ localizados en los CVO [57, 58].

Se han determinado todos los componentes del RAS a nivel cerebral [32, 59]:

- El angiotensinógeno cerebral se encuentra principalmente a nivel extracelular. Es una α 2-globulina de 453 aminoácidos, sintetizado principalmente por astrocitos aunque también por neuronas. El angiotensinógeno es secretado al fluido extracelular de forma constitutiva [60-63].
- La renina es una aspartilproteasa ácida presente en el cerebro en bajas concentraciones, que actúa a nivel intracelular. Se encuentra en las terminales nerviosas y es liberada por despolarización inducida por potasio o mediante estimulación eléctrica [64-66].
- La ACE es una enzima metalopeptidasa que, además de producir el clivaje en el C-terminal del péptido de Ang I para generar Ang II, inactiva péptidos vasodilatadores, como bradicinina y sustancia P. Es una enzima ampliamente distribuida en el SNC, encontrándose altas concentraciones en el plexo coroideo, CVO y en el líquido cefalorraquídeo (LCR) [67, 68]. Además, se encuentra en las células endoteliales de los ventrículos, en la superficie endotelial de los vasos sanguíneos y en las membranas plasmáticas neuronales [69-71].

- La enzima ACE-2 es un homólogo de la ACE, con la cual comparte un 40% de homología [72]. La ACE-2 actuando sobre la Ang II, da lugar a la formación de Ang (1-7), péptido vasodilatador. Se ha visto que la sobreexpresión de la ACE-2 en el SFO, reduce las respuestas presora y dipsogénica inducidas por Ang II aguda [73] y podría ser considerada como un nuevo blanco para el estudio de la hipertensión de origen central [74].
- La Ang II cerebral es independiente de la Ang II plasmática y es esencial para el sistema intrínseco cerebral [75, 76]. La Ang II es considerada un neuropéptido activo muy importante dentro de las angiotensinas, aunque se han establecido roles fisiológicos también significativos para sus metabolitos. La Ang II se genera en el cerebro por la vía clásica de síntesis (mediada por la renina y la ACE) y por vías alternativas (a través de catepsina G o tonina). En el cerebro se encuentra dentro de las vesículas sinápticas en las terminales nerviosas, las cuales establecen contacto con otras neuronas sin especialización sináptica [71].
- Los receptores de Ang II cerebrales, se encuentran en áreas del SNC relacionadas con el control endócrino, la función cardiovascular y en núcleos del sistema límbico y motor. Al igual que Ang II, estos receptores se encuentran ubicados en neuronas, astrocitos, oligodendrocitos y vasos cerebrales [32, 77, 78].

2.4.1. Angiotensina II cerebral y regulación del sodio

La Ang II periférica participa en la regulación del sodio, en forma directa aumentando la reabsorción del ion en el túbulo proximal e indirectamente a través de la estimulación de la liberación de aldosterona de la corteza adrenal [79]. La pérdida renal de sodio se compensa a través de cambios en la ingesta de agua y sodio, regulados a nivel central [80], involucrando no sólo los niveles de sodio plasmático, sino también la Ang II cerebral y los mineralocorticoides [81]. La Ang II cerebral regula los niveles de sodio plasmático mediante el control del consumo de sodio y la modulación de los mineralocorticoides y de la excreción de sodio urinario [82]. Se ha demostrado que la administración icv. de Ang II en mamíferos, no sólo produce un aumento de la excreción renal de sodio, sino además de potasio [83]. La administración central o periférica de Ang II exógena, también estimula la ingesta de sodio y agua [84-86], pero se requieren dosis altas de Ang II a nivel sistémico para producir ingesta de sodio y sólo ocurre con

posterioridad a un aumento de aldosterona, indicando de esta manera que la estimulación de la ingesta es principalmente regulada por Ang II cerebral [82, 84]. La administración previa de bloqueantes de los R-AT₁ (ARBs) suprime la ingesta de agua y sodio inducida por Ang II inyectada central o periféricamente [31]. De esta misma manera, alteraciones en los niveles de sodio dietarios y plasmáticos afectan al sistema de Ang II cerebral. Se ha comprobado que una depleción de sodio en ratas, disminuye el número de receptores de Ang II en el SFO [87, 88], mitigando las acciones de Ang II icv. sobre las respuestas presoras y dipsogénicas [89]. Por otro lado, Ang II icv. facilita la liberación noradrenérgica en hipotálamo de ratas espontáneamente hipertensas (SHR), animales con una exacerbación del RAS, respuesta que se inhibe con una dieta baja en sodio [90].

Por el contrario, un exceso de sodio puede estimular al RAS cerebral, originando un aumento en el número de receptores de Ang II en el núcleo medio preóptico y en el SFO, en animales hipertensos (tratados con acetato de desoxicorticosterona -DOCA-) [91].

Por otro lado, se conoce que la Ang II icv. a través de sus R-AT₁, estimula la excreción de sodio urinario vía disminución de la actividad de la renina plasmática (PRA), disminución que sería mediada por la inhibición de la actividad del nervio simpático renal (RSNA) [92, 93].

2.4.2. Distribución de Receptores de Angiotensina II en el cerebro

En todas las especies de mamíferos estudiados incluso en humanos, los R-AT₁ y R-AT₂, presentan una distribución cerebral similar, pero no idéntica. [94, 95]. Los R-AT₁, están localizados en áreas cerebrales relacionadas con el control de funciones neuroendócrinas y la regulación autónoma de los sistemas límbico y cardiovascular [25, 96], mientras los R-AT₂ están involucrados en la organogénesis y en funciones de los sistemas motor y sensorial [96-99]. Asimismo, el RAS cerebral participa no sólo del control de la presión arterial, sino también de la modulación de otras funciones [100, 101] que incluyen procesos sensoriales [42, 102], aprendizaje y memoria [103-105] y la regulación de respuestas conductuales [106], emocionales [102] y del flujo sanguíneo cerebral [32].

Área cerebral	Receptor AT ₁	Receptor AT ₂
Amígdala	*	*
Caudado putamen	*	*
Corteza cerebral	*	
Corteza piriforme	*	*
Eminencia media	*	*
Globo pálido	*	
Hipocampo	*	*
Hipófisis anterior	*	
Núcleo de la oliva inferior		*
Locus coeruleus		*
Núcleo accumbens	*	
Núcleo del tracto solitario	*	*
Núcleo paraventricular	*	*
Núcleo supraóptico	*	
Organo subfornical	*	*
Organo vasculoso de la lamina terminal	*	
Tálamo		*
Sustancia nigra	*	

Tabla 1: Distribución de los receptores AT₁ y AT₂ en algunas de las áreas cerebrales de interés, identificados en cerebro de mamíferos. Los * representan presencia del subtipo de receptor (modificado de Wright y Harding, 2008; Saavedra, 1992; Premer y col, 2013 [31, 32, 107]).

3. ESTRÉS

3.1. Bloqueo de R-AT₁ cerebrales: Efectos anti-estrés

Un gran número de evidencias sustentan el rol clave de Ang II en la respuesta de estrés, incluyendo la regulación del sistema simpático y neuroendócrino [8-10]. Se ha demostrado la presencia de R-AT₁ en distintos niveles del eje hipotálamo-hipofiso-adrenal (HPA) [108-110], con mayor densidad en áreas relacionadas con la respuesta a estrés,

como el núcleo paraventricular (PVN) [110, 111], la ME, la hipófisis anterior, la zona glomerular y medular de la glándula adrenal [112]. Asimismo, se ha visto que la exposición a estrés, promueve un aumento en los niveles de Ang II periférica y cerebral [113, 114], un aumento en la densidad de los R-AT₁ en el PVN, hipófisis anterior [115] y en neuronas que sintetizan la hormona liberadora de corticotrofina (CRH) [112, 116]. De acuerdo con esto, se ha encontrado que la estimulación del R-AT₁ por Ang II induce un aumento en la producción de CRH [110, 117], hormona que una vez en circulación aumenta la liberación de ACTH desde la hipófisis [118]. En este sentido, niveles elevados de glucocorticoides adrenales, debido a estrés, inducen un aumento en la expresión de los R-AT₁ en el PVN [117]. Además, una gran cantidad de evidencia muestra un papel clave de Ang II en la respuesta a estrés [108, 109, 111].

Por otro lado, la estimulación de los R-AT₁, aumenta la síntesis y liberación de NA a nivel central [32]. El pretratamiento con antagonistas de los R-AT₁, impide la respuesta simpática al estrés por aislamiento [108] e impide la expresión de ARNm de la TH en locus coeruleus (área que participa en la estimulación simpática central inducida por estrés) después de la administración central de la Ang II [51]. Además la administración previa de candesartan, potente antagonista AT₁, revierte el aumento en la expresión de TH en el locus coeruleus producido por inmovilización en frío en ratas [43, 119]. Este estrés, produce un aumento en la densidad de R-AT₁ en amígdala basolateral (BLA) y ME y un aumento en la densidad de R-AT₂ en los núcleos de la oliva inferior y disminución de los mismos en el núcleo ventrolateral del tálamo [119]. Todas estas evidencias, sugieren que los R-AT₁ participan en el control de la actividad simpática central, a través de la regulación de la transcripción de la TH, enzima limitante de la síntesis de catecolaminas.

Por otro lado, el tratamiento previo con candesartan impidió la formación de lesiones gástricas producidas por la inmovilización en frío en ratas [5]. Esto sugiere que el antagonismo de los R-AT₁ periféricos y cerebrales podrían ser de gran importancia terapéutica en el control de la respuesta a estrés [108].

La Ang II, a través de sus R-AT₁ estaría relacionada con la respuesta de ansiedad, es así que la sobreexpresión de los R-AT₁ en ratones que carecen de R-AT₂ se asoció con un comportamiento ansioso [120], mientras que la administración periférica de candesartan redujo la respuesta de ansiedad en roedores [121].

Se conoce que la hiperreactividad del eje HPA central y la síntesis de CRH, están estrechamente relacionadas con las respuestas de ansiedad y estrés [122, 123]. Por otro lado, se ha demostrado la participación de los R-AT₁ en las respuestas extra-hipotalámicas

a estrés. En relación con esto último, el pretratamiento con candesartan, previno la disminución de los receptores CRH₁ y del complejo ácido gama amino butírico-A (GABA_A) en la corteza cerebral, inducida por estrés por aislamiento [43], indicando que el antagonismo AT₁ ejerce una función anti-estrés a través de la modulación de tres sistemas corticales: CRH, GABA y noradrenérgico. Estos animales fueron testeados a su vez, en el laberinto en cruz elevado (*Plus Maze*), test de ansiedad, y se observó que el tratamiento previo con candesartan produjo un claro efecto ansiolítico [43], similar al encontrado luego de la administración periférica de otros antagonistas AT₁ [124, 125] o de la administración de antagonistas para el receptor CRH₁ [43, 126, 127].

Todas estas evidencias soportan un rol clave de los receptores AT₁, no sólo en la regulación de las respuestas endócrinas y autonómicas al estrés, sino también conductuales [42, 43, 128] que son controladas por centros cerebrales superiores como la amígdala y la corteza; áreas involucradas en el procesamiento de la información sensorial y las respuestas conductuales al estrés.

3.2. Estrés y drogas psicoestimulantes

La respuesta fisiológica cerebral inducida por estrés, involucra la liberación de hormonas (aminas biogénicas y esteroides adrenales), que activan el mismo circuito neuronal que las drogas de abuso, como cocaína o anfetamina. En este sentido, la administración de cocaína aumenta los valores en plasma de ACTH y CRH en ratas y se conoce, que un aumento en los niveles de CRH circulante es crucial para disparar conductas de auto-administración de psicoestimulantes, así como también para sensibilizar al animal con bajas dosis de droga [129]. Además, el estrés agudo aumenta la secreción de glucocorticoides, que actúan sobre sus receptores dopaminérgicos neuronales, produciendo la liberación de DA y sensibilizando la respuesta del animal a una exposición de cocaína [130]. A nivel conductual, un estresor físico o psicológico, aumenta la auto-administración a un psicoestimulante e incrementa la eficacia de recompensa ofrecida por la droga, incitando de esta manera a un mayor consumo de la misma. Una nueva exposición a estrés, en ratas durante el período de abstinencia, reinstala el comportamiento de búsqueda de la droga [131]. Aquellos animales que reaccionan de manera exacerbada a estrés o al psicoestimulante, son más propensos a auto-administrarse glucocorticoides, del mismo modo que lo hacen con los psicoestimulantes [132]. Estos estudios sugieren que

experiencias previas de estrés modifican las respuestas a las drogas de abuso. Otros estudios, realizados en adictos a la heroína tratados con metadona, mostraron una sensibilidad atípica al estrés, similar a la respuesta atípica al estrés en el HPA que se ha encontrado en adictos abstinentes a la cocaína [133, 134]. Estos resultados muestran que una respuesta atípica al estrés podría contribuir al uso compulsivo de drogas de abuso [135]. Además, según estos antecedentes, la actividad del eje HPA juega un papel importante en diferentes fases de la adicción a las drogas [136, 137].

3.3. Relación entre la Angiotensina II cerebral y las drogas psicoestimulantes: Sistema dopaminérgico

Las drogas psicoestimulantes, al igual que el estrés, activan el sistema dopaminérgico central, un componente clave en el circuito de recompensa del cerebro, la motivación y la conducta [138]. La sensibilización inducida por psicoestimulantes involucra una respuesta neuroadaptativa en el sistema dopaminérgico mesocorticolímbico [139, 140]. De la misma forma, la experiencia previa con un estímulo estresante, activa esta vía [141, 142]. Se ha demostrado que se produce un aumento en los niveles de DA en las terminales del sistema dopaminérgico, en respuesta tanto a procesos motivacionales positivos, inducidos por reforzadores naturales (alimento, agua o sexo) o por reforzadores sociales (drogas de abuso) [143-145], como a estímulos aversivos (situaciones de estrés) [141, 142]. Los psicoestimulantes, como anfetamina o cocaína, aumentan los niveles de DA en estructuras que conforman el sistema mesocorticolímbico como núcleo accumbens (NAc), caudado putamen (CPu) y corteza media prefrontal (CmPF) [146].

Por otro lado, existe una estrecha relación entre Ang II cerebral y el sistema catecolaminérgico [147, 148] en el control cardiovascular, la dipsogénesis y otros comportamientos más complejos. Además R-AT₁ de Ang II se encuentran en áreas dopaminérgicas [149, 150], NAc y CPu, áreas fuertemente relacionadas con la auto-administración y la sensibilización a drogas de abuso [151]. Los receptores de Ang II se encuentran además, en el soma y en las terminales de las neuronas dopaminérgicas y se ha demostrado que la Ang II, a través de sus R-AT₁, facilita la liberación de DA en el cuerpo estriado de ratas [152]. Incluso, algunos estudios indican que la Ang II podría regular conductas relacionadas con la recompensa, principalmente mediadas por el sistema dopaminérgico mesocorticolímbico. En este sentido, se demostró que Ang II icv. produce

un aumento en la concentración de DA extracelular en NAc, relacionada con la conducta de ingesta de líquido [153]. También se demostró que una administración aguda periférica o central de losartan (antagonista AT₁), disminuye los niveles elevados de DA inducidos por una administración de Ang II [152]. Además, la evidencia sostiene un importante rol de Ang II, a través de R-AT₁, en funciones principalmente mediadas por los sistemas dopaminérgicos [154]. En este sentido, la administración Ang II icv. aumentó la actividad exploratoria en ratas, esta respuesta fue potenciada por la administración de apomorfina (APO, agonista de receptores de DA) y disminuida por acción de antagonistas dopaminérgicos [147].

Como consecuencia de la exposición a noxas ambientales o farmacológicas se producen cambios duraderos en el tiempo en el SNC, este fenómeno se conoce como neuroplasticidad. Ésta, permite modificar la eficiencia de futuras respuestas a estímulos basándose en la experiencia previa. La exposición aguda o repetida a psicoestimulantes no sólo genera una respuesta sensibilizada de los circuitos de recompensa [155, 156], sino que también modifica la conducta a través de procesos de aprendizaje y memoria [157, 158]. En este sentido, la Ang II participa en procesos de neuroplasticidad, ya que se demostró una auto-potenciación en los efectos hipertensores de Ang II, por administración (icv.) repetida de dosis sub-presoras de este péptido [159]. Además, existe evidencia indirecta de que el RAS participaría en el desarrollo de cambios neuroadaptativos relacionados con la sensibilización conductual y neuroquímica, tanto a reforzadores naturales como a drogas de abuso.

Se ha comprobado, que la sensibilización conductual no está limitada sólo a las drogas, sino que puede ser inducida por la alteración de ciertos estados motivacionales o afectivos (sed, hambre) asociados con reforzadores naturales (agua, sal, comida). Así, una historia previa de depleciones repetidas de sodio, lo que activa el RAS y la síntesis de Ang II central y periférica, produce un aumento en la ingesta de sodio. El aumento en el apetito por el sodio, fue paralelo a un aumento en la activación neuronal (aumento de inmunoreactividad a Fos) en núcleos cerebrales asociados con la motivación y la recompensa, como el NAc entre otros [160]. Por otro lado la sensibilización a anfetamina, se ha asociado con alteraciones en la morfología de las neuronas en el NAc [8]. En este sentido, una depleción de sodio repetida, produce sensibilización cruzada con anfetamina del mismo modo que la administración de anfetamina promueve el apetito por soluciones ricas en NaCl [161, 162]. El mismo fenómeno se demostró utilizando morfina [163]; y recientemente se describió la sensibilización conductual cruzada entre la depleción de

sodio y cocaína [164]. En este sentido, Acerbo y col, 2011, observaron que la administración repetida de DOCA, agonista de mineralocorticoide, indujo un aumento en el consumo de sodio. Mientras que, los animales tratados previamente con DOCA, sin acceso al consumo de sodio, mostraron una mayor respuesta locomotora a la cocaína, que los animales controles. Estos resultados indican que los tratamientos que generan apetito por el sodio, producen respuestas psicomotoras exacerbadas a cocaína, que se traducen en una sensibilización cruzada [164]. Es así, que tanto los psicoestimulantes, el estrés como el apetito por el sodio compartirían el mismo sustrato neurobiológico.

Se ha demostrado que una sola exposición a los psicoestimulantes (anfetamina o cocaína) es suficiente para inducir sensibilización conductual en ratas y ratones [138, 165]. En este sentido, resultados previos de nuestro laboratorio mostraron que la exposición a anfetamina en un protocolo de dos inyecciones, produjo sensibilización locomotora, hiperreactividad dopaminérgica y aumento de la inmunoreactividad a Fos (IR-Fos) en NAc core, respuestas que fueron prevenidas por el bloqueo de los R-AT₁. Estas evidencias sustentarían la participación de los R-AT₁ en el desarrollo de la sensibilización conductual y neuroquímica a anfetamina [166, 167].

Aunque la evidencia de la participación del RAS en respuestas mediadas principalmente por el sistema dopaminérgico, es clara y abundante, no puede descartarse la influencia del RAS en otros sistemas de neurotransmisión como son el noradrenérgico [168], serotoninérgico [169], GABAérgico y glutamaérgico [170, 171].

4. INFLAMACIÓN

4.1. Angiotensina II, inflamación y especies reactivas del oxígeno

Se ha demostrado que la Ang II induce respuestas inflamatorias *in vitro* en varios tipos de células, incluyendo las células endoteliales, células musculares lisas, fibroblastos y células epiteliales de túbulos renales [172-174]. La Ang II participa en la respuesta inflamatoria, a través de dos mecanismos claves: generación de especies reactivas del oxígeno (ROS) y producción del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF-kB) [175].

La estimulación de R-AT₁ por la Ang II, activa la PKC, que a su vez fosforila p47 phox, lo que conduce al ensamble de la enzima y producción de ROS. La Ang II a través de sus R-AT₁, también aumenta la expresión vascular de componentes de la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidasa y los niveles de superóxido. La relevancia de Ang II en el estrés oxidativo se debe en gran parte a la activación de la NADPH oxidasa [176]. Este fenómeno está estrechamente asociado con el aumento de la molécula de adhesión celular vascular-1 (VCAM-1), molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1) y proteína quimiotáctica de monocitos-1 (MCP-1), y por lo tanto en la iniciación y progresión de la inflamación vascular [175].

En las SHR, un aumento de los R-AT₁ endoteliales se correlaciona con: un aumento de expresión de ICAM-1, un mayor número de macrófagos adheridos al endotelio de microvasos cerebrales y de la carótida, y a un aumento de infiltración de macrófagos perivasculares en microvasos [1]. Se ha visto, que la infusión crónica de Ang II en bajas dosis, aumenta la adhesión de leucocitos en vénulas cerebrales y promueve el estrés oxidativo [177, 178]. Por otra parte, una inyección de Ang II intraperitoneal (ip.) en ratas, aumenta la adhesión de leucocitos en arteriolas y la expresión de P-selectina, E-selectina, ICAM-1 y VCAM-1 en arteriolas y vénulas [177]. Sin embargo, no se ha dilucidado si el evento principal en la disfunción vascular mediada por Ang II, se debe a un aumento en la generación de ROS, o si el estrés oxidativo y la respuesta inflamatoria actúan sinérgicamente [175].

Se ha demostrado que Ang II, a través de sus R-AT₁, activa el NF-κB en el tejido vascular. El NF-κB, es el factor de transcripción primario responsable de la regulación de los genes pro-inflamatorios a nivel vascular y se ha visto que media el aumento de la expresión de interleuquina-6 (IL-6), VCAM-1 y MCP-1. Además, el NF-κB, activa la codificación del gen de angiotensinógeno, con la consiguiente retroalimentación positiva y amplificación de la respuesta inflamatoria mediada por Ang II. Incluso, se ha demostrado que ROS regula positivamente los niveles de NF-κB y por lo tanto el estrés oxidativo. Tanto el NF-κB y los mediadores inflamatorios pueden contribuir a la disfunción vascular mediada por R-AT₁ y Ang II [175]. También se conoce, que la administración de Ang II, aumenta la expresión vascular y cardíaca de IL-6, factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α) y óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) [179-184]. En el mismo sentido, la respuesta inflamatoria vía NF-κB, TNF-α e interleuquina-1 (IL-1) en los microvasos cerebrales de SHR, es dependiente de la estimulación de Ang II, dado que puede ser suprimida por el bloqueo de sus R-AT₁. Además, en este mismo modelo, los genes de la familia de las

proteínas de golpe de calor (HSPs) como la HSP-60, HSP-70 y HSP-90, muestran una regulación positiva en el endotelio de los microvasos, con la consiguiente sobreexpresión de la proteína [185], en un intento de proteger la microvasculatura del daño oxidativo.

Cabe remarcar que el TNF- α es un potente estimulador de la producción de IL-6 [186]. La activación de los receptores de TNF- α estimula varias de las vías de señalización que regulan procesos celulares, que van desde la proliferación celular y la diferenciación a la muerte celular [187]. Con respecto a la IL-6, su producción parece ser regulada por varias cascadas de señalización [188], incluidos principalmente el TNF- α , a través del factor NF- κ B [189, 190]. El creciente interés en la IL-6 es, en parte, debido a la modulación en la transcripción de genes [191], a su participación en la respuesta neuroinflamatoria [192, 193] y en los procesos neurotróficos así como en varias patologías cerebrales [194].

Por otro lado las HSPs, están altamente conservadas durante la evolución, desempeñan funciones esenciales, como facilitar el plegado de las chaperonas moleculares, el transporte intercelular y el montaje y desmontaje de las proteínas celulares. Una gran variedad de estímulos estresantes, como la hipertensión, la inflamación, el aumento del estrés oxidativo y la isquemia, aumentan la síntesis de las HSPs a nivel intracelular [195-197]. Se postula que las HSPs pueden prevenir el daño celular y participar en la reparación celular durante la lesión [198], pero también se conoce que pueden estimular la producción de citoquinas proinflamatorias [199]. A nivel de la vasculatura periférica, la hipertensión aumenta la expresión de HSP-70, activa HSP-1 y regula la transcripción y expresión primaria de numerosas HSP [195]. La Ang II, a través de la activación del R-AT₁, induce la expresión de la HSP en los tejidos periféricos y vascular [185, 198, 200, 201]. Las vías por las que Ang II estimula la expresión de las HSPs no están dilucidadas, pero se postula que puede ser a causa del aumento de las ROS [200].

La microglía y los astrocitos son las principales células inmunomoduladoras residentes del SNC y durante la neuroinflamación son estimulados por Ang II vía R-AT₁. Ang II inicia la producción de factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) en las células microgliales, mientras que en los astrocitos, aumenta la trombospondina proteasa-1 (TSP-1) (que activa a la TGF- β). Un aumento en los niveles de TGF- β activo en el cerebro, crea un ambiente permisivo en el SNC, que permite a las células T obtener un fenotipo más inflamatorio. Debido al carácter multifuncional de la Ang II, estos mecanismos ocurren probablemente de forma sinérgica, con la vía de NF- κ B y producción de ROS [202].

En base a todos estos antecedentes, podemos decir que Ang II puede iniciar procesos inflamatorios, mediante el aumento de la permeabilidad vascular (liberación de prostaglandinas y factor de crecimiento endotelial vascular -VEGF-), el reclutamiento de células inflamatorias en el tejido, y la regulación de moléculas de adhesión y quimioquinas por células residentes [203].

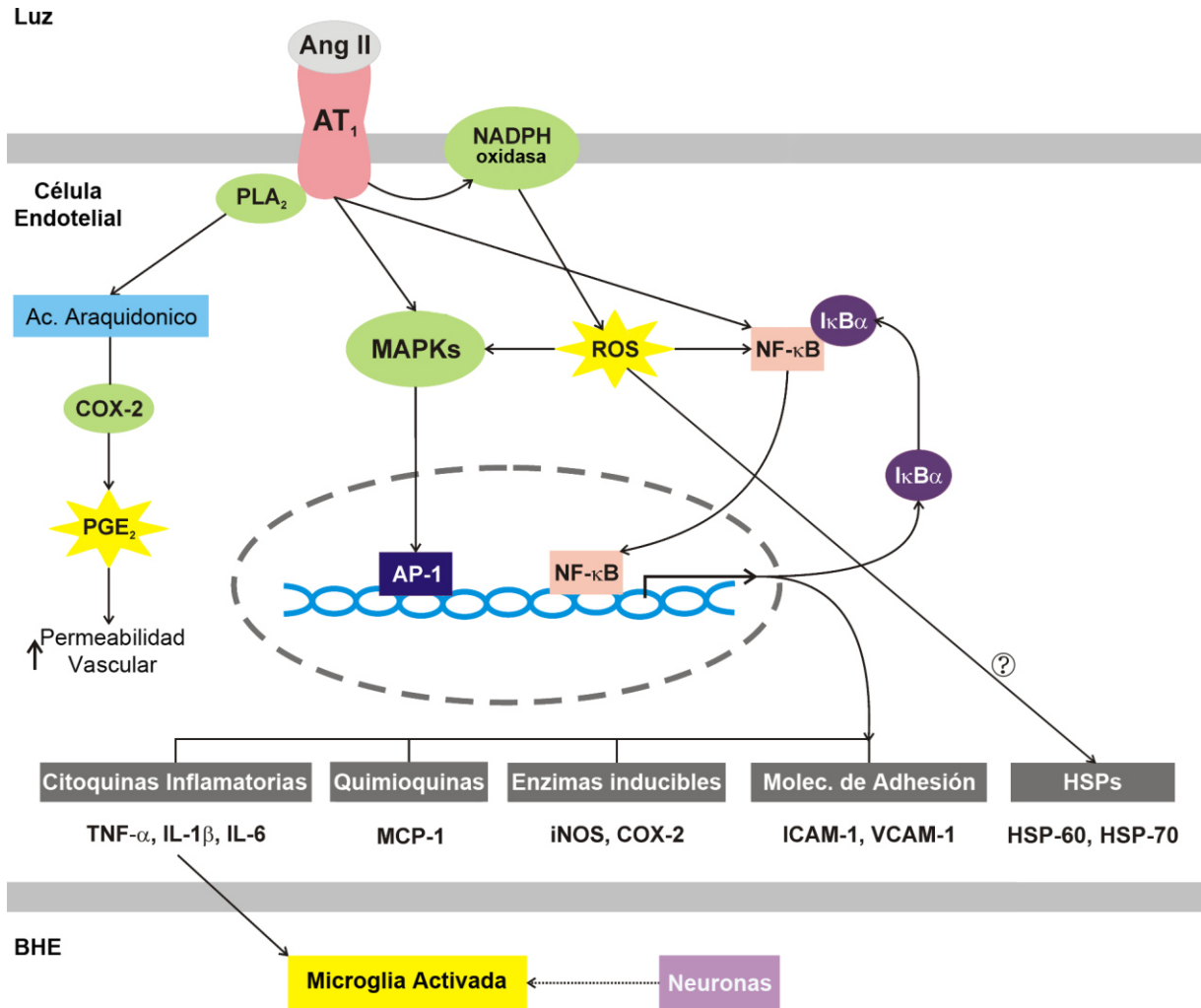


Figura 6: Angiotensina II y su rol inflamatorio. La Ang II induce la activación de numerosas vías de señalización en las células endoteliales. La estimulación de los R-AT₁ origina una cascada de señalización, con la consiguiente producción de ROS, activación de proteínas quinasas y de factores de transcripción NF-κB y AP-1. Esto resulta en una mayor expresión de citoquinas inflamatorias, quimioquinas, enzimas inducibles, moléculas de adhesión y HSPs. Las citoquinas inflamatorias activan la microglía en el parénquima cerebral. El bloqueo de los R-AT₁, por candesartan, inhibe la cascada de señalización, suprimiendo la activación de la microglía (modificado de Benicky y col, 2009 [4]). Abreviaturas: AP-1: proteína activadora 1; HSPs: proteínas de golpe de calor; ROS: especies reactivas del oxígeno; NF-κB: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas; BHE: barrera hematoencefálica; iNOS: óxido nítrico sintasa inducible; IL: interleuquina; MAPK: proteína quinasa activada por mitógeno; MCP-1: proteína quimiotáctica de monocitos-1; PGE₂: prostaglandina E₂; COX-2: ciclooxigenasa-2; NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducida; ICAM-1: molécula de adhesión intercelular-1; VCAM-1: molécula de adhesión celular vascular-1; TNF-α: factor de necrosis tumoral alfa.

4.2. Bloqueantes de los R-AT₁: Rol neuroprotector y anti-inflamatorio

Los ARBs son efectivos para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares y son considerados como neuroprotectores porque: reducen el área de isquemia cerebral luego de un accidente cerebrovascular, atenúan las respuestas centrales y periféricas a estrés y disminuyen el estado de ansiedad y la inflamación cerebrovascular [1-3, 5, 43, 119] (Figura 7 y 8). Por estas razones, es que los ARBs ofrecen un novedoso enfoque terapéutico y seguro para el tratamiento de enfermedades de gran impacto socio-económico, tales como trastornos del estado de ánimo y enfermedades neurodegenerativas [204-207].

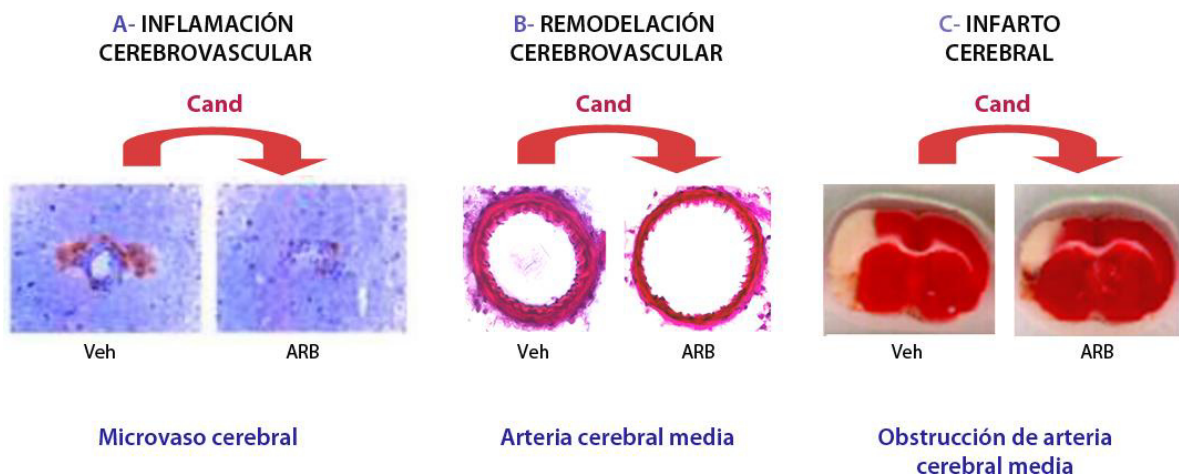


Figura 7: Rol neuroprotector y anti-inflamatorio de los bloqueantes de R-AT₁. Modificado de Saavedra y col., 2011. A y B- Ando y col., 2001; C- Nishimura y col., 2000 [1-3].

A- Inmunohistoquímica. Infiltración de macrófagos en los microvasos de la corteza cerebral en ratas hipertensas (izq), que se previno con el tratamiento de candesartan (der).

B- Imágenes de arteria cerebral media, coloreada con hematoxilina-eosina. La hipertensión crónica produce remodelación cerebrovascular que se previno con el tratamiento de candesartan.

C- Secciones de cerebro anterior con isquemia experimental. Se observa en blanco el tejido isquémico. El pre-tratamiento con candesartan disminuyó el volumen de isquemia en ratas hipertensas.

Abreviaturas: candesartan (Cand), vehículo (Veh), bloqueantes de los R-AT₁ (ARB).

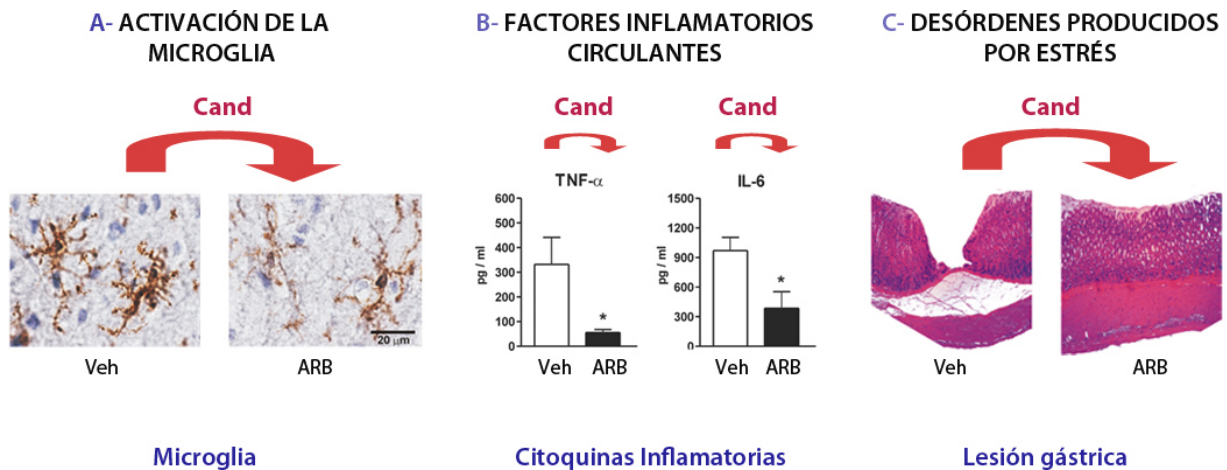


Figura 8: Rol anti-inflamatorio del bloqueo de R-AT₁. Modificado de Saavedra y col, 2011. A- Benicky y col. 2009; B- Sanchez-Lemus y col., 2008; C- Bregonzio y col., 2003 [3-6].

A- Activación de la microglía en la corteza cingulada de cerebro de ratas, inducida por inyección de lipopolisacárido (LPS) ip. El tratamiento con candesartan previno la activación de la microglía inducida por LPS.

B- Aumento de citoquinas inflamatorias plasmáticas en ratas, inducido por inyección de LPS ip. Este aumento se previno por el tratamiento con candesartan.

C- Mucosa gástrica coloreada con hematoxilina-eosina, de ratas sometidas a inmovilización en frío. Este estrés produce múltiples lesiones gástricas, que fueron prevenidas por el tratamiento con candesartan.

Abreviaturas: candesartan (Cand), vehículo (Veh), bloqueantes de los R-AT₁ (ARB).

4.3. Drogas psicoestimulantes e inflamación

Numerosas investigaciones muestran que cocaína y análogos de amfetamina producen neuroinflamación, activación de la microglía y producción de citoquinas proinflamatorias (TNF- α e IL-6) a nivel periférico y del SNC [208-213]. Se ha demostrado que las citoquinas, las quimioquinas y las moléculas de adhesión celular, pueden jugar un papel crítico en la perpetuación de la lesión neuronal inducida por análogos de amfetamina, y que estas lesiones pueden producir alteraciones neuropsiquiátricas [212, 214]. El uso de análogos de amfetamina puede: a- comprometer la BHE y aumentar su permeabilidad [213, 215]; b- generar metabolitos tóxicos de monoaminas [216]; c- aumentar la activación de la microglía y astrocitos, y producir citoquinas y quimioquinas proinflamatorias [209, 217]; y d- promover el estrés oxidativo (a causa del exceso de producción de ROS y de especies reactivas del nitrógeno) [213, 214, 218]. Además, múltiples evidencias indican que la

activación de la microglía y de los astrocitos contribuye a la neurodegeneración, a través de la promoción de procesos inflamatorios, incluyendo la producción de TNF- α , IL-1 β e IL-6, o por medio de mecanismos oxidativos [217, 219]. En este sentido, Loftis y col. observaron una desregulación del sistema inmune periférico y del SNC, con aumento de citoquinas, quimioquinas y moléculas de adhesión a nivel cerebral y plasmático (IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-10, TNF- α , MCP-1, ICAM-1, etc.), en ratones expuestos a análogos de amfetamina [212]. También se ha descrito que la administración de metanfetamina y cocaína, aumentan la formación de ROS, con el consiguiente daño oxidativo (1-3)[218, 220, 221]. Además, se ha demostrado que este estrés oxidativo, provoca la disfunción mitocondrial, excitotoxicidad [217] y perpetúa el daño a nivel de la BHE [213], mantiene la infiltración de monocitos en el SNC y favorece aún más el aumento de IL-6 y TNF- α [210].

Por otro lado, accidentes cerebrovasculares, hemorragias y vasculitis cerebral han sido asociados al abuso de cocaína y amfetamina [222-224]. La vasculitis cerebral, es una patología a nivel de pequeños vasos y arteriolas que comparte la histología con la inflamación vascular, que cuando no se trata conduce a daños irreparables [223]. Este fenómeno, se ha identificado en el SNC como un evento secundario al uso de fármacos simpaticomiméticos, probablemente por anomalías plaquetarias y de coagulación, por una aterosclerosis acelerada o embolia [213]. Además, después de la exposición a amfetamina se han descrito cambios angiográficos, anginitis fibrinoide, necrosis o proliferación de la íntima, infiltración de leucocitos y daño directo en los vasos, con agregaciones plaquetarias y aumento de la permeabilidad vascular [225, 226]. En este sentido, estudios en células endoteliales de la microvasculatura cerebral humana, mostraron una disminución de los niveles totales de glutatión y un aumento de proteína activadora-1 (AP-1), de NF- κ B y de TNF- α [227].

5. MEMORIA

5.1. Angiotensina II y memoria

La evidencia sobre el papel del sistema renina-angiotensina en el aprendizaje y la memoria es contradictoria, aunque son numerosos los estudios que apoyan la propuesta de

que la Ang II reduce la función cognitiva [100]. Incluso, varios años atrás se postuló que una disponibilidad reducida de Ang II era la causante de facilitar los procesos cognitivos en animales tratados con inhibidores de la ACE (I-ACE) [228]. Además, es conocida la estrecha relación entre la hipertensión crónica no tratada, la enfermedad cardiovascular y cerebrovascular y la reducción en la función cognitiva. Es así que, los fármacos antihipertensivos que interactúan con el RAS, como los I-ACE y los ARBs, previenen el deterioro cognitivo e incluso mejoran las funciones cognitivas en pacientes [229-231] y en animales hipertensos [232, 233]. Tota y col, 2013 han demostrado que Ang II administrada centralmente, a través de la estimulación de sus R-AT₁, afecta la formación de memoria espacial y el flujo sanguíneo cerebral [104].

6. EXPRESIÓN DE FOS

Las respuestas del SNC a estímulos ambientales pueden ser clasificadas en respuestas tempranas y tardías. Las primeras ocurren rápidamente luego de una estimulación y duran de milisegundos a minutos, surgen de la interacción de primeros mensajeros con sus receptores localizados en la superficie de la membrana celular, activando de esta manera segundos mensajeros. En cambio, las respuestas tardías pueden demorar desde horas a días, ya que necesitan cambios en la expresión de genes, debido a que el mensajero primario (directa o indirectamente) interacciona con el ADN, regulando así su expresión. Los genes que codifican para estas proteínas son llamados genes de expresión tardía. Cuando una célula es estimulada, los primeros genes en ser transcritos son los genes de expresión inmediata temprana (IGEs), que una vez traducidos constituyen proteínas que ingresan al núcleo y activan genes de respuesta tardía. La familia de los IGEs incluye a *c-fos*, *c-jun*, *jun B*, *jun D*, entre otros. Uno de los IEGs más estudiados, es *c-fos*, cuyo producto traduccional es la proteína Fos. Desde su descubrimiento Fos ha sido utilizado como una herramienta de mapeo funcional y anatómico debido a que identifica células y circuitos neuronales que se activan en respuestas a diferentes estímulos [234]. Dos características principales hacen de Fos una excelente herramienta de mapeo: los bajos niveles de expresión que se detectan en condiciones basales y su inducibilidad bajo un amplio espectro de estímulos sinápticos [235]. El máximo nivel de expresión de Fos ocurre entre 1 y 3 horas [234]. La técnica de detección de Fos, brinda una posibilidad de “mapeo

funcional". Además, Fos juega un papel importante en la transducción de estímulos extracelulares y por lo tanto, en los cambios celulares a largo plazo, por lo que se considera un marcador de activación neuronal [236, 237]. La inmunomarcación de Fos, se ha utilizado para definir las áreas que participan en las acciones inducidas por anfetamina, en este sentido, se encontró que la administración de anfetamina indujo un aumento en la expresión de Fos en CPu y NAc [238]. Además, los datos de IR-Fos mostraron que los reforzadores naturales activaron las mismas áreas cerebrales que anfetamina [161].

También se ha descrito, que la expresión de Fos en áreas cerebrales del hipocampo, se incrementa durante un test de aprendizaje espacial y que este aumento es necesario para la formación de la memoria espacial [239].

Los animales expuestos a situaciones de estrés, como el test de conflicto *Plus Maze*, presentan un aumento de IR-Fos en la amígdala [240-242]. La amígdala puede subdividirse en tres grandes subnúcleos: medial, central (CeA), y BLA, es un área cerebral implicada en el estrés y la ansiedad [240, 243]. También se conoce, la estrecha relación entre el sistema amigdalino y la CRH, ambos involucrados en la respuesta de ansiedad [240, 244, 245]. Además, se ha descrito la presencia de R-AT₁ en CeA y BLA [246].

7. SISTEMA OXITOCINÉRGICO

Las funciones clásicas del sistema oxitocinérgico involucran entre otras: la facilitación de nacimiento, la lactancia, el comportamiento materno, la regulación genética del crecimiento de la neocorteza, la eyaculación, la regulación cardiovascular e hidromineral y la osmoregulación [247]. Actualmente se le ha atribuido al sistema oxitocinérgico central, nuevas funciones, éstas involucran la participación de oxitocina (OT) en comportamientos sociales, conductas ansiolíticas, modulación del aprendizaje y la memoria [247-258]. Además, se ha evaluado su participación en patologías neurodegenerativas, abuso de drogas, depresión, esquizofrenia y autismo [247, 259-262].

El núcleo supraóptico (SON) y el PVN, son los principales núcleos que sintetizan OT. El SON es el sitio más importante de producción de OT y vasopresina, debido a su gran tamaño en comparación con el PVN, este núcleo proyecta hacia el lóbulo temporal [247]. En cambio el PVN es cito-arquitectónicamente más complejo. En el PVN coexisten neuronas oxitocinérgicas magnocelulares neurosecretorias que proyectan a la

neurohipófisis y neuronas parvocelulares de proyección central. Se ha descrito que las neuronas magnocelulares oxitocinérgicas serían las encargadas de inducir la excreción renal de sodio a través de la liberación de OT, mientras que las neuronas parvocelulares formarían parte de un circuito involucrado en el control inhibitorio de la ingesta de sodio [263]. Las neuronas magnocelulares del PVN se encuentran agrupadas formando varios subnúcleos, dentro de los cuales nombraremos: el paraventricular dorsal cap (PaDC), el magnocelular periventricular (PeM), y el anterior magnocelular (PaAM) que contienen casi exclusivamente poblaciones oxitocinérgicas; el paraventricular magnocelular medial (PaMM) que contiene neuronas oxitocinérgicas y el paraventricular magnocelular lateral (PaLM), que contiene principalmente neuronas vasopresinérgicas, a excepción de un anillo de neuronas oxitocinérgicas que rodean la zona más densa del PaLM [247].

Numerosos autores han demostrado, que la administración de Ang II icv. induce activación oxitocinérgica central [53, 264, 265]. Además, se ha comprobado que OT inhibe la ingesta de sodio [20, 264] y ejerce un tono inhibitorio que involucra la activación o desinhibición del R-AT₁ [20]. Se conoce además, que OT induce un aumento en la excreción de sodio urinario, vía excreción del péptido natriurético atrial (ANP) desde el corazón [266, 267], natriuresis que también se observa después de una inyección de Ang II icv. [54, 83, 86].

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1. HIPÓTESIS GENERAL

La angiotensina II cerebral a través de sus R-AT₁ estaría involucrada en los cambios neuroadaptativos a largo plazo inducidos por anfetamina.

2. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el impacto a largo plazo de la exposición repetida a anfetamina sobre el sistema renina-angiotensina a nivel cerebral y el rol de los R-AT₁.

3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.1. Objetivo 1

Evaluar las posibles alteraciones inducidas por anfetamina, sobre respuestas clásicas de Ang II icv. y el rol de los R-AT₁ en:

- La ingesta de sodio y agua.
- La excreción de sodio y potasio urinario.
- La actividad de la renina plasmática (PRA).
- Los parámetros bioquímicos y de función renal en sangre y orina.
- La activación neuronal en áreas cerebrales relacionadas con la recompensa a drogas de abuso y la osmoregulación.

3.2. Objetivo 2

Evaluar el efecto de la exposición repetida a anfetamina y el rol de los R-AT₁, a través de la administración de Ang II icv., sobre:

- La respuesta de Ansiedad.
- La memoria de Trabajo.
- La activación neuronal en áreas cerebrales relacionadas con la respuesta a estrés y los procesos de memoria.
- La activación oxitocinérgica central.

3.3. Objetivo 3

Evaluar el efecto de la exposición repetida a anfetamina y el rol de los R-AT₁ sobre:

- Respuestas inflamatorias a nivel de la vasculatura cerebral (ICAM-1, HSP-70 y R-AT₁)
- Respuestas de estrés oxidativo en la microvasculatura cerebral.
- Respuestas inflamatorias a nivel periférico y del LCR (TNF- α e IL-6).

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

1. ANIMALES

Se utilizaron ratas macho Wistar de 250-320 g, provistas por el bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Católica de Córdoba, Córdoba, Argentina, bajo las normas de la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del National Institute of Health (NIH Bethesda, MD, USA. 1992), mantenidas a una temperatura de 21 ± 1 °C, con un ciclo de luz/oscuridad de 12 h, con acceso libre de agua y comida). Los animales se asignaron al azar a los distintos grupos experimentales y se agruparon de a cinco por caja (34 x 48 x 19 cm).

2. DROGAS

Sulfato de d-anfetamina (Sigma Chemical Co), disuelto en solución salina 0,9% m/v, inmediatamente antes de usar. Se eligió la dosis considerando trabajos previos [268, 269].

Candesartan cilexetilo (Laboratorios Phoenix, Buenos Aires, Argentina) disuelto en una solución 0,1 N de bicarbonato de sodio, la solución fue protegida de la luz y conservada a 4 °C. La dosis utilizada se eligió en base a trabajos previos [5, 119, 166, 167, 270].

Angiotensina II (Ang II, Sigma Chemical), disuelta en solución salina 0,9%, inmediatamente antes de usar. Se eligió la dosis considerando trabajos previos [271]. Se ensayaron las dosis de 400 pmol, 4 nmol y 40 nmol utilizadas en dicha investigación, optando por la de 400 pmol. El volumen de micro-inyección usado fue de 2 μ L/lado.

3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El tipo de análisis realizado, se detalla en la descripción de cada experimento en particular. Los resultados obtenidos se analizaron por medio del análisis de varianza (ANOVA) una vía utilizando como factor en todos los análisis, el tratamiento vía oral con candesartan ó vehiculo y la inyección intraperitoneal de anfetamina ó salina. En el análisis de la inmunofluorescencia para R-AT₁ y HSP-70 se usó ANOVA una vía para sub-

muestras. En caso de interacción u observación de un efecto principal, se utilizaron los post-test Student Newman-Keuls ó Bonferroni para el análisis comparativo de las medias. Los resultados del Efecto de Ang II icv. se analizaron mediante el uso de la prueba Test-t. Los resultados se expresan como la media \pm error estándar (ES). Se consideró significativo un valor de $p < 0,05$. Para la comparación estadística de los resultados, se utilizó el programa informático Graph Pad PRISM 5 (San Diego, CA, USA).

4. GRUPOS Y DISEÑO EXPERIMENTAL

4.1. Justificación del modelo experimental

El protocolo de administración utilizado en el presente trabajo de tesis fue extraído de la bibliografía, este modelo de 5 inyecciones de anfetamina seguido de un periodo libre de droga (7 ó 21 días) es ampliamente usado para estudiar el desarrollo y la expresión de cambios neuroadaptativos inducidos por drogas de abuso [8, 269, 272]. El uso de este modelo permite estudiar el fenómeno de desarrollo y recaída en la adicción [8, 156].

Estos cambios neuroadaptativos inducidos por el psicoestimulante se ponen de manifiesto sólo cuando el sistema es sometido a un desafío (droga ó estrés) [7, 139, 155, 156]. También se consideraron resultados previos de nuestro laboratorio que muestran que la exposición a anfetamina induce cambios duraderos en la expresión de R-AT₁ y angiotensinógeno en áreas cerebrales relacionadas con la acción y los cambios neuroadaptativos de las drogas de abuso [52, 167]. Además, de resultados que muestran que el bloqueo de R-AT₁ previene el desarrollo de sensibilización conductual y neuroquímica inducida por anfetamina [166]. Por lo que, en el presente trabajo se utilizó un tratamiento farmacológico [166] destinado a atenuar la participación de los R-AT₁ en el desarrollo de cambios neuroadaptativos inducidos por anfetamina.

Debido a lo expuesto se utilizó como desafío la administración de Ang II intracerebral 7 ó 21 días después de terminados los tratamientos con candesartan y/o anfetamina. También a modo de control se evaluaron respuestas basales (desafío con salina intracerebral).

4.2. Objetivo 1

De acuerdo a resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio, se propuso el siguiente esquema experimental: se usaron animales pretratados con vehículo (NaHCO₃ 0.1 N) ó antagonista R-AT₁ candesartan vo. (3 mg/Kg/día), durante 10 días. Luego recibieron 5 inyecciones de anfetamina (2,5 mg/Kg/día) ó salina ip., durante el período que comprende del día 5 al 10. El día del experimento (1 ó 3 semanas después de la última dosis de anfetamina -día 18 ó 32-) se procedió a inyectar Ang II icv. (400 pmol) (Figura 9).

Luego de la inyección de Ang II icv.:

- Se evaluó la ingesta de agua y sodio.
- Se determinó la actividad de la renina en muestras de plasma.
- Se evaluó la excreción urinaria de sodio y potasio.
- Se evaluó el perfil bioquímico en muestras de plasma y orina (de 2 y 24 h) (albumina, proteínas totales, glucosa, electrolitos, urea, creatinina).
- Se cuantificó el número de células IR-Fos, en áreas cerebrales relacionadas con la recompensa y la osmoregulación: CPu, NAc core, núcleo accumbens shell (NAcSh), núcleo del Tracto Solitario (NTS), SFO y PVN.

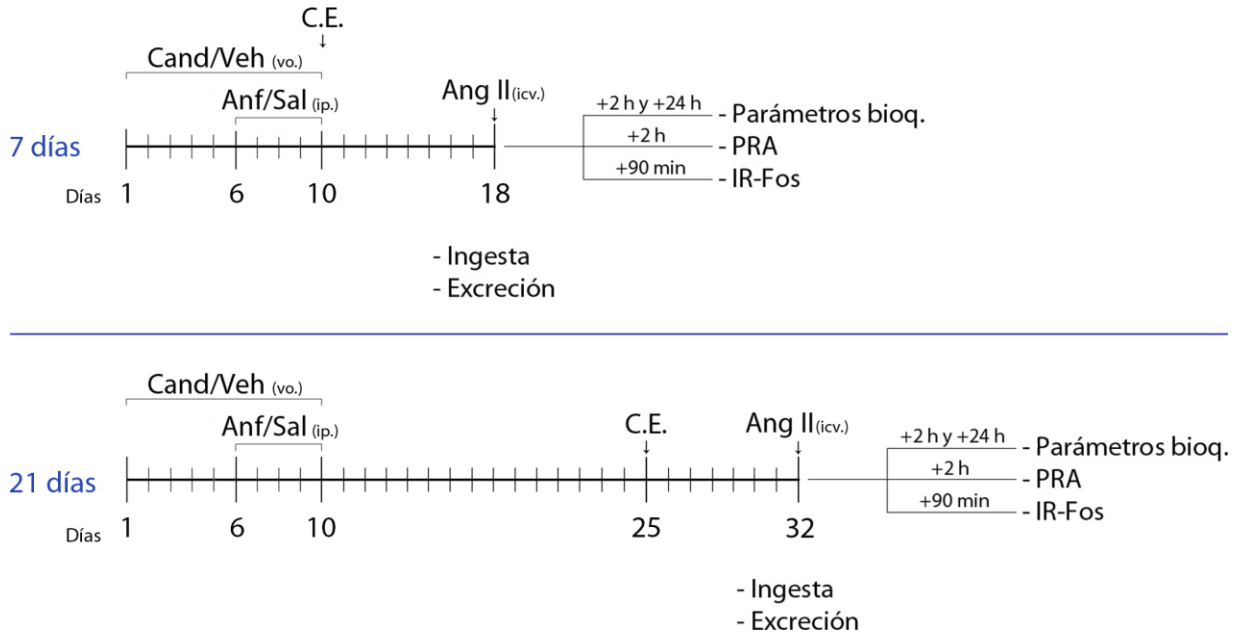


Figura 9: Diseño experimental del objetivo 1. Protocolo de 7 días post-anfetamina -post-Anf- (arriba) y 21 días post-Anf (abajo). Abreviaturas: Cand: candesartan; Veh: vehículo; Anf: anfetamina; Sal: salina; Ang II: angiotensina II; vo.: vía oral; ip.: intraperitoneal; icv.: intracerebroventricular; C.E.: cirugía estereotáxica; PRA: actividad de la renina plasmática; IR-Fos: inmunoreactividad a Fos.

4.3. Objetivo 2

Se usaron animales pretratados con vehículo ó candesartan vo. (3 mg/Kg/día), durante 10 días. Luego recibieron 5 inyecciones de anfetamina (2,5 mg/Kg/día) ó salina ip., durante el período que comprende del día 5 al 10. El día del experimento (1 ó 3 semanas después de la última dosis de anfetamina -día 18 ó 32-) se procedió a inyectar Ang II icv. (400 pmol) (Figura 10).

Luego de la inyección de Ang II icv.:

- Se determinaron a través de un test de ansiedad (*Plus Maze*), el estado de ansiedad de los animales.
- Se evaluó la memoria de trabajo de los animales a través del test de campo perforado (*Hole Board*).
- Se cuantificó el número de células inmunoreactivas a Fos, en áreas cerebrales relacionadas con el estrés y los procesos de memoria: CeA y BLA, región CA-1, CA-3 y girus dentado del hipocampo.
- Se cuantificó el número de células doblemente inmunoreactivas a Fos-Oxitocina en áreas cerebrales del hipotálamo: SON y PVN.

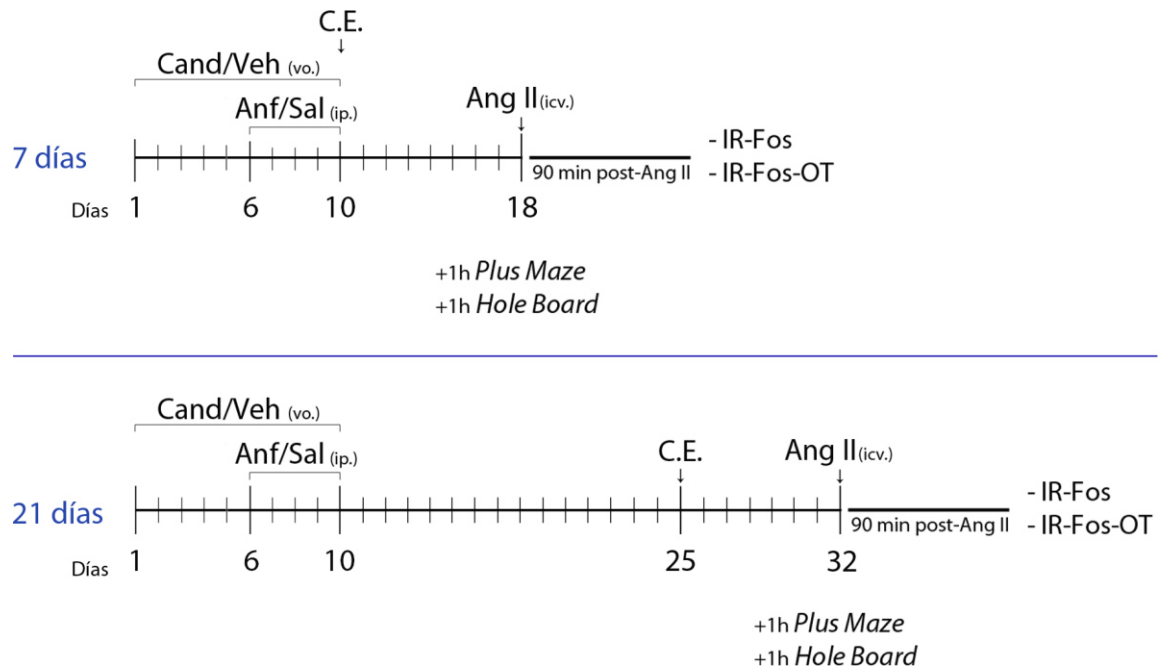


Figura 10: Diseño experimental del objetivo 2. Protocolo de 7 días post-Anf (arriba) y 21 días post-Anf (abajo). Abreviaturas: Cand: candesartan; Veh: vehículo; Anf: anfetamina; Sal: salina; Ang II: angiotensina II; vo.: vía oral; ip.: intraperitoneal; icv.: intracerebroventricular; C.E.: cirugía estereotáxica; IR-Fos: inmunoreactividad a Fos; IR-Fos-OT: doble inmunomarcación Fos-oxitocina; *Plus Maze*: laberinto en cruz elevado; *Hole Board*: campo perforado.

4.4. Objetivo 3

Se usaron animales pretratados con vehículo ó candesartan vo. (3 mg/kg/día), durante 10 días. Luego recibieron 5 inyecciones de anfetamina (2,5 mg/Kg/día) ó salina ip., durante el período que comprende del día 5 al 10. El día del experimento (1 ó 3 semanas después de la última dosis de anfetamina -día 18 ó 32-), los animales se dividieron en dos grupos, uno recibió challenge de salina ó anfetamina (0.5 mg/kg ip.) y el otro recibió Ang II icv. (400 pmol). Una hora después del challenge o 90 min después de Ang II, los animales fueron sacrificados por decapitación y se aislaron los microvasos cerebrales.

Luego del challenge ip. ó de Ang II icv.:

- Se analizó la distribución de ICAM-1 y R-AT₁ en la vasculatura cerebral (arteria cerebral media, posterior, anterior y arterias de menor calibre).
- Se determinó el marcador de peroxidación lipídica, malondialdehído (MDA) en microvasos aislados.
- Se analizó la inmunoreactividad del R-AT₁ y de la HSP-70 en la microvasculatura cerebral.
- Se cuantificó IL-6 (en plasma y en LCR) y TNF- α en LCR.

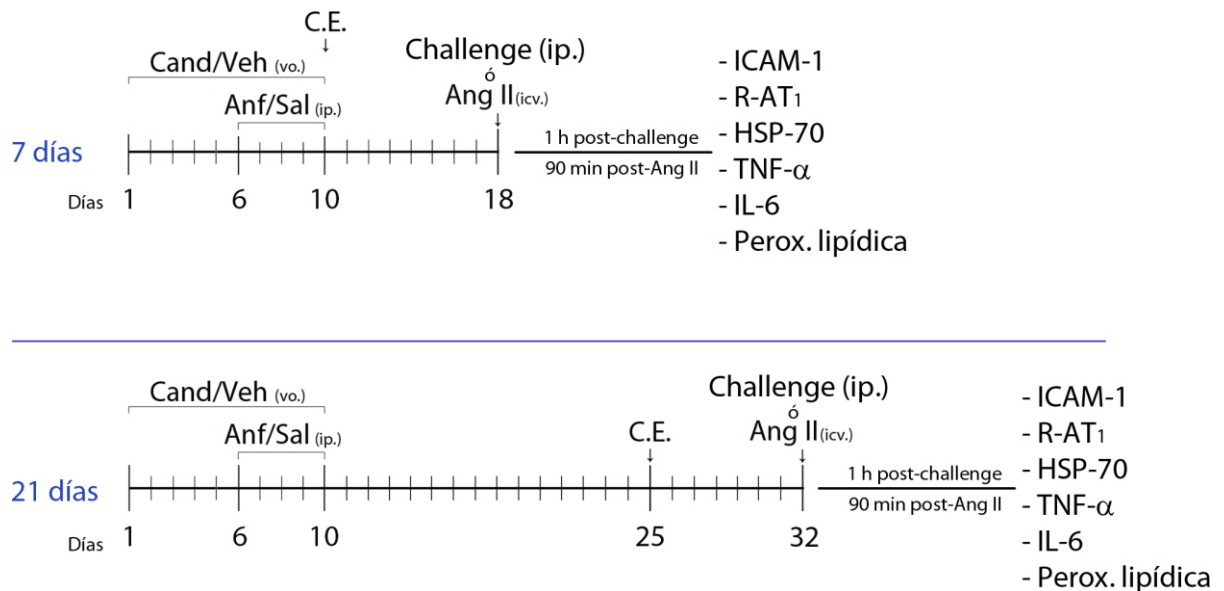


Figura 11: Diseño experimental del objetivo 3. Protocolo de 7 días post-Anf (arriba) y 21 días post-Anf (abajo). Abreviaturas: Cand: candesartan; Veh: vehículo; Anf: anfetamina; Sal: salina; Ang II: angiotensina II; vo.: vía oral; ip.: intraperitoneal; icv.: intracerebroventricular; C.E.: cirugía estereotáxica; ICAM-1: molécula de adhesión intercelular-1; HSP-70: proteína del golpe de calor 70; R-AT₁: receptor AT₁ de angiotensina II; TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa; IL-6: interleuquina-6.

TÉCNICAS

1. Cirugía Estereotáxica

Se anestesiaron los animales con ketamina/xilacina 75/5 mg/kg ip., posterior a la pérdida de los reflejos palpebrales, se colocaron en un aparato estereotáxico. Las cánulas guías (acero inoxidable, realizadas a partir de agujas hipodérmicas BD Precisión Glide, calibre 23 G y 11 mm de longitud) se implantaron estereotáxicamente en ambos ventrículos laterales del cerebro, según coordenadas con respecto a bregma: anteroposterior -1,0 mm; lateral \pm 1,7 mm; profundidad 3,5 mm (Atlas de Paxinos y Watson [273]). Luego se fijaron al cráneo con cemento acrílico y tornillos de acero inoxidable. Se colocaron tapones de acero inoxidable (realizados a partir de agujas hipodérmicas dentales Deltajet, calibre 30 G y 11 mm de longitud) dentro de las cánulas guías para evitar la obstrucción. Después de la cirugía, las ratas se alojaron en cajas individuales para su recuperación por 7 días. Se consideraron para los diferentes análisis, sólo los animales con una correcta posición de las cánulas.

2. Inyección intracerebroventricular

Los animales se dejaron habituar durante 1 h en la sala de comportamiento. Posteriormente se los retiró de su caja, se los cubrió suavemente con un paño y sujetándolos manualmente se retiraron los tapones para inyectar (en ambos ventrículos laterales del cerebro) 400 pmol de Ang II (en solución fisiológica pH 7.4) o vehículo (solución fisiológica). Se utilizó una aguja de inyección de acero inoxidable de calibre 30 G y longitud 11 mm, conectados a una microjeringa de 25 mL (Hamilton Company, EE.UU.) mediante un tubo de polietileno P20; esta aguja de inyección se introdujo dentro de las cánulas guías, administrando un volumen total de 4 μ L/rata (2 μ L en cada lado durante un periodo de 1 min) en los ventrículos laterales del cerebro. Las agujas de inyección permanecieron en los ventrículos por 20 seg adicionales para permitir la difusión. La dosis fue seleccionada en base a trabajos preliminares [271, 274].

3. Ingesta de sodio y agua

Inmediatamente después de la inyección de solución fisiológica icv. bilateral, los animales fueron devueltos a sus respectivas cajas en donde se los enfrentó a dos buretas, una con agua destilada y la otra con solución de NaCl 2%. Se registró en una planilla los mL consumidos de ambas soluciones, cada 10 minutos durante el lapso de 1 h. Posteriormente los animales se alojaron en el bioterio. Al día siguiente se realizó el mismo procedimiento, pero luego de una inyección de Ang II (400 pmol) icv.

4. Recolección de orina y obtención de plasma

Inmediatamente después de la inyección de Ang II icv (400 pmol), los animales fueron alojados individualmente en cajas metabólicas con acceso libre a agua y sin comida (sólo durante las primeras dos horas de la experiencia). La orina fue colectada en tubos de centrífuga a las 2 h de la microinyección y centrifugados a 10.000 G, el sobrenadante se conservó a -20 °C. Al finalizar el test (24 h después de Ang II icv.) se recolectaron muestras de orina y plasma.

5. Actividad de la renina plasmática

La PRA se determinó en plasma recolectado 90 min después de Ang II icv., mediante la técnica de radio inmunoensayo. Esta determinación fue realizada usando un Kit Gamma Coat Plasma Renin Activity ¹²⁵I RIA Kit, DiaSorin, en el laboratorio de Endocrinología de la Fundación para el progreso de la medicina, Córdoba.

6. Perfil bioquímico en orina y plasma

Se determinó albúmina, proteínas totales, creatinina, urea, glucosa y electrolitos, en plasma y en orina de 24 h. En orina de 2 h se midieron los niveles de creatinina, urea y electrolitos.

Los electrolitos se determinaron a través del método ion selectivo, la albúmina a través del método colorimétrico con verde de bromocresol, las proteínas totales por medio de ensayo cinético, la creatinina a través del método Jaffé, rate-blanked con compensación, la urea por medio de UV-cinética y la glucosa a través del método enzimático con hexoquinasa. Todos estos parámetros se determinaron en un Autoanalizador Roche-Hitachi, Cobas c311, en colaboración del Laboratorio Central, del Hospital Provincial San Roque, Córdoba, Argentina.

7. Test de Ansiedad: *Plus Maze*

Una hora después de la administración de Ang II icv, se procedió a la realización del test conductual de *Plus Maze*. Este test es uno de los modelos animales de ansiedad más usado y mejor validado desde el punto de vista conductual, farmacológico y fisiológico [126, 275]. Está basado en la preferencia de los roedores por los espacios cerrados (ramas cerradas del laberinto) en relación a los abiertos. Consta de dos brazos abiertos (50cm de largo x 10 cm ancho), y dos brazos cerrados (50 cm de largo x 10 cm de ancho x 40 cm de alto), posicionado a 50 cm del suelo e iluminado por una luz tenue (Figura 12) [275, 276]. El animal es colocado en el centro del laberinto mirando hacia el brazo abierto (tiempo cero) [277]. Se registra el comportamiento a través de la filmación con una cámara de video durante 5 minutos. Se mide el tiempo de permanencia en los brazos abiertos (TBA), el número de entradas a los brazos abiertos y cerrados (entradas Totales) y el número de llegadas a los extremos de los brazos abiertos (llegadas a los extremos). El porcentaje de tiempo de permanencia en los brazos abiertos es considerado como índice de ansiedad, así como el número de las entradas al brazo cerrado y las entradas totales como un índice de actividad locomotora o exploratoria [276, 278]. La entrada a los brazos se define como la colocación de las cuatro patas del animal en los mismos, y la duración de la prueba es de 5 minutos para cada animal [279].

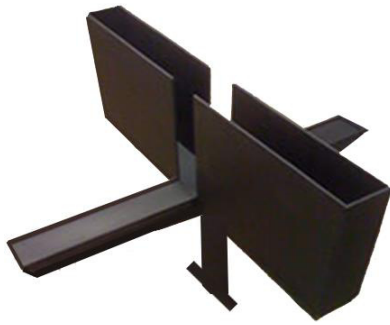


Figura 12: Aparato de *Plus Maze*

8. Test de memoria de trabajo: *Hole Board*

El test de *Hole Board*, es una prueba que permite evaluar la capacidad de memoria de trabajo en ratas [280]. Los animales son expuestos a un campo perforado (60 cm de ancho x 60 cm de largo x 30 cm de alto) que contiene 4 orificios laterales localizados a 10 cm del borde y un orificio central, cada uno de los cuales tiene 3 cm de diámetro (Figura 13).

Luego de 1 h de ambientación en la sala de conducta, las ratas recibieron Ang II icv. y 1 h después fueron ubicados en el aparato. Se registró el comportamiento a través de la filmación con cámara de video durante 5 min. Se midió: el número del *head dipping* (introducción de la cabeza en los orificios), el número de *sniffing* (olfateo de los orificios), así como el tiempo de exploración en los orificios a los 5 min. Todos estos parámetros se analizaron ordenando los agujeros en orden decreciente de exploración (desde el más explorado -orificio 1- al menos explorado -orificio 5-) [280].



Figura 13: Aparato de *Hole Board*

9. Extracción de LCR a nivel craneal

Para la extracción de LCR de los animales se siguió el método descrito por Nigori y col [281]. Brevemente, se ubicaron los animales anestesiados (ketamina/xilacina 75/5 mg/kg ip.) en un aparato estereotáxico, posicionando la cabeza a una inclinación de 45°. Se cortó el pelo al ras y se frotó la zona con alcohol etílico al 70% (facilitando la vasodilatación). Se introdujo en el cuarto ventrículo (cisterna magna), una aguja 23 G conectada a un tubo de polietileno de 50 mm y este último a una jeringa de 1 ml. Se extrajo lentamente el LCR (aproximadamente 100-120 μ L) y se lo conservó a -20 °C hasta su uso

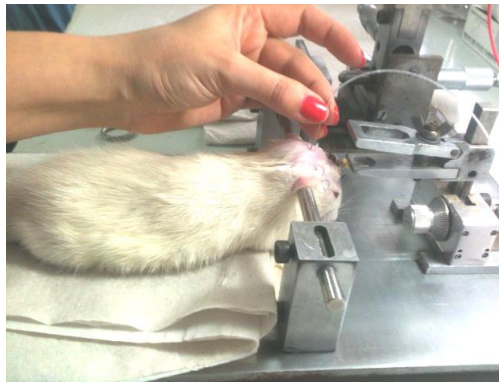


Figura 14: Extracción de líquido cefaloraquídeo a nivel craneal en rata.

10. Determinación de TNF- α en LCR

Los niveles de TNF- α del LCR fueron determinados a través de la técnica de ELISA, usando un kit Rat TNF ELISA, BD OPtEIA. BD Biosciences-Pharmingen, San Diego CA USA, siguiendo el procedimiento que detalla el protocolo.

Brevemente, se sensibilizaron placas de ELISA de 96 pocillos con anticuerpo monoclonal primario anti-TNF- α de rata (en Buffer de carbonato de sodio -CBS- 0,1 M, pH 9.5), dilución 1:250, durante la noche a 4 °C. Se lavaron los pocillos con solución de lavado (Buffer Fosfato Salino -PBS- con 0,05% de Tween 20) e incubaron con solución de bloqueo (PBS con 10% de suero fetal bovino -FBS-, pH 7,0) durante 1 h a temperatura ambiente. Se procedió a lavar los pocillos y sembrar las muestras de LCR y las distintas diluciones del patrón (concentraciones: 3,91-7,81-15,63-31,25-62,50-125,00-250,00-

500,00-1000,00-2000,00 pg/mL), se dejó reposar durante 2 h a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron los pocillos e incubaron con anticuerpo secundario anti-rata marcado con biotina (en PBS-FBS), dilución 1:250, durante 1 h a temperatura ambiente. Se lavó e incubó con reactivo enzimático (Estreptavidina-peroxidasa de rábano en PBS-FBS), dilución 1:250, durante 30 min a temperatura ambiente. Luego se lavó e incubó con el sustrato Tetrametil bencidina (TMB), durante 30 min a temperatura ambiente y al abrigo de la luz. La reacción se detuvo con el agregado de ácido orto-fosfórico 1 M y se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 450 nm, en elisómetro. Los resultados de TNF- α de las muestras se expresan en pg/mL, interpolando las absorbancias de las mismas en una curva patrón.

11. Determinación de IL-6 en LCR y plasma

Los niveles de IL-6 del LCR y plasma se determinaron a través de la técnica de ELISA, usando un kit Rat IL-6 ELISA, BD OPTeIA. BD Biosciences-Pharmingen, San Diego CA USA, siguiendo el procedimiento que detalla el protocolo. La técnica se describió para la determinación de TNF- α en LCR, las diferencias son: anticuerpo primario monoclonal anti-IL-6 de rata, dilución 1:125; anticuerpo monoclonal anti-rata; patrón recombinante de IL-6 de rata. Los resultados de IL-6 de las muestras se expresan en pg/mL, interpolando las absorbancias de las mismas en una curva patrón.

12. Aislamiento de microvasos cerebrales

La técnica de aislamiento de microvasos cerebrales fue realizada de acuerdo al protocolo establecido por Yamakawa y col [282]. Brevemente, una hora después del challenge de salina o anfetamina ip. ó 90 min después de Ang II icv. se anestesiaron los animales con pentobarbital (50 mg/kg ip.) y posterior a la pérdida de los reflejos palpebrales y musculares se colocaron en una plataforma de perfusión inmovilizando las extremidades. Se realizó un corte en área torácica visualizando corazón y aorta y se perfundió transcárdialmente con 250 mL de solución fisiológica y heparina (200 μ L/L). Se clameó aorta descendente, se practicó corte en aurícula derecha cardíaca y corrigió goteo

a 60 gotas/min. Luego se extrajeron los cerebros y cortaron con tijera en buffer sucrosa frío (-SBF- solución de sucrosa 0,32 M con hepes 3 mM, pH 7,4, a 4 °C). Se homogenizaron los cerebros en SBF y trasvasaron a tubos falcon. Los homogenatos de cerebros se sometieron a centrifugación diferencial en gradientes de sucrosa: Se utilizaron 2 centrífugas, una ultracentrífuga Sorval SM-24 (para centrifugaciones de 1.000 G en adelante) y una centrífuga analítica MSE (para centrifugaciones menores a 1.000 G). Se centrifugó 2 veces a 1000 G - 10 min - 4 °C, en ambas se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en SBF. Siguió 3 centrifugaciones a 100 G - 30 seg - 4 °C, en cada una de ellas se reservó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en SBF. Los sobrenadantes reservados se centrifugaron a 200 G - 2.5 min - 4 °C, se descartó sobrenadante y resuspendió el pellet en SBF. Se centrifugó nuevamente a 200 G - 2 min - 4 °C, se descartó el sobrenadante y resuspendió en PBS con 1mg/mL de albúmina de suero bovino (PBS-BSA) frío. Se centrifugó a 200 G - 3 min - 4 °C, se descartó el sobrenadante y se resuspendió en PBS-BSA. Se realizó la última centrifugación a 14.000 G - 10min - 4 °C, se descartó sobrenadante y el pellet (microvasos aislados) se conservó a -20 °C hasta su utilización.

13.Estrés oxidativo en microvasos cerebrales

Para determinar el daño oxidativo, peroxidación lipídica de los microvasos cerebrales, se determinó el índice de peroxidación lipídica a través del ensayo de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) descrita por Ohkawa y col. [283]. Dado que los productos de peroxidación lipídica (originados por la interacción de lípidos séricos o tisulares con radicales libres del oxígeno) resultan difíciles de determinar, se utilizó una técnica que cuantifica los productos de su degradación metabólica, constituidos fundamentalmente por aldehídos de alta capacidad reactiva, siendo el más significativo el MDA [284, 285]. Este MDA reacciona en presencia del ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) para formar productos cromógenos muy estables que pueden determinarse por espectrofotometría [283, 286].

Brevemente, se llevó a temperatura ambiente las muestras de microvasos cerebrales aislados, se añadió KCl 1,15% y homogeneizó por 10 min. Se reservó una alícuota para la determinación de proteínas totales por el método de Bradford. Se agregó dodecilsulfato

sódico (SDS) 8,1%, ácido acético 20% -pH 3,5- y TBA 0,8%. Se homogeneizó y llevó a baño maría a 95 °C durante 1 h. Posteriormente se enfriaron las muestras en baño invertido durante 5 min y centrifugaron a 4.000 rpm durante 10 min en una centrifuga Eppendorf. La absorbancia del producto coloreado se leyó a una longitud de onda de 532 nm en elisómetro. Paralelamente se realizó una curva patrón con tetrametoxipropano para interpolar las absorbancias de las muestras e informar los niveles de MDA (nmol/ μ g proteína).

14. Inmunohistoquímica de Fos y Fos-OT

Noventa minutos después de Ang II icv., los cerebros de los animales se procesaron para la detección inmunohistoquímica de Fos y Fos-OT. La inmunomarcación de Fos se realizó en las siguientes áreas cerebrales: CPu, NAc core, NAc shell, CeA, BLA, NTS, SFO, SON, PVN y CA-1, CA-3 y girus dentado del hipocampo. Mientras que, la inmunomarcación de Fos-OT se realizó en el SON y diferentes subnúcleos del PVN. Se seleccionó este tiempo debido a que el aumento de la formación de la proteína Fos (1 a 2 horas después de la estimulación), se correlaciona con aumento de la actividad neural en varios sistemas neuronales [287, 288]. Los animales fueron anestesiados con pentobarbital (50 mg/kg ip.) y se perfundieron con solución fisiológica (como se detalló anteriormente en el aislamiento de microvasos cerebrales), seguido por 400 mL de paraformaldehído al 4% en buffer fosfato 0,1 M (PB, pH 7,4). Se retiraron los cerebros, se dejaron en la misma solución durante la noche a 4 °C y luego se almacenaron en solución de sucrosa al 30% (en PB) en frío. Se obtuvieron secciones coronales de 40 μ m de espesor, utilizando un micrótomo de congelación (Leica CM15105) de: CPu (Bregma 1.6 mm), NAc core y NAc shell (Bregma 1.6 mm), CeA y BLA (Bregma -2.80 mm), SFO (Bregma -1.40 mm), NTS (Bregma -13.80 mm), SON (Bregma -1.30 mm), PVN (distancia de Bregma de -0.92 mm a -2.12 mm) y CA-1, CA-3 y girus dentado (Bregma -1.30 mm). Las secciones se recogieron en PB 0,01 M (en flotación libre) y se colocaron en una mezcla de H₂O₂ y metanol (10% de ambos) hasta la desaparición del burbujeo. Las secciones se incubaron en suero normal de caballo (NHS -GIBCO, Auckland, NZ-) al 10% en PB, durante 2 h con el fin de bloquear los sitios de unión no específicos. Todas las secciones de cerebro, se procesaron primero para IR-Fos usando el procedimiento avidina-biotina peroxidasa.

Los procedimientos de inmunomarcación se realizaron de acuerdo al protocolo descrito por Franchini y Vivas y Franchini y col. [289, 290]. Brevemente, las secciones de flotación libre se incubaron durante la noche a temperatura ambiente con anticuerpo monoclonal anti-Fos de conejo (producido en conejos contra una secuencia de 14 aminoácidos sintético, correspondiente a los residuos 4-17 de Fos humano) (Ab-5; Oncogene Science, Manhasset, NY), diluido 1: 10.000 en PB que contiene 2% de NHS y 0,3% de Tritón X-100 (Flucka analítica). A continuación se lavaron las secciones con 0,01 M PB y se incubaron con anticuerpo secundario policlonal marcado con biotina (diluido 1: 500 en 2% NHS-PB), durante 2 h a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron los cortes y se incubaron con avidina-biotina-peroxidasa (ABC Vector Laboratories, Burlingame, CA; diluido 1: 200 en 2% NHS-PB), durante 2 h a temperatura ambiente. La peroxidasa se detectó con clorhidrato de diaminobencidina (DAB -Sigma Chemical Co.-); la solución se intensificó con cloruro de cobalto 1% y sulfato de amonio y níquel 1%. Este método origina un producto de reacción violeta en el núcleo.

Por otro lado, las secciones coronales que contienen el PVN y SON inmunomarcadas con Fos, también se procesaron para la inmunoreactividad de OT (IR-OT). Para ello se incubaron durante 72 horas a 4 °C con el anticuerpo policlonal anti-OT de conejo (Peninsula Laboratories, San Carlos, CA; 1: 1000). Posteriormente los cortes se lavaron e incubaron con inmunoglobulina anti-conejo marcada con biotina, seguida del complejo avidina-biotina-peroxidasa durante 2 h a temperatura ambiente cada uno. La IR-OT citoplásmica se detectó con DAB sin intensificar, que origina un producto de reacción marrón. Por último, las secciones se montaron en portaobjetos gelatinizados, se dejaron secar, se deshidrataron en xileno y se les colocó un cubreobjetos con medio de montaje DPX para histología (Flucka Analítica).

Las imágenes que contienen núcleos IR-Fos e IR-Fos-OT se obtuvieron usando un sistema computarizado que incluye un microscopio Leica DM 4000B equipado con una cámara digital Leica DFC unido a un dispositivo de mejora de contraste. Los núcleos del cerebro que revelaron IR-Fos e IR-Fos-OT, fueron identificados y delimitados según atlas de Paxinos y Watson [273]. Se contó el número de neuronas positivas a Fos-OT en SON y diferentes subnúcleos del PVN: PeM, PaAM, PaMM, PaDC, PaLM y parvocelular posterior (PaPo).

Las secciones cerebrales de todos los grupos experimentales se procesaron simultáneamente. Las imágenes se estandarizaron mediante el programa de análisis de imágenes Adobe Photoshop (versión 5.5). Las neuronas IR-Fos presentan una tinción

negra densa del núcleo, mientras que las neuronas IR-Fos-OT presentan una tinción marrón densa del citoplasma conjuntamente con la coloración negra del núcleo. El conteo de cada área del cerebro se realizó bilateralmente en dos secciones, el valor obtenido fue el promedio de los cuatro conteos. El recuento se realizó en un área 0,37 mm² (que corresponde a una ampliación de 200X). Los resultados proporcionan datos relativos de la expresión de IR-Fos e IR-Fos-OT y no estimaciones precisas del número absoluto de células. El recuento fue realizado por dos operadores a doble ciego en cada sección analizada.

15. Inmunohistoquímica de ICAM-1 y R-AT₁

15.1. ICAM-1

Los cerebros obtenidos de misma manera que en la técnica de inmunohistoquímica para Fos y Fos-OT, fueron procesados de la siguiente manera: Se obtuvieron secciones coronales de 10 µm de espesor, utilizando un micrótopo de congelación (LeicaCM15105), para obtener cortes transversales de arteria cerebral media, posterior y anterior y arterias de menor calibre. Las secciones se recogieron en portaobjetos positivados y se bloqueó la peroxidasa endógena en solución de H₂O₂ y metanol (10% de ambos) hasta la desaparición del burbujeo. Posteriormente se lavaron las secciones, se incubaron en NHS al 10% en PB (durante 2 h) y se incubaron con una solución de anticuerpo monoclonal mouse anti-R-AT₁, toda la noche a T° ambiente (1:10.000). A continuación se lavaron las secciones con 0,01 M PB y se incubaron con anticuerpo secundario policlonal marcado con biotina (mouse- Jackson Laboratorios), diluido 1: 500 en 2% NHS-PB, durante 2 h a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron los cortes y se incubaron con avidina-biotina-peroxidasa (ABC Vector Laboratories, Burlingame, CA; diluido 1: 200 en 2% NHS-PB), durante 2 h a temperatura ambiente. La peroxidasa se detectó con solución de DAB (50 mg DAB + 100 ml de PB 0,1 M, filtrada + H₂O₂). Los vidrios se lavaron y secaron toda la noche. Se realizó una contra-tinción con azul de toluidina y cubrió con medio de montaje y cubre-objetos. La marca de ICAM-1 se evidencia en el endotelio de las arterias con una coloración marrón-violácea.

Las imágenes que muestran las distintas arterias cerebrales se obtuvieron usando un sistema computarizado que incluye un microscopio Leica DM 4000B equipado con una cámara digital Leica DFC unido a un dispositivo de mejora de contraste. Las secciones

cerebrales de todos los grupos experimentales se procesaron simultáneamente. Las imágenes se estandarizaron mediante el programa de análisis de imágenes Adobe Photoshop (versión 5.5).

15.2. R-AT₁

Se procedió de la misma manera que para inmunohistoquímica de ICAM-1. Variaciones: se utilizó suero normal de cabra (NGS) para la solución de bloqueo y para la solución de anticuerpo primario; se utilizó anticuerpo monoclonal mouse anti-ICAM-1, diluido 1:500 y se incubó por 2 h a T° amb.; el anticuerpo secundario fue el mismo que para ICAM-1 pero en una dilución 1:1000, incubado durante 1 h a T° amb.; el incubado con el complejo ABC fue de 1 h. La marca de R-AT₁ se evidencia en el endotelio de las arterias con una coloración marrón-violácea.

16. Inmunofluorescencia de R-AT₁ y HSP-70 en microvasos cerebrales

Se determinó la inmunofluorescencia de R-AT₁ en microvasos cerebrales aislados de animales de los distintos grupos experimentales en estudio. Como control negativo, algunas muestras se procesaron en ausencia del anticuerpo primario. Se sembraron con pincel los microvasos aislados en portaobjeto positivados, se dejaron secar 4 h en estufa a 37 °C y posteriormente se delimitó la zona de sembrado con lápiz Dakopen. Se bloquearon las uniones inespecíficas con solución de bloqueo (PBS con 1% de BSA –PBS-BSA–) durante 40 min en cámara húmeda y lavó 2 veces con PBS. Los microvasos se incubaron durante la noche a 4 °C en cámara húmeda, con anticuerpo monoclonal de ratón anti-R-AT₁ [291], diluido 1:100 en PBS-BSA. A continuación se lavó y se incubó con anticuerpo secundario policlonal de cabra anti-IG-H&L de ratón (Alexa Fluor 555 - abcam), diluido 1:400, durante 30 min en cámara húmeda y al abrigo de la luz. Se lavó y montó con glicerol y cubreobjeto para prolongar la fluorescencia.

Por otro lado, para la inmunofluorescencia de HSP-70 los microvasos sembrados en portaobjetos positivados, se secaron por 30 min en estufa a 37 °C y luego se fijaron con una solución de paraformaldehído al 4% en PB 0,1 M (pH 7,4). Posteriormente, se permeabilizaron los microvasos con Tritón x-100 al 1% en PBS. Se lavó y bloqueó las uniones inespecíficas con solución de bloqueo. Se lavó nuevamente e incubó durante la noche a 4 °C en cámara húmeda con el anticuerpo primario monoclonal de ratón IgG1 anti-

HSP-70 de rata (clon BRM-22 – Sigma), diluido 1:400. En adelante se procedió de igual manera que para la inmunofluorescencia de R-AT₁.

Las imágenes que contienen inmunofluorescencia para R-AT₁ y HSP-70 se obtuvieron usando un sistema computarizado que incluye un microscopio invertido de epifluorescencia Nikon Eclipse TE 2000-U equipado con una cámara de video Nikon DS-5M. Los microvasos cerebrales de todos los grupos experimentales se procesaron simultáneamente. Las imágenes se estandarizaron mediante el programa de análisis de imágenes Adobe Photoshop (versión 5.5). Los microvasos inmunofluorescentes para R-AT₁ y HSP-70 presentan un color rojo en contraste con el fondo negro de las imágenes. La intensidad de fluorescencia se midió utilizando el software ImageJ de NIH. El análisis se realizó en un área 0,37 mm² (que corresponde a una ampliación de 200X). Para cada grupo de tratamiento, las fotografías de los microvasos se eligieron al azar (n= 5-6). Los resultados proporcionan datos relativos de la expresión de R-AT₁ y HSP-70 en microvasos cerebrales aislados. El recuento fue realizado por dos operadores a doble ciego en cada sección analizada, pero se utilizó sólo una.

RESULTADOS

RESULTADOS

1. OBJETIVO 1

Evaluar las posibles alteraciones inducidas por anfetamina, sobre respuestas clásicas de Ang II icv. y el rol de los R-AT₁ en:

- La ingesta de sodio y agua.
- La excreción de sodio y potasio urinario.
- La actividad de la renina plasmática (PRA).
- Los parámetros bioquímicos y de función renal en sangre y orina.
- La activación neuronal en áreas cerebrales relacionadas con la recompensa a drogas de abuso y la osmoregulación.

Los estudios realizados en mamíferos han demostrado que la administración de Ang II icv., produce un aumento de la excreción renal de sodio y potasio [54, 83, 86], de la ingesta de sodio y agua [292, 293] y una disminución de la PRA [93]. Además, la Ang II icv. induce síntesis temprana de proteínas, tales como Fos en el SFO, el área preóptica media, PVN y SON del hipotálamo [294, 295]. Estas áreas cerebrales están involucradas en las acciones centrales osmoregulatorias y neuroendócrinas de Ang II y participan en las acciones inducidas por anfetamina.

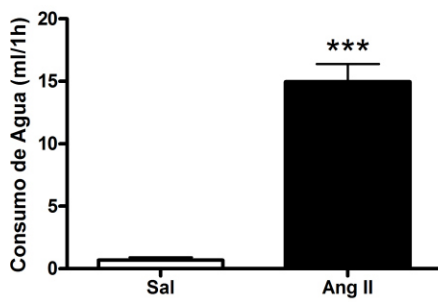
1.1. Efecto de Ang II icv. sobre: Ingesta de sodio y agua, excreción de sodio y potasio urinario, actividad de la renina plasmática, IR-Fos, memoria de trabajo, respuesta de ansiedad e inflamatoria.

En primer lugar se corroboró que la dosis de Ang II icv. utilizada (400 pmol), fuera eficaz para inducir un incremento significativo en la ingesta de sodio y agua, un aumento en la excreción de sodio y potasio urinario, una disminución en la IR-Fos en áreas hipocampales, un aumento de IR-Fos en áreas relacionadas con la recompensa y la osmoregulación, un marcado efecto ansiogénico y un deterioro en la memoria de trabajo

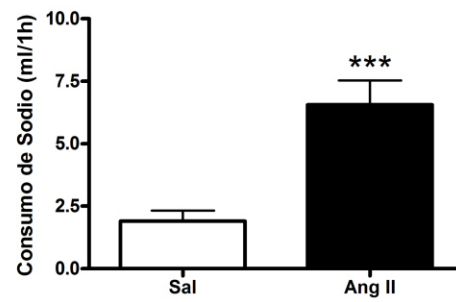
(Figura 15 y 16). Los resultados obtenidos del análisis Test-t revelaron diferencias significativas:

Ingesta de agua $p(41)=10.08$ $p<0.001$; ingesta de sodio $p(43)=4.575$ $p<0.001$, natriuresis $p(16)=2.674$ $p<0.05$; kaliuresis $p(27)=2.184$ $p<0.05$; actividad de la renina plasmática $p(12)=2.602$ $p<0.05$; IR-Fos en CA3 $p(18)=3.846$ $p<0.01$; IR-Fos en Girus Dentado $p(17)=14.48$ $p<0.001$; Hole Board $F(9,90)=28,02$ $p<0.001$ y el post-test Bonferroni indicó que en el grupo con Ang II icv. el orificio más explorado es diferente del 2° ($p<0.001$); plus maze $p(19)=11.00$ $p<0.001$; IR-Fos en NAcc core $p(15)=3.445$ $p<0.01$; TNF- α $p(15)=2.219$ $p<0.05$.

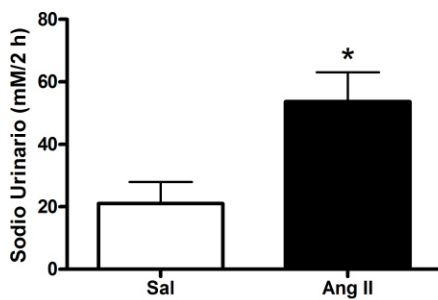
Ingesta de Agua



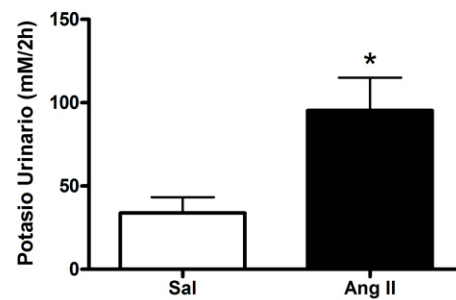
Ingesta de Sodio



Natriuresis



Kaliuresis



Renina Plasmática

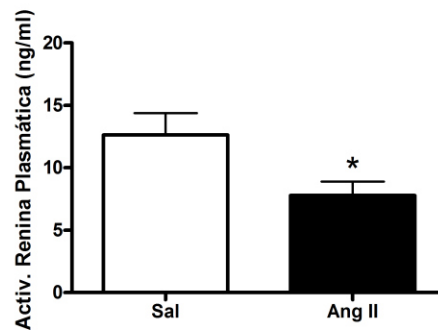
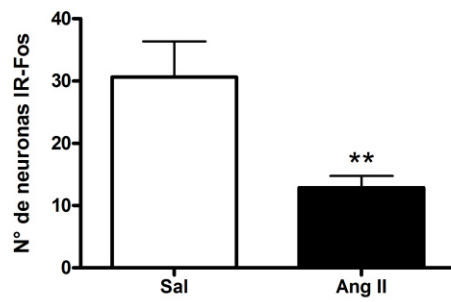
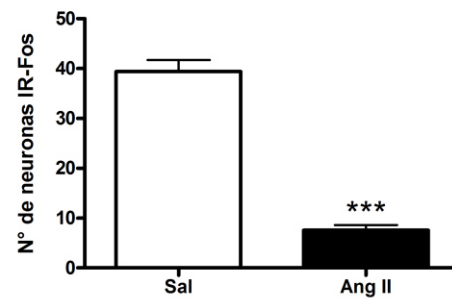


Figura 15: Determinación de: Ingesta de agua (mL/h), ingesta de sodio (mL/h), natriuresis (mM/2h), kaliuresis (mM/2h) y actividad de renina plasmática (ng/mL), luego de inyección de salina ó de Ang II icv. (400 pmol), Grupos: Sal (n= 5-11), Ang II (n= 11-15). Los valores expresan la media +/- ES. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$. Test-t.

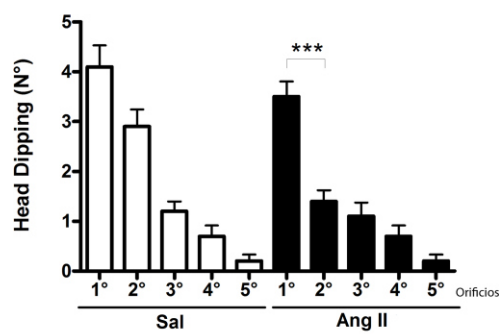
IR-Fos en CA-3



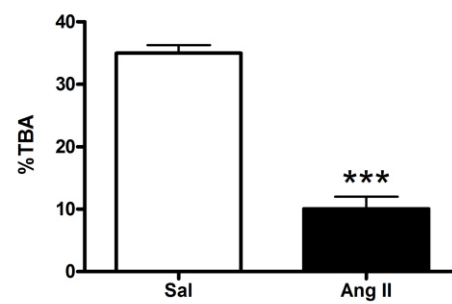
IR-Fos en Girus Dentado



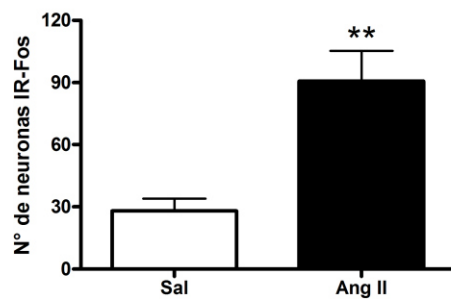
Hole Board



Plus Maze



IR-Fos en NAc core



TNF- α

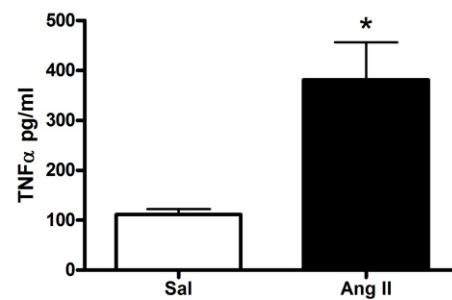


Figura 16: Determinación de: N° de neuronas IR-Fos en CA-3 y girus dentado del hipocampo, N° de *head dipping* en el test de *Hole Board*, tiempo de permanencia en el brazo abierto del *Plus Maze* (TBA-%), N° de neuronas IR-Fos en NAc core y niveles de TNF- α en LCR (pg/mL), luego de inyección de salina ó de Ang II icv. (400 pmol), Grupos: Sal (n= 5-11), Ang II (n= 11-15). Los valores expresan la media +/- ES. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001. Test ANOVA una vía, post test Bonferroni para resultados del Hole Board. Test-t para los demás resultados.

1.2. Efecto de la exposición repetida a anfetamina sobre la ingesta de agua y sodio inducido por Ang II icv.

Ang II icv. indujo un aumento en la ingesta de agua, similar en todos los grupos estudiados. Los resultados obtenidos del análisis estadístico ANOVA una vía, no revelaron diferencias significativas en la ingesta de agua a los 7 ($F(3,39)= 0,1525$ $p>0.05$) y a los 21 días ($F(3,38)= 0,06887$ $p>0.05$) post-anfetamina (Figura 17). En los animales controles que recibieron salina icv. no se encontró ninguna diferencia entre los grupos. La exposición a anfetamina no modificó la ingesta de sodio y agua basal (datos no presentados).

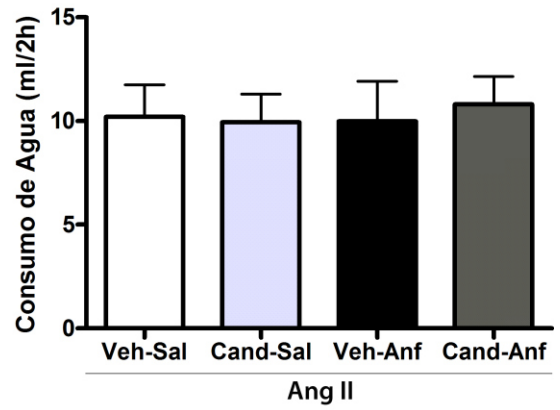
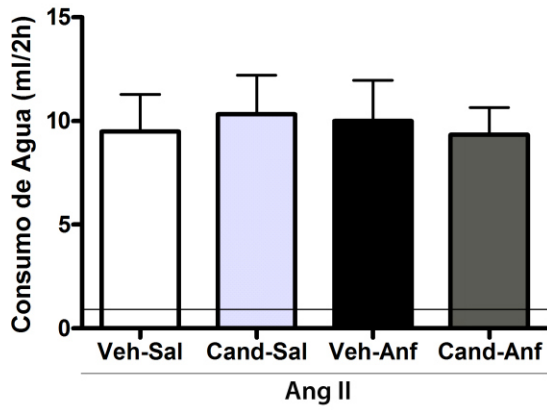
7 días: Siete días después de la última exposición a anfetamina, se observó una disminución marcada en la ingesta de sodio inducido por Ang II icv. (grupo Veh-Anf) y el pretratamiento con bloqueante de los R-AT₁ no previno esta respuesta (Cand-Anf) (Figura 18). Los resultados obtenidos del análisis ANOVA una vía fueron: $F(3,38)=7.305$ $p<0.001$ y el post-test Student Newman-Keuls indicó que Veh-Anf fue significativamente diferente de Veh-Sal ($p<0.05$) y de Cand-Sal ($p<0.01$) y que el grupo Cand-Anf fue significativamente diferente de los dos grupos controles (Veh-Sal y Cand-Sal) ($p<0.01$).

21 días: Veintiún días después de la exposición a anfetamina, la ingesta de sodio inducido por Ang II icv. se mantuvo disminuída. El pretratamiento con candesartan restableció la respuesta a Ang II icv. (Figura 18). Los resultados obtenidos del análisis ANOVA una vía fueron: $F(3,38)=4.671$ $p<0.01$ y el post-test Student Newman-Keuls indicó que el grupo Veh-Anf fue significativamente diferente de Veh-Sal y de Cand-Sal ($p<0.05$) y de Cand-Anf ($p<0.01$).

7 DÍAS

21 DÍAS

Ingesta de Agua



Ingesta de Sodio

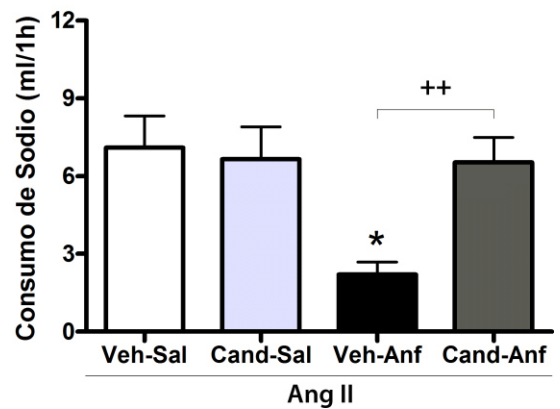
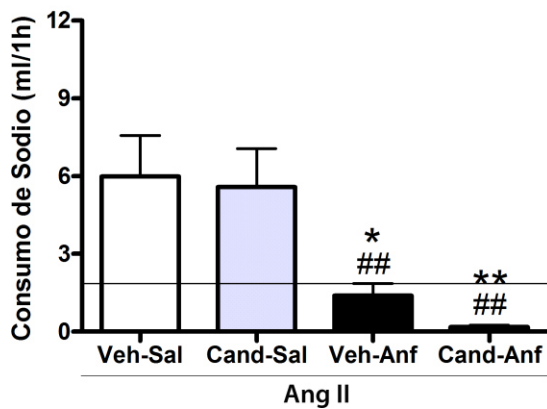


Figura 17: Ingesta de agua y sodio (ml/1h), luego de inyección de Ang II icv. (400 pmol), 7 y 21 días post-Anf. Grupos: Veh-Sal, Cand-Sal, Veh-Anf y Cand-Anf (n= 11-13). Los valores expresan la media +/- ES. *p<0.05 y **p<0.01 significativamente diferente de Veh-Sal y ##p<0.01 diferente de Cand-Sal, 7 días post-Anf; *p<0.05 diferente de Veh-Sal y Cand-Sal, y ++p<0.01 diferente de Cand-Anf, 21 días post-Anf. La línea en los gráficos de izq. representa la media del grupo control con salina icv. (ver Figura 15).

1.3. Efecto de la exposición repetida a anfetamina sobre la excreción de sodio y potasio urinario inducida por Ang II icv.

1.3.1. Natriuresis

La natriuresis (en orina de 2 y 24 h) inducida por Ang II icv., se incrementó con la exposición repetida a anfetamina, a los 7 y 21 días después del psicoestimulante. El pretratamiento con candesartan restauró la respuesta a Ang II icv. sólo a los 21 días post-psicoestimulante (Figura 18).

Natriuresis de 2h, 7 días post-Anf: Los resultados obtenidos del análisis ANOVA una vía fueron: $F(3,47)=4.127$ $p<0.05$ y el post-test Student Newman-Keuls indicó que el grupo Veh-Anf fue significativamente diferente de Veh-Sal y de Cand-Sal ($p<0.05$), y que el grupo Cand-Anf fue significativamente diferente de los dos grupos controles ($p<0.05$).

Natriuresis de 2h, 21 días post-Anf: Los resultados obtenidos del análisis ANOVA una vía fueron: $F(3,37)=8.730$ $p<0.001$ y el post-test Student Newman-Keuls indicó que el grupo Veh-Anf fue significativamente diferente de Veh-Sal y de Cand-Anf ($p<0.001$) y de Cand-Sal ($p<0.01$).

Natriuresis de 24h, 7 días post-Anf: Los resultados obtenidos del análisis ANOVA una vía fueron: $F(3,47)=9.777$ $p<0.001$ y el post-test Student Newman-Keuls indicó que el grupo Veh-Anf fue significativamente diferente de Veh-Sal y de Cand-Sal ($p<0.001$) y que el grupo Cand-Anf fue significativamente diferente de Veh-Sal y de Cand-Sal ($p<0.01$).

Natriuresis de 24h, 21 días post-Anf: Los resultados obtenidos del análisis ANOVA una vía fueron: $F(3,38)=4.926$ $p<0.01$ y el post-test Student Newman-Keuls indicó que el grupo Veh-Anf fue significativamente diferente de Veh-Sal ($p<0.05$), de Cand-Sal ($p<0.01$) y de Cand-Anf ($p<0.05$).

1.3.2. Kaliuresis

No se encontraron diferencias significativas en la Kaliuresis de 2 h, entre los grupos experimentales, tanto a los 7 y a los 21 días post-psicoestimulante (tabla 1 y 2). En cambio se observó, que la exposición repetida a anfetamina incrementó los niveles de kaliuresis en orina de 24 h, a los 7 y 21 días después. El pretratamiento con candesartan restauró la respuesta a Ang II icv. sólo a los 21 días post-anfetamina (Figura 18).

Kaliuresis de 2h: Los resultados obtenidos del análisis ANOVA una vía a los 7 días post-anfetamina no revelaron diferencias significativas: $F(3,44)=0.04004$ $p>0.05$ (Tabla 2);

y los resultados obtenidos del análisis ANOVA a una vía, 21 días post-psicoestimulante, tampoco revelaron diferencias significativas: $F(3,36)=0.02192$ $p>0.05$ (Tabla 3).

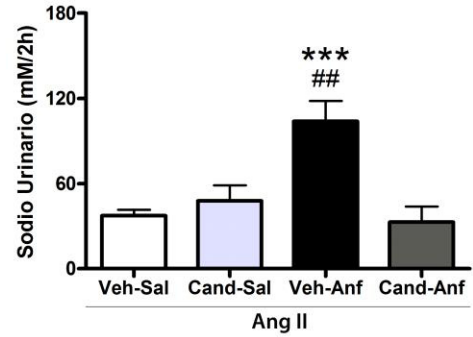
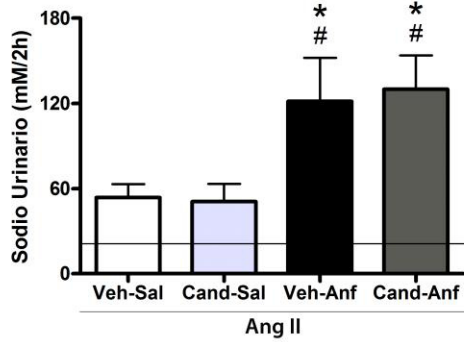
Kaliuresis de 24h, 7 días post-Anf: Los resultados obtenidos del análisis ANOVA una vía fueron: $F(3,46)=10.14$ $p<0.001$ y el post-test Student Newman-Keuls indicó que el grupo Veh-Anf fue significativamente diferente de los dos grupos controles ($p<0.001$), y que el grupo Cand-Anf fue significativamente diferente de Veh-Sal y de Cand-Sal ($p<0.05$ y $p<0.01$ respectivamente).

Kaliuresis de 24h, 21 días post-Anf: Los resultados obtenidos del análisis ANOVA una vía fueron: $F(3,37)=4.830$ $p<0.01$ y el post-test Student Newman-Keuls indicó que el grupo Veh-Anf fue significativamente diferente los otros tres grupos ($p<0.05$ y $p<0.01$).

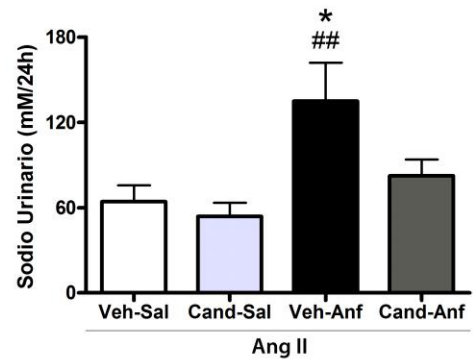
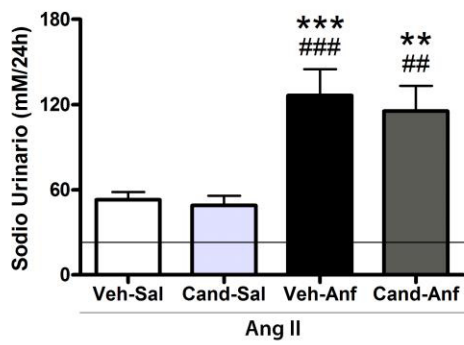
7 DÍAS

21 DÍAS

Natriuresis 2 h



Natriuresis 24 h



Kaliuresis 24 h

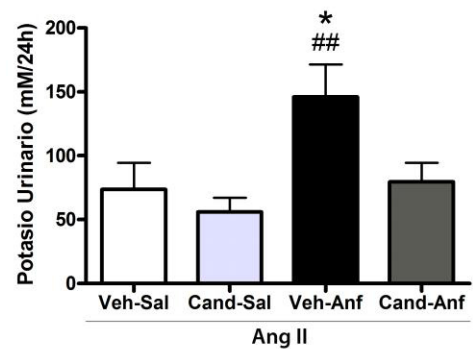
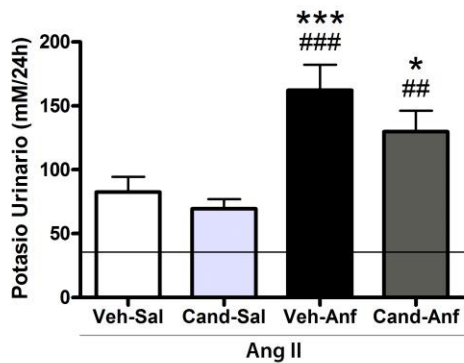


Figura 18: Natriuresis de 2 y 24 h (mM) y kaliuresis de 24 h (mM), luego de inyección de Ang II icv. (400 pmol), 7 y 21 días post-Anf. Grupos: Veh-Sal, Cand-Sal, Veh-Anf y Cand-Anf (n= 11-14). Los valores expresan la media +/- ES. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ significativamente de Veh-Sal, 7 días post-Anf.; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ y ### $p < 0.001$ diferente de Cand-Sal; * $p < 0.05$ y *** $p < 0.001$ diferente de Veh-Sal y Cand-Anf, 21 días post-Anf. La línea en los gráficos de izq. representa la media del grupo control con salina icv. (ver Figura 15).

1.4. Efecto de la exposición repetida a anfetamina sobre la actividad de la renina plasmática, luego de Ang II icv.

La exposición repetida a anfetamina favoreció la disminución de la PRA inducida por Ang II icv., a los 7 y 21 días post-psicoestimulante. El pretratamiento con candesartan previno esta respuesta sólo a los 21 días post-anfetamina (Figura 19).

7 días: Los resultados obtenidos del análisis ANOVA una vía, 7 días post-anfetamina, fueron: $F(3,26)=5.067$ $p<0.01$ y el post-test Student Newman-Keuls indicó que el grupo Veh-Anf es significativamente diferente de Veh-Sal y de Cand-Sal ($p<0.05$ y $p<0.01$ respectivamente).

21 días: Veintiún días después de la exposición a anfetamina los resultados del análisis estadístico de ANOVA una vía fueron: $F(3,18)=4.295$ $p<0.05$ y el post-test Student Newman-Keuls indicó que el grupo Veh-Anf es significativamente diferente de los demás grupos ($p<0.05$).

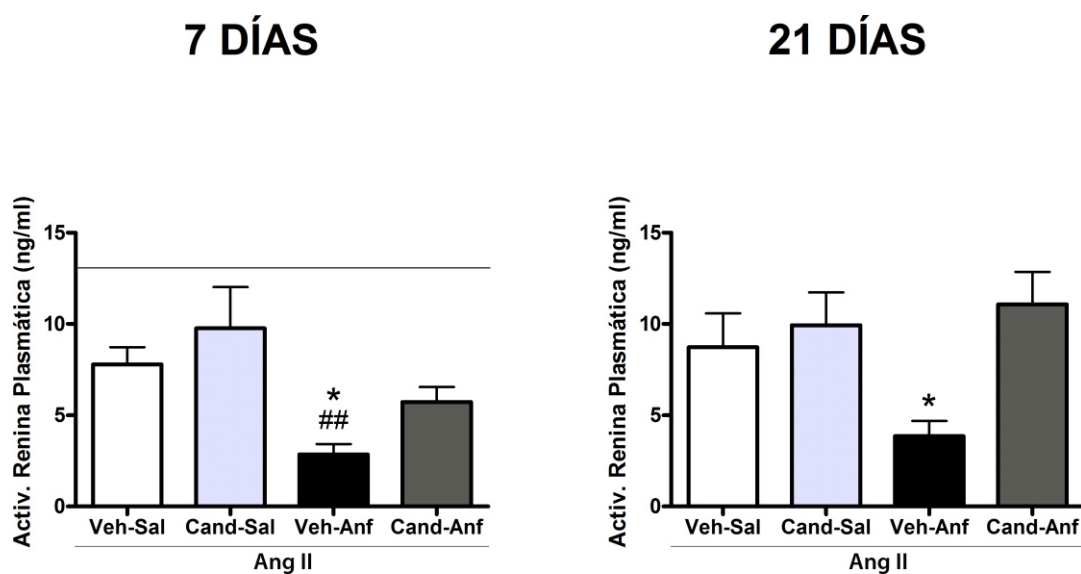


Figura 19: Actividad de renina plasmática ($n= 5-9$), en respuesta a Ang II icv. (400 pmol), 7 y 21 post-Anf. Grupos: Veh-Sal, Cand-Sal, Veh-Anf y Cand-Anf. Los valores expresan la media \pm ES. * $p<0.05$ y ## $p<0.01$ significativamente diferente de Veh-Sal y Cand-Sal respectivamente, 7 días post-Anf; * $p<0.05$ diferente de los demás grupos, 21 días post-Anf. La línea en el gráfico de izq. representa la media del grupo control con salina icv. (ver Figura 15).

1.5. Efecto de la exposición repetida a anfetamina sobre parámetros bioquímicos urinarios y plasmáticos, luego de Ang II icv.

Se determinaron los niveles plasmáticos de: albúmina, proteínas totales, creatinina, urea, cloruro, potasio, sodio y glucosa. Además, en orina de 24 h se determinó: albúmina, proteínas totales, creatinina, urea, cloruro y glucosa. Mientras que en orina de 2 h se evaluó: creatinina, urea y cloruro. Por otro lado se cuantificó el volumen de orina de 2 y 24 h. Todos estos parámetros se determinaron luego de la inyección de Ang II icv., a los 7 y 21 días post-anfetamina. También, se controló el peso de los animales a lo largo del tratamiento. No se observaron diferencias en ninguno de estos parámetros determinados, entre los distintos grupos experimentales (Veh-Sal, Cand-Sal, Veh-Anf y Cand-Anf). Los resultados obtenidos del análisis estadístico ANOVA una vía, no revelan diferencias significativas en los parámetros estudiados, posterior a Ang II icv., a los 7 y a los 21 días post-anfetamina (Tabla 2 y 3). Sólo se encontraron diferencias en la excreción de sodio en orina de 2 y 24 h y en la excreción de potasio en orina de 24 h (Figura 18 -análisis ya presentado-).

Tabla 2. Parámetros bioquímicos urinarios y plasmáticos, 7 días post-anfetamina

Grupos	Peso (g)	Muestras	Vol. Orina mL	Alb g/dL	Prot g/dL	Creat mg%	Urea mg%	Cl ⁻ mM	K ⁺ mM	Na ⁺ mM	Gluc mg%
Veh-Sal	285.7 ± 2.7	Plasma	-	3.5 ± 0.1	6.6 ± 0.2	0.40 ± 0.02	47.4 ± 2.8	104.7 ± 1.9	5.47 ± 0.23	159.8 ± 4.7	180.8 ± 6.2
		Or. 2 h	5.6 ± 1.4	-	-	29.4 ± 6.9	1651 ± 409	105.7 ± 25.6	94.8 ± 21.3	Fig. 18	-
		Or. 24 h	19.8 ± 1.9	-	55.3 ± 12.6	33.9 ± 4.7	1717 ± 201	94.9 ± 20	Fig. 18	Fig. 18	-
Cand-Sal	292.2 ± 2.9	Plasma	-	3.7 ± 0.1	6.9 ± 0.3	0.38 ± 0.02	47.2 ± 2.2	105.9 ± 3.8	5.64 ± 0.20	160.8 ± 4.7	176.0 ± 20.4
		Or. 2 h	5.1 ± 1.5	-	-	29.8 ± 7.7	1632 ± 412	113.4 ± 35.7	90.54 ± 16.3	Fig. 18	-
		Or. 24 h	20 ± 2.7	-	60.7 ± 14.6	36.0 ± 7.9	1566 ± 288	75.3 ± 16.7	Fig. 18	Fig. 18	-
Veh-Anf	286.8 ± 2.5	Plasma	-	3.6 ± 0.2	6.7 ± 0.3	0.39 ± 0.03	47.8 ± 2.6	105.7 ± 4.8	5.50 ± 0.19	162 ± 5.4	174.0 ± 20.6
		Or. 2 h	5.9 ± 1.2	-	-	24.3 ± 5.9	1332 ± 319	103.7 ± 36.3	98.10 ± 18.6	Fig. 18	-
		Or. 24 h	18.9 ± 2.4	-	61.2 ± 10.9	46.5 ± 6.8	1954 ± 274	131.3 ± 19.4	Fig. 18	Fig. 18	-
Cand-Anf	294.0 ± 3.0	Plasma	-	3.7 ± 0.2	6.8 ± 0.3	0.41 ± 0.04	43.4 ± 2.6	107.8 ± 4.6	5.70 ± 0.20	158.1 ± 7.1	178.0 ± 18.9
		Or. 2 h	4.8 ± 1.2	-	-	33.7 ± 7.3	1735 ± 352	119 ± 31.2	98.71 ± 16.2	Fig. 18	-
		Or. 24 h	18.9 ± 2.9	-	67.7 ± 11.8	40.6 ± 5.5	1667 ± 256	112.7 ± 26.5	Fig. 18	Fig. 18	-

Tabla 2: Parámetros bioquímicos urinarios y plasmáticos, 7 días post-anfetamina: Proteínas totales, albúmina, creatinina, urea, glucosa y electrolitos en plasma de 24 h. Volumen de orina, creatinina, urea y cloruro en orina de 2 h. Volumen de orina, proteínas totales, creatinina, urea, glucosa y cloruro en orina de 24 h. Parámetros medidos a los 7 días post-Anf, en respuesta a Ang II icv. Peso corporal de los animales. Grupos: Veh-Sal, Cand-Sal, Veh-Anf y Cand-Anf (n= 15-21). Los valores expresan la media +/- ES. Ver Figura 18 para excreción de sodio en orina de 2 y 24 h y para excreción de potasio en orina 24 h.

Tabla 3. Parámetros bioquímicos urinarios y plasmáticos, 21 días post-anfetamina

Grupos	Peso (g)	Muestras	Vol. Orina mL	Alb g/dL	Prot g/dL	Creat mg%	Urea mg%	Cl mM	K ⁺ mM	Na ⁺ mM	Gluc mg%
Veh-Sal	325.2 ± 5.6	Plasma	-	3.1 ± 0.2	6.4 ± 0.3	0.39 ± 0.02	38.1 ± 2.1	97.5 ± 3.2	4.79 ± 0.22	153.1 ± 5.4	170.6 ± 16.6
		Or. 2 h	4.0 ± 1.3	-	-	33.4 ± 11.5	1401 ± 442	92.0 ± 44.3	88,13 ± 24,0	Fig. 18	-
		Or. 24 h	22.7 ± 2.1	-	57.6 12	35.3 ± 11.8	1499 ± 502	75.8 ± 20.7	Fig. 18	Fig. 18	-
Cand-Sal	326.9 ± 6.5	Plasma	-	3.5 ± 0.1	6.5 ± 0.2	0.44 ± 0.03	44 ± 2.7	93.5 ± 1.8	4.80 ± 0.11	156.8 ± 3.5	183.2 ± 14
		Or. 2 h	4.4 ± 0.9	-	-	33.8 ± 9.9	1573 ± 412	92.4 ± 22.4	84,42 ± 12,7	Fig. 18	-
		Or. 24 h	18.7 ± 1.6	-	51.3 13.6	25.8 ± 3.4	1123 ± 184	70.0 ± 16.9	Fig. 18	Fig. 18	-
Veh-Anf	317.7 ± 5.2	Plasma	-	3.4 ± 0.2	6.3 ± 0.2	0.46 ± 0.01	44 ± 1.2	96.6 ± 4.6	4.92 ± 0.19	157.4 ± 4.7	170.9 ± 14.9
		Or. 2 h	3.7 ± 1.1	-	-	32.0 ± 7.8	1412 ± 278	112.3 ± 22.3	83,23 ± 7,7	Fig. 18	-
		Or. 24 h	19.9 ± 1.9	-	47.9 ± 11.8	43.3 ± 9.6	1782 ± 368	96.3 ± 29.7	Fig. 18	Fig. 18	-
Cand-Anf	329.2 ± 5.5	Plasma	-	3.3 ± 0.2	6.1 ± 0.3	0.42 ± 0.03	45.7 ± 2.9	95.5 ± 4.2	5.11 ± 0.23	157.9 ± 5.5	178.1 ± 13.7
		Or. 2 h	5.0 ± 1.0	-	-	28.1 ± 9.4	1239 ± 364	82.0 ± 37.7	81,85 ± 23,6	Fig. 18	-
		Or. 24 h	24.2 ± 2.4	-	48.5 ± 10.4	46.3 ± 10.7	1932 ± 388	90.7 ± 18.4	Fig. 18	Fig. 18	-

Tabla 3: Parámetros bioquímicos urinarios y plasmáticos, 21 días post-anfetamina: Proteínas totales, albúmina, creatinina, urea, glucosa y electrolitos en plasma de 24 h. Volumen de orina, creatinina, urea y electrolitos en orina de 2 h. Volumen de orina, proteínas totales, creatinina, urea, glucosa y electrolitos en orina de 24 h. Parámetros medidos a los 21 días post-Anf, en respuesta a Ang II icv. Peso corporal de los animales. Grupos: Veh-Sal, Cand-Sal, Veh-Anf y Cand-Anf (n= 13-24). Los valores expresan la media +/- ES. Ver Figura 18 para excreción de sodio en orina de 2 y 24 h y para excreción de potasio en orina 24 h.

1.6. Efecto de la exposición repetida a anfetamina sobre la distribución de Fos inducida por Ang II icv. en CPu, NAc core, NAc shell, PVN, NTS y SFO.

Ang II icv. indujo un aumento de células IR-Fos en áreas cerebrales: CPu, NAc core, NAc Shell, PVN, NTS y SFO (resultados previos).

1.6.1. CPu

La exposición repetida a anfetamina disminuyó el número de células IR-Fos en CPu, comparado con los grupos controles (Veh-Sal y Cand-Sal), a los 7 y 21 días post-anfetamina. El pretratamiento con candesartan previno esta respuesta sólo a los 21 días post-anfetamina (Figura 20).

7 días: Los resultados obtenidos del análisis ANOVA una vía, 7 días post-anfetamina, fueron: $F(3,22)=6.094$ $p<0.01$ y el post-test Student Newman-Keuls indicó que el grupo Veh-Anf fue significativamente diferente de Veh-Sal ($p<0.05$) y de Cand-Sal ($p<0.01$) y que el grupo Cand-Anf fue significativamente diferente de Cand-Sal ($p<0.05$).

21 días: Cuando se analizó la distribución de Fos inducida por Ang II icv. en el CPu, 21 días después de la exposición a anfetamina, los resultados del ANOVA una vía fueron: $F(3,20)=7,538$ $p<0.01$ y el post-test Student Newman-Keuls indicó que el grupo Veh-Anf fue significativamente diferente de todos los grupos restantes (Cand-Sal y Cand-Anf ($p<0.05$) y Veh-Sal ($p<0.001$)).

1.6.2. NAc core

Se observó una disminución en el número de células IR-Fos en NAc core, a los 7 y 21 días después de la exposición a anfetamina. El pretratamiento con candesartan previno esta respuesta sólo a los 21 días post-anfetamina (Figura 20).

7 días: Los resultados obtenidos del análisis ANOVA una vía, 7 días post-anfetamina, fueron: $F(3,22)=8,033$ $p<0.001$ y el post-test Student Newman-Keuls indicó que el grupo Veh-Anf fue significativamente diferente de Veh-Sal ($p<0.05$) y de Cand-Sal ($p<0.001$) y que el grupo Cand-Sal fue significativamente diferente de Veh-Sal y Cand-Anf ($p<0.05$).

21 días: Veintiún días después de la exposición a anfetamina los resultados del ANOVA una vía fueron: $F(3,20)=7.331$ $p<0.01$ y el post-test Student Newman-Keuls

indicó que el grupo Veh-Anf fue significativamente diferente de todos los otros grupos ($p < 0.01$).

1.6.3. NAc shell

No se encontraron diferencias en el número de células IR-Fos en respuesta a Ang II icv. entre ninguno de los grupos analizados, tanto a los 7 como a los 21 días post-anfetamina (Figura 21). Los resultados obtenidos del análisis estadístico ANOVA a una vía, no revelaron diferencias significativas a los 7 días ($F(3,21)=2,471$ $p > 0.05$) y a los 21 días ($F(3,18)=0,3272$ $p > 0.05$) post-anfetamina, entre los diferentes grupos estudiados.

1.6.4. PVN

La exposición repetida a anfetamina, disminuyó el número de células IR-Fos en el PVN en respuesta a Ang II icv. cuando se comparó con el grupo control (Veh-Sal), a los 7 y 21 días después de la exposición a anfetamina. El pretratamiento con candesartan previno este efecto sólo a los 21 días post-anfetamina (Figura 22).

7 días: Los resultados obtenidos del análisis ANOVA una vía, a los 7 días post-anfetamina, fueron: $F(3,21)=4.250$ $p < 0.05$ y el post-test Student Newman-Keuls indicó que los grupos Veh-Anf y Cand-Anf fueron significativamente diferentes de Veh-Sal ($p < 0.05$).

21 días: Cuando se analizó la distribución de Fos inducida por Ang II icv. en PVN, 21 días después de la exposición a anfetamina, los resultados del ANOVA una vía fueron: $F(3,19)=4.931$ $p < 0.05$ y el post-test Student Newman-Keuls indicó que el grupo Veh-Anf fue significativamente diferente de todos los grupos restantes ($p < 0.05$).

1.6.5. NTS

Se observó una marcada disminución del número de células IR-Fos en NTS, sólo a los 21 días post-anfetamina, que se previno con el pretratamiento de candesartan (Figura 22).

7 días: Los resultados obtenidos del análisis estadístico ANOVA una vía, no revelaron diferencias significativas a los 7 días post-anfetamina, entre los diferentes grupos estudiados $F(3,18)=0,1653$ $p > 0.05$.

21 días: En cambio, a los 21 días después de la exposición al psicoestimulante, los resultados obtenidos del análisis ANOVA una vía si evidenciaron diferencias entre los grupos: $F(3,16)=10,43$ $p < 0.001$ y el post-test Student Newman-Keuls indicó que el grupo

Veh-Anf fue significativamente diferente de todos los otros grupos (Cand-Anf ($p < 0.01$), Veh-Sal y Cand-Sal ($p < 0.001$)).

1.6.6. SFO

No se encontraron diferencias en el número de células IR-Fos en respuesta a Ang II icv. entre ninguno de los grupos analizados, tanto a los 7 como a los 21 días post-anfetamina (Figura 22). Los resultados obtenidos del análisis estadístico ANOVA a una vía, no revelaron diferencias significativas a los 7 días ($F(3,18)=0,1606$ $p > 0.05$) y a los 21 días ($F(3,20)=0,6536$ $p > 0.05$) post-anfetamina, entre los diferentes grupos estudiados.

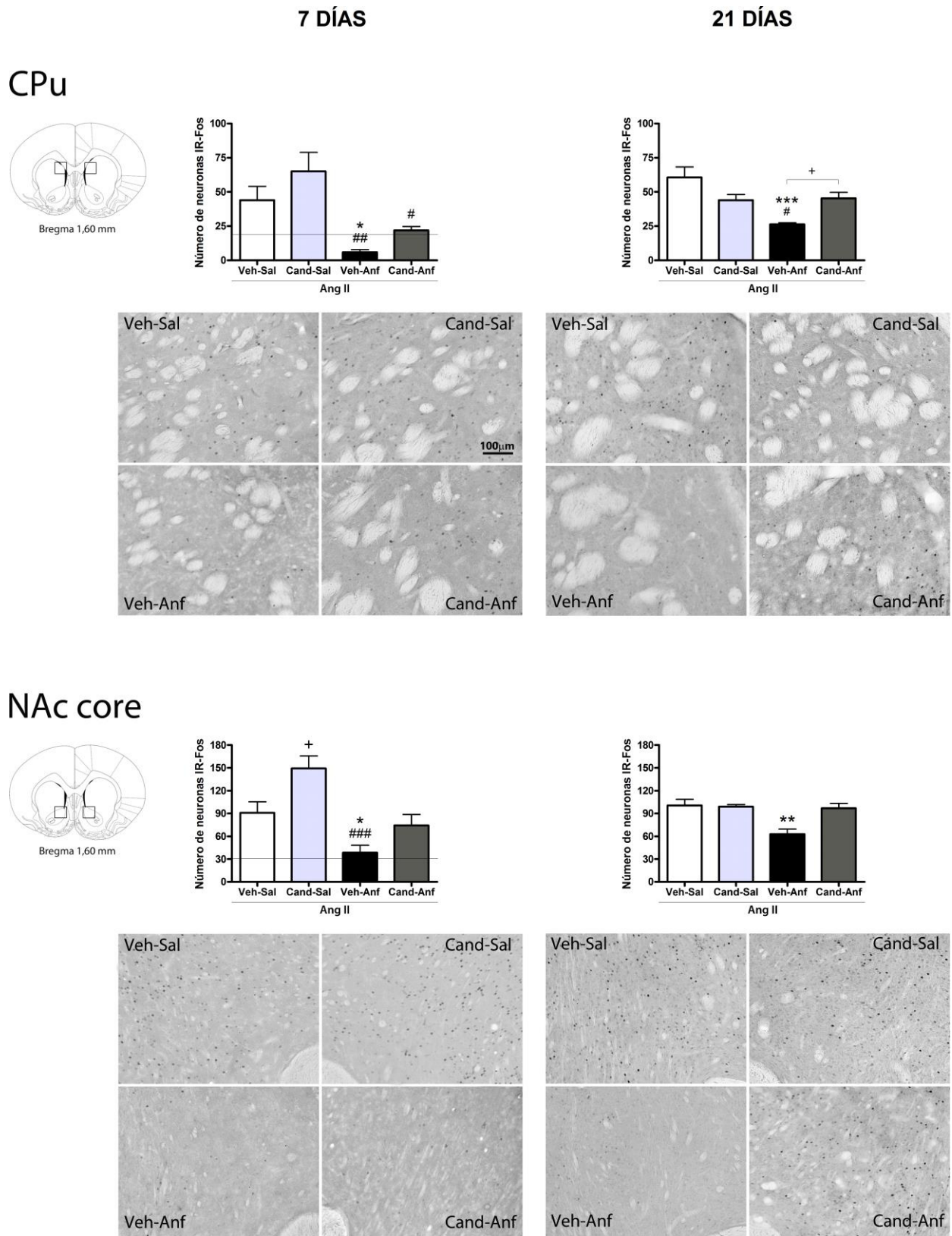


Figura 20

Figura 20:

Esquema de cortes coronales: Indican la región de conteo en diferentes áreas cerebrales: CPu y NAc core.

Microfotografías: Cortes coronales de CPu y NAc core que muestran el patrón de IR-Fos en animales, 90 min después de Ang II icv. (400 pmol), 7 (izquierda) y 21 días (derecha) post-Anf. Aumento 200x. Barra: 100 μ m.

Gráficos de barra: Número de neuronas IR-Fos por 0,37 mm², en CPu y NAc core, en respuesta a Ang II icv., 7 (izquierda) y 21 días (derecha) después de la última dosis de anfetamina. Grupos: Veh-Sal, Cand-Sal, Veh-Anf y Cand-Anf (n= 6-10). Los valores expresan la media +/- ES: *p<0.05 y ***p<0.001 significativamente diferente de Veh-Sal; #p<0.05, ##p<0.01 y ###p<0.001 diferente de Cand-Sal; +p<0.05 diferente de Veh-Sal y Cand-Anf, 7 días post-Anf; +p<0.05 diferente de Cand-Anf y **p<0.01 diferente de los demás grupos, 21 días post-Anf. La línea en los gráficos de izq. representa la media del grupo control con salina icv. (ver Figura 16).

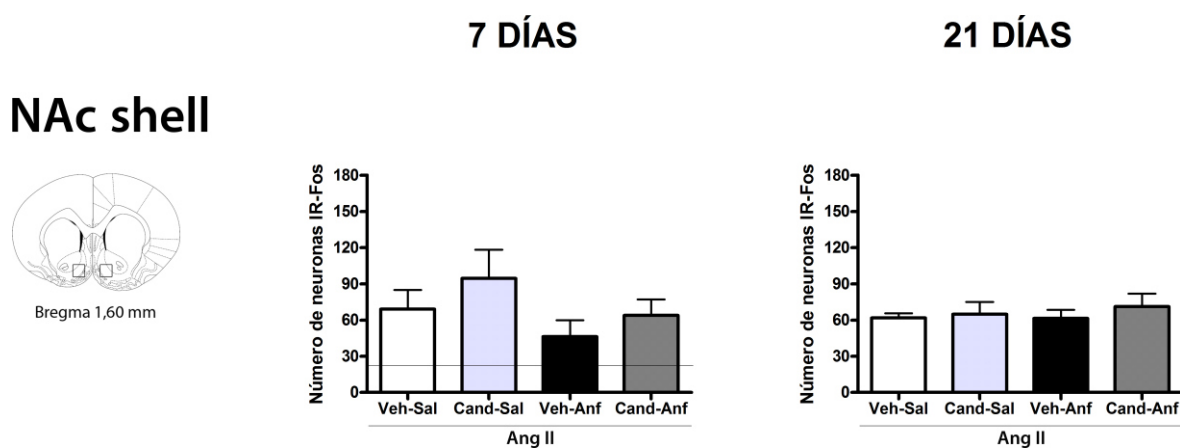


Figura 21:

Esquema de corte coronal: Indica la región de conteo en NAc shell.

Gráficos de barra: Número de neuronas IR-Fos por 0,37 mm², en NAc shell, en respuesta a Ang II icv., 7 (izquierda) y 21 días (derecha) después de la última dosis de anfetamina. Grupos: Veh-Sal, Cand-Sal, Veh-Anf y Cand-Anf (n= 6-10). Los valores expresan la media +/- ES. La línea en el gráfico de la izq. representa la media del grupo control con salina icv.

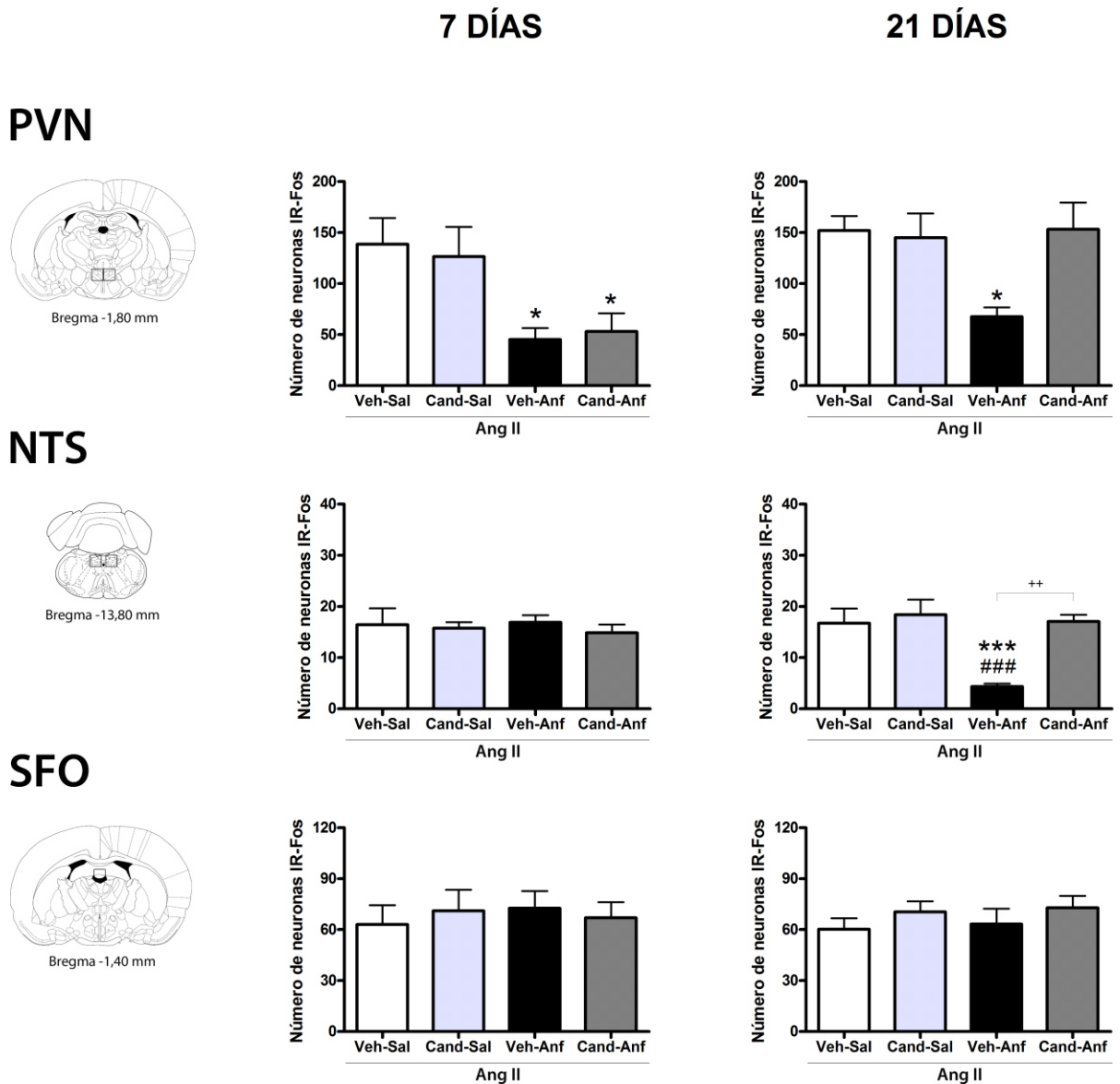


Figura 22:

Esquema de cortes coronales: Indican la región de conteo en diferentes áreas cerebrales: PVN, NTS y SFO.
Gráficos de barra: Número de neuronas IR-Fos por 0,37 mm² en PVN, NTS y SFO, en respuesta a Ang II icv., 7 (izquierda) y 21 días (derecha) después de la última dosis de amfetamina. Grupos: Veh-Sal, Cand-Sal, Veh-Anf y Cand-Anf (n= 6-10). Los valores expresan la media +/- ES: *p<0.05 significativamente diferente de Veh-Sal, 7 días post-Anf; *p<0.01 diferente de los demás grupos, ***p<0.001, ###p<0.001 y ++p<0.01 diferente de Veh-Sal, Cand-Sal y de Cand-Anf, 21 días post-Anf.

2. OBJETIVO 2

Evaluar el efecto de la exposición repetida a anfetamina y el rol de los R-AT₁, a través de la administración de Ang II icv., sobre:

- La respuesta de Ansiedad.
- La memoria de Trabajo.
- La activación neuronal en áreas cerebrales relacionadas con la respuesta a estrés y los procesos de memoria.
- La activación oxitocinérgica central.

Se conoce, que la administración de Ang II icv. induce activación oxitocinérgica central [264, 265], interfiere en la formación de la memoria espacial [104] y en el estado de ansiedad (ansiógena) [296]. En este sentido, animales expuestos a situaciones de ansiedad, expresan mayor IR-Fos en la amígdala (BLA, MeA, CeA) y PVN, entre otras áreas [240-242, 297-300].

Por otro lado, se ha descrito un aumento de IR-Fos en áreas hipocampales en animales sometidos a un test de memoria espacial, y se ha demostrado que ese aumento es necesario para la formación de la memoria espacial [239].

2.1. Efecto de la exposición repetida a anfetamina sobre la respuesta de ansiedad, inducida por Ang II icv.

La exposición repetida a anfetamina inhibió la respuesta ansiogénica inducida por Ang II icv., en animales expuestos 7 y 21 días antes al psicoestimulante. El pretratamiento con candesartan no restableció la respuesta ansiogénica a Ang II icv. a ninguno de los dos tiempos estudiados (Figura 23).

2.1.1. Tiempo de permanencia en el brazo abierto

7 días: Los resultados obtenidos del análisis estadístico ANOVA una vía, revelaron diferencias significativas a los 7 días post-anfetamina: $F(3,31)=52,21$ $p<0.001$ y el post-test Student Newman-Keuls indicó que los grupos Veh-Anf y Cand-Anf fueron significativamente diferentes de los grupos controles: Veh-Sal y Cand-Sal ($p<0.001$).

21 días: Cuando se analizó el estado de ansiedad inducido por Ang II icv., 21 días después de la exposición a anfetamina, los resultados del ANOVA una vía fueron: $F(3,43)=8.519$ $p<0.001$ y el post-test Student Newman-Keuls indicó que los grupos Veh-Anf y Cand-Anf fueron significativamente diferentes de los grupos Cand-Sal ($p<0.05$ y $p<0.001$ respectivamente) y de Veh-Sal ($p<0.01$ y $p<0.001$ respectivamente).

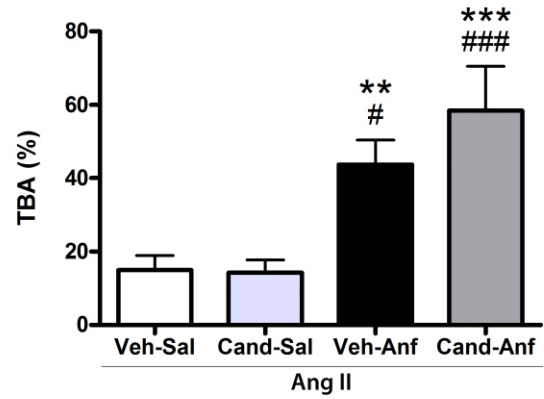
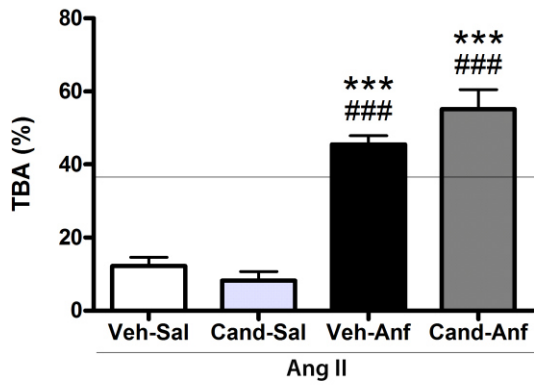
2.1.2. Entradas Totales

No se encontraron diferencias significativas con respecto a las entradas totales, en respuesta a Ang II icv. entre los grupos analizados, tanto a los 7 como a los 21 días post-anfetamina. Los resultados obtenidos del análisis estadístico ANOVA una vía, no revelaron diferencias significativas a los 7 días ($F(3,31)=1,205$ $p>0.05$) y a los 21 días ($F(3,43)=0.3207$ $p>0.05$) post-anfetamina, entre los diferentes grupos estudiados.

7 DÍAS

21 DÍAS

Tiempo en el brazo abierto



Entradas totales

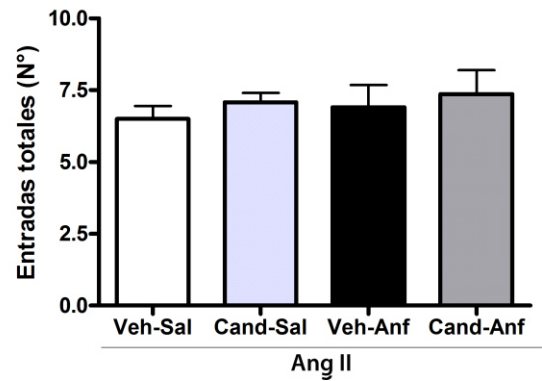
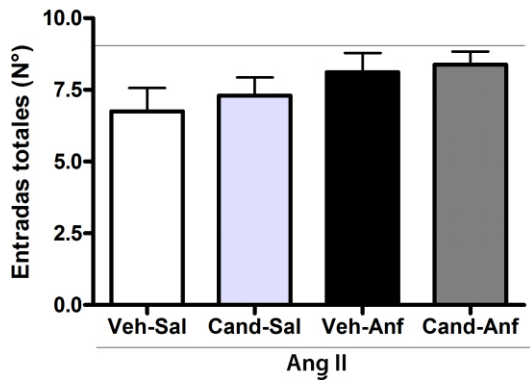


Figura 23: Índice de Ansiedad, determinado como: tiempo de permanencia en el brazo abierto del *Plus Maze* (TBA%, en 300 seg.). Índice de locomoción, determinado como: número de entradas totales a los brazos del *Plus Maze* (entrada al brazo abierto + entrada al brazo cerrado); parámetros determinados una hora después de Ang II icv (400 pmol), en animales expuestos a anfetamina 7 y 21 días antes. Grupos: Veh-Sal, Cand-Sal, Veh-Anf y Cand-Anf (n= 9-13). Los valores expresan la media +/- ES. **p<0.01 y ***p<0.001 significativamente diferente de Veh-Sal; #p<0.05 y ###p<0.001 diferente de Cand-Sal. La línea en los gráficos de izq. representa la media del grupo control con salina icv. (ver Figura 16).

2.2. Efecto de la exposición repetida a anfetamina sobre la memoria de trabajo, evaluada en el test de *Hole Board*, luego de Ang II icv.

El análisis del número de veces que los animales introdujeron la cabeza en cada orificio (*head dipping*) y el olfateo de los mismos (*sniffing*), nos permitió estudiar la distribución de estos parámetros entre los distintos orificios del *Hole Board*. Estos datos se presentan para todos los tratamientos en orden decreciente, de manera que permitan discriminar si los tratamientos modificaron el patrón de exploración sobre los orificios. Se compara la exploración del orificio más explorado (orificio 1) con respecto al segundo orificio más explorado (orificio 2) entre los diferentes grupos experimentales (Figura 24). Se asume que una distribución más homogénea refleja un mejor desempeño de la memoria de trabajo, ya que el animal recuerda en un corto plazo los orificios previamente explorados y no persevera en la exploración de éstos. En este sentido, la exposición repetida a anfetamina impidió la expresión del deterioro en la memoria de trabajo inducido por Ang II icv., en animales expuestos al psicoestimulante 7 y 21 días antes. Estos animales mostraron un patrón de exploración más homogéneo que el resto de los grupos. El pretratamiento con candesartan previno esta respuesta sólo a los 21 días post-anfetamina (Figura 24).

2.2.1. Exploración Total

7 días: Los resultados obtenidos del análisis estadístico ANOVA una vía, revelaron diferencias significativas a los 7 días post-anfetamina: $F(19,175)= 16.58$ $p<0.001$ y el post-test Bonferroni indicó que: en los grupos Veh-Sal y Cand-Sal, el orificio más explorado es diferente del 2° ($p<0.05$); en los grupos Veh-Anf y Cand-Anf, el orificio más explorado no fue diferente del 2° orificio más explorado ($p>0.05$).

21 días: Los resultados obtenidos del análisis estadístico ANOVA una vía, revelaron diferencias significativas a los 21 días post-anfetamina: $F(19,145)= 27.65$ $p<0.001$ y el post-test Bonferroni indicó que: en los grupos Veh-Sal, Cand-Sal y Cand-Anf, el orificio más explorado es diferente del 2° ($p<0.001$); en el grupo Veh-Anf, el orificio más explorado no es diferente del 2° ($p>0.05$).

2.2.2. Head Dipping

7 días: Los resultados obtenidos del análisis estadístico ANOVA una vía, revelaron diferencias significativas a los 7 días post-anfetamina: $F(19,175)= 12.75$ $p<0.001$ y el post-test Bonferroni indicó que: en los grupos Veh-Sal y Cand-Sal, el orificio más explorado es diferente del 2° ($p<0.01$); en los grupos Veh-Anf y Cand-Anf el orificio más explorado no es diferente del 2° ($p>0.05$).

21 días: Los resultados obtenidos del análisis estadístico ANOVA una vía, revelaron diferencias significativas a los 21 días post-anfetamina: $F(19,140)= 20.69$ $p<0.001$ y el post-test Bonferroni indicó que: en los grupos Veh-Sal, Cand-Sal y Cand-Anf, el orificio más explorado es diferente del 2° ($p<0.01$, $p<0.001$ y $p<0.001$ respectivamente); en el grupo Veh-Anf, el orificio más explorados no es diferente del 2° ($p>0.05$).

2.2.3. Sniffing

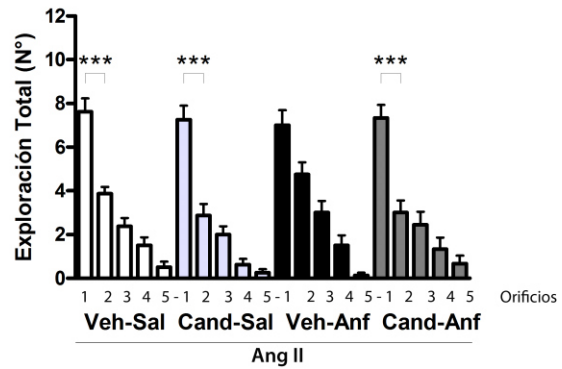
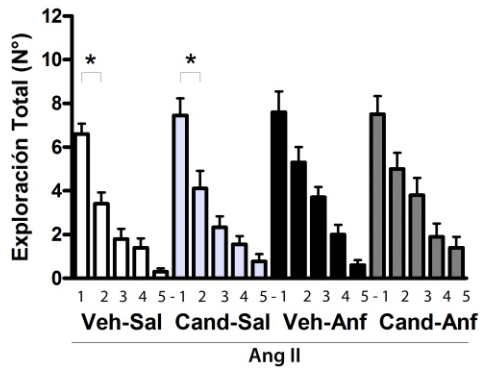
7 días: Los resultados obtenidos del análisis estadístico ANOVA una vía, revelaron diferencias significativas a los 7 días post-anfetamina: $F(19,175)= 12.55$ $p<0.001$ y el post-test Bonferroni indicó que: en los grupos Veh-Sal y Cand-Sal, el 2° orificio más explorado es diferente del 3° ($p<0.01$); en los grupos Veh-Anf y Cand-Anf, el orificio más explorados no es diferente del 3° ($p>0.05$).

21 días: Los resultados obtenidos del análisis estadístico ANOVA una vía, revelaron diferencias significativas a los 21 días post-anfetamina: $F(19,145)= 18.41$ $p<0.001$ y el post-test Bonferroni indicó que: en los grupos Veh-Sal, Cand-Sal y Cand-Anf, el orificio más explorado es diferente del 2° ($p<0.01$, $p<0.001$ y $p<0.001$ respectivamente); en el grupo Veh-Anf, el orificio más explorado no es diferente del 2° ($p>0.05$).

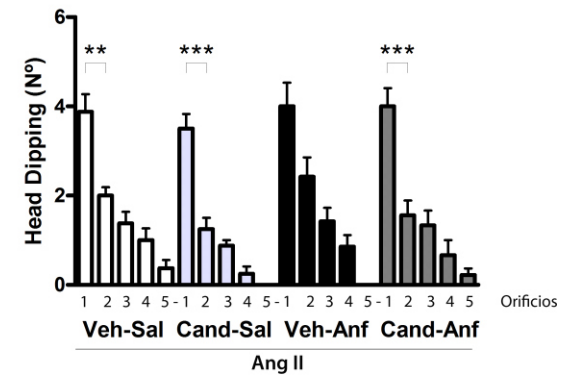
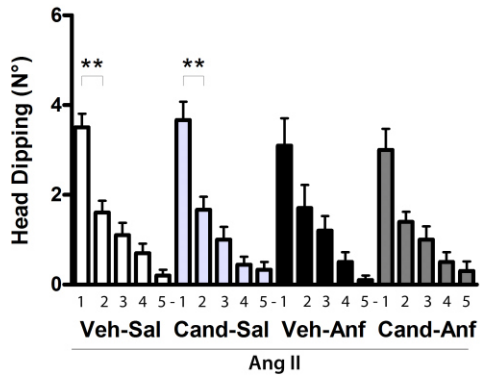
7 DÍAS

21 DÍAS

Exploración Total



Head Dipping



Sniffing

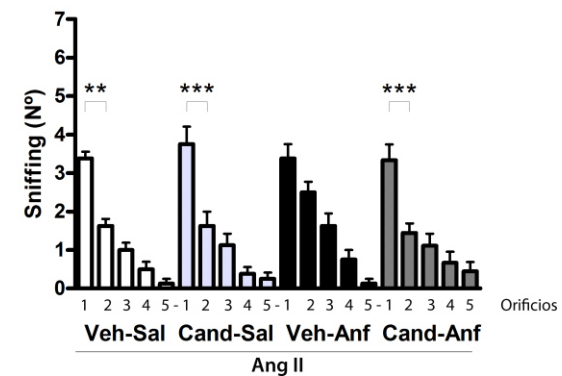
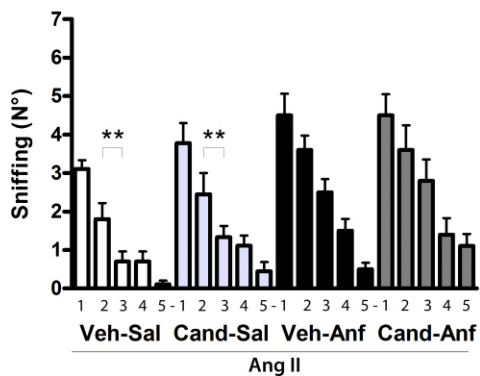


Figura 24: Exploración total, número de *head dipping* y número de *sniffing* en el test de *Hole Board*, en respuesta a Ang II icv. (400 pmol), 7 y 21 días post-Anf. Grupos: Veh-Sal, Cand-Sal, Veh-Anf y Cand-Anf (n= 8-10). Los orificios están ordenados de manera decreciente, desde el más explorado (1) al menos explorado (5). Los valores expresan la media +/- ES. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.01. Todas las comparaciones se realizaron entre el 1º orificio más explorado con respecto al 2º orificio más explorado, salvo en el número de sniffing 7 días post-Anf donde se encontró diferencia a partir del 2º orificio respecto al 3º orificio.

2.3. Efecto de la exposición repetida a anfetamina sobre la distribución de Fos inducida por Ang II icv. en CeA, BLA y en regiones hipocampales (CA-1, CA-3 y girus dentado).

Ang II icv. indujo un aumento en el número de neuronas IR-Fos en la CeA y la BLA (resultados previos) y una disminución en las regiones hipocampales de CA-1, CA-3 y girus dentado.

2.3.1. CeA

La exposición repetida a anfetamina, indujo una marcada disminución en el número de neuronas IR-Fos en CeA, en respuesta a Ang II icv. a los 7 y 21 días post-anfetamina. El pretratamiento con candesartan previno esta disminución en IR-Fos, sólo a los 21 días post-anfetamina (Figura 25).

7 días: Los resultados obtenidos del análisis estadístico ANOVA una vía, 7 días post-anfetamina, fueron: $F(3,18)=7.847$ $p<0.01$ y el post-test Student Newman-Keuls indicó que el grupo Veh-Anf fue significativamente diferente de Veh-Sal ($p<0.05$) y de Cand-Sal ($p<0.01$); y que el grupo Cand-Anf fue significativamente diferente de Cand-Sal ($p<0.01$).

21 días: Cuando analizamos la distribución de Fos en CeA, inducida por Ang II, 21 días post-anfetamina, los resultados obtenidos del ANOVA una vía fueron: $F(3,20)=12.27$ $p<0.001$ y el post-test Student Newman-Keuls indicó que el grupo Veh-Anf fue significativamente diferente de todos los otros grupos ($p<0.001$).

2.3.2. BLA

La exposición repetida a anfetamina, indujo una marcada disminución en el número de neuronas IR-Fos en BLA, en respuesta a Ang II icv. a los 7 y 21 días post-anfetamina. El pretratamiento con candesartan previno esta disminución en IR-Fos, sólo a los 21 días post-anfetamina (Figura 25).

7 días: Los resultados obtenidos del análisis estadístico ANOVA a los 7 días post-anfetamina fueron: $F(3,19)=10.99$ $p<0.001$ y el post-test Student Newman-Keuls indicó que el grupo Veh-Anf fue significativamente diferente de Veh-Sal ($p<0.05$), Cand-Sal ($p<0.001$) y de Cand-Anf ($p<0.05$); y que el grupo Cand-Sal fue significativamente diferente de Veh-Sal y Cand-Anf ($p<0.05$).

21 días: Veintiún días después de la exposición a anfetamina los resultaron del análisis estadístico de ANOVA una vía fueron: $F(3,20)=7,713$ $p<0.01$ y el post-test Student Newman-Keuls indicó que el grupo Veh-Anf fue significativamente diferente todos los otros grupos (Cand-Sal ($p<0.001$), Veh-Sal y de Cand-Anf ($p<0.01$)).

2.3.3. CA-1

La exposición repetida a anfetamina, indujo un aumento en el número de células IR-Fos en la región CA-1 del hipocampo en respuesta a Ang II icv. a los 7 y 21 días post-anfetamina. El pretratamiento con candesartan previno este aumento en IR-Fos, sólo a los 21 días post-anfetamina (Figura 26).

7 días: Los resultados obtenidos del análisis ANOVA una vía, 7 días post-anfetamina, fueron: $F(3,22)=8.591$ $p<0.001$ y el post-test Student Newman-Keuls indicó que el grupo Veh-Anf es significativamente diferente de ambos grupos controles ($p<0.01$) y que el grupo Cand-Anf también es significativamente diferente de los dos grupos controles ($p<0.05$).

21 días: Veintiún días después de la exposición a anfetamina los resultados del ANOVA una vía fueron: $F(3,16)=4,212$ $p<0.05$ y el post-test Student Newman-Keuls indicó que el grupo Veh-Anf es significativamente diferente de los demás grupos ($p<0.05$).

2.3.4. CA-3

La exposición repetida a anfetamina, indujo un aumento en el número de células IR-Fos en la región CA-3 del hipocampo en respuesta a Ang II icv. a los 7 y 21 días post-anfetamina. El pretratamiento con candesartan previno este aumento en IR-Fos, sólo a los 21 días post-anfetamina (Figura 26).

7 días: Los resultados obtenidos del análisis ANOVA a una vía, 7 días post-anfetamina, fueron $F(3,20)=8.126$ $p<0.001$ y el post-test Student Newman-Keuls indicó que el grupo Veh-Anf es significativamente diferente Veh-Sal y de Cand-Sal ($p<0.01$ y $p<0.05$ respectivamente) y que el grupo Cand-Anf también es significativamente diferente de Veh-Sal y de Cand-Sal ($p<0.01$ y $p<0.05$ respectivamente).

21 días: Cuando se analizó la distribución de Fos inducida por Ang II icv. en el CA-3, 21 días después de la exposición a anfetamina, los resultados del ANOVA a una vía fueron: $F(3,16)=4.212$ $p<0.05$ y el post-test Student Newman-Keuls indicó que el grupo Veh-Anf es significativamente diferente de los demás grupos ($p<0.05$).

2.3.5. Girus Dentado

La exposición repetida a anfetamina, indujo un aumento en el número de células IR-Fos en el girus dentado del hipocampo en respuesta a Ang II icv. a los 7 y 21 días post-anfetamina. El pretratamiento con candesartan previno este aumento en IR-Fos, sólo a los 21 días post-anfetamina (Figura 26).

7 días: Los resultados obtenidos del análisis ANOVA a una vía, 7 días post-anfetamina, fueron: $F(3,22)=6,647$ $p<0.01$ y el post-test Student Newman-Keuls indicó que el grupo Veh-Anf es significativamente diferente de Veh-Sal y de Cand-Sal ($p<0.01$ y $p<0.05$ respectivamente) y que el grupo Cand-Anf es significativamente diferente de Veh-Sal ($p<0.05$).

21 días: Veintiún días después de la exposición a anfetamina los resultados del análisis estadístico de ANOVA a una vía fueron: $F(3,16)=8,739$ $p<0.01$ y el post-test Student Newman-Keuls indicó que el grupo Veh-Anf es significativamente diferente de los demás grupos ($p<0.01$).

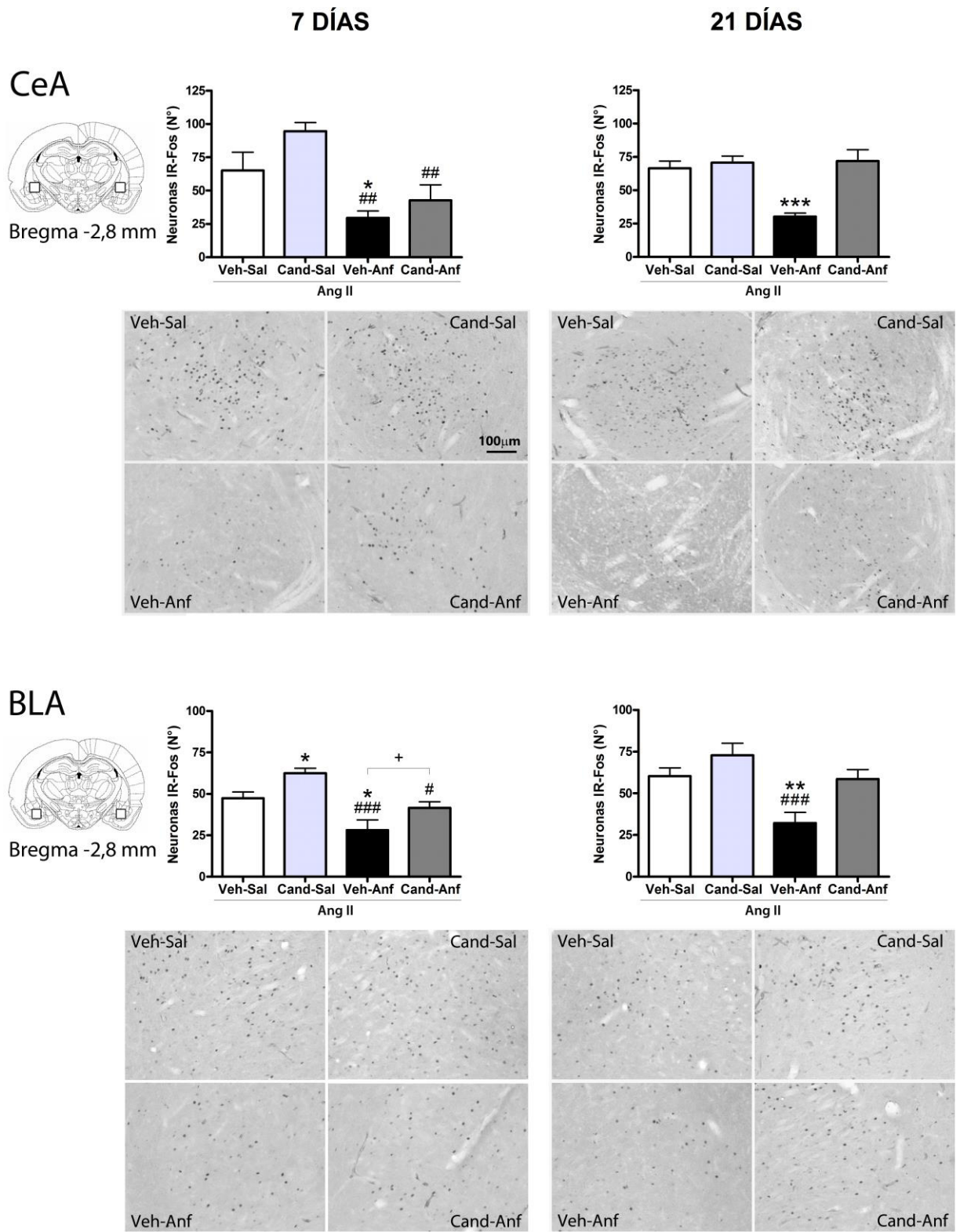


Figura 25

Figura 25:

Esquema de cortes coronales: Indican la región de conteo en diferentes áreas cerebrales: CeA y BLA.

Microfotografías: Cortes coronales de CeA y BLA que muestran el patrón de IR-Fos, 90 min después de Ang II icv. (400 pmol), 7 (izq) y 21 días (der) post-Anf. Aumento 200x. Barra: 100 μ m.

Gráficos: Número de neuronas IR-Fos por 0,37 mm² en CeA y BLA, en respuesta a Ang II icv., 7 (izq) y 21 días (der) post-Anf. Grupos: Veh-Sal, Cand-Sal, Veh-Anf y Cand-Anf (n= 5-7). Los valores expresan la media +/- ES: *p<0.05 significativamente diferente de Veh-Sal, #p<0.05, ##p<0.01 y ###p<0.001 diferente de Cand-Sal, y +p<0.05 diferente de Cand-Anf, 7 días post-Anf; ***p<0.001 diferente de los demás grupos, **p<0.05 y ###p<0.001 diferente de los grupos Veh-Sal y Cand-Sal respectivamente, 21 días post-Anf.

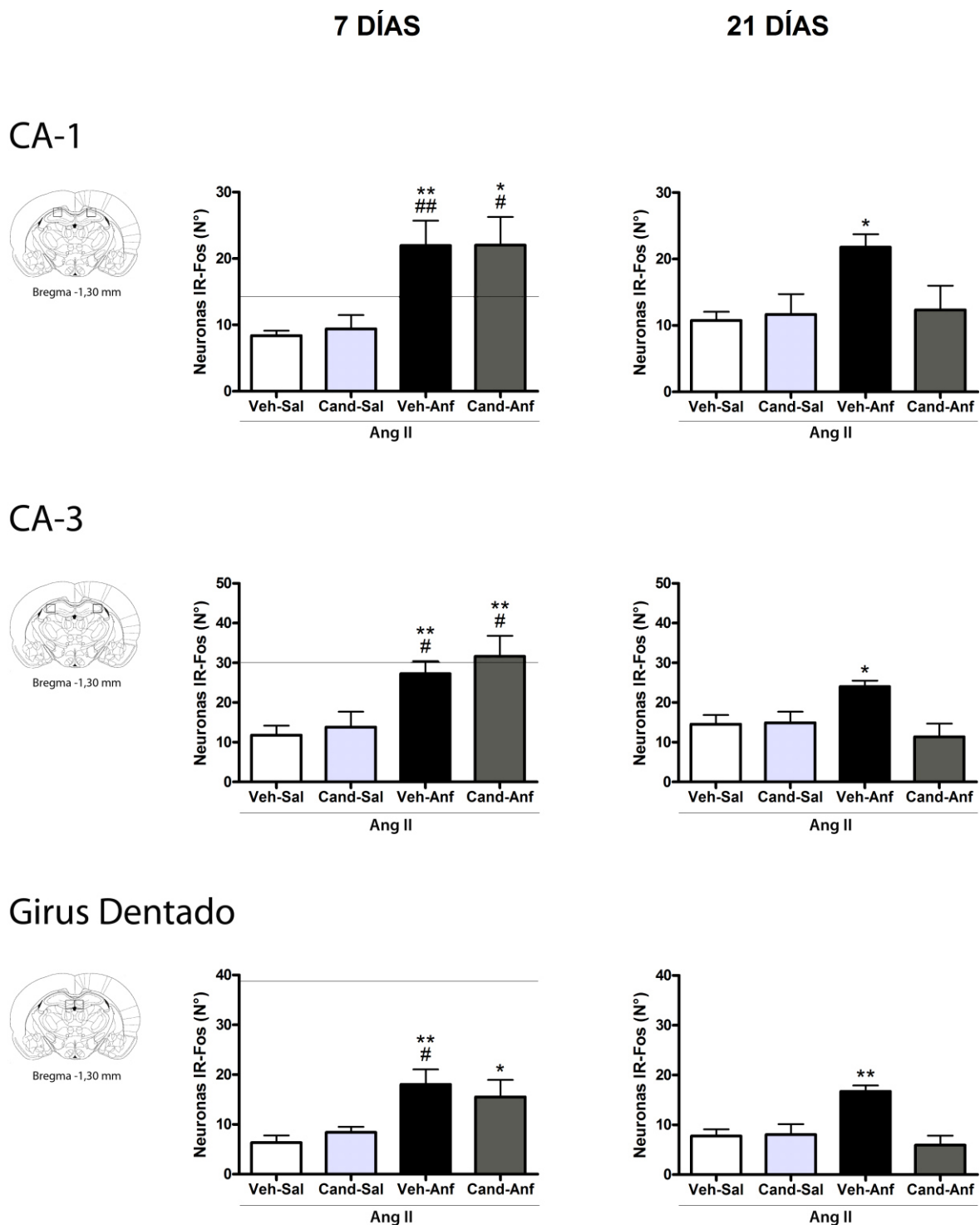


Figura 26: Número de neuronas IR-Fos en CA-1, CA-3 y giro dentado del hipocampo en respuesta a Ang II icv. (400 pmol), 7 y 21 días post-Anf. Grupos: Veh-Sal, Cand-Sal, Veh-Anf y Cand-Anf (n= 4-10). Los valores expresan la media \pm ES. * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$ significativamente diferente de Veh-Sal, # $p < 0.05$ y ## $p < 0.01$ diferente de Cand-Sal, 7 días post-Anf; * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$ diferente de los demás grupos, 21 días post-Anf. El área cerebral encuadrada corresponde a la zona de conteo. La línea en los gráficos de la izq. representa la media del grupo control con salina icv. (ver Figura 16).

2.4. Efecto de la exposición repetida a anfetamina sobre la inmunomarcación de Fos-OT inducida por Ang II icv. en SON y PVN.

Ang II icv. induce un aumento de células inmunomarcadas con Fos-OT en áreas cerebrales: SON y PVN (datos no presentados) [264, 265]. La exposición repetida a anfetamina potenció el aumento en el número de células positivas Fos-OT en el SON y PVN, inducidos por Ang II icv. a los 7 días post-anfetamina. El pretratamiento con candesartan no previno esta respuesta (Figura 27-29).

2.4.1. SON

Los resultados obtenidos del análisis ANOVA una vía, 7 días post-anfetamina, fueron: $F(3,17)=6.640$ $p<0.01$ y el post-test Student Newman-Keuls indicó que el grupo Veh-Anf es significativamente diferente de Veh-Sal ($p<0.01$) y de Cand-Sal ($p<0.05$) y que el grupo Cand-Anf es significativamente diferente de ambos grupos controles ($p<0.05$) (Figura 27).

2.4.2. PaMM

Los resultados obtenidos del análisis ANOVA una vía, 7 días post-anfetamina, fueron: $F(3,17)=10,89$ $p<0.001$ y el post-test Student Newman-Keuls indicó que el grupo Veh-Anf es significativamente diferente de Veh-Sal ($p<0.001$) y de Cand-Sal ($p<0.01$) y que el grupo Cand-Anf es significativamente diferente de ambos grupos controles ($p<0.01$) (Figura 28).

2.4.3. PeM

Los resultados obtenidos del análisis ANOVA una vía, 7 días post-anfetamina, fueron $F(3,16)=6.401$ $p<0.01$ y el post-test Student Newman-Keuls indicó que el grupo Veh-Anf es significativamente diferente de Veh-Sal y de Cand-Sal ($p<0.01$) (Figura 29).

2.4.4. PaAM

Los resultados obtenidos del análisis ANOVA una vía, 7 días post-anfetamina, fueron $F(3,16)=10.42$ $p<0.001$ y el post-test Student Newman-Keuls indicó que el grupo Veh-Anf es significativamente diferente de Veh-Sal ($p<0.01$) y de Cand-Sal ($p<0.001$) y que el grupo Cand-Anf es significativamente diferente de Veh-Sal ($p<0.05$) y de Cand-Sal ($p<0.01$) (Figura 29).

2.4.5. PaDC

Los resultados obtenidos del análisis ANOVA una vía, 7 días post-anfetamina, fueron $F(3,17)=6.410$ $p<0.01$ y el post-test Student Newman-Keuls indicó que el grupo Veh-Anf es significativamente diferente de Veh-Sal y de Cand-Sal ($p<0.01$) (Figura 29).

2.4.6. PaLM

Los resultados obtenidos del análisis ANOVA una vía, 7 días post-anfetamina, fueron $F(3,17)=4.842$ $p<0.05$ y el post-test Student Newman-Keuls indicó que el grupo Veh-Anf es significativamente diferente de Veh-Sal y de Cand-Sal ($p<0.05$) (Figura 29).

2.5.7. PaPo

Los resultados obtenidos del análisis ANOVA a una vía, 7 días post-anfetamina, fueron $F(3,17)=12,52$ $p<0.001$ y el post-test Student Newman-Keuls indicó que el grupo Veh-Anf es significativamente diferente de Veh-Sal y de Cand-Sal ($p<0.001$) y que el grupo Cand-Anf es significativamente diferente de ambos grupos controles ($p<0.01$) (Figura 29).

SON

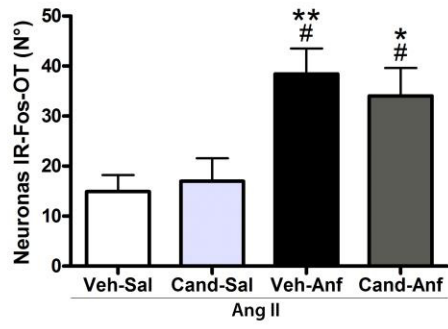
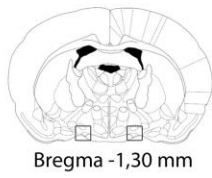
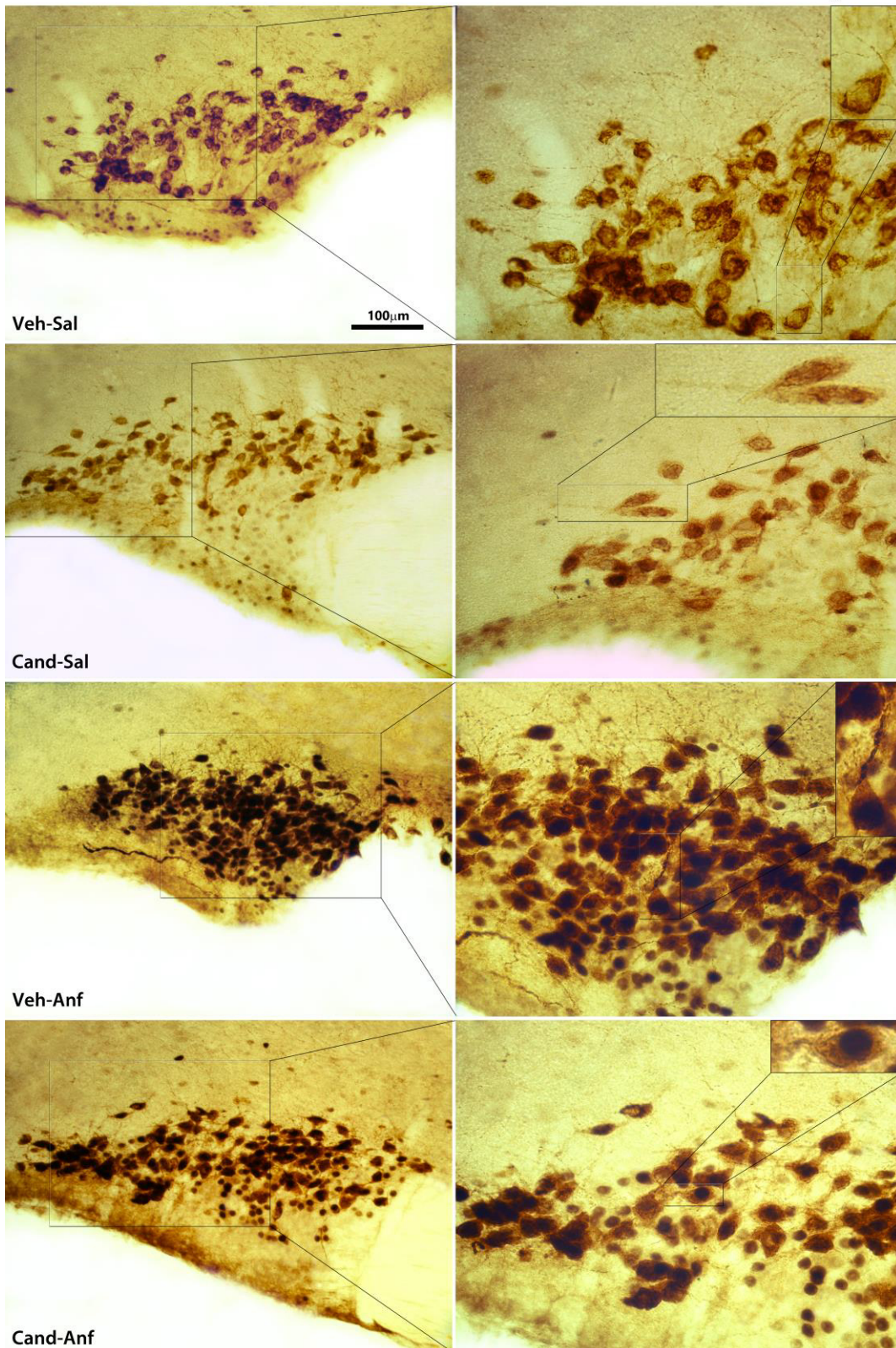


Figura 27



PaMM

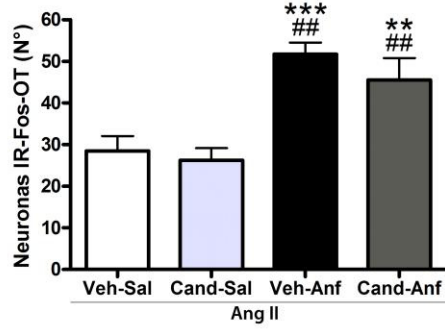
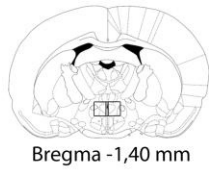


Figura 28

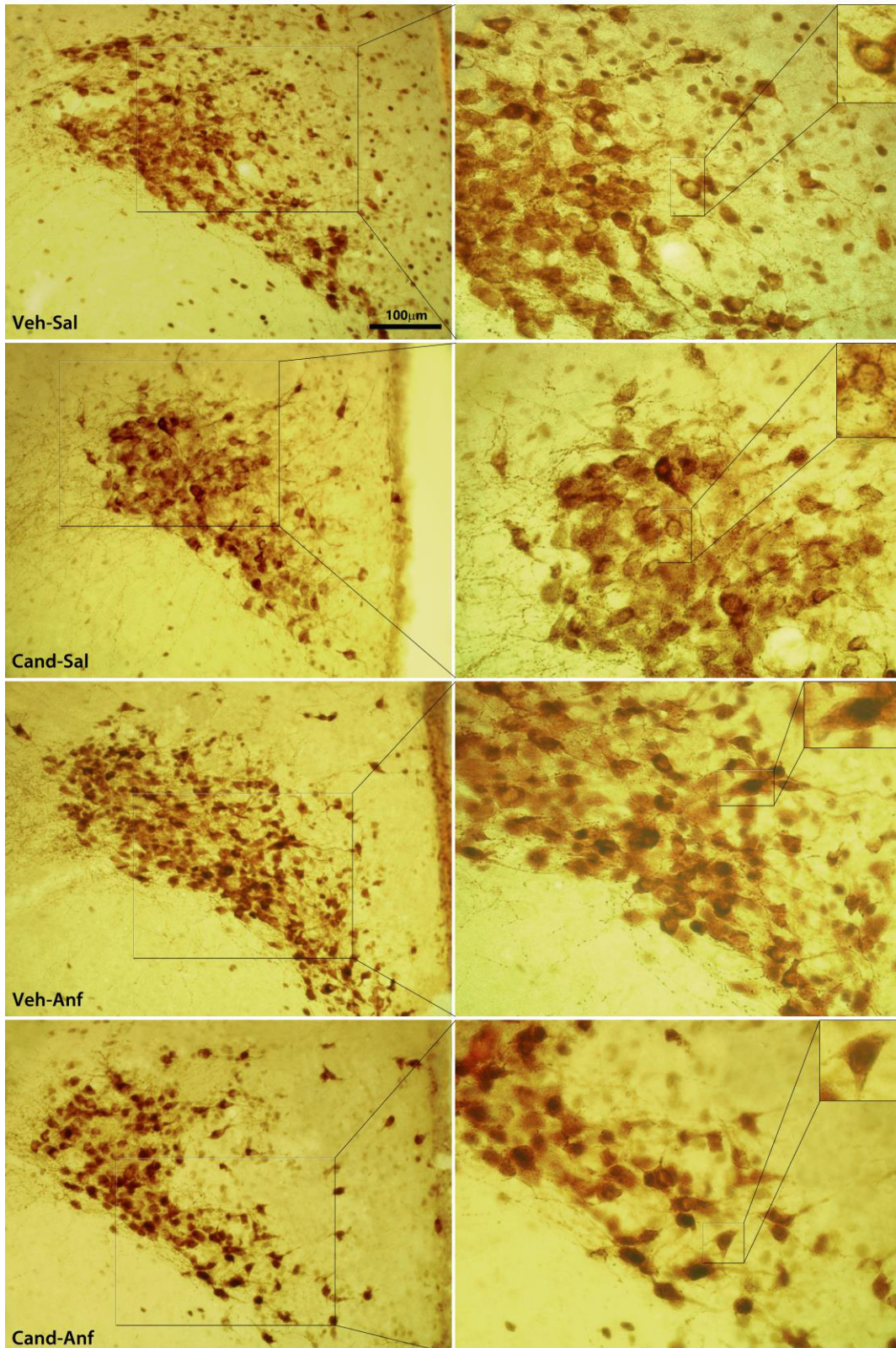


Figura 27:

Esquema de corte coronal: Indica la región de conteo en el SON.

Microfotografías: Cortes coronales del SON, que muestran patrón IR-Fos-OT, 90 min después de Ang II icv. (400 pmol), 7 días post-Anf. Fotos de microscopía óptica, las de la izquierda tomadas a 200x, las de la derecha a 400x y las de la derecha extremo superior a 1000x. Área cerebral encuadrada correspondiente a la zona fotografiada. Barra: 100 μ m.

Gráficos: Número de neuronas doblemente marcadas Fos-OT por 0,37 mm² en el SON, luego de Ang II icv. (400 pmol) y 7 días después de la última dosis de anfetamina. Grupos: Veh-Sal, Cand, Sal, Veh-Anf y Cand-Anf (n= 5-6). Los valores expresan la media +/- ES. *p<0.05 y **p<0.01 significativamente diferente de Veh-Sal; #p<0.01 diferente de Cand-Sal.

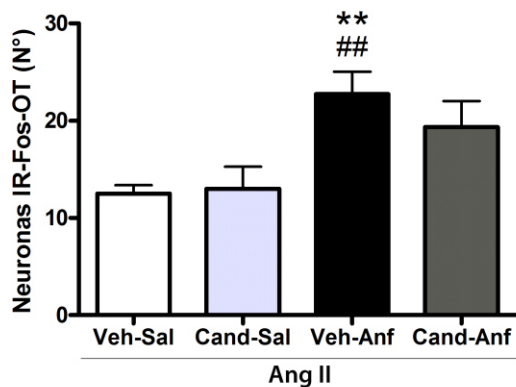
Figura 28:

Esquema de corte coronal: Indica la región de conteo en el PaMM del PVN.

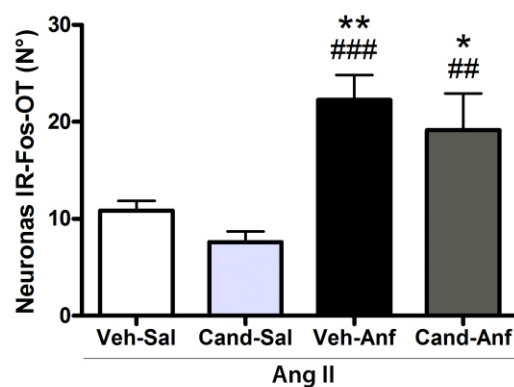
Microfotografías: Cortes coronales de PaMM del PVN, que muestran patrón IR-Fos-OT, 90 min después de Ang II icv. (400 pmol), 7 días post-Anf. Fotos de microscopía óptica, las de la izquierda tomadas a 200x, las de la derecha a 400x y las de la derecha extremo superior a 1000x. Área cerebral encuadrada correspondiente a la zona fotografiada. Barra: 100 μ m.

Gráficos: Número de neuronas doblemente marcadas Fos-OT por 0,37 mm² en el PaMM, luego de Ang II icv. (400 pmol) y 7 días después de la última dosis de anfetamina. Grupos: Veh-Sal, Cand, Sal, Veh-Anf y Cand-Anf (n= 5-6) Los valores expresan la media +/- ES. **p<0.01 y ***p<0.001 significativamente diferente de Veh-Sal; ##p<0.01 diferente de Cand-Sal.

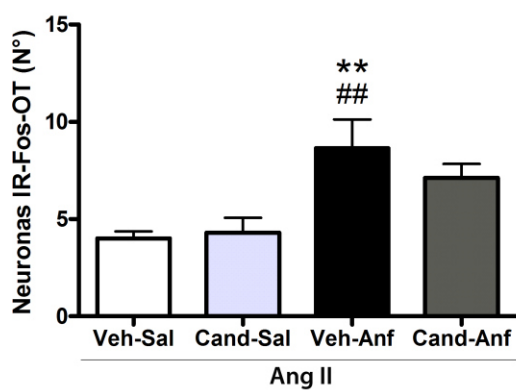
PeM



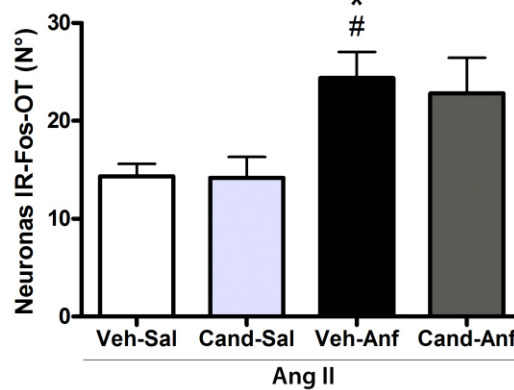
PaAM



PaDC



PaML



PaPo

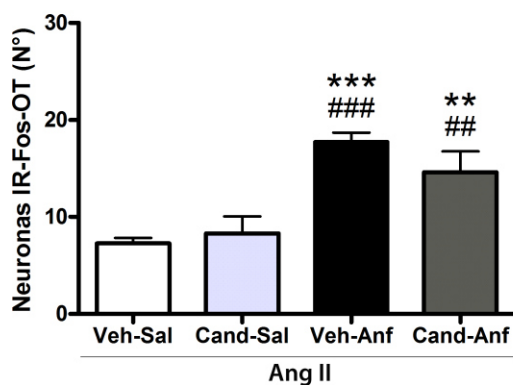


Figura 29: Número de neuronas doblemente inmunomarcadas Fos-OT en las subdivisiones del PVN: PeM, PaAM, PaDC, PaLM y PaPo, luego de Ang II icv. (400 pmol) y 7 días después de la última dosis de anfetamina. Grupos: Veh-Sal, Cand, Sal, Veh-Anf y Cand-Anf (n= 5-6). Los valores expresan la media +/- ES. *p<0.05, **p<0.01 y ***p<0.001 significativamente diferente de Veh-Sal; #p<0.05, ##p<0.01 y ###p<0.001 diferente de Cand-Sal.

Tabla 4: RESUMEN RESULTADOS (Objetivo 1 y 2)

Respuestas a Ang II icv. alteradas por exposición repetida a anfetamina	Bloqueo AT₁ restaura la respuesta a Ang II icv., 21 días post-Anf?
Ingesta de sodio	Si
Natriuresis	Si
Kaliuresis	Si
PARA	Si
IR-Fos en áreas relacionadas con la recompensa (CPu y NAc)	Si
IR-Fos en áreas relacionadas con la osmoregulación (PVN y NTS)	Si
Respuesta de Ansiedad	No
IR-Fos en áreas relacionadas con la ansiedad (CeA, BLA y PVN)	Si
Memoria de trabajo	Si
IR-Fos en áreas relacionadas con la memoria (CA-1, CA-3 y girus dentado del hipocampo)	Si
IR-Fos-OT en SON Y PVN	No se evaluó

Tabla 4: Resumen de los resultados del objetivo 1 y 2. Abreviaturas: PRA: actividad de la renina plasmática; IR-Fos: inmunoreactividad a Fos; IR-Fos-OT: inmunoreactividad a Fos-oxitocina.

3. OBJETIVO 3

Evaluar el efecto de la exposición repetida a anfetamina y el rol de los R-AT₁ sobre:

- Respuestas inflamatorias a nivel de la vasculatura cerebral (ICAM-1, HSP-70 y R-AT₁)
- Respuestas de estrés oxidativo en la microvasculatura cerebral.
- Respuestas inflamatorias a nivel periférico y del líquido cefalorraquídeo -LCR- (TNF- α e IL-6).

La Ang II participa en la respuesta inflamatoria, a través de dos mecanismos claves: generación de ROS y producción del NF-kB [175]. Además, se conoce que tanto Ang II como anfetamina, producen un aumento de: ICAM-1, HSPs, TNF- α , IL-6, R-AT₁ a nivel central y periférico y promueven el daño oxidativo a nivel de la vasculatura cerebral [175, 178, 185, 209, 213, 214, 217, 218]. En este sentido se ha descrito que estos efectos de Ang II son mediados por la estimulación de los R-AT₁ [178, 185].

3.1. Aislamiento de microvasos cerebrales.

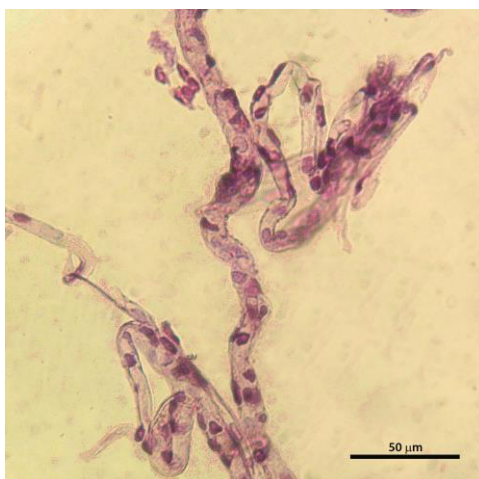


Figura 30: Microfotografía de microvasos cerebrales aislados según técnica desarrollada. Tinción con hematoxilina. Barra de calibración: 50 μ m. Aumento 400x.

3.2. Efectos de la exposición repetida a anfetamina sobre la expresión de TNF- α en LCR, en respuesta a Ang II icv.

La exposición repetida al psicoestimulante produjo un aumento en los niveles de TNF- α en el LCR inducido por Ang II icv., 7 y 21 días después de la última dosis de anfetamina. El pretratamiento con candesartan previno este aumento sólo a los 21 días post-psicoestimulante (Figura 31).

7 días: Los resultados del ANOVA a una vía fueron: $F(3,18)=5.204$ $p<0.01$ y el post-test Student Newman-Keuls indicó que el grupo Veh-Anf es significativamente diferente Veh-Sal y de Cand-Sal ($p<0.05$)

21 días: Los resultados obtenidos del análisis ANOVA a una vía, 21 días post-anfetamina, fueron $F(3,22)=4.196$ $p<0.05$, y el post-test Student Newman-Keuls indicó que el grupo Veh-Anf es significativamente diferente de los demás grupos experimentales ($p<0.05$).

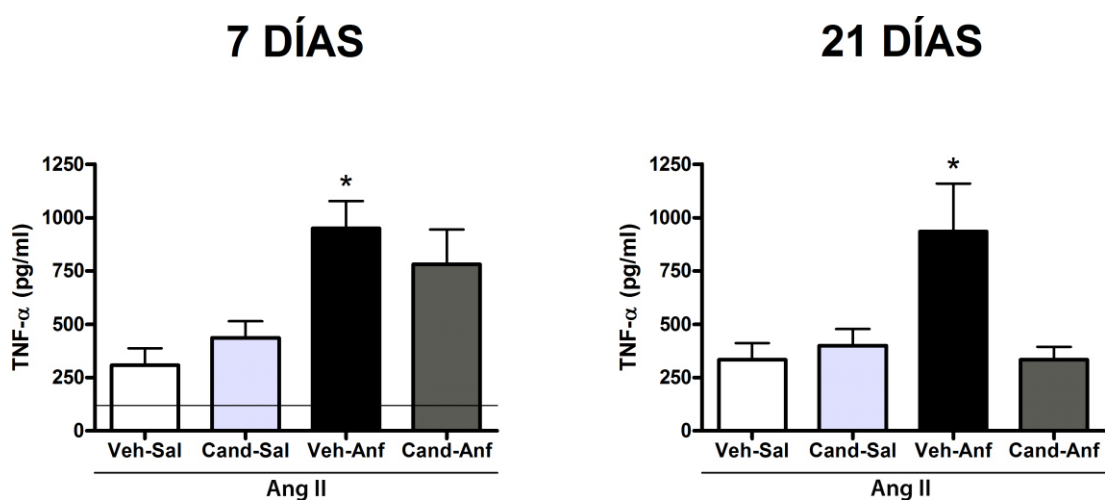


Figura 31: Niveles de TNF- α en el LCR de ratas, expresados como pg/ml, luego de Ang II icv. (400 pmol), 7 y 21 días post-Anf. Grupos: Veh-Sal, Cand, Sal, Veh-Anf y Cand-Anf (n= 4-8). Los valores expresan la media \pm ES. * $p<0.05$ significativamente diferente de Veh-Sal y Cand-Sal, 7 días post-Anf; * $p<0.05$ diferente de los demás grupos, 21 días post-Anf. La línea en el gráfico de la izq. representa la media del grupo control con salina icv. (ver Figura 17).

3.3. Efectos de la exposición a anfetamina sobre la expresión de IL-6 en plasma y LCR

Los niveles de IL-6 en plasma y LCR, se incrementaron en animales expuestos a anfetamina, luego de Ang II icv. a los 7 y 21 días post-psicoestimulante. Este aumento se previno con el pretratamiento con candesartan sólo a los 21 días post-anfetamina (Figura 32).

3.3.1. Plasma

7 días: Los resultados obtenidos del análisis ANOVA una vía, 7 días post-anfetamina, fueron: $F(3,33)=8.147$ $p<0.001$ y el post-test Student Newman-Keuls indicó que los grupos Veh-Anf y Cand-Anf son significativamente diferentes de Veh-Sal y de Cand-Sal ($p<0.01$)

21 días: Los resultados del ANOVA una vía fueron: $F(3,82)=9.180$ $p<0.001$, y el post-test Student Newman-Keuls indicó que el grupo Veh-Anf es significativamente diferente de los demás grupos experimentales ($p<0.001$).

3.3.2. LCR

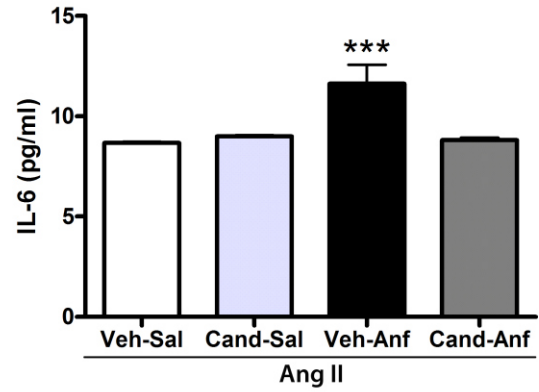
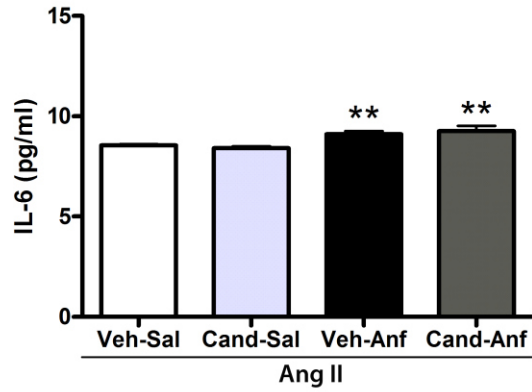
7 días: Los resultados del ANOVA una vía fueron: $F(3,18)=8.656$ $p<0.001$ y el post-test Student Newman-Keuls indicó que los grupos Veh-Anf y Cand-Anf son significativamente diferentes de Veh-Sal y de Cand-Sal ($p<0.01$)

21 días: Los resultados obtenidos del análisis ANOVA una vía, 21 días post-anfetamina, fueron $F(3,16)=7.449$ $p<0.01$, y el post-test Student Newman-Keuls indicó que el grupo Veh-Anf es significativamente diferente de Veh-Sal y Cand-Sal ($p<0.01$) y de Cand-Anf ($p<0.001$).

7 DÍAS

21 DÍAS

Plasma



LCR

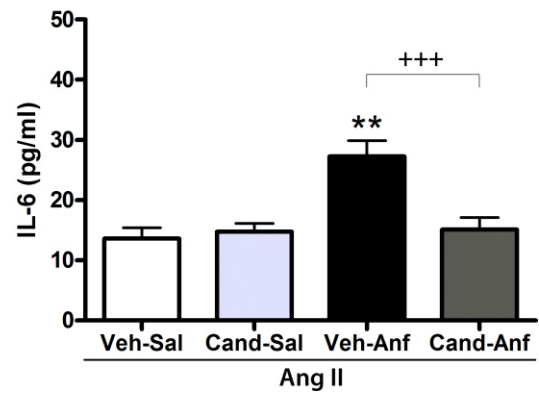
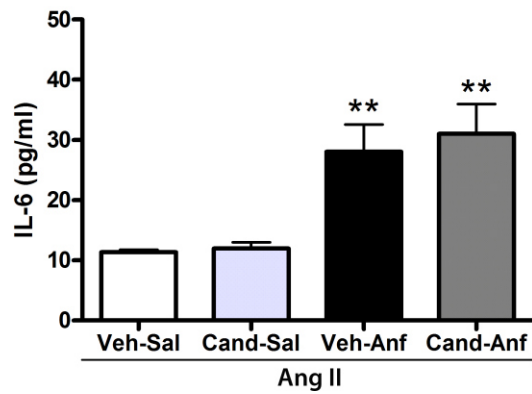


Figura 32: Niveles de IL-6 en plasma (n= 19-24) y LCR (n= 4-8) de ratas, en respuesta a Ang II icv. (400 pmol), 7 y 21 días post-Anf. Grupos: Veh-Sal, Cand-Sal, Veh-Anf y Cand-Anf. Los valores expresan la media +/- ES. **p<0.01 significativamente diferente de Veh-Sal y Cand-Sal, 7 días post-Anf; ***p<0.001 diferente de los demás grupos, **p<0.01 diferente de Veh-Sal y de Cand-Sal, +++p<0.001 diferente de Cand-Anf, 21 días post-Anf.

3.4. Efecto de la exposición repetida a anfetamina sobre la inmunofluorescencia de R-AT₁ (IF-R-AT₁) en la microvasculatura cerebral, en respuesta a Ang II icv.

La administración de Ang II icv. indujo un aumento de la IF-R-AT₁ en microvasos aislados de cerebro de ratas (datos no presentados).

La exposición repetida a anfetamina incrementó la intensidad de fluorescencia del R-AT₁ en microvasos cerebrales, a los 7 y 21 días post-anfetamina, en respuesta a Ang II icv. El pretratamiento con candesartan previno esta respuesta a los dos tiempos estudiados (Figura 33 y 34).

7 días: Los resultados del ANOVA a una vía para submuestras fueron: $F(3,8)=153.62$ $p<0.001$ y el post-test Student Newman-Keuls indicó que el grupo Veh-Anf es significativamente diferente de los demás grupos experimentales ($p<0.001$).

21 días: Los resultados obtenidos del análisis ANOVA a una vía para submuestras, 21 días post-anfetamina, fueron: $F(3,8)=132.26$ $p<0.001$, y el post-test Student Newman-Keuls indicó que el grupo Veh-Anf es significativamente diferente de los demás grupos experimentales ($p<0.001$).

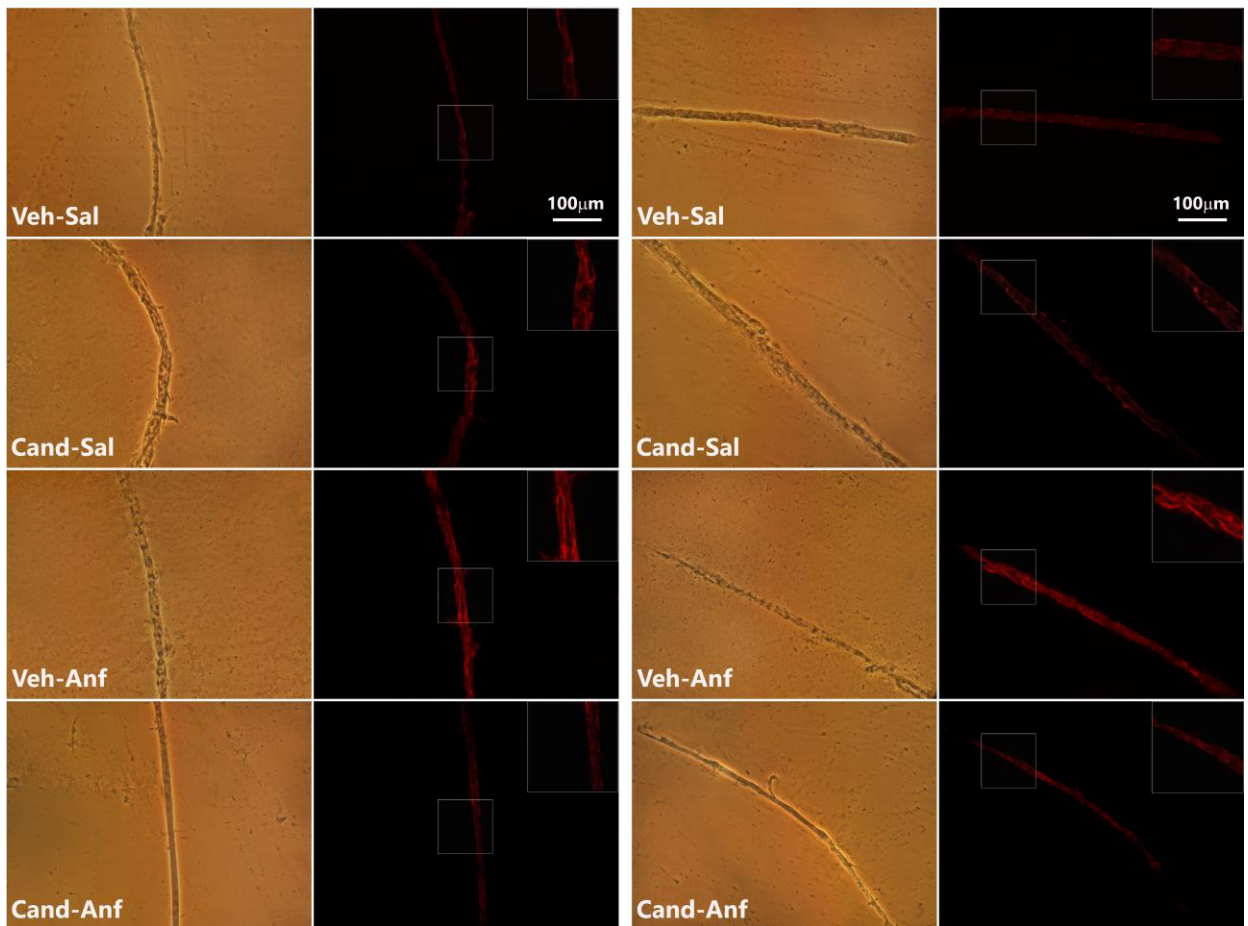
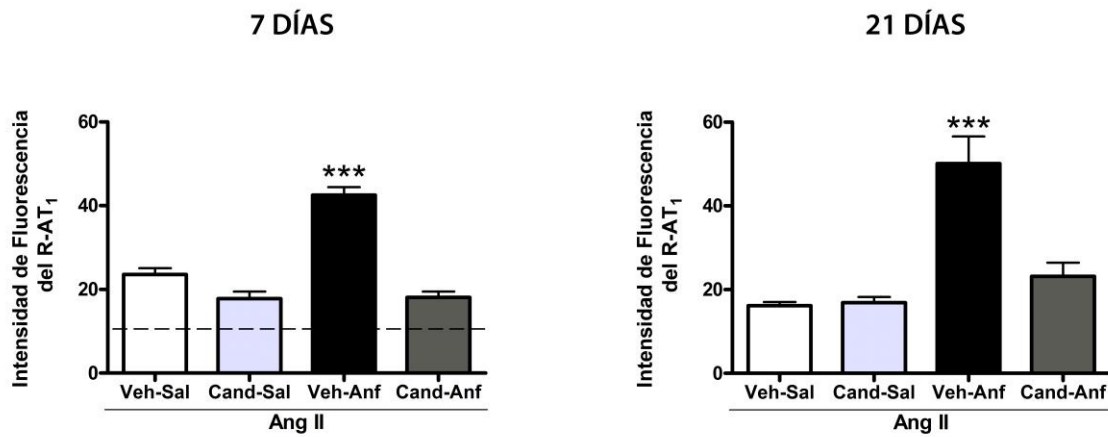


Figura 33: Intensidad de Inmunofluorescencia del R-AT₁, en microvasos cerebrales aislados de ratas, 7 (izquierda) y 21 días (derecha) post-Anf, en respuesta a Ang II icv. Grupos: Veh-Sal, Cand, Sal, Veh-Anf y Cand-Anf (n= 4). Los valores expresan la media \pm ES. *** $p < 0.001$ significativamente diferente de los demás grupos experimentales. La línea punteada representa la media del grupo control con salina icv. Las microfotografías son representativas de la tinción inmunofluorescente de los microvasos cerebrales de los distintos grupos. Panel izquierdo: imagen de microscopía óptica. Panel derecho: imagen de inmunofluorescencia con estímulo a una longitud de onda de 555 nm. Barra de calibración: 100 μ m. Aumento 200x. Recuadro derecho superior, aumento 400x.

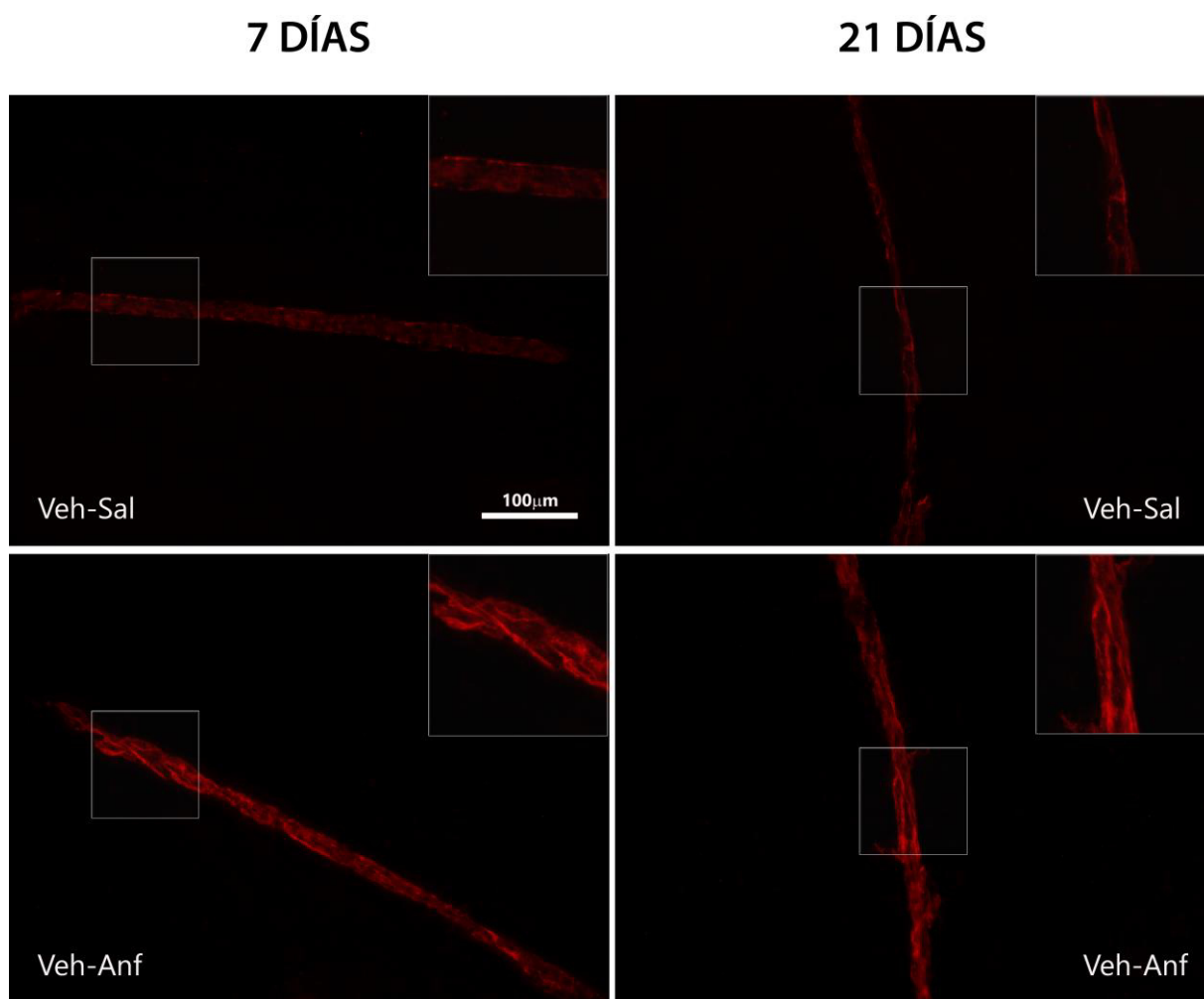


Figura 34: Inmunofluorescencia indirecta para R-AT₁, en microvasos cerebrales aislados de ratas, 7 (izquierda) y 21 días (derecha) post-Anf, en respuesta a Ang II icv. Las microfotografías son representativas de la tinción inmunofluorescente de los microvasos cerebrales de animales que recibieron los tratamientos: Veh-Sal y Veh-Anf (n= 4). Imagen de inmunofluorescencia con estímulo a una longitud de onda de 555 nm. Barra de calibración: 100 μm. Aumento 200x. Recuadro derecho superior, aumento 400x.

3.5. Efecto de la exposición previa a anfetamina sobre la inmunofluorescencia de HSP-70 (IF-HSP-70) en la microvasculatura cerebral, en respuesta a Ang II icv.

La administración de Ang II icv. indujo un aumento de la IF-HSP-70 en microvasos aislados de cerebro de ratas (datos no presentados).

La exposición repetida a anfetamina incrementó la intensidad de fluorescencia de la HSP-70 en microvasos cerebrales, a los 7 y 21 días post-anfetamina en respuesta a Ang II icv. El pretratamiento con candesartan previno esta respuesta a los dos tiempos estudiados (n= 4) (Figura 35 y 36).

7 días: Los resultados del ANOVA a una vía para submuestras fueron: $F(3,8)=107.10$ $p<0.001$ y el post-test Student Newman-Keuls indicó que el grupo Veh-Anf es significativamente diferente de los demás grupos experimentales ($p<0.001$).

21 días: Los resultados obtenidos del análisis ANOVA a una vía para submuestras, 21 días post-anfetamina, fueron: $F(3,8)=138.47$ $p<0.001$, y el post-test Student Newman-Keuls indicó que el grupo Veh-Anf es significativamente diferente de los demás grupos experimentales ($p<0.001$).

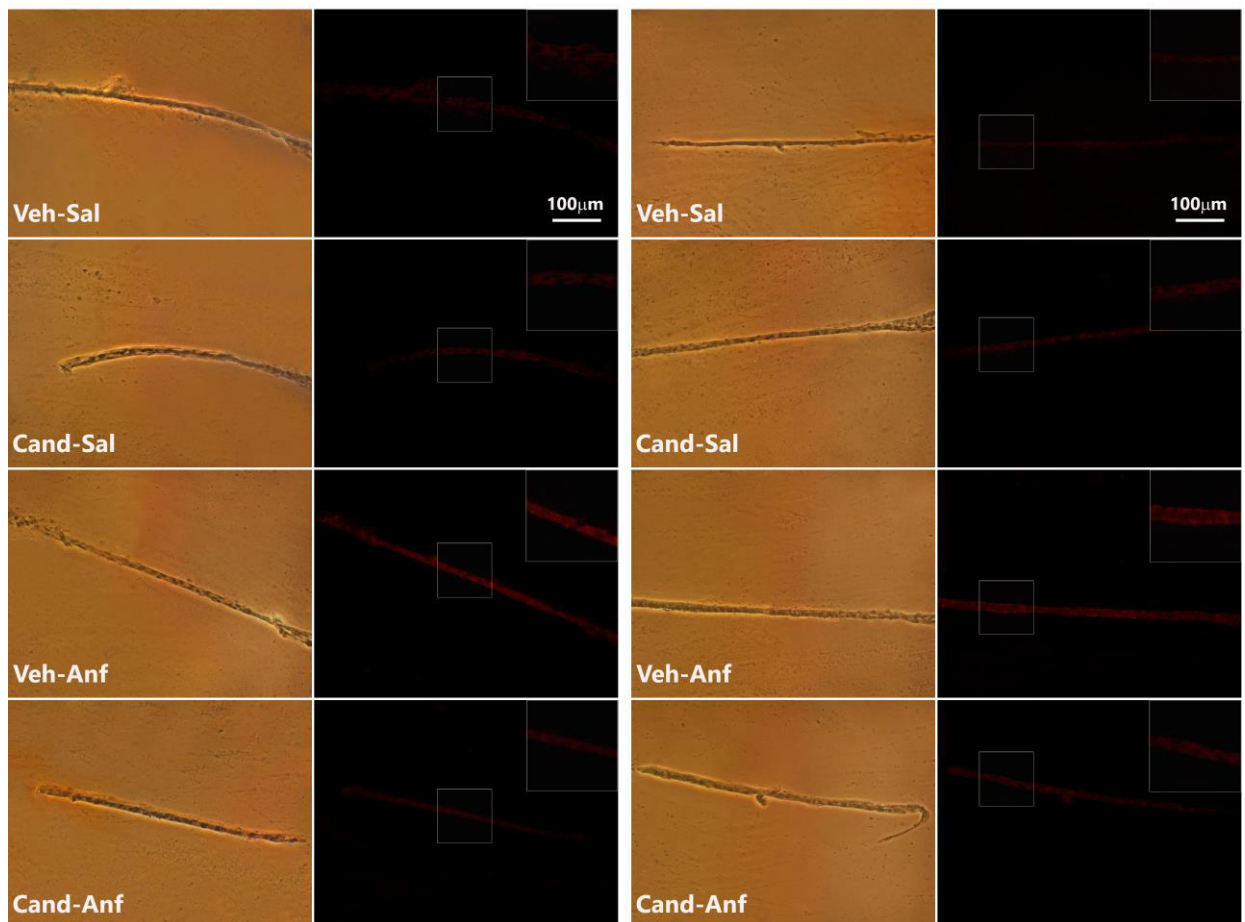
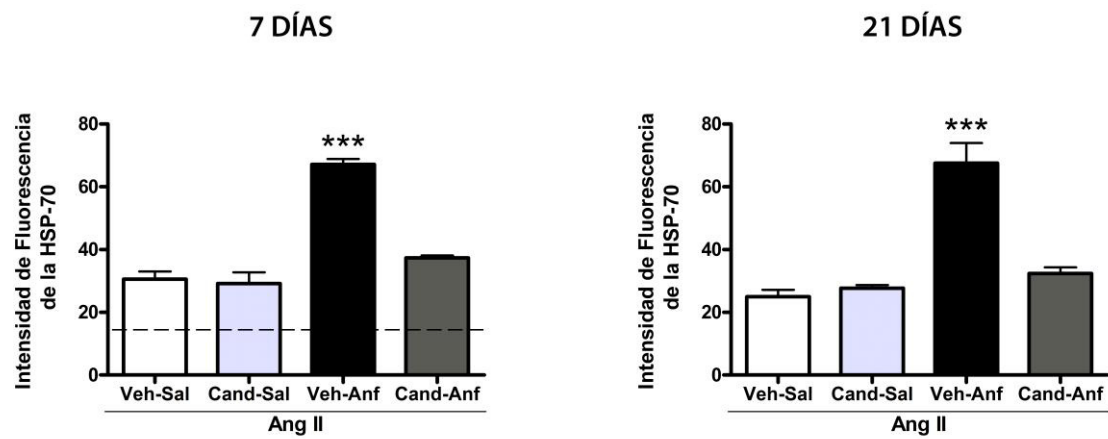


Figura 35: Intensidad de Inmunofluorescencia de la HSP-70, en microvasos cerebrales aislados de ratas, 7 (izquierda) y 21 días (derecha) post-Anf, en respuesta a Ang II icv. Grupos: Veh-Sal, Cand, Sal, Veh-Anf y Cand-Anf (n= 4). Los valores expresan la media \pm ES. *** $p < 0.001$ significativamente diferente de los demás grupos experimentales. La línea punteada representa la media del grupo control con salina icv. Las microfotografías son representativas de la tinción inmunofluorescente de los microvasos cerebrales de los distintos grupos. Panel izquierdo: imagen de microscopía óptica. Panel derecho: imagen de inmunofluorescencia con estímulo a una longitud de onda de 555 nm. Barra de calibración: 100 μ m. Aumento 200x. Recuadro derecho superior, aumento 400x.

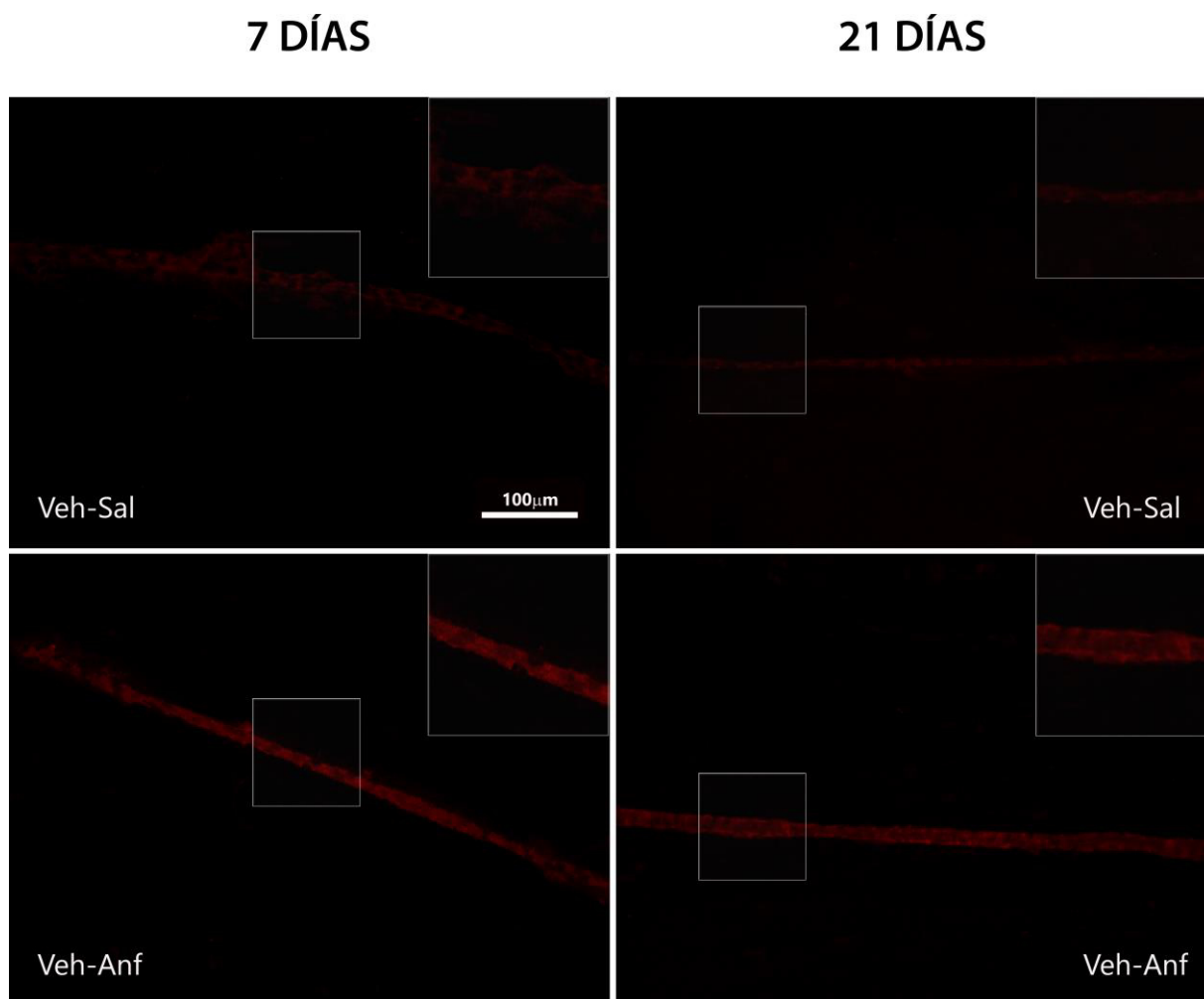


Figura 36: Inmunofluorescencia indirecta para HSP-70, en microvasos cerebrales aislados de ratas, 7 (izquierda) y 21 días (derecha) post-Anf, en respuesta a Ang II icv. Las microfotografías son representativas de la tinción inmunofluorescente de los microvasos cerebrales de animales que recibieron los tratamientos: Veh-Sal y Veh-Anf (n= 4). Imagen de inmunofluorescencia con estímulo a una longitud de onda de 555 nm. Barra de calibración: 100 μ m. Aumento 200x. Recuadro derecho superior, aumento 400x.

3.6. Efecto de la exposición repetida a anfetamina sobre la inmunomarcación de R-AT₁ y ICAM-1 en la vasculatura cerebral.

La exposición repetida al psicoestimulante produjo un aumento en la inmunomarcación de R-AT₁ y ICAM-1 en la vasculatura cerebral (arterias cerebrales del polígono de Willis y de calibre medio), 7 días después de la última dosis de anfetamina (Figura 37 y 38). Por otro lado, el challenge de anfetamina ó salina (datos no presentados) no alteró estos parámetros.

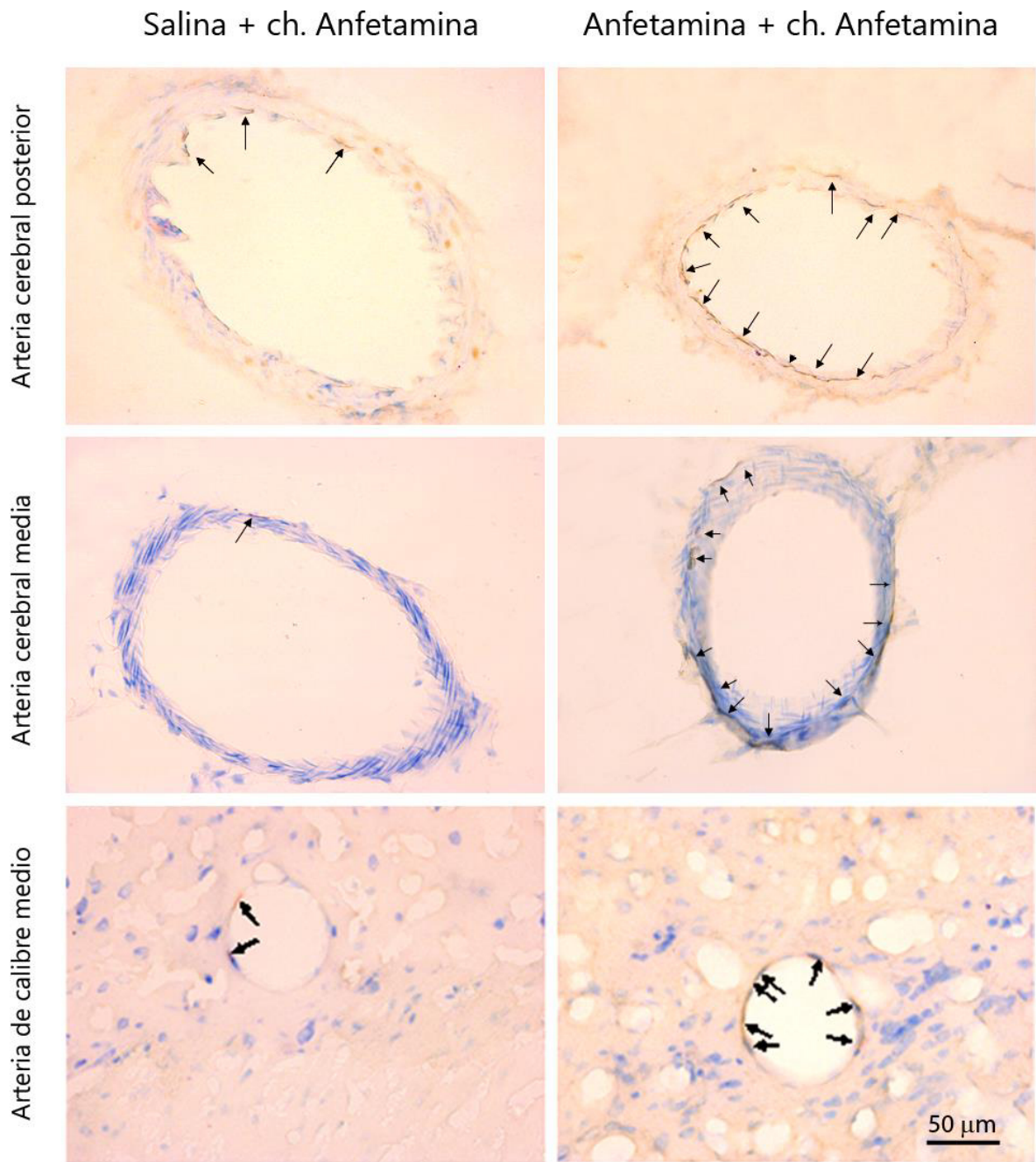


Figura 37: Inmunohistoquímica de ICAM-1 en cortes de 10 µm de: arteria cerebral posterior (panel superior), arteria cerebral media (panel medio) y arteria de menor calibre (panel inferior); en animales tratados con Veh-Sal (izquierda) ó Veh-Anf (derecha) 7 días antes y una hora posterior a un challenge de amfetamina ip. (n= 5). Microfotografías representativas de las tinciones inmunohistoquímicas de las áreas estudiadas, la flecha indica la inmunomarcación de ICAM-1. Barra de calibración: 50 µm. Aumento 400x

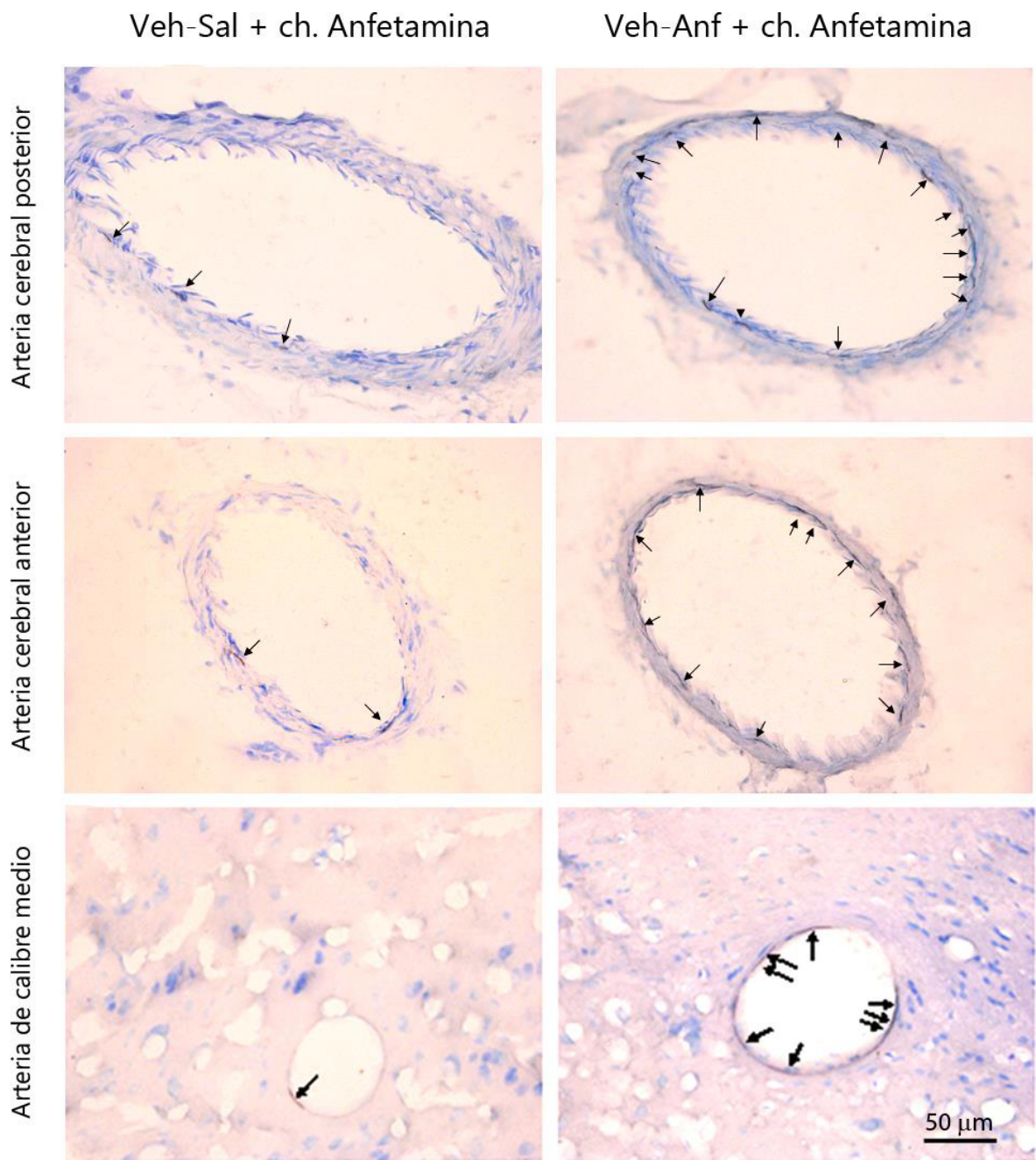


Figura 38: Inmunohistoquímica de R-AT₁ en cortes de 10 µm de: arteria cerebral posterior (panel superior), arteria cerebral anterior (panel medio) y arteria de menor calibre (panel inferior); en animales tratados con Veh-Sal (izquierda) ó Veh-Anf (derecha) 7 días antes y una hora posterior a un challenge de anfetamina ip. (n= 5). Microfotografías representativas de las tinciones inmunohistoquímicas de las áreas estudiadas, la flecha indica la inmunomarcación de R-AT₁. Barra de calibración: 50 µm. Aumento 400x.

3.7. Efecto de la exposición repetida a anfetamina sobre el estrés oxidativo en la microvasculatura cerebral.

Los niveles de MDA, parámetro estrés oxidativo -peroxidación lípidica-, en la microvasculatura cerebral, se incrementaron en animales expuestos a anfetamina, luego de un challenge de anfetamina a los 7 y 21 días post-psicoestimulante. Este aumento se previno con el pretratamiento con candesartan (Figura 39).

3.7.1. Challenge Salina

7 días: Los resultados obtenidos del análisis ANOVA a una vía, 7 días post-anfetamina, fueron: $F(3,16)=1.880$ $p>0.05$, no mostrando diferencias significativas entre los grupos experimentales.

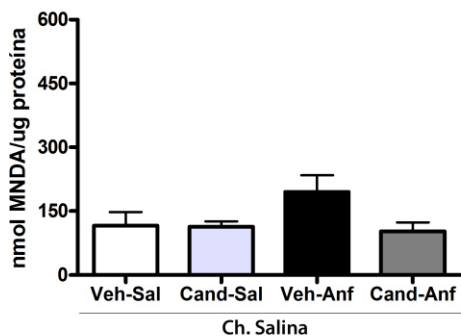
21 días: Veintiún días después de la exposición a anfetamina los resultaron del análisis estadístico de ANOVA a una vía fueron: $F(3,15)=0,2603$ $p>0.05$, no mostrando diferencias significativas entre los grupos experimentales.

3.7.2. Challenge Anfetamina

7 días: Los resultados obtenidos del análisis ANOVA a una vía, 7 días post-anfetamina, fueron: $F(3,17)=9.847$ $p<0.001$ y el post-test Student Newman-Keuls indicó que el grupo Veh-Anf es significativamente diferente de los demás grupos ($p<0.01$).

21 días: Veintiún días después de la exposición a anfetamina los resultaron del análisis estadístico de ANOVA a una vía fueron: $F(3,13)=7.476$ $p<0.01$ y el post-test Student Newman-Keuls indicó que el grupo Veh-Anf es significativamente diferente de Veh-Sal y Cand-Sal ($p<0.01$) y de Cand-Anf ($p<0.05$).

7 DÍAS



21 DÍAS

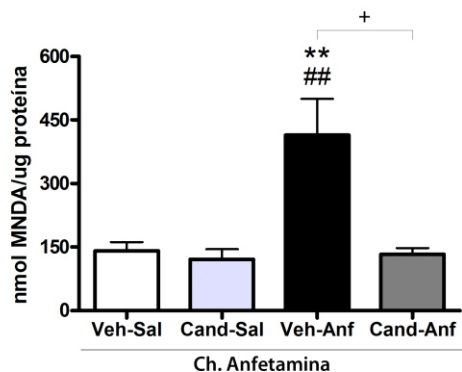
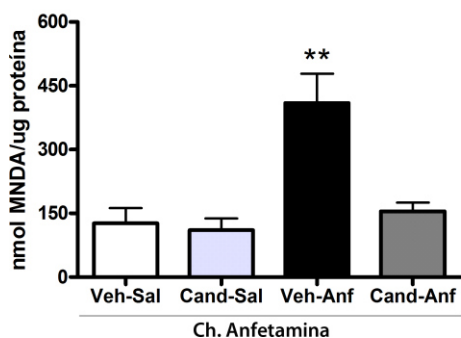
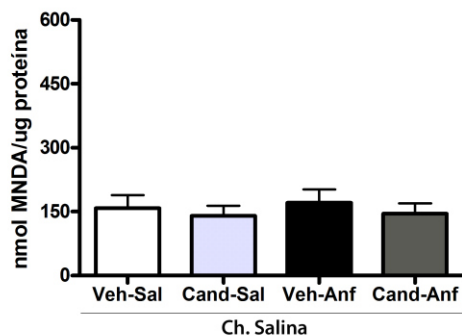


Figura 39: Niveles de malondialdeído (MDA), como medida de estrés oxidativo -peroxidación lipídica-, expresado en nmoles de MDA por ug de proteínas, en los microvasos cerebrales de ratas, luego de challenge de salina (arriba) o anfetamina -0,5mg/kg ip.- (abajo), 7 y 21 días post-Anf. Grupos: Veh-Sal, Cand-Sal, Veh-Anf y Cand-Anf (n= 4-6). Los valores expresan la media +/- ES. **p<0.01 significativamente diferente de los demás grupos, 7 días post-Anf; **p<0.01, ##p<0.01 y +p<0.05 diferente de Veh-Sal, Cand-Sal y Cand-Anf respectivamente, 21 días post-Anf.

Tabla 5: RESUMEN DE RESULTADOS (Objetivo 3)

Efecto de la exposición repetida a Anfetamina	Bloqueo AT₁ previene los efectos de anfetamina?
Aumento de TNF- α en LCR	Si
Aumento de IL-6 en plasma y LCR	Si
Aumento de R-AT ₁ en microvasos cerebrales	Si
Aumento de HSP-70 en microvasos cerebrales	Si
Aumento de R-AT ₁ en arterias cerebral anterior, arteria cerebral posterior y arterias de menor calibre	Si
Aumento de ICAM-1 en arterias cerebral media, arteria cerebral posterior y arterias de menor calibre	Si
Aumento del marcador de peroxidación lipídica (MDA) en microvasos cerebrales	Si

Tabla 5: Resumen de los resultados del objetivo 3. MDA: malondialdehído.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

El principal hallazgo de este trabajo de tesis es el efecto duradero de la exposición repetida a anfetamina sobre respuestas mediadas por la activación de R-AT₁. Las secuelas de la exposición a anfetamina pudieron ser evidenciadas con la administración intracerebral de Ang II.

Respecto a las alteraciones inducidas por el psicoestimulante, encontramos que la exposición previa a anfetamina indujo una menor respuesta a Ang II icv., en la ingesta de sodio, memoria de trabajo, ansiedad y perfil de activación neuronal (en estructuras cerebrales involucradas en la osmoregulación y recompensa). Mientras que, un efecto contrario (mayor respuesta a Ang II icv.) se halló en la activación neuronal en áreas involucradas en la cognición, la actividad oxitocinérgica central y excreción de sodio urinario. Respecto a la PRA la exposición a anfetamina potenció la inhibición inducida por la administración central de Ang II. El bloqueo previo de los R-AT₁ permitió que las respuestas a Ang II se normalizaran a los 21 días post- anfetamina en todos los casos, salvo en la respuesta de ansiedad. Estos resultados apoyan la importancia funcional de los R-AT₁ en las respuestas neuroadaptativas inducidas por anfetamina. Y son relevantes dado que las evidencias muestran que los cambios adaptativos en la sensibilización conductual y neuroquímica a psicoestimulantes son más pronunciados a los 21 días [269].

Por otro lado, también encontramos que la exposición repetida a anfetamina, favoreció el desarrollo de una respuesta inflamatoria a nivel cerebral evaluada en el LCR y en la microvasculatura. Estas respuestas inflamatorias fueron prevenidas por el bloqueo previo de los R-AT₁.

1.1. Uso de Ang II icv. para evidenciar los cambios en el RAS cerebral, inducido por exposición repetida a anfetamina

Los resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio mostraron que los R-AT₁ cumplen un rol clave en el desarrollo y la expresión de los cambios neuroadaptativos inducidos por anfetamina. Del mismo modo, se comprobó que la respuesta neuroadaptativa a este psicoestimulante involucra cambios en los distintos componentes del RAS cerebral [166, 167, 270]. Por ello, en el presente trabajo de tesis nos propusimos estudiar el rol

funcional de las alteraciones del RAS cerebral inducidas por anfetamina utilizando Ang II icv.

Si bien, es ampliamente conocido que la Ang II periférica induce retención de sodio por acción directa renal, así como a través de la liberación de aldosterona de la glándula adrenal, en el presente estudio nos enfocamos en la acción central de Ang II. En este sentido, se ha descrito que la administración intracerebral de Ang II, estimula o inhibe la activación neuronal, medida por un aumento o disminución de la IR-Fos en determinadas áreas cerebrales [294, 295]. Así mismo, Ang II icv. induce activación oxitocinérgica central [264, 265], con el consiguiente aumento de la excreción de sodio urinario [54, 83, 86] y de la ingesta de sodio y agua [292, 293], además de disminuir la PRA [93]. Sin embargo, se postula que Ang II icv. tiene un efecto dual a través de sus R-AT₁: uno es directo y estimulante de la ingesta de sodio [301, 302] y el otro es indirecto e inhibidor mediado por la activación central del sistema oxitocinérgico [20]. Además, se conoce que Ang II icv. interfiere en la formación de la memoria espacial [104], en el estado de ansiedad (ansiogénica) [303] y favorece la respuesta inflamatoria [175, 179, 182, 304].

1.2. Ingesta de Sodio y Agua

En concordancia con trabajos previos [54, 83, 86, 292, 293] hallamos que la dosis utilizada de Ang II icv. (400 pmol) en ratas conscientes, produjo un marcado aumento de la ingesta de sodio y agua. En tanto que, la administración previa de anfetamina inhibió la ingesta de sodio en respuesta a Ang II icv. sin afectar la ingesta de agua.

En esta alteración inducida por anfetamina podría estar implicada la desensibilización/inactivación de los R-AT₁ [305]. Dado que numerosos trabajos muestran que la Ang II induce la internalización de R-AT₁ [306-308], es posible que luego de una estimulación persistente o repetitiva de los R-AT₁ se encuentre una disminución en la respuesta a Ang II [309]. Estos cambios en el receptor se correlacionan con la activación de genes inducibles tempranos, *c-fos*, *delta-fos* y *c-jun* que estarían implicados en el control de la expresión de factores de transcripción que median en última instancia la desensibilización, a la señal de Ang II [310]. Una posible explicación a los resultados encontrados en el presente estudio sería la existencia de diferentes subpoblaciones de R-AT₁ [39, 311]. En este sentido, la subpoblación que media la ingesta de sodio inducida por

Ang II, podría ser más susceptible a la desensibilización/inactivación que la otra población de receptores. Es posible que el comportamiento de la ingesta de sodio observada, refleje la regulación diferencial de las vías de señalización intracelular. Se ha planteado la hipótesis de que la estimulación de los R-AT₁ por Ang II, puede activar distintas vías de señalización para la ingesta de agua y para la ingesta de sodio [39, 311]. Hay resultados que apoyan esta hipótesis, mostrando que las vías dependientes de proteína G serían más importantes en la ingesta de agua estimulada por Ang II, mientras que las vías independientes de proteína G serían más relevantes en la ingesta de sodio inducida por Ang II [38]. Apoyando este punto de vista, hay hallazgos que muestran un fenómeno similar, donde una administración repetida de Ang II icv., reduce el efecto dipsogénico sin afectar la ingesta de sodio [274]. Basado en lo anterior, es posible pensar que la anfetamina podría estar afectando en forma selectiva la subpoblación de R-AT₁ que median la ingesta de sodio.

Se ha demostrado, que la administración central de Ang II estimula la liberación hipofisaria de OT [53, 265]. Hay varias situaciones que aumentan la ingesta de sodio (por ejemplo, la depleción de sodio, adrenalectomía, e inyecciones de desoxicorticosterona - DOCA-) y disminuyen los niveles basales de OT. En cambio, los tratamientos que estimulan la secreción de OT (por ejemplo, solución salina hipertónica, cloruro de litio y sulfato de cobre) inhiben la ingesta de sodio en ratas depletadas [38, 263, 312]. En este sentido, se comprobó que la administración central de antagonistas de los receptores de OT, previo a Ang II icv. induce una marcada potenciación de la ingesta de sodio. Sin embargo, el antagonismo del receptor de OT, no interfiere con la propiedad dipsogénica de Ang II, ni tampoco estimula la ingesta de sodio en ausencia de Ang II [264]. Aunque, otros investigadores encontraron un leve aumento en la ingesta de sodio y agua en ratas, inducido por la administración intracerebral de antagonista de los receptores de OT [20]. Además, la administración de losartan en ratas, inhibió la ingesta de sodio inducida por la inyección de un antagonista del receptor de OT, apoyando la idea de un tono oxitocinérgico inhibitorio involucrado en la activación o desinhibición del R-AT₁ [20]. En este sentido, la exposición repetida a anfetamina produciría una desensibilización/inactivación de los R-AT₁, por lo que no se observan las respuestas descritas para Ang II icv. y predominan los efectos de oxitocina en respuesta a Ang II icv. sobre las respuestas estudiadas. Este efecto se previno con la administración del antagonista de los R-AT₁ sólo a los 21 días post-psicoestimulante.

1.3. Expresión de Fos y Fos-oxitocina

Se ha descrito la presencia de R-AT₁ en el SFO, PVN y NAc, y la participación de estos receptores en la osmoregulación y las respuestas de recompensa [313, 314]. En este sentido, se ha reportado que una depleción de sodio en ratas (que estimula el RAS cerebral), aumenta la IR-Fos en el SFO, PVN y NAc, y que este aumento se correlaciona con un incremento en la ingesta de sodio [160, 315]. En el presente trabajo, encontramos que la administración de Ang II icv., aumentó significativamente la IR-Fos en NAc e incrementó la ingesta de sodio. En tanto que la exposición previa a anfetamina, disminuyó el número de células IR-Fos en CPu, NAc core, PVN y NTS.

Por otra parte, se conoce que el R-AT₁ puede mediar la expresión de Fos en SFO y PVN, después de una sola inyección icv. de Ang II [294, 316]. En contraste, las administraciones repetidas de Ang II icv. inducen una disminución del 50% en la expresión de Fos en SFO y PVN y un aumento de la expresión de R-AT₁ en estas áreas cerebrales [310]. Esta disminución de la IR-Fos en contraposición con el aumento de R-AT₁ podría deberse a la desensibilización/inactivación provocada por la unión de Ang II, reduciendo de esta manera los receptores en la superficie celular. Una posible explicación a este resultado contradictorio sería que los autores usaron técnicas de inmunohistoquímica y de Western blot, que miden los receptores de la superficie celular, además de los localizados en el citoplasma [310].

Por otro lado, se ha descrito que la exposición a anfetamina y cocaína, induce una sobreexpresión de la IR-Fos en el CPu y en el NAc [166, 238, 287, 317-320]. Se comprobó, que una única inyección de cocaína aumentó IR-Fos en NAc, en tanto que la administración crónica produjo una disminución en la expresión de Fos [321]. Estos resultados explicarían de cierto modo lo observado en este estudio, donde la exposición previa y repetida a anfetamina, podría haber desensibilizado o inactivado los R-AT₁ y la expresión de Fos en NAc, CPu, PVN y Amígdala, produciendo una disminución en la IR-Fos en respuesta a Ang II icv. Esta respuesta también se reestablece a los 21 días post-anfetamina con el bloqueo previo de los R-AT₁.

El grupo de Fitzsimons mostró que la activación del SFO está más vinculada a la ingesta de agua que a la de sodio [292]. Nuestros hallazgos estarían en concordancia, dado que la exposición a anfetamina no afectó el número de neuronas IR-Fos en el SFO luego de Ang II icv. ni tampoco afectó la ingesta de agua.

Las células del PVN y del SON producen OT, y el RAS está estrechamente vinculado con la estimulación del sistema oxitocinérgico [247]. Diversos estudios muestran que las inyecciones de Ang II icv. aumentan la activación de las neuronas oxitocinérgicas en el PVN y SON [264, 265]. En el presente estudio, encontramos que la exposición a anfetamina produjo una potenciación de la activación oxitocinérgica en el SON y PVN, en respuesta a Ang II icv. Esta respuesta oxitocinérgica aumentada en los animales expuestos al psicoestimulante, explicaría la menor respuesta a Ang II icv. en la ingesta de sodio.

1.4. Natriuresis y actividad de la renina plasmática

Es conocido que los nervios simpáticos renales inervan los túbulos, los vasos y las células yuxtaglomerulares del riñón [322]. Una estimulación de la RSNA, produce disminución de la excreción de sodio y agua, del flujo sanguíneo renal y de la tasa de filtración glomerular, además de producir vasoconstricción, liberación de renina desde las células yuxtaglomerulares [79], estimulando de esta manera la actividad del RAS. [323]. A nivel central, la Ang II endógena actuaría a través de sus R-AT₁ regulando la actividad del nervio simpático periférico. DiBona y col, mostraron que el bloqueo de los R-AT₁, usando losartan icv., indujo una disminución en la RSNA basal, lo que evidencia un tono estimulador de la Ang II endógena en la RSNA [323]. En tanto que, otros autores observaron que la administración de Ang II icv. produjo una disminución del 57% en la RSNA [324]. Los mecanismos por los cuales Ang II icv. induce efectos natriuréticos, no están del todo esclarecidos pero involucrarían dos posibles vías. En primer lugar, Ang II icv. actuando a través de R-AT₁, disminuiría la RSNA como vimos anteriormente [324, 325]. En segundo lugar, la natriuresis inducida por Ang II i.c.v. podría ser mediada a través de la liberación de OT cerebral [326], que a su vez induce un aumento en la excreción del ANP desde el corazón [266, 267]. El ANP promueve la excreción de sodio y potasio vía su receptor específico renal, aumentando GMPc y la presión hidrostática en el glomérulo [267, 327]. En el presente estudio, la excreción de sodio y potasio inducido por la inyección de Ang II icv. fue potenciada por la exposición repetida a anfetamina. En tanto que, el bloqueo de los R-AT₁ normalizó la respuesta, sólo a los 21 días post-psicoestimulante. Esta potenciación en la excreción de sodio y potasio en los animales

expuestos a anfetamina podría deberse también a la desensibilización/inactivación de los R-AT₁. Esto mediaría en última instancia la exacerbación de la respuesta oxitocinérgica sobre la natriuresis y kaliuresis inducida por Ang II icv.

Por otro lado, se conoce que la Ang II icv. a través de sus R-AT₁, induce una disminución de la PRA, esta disminución sería mediada por la inhibición de la RSNA [92, 93]. En el presente estudio, observamos que la exposición a anfetamina potenció la disminución inducida por Ang II icv. sobre la PRA. En tanto que, el bloqueo de los R-AT₁ restauró la respuesta a Ang II icv. a los 21 días post-anfetamina. Esta disminución en la PRA por exposición al psicoestimulante, junto con los hallazgos de activación oxitocinérgica aumentada en respuesta a Ang II icv. explicarían el efecto potenciado en la natriuresis y kaliuresis.

1.5. Memoria

Numerosos estudios han demostrado la participación de la Ang II en aspectos conductuales, pero el papel exacto de la Ang II en la memoria sigue siendo ambiguo. Tota y col, mostraron que la administración de escopolamina, un antagonista muscarínico utilizado como modelo de pérdida de memoria [328, 329], produjo una disminución del flujo sanguíneo cerebral y un aumento del estrés oxidativo. En este trabajo, Tota y col, observaron que el tratamiento con candesartan impidió la amnesia inducida por escopolamina, restaurando el flujo sanguíneo cerebral y disminuyendo el estrés oxidativo. En contraste, el tratamiento con un antagonista de los R-AT₂ no fue eficaz para impedir estas alteraciones. Este estudio sugiere que la activación de los R-AT₁ estaría implicada en la amnesia inducida por escopolamina [330]. Otros estudios, han mostrado que la administración central de Ang II en ratas, causa deterioro de la memoria espacial al afectar la adquisición, consolidación y recuperación en pruebas de memoria espacial. Asimismo, en este mismo modelo se ha descrito una reducción del flujo sanguíneo cerebral y un aumento del estrés oxidativo por Ang II icv. En este sentido, se mostró que candesartan impidió los efectos de Ang II icv., sugiriendo que actuaría a través de sus R-AT₁, afectando la formación de la memoria espacial y el flujo sanguíneo cerebral [104].

Por otro lado, se conoce que la hipertensión en seres humanos, se asocia con un deterioro cognitivo, depresión y ansiedad. Los I-ACE son ampliamente utilizados como

agentes antihipertensivos, pero también se les han atribuido efectos positivos en el estado de ánimo y la cognición [230, 233]. En este sentido, otros autores han encontrado que la administración de perindopril, I-ACE, en ratas, mejora la performance en el test de memoria espacial y la respuesta de ansiedad en el test de *Plus Maze* [232]. Resultados obtenidos de la clínica, muestran una influencia positiva de los I-ACE sobre la cognición, planteándose la posibilidad de su uso, en el tratamiento de pérdida de memoria [331]. Otros estudios clínicos en pacientes hipertensos tratados con losartán, mostraron efectos positivos no sólo sobre la presión arterial, sino también en la función cognitiva, observándose una reversión del déficit cognitivo [229].

En el presente trabajo, comprobamos que la dosis de 400 pmol de Ang II icv., produce un deterioro en la memoria de trabajo que se evidencia por un patrón de exploración heterogéneo en el test de *Hole Board*. En cambio, los animales expuestos a anfetamina 7 o 21 días antes no mostraron este deterioro en la memoria en respuesta a Ang II icv. Esta falta de respuesta en los animales expuestos a anfetamina, puede explicarse también por una desensibilización/inactivación de los R-AT₁, como consecuencia de una sobre-estimulación inducida por la exposición repetida al psicoestimulante. La respuesta a Ang II se restauró con el pretratamiento de candesartan 21 días post-anfetamina al igual que la mayoría de las respuestas evaluadas.

La administración repetida a anfetamina provocó una mayor activación oxitocinérgica en el SON y PVN en respuesta a Ang II. Existen datos controvertidos en la literatura respecto al rol de OT en la memoria. Si bien, se plantea que la OT modula negativamente el almacenamiento de la memoria [332], se ha sugerido desde hace unos años, que no debe generalizarse el papel de la OT en la cognición, porque depende de la prueba conductual y del área del cerebro en estudio [333], siendo el rol de OT muy discutido actualmente [255]. Es así, que estudios recientes han demostrado, que la OT mejora la flexibilidad cognitiva en ratones [255] y que OT administrada intra-nasalmente tiene efectos positivos en la memoria de pacientes con esquizofrenia [255, 259, 334]. Otros hallazgos indican que la OT está involucrada en la mejora del aprendizaje hipocampo-dependiente y en la memoria durante la maternidad en ratones [256]. Incluso, se le ha atribuido recientemente beneficios terapéuticos en la memoria de procesamiento de rostros [257, 258]. De esta manera, una posible explicación para nuestros hallazgos en el test de memoria en los animales expuestos a anfetamina, sería la desensibilización/inactivación de los R-AT₁ y/o una respuesta oxitocinérgica aumentada.

Por otro lado, se conoce que los cambios plásticos dependientes de la actividad de las conexiones sinápticas se consideran la base de aprendizaje y la memoria [335-337]. La activación de las neuronas por una variedad de estímulos influye en el nivel de expresión del gen temprano *c-fos* [299, 338], incluso la activación neuronal después de algunas formas de aprendizaje también involucran la expresión de Fos [339-341]. En consecuencia, la expresión de Fos se considera un mecanismo por el cual breves estímulos pueden desencadenar a largo plazo cambios en la expresión génica y alterar la estructura y propiedades funcionales de las células nerviosas [342, 343]. Se ha descrito, que la expresión de Fos en la corteza cerebral y en la región CA-3 del hipocampo dorsal, se incrementa durante el aprendizaje espacial en el laberinto radial de 8 brazos, y este aumento específico en la región hipocámpal es necesaria para la formación de la memoria espacial [239]. Es por ello, que numerosos autores postulan que la inhibición de la expresión de Fos en el hipocampo perjudica la formación de la memoria de referencia mediante la inhibición de la expresión de un número de genes que juegan un papel importante en los cambios a largo plazo en las conexiones sinápticas [236, 342, 343].

Los antecedentes descritos explicarían los resultados obtenidos en el presente estudio, donde el deterioro en la memoria de trabajo inducida por Ang II icv., se correlaciona con una disminución en la IR-Fos en la región CA-1, CA-3 y girus dentado del hipocampo. En tanto que en los animales expuestos a anfetamina, no se evidencia el deterioro cognitivo ni la disminución en la IR-Fos en las áreas hipocámpales analizadas, en respuesta a la administración de Ang II icv. Este fenómeno podría explicarse nuevamente por una desensibilización/inactivación de los R-AT₁ en los animales expuestos a anfetamina. Las alteraciones producidas por la exposición al psicoestimulante se restauraron con el pretratamiento de candesartan 21 días post-anfetamina.

1.6. Ansiedad

El test de *Plus Maze*, es uno de los modelos animales de ansiedad más usado y mejor validado desde el punto de vista conductual, farmacológico y fisiológico [126, 275]. Los antagonistas de los R-AT₁ (candesartan, losartan) han mostrado tener efecto ansiolítico mientras que la administración de Ang II icv. tiene efecto ansiogénico [303]. En este sentido, se ha visto que las ratas evaluadas en el test de *Plus Maze*, muestran una mayor

IR-Fos en la amígdala (BLA, MeA, CeA), PVN, LC entre otras áreas [240-242]. Estas áreas cerebrales también expresan Fos cuando los animales son expuestos a otros estímulos ansiogénicos (shock eléctrico, olor del depredador, etc.) [297-300]. También se ha descrito una correlación entre el aumento de IR-Fos en el PVN y un comportamiento de ansiedad luego de una inyección icv. de CRH [344].

Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran que Ang II icv. induce un marcado efecto ansiogénico, que puede asociarse con el aumento en la IR-Fos en amígdala (CeA y BLA) y en el PVN. Una posible explicación al aumento de IR-Fos en el PVN sería una mayor activación de neuronas CRH. La exposición repetida a anfetamina contrarrestó el efecto ansiogénico de Ang II icv. así como el aumento de IR-Fos en amígdala y en el PVN. Estos resultados pueden ser explicados también como consecuencia de la desensibilización/inactivación de los R-AT₁. Si bien el efecto de anfetamina sobre la respuesta ansiogénica a Ang II icv. no se recupera con el bloqueante AT₁ en ninguno de los 2 tiempos estudiados.

Con respecto a la relación entre OT y la ansiedad se ha descrito que OT posee propiedades ansiolíticas y que suprime la actividad del HPA inducida por estrés [248-251]. Además, la administración central de un antagonista de OT potencia la actividad del HPA y aumenta el estado ansioso en el test de *Plus Maze*. Esto indica que la OT endógena participa en la respuesta de ansiedad [252-254].

Nuestros hallazgos con respecto a la ausencia del efecto ansiogénico inducido por Ang II icv. en los animales expuestos a anfetamina, podría ser consecuencia de la mayor activación oxitocinérgica observada en este grupo. Es así, que en ausencia de respuesta ansiogénica a Ang II icv. por exposición repetida a anfetamina, pueden estar implicados dos eventos: desensibilización/inactivación de los R-AT₁ y respuesta oxitocinérgica aumentada. Una posible explicación para la no recuperación con el tratamiento previo de candesartan, puede deberse que si bien los R-AT₁ están involucrados en la respuesta ansiogénica a Ang II icv., la acción de anfetamina en esta respuesta puede involucrar además otros receptores del RAS cerebral e incluso otros sistemas de neurotransmisión.

1.7. Inflamación

Es ampliamente conocido que la activación de los R-AT₁ por Ang II, aumenta los niveles de ROS y de NADPH oxidasa, generando un ambiente oxidativo [176] y que la circulación cerebral es particularmente sensible a Ang II [345]. A este respecto, Ang II media el estrés oxidativo a nivel de los vasos cerebrales, pudiendo contribuir a la susceptibilidad de lesiones isquémicas y a la demencia asociada con la hipertensión [346]. Resultados recientes sugieren que el RAS, también aumenta la producción de citoquinas proinflamatorias, tales como TNF- α , afectando la vasculatura cerebral y cardíaca, tanto a través de acciones directas como a través de la modulación de vías de señalización de ROS [180-183]. Incluso se ha visto que el bloqueo del TNF- α a nivel central evita la desregulación de los componentes de RAS y atenúa la hipertensión inducida por Ang II [182, 185]. También se conoce, que Ang II, a través de sus R-AT₁ induce la expresión tisular de la familia de las HSP (HSP-60, HSP-70, HSP-90) [185, 200] y de IL-6 [184], mientras que a nivel de los microvasos cerebrales favorece la infiltración leucocitaria y la expresión de ICAM-1 [1, 347], colaborando de esta manera con la mantención del proceso inflamatorio. Debido a lo expuesto, es que un aumento de los R-AT₁ a nivel cerebral y periférico se considera un importante marcador de inflamación [4, 178].

Por otro lado, se ha reportado que el abuso de cocaína y anfetamina produce accidentes cerebro-vasculares, hemorragias y vasculitis cerebral [222, 223]. También se ha descrito que la exposición a análogos de anfetamina o cocaína produce neuroinflamación, activación de la microglía, producción de citoquinas proinflamatorias a nivel periférico y del SNC, como TNF- α e IL-6 [208-213], además de favorecer el aumento de ICAM-1 [212] y estimular la producción de ROS, con el consiguiente estrés oxidativo [218, 220].

De lo descrito previamente se desprende que anfetamina y Ang II comparten historias de inflamación a nivel cerebral y vascular. En concordancia con estos antecedentes, nuestros resultados muestran que la exposición previa a anfetamina produjo: un aumento en la IF-HSP-70 y IF-R-AT₁ en la microvasculatura cerebral, un aumento de inmunoreactividad a ICAM-1 en la vasculatura cerebral, un aumento del estrés oxidativo en los microvasos y un aumento en los niveles de TNF- α y de IL-6 en LCR, en respuesta a Ang II icv. En tanto que, el bloqueo previo de los R-AT₁ normalizó estas respuestas. La respuesta inflamatoria a nivel de la vasculatura se previno por el tratamiento con candesartan en los 2 tiempos estudiados, en cambio la respuesta a nivel del LCR se vio

normalizada sólo a los 21 días post-anfetamina. Esto muestra la eficacia del bloqueo de los R-AT₁ sobre las respuestas inflamatorias vasculares, corroborando el rol preponderante de estos receptores a nivel de la inflamación vascular así como la capacidad inflamatoria de anfetamina. A su vez, se confirma la estrecha relación entre el aumento de la expresión de los R-AT₁ y la respuesta inflamatoria inducida por la exposición al psicoestimulante, dado que estos receptores serían los encargados de mediar la marcada respuesta inflamatoria en respuesta a Ang II icv. en la vasculatura cerebral. Del mismo modo, que se observa una correlación temporal entre la respuesta inflamatoria y las respuestas neuroadaptativas a Ang II icv.

Esto es importante dado que existe una interrelación entre los procesos inflamatorios cerebrales y las alteraciones neuroquímicas, en este sentido se ha descrito que los procesos inflamatorios están estrechamente relacionados con alteraciones en la neurotransmisión (cita) y como es conocido las drogas de abuso tipo anfetamina producen neuroinflamación. De esta manera la prevención de una respuesta inflamatoria a nivel de la microvasculatura cerebral con candesartan (7 días) podría estar involucrada en la duración de las respuestas neuroadaptativas observadas.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

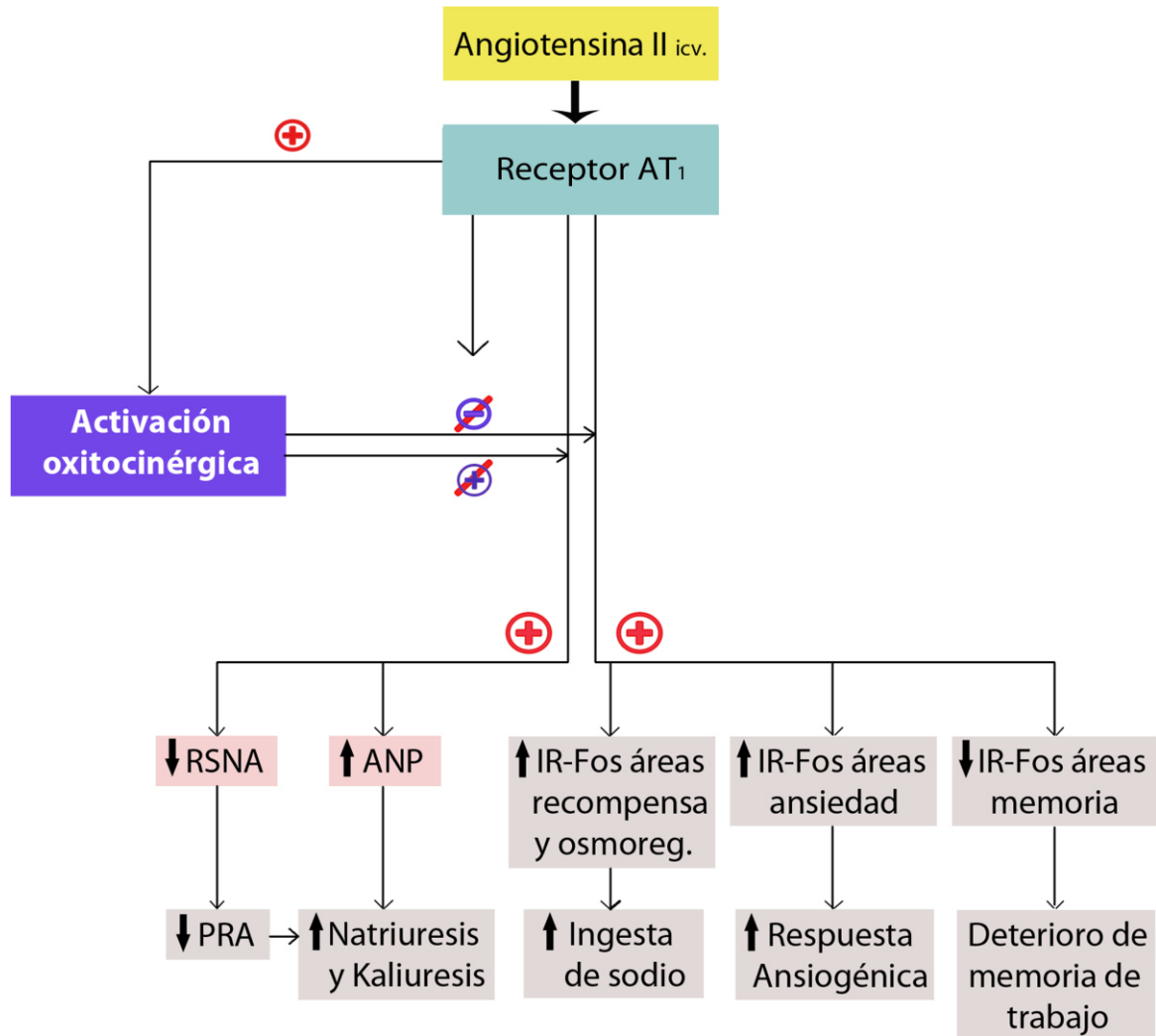


Figura 40: Esquema mostrando las respuestas a Ang II icv. Respuestas descritas a Ang II icv. (todos los cuadros) y estudiadas en este trabajo (salvo cuadros rosa). La estimulación de los R-AT₁ tiene una acción dual (estimulación-inhibición) sobre las respuestas del sistema oxitocinérgico central.

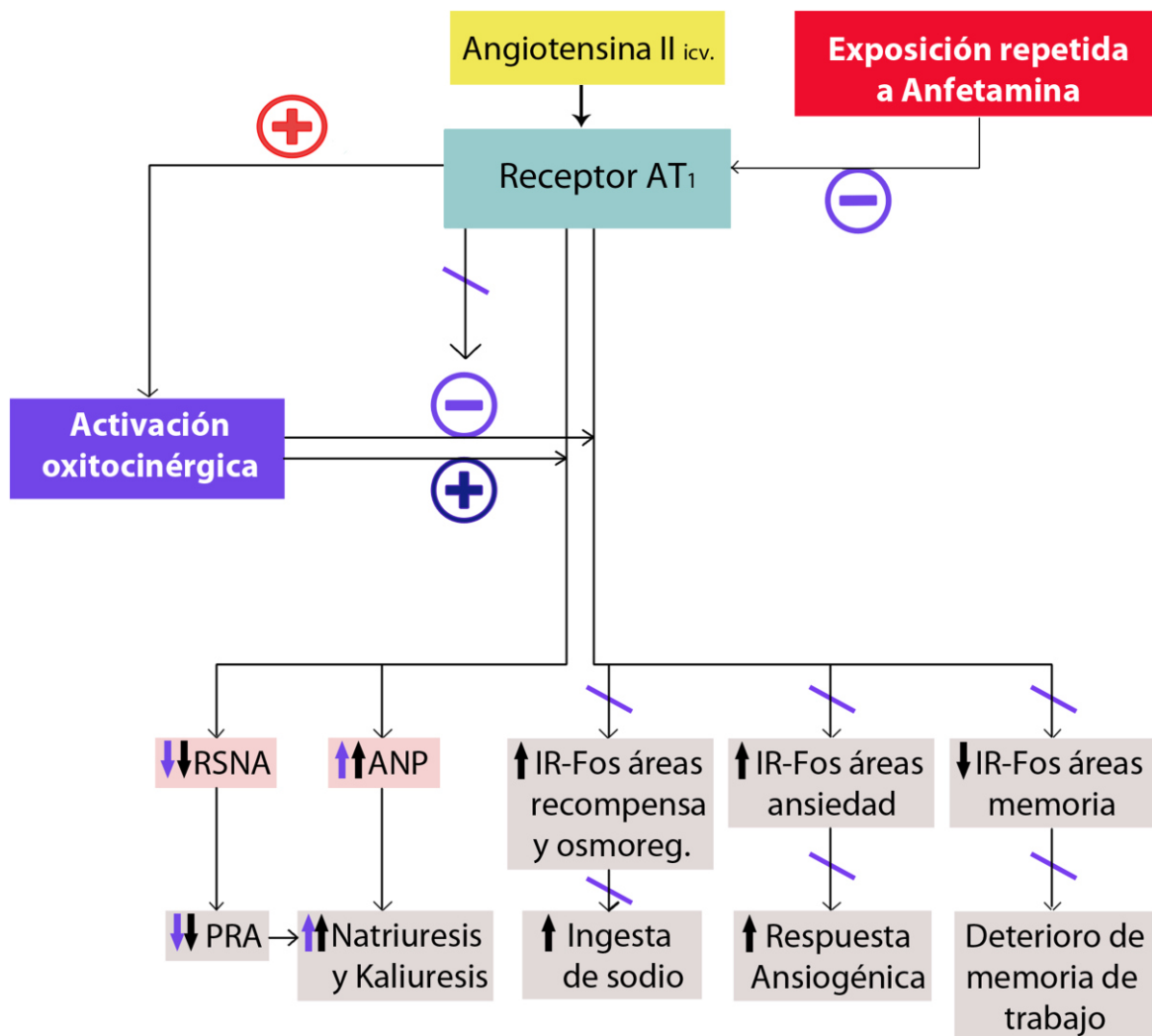


Figura 41: Efecto de la exposición repetida a anfetamina sobre las respuestas a Ang II icv. La exposición repetida a anfetamina produciría una desensibilización/inactivación de los R-AT₁, por lo que no se observan las respuestas descritas para Ang II icv. y predominan los efectos de oxitocina en respuesta a Ang II icv.

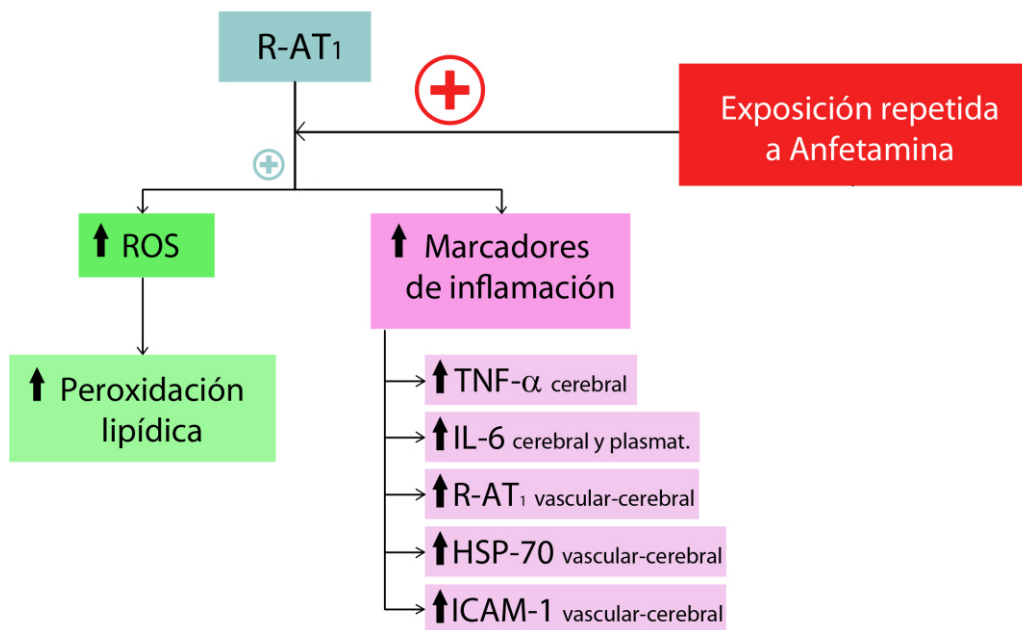


Figura 42: Esquema mostrando las respuestas inflamatorias inducidas por exposición repetida a anfetamina y la participación de los R-AT₁ en dicha respuesta.

Nuestros hallazgos apoyan la idea de que los cambios neuroadaptativos inducidos por anfetamina implicarían una alteración funcional de los R-AT₁, que podría ajustarse a una desensibilización/inactivación de los mismos y que la duración de las alteraciones inducidas por anfetamina también involucraría la activación de los R-AT₁. Además, nuestros resultados muestran la acción inflamatoria de la exposición repetida a anfetamina a nivel cerebral y vascular mediada por la activación de los R-AT₁.

Consideramos que los datos obtenidos en este trabajo de tesis son relevantes, dado que sustentan la idea de que un tratamiento farmacológico que altere el RAS cerebral podría conducir a respuestas disfuncionales a Ang II endógena bajo condiciones fisiológicas y/o de estrés.

RELEVANCIA Y PROYECCIONES

RELEVANCIA Y PROYECCIONES

Debido al incremento en el consumo de anfetamina en nuestra sociedad y el alto costo sanitario asociado al deterioro psicosocial del paciente y su entorno, es relevante estudiar sistemas de neurotransmisión poco explorados como posibles blancos terapéuticos.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis sustentan la visión del uso de antagonistas de los R-AT₁ como nuevas herramientas farmacológicas para la prevención y tratamiento de desórdenes cognitivos, de ansiedad, inflamatorios y osmoregulatorios, inducidos por el uso de anfetamina. Además, muestran la eficacia de este fármaco administrado por vía oral.

Cabe destacar que el fármaco utilizado en el presente trabajo (candesartan), está actualmente disponible en el mercado, presenta baja incidencia de efectos adversos y no provoca alteraciones en la presión arterial en individuos normotensos.

1. Futuras investigaciones derivadas de este trabajo de tesis

- A. Manipular el sistema oxitocinérgico, a través de antagonistas y agonistas de los receptores de OT, para evidenciar las alteraciones inducidas por la exposición repetida a anfetamina sobre este sistema, en relación con el RAS cerebral.
- B. Estudiar los cambios inducidos por anfetamina sobre los sistemas vasopresinérgico y serotoninérgico en relación con el RAS cerebral.
- C. Caracterizar las alteraciones sobre receptores de Ang II, vías de señalización así como cambios en el metabolismo en consecuencia de la exposición a anfetamina.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Ando, H., et al., *Angiotensin II AT1 receptor blockade reverses pathological hypertrophy and inflammation in brain microvessels of spontaneously hypertensive rats*. Stroke, 2004. **35**(7): p. 1726-31.
2. Nishimura, Y., et al., *Chronic peripheral administration of the angiotensin II AT(1) receptor antagonist candesartan blocks brain AT(1) receptors*. Brain Res, 2000. **871**(1): p. 29-38.
3. Saavedra, J.M., E. Sanchez-Lemus, and J. Benicky, *Blockade of brain angiotensin II AT1 receptors ameliorates stress, anxiety, brain inflammation and ischemia: Therapeutic implications*. Psychoneuroendocrinology, 2011. **36**(1): p. 1-18.
4. Benicky, J., et al., *Anti-inflammatory effects of angiotensin receptor blockers in the brain and the periphery*. Cell Mol Neurobiol, 2009. **29**(6-7): p. 781-92.
5. Bregonzio, C., et al., *Anti-inflammatory effects of angiotensin II AT1 receptor antagonism prevent stress-induced gastric injury*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2003. **285**(2): p. G414-23.
6. Sanchez-Lemus, E., et al., *Angiotensin II AT1 receptor blockade decreases lipopolysaccharide-induced inflammation in the rat adrenal gland*. Endocrinology, 2008. **149**(10): p. 5177-88.
7. Chevillard, C. and J.M. Alexandre, *In vitro effects on cardiac norepinephrine of angiotensin II and of two indirectly acting sympathomimetic amines (amphetamine and tyramine). A study of their combinations*. Eur J Pharmacol, 1972. **19**(2): p. 223-30.
8. Robinson, T.E. and B. Kolb, *Alterations in the morphology of dendrites and dendritic spines in the nucleus accumbens and prefrontal cortex following repeated treatment with amphetamine or cocaine*. Eur J Neurosci, 1999. **11**(5): p. 1598-604.
9. Salsbury, C.A. and R.B. Wayland, *The uses and misuses of amphetamines*. Med Leg Bull, 1966. **15**(4): p. 1-9.
10. Hutson, P.H., et al., *Preclinical pharmacology of amphetamine: implications for the treatment of neuropsychiatric disorders*. Pharmacol Ther, 2014. **143**(3): p. 253-64.
11. Ahmann, P.A., et al., *Placebo-controlled evaluation of amphetamine mixture-dextroamphetamine salts and amphetamine salts (Adderall): efficacy rate and side effects*. Pediatrics, 2001. **107**(1): p. E10.
12. Goodman and Gilman, *5-hidroxitriptamina (serotonina) y dopamina*. Sanders-Bush, E. y Hazelwood, L., in *Las bases farmacológicas de la terapéutica*, L.L. Brunton, Editor. 2012, Mc Graw-Hill.
13. Moore, K.E., *The actions of amphetamine on neurotransmitters: a brief review*. Biol Psychiatry, 1977. **12**(3): p. 451-62.
14. Tigerstedt, R. and P.G. Bergman, *Niere und Kreislauf*. Scand.Arch.Physiol, 1898(8): p. 223-271.
15. Braun-Menendez, E., et al., *The substance causing renal hypertension*. J Physiol, 1940. **98**(3): p. 283-98.
16. Page, I.H. and O.M. Helmer, *Angiotonin-Activator, Renin- and Angiotonin-Inhibitor, and the Mechanism of Angiotonin Tachyphylaxis in Normal, Hypertensive, and Nephrectomized Animals*. J Exp Med, 1940. **71**(4): p. 495-519.
17. de Gasparo, M., et al., *International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors*. Pharmacol Rev, 2000. **52**(3): p. 415-72.

18. Inagami, T. and S. Eguchi, *Angiotensin II-mediated vascular smooth muscle cell growth signaling*. Braz J Med Biol Res, 2000. **33**(6): p. 619-24.
19. Timmermans, P.B., et al., *Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists*. Pharmacol Rev, 1993. **45**(2): p. 205-51.
20. Fitts, D.A., et al., *Losartan blocks drinking and cFos expression induced by central ornithine vasotocin in rats*. Physiol Behav, 2005. **86**(4): p. 573-7.
21. Dinh, D.T., et al., *Angiotensin receptors: distribution, signalling and function*. Clin Sci (Lond), 2001. **100**(5): p. 481-92.
22. Goodman and Gilman, *Angiotensina*. In: Brunton, L.L, JSL. Parker, L.K. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 2007.
23. Lavoie, J.L. and C.D. Sigmund, *Minireview: overview of the renin-angiotensin system--an endocrine and paracrine system*. Endocrinology, 2003. **144**(6): p. 2179-83.
24. Danser, A.H., *Local renin-angiotensin systems: the unanswered questions*. Int J Biochem Cell Biol, 2003. **35**(6): p. 759-68.
25. Phillips, M.I. and C. Summers, *Angiotensin II in central nervous system physiology*. Regul Pept, 1998. **78**(1-3): p. 1-11.
26. Wright, J.W., L.H. Kawas, and J.W. Harding, *A Role for the Brain RAS in Alzheimer's and Parkinson's Diseases*. Front Endocrinol (Lausanne), 2013. **4**: p. 158.
27. Zhuo, J.L. and X.C. Li, *New insights and perspectives on intrarenal renin-angiotensin system: focus on intracrine/intracellular angiotensin II*. Peptides, 2011. **32**(7): p. 1551-65.
28. Murphy, T.J., et al., *Isolation of a cDNA encoding the vascular type-1 angiotensin II receptor*. Nature, 1991. **351**(6323): p. 233-6.
29. Mukoyama, M., et al., *Expression cloning of type 2 angiotensin II receptor reveals a unique class of seven-transmembrane receptors*. J Biol Chem, 1993. **268**(33): p. 24539-42.
30. Sasaki, K., et al., *Cloning and expression of a complementary DNA encoding a bovine adrenal angiotensin II type-1 receptor*. Nature, 1991. **351**(6323): p. 230-3.
31. Wright, J.W., B.J. Yamamoto, and J.W. Harding, *Angiotensin receptor subtype mediated physiologies and behaviors: new discoveries and clinical targets*. Prog Neurobiol, 2008. **84**(2): p. 157-81.
32. Saavedra, J.M., *Brain and pituitary angiotensin*. Endocr Rev, 1992. **13**(2): p. 329-80.
33. Guo, D.F. and T. Inagami, *The genomic organization of the rat angiotensin II receptor AT1B*. Biochim Biophys Acta, 1994. **1218**(1): p. 91-4.
34. Inagami, T., D.F. Guo, and Y. Kitami, *Molecular biology of angiotensin II receptors: an overview*. J Hypertens Suppl, 1994. **12**(10): p. S83-94.
35. Thomas, W.G., T.J. Thekkumkara, and K.M. Baker, *Molecular mechanisms of angiotensin II (AT1A) receptor endocytosis*. Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl, 1996. **3**: p. S74-80.
36. von Bohlen und Halbach, O. and D. Albrecht, *The CNS renin-angiotensin system*. Cell Tissue Res, 2006. **326**(2): p. 599-616.
37. Sayeski, P.P., et al., *Angiotensin II signal transduction pathways*. Regul Pept, 1998. **78**(1-3): p. 19-29.
38. Daniels, D., et al., *Angiotensin II stimulates water and NaCl intake through separate cell signalling pathways in rats*. Exp Physiol, 2009. **94**(1): p. 130-7.
39. Daniels, D., et al., *Divergent behavioral roles of angiotensin receptor intracellular signaling cascades*. Endocrinology, 2005. **146**(12): p. 5552-60.

40. Hunyady, L. and K.J. Catt, *Pleiotropic AT1 receptor signaling pathways mediating physiological and pathogenic actions of angiotensin II*. Mol Endocrinol, 2006. **20**(5): p. 953-70.
41. Claing, A., et al., *Endocytosis of G protein-coupled receptors: roles of G protein-coupled receptor kinases and beta-arrestin proteins*. Prog Neurobiol, 2002. **66**(2): p. 61-79.
42. Saavedra, J.M., et al., *Anti-stress and anti-anxiety effects of centrally acting angiotensin II AT1 receptor antagonists*. Regul Pept, 2005. **128**(3): p. 227-38.
43. Saavedra, J.M., et al., *A centrally acting, anxiolytic angiotensin II AT1 receptor antagonist prevents the isolation stress-induced decrease in cortical CRF1 receptor and benzodiazepine binding*. Neuropsychopharmacology, 2006. **31**(6): p. 1123-34.
44. Saavedra, J.M., J. Benicky, and J. Zhou, *Mechanisms of the Anti-Ischemic Effect of Angiotensin II AT(1) Receptor Antagonists in the Brain*. Cell Mol Neurobiol, 2006. **26**(7-8): p. 1099-111.
45. Paul, M., A. Poyan Mehr, and R. Kreutz, *Physiology of local renin-angiotensin systems*. Physiol Rev, 2006. **86**(3): p. 747-803.
46. Phillips, M.I. and E.M. de Oliveira, *Brain renin angiotensin in disease*. J Mol Med (Berl), 2008. **86**(6): p. 715-22.
47. Bader, M., *Tissue renin-angiotensin-aldosterone systems: Targets for pharmacological therapy*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2010. **50**: p. 439-65.
48. Kakar, S.S., K.K. Riel, and J.D. Neill, *Differential expression of angiotensin II receptor subtype mRNAs (AT-1A and AT-1B) in the brain*. Biochem Biophys Res Commun, 1992. **185**(2): p. 688-92.
49. Mendelsohn, F.A., et al., *Autoradiographic localization of angiotensin II receptors in rat brain*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1984. **81**(5): p. 1575-9.
50. Jugdutt, B.I., *Valsartan in the treatment of heart attack survivors*. Vasc Health Risk Manag, 2006. **2**(2): p. 125-38.
51. Seltzer, A., et al., *Oral administration of an AT1 receptor antagonist prevents the central effects of angiotensin II in spontaneously hypertensive rats*. Brain Res, 2004. **1028**(1): p. 9-18.
52. Vauquelin, G., F. Fierens, and I. Van Liefde, *Long-lasting angiotensin type 1 receptor binding and protection by candesartan: comparison with other biphenyl-tetrazole sartans*. J Hypertens Suppl, 2006. **24**(1): p. S23-30.
53. Ferguson, A.V. and N.W. Kasting, *Angiotensin acts at the subfornical organ to increase plasma oxytocin concentrations in the rat*. Regul Pept, 1988. **23**(3): p. 343-52.
54. Ferguson, A.V., D.L. Washburn, and K.J. Latchford, *Hormonal and neurotransmitter roles for angiotensin in the regulation of central autonomic function*. Exp Biol Med (Maywood), 2001. **226**(2): p. 85-96.
55. Ferguson, A.V. and J.S. Bains, *Actions of angiotensin in the subfornical organ and area postrema: implications for long term control of autonomic output*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 1997. **24**(1): p. 96-101.
56. Zhuo, J., et al., *Mapping tissue angiotensin-converting enzyme and angiotensin AT1, AT2 and AT4 receptors*. J Hypertens, 1998. **16**(12 Pt 2): p. 2027-37.
57. McKinley, M.J., et al., *The brain renin-angiotensin system: location and physiological roles*. Int J Biochem Cell Biol, 2003. **35**(6): p. 901-18.
58. Llorens-Cortes, C. and F.A. Mendelsohn, *Organisation and functional role of the brain angiotensin system*. J Renin Angiotensin Aldosterone Syst, 2002. **3** **Suppl 1**: p. S39-48.

59. Antunes-Rodrigues, J., et al., *Neuroendocrine control of body fluid metabolism*. *Physiol Rev*, 2004. **84**(1): p. 169-208.
60. Stornetta, R.L., et al., *Astrocytes synthesize angiotensinogen in brain*. *Science*, 1988. **242**(4884): p. 1444-6.
61. Richoux, J.P., et al., *The renin-angiotensin system in the rat brain. Immunocytochemical localization of angiotensinogen in glial cells and neurons*. *Histochemistry*, 1988. **89**(4): p. 323-31.
62. Ohkubo, H., et al., *Tissue distribution of rat angiotensinogen mRNA and structural analysis of its heterogeneity*. *J Biol Chem*, 1986. **261**(1): p. 319-23.
63. Yang, G., et al., *The angiotensinogen gene is expressed in both astrocytes and neurons in murine central nervous system*. *Brain Res*, 1999. **817**(1-2): p. 123-31.
64. Ganong, W.F., *The brain renin-angiotensin system*. *Annu Rev Physiol*, 1984. **46**: p. 17-31.
65. Moffett, R.B., F.M. Bumpus, and A. Husain, *Cellular organization of the brain renin-angiotensin system*. *Life Sci*, 1987. **41**(16): p. 1867-79.
66. Morimoto, S., M.D. Cassell, and C.D. Sigmund, *The brain renin-angiotensin system in transgenic mice carrying a highly regulated human renin transgene*. *Circ Res*, 2002. **90**(1): p. 80-6.
67. Rix, E., et al., *Converting-enzyme in the choroid plexus, brain, and kidney: immunocytochemical and biochemical studies in rats*. *Neurosci Lett*, 1981. **22**(2): p. 125-30.
68. Beckmann, H., J.M. Saavedra, and W.F. Gattaz, *Low angiotensin-converting enzyme activity (kininase II) in cerebrospinal fluid of schizophrenics*. *Biol Psychiatry*, 1984. **19**(5): p. 679-84.
69. Caldwell, P.R., et al., *Angiotensin-converting enzyme: vascular endothelial localization*. *Science*, 1976. **191**(4231): p. 1050-1.
70. Mendelsohn, F.A., et al., *The brain angiotensin system: insights from mapping its components*. *Trends Endocrinol Metab*, 1990. **1**(4): p. 189-98.
71. Pickel, V.M., J. Chan, and D. Ganten, *Dual peroxidase and colloidal gold-labeling study of angiotensin converting enzyme and angiotensin-like immunoreactivity in the rat subfornical organ*. *J Neurosci*, 1986. **6**(8): p. 2457-69.
72. Tipnis, S.R., et al., *A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(43): p. 33238-43.
73. Feng, Y., et al., *Angiotensin-converting enzyme 2 overexpression in the subfornical organ prevents the angiotensin II-mediated pressor and drinking responses and is associated with angiotensin II type 1 receptor downregulation*. *Circ Res*, 2008. **102**(6): p. 729-36.
74. Feng, Y., et al., *Angiotensin-converting enzyme 2 over-expression in the central nervous system reduces angiotensin-II-mediated cardiac hypertrophy*. *PLoS One*, 2012. **7**(11): p. e48910.
75. Lind, R.W., L.W. Swanson, and D. Ganten, *Organization of angiotensin II immunoreactive cells and fibers in the rat central nervous system. An immunohistochemical study*. *Neuroendocrinology*, 1985. **40**(1): p. 2-24.
76. Sumners, C., et al., *Physiological and pharmacological comparisons of angiotensin II receptors in neuronal and astrocyte glial cultures*. *Prog Neurobiol*, 1990. **34**(5): p. 355-85.
77. Simonnet, G., et al., *Location of angiotensin II binding sites on neuronal and glial cells of cultured mouse spinal cord: an autoradiographic study*. *Brain Res*, 1988. **443**(1-2): p. 403-6.

78. Fogarty, D.J. and C. Matute, *Angiotensin receptor-like immunoreactivity in adult brain white matter astrocytes and oligodendrocytes*. *Glia*, 2001. **35**(2): p. 131-46.
79. Hall, J.E. and M.W. Brands, *The renin-angiotensin-aldosterone systems*, in *The Kidney: Physiology and Pathophysiology*, D.W.y.G. Seldin, G., Editor. 2000, Lippincott Williams & Wilkins.
80. Weiss, M.L., K.E. Moe, and A.N. Epstein, *Interference with central actions of angiotensin II suppresses sodium appetite*. *Am J Physiol*, 1986. **250**(2 Pt 2): p. R250-9.
81. Muntzel, M., et al., *Selective effects of sodium and chloride depletion on salt appetite in rats*. *Am J Physiol*, 1991. **261**(3 Pt 2): p. R603-8.
82. Epstein, A.N., *The dependence of the salt appetite of the rat on the hormonal consequences of sodium deficiency*. *J Physiol (Paris)*, 1984. **79**(6): p. 496-8.
83. Unger, T., et al., *Natriuretic action of central angiotensin II in conscious rats*. *Brain Res*, 1989. **486**(1): p. 33-8.
84. Phillips, M.I., *Functions of angiotensin in the central nervous system*. *Annu Rev Physiol*, 1987. **49**: p. 413-35.
85. Fluharty, S.J. and A.N. Epstein, *Sodium appetite elicited by intracerebroventricular infusion of angiotensin II in the rat: II. Synergistic interaction with systemic mineralocorticoids*. *Behav Neurosci*, 1983. **97**(5): p. 746-58.
86. Fluharty, S.J. and S. Manaker, *Sodium appetite elicited by intracerebroventricular infusion of angiotensin II in the rat: I. Relation to urinary sodium excretion*. *Behav Neurosci*, 1983. **97**(5): p. 738-45.
87. Ray, P.E., et al., *Different effects of sodium or chloride depletion on angiotensin II receptors in rats*. *Am J Physiol*, 1990. **258**(4 Pt 2): p. R1008-15.
88. Ray, P.E., E.J. Ruley, and J.M. Saavedra, *Down-regulation of angiotensin II receptors in subfornical organ of young male rats by chronic dietary sodium depletion*. *Brain Res*, 1990. **510**(2): p. 303-8.
89. Mann, J.F., et al., *Central actions and brain receptor binding of angiotensin II: Influence of sodium intake*. *Hypertension*, 1980. **2**(4): p. 437-43.
90. Meldrum, M.J. and T.C. Westfall, *Angiotensin facilitation of 3H-norepinephrine release in central tissue of spontaneously hypertensive rats but not in Wistar-Kyoto rats: effects of sodium depletion*. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1986. **8**(3): p. 582-7.
91. Gutkind, J.S., M. Kurihara, and J.M. Saavedra, *Increased angiotensin II receptors in brain nuclei of DOCA-salt hypertensive rats*. *Am J Physiol*, 1988. **255**(3 Pt 2): p. H646-50.
92. McKinley, M.J., et al., *Effects of central losartan on plasma renin and centrally mediated natriuresis*. *Kidney Int*, 1994. **46**(6): p. 1479-82.
93. Weekley, L.B., *Renal renin secretion rate and norepinephrine secretion rate in response to centrally administered angiotensin-II: role of the medial basal forebrain*. *Clin Exp Hypertens A*, 1992. **14**(5): p. 923-45.
94. Allen, A.M., et al., *Angiotensin II receptors in the human brain*. *Regul Pept*, 1999. **79**(1): p. 1-7.
95. Barnes, J.M., et al., *Identification and characterisation of angiotensin II receptor subtypes in human brain*. *Eur J Pharmacol*, 1993. **230**(3): p. 251-8.
96. Tsutsumi, K. and J.M. Saavedra, *Characterization and development of angiotensin II receptor subtypes (AT1 and AT2) in rat brain*. *Am J Physiol*, 1991. **261**(1 Pt 2): p. R209-16.
97. Johren, O., T. Inagami, and J.M. Saavedra, *AT1A, AT1B, and AT2 angiotensin II receptor subtype gene expression in rat brain*. *Neuroreport*, 1995. **6**(18): p. 2549-52.

98. Johren, O., T. Inagami, and J.M. Saavedra, *Localization of AT2 angiotensin II receptor gene expression in rat brain by in situ hybridization histochemistry*. Brain Res Mol Brain Res, 1996. **37**(1-2): p. 192-200.
99. Johren, O. and J.M. Saavedra, *Gene expression of angiotensin II receptor subtypes in the cerebellar cortex of young rats*. Neuroreport, 1996. **7**(8): p. 1349-52.
100. Gard, P.R., *The role of angiotensin II in cognition and behaviour*. Eur J Pharmacol, 2002. **438**(1-2): p. 1-14.
101. Wright, J.W. and J.W. Harding, *Brain renin-angiotensin--a new look at an old system*. Prog Neurobiol, 2011. **95**(1): p. 49-67.
102. Tchekalarova, J., et al., *The effects of sarmesin, an Angiotensin II analogue on seizure susceptibility, memory retention and nociception*. Regul Pept, 2003. **111**(1-3): p. 191-7.
103. Pederson, E.S., J.W. Harding, and J.W. Wright, *Attenuation of scopolamine-induced spatial learning impairments by an angiotensin IV analog*. Regul Pept, 1998. **74**(2-3): p. 97-103.
104. Tota, S., et al., *Effect of angiotensin II on spatial memory, cerebral blood flow, cholinergic neurotransmission, and brain derived neurotrophic factor in rats*. Psychopharmacology (Berl), 2013. **226**(2): p. 357-69.
105. Denny, J.B., et al., *Angiotensin II blocks hippocampal long-term potentiation*. Brain Res, 1991. **567**(2): p. 321-4.
106. Georgiev, V., D. Getova, and M. Opitz, *Mechanisms of the angiotensin II effects on the exploratory behavior of rats in open field. I. Interaction of angiotensin II with saralasin and catecholaminergic drugs*. Methods Find Exp Clin Pharmacol, 1987. **9**(5): p. 297-301.
107. Premer, C., et al., *Immunohistochemical Localization of AT1a, AT1b, and AT2 Angiotensin II Receptor Subtypes in the Rat Adrenal, Pituitary, and Brain with a Perspective Commentary*. Int J Hypertens, 2013. **2013**: p. 175428.
108. Armando, I., et al., *Peripheral administration of an angiotensin II AT(1) receptor antagonist decreases the hypothalamic-pituitary-adrenal response to isolation Stress*. Endocrinology, 2001. **142**(9): p. 3880-9.
109. Baiardi, G., et al., *Angiotensin II AT1 receptor blockade prolongs the lifespan of spontaneously hypertensive rats and reduces stress-induced release of catecholamines, glucocorticoids, and vasopressin*. Ann N Y Acad Sci, 2004. **1018**: p. 131-6.
110. Jezova, D., et al., *Brain angiotensin II modulates sympathoadrenal and hypothalamic pituitary adrenocortical activation during stress*. J Neuroendocrinol, 1998. **10**(1): p. 67-72.
111. Armando, I., et al., *Angiotensin II AT1 receptor blockade prevents the hypothalamic corticotropin-releasing factor response to isolation stress*. Brain Res, 2007. **1142**: p. 92-9.
112. Tsutsumi, K. and J.M. Saavedra, *Angiotensin-II receptor subtypes in median eminence and basal forebrain areas involved in regulation of pituitary function*. Endocrinology, 1991. **129**(6): p. 3001-8.
113. Yang, G., Y. Wan, and Y. Zhu, *Angiotensin II--an important stress hormone*. Biol Signals, 1996. **5**(1): p. 1-8.
114. Yang, G., et al., *Changes in circulating and tissue angiotensin II during acute and chronic stress*. Biol Signals, 1993. **2**(3): p. 166-72.
115. Castren, E. and J.M. Saavedra, *Repeated stress increases the density of angiotensin II binding sites in rat paraventricular nucleus and subfornical organ*. Endocrinology, 1988. **122**(1): p. 370-2.

116. Shigematsu, K., et al., *Angiotensin II binding sites in the anteroventral-third ventricle (AV3V) area and related structures of the rat brain*. *Neurosci Lett*, 1986. **67**(1): p. 37-41.
117. Aguilera, G., A. Kiss, and X. Luo, *Increased expression of type I angiotensin II receptors in the hypothalamic paraventricular nucleus following stress and glucocorticoid administration*. *J Neuroendocrinol*, 1995. **7**(10): p. 775-83.
118. Ganong, W.F. and K. Murakami, *The role of angiotensin II in the regulation of ACTH secretion*. *Ann N Y Acad Sci*, 1987. **512**: p. 176-86.
119. Bregonzio, C., et al., *Angiotensin II AT(1) receptor blockade selectively enhances brain AT(2) receptor expression, and abolishes the cold-restraint stress-induced increase in tyrosine hydroxylase mRNA in the locus coeruleus of spontaneously hypertensive rats*. *Stress*, 2008. **11**(6): p. 457-66.
120. Okuyama, S., et al., *Anxiety-like behavior in mice lacking the angiotensin II type-2 receptor*. *Brain Res*, 1999. **821**(1): p. 150-9.
121. Pavel, J., et al., *Peripherally administered angiotensin II AT1 receptor antagonists are anti-stress compounds in vivo*. *Ann N Y Acad Sci*, 2008. **1148**: p. 360-6.
122. Bremner, J.D., et al., *Decreased benzodiazepine receptor binding in prefrontal cortex in combat-related posttraumatic stress disorder*. *Am J Psychiatry*, 2000. **157**(7): p. 1120-6.
123. Keck, M.E. and F. Holsboer, *Hyperactivity of CRH neuronal circuits as a target for therapeutic interventions in affective disorders*. *Peptides*, 2001. **22**(5): p. 835-44.
124. Barnes, N.M., et al., *Anxiolytic-like action of DuP753, a non-peptide angiotensin II receptor antagonist*. *Neuroreport*, 1990. **1**(1): p. 20-1.
125. Kaiser, F.C., et al., *Antianxiety properties of the angiotensin II antagonist, DUP 753, in the rat using the elevated plus-maze*. *Neuroreport*, 1992. **3**(10): p. 922-4.
126. Korte, S.M. and S.F. De Boer, *A robust animal model of state anxiety: fear-potentiated behaviour in the elevated plus-maze*. *Eur J Pharmacol*, 2003. **463**(1-3): p. 163-75.
127. Millan, M.J., et al., *Anxiolytic properties of the selective, non-peptidergic CRF(1) antagonists, CP154,526 and DMP695: a comparison to other classes of anxiolytic agent*. *Neuropsychopharmacology*, 2001. **25**(4): p. 585-600.
128. Shekhar, A., et al., *The amygdala, panic disorder, and cardiovascular responses*. *Ann N Y Acad Sci*, 2003. **985**: p. 308-25.
129. Goeders, N.E., *Stress and cocaine addiction*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2002. **301**(3): p. 785-9.
130. Rouge-Pont, F., et al., *Stress-induced sensitization and glucocorticoids. II. Sensitization of the increase in extracellular dopamine induced by cocaine depends on stress-induced corticosterone secretion*. *J Neurosci*, 1995. **15**(11): p. 7189-95.
131. Piazza, P.V. and M. Le Moal, *The role of stress in drug self-administration*. *Trends Pharmacol Sci*, 1998. **19**(2): p. 67-74.
132. Piazza, P.V., et al., *Stress, glucocorticoids, and mesencephalic dopaminergic neurons: a pathophysiological chain determining vulnerability to psychostimulant abuse*. *NIDA Res Monogr*, 1996. **163**: p. 277-99.
133. Dole, V.P. and M.E. Nyswander, *Rehabilitation of heroin addicts after blockade with methadone*. *N Y State J Med*, 1966. **66**(15): p. 2011-7.
134. Kreek, M.J., *Effects of opiates, opioid antagonists and cocaine on the endogenous opioid system: clinical and laboratory studies*. *NIDA Res Monogr*, 1992. **119**: p. 44-8.
135. Kreek, M.J. and G.F. Koob, *Drug dependence: stress and dysregulation of brain reward pathways*. *Drug Alcohol Depend*, 1998. **51**(1-2): p. 23-47.

136. Piazza, P.V., et al., *Corticosterone in the range of stress-induced levels possesses reinforcing properties: implications for sensation-seeking behaviors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(24): p. 11738-42.
137. Goeders, N.E., *Stress, the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, and vulnerability to drug abuse*. NIDA Res Monogr, 1998. **169**: p. 83-104.
138. Vanderschuren, L.J., et al., *A single exposure to amphetamine is sufficient to induce long-term behavioral, neuroendocrine, and neurochemical sensitization in rats*. J Neurosci, 1999. **19**(21): p. 9579-86.
139. Pierce, R.C. and P.W. Kalivas, *A circuitry model of the expression of behavioral sensitization to amphetamine-like psychostimulants*. Brain Res Brain Res Rev, 1997. **25**(2): p. 192-216.
140. Vanderschuren, L.J. and P.W. Kalivas, *Alterations in dopaminergic and glutamatergic transmission in the induction and expression of behavioral sensitization: a critical review of preclinical studies*. Psychopharmacology (Berl), 2000. **151**(2-3): p. 99-120.
141. Abercrombie, E.D., et al., *Differential effect of stress on in vivo dopamine release in striatum, nucleus accumbens, and medial frontal cortex*. J Neurochem, 1989. **52**(5): p. 1655-8.
142. Imperato, A., et al., *Repeated stressful experiences differently affect limbic dopamine release during and following stress*. Brain Res, 1992. **577**(2): p. 194-9.
143. Berridge, K.C. and T.E. Robinson, *What is the role of dopamine in reward: hedonic impact, reward learning, or incentive salience?* Brain Res Brain Res Rev, 1998. **28**(3): p. 309-69.
144. Ikemoto, S. and J. Panksepp, *The role of nucleus accumbens dopamine in motivated behavior: a unifying interpretation with special reference to reward-seeking*. Brain Res Brain Res Rev, 1999. **31**(1): p. 6-41.
145. Lorrain, D.S., G.M. Arnold, and P. Vezina, *Previous exposure to amphetamine increases incentive to obtain the drug: long-lasting effects revealed by the progressive ratio schedule*. Behav Brain Res, 2000. **107**(1-2): p. 9-19.
146. Di Chiara, G. and A. Imperato, *Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(14): p. 5274-8.
147. Georgiev, V., et al., *Some central effects of angiotensin II. Interactions with dopaminergic transmission*. Acta Physiol Pharmacol Bulg, 1985. **11**(4): p. 19-26.
148. Huang, B.S. and R.L. Malvin, *Dopaminergic modulation of some central actions of angiotensin II in vivo*. Proc Soc Exp Biol Med, 1988. **188**(4): p. 405-9.
149. Tchekalarova, J. and V. Georgiev, *Further evidence for interaction between angiotensin II and dopamine receptors (experiments on apomorphine stereotypy)*. Methods Find Exp Clin Pharmacol, 1998. **20**(5): p. 419-24.
150. Daubert, D.L., et al., *Changes in angiotensin II receptors in dopamine-rich regions of the mouse brain with age and ethanol consumption*. Brain Res, 1999. **816**(1): p. 8-16.
151. White, F.J. and P.W. Kalivas, *Neuroadaptations involved in amphetamine and cocaine addiction*. Drug Alcohol Depend, 1998. **51**(1-2): p. 141-53.
152. Brown, D.C., et al., *Ability of angiotensin II to modulate striatal dopamine release via the AT1 receptor in vitro and in vivo*. Br J Pharmacol, 1996. **118**(2): p. 414-20.
153. Hoebel, B.G., et al., *The power of integrative peptides to reinforce behavior by releasing dopamine*. Ann N Y Acad Sci, 1994. **739**: p. 36-41.

154. Raghavendra, V., K. Chopra, and S.K. Kulkarni, *Modulation of motor functions involving the dopaminergic system by AT1 receptor antagonist, losartan*. *Neuropeptides*, 1998. **32**(3): p. 275-80.
155. Kalivas, P.W., *Cocaine and amphetamine-like psychostimulants: neurocircuitry and glutamate neuroplasticity*. *Dialogues Clin Neurosci*, 2007. **9**(4): p. 389-97.
156. Robinson, T.E. and B. Kolb, *Structural plasticity associated with exposure to drugs of abuse*. *Neuropharmacology*, 2004. **47 Suppl 1**: p. 33-46.
157. Soetens, E., R. D'Hooge, and J.E. Hueting, *Amphetamine enhances human-memory consolidation*. *Neurosci Lett*, 1993. **161**(1): p. 9-12.
158. Wood, S.C. and S.G. Anagnostaras, *Memory and psychostimulants: modulation of Pavlovian fear conditioning by amphetamine in C57BL/6 mice*. *Psychopharmacology (Berl)*, 2009. **202**(1-3): p. 197-206.
159. Xue, B., et al., *Sensitization of slow pressor angiotensin II (Ang II)-initiated hypertension: induction of sensitization by prior Ang II treatment*. *Hypertension*, 2012. **59**(2): p. 459-66.
160. Na, E.S., et al., *The neural substrates of enhanced salt appetite after repeated sodium depletions*. *Brain Res*, 2007. **1171**: p. 104-10.
161. Clark, J.J. and I.L. Bernstein, *Reciprocal cross-sensitization between amphetamine and salt appetite*. *Pharmacol Biochem Behav*, 2004. **78**(4): p. 691-8.
162. Roitman, M.F., et al., *Induction of a salt appetite alters dendritic morphology in nucleus accumbens and sensitizes rats to amphetamine*. *J Neurosci*, 2002. **22**(11): p. RC225.
163. Na, E.S., M.J. Morris, and A.K. Johnson, *Behavioral cross-sensitization between morphine-induced locomotion and sodium depletion-induced salt appetite*. *Pharmacol Biochem Behav*, 2009. **93**(4): p. 368-74.
164. Acerbo, M.J. and A.K. Johnson, *Behavioral cross-sensitization between DOCA-induced sodium appetite and cocaine-induced locomotor behavior*. *Pharmacol Biochem Behav*, 2011. **98**(3): p. 440-8.
165. Valjent, E., et al., *Mechanisms of locomotor sensitization to drugs of abuse in a two-injection protocol*. *Neuropsychopharmacology*, 2010. **35**(2): p. 401-15.
166. Paz, M.C., et al., *The AT(1) angiotensin II receptor blockade attenuates the development of amphetamine-induced behavioral sensitization in a two-injection protocol*. *Synapse*, 2011. **65**(6): p. 505-12.
167. Paz, M.C., et al., *Angiotensin II AT(1) receptors are involved in neuronal activation induced by amphetamine in a two-injection protocol*. *Biomed Res Int*, 2013. **2013**: p. 534817.
168. Gelband, C.H., et al., *Angiotensin receptors and norepinephrine neuromodulation: implications of functional coupling*. *Regul Pept*, 1998. **73**(3): p. 141-7.
169. Nahmod, V.E., et al., *Angiotensin regulates release and synthesis of serotonin in brain*. *Science*, 1978. **202**(4372): p. 1091-3.
170. Barnes, K.L., D.M. DeWeese, and M.C. Andresen, *Angiotensin potentiates excitatory sensory synaptic transmission to medial solitary tract nucleus neurons*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2003. **284**(5): p. R1340-53.
171. Oz, M., et al., *Presynaptic angiotensin II AT1 receptors enhance inhibitory and excitatory synaptic neurotransmission to motoneurons and other ventral horn neurons in neonatal rat spinal cord*. *J Neurophysiol*, 2005. **94**(2): p. 1405-12.
172. Sachinidis, A., et al., *Angiotensin II induces formation of the early growth response gene-1 protein in rat vascular smooth muscle cells*. *FEBS Lett*, 1992. **313**(2): p. 109-12.

173. Puri, P.L., et al., *Reactive oxygen intermediates mediate angiotensin II-induced c-Jun.c-Fos heterodimer DNA binding activity and proliferative hypertrophic responses in myogenic cells.* J Biol Chem, 1995. **270**(38): p. 22129-34.
174. Marrero, M.B., et al., *Direct stimulation of Jak/STAT pathway by the angiotensin II AT1 receptor.* Nature, 1995. **375**(6528): p. 247-50.
175. MacKenzie, A., *Endothelium-derived vasoactive agents, AT1 receptors and inflammation.* Pharmacol Ther, 2011. **131**(2): p. 187-203.
176. Faraci, F.M., *Protecting against vascular disease in brain.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2011. **300**(5): p. H1566-82.
177. Alvarez, A., et al., *Direct evidence of leukocyte adhesion in arterioles by angiotensin II.* Blood, 2004. **104**(2): p. 402-8.
178. Benicky, J., et al., *Angiotensin II AT1 receptor blockade ameliorates brain inflammation.* Neuropsychopharmacology, 2011. **36**(4): p. 857-70.
179. Didion, S.P., et al., *Endogenous interleukin-10 inhibits angiotensin II-induced vascular dysfunction.* Hypertension, 2009. **54**(3): p. 619-24.
180. Kang, Y.M., et al., *Brain nuclear factor-kappa B activation contributes to neurohumoral excitation in angiotensin II-induced hypertension.* Cardiovasc Res, 2009. **82**(3): p. 503-12.
181. Shi, P., et al., *Brain microglial cytokines in neurogenic hypertension.* Hypertension, 2010. **56**(2): p. 297-303.
182. Sriramula, S., J.P. Cardinale, and J. Francis, *Inhibition of TNF in the brain reverses alterations in RAS components and attenuates angiotensin II-induced hypertension.* PLoS One, 2013. **8**(5): p. e63847.
183. Zubcevic, J., et al., *Autonomic-immune-vascular interaction: an emerging concept for neurogenic hypertension.* Hypertension, 2011. **57**(6): p. 1026-33.
184. Sriramula, S., et al., *ACE2 overexpression in the paraventricular nucleus attenuates angiotensin II-induced hypertension.* Cardiovasc Res, 2011. **92**(3): p. 401-8.
185. Zhou, J., et al., *Angiotensin II AT1 receptor blockade abolishes brain microvascular inflammation and heat shock protein responses in hypertensive rats.* J Cereb Blood Flow Metab, 2005. **25**(7): p. 878-86.
186. Amrani, Y., A.J. Ammit, and R.A. Panettieri, Jr., *Tumor necrosis factor receptor (TNFR) 1, but not TNFR2, mediates tumor necrosis factor-alpha-induced interleukin-6 and RANTES in human airway smooth muscle cells: role of p38 and p42/44 mitogen-activated protein kinases.* Mol Pharmacol, 2001. **60**(4): p. 646-55.
187. Baud, V. and M. Karin, *Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives.* Trends Cell Biol, 2001. **11**(9): p. 372-7.
188. Heinrich, P.C., et al., *Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation.* Biochem J, 2003. **374**(Pt 1): p. 1-20.
189. Beyaert, R., et al., *The p38/RK mitogen-activated protein kinase pathway regulates interleukin-6 synthesis response to tumor necrosis factor.* EMBO J, 1996. **15**(8): p. 1914-23.
190. Sparacio, S.M., et al., *Cytokine regulation of interleukin-6 gene expression in astrocytes involves activation of an NF-kappa B-like nuclear protein.* J Neuroimmunol, 1992. **39**(3): p. 231-42.
191. Ihle, J.N., *STATs: signal transducers and activators of transcription.* Cell, 1996. **84**(3): p. 331-4.
192. Penkowa, M., et al., *Impaired inflammatory response and increased oxidative stress and neurodegeneration after brain injury in interleukin-6-deficient mice.* Glia, 2000. **32**(3): p. 271-85.

193. Pizzi, M., et al., *Prevention of neuron and oligodendrocyte degeneration by interleukin-6 (IL-6) and IL-6 receptor/IL-6 fusion protein in organotypic hippocampal slices*. Mol Cell Neurosci, 2004. **25**(2): p. 301-11.
194. Quintanilla, R.A., et al., *Interleukin-6 induces Alzheimer-type phosphorylation of tau protein by deregulating the cdk5/p35 pathway*. Exp Cell Res, 2004. **295**(1): p. 245-57.
195. Xu, Q., et al., *Vasopressin-induced heat shock protein expression in renal tubular cells*. Lab Invest, 1996. **74**(1): p. 178-87.
196. Pockley, A.G., et al., *Serum heat shock protein 70 levels predict the development of atherosclerosis in subjects with established hypertension*. Hypertension, 2003. **42**(3): p. 235-8.
197. Wallin, R.P., et al., *Heat-shock proteins as activators of the innate immune system*. Trends Immunol, 2002. **23**(3): p. 130-5.
198. Gil Lorenzo, A.F., et al., *Hsp70 regulation on Nox4/p22phox and cytoskeletal integrity as an effect of losartan in vascular smooth muscle cells*. Cell Stress Chaperones, 2014. **19**(1): p. 115-34.
199. Asea, A., et al., *HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine*. Nat Med, 2000. **6**(4): p. 435-42.
200. Ishizaka, N., et al., *Regulation and localization of HSP70 and HSP25 in the kidney of rats undergoing long-term administration of angiotensin II*. Hypertension, 2002. **39**(1): p. 122-8.
201. Patton, W.F., et al., *Components of the protein synthesis and folding machinery are induced in vascular smooth muscle cells by hypertrophic and hyperplastic agents. Identification by comparative protein phenotyping and microsequencing*. J Biol Chem, 1995. **270**(36): p. 21404-10.
202. Lanz, T.V., et al., *Angiotensin II sustains brain inflammation in mice via TGF-beta*. J Clin Invest, 2010. **120**(8): p. 2782-94.
203. Negro, R., *Endothelial effects of antihypertensive treatment: focus on irbesartan*. Vasc Health Risk Manag, 2008. **4**(1): p. 89-101.
204. Tota, S., et al., *Candesartan improves memory decline in mice: involvement of AT1 receptors in memory deficit induced by intracerebral streptozotocin*. Behav Brain Res, 2009. **199**(2): p. 235-40.
205. Dantzer, R., *Cytokine, sickness behavior, and depression*. Immunol Allergy Clin North Am, 2009. **29**(2): p. 247-64.
206. Dantzer, R., et al., *Identification and treatment of symptoms associated with inflammation in medically ill patients*. Psychoneuroendocrinology, 2008. **33**(1): p. 18-29.
207. Tansey, M.G. and M.S. Goldberg, *Neuroinflammation in Parkinson's disease: its role in neuronal death and implications for therapeutic intervention*. Neurobiol Dis, 2010. **37**(3): p. 510-8.
208. Coelho-Santos, V., et al., *Prevention of methamphetamine-induced microglial cell death by TNF-alpha and IL-6 through activation of the JAK-STAT pathway*. J Neuroinflammation, 2012. **9**: p. 103.
209. Goncalves, J., et al., *Methamphetamine-induced neuroinflammation and neuronal dysfunction in the mice hippocampus: preventive effect of indomethacin*. Eur J Neurosci, 2010. **31**(2): p. 315-26.
210. Goncalves, J., et al., *Methamphetamine-induced early increase of IL-6 and TNF-alpha mRNA expression in the mouse brain*. Ann N Y Acad Sci, 2008. **1139**: p. 103-11.

211. LaVoie, M.J., J.P. Card, and T.G. Hastings, *Microglial activation precedes dopamine terminal pathology in methamphetamine-induced neurotoxicity*. Exp Neurol, 2004. **187**(1): p. 47-57.
212. Loftis, J.M., et al., *Methamphetamine causes persistent immune dysregulation: a cross-species, translational report*. Neurotox Res, 2011. **20**(1): p. 59-68.
213. Silva, A.P., et al., *Brain injury associated with widely abused amphetamines: neuroinflammation, neurogenesis and blood-brain barrier*. Curr Drug Abuse Rev, 2010. **3**(4): p. 239-54.
214. Narita, M., et al., *Implication of activated astrocytes in the development of drug dependence: differences between methamphetamine and morphine*. Ann N Y Acad Sci, 2008. **1141**: p. 96-104.
215. Bowyer, J.F. and S. Ali, *High doses of methamphetamine that cause disruption of the blood-brain barrier in limbic regions produce extensive neuronal degeneration in mouse hippocampus*. Synapse, 2006. **60**(7): p. 521-32.
216. Miyazaki, I. and M. Asanuma, *Approaches to prevent dopamine quinone-induced neurotoxicity*. Neurochem Res, 2009. **34**(4): p. 698-706.
217. Yamamoto, B.K. and J. Raudensky, *The role of oxidative stress, metabolic compromise, and inflammation in neuronal injury produced by amphetamine-related drugs of abuse*. J Neuroimmune Pharmacol, 2008. **3**(4): p. 203-17.
218. Yamamoto, B.K., A. Moszczynska, and G.A. Gudelsky, *Amphetamine toxicities: classical and emerging mechanisms*. Ann N Y Acad Sci, 2010. **1187**: p. 101-21.
219. Kuhn, D.M., D.M. Francescutti-Verbeem, and D.M. Thomas, *Dopamine quinones activate microglia and induce a neurotoxic gene expression profile: relationship to methamphetamine-induced nerve ending damage*. Ann N Y Acad Sci, 2006. **1074**: p. 31-41.
220. Poon, H.F., et al., *Cocaine-induced oxidative stress precedes cell death in human neuronal progenitor cells*. Neurochem Int, 2007. **50**(1): p. 69-73.
221. Cunha-Oliveira, T., A.C. Rego, and C.R. Oliveira, *Cellular and molecular mechanisms involved in the neurotoxicity of opioid and psychostimulant drugs*. Brain Res Rev, 2008. **58**(1): p. 192-208.
222. Buttner, A., *Review: The neuropathology of drug abuse*. Neuropathol Appl Neurobiol, 2011. **37**(2): p. 118-34.
223. Fredericks, R.K., et al., *Cerebral vasculitis associated with cocaine abuse*. Stroke, 1991. **22**(11): p. 1437-9.
224. Broadley, K.J., *The vascular effects of trace amines and amphetamines*. Pharmacol Ther, 2010. **125**(3): p. 363-75.
225. Buxton, N. and N.S. McConachie, *Amphetamine abuse and intracranial haemorrhage*. J R Soc Med, 2000. **93**(9): p. 472-7.
226. Harrington, H., et al., *Intracerebral hemorrhage and oral amphetamine*. Arch Neurol, 1983. **40**(8): p. 503-7.
227. Lee, Y.W., et al., *Methamphetamine induces AP-1 and NF-kappaB binding and transactivation in human brain endothelial cells*. J Neurosci Res, 2001. **66**(4): p. 583-91.
228. Barnes, J.M., et al., *Angiotensin II inhibits the release of [3H]acetylcholine from rat entorhinal cortex in vitro*. Brain Res, 1989. **491**(1): p. 136-43.
229. Tedesco, M.A., et al., *Comparison of losartan and hydrochlorothiazide on cognitive function and quality of life in hypertensive patients*. Am J Hypertens, 1999. **12**(11 Pt 1): p. 1130-4.
230. Braszko, J.J., et al., *Captopril and enalapril improve cognition and depressed mood in hypertensive patients*. J Basic Clin Physiol Pharmacol, 2003. **14**(4): p. 323-43.

231. Tedesco, M.A., et al., *Does the angiotensin II receptor antagonist losartan improve cognitive function?* *Drugs Aging*, 2002. **19**(10): p. 723-32.
232. Jenkins, T.A. and S.Y. Chai, *Effect of chronic angiotensin converting enzyme inhibition on spatial memory and anxiety-like behaviours in rats.* *Neurobiol Learn Mem*, 2007. **87**(2): p. 218-24.
233. Raghavendra, V., K. Chopra, and S.K. Kulkarni, *Comparative studies on the memory-enhancing actions of captopril and losartan in mice using inhibitory shock avoidance paradigm.* *Neuropeptides*, 2001. **35**(1): p. 65-9.
234. Kovacs, K.J., *c-Fos as a transcription factor: a stressful (re)view from a functional map.* *Neurochem Int*, 1998. **33**(4): p. 287-97.
235. Hughes, P., P. Lawlor, and M. Dragunow, *Basal expression of Fos, Fos-related, Jun, and Krox 24 proteins in rat hippocampus.* *Brain Res Mol Brain Res*, 1992. **13**(4): p. 355-7.
236. Dragunow, M., *A role for immediate-early transcription factors in learning and memory.* *Behav Genet*, 1996. **26**(3): p. 293-9.
237. Dragunow, M. and R. Faull, *The use of c-fos as a metabolic marker in neuronal pathway tracing.* *J Neurosci Methods*, 1989. **29**(3): p. 261-5.
238. Rotllant, D., et al., *The brain pattern of c-fos induction by two doses of amphetamine suggests different brain processing pathways and minor contribution of behavioural traits.* *Neuroscience*, 2010. **168**(3): p. 691-705.
239. He, J., K. Yamada, and T. Nabeshima, *A role of Fos expression in the CA3 region of the hippocampus in spatial memory formation in rats.* *Neuropsychopharmacology*, 2002. **26**(2): p. 259-68.
240. Butler, R.K., et al., *Comparison of the activation of somatostatin- and neuropeptide Y-containing neuronal populations of the rat amygdala following two different anxiogenic stressors.* *Exp Neurol*, 2012. **238**(1): p. 52-63.
241. Salome, N., et al., *Neurobiological correlates of high (HAB) versus low anxiety-related behavior (LAB): differential Fos expression in HAB and LAB rats.* *Biol Psychiatry*, 2004. **55**(7): p. 715-23.
242. Silveira, M.C., G. Sandner, and F.G. Graeff, *Induction of Fos immunoreactivity in the brain by exposure to the elevated plus-maze.* *Behav Brain Res*, 1993. **56**(1): p. 115-8.
243. Watanabe, M.A., et al., *Angiotensin II and CRF receptors in the central nucleus of the amygdala mediate hemodynamic response variability to cocaine in conscious rats.* *Brain Res*, 2010. **1309**: p. 53-65.
244. Burghardt, P.R. and M.A. Wilson, *Microinjection of naltrexone into the central, but not the basolateral, amygdala blocks the anxiolytic effects of diazepam in the plus maze.* *Neuropsychopharmacology*, 2006. **31**(6): p. 1227-40.
245. Wilson, M.A. and L. Junor, *The role of amygdalar mu-opioid receptors in anxiety-related responses in two rat models.* *Neuropsychopharmacology*, 2008. **33**(12): p. 2957-68.
246. von Bohlen und Halbach, O. and D. Albrecht, *Visualization of specific angiotensin II binding sites in the rat limbic system.* *Neuropeptides*, 1998. **32**(3): p. 241-5.
247. Gimpl, G. and F. Fahrenholz, *The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation.* *Physiol Rev*, 2001. **81**(2): p. 629-83.
248. Bale, T.L., et al., *CNS region-specific oxytocin receptor expression: importance in regulation of anxiety and sex behavior.* *J Neurosci*, 2001. **21**(7): p. 2546-52.
249. McCarthy, M.M., et al., *An anxiolytic action of oxytocin is enhanced by estrogen in the mouse.* *Physiol Behav*, 1996. **60**(5): p. 1209-15.

250. Neumann, I.D., *Involvement of the brain oxytocin system in stress coping: interactions with the hypothalamo-pituitary-adrenal axis*. Prog Brain Res, 2002. **139**: p. 147-62.
251. Windle, R.J., et al., *Central oxytocin administration reduces stress-induced corticosterone release and anxiety behavior in rats*. Endocrinology, 1997. **138**(7): p. 2829-34.
252. Neumann, I.D., et al., *Brain oxytocin inhibits the (re)activity of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in male rats: involvement of hypothalamic and limbic brain regions*. Regul Pept, 2000. **96**(1-2): p. 31-8.
253. Neumann, I.D., L. Torner, and A. Wigger, *Brain oxytocin: differential inhibition of neuroendocrine stress responses and anxiety-related behaviour in virgin, pregnant and lactating rats*. Neuroscience, 2000. **95**(2): p. 567-75.
254. Neumann, I.D., et al., *Brain oxytocin inhibits basal and stress-induced activity of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in male and female rats: partial action within the paraventricular nucleus*. J Neuroendocrinol, 2000. **12**(3): p. 235-43.
255. Chini, B., et al., *Learning about oxytocin: pharmacologic and behavioral issues*. Biol Psychiatry, 2014. **76**(5): p. 360-6.
256. Tomizawa, K., et al., *Oxytocin improves long-lasting spatial memory during motherhood through MAP kinase cascade*. Nat Neurosci, 2003. **6**(4): p. 384-90.
257. Bate, S., et al., *Intranasal inhalation of oxytocin improves face processing in developmental prosopagnosia*. Cortex, 2014. **50**: p. 55-63.
258. Rimmele, U., et al., *Oxytocin makes a face in memory familiar*. J Neurosci, 2009. **29**(1): p. 38-42.
259. Feifel, D., et al., *Adjunctive intranasal oxytocin improves verbal memory in people with schizophrenia*. Schizophr Res, 2012. **139**(1-3): p. 207-10.
260. Macdonald, K. and D. Feifel, *Oxytocin in schizophrenia: a review of evidence for its therapeutic effects*. Acta Neuropsychiatr, 2012. **24**(3): p. 130-146.
261. Modi, M.E. and L.J. Young, *The oxytocin system in drug discovery for autism: animal models and novel therapeutic strategies*. Horm Behav, 2012. **61**(3): p. 340-50.
262. Morales-Rivera, A., et al., *Anxiolytic effects of oxytocin in cue-induced cocaine seeking behavior in rats*. Psychopharmacology (Berl), 2014. **231**(21): p. 4145-55.
263. Stricker, E.M. and J.G. Verbalis, *Central inhibition of salt appetite by oxytocin in rats*. Regul Pept, 1996. **66**(1-2): p. 83-5.
264. Blackburn, R.E., et al., *Central oxytocin inhibition of angiotensin-induced salt appetite in rats*. Am J Physiol, 1992. **263**(6 Pt 2): p. R1347-53.
265. Lang, R.E., et al., *Angiotensin stimulates oxytocin release*. Life Sci, 1981. **29**(14): p. 1425-8.
266. Haanwinckel, M.A., et al., *Oxytocin mediates atrial natriuretic peptide release and natriuresis after volume expansion in the rat*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(17): p. 7902-6.
267. McCann, S.M., J. Gutkowska, and J. Antunes-Rodrigues, *Neuroendocrine control of body fluid homeostasis*. Braz J Med Biol Res, 2003. **36**(2): p. 165-81.
268. Schoffelmeer, A.N., et al., *Psychostimulant-induced behavioral sensitization depends on nicotinic receptor activation*. J Neurosci, 2002. **22**(8): p. 3269-76.
269. Vanderschuren, L.J., et al., *Lack of cross-sensitization of the locomotor effects of morphine in amphetamine-treated rats*. Neuropsychopharmacology, 1999. **21**(4): p. 550-9.

270. Paz, M.C., 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**: p. 314-23.
271. Zapparoli, A., et al., *Impaired dipsogenic and renal response to repetitive intracerebroventricular angiotensin II (AngII) injections in rats*. J Renin Angiotensin Aldosterone Syst, 2011. **12**(3): p. 161-8.
272. Stewart, J. and A. Badiani, *Tolerance and sensitization to the behavioral effects of drugs*. Behav Pharmacol, 1993. **4**(4): p. 289-312.
273. Paxinos G, W.C., *The Rat Brain in stereotaxic coordinates*. 2009, Oxford: Elsevier.
274. Vento, P.J. and D. Daniels, *Repeated administration of angiotensin II reduces its dipsogenic effect without affecting saline intake*. Exp Physiol, 2010. **95**(6): p. 736-45.
275. Pellow, S., et al., *Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat*. J Neurosci Methods, 1985. **14**(3): p. 149-67.
276. Gonzalez, L.E. and S.E. File, *A five minute experience in the elevated plus-maze alters the state of the benzodiazepine receptor in the dorsal raphe nucleus*. J Neurosci, 1997. **17**(4): p. 1505-11.
277. Rodgers, R.J. and N.J. Johnson, *Behaviorally selective effects of neuroactive steroids on plus-maze anxiety in mice*. Pharmacol Biochem Behav, 1998. **59**(1): p. 221-32.
278. Wall, P.M. and C. Messier, *Methodological and conceptual issues in the use of the elevated plus-maze as a psychological measurement instrument of animal anxiety-like behavior*. Neurosci Biobehav Rev, 2001. **25**(3): p. 275-86.
279. Montgomery, K.C., *The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior*. J Comp Physiol Psychol, 1955. **48**(4): p. 254-60.
280. Baiardi, G., et al., *Glutamatergic ionotropic blockade within accumbens disrupts working memory and might alter the endocytic machinery in rat accumbens and prefrontal cortex*. J Neural Transm, 2007. **114**(12): p. 1519-28.
281. Nirogi, R., et al., *A simple and rapid method to collect the cerebrospinal fluid of rats and its application for the assessment of drug penetration into the central nervous system*. J Neurosci Methods, 2009. **178**(1): p. 116-9.
282. Yamakawa, H., et al., *Normalization of endothelial and inducible nitric oxide synthase expression in brain microvessels of spontaneously hypertensive rats by angiotensin II AT1 receptor inhibition*. J Cereb Blood Flow Metab, 2003. **23**(3): p. 371-80.
283. Ohkawa, H., N. Ohishi, and K. Yagi, *Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction*. Anal Biochem, 1979. **95**(2): p. 351-8.
284. Janero, D.R., *Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury*. Free Radic Biol Med, 1990. **9**(6): p. 515-40.
285. Lazzarino, G., et al., *The relevance of malondialdehyde as a biochemical index of lipid peroxidation of postischemic tissues in the rat and human beings*. Biol Trace Elem Res, 1995. **47**(1-3): p. 165-70.
286. Petit, E., et al., *Polyclonal antibodies against malondialdehyde-modified proteins: characterization and application in study of in vitro lipid peroxidation of cellular membranes*. Biochem Mol Biol Int, 1995. **36**(2): p. 355-64.
287. Nordquist, R.E., et al., *Expression of amphetamine sensitization is associated with recruitment of a reactive neuronal population in the nucleus accumbens core*. Psychopharmacology (Berl), 2008. **198**(1): p. 113-26.

288. Morgan, J.I. and T. Curran, *Stimulus-transcription coupling in neurons: role of cellular immediate-early genes*. Trends Neurosci, 1989. **12**(11): p. 459-62.
289. Franchini, L.F., et al., *Sodium appetite and Fos activation in serotonergic neurons*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2002. **282**(1): p. R235-43.
290. Franchini, L.F. and L. Vivas, *Distribution of Fos immunoreactivity in rat brain after sodium consumption induced by peritoneal dialysis*. Am J Physiol, 1999. **276**(4 Pt 2): p. R1180-7.
291. Frei, N., et al., *Immunocytochemical localization of angiotensin II receptor subtypes and angiotensin II with monoclonal antibodies in the rat adrenal gland*. Regul Pept, 2001. **101**(1-3): p. 149-55.
292. Fitzsimons, J.T., *Angiotensin, thirst, and sodium appetite*. Physiol Rev, 1998. **78**(3): p. 583-686.
293. Geerling, J.C. and A.D. Loewy, *Central regulation of sodium appetite*. Exp Physiol, 2008. **93**(2): p. 177-209.
294. Lebrun, C.J., et al., *Angiotensin II induces a complex activation of transcription factors in the rat brain: expression of Fos, Jun and Krox proteins*. Neuroscience, 1995. **65**(1): p. 93-9.
295. Lebrun, C.J., et al., *Angiotensin II induces the expression of c-fos mRNA in the central nervous system of the rat*. Clin Exp Hypertens, 1995. **17**(6): p. 877-93.
296. Braszko, J.J., A. Kulakowska, and M.M. Winnicka, *Effects of angiotensin II and its receptor antagonists on motor activity and anxiety in rats*. J Physiol Pharmacol, 2003. **54**(2): p. 271-81.
297. Baisley, S.K., C.L. Cloninger, and V.P. Bakshi, *Fos expression following regimens of predator stress versus footshock that differentially affect prepulse inhibition in rats*. Physiol Behav, 2011. **104**(5): p. 796-803.
298. Dielenberg, R.A., G.E. Hunt, and I.S. McGregor, *"When a rat smells a cat": the distribution of Fos immunoreactivity in rat brain following exposure to a predatory odor*. Neuroscience, 2001. **104**(4): p. 1085-97.
299. Duncan, G.E., D.J. Knapp, and G.R. Breese, *Neuroanatomical characterization of Fos induction in rat behavioral models of anxiety*. Brain Res, 1996. **713**(1-2): p. 79-91.
300. Janitzky, K., et al., *Behavioral effects and pattern of brain c-fos mRNA induced by 2,5-dihydro-2,4,5-trimethylthiazoline, a component of fox feces odor in GAD67-GFP knock-in C57BL/6 mice*. Behav Brain Res, 2009. **202**(2): p. 218-24.
301. Buggy, J. and J. Jonklaas, *Sodium appetite decreased by central angiotensin blockade*. Physiol Behav, 1984. **32**(5): p. 737-42.
302. Moe, K.E., M.L. Weiss, and A.N. Epstein, *Sodium appetite during captopril blockade of endogenous angiotensin II formation*. Am J Physiol, 1984. **247**(2 Pt 2): p. R356-65.
303. Marinzalda Mde, L., et al., *Fear-potentiated behaviour is modulated by central amygdala angiotensin II AT1 receptors stimulation*. Biomed Res Int, 2014. **2014**: p. 183248.
304. Israel, A., et al., *Role of oxidative stress in the natriuresis induced by central administration of angiotensin II*. J Renin Angiotensin Aldosterone Syst, 2009. **10**(1): p. 9-14.
305. Hunyady, L., et al., *Mechanisms and functions of AT(1) angiotensin receptor internalization*. Regul Pept, 2000. **91**(1-3): p. 29-44.
306. Sasamura, H., V.J. Dzau, and R.E. Pratt, *Desensitization of angiotensin receptor function*. Kidney Int, 1994. **46**(6): p. 1499-501.

307. Conchon, S., et al., *Internalization of the rat AT1a and AT1b receptors: pharmacological and functional requirements*. FEBS Lett, 1994. **349**(3): p. 365-70.
308. Kapas, S., et al., *Internalization of the type I angiotensin II receptor (AT1) is required for protein kinase C activation but not for inositol trisphosphate release in the angiotensin II stimulated rat adrenal zona glomerulosa cell*. Biochem Biophys Res Commun, 1994. **204**(3): p. 1292-8.
309. Tang, H., H. Shirai, and T. Inagami, *Inhibition of protein kinase C prevents rapid desensitization of type 1B angiotensin II receptor*. Circ Res, 1995. **77**(2): p. 239-48.
310. Moellenhoff, E., et al., *Effect of repetitive icv injections of ANG II on c-Fos and AT(1)-receptor expression in the rat brain*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2001. **280**(4): p. R1095-104.
311. Daniels, D., D.K. Yee, and S.J. Fluharty, *Angiotensin II receptor signalling*. Exp Physiol, 2007. **92**(3): p. 523-7.
312. Stricker, E.M. and J.G. Verbalis, *Central inhibitory control of sodium appetite in rats: correlation with pituitary oxytocin secretion*. Behav Neurosci, 1987. **101**(4): p. 560-7.
313. Phillips, M.I., et al., *Immunohistochemical mapping of angiotensin AT1 receptors in the brain*. Regul Pept, 1993. **44**(2): p. 95-107.
314. Saavedra, J.M., et al., *Enhanced angiotensin converting enzyme binding in arteries from spontaneously hypertensive rats*. J Hypertens, 1992. **10**(11): p. 1353-9.
315. Voorhies, A.C. and I.L. Bernstein, *Induction and expression of salt appetite: effects on Fos expression in nucleus accumbens*. Behav Brain Res, 2006. **172**(1): p. 90-6.
316. Blume, A., et al., *Increased brain transcription factor expression by angiotensin in genetic hypertension*. Hypertension, 1997. **29**(2): p. 592-8.
317. Graybiel, A.M., R. Moratalla, and H.A. Robertson, *Amphetamine and cocaine induce drug-specific activation of the c-fos gene in striosome-matrix compartments and limbic subdivisions of the striatum*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(17): p. 6912-6.
318. Larson, E.B., et al., *Striatal regulation of DeltaFosB, FosB, and cFos during cocaine self-administration and withdrawal*. J Neurochem, 2010. **115**(1): p. 112-22.
319. Vanderschuren, L.J., et al., *Compartment-specific changes in striatal neuronal activity during expression of amphetamine sensitization are the result of drug hypersensitivity*. Eur J Neurosci, 2002. **16**(12): p. 2462-8.
320. Young, S.T., L.J. Porrino, and M.J. Iadarola, *Cocaine induces striatal c-fos-immunoreactive proteins via dopaminergic D1 receptors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(4): p. 1291-5.
321. Hope, B., et al., *Regulation of immediate early gene expression and AP-1 binding in the rat nucleus accumbens by chronic cocaine*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(13): p. 5764-8.
322. DiBona, G.F. and U.C. Kopp, *Neural control of renal function*. Physiol Rev, 1997. **77**(1): p. 75-197.
323. DiBona, G.F., *Nervous kidney. Interaction between renal sympathetic nerves and the renin-angiotensin system in the control of renal function*. Hypertension, 2000. **36**(6): p. 1083-8.
324. Kannan, H., et al., *Effects of centrally administered angiotensin on sympathetic nerve activity and blood flow to the kidney in conscious rats*. J Auton Nerv Syst, 1991. **34**(2-3): p. 201-10.
325. McKinley, M.J., M.I. McBurnie, and M.L. Mathai, *Neural mechanisms subserving central angiotensinergic influences on plasma renin in sheep*. Hypertension, 2001. **37**(6): p. 1375-81.

326. Verbalis, J.G., M.P. Mangione, and E.M. Stricker, *Oxytocin produces natriuresis in rats at physiological plasma concentrations*. *Endocrinology*, 1991. **128**(3): p. 1317-22.
327. Nasser, A., et al., *Effects of kaliuretic peptide on sodium and water excretion in persons with congestive heart failure*. *Am J Cardiol*, 2001. **88**(1): p. 23-9.
328. Gilles, C. and S. Ertle, *Pharmacological models in Alzheimer's disease research*. *Dialogues Clin Neurosci*, 2000. **2**(3): p. 247-55.
329. Budzynska, B., et al., *Effects of imperatorin on scopolamine-induced cognitive impairment and oxidative stress in mice*. *Psychopharmacology (Berl)*, 2014.
330. Tota, S., et al., *Role of central angiotensin receptors in scopolamine-induced impairment in memory, cerebral blood flow, and cholinergic function*. *Psychopharmacology (Berl)*, 2012. **222**(2): p. 185-202.
331. Sudilovsky, A., et al., *Angiotensin converting enzyme and memory: preclinical and clinical data*. *Int J Neurol*, 1987. **21-22**: p. 145-62.
332. Boccia, M.M. and C.M. Baratti, *Effects of oxytocin and an oxytocin receptor antagonist on retention of a nose-poke habituation response in mice*. *Acta Physiol Pharmacol Ther Latinoam*, 1999. **49**(3): p. 155-60.
333. Engelmann, M., et al., *Behavioral consequences of intracerebral vasopressin and oxytocin: focus on learning and memory*. *Neurosci Biobehav Rev*, 1996. **20**(3): p. 341-58.
334. Woolley, J.D., et al., *Oxytocin administration enhances controlled social cognition in patients with schizophrenia*. *Psychoneuroendocrinology*, 2014. **47**: p. 116-25.
335. Burns, M.E. and G.J. Augustine, *Synaptic structure and function: dynamic organization yields architectural precision*. *Cell*, 1995. **83**(2): p. 187-94.
336. Edwards, F.A., *Anatomy and electrophysiology of fast central synapses lead to a structural model for long-term potentiation*. *Physiol Rev*, 1995. **75**(4): p. 759-87.
337. Kleim, J.A., et al., *Synaptogenesis and Fos expression in the motor cortex of the adult rat after motor skill learning*. *J Neurosci*, 1996. **16**(14): p. 4529-35.
338. Smith, M.A., et al., *Induction of c-fos mRNA in rat brain by conditioned and unconditioned stressors*. *Brain Res*, 1992. **578**(1-2): p. 135-41.
339. McCabe, B.J. and G. Horn, *Learning-related changes in Fos-like immunoreactivity in the chick forebrain after imprinting*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. **91**(24): p. 11417-21.
340. Vann, S.D., et al., *Fos imaging reveals differential patterns of hippocampal and parahippocampal subfield activation in rats in response to different spatial memory tests*. *J Neurosci*, 2000. **20**(7): p. 2711-8.
341. Wan, H., J.P. Aggleton, and M.W. Brown, *Different contributions of the hippocampus and perirhinal cortex to recognition memory*. *J Neurosci*, 1999. **19**(3): p. 1142-8.
342. Goelet, P., et al., *The long and the short of long-term memory--a molecular framework*. *Nature*, 1986. **322**(6078): p. 419-22.
343. Morgan, J.I. and T. Curran, *Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun*. *Annu Rev Neurosci*, 1991. **14**: p. 421-51.
344. Campbell, B.M., et al., *Differential regulation of behavioral, genomic, and neuroendocrine responses by CRF infusions in rats*. *Pharmacol Biochem Behav*, 2004. **77**(3): p. 447-55.
345. Zhou, J., et al., *AT1 receptor blockade regulates the local angiotensin II system in cerebral microvessels from spontaneously hypertensive rats*. *Stroke*, 2006. **37**(5): p. 1271-6.

346. Capone, C., et al., *Cyclooxygenase 1-derived prostaglandin E2 and EP1 receptors are required for the cerebrovascular dysfunction induced by angiotensin II*. *Hypertension*, 2010. **55**(4): p. 911-7.
347. Ito, H., K. Takemori, and T. Suzuki, *Role of angiotensin II type 1 receptor in the leucocytes and endothelial cells of brain microvessels in the pathogenesis of hypertensive cerebral injury*. *J Hypertens*, 2001. **19**(3 Pt 2): p. 591-7.