

TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**ROL DE LOS RECEPTORES AT₁ DE ANGIOTENSINA II
CEREBRAL EN UN MODELO ANIMAL DE DEMENCIA**

por

Bioquímica Marinzalda María de los Angeles

Director: Dr. Baiardi Gustavo

Co-Director: Dra. Bregonzio Claudia

**Laboratorio de Neurofarmacología. Facultad de Ciencias Químicas,
UCC. IIByT-CONICET-UNC**



Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales

Universidad Nacional de Córdoba

Córdoba, Argentina

COMISIÓN ASESORA

Dra. Paglini Gabriela. Instituto de Investigación Médica Mercedes y Martín Ferreyra.
INIMEC-CONICET-UNC.

Dr. Coirini Héctor. Instituto de Biología y Medicina Experimental. Facultad de Ciencias
Exactas y Naturales. IBYME-CONICET-UBA.

Dr. Baiardi Gustavo. Laboratorio de Neurofarmacología. Facultad de Ciencias Químicas,
UCC. IIByT-CONICET.

DEFENSA ORAL Y PÚBLICA

Lugar y Fecha:

Calificación:

TRIBUNAL

Firma:

Aclaración:

Firma:

Aclaración:

Firma:

Aclaración:

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado a mis abuelos, muy especialmente a mi abuelo quien me enseñó que en la vida hay que aspirar muy alto y que con sacrificio todo se puede. Y que nunca es tarde para aprender.

AGRADECIMIENTOS

A todas las personas que me acompañaron en este largo camino. Muy especialmente a mi esposo, de quien aprendí que con constancia y perseverancia todo se puede. Gracias, porque todos los fin de semanas de estos cinco años me acompañó y esperó a que tratara los animales o incluso hiciera algún experimento.

Agradezco a mis padres que además de enseñarme e incentivarme a superarme día a día, me dieron todas las herramientas necesarias para que pueda lograrlo.

A mi hermana, a mis amigas, a todas aquellas personas que conocí a lo largo de este proyecto, muy especialmente a Brenda, cuya amistad fue fundamental para poder recorrer este camino.

Agradezco a mi director y co-director de tesis, al IIByT y a CONICET, por darme la oportunidad de llevar a cabo este proyecto. Especialmente a todas las personas de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Católica de Córdoba que me brindaron no sólo el lugar de trabajo, sino que también, me formaron como profesional de ciencia, conciencia y compromiso.

PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS

Papers:

Maria 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:

M.C. Paz, M. Marinzalda, C. Bregonzio, G. Baiardi, Renin-Angiotensin System Modulating Functions in the CPu. 2012, Neuroscience Research Progress, Horizons in Neuroscience Research. Volume 7.

Bregonzio, C.; Marinzalda, M.; Baiardi, G. Role of the neuropeptide Angiotensin II in stress and related disorders. In Psychiatry and Neuroscience: Bridging the Difference. Editors: Luis Mesones Arroyo and Pascual Angel Gargiulo. Springer. 2014. In press.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	7
RESUMEN	10
SUMMARY	12
1. INTRODUCCIÓN GENERAL	14
1.1 Sistema Renina-Angiotensina Cerebral	14
1.1.1 Receptores de angiotensina	17
1.2 RAS en el aprendizaje y la memoria	20
1.2.1 Receptores AT ₁ , inflamación y estrés oxidativo	23
1.2.2 Enzima convertidora de angiotensina	27
1.2.2.1 ACE, estrés oxidativo e inflamación	28
1.3 Enfermedad de Alzheimer	30
1.4 Elección del modelo animal: administración intracerebroventricular (ICV) de estreptozotocina (STZ)	35
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	37
2.1 Hipótesis general:	37
2.1.1 Hipótesis específicas:	37
2.2 Objetivo general:.....	37
2.2.1 Objetivos específicos:	37
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	39
3.1 Administración de las drogas y diseño experimental	39
3.1.1 Animales.....	39
3.1.2 Administración de las drogas	39
3.1.3 Cirugía.....	39
3.1.4 Administración Intracerebroventricular (ICV) de Estreptozotocina (STZ)	39
3.1.5 Grupos y Diseño Experimental	40
3.2 Pruebas de aprendizaje y memoria	40
3.2.1 Prueba de Campo Perforado.....	41
3.2.2 Prueba de Reconocimiento de Objetos.....	41
3.2.3 Prueba de Morris	42
3.2.4 Prueba de Evitación Pasiva	42
3.3.1 Análisis histomorfológico	43

3.3.2 Cuantificación de neuronas fos-IR.....	43
3.3.3 Aislamiento de microvasos cerebrales	45
3.3.3.1 Determinación de los productos de reacción del ácido tiobarbitúrico	46
3.3.3.2 Determinación de los dienos conjugados	46
3.3.3.3 Expresión de los RAT ₁ y HSP-70	46
3.3.4 Cuantificación de astrocitos GFAP-IR.....	47
3.3.5 Extracción de líquido cefalorraquídeo	48
3.3.6 Determinación del volumen de los ventrículos laterales.....	49
3.4 Análisis estadístico	50
4. EFECTO DEL BLOQUEO DE LOS RAT₁ DE ANGIOTENSINA II CEREBRAL SOBRE LA MEMORIA, LA INFLAMACIÓN Y EL ESTRÉS OXIDATIVO EN EL MODELO DE DEMENCIA ANIMAL POR STZ.....	51
4.1 Evaluación de la conducta	51
4.1.1 Efecto del pretratamiento con candesartan sobre la memoria de trabajo evaluada en el test de campo perforado.....	51
4.1.2 Efecto del pretratamiento con candesartan sobre la memoria de reconocimiento de objetos.....	55
4.1.3 Efecto del pretratamiento con candesartan sobre la memoria espacial y de referencia evaluadas en el test de Morris	57
4.1.4 Efecto del pretratamiento con candesartan sobre la memoria de evitación pasiva	60
4.2 Efecto del bloqueo de los receptores AT ₁ sobre los marcadores histomorfológicos, el estrés oxidativo y la inflamación	61
4.2.1 Efecto del pretratamiento con candesartan sobre los cambios histológicos en la zona CA ₁ del hipocampo.....	61
4.2.2 Efecto del pretratamiento con candesartan sobre la expresión del marcador de activación neuronal Fos.....	61
4.2.3 Aislamiento de microvasos	65
4.2.4 Efecto del pretratamiento con candesartan sobre el producto de reacción del ácido tiobarbitúrico (MDA) y sobre los niveles de dienos conjugados en los microvasos cerebrales	65
4.2.5 Localización del Receptor AT ₁ y de la HSP-70 en microvasos cerebrales aislados.....	66
4.2.6 Efecto del pretratamiento con candesartan sobre la expresión de GFAP en áreas cerebrales relacionadas al aprendizaje y la memoria	68

4.2.7 Efecto del pretratamiento con candesartan sobre los niveles del factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) en el líquido cefalorraquídeo (LCR)	70
4.2.8 Efecto del pretratamiento con candesartan sobre el volumen de los ventrículos laterales.....	71
5. EFECTO DE LA INHIBICIÓN DE LA ENZIMA CONVERTIDORA DE ANGIOTENSINA CEREBRAL SOBRE LA MEMORIA, LA INFLAMACIÓN Y EL ESTRÉS OXIDATIVO EN EL MODELOS DE DEMENCIA ANIMAL DE STZ.....	72
5.1 Evaluación de la conducta	72
5.1.1 Efecto del pretratamiento con captopril sobre la memoria de reconocimiento de objetos	72
5.1.2 Efecto del pretratamiento con captopril sobre la memoria espacial y de referencia evaluadas en el test de Morris	74
5.2 Efecto de la inhibición de la ACE sobre el estrés oxidativo y la inflamación.....	77
5.2.1 Efecto del pretratamiento con captopril sobre el producto de peroxidación lipídica, MDA, en los microvasos cerebrales.....	77
5.2.2 Localización del Receptor AT ₁ y de la HSP-70 en microvasos cerebrales aislados.....	78
5.2.3 Efecto del pretratamiento con captopril sobre la expresión de GFAP en áreas cerebrales relacionadas al aprendizaje y la memoria	79
5.2.4 Efecto del pretratamiento con captopril sobre los niveles del factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) en el líquido cefalorraquídeo (LCR).....	82
5.2.5 Efecto del pretratamiento con captopril sobre el volumen de los ventrículos laterales.....	82
6. DISCUSIÓN.....	84
6.1 Relación con enfermedad de Alzheimer en humanos.....	96
7. CONSIDERACIONES FINALES	98
8. BIBLIOGRAFÍA	100

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Expresión relativa de los componentes del RAS en el cerebro de una rata adulta.

Tabla 2. Efecto del pretratamiento con candesartan sobre la conducta de evitación pasiva.

Tabla 3. Efecto del pretratamiento con candesartan sobre los niveles de dienos conjugados en los microvasos cerebrales.

Figura 1. Biosíntesis de los neuropéptidos activos derivados del angiotensinógeno.

Figura 2. Receptores de los péptidos derivados de angiotensinógeno.

Figura 3. Ang (1-7) y su receptor Mas.

Figura 4. Mecanismos que promueven la injuria vascular inducidos por Ang II.

Figura 5. Vías colinérgicas.

Figura 6. Interacciones entre el NO y los ROS.

Figura 7. Diseño experimental.

Figura 8. Efecto del pretratamiento con candesartan sobre la memoria de trabajo en el test de campo perforado.

Figura 9. Distancia recorrida por los animales en el campo perforado.

Figura 10. Efecto del pretratamiento con candesartan sobre A) el índice de reconocimiento y B) el índice de discriminación en el test de reconocimiento de objetos.

Figura 11. Tiempo de exploración de ambos objetos durante la fase de entrenamiento en el test de reconocimiento de objetos.

Figura 12. Efecto del pretratamiento con candesartan sobre la memoria espacial evaluada en el test de Morris.

Figura 13. Efecto del pretratamiento con candesartan sobre la memoria de referencia evaluada en el test de Morris.

Figura 14. Microfotografía de las células piramidales de la región CA₁ del hipocampo coloreadas con HE.

Figura 15. Efecto del pretratamiento con candesartan sobre la expresión del marcador neuronal fos en las regiones A) CA₁, B) CA₃ y C) GD del hipocampo.

Figura 16. Efecto del pretratamiento con candesartan sobre la expresión del marcador neuronal fos en A) Cpu dorso medial y B) CxP.

Figura 17. Microfotografía de un microvaso cerebral aislado coloreado con hematoxilina.

Figura 18. Efecto del pretratamiento con candesartan sobre los niveles de MDA (umol MDA/ug de proteínas) en los microvasos cerebrales.

Figura 19. Localización de A) RAT₁ y B) HSP-70 en los microvasos cerebrales.

Figura 20. Efecto del pretratamiento con candesartan sobre la expresión de astrocitos GFAP-IR en A) GD, B) CPu dorsal y C) CxF.

Figura 21. Efecto del pretratamiento con candesartan sobre los niveles de TNF α (pg TNF α /ml) en el LCR de los animales.

Figura 22. Efecto del pretratamiento con candesartan sobre el volumen de los ventrículos laterales.

Figura 23. Efecto del pretratamiento con captopril sobre A) el índice de reconocimiento y B) el índice de discriminación en el test de reconocimiento de objetos.

Figura 24. Tiempo de exploración de ambos objetos idénticos durante la fase de entrenamiento en el test de reconocimiento de objetos.

Figura 25. Efecto del pretratamiento con captopril sobre la memoria espacial evaluada en el test de Morris.

Figura 26. Efecto del pretratamiento con captopril sobre la memoria de referencia evaluada en el test de Morris.

Figura 27. Efecto del pretratamiento con captopril sobre los niveles de MDA (umol MDA/ug de proteínas) en los microvasos cerebrales.

Figura 28. Localización de A) RAT₁ y B) HSP-70 en los microvasos cerebrales.

Figura 29. Efecto del pretratamiento con captopril sobre la expresión de astrocitos GFAP-IR en A) GD, B) CPu dorsal y C) CxF.

Figura 30. Efecto del pretratamiento con captopril sobre los niveles de TNF α (pg TNF α /ml) en el LCR de los animales.

Figura 31. Efecto del pretratamiento con captopril sobre el volumen de los ventrículos laterales

ABREVIATURAS

A β : péptido A beta
ACE 2: enzima convertidora de angiotensina II
ACE: enzima convertidora de angiotensina
Ach: acetilcolina
AchE: acetilcolinesterasa
AchT: acetilcolin transferasa
aCSF: líquido cerebrospinal artificial
ACV: accidente cerebrovascular
AD: enfermedad de Alzheimer
AGT: angiotensinógeno
Ang (1-7): angiotensina (1-7)
Ang I: angiotensina I
Ang II: angiotensina II
Ang III: angiotensina III
Ang IV: angiotensina IV
AP-1: factor activador de proteína 1
APP: proteína precursora amiloidea
BBB: barrera hematoencefálica
BSA: suero de albúmina bovina
CA₁: región cornu ammonis uno del hipocampo
CA₃: región cornu ammonis tres del hipocampo
capt: captopril
CNS: sistema nervioso central
CPu: núcleo caudado putamen
CxF: corteza frontal
CxP: corteza primaria motora
COX: ciclooxigenasa
cv: candesartan
eNOS: sintasa de óxido nítrico endotelial
GD: girus dentado
GFAP: proteína acídica fibrilar de la glia

H₂O₂: peróxido de hidrógeno
HE: hematoxilina-eosina
HSP: proteínas de choque térmico
ICAM-1: molécula de adhesión intracelular
ICV: intracerebroventricular
IL-1 β : interleuquina uno beta
IL-6: interleuquina seis
iNOS: sintasa del óxido nítrico inducible
KCl: cloruro de potasio
KKS: sistema kinina-kallicreina
LCR: líquido cefalorraquídeo
LPS: lipopolisacárido
LTP: potencial a largo plazo
MDA: malondialdehído
NF κ B: factor nuclear kappa beta
NHS: suero de caballo normal
nNOS: sintasa de óxido nítrico neuronal
NO: óxido nítrico
NS: sistema nervioso
O₂⁻: anión superóxido
OH: radical hidroxilo
ONOO⁻: radical peroxinitrito
PB: buffer fosfato
PBS: buffer fosfato salino
PD: enfermedad de Parkinson
PPAR γ : receptor de activación del proliferador de peroxisoma gamma
RAS: sistema renina-angiotensina
RAT₁: receptores AT₁
RAT₂: receptores AT₂
RAT₄: receptores AT₄
ROS: especies reactivas del oxígeno
SDS: dodecilsulfato sódico
SHR: ratas Espontáneamente Hipertensas

SOD: superóxido dismutasa

STZ: estreptozotocina

TBARS: productos de reacción del ácido tiobarbitúrico

TMP: tetrametoxipropano

TNF α : factor de necrosis tumoral alfa

v: vehículo

WK: ratas Wistar Kyoto

RESUMEN

A partir de estudios que sugieren que las drogas utilizadas en el tratamiento de la hipertensión arterial, particularmente las que actúan modificando el sistema renina angiotensina (RAS), podrían reducir la progresión del declive cognitivo observado en enfermedades neurodegenerativas, se ha considerado al RAS cerebral como un nuevo blanco terapéutico para el tratamiento de estas enfermedades. Varios trabajos científicos realizados en los últimos tiempos mostraron que los factores de riesgo vascular juegan un rol considerable en el desarrollo de las neuropatías. Más aún, alteraciones en la regulación cerebrovascular relacionadas con el estrés oxidativo fueron asociadas a estadios tempranos de estas patologías.

El modelo animal de demencia inducido por la administración central de estreptozotocina (STZ) ha sido ampliamente utilizado en los últimos años por su capacidad de reproducir las características tempranas de la forma esporádica de la enfermedad de Alzheimer (AD). Evita la manipulación genética que se utiliza en los modelos murinos transgénicos y, de esta manera, representa una alternativa para el estudio de nuevas terapias que puedan utilizarse para la prevención del característico declive cognitivo progresivo que se observa en pacientes con AD.

En el presente trabajo, utilizamos ratas macho de la cepa Wistar para estudiar el efecto del pretratamiento por vía oral de un bloqueante de los receptores AT₁ de angiotensina II (RAT₁) (candesartan 3 mg/kg/día) y de captopril (30 mg/kg/día) como inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina (ACE) sobre el deterioro en la memoria inducida por la administración de STZ (3 mg/kg, 2 inyecciones con un intervalo de 48 hs). Se evaluó la memoria de trabajo en el test del campo perforado y la memoria espacial y de referencia en el test de Morris, así como la memoria declarativa en el test de reconocimiento de objetos. Además se analizó la expresión de los RAT₁, los marcadores de la peroxidación lipídica (malonildialdeído y niveles de dienos conjugados) en los microvasos cerebrales de los animales, así como los marcadores de inflamación, factor de necrosis tumoral α (TNF α) en el líquido cefalorraquídeo y proteína de choque térmico (HSP-70) en los microvasos cerebrales. En áreas cerebrales relacionadas al aprendizaje y la memoria se evaluó el marcador de astrogliosis GFAP así como el marcador de activación neuronal fos, y los cambios histomorfológicos inducidos por la administración central de STZ.

Nuestros resultados mostraron que los RAT_1 de angiotensina II cerebral están involucrados en procesos clave que conducen al declive cognitivo observado en las pruebas de memoria, ya que el bloqueo de los mismos, así como la inhibición de la síntesis de angiotensina II, previnieron el déficit en la memoria de trabajo inducida por la administración intracerebroventricular de STZ.

En este contexto, el uso de fármacos que interfieren con el RAS cerebral, podrían contribuir a prevenir los desórdenes cognitivos y a mejorar la expectativa y calidad de vida de la población adulta dado que, la pérdida de memoria es el síntoma más discapacitante de muchas enfermedades y produce la interrupción de las actividades diarias de las personas que la padecen y afecta de manera profunda a sus familiares

SUMMARY

From many studies that suggest that antihypertensive drugs, particularly those that act by modifying the Renin Angiotensin System (RAS), could slow the progression of cognitive decline observed in neurodegenerative diseases, the brain RAS has been considered as a new therapeutic target for the treatment of these diseases. In the past few years, scientists demonstrated that vascular risk factors play an important role in the development of different neuropathies. Furthermore, alterations in cerebrovascular regulation related to oxidative stress processes have been associated to the early stages of these pathologies.

The animal model of dementia induced by the central administration of the betacytotoxic drug streptozotocin (STZ) has been widely used in recent years in reproducing the early aspects of sporadic Alzheimer's disease (AD). This model prevents the genetic manipulation of transgenic murine models and thereby it constitutes an alternative model to study new therapies that could be used to prevent the progressive cognitive decline observed in AD patients.

In this study we used male Wistar rats to study the effect of oral pretreatment with an angiotensin II type 1 receptor (AT₁R) blocker (candesartan, 3 mg/kg/day) and an angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitor (captopril, 30 mg/kg/day) on the memory decline induced by the intracerebroventricular (ICV) administration of STZ (3 mg/kg, 2 injections at an interval of 48 hours). We assessed the working memory using the hole-board test, the spatial and reference memory using the Morris water maze and the declarative memory using the novel object recognition test. In addition, we studied the AT₁R expression, and the lipid peroxidation markers (malondialdehyde, and conjugated diene levels), as well as the inflammation markers, the alpha necrosis tumor factor (TNF α) in the cerebrospinal fluid and the heat shock protein (HSP-70) on the rats' brain microvessels. The astrogliosis marker GFAP and the neural activation marker fos were assessed in brain areas related to learning and memory processes as well as the histomorphological changes induced by the central administration of STZ.

Our results show that brain angiotensin II AT₁R are involved in the key processes that lead to the cognitive decline observed in memory tests, as their blockage and the inhibition of angiotensin II synthesis prevented the working memory deficit induced by the ICV administration of STZ.

In this context, the use of drugs that interfere with the brain RAS could contribute to prevent cognitive disorders, and also improve the life expectancy and quality of life of adult population since memory lost is not only the most disabling symptom of many diseases disturbing the daily activities of the victims but it deeply affects their relatives.

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

Desde el descubrimiento de la renina en el año 1898, hasta la actualidad, el sistema renina-angiotensina (RAS) ha sido estudiado intensamente ya que se vio involucrado en múltiples procesos tales como: la regulación del equilibrio hidroelectrolítico, la regulación de la presión sanguínea, el control de la temperatura y la secreción hormonal. Estas denominadas acciones clásicas del RAS están mediadas por la angiotensina II (Ang II) que es considerado el principal péptido efector del sistema [1]. Fueron el Dr. Alberto C. Taquini y el Dr. Bernardo Houssay, junto a otros destacados fisiólogos argentinos, quienes caracterizaron por primera vez a esta sustancia hipertensora que liberaba el riñón en condiciones de isquemia y dieron inicio al estudio de la hipertensina (posteriormente llamada angiotensina) [1, 2].

Más adelante, en el año 1971 Ganten y col. [3, 4] descubrieron que todos los componentes de este sistema se hallaban presentes en el Sistema Nervioso (NS), de manera que comenzó a estudiarse su participación en otros procesos, aparte de los mencionados previamente, como el estrés [5, 6], la conducta sexual, el aprendizaje y la memoria [7, 8] así como, consecuentemente, su posible rol en algunas enfermedades neurodegenerativas como la Enfermedad de Alzheimer (AD).

1.1 Sistema Renina-Angiotensina Cerebral

A lo largo de la historia del RAS, numerosos experimentos evidenciaron la presencia del mismo en el Sistema Nervioso Central (CNS), como ser: que la perfusión de Ang II en perros produjo un aumento en la presión sanguínea periférica a partir de la estimulación del NS [9], o que la inyección del péptido en el cerebro de ratas estimuló el comportamiento dípico de las mismas [10], y más adelante gracias a la medición directa de Ang II mediante el uso de técnicas como radioinmunoensayo se la pudo evaluar y caracterizar como un neuropéptido [11]. De esta manera, se mostró que todos los componentes del RAS se expresan en distintas zonas del cerebro como se muestra en la siguiente tabla [12]:

Tabla 1. Expresión relativa de los componentes del RAS en el cerebro de una rata adulta.

	Ang II	Renina	AGT	ACE	RAT₁	RAT₂
Corteza cerebral	Lo	Lo	Lo	Lo	Lo	0
Hipocampo	Mod	NR	Lo	Lo	Lo	0
Amígdala	Hi	NR	Mod	Mod	Lo	0
Septum	Lo	NR	Mod	Lo	Lo	Lo
Ganglio basales	Lo	Lo	Lo	Hi	Lo	0
Área preóptica	Hi	NR	Hi	0	Mod	0
Hipotálamo:						
PVN	Hi	NR	Hi	Mod	Hi	0
SON	Hi	NR	Hi	Mod	Hi	0
Tálamo	Lo	NR	Hi	0	Lo	Hi
Tronco encefálico:						
Locus coeruleus	Lo	NR	Lo	Mod	Lo	Hi
NTS	Hi	Mod	Hi	Hi	Hi	
Oliva inferior	Mod	NR	Hi	Mod	Lo	Hi
Cerebelo	Mod	NR	Mod	Hi	Lo	Mod

Lo = bajo. Mod = moderado. Hi = elevado. NR = no reactivo. *Extraído de Phillips MI et al. Angiotensin II in the Central Nervous System physiology, 1998.*

Así mismo, la síntesis de Ang II cerebral continua la misma vía de síntesis que la Ang II circulante, figura 1 [13].

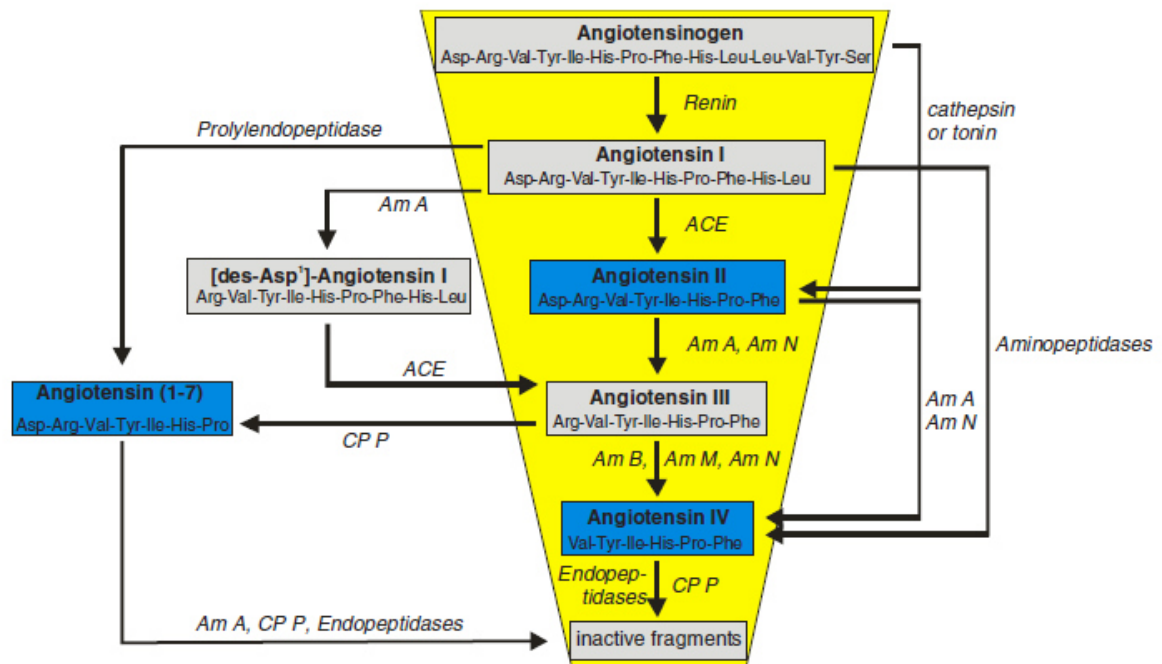


Figura 1. Biosíntesis de los péptidos de angiotensina neuroactivos a partir de su precursor, el angiotensinógeno (AGT). ACE, enzima convertidora de angiotensina. Am, aminopeptidasa. CP, carboxipeptidasa P. Imagen adaptada de von Bohlen et al. *The Central Nervous System Renin Angiotensin System*, 2006.

Brevemente, a partir de la acción de la renina sobre el precursor proteico angiotensinógeno (AGT) se obtiene el decapeptido, Ang I, que sirve como sustrato para la ACE para dar lugar a la formación del octapéptido Ang II, síntesis que también pueden realizarla otras peptidasas como la quimasa y una serinproteasa del tipo quimotripsina. Ang II sufre la acción hidrolítica por parte de la aminopeptidasa A para transformarse en el heptapéptido Ang III. La aminopeptidasa N actúa sobre éste para dar lugar a la formación de Ang IV, que después se convierte en Ang (3-7) por acción de la carboxipeptidasa P. Luego, por acción de otras endopeptidasas, continúa la hidrólisis hacia fragmentos peptídicos más pequeños y presumiblemente inactivos. Por su parte, Ang II también puede transformarse en Ang (1-7) por acción de la ACE2, o bien por la acción de la ACE sobre Ang (1-9), producto de la acción de la ACE2 sobre la Ang I [14].

1.1.1 Receptores de angiotensina

El descubrimiento del RAS cerebral produjo una expansión del conocimiento fisiológico y farmacológico del sistema, debido a la acción como neurotransmisor y neuromodulador que la Ang II ejerce en el cerebro. Los péptidos activos del RAS, producen su acción a través de la unión a receptores específicos ubicados en la membrana celular.

Se caracterizaron inicialmente dos tipos de receptores para la Ang II: los receptores AT₁ (RAT₁) y los receptores AT₂ (RAT₂), siendo a través de la unión al primero que el péptido ejerce todas las acciones clásicas asociadas al sistema. Ambos receptores pertenecen a la familia de receptores de membrana acoplados a proteína G y fueron clonados y caracterizados farmacológicamente [15, 16]. Existen dos subtipos del RAT₁, el RAT_{1A} y el RAT_{1B}, ambos clonados en ratón. Sin embargo es el primero el que media las acciones clásicas asociadas al RAS cerebral, según la evidencia experimental [17]. En la década de 1980, principio de los '90 se desarrollaron numerosos antagonistas no peptídicos del RAT₁, que lograban un bloqueo selectivo del mismo, sin afectar al RAT₂, y mostraron ser compuestos muy efectivos para el tratamiento de la hipertensión y la enfermedad cardiovascular. Actualmente varios de estos antagonistas selectivos se encuentran disponibles e incluyen al candesartan, valsartan, telmisartan, losartan, irbesartan. Difieren entre ellos farmacológicamente por su afinidad por el receptor, así como por la duración del efecto bloqueante. Estudios realizados *in vitro* mostraron que el candesartan presentaba una destacada afinidad por el RAT₁ cuando se lo comparó con otros antagonistas, y se demostró que la disociación del receptor era extremadamente lenta como para producir una inhibición insalvable del mismo, es decir un bloqueo a largo plazo por parte del antagonista. En adición, se demostró que, de todos bloqueantes capaces de atravesar la barrera hematoencefálica (BBB), candesartan producía la inhibición más efectiva de los RAT₁ cerebrales cuando era administrado de forma sistémica [18]. Candesartan cilexetil es una prodroga inactiva que se transforma en la droga activa durante el proceso de absorción gastrointestinal [19].

Por su parte, el RAT₂ se expresa principalmente durante el desarrollo fetal, produciéndose una disminución en sus niveles de expresión después del nacimiento. En los adultos la expresión de este receptor aún puede detectarse en el riñón, el páncreas, el corazón, las glándulas adrenales, el miometrio, el cerebro y en los vasos sanguíneos [20]. Se lo ha involucrado en la regulación de la presión sanguínea, la función renal y el

crecimiento vascular [21]. Luego de una injuria vascular o de un evento cardíaco, así como durante el proceso de cicatrización, se observó una re-expresión del RAT_2 sugiriendo que éste cumpliría un rol en los procesos de remodelación tisular, crecimiento y desarrollo [20]. Más aún, se sugirió que en condiciones fisiológicas la activación de este receptor produciría un antagonismo a la activación del RAT_1 . También, fue reportado que la Ang III era capaz de unirse a los RAT_1 y RAT_2 , presentando una mayor afinidad por este último [22].

Además de los receptores mencionados anteriormente, se ha descubierto un nuevo receptor del RAS: el receptor AT_4 (RAT_4), que presenta afinidad por Ang IV y Ang (3-7) y no por ligandos característicos de los RAT_1 y RAT_2 . Aún no se ha podido caracterizar la naturaleza de este sitio de unión, por un lado hay evidencias que lo involucran con los receptores de tipo aminopeptidasas reguladas por insulina (IRAP), sin embargo existe gran evidencia que asocia este sitio de unión a los receptores de tipo tirosinquinasa c-Met [23]. La estimulación de este receptor está relacionada con la proliferación y diferenciación celular, aumento de la angiogénesis mediante la activación de células vasculares endoteliales. Recientemente, este receptor ha recibido especial atención debido a que su estimulación está relacionada con la atenuación de cambios neurodegenerativos y su posible participación en procesos de aprendizaje y memoria. Las estructuras cerebrales en donde se encontró mayor expresión del RAT_4 son: la hipófisis anterior, el núcleo caudado-putamen (CPu), el cerebelo, la corteza cerebral y piriforme, el globo pallidum, la habénula, el hipocampo, el núcleo olivar inferior, el núcleo geniculado lateral, el colículo superior, el tálamo y el área tegmental ventral (VTA). Si se realiza una comparación de los sitios que expresan los tres tipos de receptores (el RAT_1 , RAT_2 y RAT_4) las zonas de mayor expresión de este último son el cerebelo, la corteza cerebral y piriforme, el claustrum, el núcleo CPu, el hipocampo, la habénula media y el núcleo basal de Meynert. Muchas de estas estructuras están relacionadas al procesamiento cognitivo [17].

Algunas de las acciones que produce la activación de estos tres receptores se destacan en la figura 2:

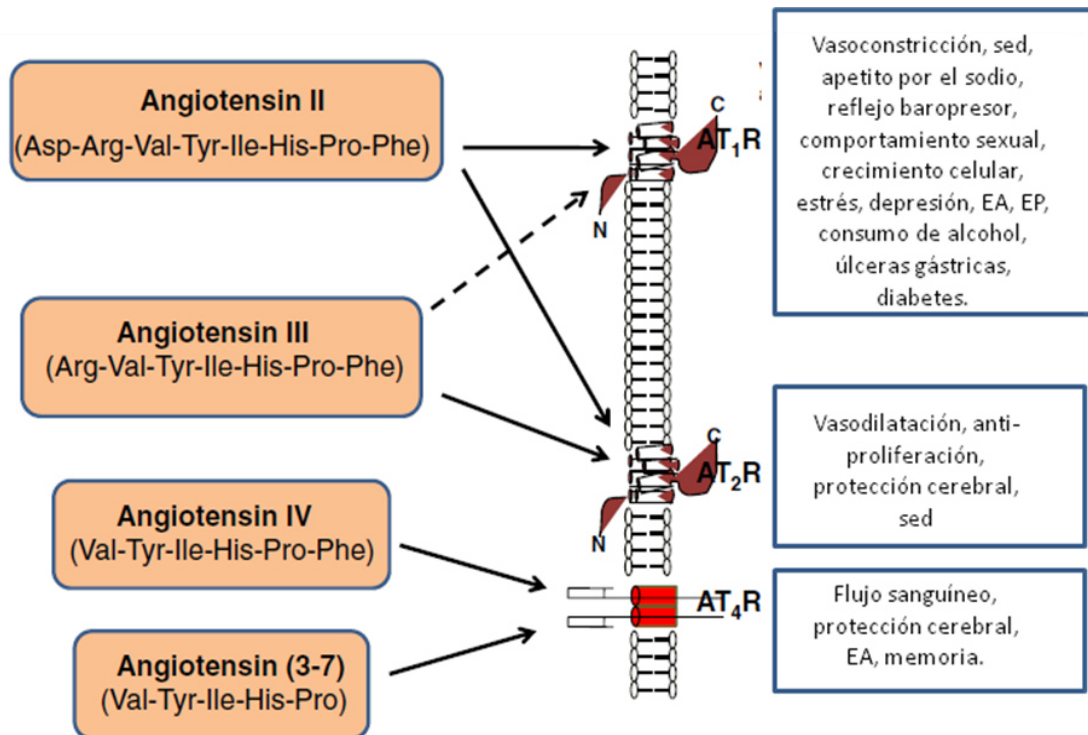


Figura 2. Péptidos de angiotensina biológicamente activos, los receptores proteicos a los cuales se unen se muestran con flechas. Se indican las funciones mediadas por cada receptor. *Adaptado de Wright and Harding. Brain Renin Angiotensin System, a new look at an old system, 2011 [23].*

Cabe mencionar la existencia de otro receptor importante del sistema: el receptor Mas, también perteneciente a la familia de receptores acoplados a proteína G, cuyo ligando es la Ang (1-7). Este péptido presenta efectos opuestos a la activación de los RAT₁, promueve la vasodilatación, antiproliferación y antihipertrofia (figura 3). Más aún, cada vez existe mayor evidencia acerca de sus efectos benéficos sobre las enfermedades cardiovasculares por su capacidad de protección ante una injuria [24]. Por este motivo se ha postulado al sistema ACE2/Ang (1-7)/Mas como un regulador de los efectos de la activación del RAT₁ [25].

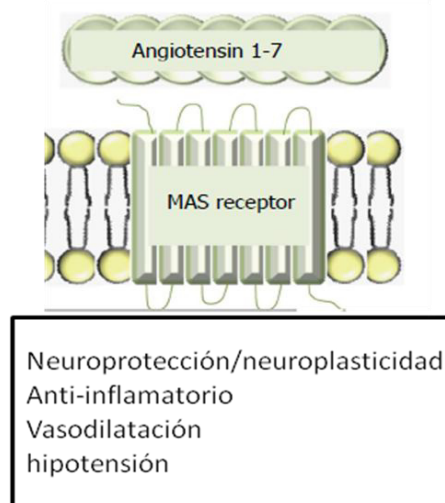


Figura 3. Ang (1-7) y su receptor Mas. Relacionados a la plasticidad neuronal y cambios en el fenotipo celular producidos por actividad neuronal. *Imagen adaptada de Naffah-Mazzacoratti et al. What have we learned about the Kinin-Kallikrein system and the Renin Angiotensin System in neurological disorders, 2014 [26].*

1.2 RAS en el aprendizaje y la memoria

Existen evidencias contradictorias acerca del rol que la Ang II cerebral cumple en los procesos de aprendizaje y la memoria, sin embargo son más abundantes los trabajos que postulan que el neuropéptido produciría una disminución de las funciones cognitivas. Esto guarda relación con que cada vez son más las evidencias que apoyan la hipótesis de que las anomalías vasculares promueven el deterioro cognitivo [27].

El envejecimiento produce cambios estructurales y funcionales en la circulación cerebral, lo que constituye un factor de riesgo importante para enfermedades como la AD la cual presenta un componente vascular. A su vez, la Ang II es un componente clave de la enfermedad vascular debido a que promueve el estrés oxidativo, y las especies reactivas del oxígeno (ROS) cumplen un papel muy importante en la disfunción endotelial [28]. Numerosos estudios mostraron que el envejecimiento normal se encuentra asociado a un estado pro-inflamatorio y pro-oxidativo que puede favorecer una respuesta exagerada al daño en el contexto de una enfermedad degenerativa. Es posible que el RAS, a través de los RAT_1 , esté relacionado a estos cambios degenerativos asociados a la edad avanzada [29]. Evidencia de esto es el trabajo de Ongali y col. quienes observaron que en ratones

viejos había un aumento en la expresión del RAT_1 en la corteza y en la vasculatura cerebral [30]. En contraposición, la activación de los RAT_2 parecería mediar efectos neuroprotectores. Se encontró que en animales con ablación génica de este receptor, a los que se les practicó una oclusión de la arteria cerebral media, presentaban un daño cerebral más severo que aquellos que presentaban normal expresión del RAT_2 [31]. Por otro lado, muchas evidencias sugieren que también la Ang IV y el receptor c-Met cumplen un rol neuroprotector por su capacidad de aumentar el flujo sanguíneo cerebral a partir de un mecanismo dependiente del NO [32].

Debido a que la hipertensión es un factor de riesgo importante para el padecimiento de enfermedades cerebrovasculares, incluyendo a los accidentes cerebrovasculares (ACV), y a que contribuye al riesgo de padecer demencia vascular, el tratamiento de la hipertensión está asociado a un menor riesgo de padecer demencia [33].

El hecho de que los bloqueantes AT_1 limiten pero no eliminen la respuesta inflamatoria innata es una propiedad interesante ya que el mantenimiento de la respuesta inmune es necesario para mantener y restablecer la homeostasis [5]. La inflamación crónica cerebral está asociada al desarrollo de numerosos desórdenes neuropsiquiátricos que incluyen no sólo a la AD sino también a la depresión y a la enfermedad de Parkinson (PD). Existen diversas causas que pueden llevar a una pérdida en el control de la respuesta fisiológica inflamatoria produciendo un estado inflamatorio exacerbado, y por lo tanto a una alteración en el flujo sanguíneo cerebral y la consecuente alteración neurológica que puede manifestarse como una simple alteración en el comportamiento o incluso, llevar a la pérdida de la cognición y derivar en una enfermedad neurodegenerativa. Entre esas causas se encuentran: la ya mencionada hipertensión, los desórdenes metabólicos como la diabetes y la obesidad e incluso, el propio envejecimiento. En relación a esto, utilizando un modelo animal de AD inducido por la administración central del péptido $A\beta$ en un contexto de enfermedad cerebrovascular inducido por isquemia, Shindo T. y col. encontraron que el bloqueante de los RAT_1 , telmisartan, era capaz de revertir la interrupción en la memoria espacial evaluada en el laberinto radial de ocho brazos [34].

Por otro lado, se encontró que la Ang II mediante la activación de los RAT_1 producía una inhibición del potencial a largo plazo (LTP) en el hipocampo y el giro dentado (GD) [35]. El LTP es reconocido como un mecanismo fisiológico básico en el almacenamiento de la memoria [36, 37] y como un modelo neuronal de aprendizaje [38]. Se conoce además, que la activación del RAT_4 aumenta de forma significativa el LTP en el

hipocampo [39]. Más aún, recientemente se demostró que la Ang (1-7) estimulaba el LTP en el hipocampo a través de su receptor Mas [40].

La disminución en la actividad colinérgica está relacionada con la pérdida de la memoria característica de la AD, en relación a esto Barnes y col. mostraron que niveles aumentados de Ang II podían interferir con la liberación de acetilcolina (ACh), por lo tanto afectar el procesamiento cognitivo [41]. Por su parte, Tota y col. mostraron que el tratamiento previo con perindopril (un inhibidor de la ACE) en ratas inyectadas intracerebroventricular (ICV) con estreptozotocina (STZ) producía una disminución en la actividad de la acetilcolinesterasa (AChE) tanto en la corteza como en el hipocampo [42].

La acción de la Ang II y los péptidos derivados de ésta sobre el aprendizaje y la memoria fueron evaluados también mediante el uso de modelos animales y pruebas conductuales como herramienta de medida de la memoria. Fue así como, Bild y col. encontraron que la administración central de Ang II en ratas indujo un déficit en la memoria a corto y a largo plazo evaluados en el laberinto en Y y en el test de evitación pasiva respectivamente, y que el tratamiento con un bloqueante de los RAT_1 (losartan), con un bloqueante de los RAT_2 (PD-123177) y con un inhibidor de la ACE (captopril) fue capaz de revertir el déficit cognitivo observado [8]. Por otro lado, cuando se administró renina ICV a ratas 1 min previo a la sesión de entrenamiento en un test de evitación pasiva, la respuesta de los animales se vio interrumpida durante 24 y 48 hs posteriores a su administración. La Ang II sería la responsable de esta interrupción en la memoria ya que el efecto fue atenuado luego del tratamiento con captopril [43]. Utilizando distintos modelos animales de déficit cognitivo ya sea en ratas como en ratones, Tota y col. mostraron que tanto el bloqueo de los RAT_1 como la inhibición de la ACE revierten la interrupción en la memoria evaluada en el test de Morris [42, 44, 45].

El bloqueo de los RAT_1 favorece la conversión de Ang II a Ang IV [30], y fue demostrado en el trabajo realizado por Braszko y col. que era a partir de la conversión a Ang IV que Ang II era capaz de producir un aumento en la memoria de evitación pasiva y en la memoria de reconocimiento de objetos [46]. También en un modelo animal de amnesia inducido por la inyección de escopolamina, Ang IV fue capaz de revertir el déficit de memoria detectado en el test de Morris [47]. Por su parte, Lee y col. evidenciaron que la administración central de dos análogos de este neuropéptido, Nle1-Ang IV y LVV-haemorfina-7, en ratas producía una mejora en la performance de los animales en el laberinto circular de Barnes comparado con las ratas controles, y que esta mejora podía ser

observada desde el primer día del test [48]. También, se observó un rol facilitador de la Ang IV en el procesamiento cognitivo durante el tratamiento con inhibidores de la ACE [49].

1.2.1 Receptores AT₁, inflamación y estrés oxidativo

Frente a un estado de inflamación cerebral, que puede ser ocasionado por múltiples causas, entre ellas el estrés, la edad avanzada, la hipertensión, enfermedades metabólicas o desórdenes cerebrales en general, el desequilibrio generado puede producir daño neuronal y la consecuente pérdida progresiva de la cognición, de esta manera llevar a la aparición de enfermedades neurodegenerativas [25]. Se ha visto que la sobre-estimulación de los RAT₁ guarda relación con estos estadios inflamatorios [50-52]. Más aún, muchos trabajos demuestran que la sobre-estimulación de estos receptores es un determinante importante de la inflamación descontrolada y aumentada produciendo alteraciones en la función cerebrovascular, estableciendo una asociación directa entre el aumento en la expresión de los RAT₁ cerebrales y cuadros inflamatorios que pueden llevar al daño tisular (ver figura 4). De esta manera, se encontró que las ratas Espontáneamente Hipertensas (SHR) presentan niveles aumentados de RAT₁ en la microvasculatura cerebral con respecto a sus controles normotensos, las ratas Wistar Kyoto (WK). La estimulación de estos receptores por parte de la Ang II produjo un aumento en la expresión de citoquinas pro-inflamatorias, así como un aumento en la síntesis de proteínas de shock térmico (HSP), mientras que el bloqueo de los mismos produjo una efectiva acción antiinflamatoria, así como también pudo observarse una disminución en la infiltración de macrófagos en los microvasos cerebrales de las ratas SHR [53].

Por otro lado, se encontró que la acción antiinflamatoria de los bloqueantes de los RAT₁ no sólo se encontraba restringida a la inflamación como consecuencia de la hipertensión, sino que, por ejemplo, candesartan fue capaz de disminuir la inflamación en un modelo de ulceración gástrica inducida por estrés a partir de la disminución del factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) y de la molécula de adhesión intracelular (ICAM-1) en el endotelio vascular, así como también produjo la disminución de la infiltración de neutrófilos en la mucosa gástrica [6]. Asimismo, a partir de la inyección sistémica del componente de la pared externa de las bacterias Gram (-), el lipopolisacárido (LPS), se demostró que el pretratamiento con el bloqueante de los RAT₁ en ratas normotensas fue capaz de limitar la respuesta inmune innata no sólo a nivel de la periferia, produciendo una

disminución en los niveles plasmáticos de citoquinas pro-inflamatorias como el TNF α y la interleuquina 6 (IL-6), sino que a nivel cerebral también pudo observarse la acción antiinflamatoria del bloqueante debido a la disminución en la producción y secreción de las citoquinas pro-inflamatorias, y por una disminución en la activación de la microglia. Estos estudios muestran que la actividad del RAT₁ es esencial para el desarrollo de una respuesta inmune innata completa, más allá del estado fisiológico particular; que los bloqueantes de estos receptores son potentes agentes antiinflamatorios no sólo a nivel de la periferia sino también a nivel central; y que esta acción antiinflamatoria es independiente de los efectos antihipertensivos de estas drogas [5].

Por otro lado, una amplia variedad de estudios pusieron en evidencia la estrecha relación entre la activación de los RAT₁ y la producción del anión superóxido (O₂⁻) a partir de la enzima NADPHox. Existen múltiples fuentes de anión superóxido en la vasculatura, no sólo la NADPHox, sino también las mitocondrias, la ciclooxigenasa (COX) y la xantino oxidasa. Debido a que las células endoteliales del cerebro son metabólicamente muy activas, las mitocondrias generan anión superóxido durante el proceso de fosforilación oxidativa [54]. Este radical libre puede convertirse en especies altamente reactivas, capaces de producir daño a los tejidos, como el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y el radical peroxinitrito (ONOO[·]) luego de reaccionar con el óxido nítrico (NO). En su trabajo, Landmesser y col. mostraron que no sólo a nivel de las células del músculo liso vascular sino que también en las células endoteliales la Ang II estimulaba la producción del radical O₂⁻ a partir de la NADPHox [55]. De la misma manera, otros trabajos más recientes mostraron que la producción del anión superóxido por esta vía no sólo ocurría a nivel vascular sino que se observó el mismo fenómeno en el cerebro. Por ejemplo, en enfermedades relacionadas a la edad avanzada se encontró que existe una desregulación entre la activación de la NADPHox, con la consecuente superproducción del radical, a partir de la Ang II [29].

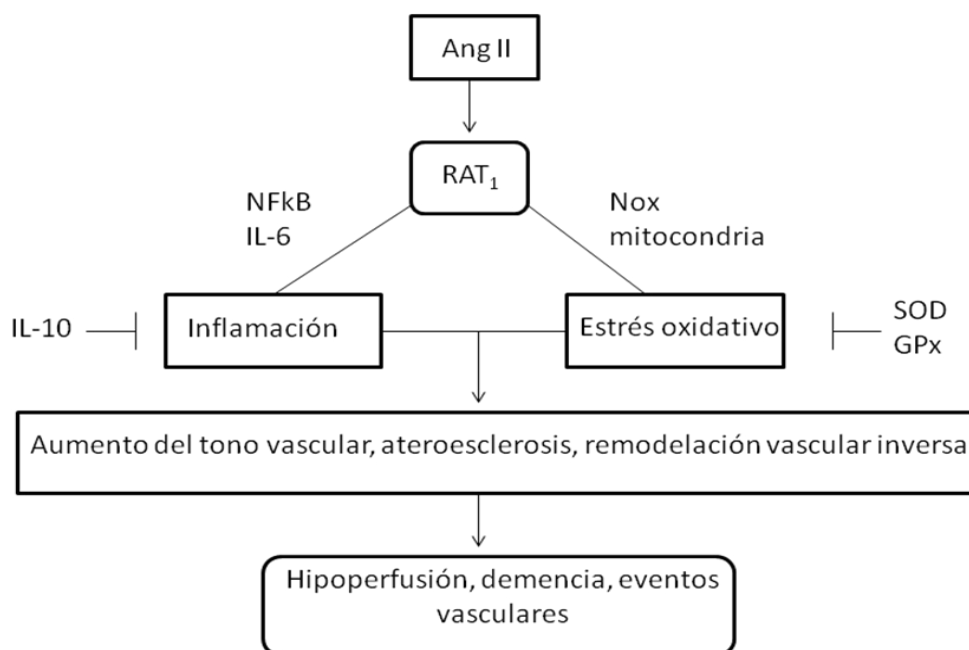


Figura 4. Mecanismos que promueven la injuria vascular inducidos por Ang II. La Ang II activa los RAT_1 y promueve el estrés oxidativo y activa componentes de la cascada de inflamación. Los mecanismos que promueven estas cascadas interactúan entre ellos. También existen moléculas inhibitorias que pueden suprimir los efectos de la Ang II sobre el estrés oxidativo y la inflamación. *Imagen adaptada de Faraci FM. Protecting against cerebrovascular disease in brain, 2011 [54].*

En las enfermedades neurodegenerativas o con la inyección ICV de STZ, hay un desbalance entre la producción de ROS y el sistema celular de protección frente a las ROS, lo que produce peroxidación lipídica y daño tisular permanente [29]. La peroxidación lipídica comienza con el ataque de cualquier especie con suficiente reactividad como para sustraer un átomo de hidrógeno de un ácido graso poliinsaturado. La salida del átomo de hidrógeno deja un electrón desapareado en el átomo de carbono al cual se encontraba unido originalmente. Se produce entonces, una reorganización de los enlaces que da lugar a la formación de dienos conjugados, seguido inmediatamente por una reacción con el oxígeno que genera un radical peroxilo, éste último es capaz de sustraer un átomo de hidrógeno de otro ácido graso y formar así un hidroperóxido y un radical lipídico, este nuevo radical lipídico puede reaccionar con el oxígeno para formar un nuevo radical peroxilo constituyéndose una propagación de la reacción de peroxidación [56] que genera entre otros productos el MDA.

Recientemente, se describió que algunos de los bloqueantes de los RAT_1 ejercen acción agonista sobre el receptor de activación del proliferador de peroxisoma gamma (PPAR γ) y que esta propiedad no es independiente de la capacidad del bloqueo del RAT_1 . Este receptor intracelular (PPAR γ) presenta efectos benéficos sobre el metabolismo de hidratos de carbono (agonistas de este receptor se utilizan como agentes hipoglucemiantes en el tratamiento de la insulino resistencia y diabetes mellitus tipo II) y de lípidos, e inhibe la transcripción de genes pro-inflamatorios como el activador de proteína-1 (AP-1) y el factor nuclear kappa beta (NFk β). Se ha reportado que agonistas de este receptor PPAR γ atenúan el estrés oxidativo, la inflamación y la apoptosis en el CNS [25]. Uno de los mecanismos por los cuales Ang II podría inhibir los efectos mediados por PPAR γ sería mediante un aumento en la actividad de la Bcr quinasa, lo cual resulta en un aumento en la fosforilación y una disminución de la actividad transcripcional del receptor, lo que produciría una activación aumentada de NFk β y de la inflamación local [57]. Varios trabajos postularon que la activación del receptor PPAR γ podría antagonizar el RAS inhibiendo la expresión de los RAT_1 en las células del músculo liso de los vasos sanguíneos [58]. De acuerdo con esto, Singh y col. mostraron que es a través del receptor PPAR γ que tanto el telmisartan como el lisinopril (inhibidor de la ACE) eran capaces de revertir el déficit cognitivo en un modelo de demencia en ratones inyectados intracerebroventricular (ICV) con estreptozotocina (STZ) evaluados en el test de Morris. Más aún, tanto el bloqueante de los RAT_1 como el inhibidor de la ACE lograron revertir el aumento en los niveles de estrés oxidativo e inflamación de estos ratones. Sin embargo, todos estos efectos fueron abolidos cuando ambas drogas se administraron concomitantemente con el antagonista del receptor PPAR γ , BADGE [59]. Este efecto dual de los bloqueantes de los RAT_1 también se puso de manifiesto en el trabajo de Villapol y col., en donde en un modelo de ratón en el que se indujo una injuria cerebral por traumatismo, el tratamiento con candesartan redujo el daño neuronal, disminuyó el volumen de la lesión y la activación de la microglia y mejoró la performance de los animales en el test de Morris. Mientras que, la administración de un antagonista del receptor PPAR γ redujo los efectos neuroprotectores atribuibles al bloqueante [60]. Por otro lado, también se ha relacionado la activación de este receptor con el clearance del péptido A β y la proliferación de células madres en el cerebro [61, 62].

1.2.2 Enzima convertidora de angiotensina

La ACE es un componente importante del RAS que participa en la síntesis de Ang II a partir de Ang I. A nivel de la microvasculatura predomina su localización en las células endoteliales así como en las células del músculo liso vascular [63, 64]. Resultados recientes obtenidos a partir de datos epidemiológicos sugieren que el uso de los inhibidores de esta enzima podría resultar beneficioso para el tratamiento de la demencia senil de tipo Alzheimer [65, 66]. Se encontró que estas drogas reducen la incidencia de la enfermedad en personas que presentan un declive cognitivo leve [67]. Como consecuencia de estos resultados surgió la expectativa de que el uso de aquellos inhibidores de la ACE capaces de atravesar la barrera hematoencefálica, puedan presentar un efecto protector contra el declive cognitivo independientemente de los efectos cardiovasculares de estas drogas. En relación a esto, se postuló que cambios en la actividad de la convertasa podrían participar en la patogénesis de la AD [68]. Uno de los hallazgos que sostiene esta premisa es la observación realizada en pacientes con AD que presentan el genotipo D/D en el gen que codifica para la ACE, el cual está asociado con una mayor actividad sérica de la enzima. De acuerdo con esto, se han encontrado niveles aumentados de la convertasa en cerebros de pacientes que padecieron la enfermedad [69, 70]. En contraposición a esto, se encontró que la ACE es capaz de promover la degradación del péptido A β in vitro [71] y que, por lo tanto, el uso de inhibidores de la enzima favorecería la acumulación del péptido y el consecuente desarrollo de la enfermedad. Sin embargo, un gran número de autores han reportado que el uso de inhibidores de la ACE mejoraría el deterioro cognitivo observado en distintos modelos animales de demencia [45, 59, 72]. Así como también, existe una amplia variedad de ensayos clínicos realizados en pacientes hipertensos bajo tratamiento con estos inhibidores que han reportado un aumento en las habilidades cognitivas y una mejora en la calidad de vida [73, 74]. Ya mencionamos la estrecha relación entre los niveles de presión sanguínea elevados y el riesgo de padecer demencia senil, que hacen de la hipertensión durante la edad media, un importante factor de riesgo para el desarrollo de la patología de Alzheimer. En relación a esto, pacientes tratados con perindopril con antecedentes de ACV o eventos isquémicos fueron monitoreados durante 4 años y se observó una menor incidencia de afecciones cognitivas con respecto a aquellas personas que no fueron tratadas con esta droga [65].

1.2.2.1 ACE, estrés oxidativo e inflamación

El aumento en los niveles de los ROS en cerebros de pacientes con la AD puede ser atribuido en parte a la toxicidad del péptido A β [75, 76], de hecho, se pueden observar mediadores inflamatorios y signos de estrés oxidativo en los sitios de depósito A β y de los ovillos neurofibrilares, los clásicos marcadores tisulares de la enfermedad asociados al proceso neurodegenerativo [77]. Se demostró también, que el daño oxidativo es significativamente mayor en la etapa más temprana de la enfermedad y que el mismo se reduciría a medida que esta progresa [78]. Más aún, se formuló la hipótesis de que el estrés oxidativo sería el inicio de los procesos neurodegenerativos que culminan en enfermedades como la de Alzheimer o la de Parkinson [79]. Los radicales libres, en especial el anión O $_2^-$, inactivan el NO, que además de ser un potente vasodilatador, presenta otras funciones biológicas [80], su principal función en la regulación de la presión sanguínea es equilibrar el principal sistema presor no solo en la periferia sino también a nivel central, el sistema nervioso simpático [81]. Yamada y col. mostraron que la interrupción en la memoria espacial producida por la administración central de LPS era consecuencia de un aumento en la actividad de la óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) debido a que los animales tratados con aminoguanidina (un inhibidor de la iNOS) no presentaron la interrupción en la memoria observada [82]. En relación a esto, se reportó que la síntesis de NO es importante en la memoria de reconocimiento de objetos y se demostró que la Ang (1-7) a través del receptor Mas estimulaba la síntesis de NO por activación de la óxido nítrico sintetasa neuronal (nNOS) en las neuronas catecolaminérgicas [83]. Por su parte, la Ang II, péptido resultante de la acción de la ACE sobre la Ang I, a través de la estimulación de los RAT $_1$ es uno de los principales productores de ROS a partir de la activación de la NADPHox [80]. De manera que niveles elevados de Ang II producen una disminución en la síntesis de NO lo cual podría explicar la relación que guardan los niveles aumentados de Ang II y su posible rol en distintas condiciones patológicas. Como se describió anteriormente, la Ang II activa el factor nuclear NF κ B y de esta manera media la expresión genes pro-inflamatorios y pro-oxidantes. Más aún, los ROS promueven la fosforilación de I κ B y su ubiquitinación, favoreciendo la traslocación al núcleo de NF κ B para aumentar la transcripción de citoquinas pro-inflamatorias, moléculas de adhesión intercelular y la activación de la NADPHox [80].

En relación a lo expuesto, Abdalla S. y col, mostraron en su trabajo realizado con ratones transgénicos Tg2576 (que desarrollan patología A β a los 12 meses de vida) que el

tratamiento con el inhibidor de la ACE captopril, previene y retrasa el desarrollo de las placas seniles y por lo tanto retrasar los signos de neurodegeneración relacionados con éstos. Además, observaron que estos ratones presentaban una actividad aumentada de la enzima en el hipocampo y que a su vez este fenómeno producía una mayor activación del RAT_1 como consecuencia de una mayor síntesis en los niveles de Ang II [84] y por lo tanto un aumento en la producción de ROS. Sin embargo todas estas alteraciones fueron prevenidas por el tratamiento con captopril. Otro trabajo que muestra la participación del RAS en el declive cognitivo como consecuencia de un estado de inflamación exacerbado, es el de El Sayed y col. donde a partir de la inyección sistémica de LPS en ratones produjeron un cuadro de inflamación central, reflejado en un aumento en los niveles de $TNF\alpha$ e $IL-1\beta$ en homogenatos de cerebro y observaron un deterioro en la memoria evaluado en el test de alternación espontánea en Y. El tratamiento de estos animales con perindopril revirtió el déficit cognitivo observado así como disminuyó los niveles en los marcadores de inflamación [85].

En los desórdenes neurodegenerativos como la AD, la inflamación se considera una de las primeras respuestas al daño. Se produce un aumento en la permeabilidad vascular y el flujo sanguíneo y se liberan sustancias producidas por los mastocitos y las plaquetas como histamina, bradiquinina, leucotrienos, prostaglandinas y serotonina. El aumento en la permeabilidad vascular tiene como objetivo permitir el reclutamiento de células que van a participar en la defensa del tejido contra la injuria, como leucocitos, moléculas de adhesión intracelular, citoquinas y factores quimiotácticos [86]. La bradiquinina, importante nonapéptido vasoactivo del sistema kinina-kallicreina (KKS), se cree que participa en este proceso. La asociación entre este sistema y el RAS es la ACE, que como bien fue expuesto previamente, interviene en la síntesis de Ang II a través de su acción sobre la Ang I, pero también inactiva la bradiquinina por clivaje enzimático. El balance entre ambos sistemas, se cree es muy importante en la regulación de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica [26].

De manera que una actividad aumentada de la ACE no sólo produce un aumento en los niveles de Ang II sino que también conduce a un aumento en la producción de ROS, una disminución en la síntesis de NO y bradiquinina y las posibles consecuencias que estos eventos traen aparejados.

1.3 Enfermedad de Alzheimer

La demencia se define como una interrupción en la memoria, acompañada de uno o más déficits de las funciones mentales superiores como ser: el pensamiento abstracto, la orientación, el juicio; o disturbios corticales superiores, como lo son: la afasia, la agnosia y los desórdenes de personalidad. La enfermedad de Alzheimer es la forma más común de demencia [66], si bien se desconoce la etiología precisa de la misma, se consideran factores de riesgo la edad, la hipertensión, los desórdenes metabólicos como la diabetes o la hipercolesterolemia y la inflamación [87]. Se trata de una patología neurodegenerativa progresiva, que depende de la edad y que se caracteriza por la pérdida de la actividad sináptica que resulta en la pérdida de neuronas especialmente en la corteza y en el hipocampo, lo que lleva a la pérdida de la memoria. Las manifestaciones clínicas aparecen mucho tiempo después de una larga etapa presintomática [88]. A nivel neuropatológico se caracteriza por la presencia de placas seniles que se forman a partir de los depósitos extracelulares y dentro de los vasos sanguíneos cerebrales, del péptido beta amiloideo ($A\beta$), derivado de la proteína precursora amiloidea (APP) [89] y por la presencia de ovillos intracelulares que se forman a partir de la hiperfosforilación de una proteína del citoesqueleto de las células, la proteína TAU. La acumulación del péptido $A\beta$ en la pared de los vasos sanguíneos, específicamente en arterias, arteriolas y capilares cerebrales se conoce como angiopatía cerebral amiloidea y no necesariamente converge en AD. Sin embargo, los exámenes post mortem de cerebros de pacientes que padecieron la enfermedad resultan positivos para la tinción de Rojo Congo, tinción que pone de manifiesto la presencia de los depósitos amiloideos [90].

La inflamación cumple un rol significativo en el desarrollo de la enfermedad, por ejemplo, existen evidencias de que produce una exacerbación de la patología TAU [91]. Así mismo, muestras de plasma, de líquido cefalorraquídeo (LCR) y cerebros de pacientes con diagnóstico de Alzheimer muestran niveles elevados de proteínas inflamatorias como el $TNF\alpha$ [92] que pueden contribuir con los procesos neurodegenerativos [93]. En el cerebro, la síntesis de esta proteína inflamatoria es realizada principalmente por las células de la glia y puede ser estimulada por varios factores entre los que se destacan la presencia de los agregados peptídicos anormales, como el agregado $A\beta$ característico de la AD [94]. En su trabajo, Tweedie y col. mostraron que disminuyendo los niveles de $TNF\alpha$ se producía una mejora en los aspectos más relevantes que regulan la inflamación cerebral en modelos de roedores que imitaban puntos clave de la AD, estableciendo una relación entre

el desarrollo de la inflamación y la progresión de la enfermedad. Más aún, la disminución en los niveles de esta proteína tuvo un impacto benéfico en la performance de los animales en el test de Morris [94].

La inflamación cerebral puede ser responsable de la pérdida de las neuronas colinérgicas en el prosencéfalo basal, característica de la AD. De hecho, la pérdida de la función colinérgica en el CNS es uno de los puntos que contribuyen de manera más significativa al deterioro en la memoria [95]. De acuerdo con esto, se ha visto que la inyección de LPS en ratas en esta estructura cerebral produjo una degeneración selectiva de neuronas colinérgicas que pudo ser atenuado con drogas antiinflamatorias o antagonistas de los receptores NMDA de glutamato [96]. La acetilcolina (ACh) es un neurotransmisor estrechamente relacionado a los procesos de aprendizaje y memoria. Si bien la AD involucra la pérdida de las funciones cognitivas en general, la pérdida de la memoria es de aparición temprana y su severidad guarda relación con el grado de pérdida de las neuronas colinérgicas [97]. El prosencéfalo basal es considerado la principal eferencia colinérgica del CNS. Neuronas colinérgicas de esta estructura proyectan hacia el hipocampo y hacia la corteza cerebral, los cuerpos celulares de estas neuronas residen en el septum medial, la banda diagonal de Broca y el núcleo basal magnocelular, figura 5. Defectos en este sistema contribuyen al déficit de las funciones cognitivas. También se ha descrito que con la edad ocurren cambios degenerativos en estas neuronas colinérgicas que resultan en la hipofunción relacionado al déficit de memoria progresivo que se observa en las personas mayores [98]. De manera coincidente, uno de los principales hallazgos en la AD es la disminución en los niveles de ACh en el hipocampo y en la corteza frontal, así como una disminución en el número de neuronas colinérgicas en el núcleo basal en estudios de cerebros de personas realizados post mortem que padecieron la enfermedad [88], de hecho una de las principales terapias actualmente utilizadas es la administración de fármacos inhibidores de la acetilcolinesterasa (AChE), la enzima responsable de la degradación del neurotransmisor.

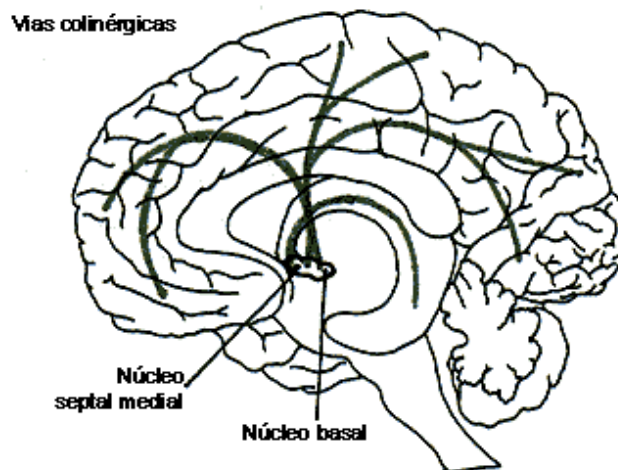


Figura 5. Vías colinérgicas, principales núcleos de origen. *Extraído de Avances en Psicofarmacología y perspectivas de futuro, Cecilio Álamo y col. Departamento de Farmacología, Universidad de Alcalá, Madrid.*

Tanto el aumento en la inflamación cerebral, como las alteraciones en el endotelio cerebral, la interrupción en la integridad de la barrera hematocefálica y la reducción progresiva del flujo sanguíneo son reconocidos mecanismos que contribuyen a la patogénesis de AD [25]. Muchos estudios correlacionan los niveles elevados de presión sanguínea con el riesgo de padecer algún déficit cognitivo, específicamente con el riesgo de padecer demencia. Más aún, la hipertensión en la edad media podría ser un parámetro predictivo significativo del riesgo de padecer un deterioro cognitivo. En relación a esto, se reportó que pacientes que sufren la AD padecieron hipertensión años antes del establecimiento de la enfermedad, aunque una vez instaurada, se observó que la presión sanguínea disminuía [99]. Las lesiones vasculares que se observan durante el declive cognitivo involucran: enfermedad de los pequeños vasos asociado a pequeños infartos, lesiones en la materia blanca e hipertrofia cortical. La demencia puede ser consecuencia directa de lesiones isquémicas cerebrales en función de la magnitud del daño. La hipertensión puede originar una hipoperfusión o un ACV debido a que promueve la arterioesclerosis en los pequeños vasos y esto puede provocar los daños mencionados que conducen a una manifestación subclínica de la AD, e incluso puede predisponer a que la manifestación del déficit cognitivo aparezca de manera más temprana. La hipertensión también se encuentra asociada a desórdenes en la microcirculación y disfunción endotelial, produciéndose cambios degenerativos a nivel de las arteriolas y capilares cerebrales. La

AD también se encuentra asociada a lesiones en la microvasculatura cerebral (angiopatía cerebral amiloidea). Estos cambios pueden comprometer la integridad de la BBB, produciendo un aumento en la permeabilidad vascular [65]. Los estudios acerca del proceso normal de envejecimiento del cerebro y el hallazgo de cambios en la vasculatura cerebral relacionados a la edad avanzada mostraron que durante el envejecimiento el cerebro sufre un estado de hipoperfusión crónica lo que lleva a la injuria tisular y el posterior declive cognitivo característico de la AD.

Por otro lado, existe evidencia de un aumento en los niveles de estrés oxidativo en cerebros de pacientes con AD y otras enfermedades neurodegenerativas [33]. Se han encontrado marcadores que son consecuencia del daño oxidativo como proteínas modificadas y productos de peroxidación lipídica. Una de las posibles fuentes de ROS identificadas en la AD ha sido la microglia como consecuencia de la activación de la NADPHox [76]. Se demostró además que la activación de la microglia es responsable de la respuesta inflamatoria que se observa en cerebros con AD [100]. Más aún, se ha postulado al estrés oxidativo como el evento más temprano en cerebros que sufren de Alzheimer de manera que sería un importante mediador en la progresión de la enfermedad [88]. Como ya hemos visto, uno de los hallazgos más prominentes respecto a las alteraciones vasculares es el estrés oxidativo [101]. Los vasos sanguíneos cerebrales tienen la capacidad de generar niveles elevados de anión O_2^- y son particularmente sensibles a los efectos de los ROS [102]. Por ejemplo, una vez producido puede afectar la función mitocondrial y vascular por inactivación de proteínas que contienen centros ferro-sulfurados [103]. Un mecanismo clave de vital importancia es la interacción entre el anión O_2^- y el NO (figura 6), como consecuencia de esta interacción se produce una interrupción en la vasodilatación inducida por el NO. Por otro lado, el NO producido por la sintetasa del óxido nítrico neuronal (nNOS) es importante en el acople neurovascular el cual se ve interrumpido por efecto del O_2^- . Además, la reacción entre ambos da lugar a la formación de peroxinitrito ($ONOO^-$) que promueve la injuria celular e interrumpe la regulación del tono vascular [54].

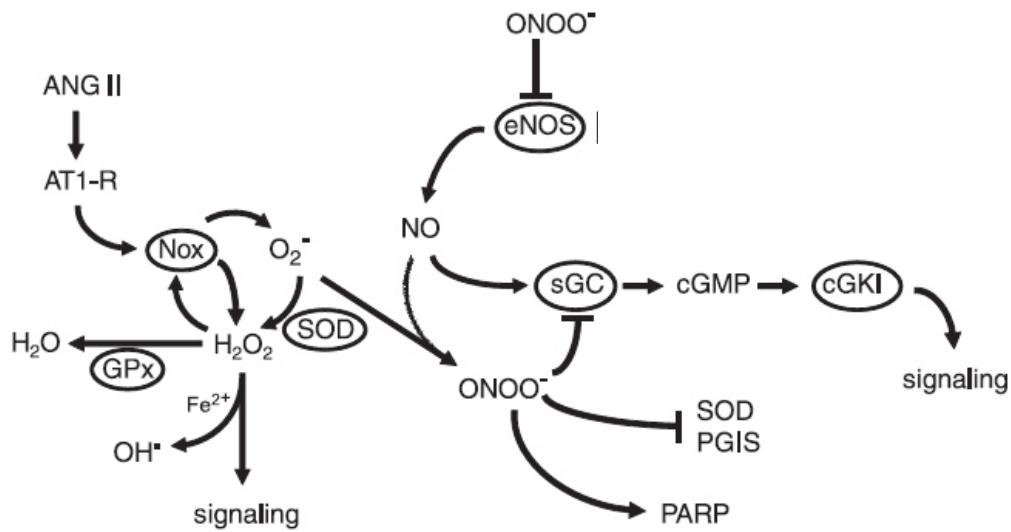


Figura 6. Interacciones entre el NO y los ROS. El NO que deriva de la eNOS (sintasa del óxido nítrico endotelial) actúa vía sGC (guanilato ciclasa) y el GMPc (GMP cíclico). El ONOO⁻ produce el desacople de la eNOS disminuyendo los niveles de síntesis de ON. Después de la activación de los RAT₁, la NADPHox produce anión O₂⁻, que puede directamente producir daño o se puede convertir en H₂O₂ (peróxido de hidrógeno) por acción de SOD (superóxido dismutasa) o bien, puede reaccionar con el NO para producir ONOO⁻. La NADPHox que en su estructura contiene la subunidad Nox4 puede producir directamente H₂O₂ que, a su vez, puede formar el radical OH· el cual es un mediador de daño tisular altamente reactivo. El H₂O₂ también puede ser degradado por la GPx (glutación peroxidasa) a H₂O. El ONOO⁻ inhibe la SOD y la prostaciclina sintasa y activa las poli-ADPribosas polimerasas. *Imagen adaptada de Faraci FM. Protecting against cerebrovascular disease in brain, 2011 [54].*

La activación del RAS cumple un rol prominente en el desarrollo de todas estas anomalías vasculares. La Ang II produce vasoconstricción, estrés oxidativo, inflamación, disfunción endotelial, aumento en la permeabilidad vascular, interrupción del acople neurovascular y alteración de la estructura vascular [54]. Tanto la Ang II como los ROS favorecen la expresión de citoquinas pro-inflamatorias que contribuyen a la enfermedad vascular [80, 102].

Las nuevas estrategias terapéuticas apuntan a la posible intervención durante las primeras etapas de la patología o incluso a la prevención de la misma. La hipertensión está relacionada con el desarrollo de la enfermedad cerebrovascular, lo cual produce un aumento en la posibilidad de los individuos de padecer demencia. Más aún, puede producir cambios en la pared de los vasos sanguíneos cerebrales, causando en primera instancia una disminución de la perfusión sanguínea y luego isquemia con la consecuente hipoxia, dando

inicio al desarrollo de la patología [104]. Respecto a esto, se ha visto que tanto la estructura como la función cerebrovascular se encuentran alteradas en la AD, el flujo sanguíneo cerebral basal esta disminuido y se encuentra atenuada la demanda de un aumento del flujo sanguíneo como consecuencia de la activación. Estos cambios cerebrovasculares generalmente preceden al establecimiento del déficit cognitivo [105].

1.4 Elección del modelo animal: administración intracerebroventricular (ICV) de estreptozotocina (STZ)

Al no conocer los eventos neuroquímicos que tienen lugar durante las primeras etapas del desarrollo de la AD, y en vista de que los modelos transgénicos de ratones son consecuencia de la manipulación genética directa, lo cual limita la posibilidad de estudiar el desarrollo de la forma esporádica de la enfermedad, es necesario generar modelos animales que permitan evaluar los cambios cerebrales que ocurren durante los estadios más tempranos de la misma.

La estreptozotocina (2-desoxi-2-(3-(metil-3-nitrosoureido)-D-glucopiranososa)) es una droga betacitotóxica que, al ser administrada de forma parenteral, produce la destrucción de las células beta del páncreas responsables de la síntesis y de la secreción de insulina, generando un cuadro de Diabetes Mellitus tipo 1. Debido a su estructura química, ingresa a las células del páncreas a través del transportador de glucosa GLUT-2, produce así una alquilación del ADN y una depleción de ATP y de NAD⁺. Por su estructura química también, induce la liberación de radicales libres [106].

Si bien, el mecanismo exacto a partir del cual ejerce su acción tóxica en el cerebro no está totalmente dilucidado, se cree que actuaría de forma semejante a como lo hace en el páncreas, es decir, ingresaría a las células a partir del transportador GLUT [106]. Se observaron cambios neuroquímicos, estructurales y en el comportamiento de las ratas que asemejan los observados en los pacientes que sufren demencia senil de tipo Alzheimer al ser administrada de forma central, mediante su inyección ICV en dosis que varían entre 1 mg/kg hasta 3 mg/kg, aplicada de una a tres veces [107, 108]. Por ejemplo, se observó que tres semanas después de su administración se producía una disminución en la utilización de la glucosa cerebral (hasta un 44%) [109] y una reducción de las enzimas claves glicolíticas en la corteza y el hipocampo [110] lo que resultó en una disminución de los compuestos ricos en energía ATP, creatinfosfato y GTP [111]. Así mismo, se reportó que luego de una

semana de tratamiento con STZ ICV hubo una disminución en la actividad de la enzima acetilcolina transferasa (AChT) a nivel del hipocampo, sostenida hasta por tres semanas [112], observándose también un aumento en la actividad de la AchE [113].

Así mismo, se evidenció un aumento en los niveles del producto de peroxidación lipídica MDA y disminución en los niveles del antioxidante glutatión. De hecho, la interrupción en el metabolismo glucídico y energético que se observa luego de la administración ICV de STZ se reconoce como posible fuente de estrés oxidativo, y estaría asociado al déficit cognitivo que se observa en estos animales [114].

En cuanto a los cambios morfológicos que ocurren luego de la administración de la droga, se observó: astrogliosis con aumento del marcador GFAP en las zonas peri y paraventriculares, en el hipocampo y en el estriado [115]; se reportaron procesos de inflamación, toxicidad axonal y de la mielina, aumento del volumen del sistema ventricular y pérdida neuronal [116].

Por último, los animales tratados con STZ ICV muestran un gran déficit cognitivo, con interrupción en el aprendizaje y la memoria. Además, se describió que la correlación entre la falta de discriminación del espacio en el test de Morris así como la disminución de la actividad de la AchT en el hipocampo de las ratas tratadas con STZ, se asemeja a los cambios colinérgicos, bioquímicos y cognitivos observados en la enfermedad de Alzheimer [117]. También se mostró que el estrés oxidativo y la reactividad de la glia inducidos por la inyección de STZ, observados a la semana de ser administrada la droga, son eventos que preceden la adquisición del déficit en la memoria [118]. Se encontró además, un aumento en la expresión de la proteína TAU así como un aumento en la relación p-TAU/TAU en el hipocampo de ratas tratadas con STZ a las 4 y 12 semanas posteriores a su administración; así como también se encontraron agregados de tipo A β en los capilares leptomeníngicos a las 12 semanas de inyectada la droga, aunque no se los pudo detectar 4 semanas posteriores a la inyección ICV de STZ [106].

Debido a la evidente interrelación que existe entre la activación del RAS cerebral y la enfermedad cerebrovascular por un lado, y a la asociación establecida entre esta última y la AD es que **nos propusimos evaluar el rol de los RAT₁ en un modelo animal de demencia que pueda reproducir los hallazgos más sobresalientes de los estadios más tempranos de la patología, como lo es la inyección ICV de STZ.**

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 Hipótesis general:

La angiotensina II cerebral modula los efectos neurotóxicos que se producen durante el desarrollo de la demencia.

2.1.1 Hipótesis específicas:

A) La angiotensina II cerebral participa en la disminución de la memoria provocada por la inyección intracerebroventricular de estreptozotocina.

B) La angiotensina II a través de los receptores AT₁, modula la activación neuronal inducida por estreptozotocina.

C) La angiotensina II a través de los receptores AT₁ estimula la expresión de citoquinas pro inflamatorias y el estrés oxidativo producidos durante el proceso inflamatorio inducido por la inyección intracerebral de estreptozotocina.

D) La angiotensina II cerebral induce cambios histomorfológicos como consecuencia de los procesos neurotóxicos desencadenados a partir de la administración intracerebroventricular de estreptozotocina.

2.2 Objetivo general:

Evaluar el rol de la angiotensina II cerebral en los procesos neurotóxicos que se desarrollan en un modelo animal de demencia.

2.2.1 Objetivos específicos:

Evaluar en el modelo animal de demencia provocado por la inyección intracerebroventricular (ICV) de estreptozotocina (STZ) el efecto del tratamiento vía oral con un bloqueante de los receptores AT₁ capaz de atravesar la barrera hematocefálica (candesartan) y con un inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina, también capaz de atravesar la barrera hematocefálica (captopril) sobre:

A) La memoria evaluada en un test de campo perforado, test reconocimiento de objetos, test de Morris y test de evitación pasiva.

B) La expresión del marcador de activación neuronal fos en el hipocampo, corteza y núcleos del estriado.

- C₁) Los productos de reacción del ácido tiobarbitúrico y los niveles de dienos conjugados en microvasos cerebrales.
- C₂) La expresión de los receptores AT₁ en microvasos cerebrales.
- C₃) La expresión del marcador de inflamación TNF α y de la proteína de shock térmico (HSP-70) en la microcirculación cerebral.
- D) Los cambios histomorfológicos que se producen como consecuencia de la administración de STZ.

MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Administración de las drogas y diseño experimental

3.1.1 Animales

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar con un peso entre 290 y 340 g, mantenidas a una temperatura controlada de $21 \pm 1^\circ\text{C}$, bajo un ciclo de luz/oscuridad de 12 hs (luz desde las 8 am hasta las 8 pm), con acceso libre a agua y comida. Todos los experimentos se realizaron bajo las normas establecidas en la Guía de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Católica de Córdoba de acuerdo con la Guía de Uso y Cuidado de Animales de Laboratorio del Instituto Nacional de Salud (NIH).

3.1.2 Administración de las drogas

Los animales recibieron desde el primer día de experimentación hasta el día de su sacrificio por gavage, un bloqueante de los receptores AT_1 (candesartan cilexetil, 3 mg/kg/día) o un inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina (captopril, 30 mg/kg/día), ambas drogas capaces de atravesar la barrera hematocefálica, o NaHCO_3 0,1 N como vehículo.

3.1.3 Cirugía

Ochos días posteriores al inicio del tratamiento vía oral, los animales se anestesiaron con ketamina/xilacina (75/5 mg/kg) para la implantación de cánulas guía de acero inoxidable (23G, 10 mm de largo) mediante el uso de un estereotáxico, en los ventrículos laterales de acuerdo a las siguientes coordenadas con respecto a bregma: antero posterior -0,92 mm; lateral $\pm 1,5$ mm; profundidad 3,5 mm [119]. Las cánulas se fijaron al cráneo utilizando cemento de acrílico dental y un tornillo de acero de 2 mm de largo. Luego de la cirugía los animales fueron colocados en cajas individuales, devueltos al bioterio y se les permitió un tiempo de reposo de 5 días.

3.1.4 Administración Intracerebroventricular (ICV) de Estreptozotocina (STZ)

Luego del período post cirugía, se administraron dos inyecciones de estreptozotocina (STZ, 3 mg/kg) en ambos ventrículos laterales con un intervalo de 48 hs. La administración se realizó utilizando una cánula de inyección de acero inoxidable (30G;

10,5 mm de largo) conectada a un tubo de polietileno (P50) montado sobre una jeringa Hamilton de 25 ul conectada a una bomba de microinfusión la cual permitió la administración precisa de la droga en un volumen de 2 ul en cada ventrículo en un período de 2 min. Se utilizó líquido cerebroespinal artificial (aCSF, 140 mM NaCl; 3 mM KCl; 1,2 mM CaCl₂; 1 mM MgCl₂; 1 mM Na₂HPO₄; 0,3 mM NaH₂PO₄; 3 mM D-glucosa; pH 7,3) como vehículo [106].

3.1.5 Grupos y Diseño Experimental

Los animales fueron tratados de acuerdo al siguiente protocolo:

Candesartan (3 mg/kg/día) - Captopril (30 mg/kg/día) - Vehículo						
día 1		día 8		día 12	día 14	día 22 a día 25
		cánulas		STZ – aCSF ICV		pruebas conductuales

Figura 7. Esquema representativo del diseño experimental.

Se formaron los siguientes grupos experimentales:

- Grupo 1: vehículo v.o/aCSF ICV (v/aCSF)
- Grupo 2: vehículo v.o/STZ ICV (v/STZ)
- Grupo 3: candesartan v.o/STZ ICV (cv/STZ)
- Grupo 4: candesartan v.o/aCSF ICV (cv/aCSF)
- Grupo 5: captopril v.o/STZ ICV (capt/STZ)
- Grupo 6: captopril v.o/aCSF ICV (capt/aCSF)

3.2 Pruebas de aprendizaje y memoria

Todas las pruebas conductuales se llevaron a cabo en una habitación con temperatura controlada de 21 ± 1°C. Los animales se colocaron en la habitación 1 h antes para su habituación y los experimentos se realizaron durante las 10:00-12:00 hs. El comportamiento de los animales se captó a través de una videocámara localizada de manera vertical sobre los aparatos y fueron grabados en una computadora ubicada en el cuarto contiguo a la sala de experimentación.

3.2.1 Prueba de Campo Perforado

Para evaluar el déficit en la memoria de trabajo un grupo de ratas fue sometido al test de campo perforado once días posteriores a la primera inyección de STZ. El aparato consistía en una caja de 60 x 60 x 30 cm (ancho, largo, alto) con 5 orificios de 3 cm de diámetro cada uno. La habitación se encontraba iluminada con una lámpara de 25 W ubicada 1,5 m por encima del aparato. Los animales fueron colocados de manera individual dentro del aparato y se les permitió la libre exploración durante 10 min. Cada rata se utilizó una sola vez. Como parámetros de exploración se midieron el tiempo y el número de veces que el animal introdujo la cabeza en cada orificio (head dipping time y head dipping number), así como el número de veces que olfateó cada orificio (sniffing number) [120]. La actividad locomotora de los animales se midió analizando la distancia recorrida por éstos (en cm) mediante el uso del programa informático Open Source Physics Tracker software versión 4.62.

3.2.2 Prueba de Reconocimiento de Objetos

Para medir la preferencia de los animales por un objeto nuevo, al que nunca fueron expuestos previamente se realizó el test de reconocimiento de objetos en otro grupo de ratas sometidas al mismo diseño experimental. El aparato consistió en una caja plástica de 60 x 60 x 30 cm (ancho, largo, alto) que contenía el piso cubierto con aserrín. Los objetos a ser discriminados fueron hechos de vidrio o plástico y existían por duplicado, nunca estuvieron asociados a ninguna recompensa para los animales y eran lo suficientemente pesados como para que no pudieran moverse. El procedimiento consistió en dos sesiones de habituación separadas por un intervalo de 1 h, donde se les permitió a las ratas la libre exploración por el campo durante 3 min. Veinticuatro horas después, comenzó la sesión experimental, la cual consistió en 2 sesiones de 3 min cada una separadas por un intervalo de 1 h. En la primera sesión (T_1) las ratas fueron expuestas a dos objetos exactamente iguales (A), y se midió el tiempo que pasaban explorando ambos objetos. En la segunda sesión (T_2), los animales se expusieron a una copia exactamente igual de los objetos a los que fueron expuestos en la sesión previa (A') y a un objeto nuevo (B), al que nunca habían sido expuestos previamente. Entre rata y rata la ubicación del objeto nuevo cambiaba con respecto a la del objeto viejo para evitar el factor de preferencia del lugar. La exploración de un objeto se definió como la acción de tocarlo con el hocico. Se midió el tiempo de exploración del objeto nuevo (OR) que fue definido como el tiempo de exploración de B

menos el tiempo de exploración de A' ($B-A'$), el índice de reconocimiento del objeto nuevo (IR) que se definió como el tiempo de exploración de B con respecto al tiempo de exploración total de ambos objetos ($B/B+A'$) [121], y el índice de discriminación del objeto nuevo definido como el tiempo de exploración del objeto nuevo con respecto al tiempo total de exploración de ambos objetos ($OR/B+A'$) [122].

3.2.3 Prueba de Morris

Para la evaluación de la memoria espacial, otro grupo de ratas fue sometido al laberinto acuático de Morris, el cual consistió en un tanque de agua circular de 150 cm de diámetro y 60 cm de alto, lleno con agua hasta una altura de 30 cm. La piscina se dividió en cuatro cuadrantes imaginarios (designados NO, NE, SO, SE), en el asignado como NO se colocó una plataforma de 10 cm de diámetro que se encontraba sumergida 2 cm por debajo de la superficie del agua. Cada una de las paredes de la habitación presentaba un elemento distintivo a partir de los cuales los animales podían ubicar la localización de la plataforma de escape y nadar hacia ella. A las ratas se las sometió a un período de entrenamiento que consistió en 4 sesiones separadas por 20 min (cada una comenzó desde un punto de partida distinto seleccionado al azar) por día durante 3 días, cada sesión presentó una tolerancia de 120 s para encontrar la plataforma escondida, si la rata no era capaz de encontrar la plataforma dentro de ese período de tiempo, era conducida por el operador hacia la plataforma y se dejaba allí durante 12 s. El tiempo que demoró cada animal en encontrar la plataforma se midió como tiempo de latencia (en segundos). Veinticuatro horas después de la fase de adquisición se llevó a cabo una prueba en donde la plataforma se encontraba ausente y se permitió que las ratas naden libremente durante 30 s, midiendo el tiempo que los animales pasaron en el cuadrante donde se encontraba la plataforma, así como la distancia recorrida por éstos (en cm) para llegar hacia el punto en que se encontraba la plataforma [123]. Este último parámetro se obtuvo mediante el análisis de los videos con el uso del programa informático Open Source Physics Tracker Software versión 4.62.

3.2.4 Prueba de Evitación Pasiva

El día posterior a la realización del test de campo perforado, la memoria en una conducta de evitación pasiva se estudió, en el mismo grupo de animales, en una prueba de aprendizaje basada en la preferencia de las ratas por los compartimientos oscuros. Se

utilizó una caja de 60 x 30 x 30 cm (largo, ancho, alto) dividida en dos compartimentos: el compartimento A estaba iluminado y el B estaba oscuro, ambos se encontraban separados por una puerta tipo guillotina de 8 x 5 cm. El piso del lado B contenía una rejilla metálica conectada a una fuente de electricidad. El primer día de la prueba los animales se colocaron en el compartimento A y luego de 2 min de habituación se abrió la compuerta para permitir el paso hacia el lado oscuro (los animales que tardaron más de 120 s en ingresar fueron descartados del experimento), inmediatamente después de su ingreso a este compartimento la compuerta se cerró. Luego de 30 s allí, se les aplicó un shock eléctrico de 0,3 mA durante 3 s. Las ratas fueron devueltas a su caja y trasladadas al bioterio nuevamente hasta el día siguiente. Veinticuatro horas después de realizado el test, los animales se colocaron nuevamente en el compartimento A y luego de 2 min se abrió la compuerta y se midió el tiempo que las ratas tardaron en ingresar al compartimento B (tiempo de latencia) [46].

3.3.1 Análisis histomorfológico

Inmediatamente después de las pruebas conductuales, otro grupo de ratas se anestesió con pentobarbital de sodio (50 mg/kg) y se perfundió a través del corazón con solución salina (con heparina 200 ul/L) primero y luego con 300 ml de paraformaldehído 4% en buffer fosfato (PB 0,1M; pH 7,4) para fijación del tejido. Una vez removidos los cerebros se mantuvieron en la misma solución fijadora durante la noche y luego se conservaron a 4°C en PB con sucrosa 30%. Luego, los cerebros se deshidrataron y se embebieron en parafina hasta formar un bloque. Se realizaron cortes coronales de 10 um desde la porción rostral a caudal de los bloques con un micrótopo (Rot Arcano) y los cortes obtenidos se recogieron en portaobjetos positivados. Luego se tiñeron con hematoxilina-eosina, se deshidrataron, aclararon en xilol y se colocaron debajo de un cubreobjetos con el montaje para histología DPX. Se tomaron fotografías de los cortes teñidos a un aumento de 200x con una cámara fotográfica Nikon DS-5M conectada a un microscopio invertido de epifluorescencia Nikon Eclipse TE2000-U [124].

3.3.2 Cuantificación de neuronas fos-IR

La inmunoreactividad de Fos se determinó en los núcleos caudado putámen dorso medial (CPu), en la corteza primaria motora (CxP) y en las áreas CA₁, CA₃ y GD del hipocampo.

Brevemente, el día del sacrificio del animal, las ratas se prepararon para la fijación del cerebro y posterior detección inmunohistoquímica de Fos. Para lo cual, los animales se anestesiaron con pentobarbital de sodio (50 mg/kg) y se perfundieron a través del corazón con 250 ml de solución fisiológica y heparina (200 ul/L) seguido de 300 ml de paraformaldehído al 4% en 0,1 M buffer fosfato (PB pH 7,4). Una vez removidos los cerebros se colocaron en la misma solución fijadora durante toda la noche, y luego se mantuvieron a 4°C en PB con sucrosa 30%. Se realizaron cortes coronales de 40 μ m utilizando un criostato (LEICA CM15105) que se recogieron en PB 0,01 M. Se colocaron en una mezcla de H₂O₂ 10% y metanol 10% hasta que culminó la aparición de burbujas. Luego, se incubaron en suero normal de caballo (NSH) al 10% (GIBCO, Auckland, NZ) en PB durante 2 hs para bloquear las uniones inespecíficas. Todas las secciones que se utilizaron para determinar la inmunoreactividad de Fos se hicieron utilizando el procedimiento de avidina-biotina peroxidasa. Brevemente, las secciones flotantes se incubaron durante la noche con un anticuerpo de conejo anti-fos (producido en conejos contra una sección de 14 aminoácidos, correspondiente a los residuos 4-17 de fos humano) (Ab-5; Oncogene Science, Manhasset, NY), diluido 1:20.000 en PB que contenía 2% NHS y 0,3% de Tritón X-100 (Flucka Analytical). Luego las secciones se sumergieron en PB 0,01 M con un anticuerpo secundario biotinilado (diluido 1:2.000 en NHS-PB 2%) durante 2 hs a temperatura ambiente. Se detectó la peroxidasa conjugada con hidrocloreuro de diaminobencidina (Sigma Chemical Co), la solución se intensificó con cloruro de cobalto 1% y sulfato de amonio y níquel 1%. Este método reveló un producto de reacción nuclear violeta. Por último, los cortes se montaron en portaobjetos gelatinizados, se dejaron secar durante la noche, se deshidrataron, aclararon en xilol y se colocaron debajo de un cubreobjetos con el montaje para histología DPX (Flucka Analytical) [125]. Las imágenes que contenían los núcleos fos-IR se capturaron mediante un sistema computarizado que incluía un microscopio (Leica DM 4000B) equipado con una cámara conectada a un sistema de contraste y fueron delimitados de acuerdo al atlas de Paxinos y Watson [119] para la áreas CPu dorso medial (0,48 mm con respecto a bregma) y CxP (1,70 mm con respecto a bregma) y para CA₁, CA₃ y GD del hipocampo (correspondiente a -3,30 mm con respecto a bregma). Todas las áreas cerebrales se procesaron de igual manera para los distintos grupos.

Las imágenes se estandarizaron mediante el programa de análisis de imágenes Adobe Photoshop (versión 5.5). Las neuronas fos-IR se identificaron por su color negro

intenso en el núcleo y se contaron estableciendo un rango en el tamaño del núcleo celular (de 8 a 12 μm de diámetro). 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 $0,37 \text{ mm}^2$ (que corresponde a una ampliación de 200X). Los resultados proporcionan datos relativos de la expresión de fos-IR y no estimaciones precisas del número absoluto de células. El recuento fue realizado por dos operadores a doble ciego en cada sección analizada [125].

3.3.3 Aislamiento de microvasos cerebrales

La técnica de aislamiento de microvasos cerebrales fue realizada de acuerdo al protocolo establecido por Yamakawa y col. [126]. El día del sacrificio los animales se anestesiaron con pentobarbital de sodio (50 mg/kg), luego se realizó una perfusión transcardíaca con 300 ml de solución fisiológica con heparina (200 ul/L) durante 30 min. Una vez finalizada la perfusión se procedió a la extracción del cerebro en frío, el mismo se cortó en trozos de 1 mm^3 en 1 ml de buffer HEPES-sucrosa frío (0,32 M sucrosa; 3 mM HEPES; pH 7,4) y luego se homogeneizó en 4 ml de buffer HEPES-sucrosa frío. El homogenato obtenido se centrifugó a 1000g durante 10 min a 4°C y el pellet obtenido se resuspendió en 2 ml de buffer HEPES-sucrosa frío. Nuevamente se centrifugó a 1000g durante 10 min a 4°C descartando la mitad superior del sobrenadante obtenido. Luego se añadió 1 ml de buffer HEPES-sucrosa frío y se centrifugó nuevamente a 100g durante 30 s a 4°C , se extrajo el sobrenadante en un nuevo tubo y se lo mantuvo en frío para su posterior utilización. Por otro lado, el pellet obtenido se resuspendió en 2,5 ml de buffer HEPES-sucrosa frío y se centrifugó nuevamente a 100g durante 30 s a 4°C , se extrajo el sobrenadante y se juntó con el otro que estaba almacenado en frío. Se repitió este último punto una vez más. A los sobrenadantes obtenidos se les agregó 1 ml de buffer HEPES-sucrosa frío y se centrifugó a 200g durante 2,5 min a 4°C y se descartó el sobrenadante. Nuevamente, el pellet obtenido se resuspendió en 3 ml de buffer HEPES-sucrosa frío y se centrifugó a 200g durante 2 min a 4°C . Al pellet obtenido se le agregaron 2,5 ml de PBS-0,1% BSA frío y se centrifugó a 200g durante 3 min a 4°C , se descartó el sobrenadante y se agregó 1 ml de PBS-BSA frío nuevamente, se homogeneizó bien y se apartó una alícuota para la evaluación histomorfológica de los microvasos cerebrales obtenidos (ver figura 8). Luego se centrifugó a 14000g durante 10 min a 4°C y el pellet obtenido se almacenó a -70°C hasta su posterior utilización.

3.3.3.1 Determinación de los productos de reacción del ácido tiobarbitúrico

Para determinar el índice de peroxidación lipídica en los microvasos cerebrales, se utilizó el método descrito por Ohkawa y col. [127] que permite medir el producto de reacción del ácido tiobarbitúrico, malondialdehído (MDA), en tejidos animales. Para lo cual se extrajeron los pellets que contenían las muestras de microvasos cerebrales almacenados a -70°C y se llevaron a T ambiente. Luego se añadieron 30 μl de KCl 1,15% a cada uno de los tubos y se homogeneizó en frío durante 10 min. Se tomó una alícuota de 15 μl que se reservó para la posterior determinación de los dienos conjugados y 2 μl se utilizaron para la determinación de proteínas de las muestras por el método de Bradford [128]. A la alícuota restante se le agregaron 15 μl de SDS 8,1%; 150 μl de ácido acético 20% pH 3,5 y 175 μl de ácido tiobarbitúrico 0,8%. Se homogeneizó y se llevó a baño de agua hirviendo durante 1 h. Luego de retirar los tubos del baño de agua se procedió a enfriarlos con agua corriente durante 5 min, se centrifugaron durante 10 min a 4000 rpm y se leyó la absorbancia del compuesto coloreado formado a una longitud de onda de 532 nm. Paralelamente se realizó una curva patrón con tetrametoxipropano (TMP) para la determinación de los niveles de MDA ($\mu\text{mol}/\mu\text{g}$ proteínas) de las muestras.

3.3.3.2 Determinación de los dienos conjugados

Se adicionaron 800 μl de cloroformo y 400 μl de metanol (Reactivo de Folch) calentados previamente a 45°C a los 15 μl del homogenato de microvasos cerebrales reservados en el apartado anterior. Se llevó al vórtex durante 3 min y se centrifugó durante 5 min a 2500 rpm. Se separaron 1000 μl del tercio inferior del tubo y la alícuota obtenida se secó con N_2 durante 15 min. Se resuspendió en 1000 μl de hexano y nuevamente se llevó al vórtex durante 2 min. El homogenato obtenido se leyó a una longitud de onda de 233 nm en un espectrofotómetro previo ajuste del cero con hexano. La determinación de los dienos conjugados en la muestra se determinó utilizando el coeficiente de extinción molar $29000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [129].

3.3.3.3 Expresión de los RAT_1 y HSP-70

Para la determinación de los RAT_1 y de la proteína de shock térmico setenta (HSP-70) en los microvasos cerebrales por la técnica de inmunofluorescencia, los microvasos obtenidos de acuerdo a cómo fue descrito previamente, se sembraron en portaobjetos positivados y se dejaron secar en estufa a 37°C durante 4 h para la determinación del RAT_1

y durante 30 min para la determinación de HSP-70. Luego, para la determinación de HSP-70 se fijaron los vidrios en paraformaldehído 4% en PBS pH 7,4 durante 10 min. Inmediatamente las muestras fueron permeabilizadas con Tritón X-100 1% en PBS y se lavó 2 veces con PBS durante 7 min. Luego se bloquearon las uniones inespecíficas con PBS-BSA 1% por 50 min, seguido de dos lavados con PBS durante 5 min. Las muestras fueron incubadas con el Ac 1° (monoclonal hecho en ratón contra la HSP-70 de rata, dilución 1:400, Sigma Chemical Co) a 4 °C durante 24 h. Al otro día se realizaron dos lavados con PBS-Tween 0,05% durante 5 min y dos lavados con PBS durante 5 min. Se incubaron las muestras con Ac 2° conjugado con el fluorocromo Alexa Fluor-555 (hecho en cabra contra ratón, dilución 1:400, Abcam). Nuevamente se lavó dos veces con PBS-Tween 0,05% y con PBS. Se cubrió con medio de montaje y se observaron los cortes en el microscopio de fluorescencia con el objetivo de 20x.

Para la determinación del RAT₁, luego de secar los microvasos en estufa se procedió a bloquear las uniones inespecíficas con PBS-BSA 1% como se mencionó previamente. Luego de los lavados se incubaron las muestras con Ac 1° anti-RAT₁ (hecho en ratón contra rata, dilución 1:100) durante 24 h a 4°C. Al otro día se lavó como fue descrito previamente y se incubó con Ac 2° conjugado con el fluorocromo Alexa Fluor-555 (hecho en cabra anti ratón, dilución 1:400, Abcam). Nuevamente se lavó 2 veces con PBS-Tween 0,05% y posteriormente con PBS. Se cubrió con medio de montaje y se observaron los cortes en un microscopio invertido de epifluorescencia Nikon Eclipse TE2000-U a un aumento de 200x, conectado a una cámara de video Nikon DS-5M.

3.3.4 Cuantificación de astrocitos GFAP-IR

La inmunoreactividad de GFAP se determinó en los núcleos caudado putámen dorsal (CPu), en corteza frontal (CxF) y en el GD del hipocampo.

Brevemente, el día del sacrificio del animal, luego de finalizadas las pruebas conductuales, las ratas se prepararon para la fijación del cerebro y posterior detección inmunohistoquímica de GFAP. Para lo cual, los animales se anestesiaron con pentobarbital de sodio (50 mg/kg) y se perfundieron a través del corazón con 250 ml de solución fisiológica y heparina (200 ul/L) seguido de 300 ml de paraformaldehído al 4% en 0,1 M PB pH 7,4. Una vez removidos los cerebros se colocaron en la misma solución fijadora durante toda la noche, y luego se mantuvieron a 4°C en PB con sucrosa 30%. Se realizaron cortes coronales de 20 um utilizando un criostato (LEICA CM15105) que se recogieron en

PB 0,01 M. Se colocaron en una mezcla de H₂O₂ 10% y metanol 10% hasta que culminó la aparición de burbujas. Luego, se incubaron en NSH al 10% (GIBCO, Auckland, NZ) en PB durante 2 hs para bloquear las uniones inespecíficas. Todas las secciones que se utilizaron para determinar la inmunoreactividad de GFAP se hicieron utilizando el procedimiento de avidina-biotina peroxidasa. Brevemente, las secciones flotantes se incubaron durante la noche con un anticuerpo de ratón anti-GFAP diluido 1:1.000 en PB que contenía 2% NHS y 0,3% de Tritón X-100 (Flucka Analytical). Luego las secciones se sumergieron en PB 0,01 M con un anticuerpo secundario biotinilado (diluido 1:3.000 en NHS-PB 2%) durante 2 hs a temperatura ambiente. Se detectó la peroxidasa conjugada con hidrocloreuro de diaminobencidina (Sigma Chemical Co), la solución se intensificó con cloruro de cobalto 1% y sulfato de amonio y níquel 1%. Por último, los cortes se montaron en portaobjetos gelatinizados, se dejaron secar durante la noche, se deshidrataron, aclararon en xilol y se colocaron debajo de un cubreobjetos con el montaje para histología DPX (Flucka Analytical) [125]. Las imágenes que contenían los astrocitos GFAP-IR se capturaron mediante un sistema computarizado que incluía un microscopio (Leica DM 4000B) equipado con una cámara conectada a un sistema de contraste y fueron delimitados de acuerdo al atlas de Paxinos y Watson [119] para la áreas CPu dorsal y CxF (0,48 mm y 2,20 mm con respecto a bregma) y para GD del hipocampo (-3,30 mm con respecto a bregma). Todas las áreas cerebrales se procesaron de igual manera para los distintos grupos. Se tuvieron en cuenta ambos hemisferios cerebrales para cada área.

3.3.5 Extracción de líquido cefalorraquídeo

Para la extracción de líquido cefalorraquídeo (LCR) de los animales se siguió el método descrito por Nigori y col. [130]. Brevemente, luego de anestesiarse las ratas con pentobarbital de sodio (50 mg/kg), se colocaron en un estereotáxico con la cabeza sostenida a un ángulo de 45°. Se aplicó alcohol 70° sobre la superficie de la cabeza del animal, produciéndose de esta manera la dilatación de la cisterna magna que podía percibirse con forma de rombo al tacto del operador. Una aguja (23G) conectada por medio de un tubo de polietileno (P50) a una jeringa de 1ml, se introdujo en forma vertical a la altura del cuarto ventrículo bajando suavemente hasta sentir una liberación de la presión, luego suavemente se produjo la aspiración del LCR y la muestra obtenida se guardó en un tubo tipo eppendorf de 500 ul a -20°C para su posterior procesamiento.

3.3.5.1 Determinación del factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) en muestras LCR

Los niveles de TNF α del LCR fueron determinados a través de la técnica de ELISA, utilizando 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 (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, 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.

3.3.6 Determinación del volumen de los ventrículos laterales

Para la determinación del volumen de los ventrículos laterales se utilizó otro grupo de ratas. El día de su sacrificio, los animales se anestesiaron con pentobarbital de sodio (50 mg/kg) y luego fueron decapitados. Se extrajeron los cerebros que inmediatamente fueron colocados en una solución de formol 10 % v/v para su conservación y fijación. Una vez fijados, se realizaron cortes coronales de 100 μ m con un micrótopo de congelación que se recogieron en portaobjetos y se colorearon con azul de bromofenol como coloración de contraste. Los cortes abarcaron las secciones de bregma desde +2,2 hasta -1,4 mm, según el atlas de Paxinos y Watson [119]. Inmediatamente después de la coloración se tomaron fotografías con una lupa conectada a una computadora con un aumento de 30x. El volumen de ambos ventrículos laterales se determinó mediante la utilización del programa informático ImajeJ 1.46f (NIH, USA).

3.4 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se analizaron por medio del análisis de varianza (ANOVA) a una vía utilizando como factor en todos los análisis, el tratamiento vía oral con candesartan /vehículo o captopril/vehículo y la inyección ICV de STZ o aCSF. En la prueba de Morris se usó ANOVA II empleando como segundo factor el día de entrenamiento y en la prueba del campo perforado se usó como segundo factor el orden de exploración de los orificios. En caso de existir una interacción u observación de un efecto principal, se utilizaron los post test de Newman-Keuls y de Bonferroni para el análisis comparativo de las medias. Se consideró significativo un valor de $p < 0,05$. Los resultados presentados se expresan como la media \pm ESM. El análisis se realizó por medio del programa informático GraphPad Prism 4.0, GraphPad software, Inc.

RESULTADOS

4. EFECTO DEL BLOQUEO DE LOS RAT₁ DE ANGIOTENSINA II CEREBRAL SOBRE LA MEMORIA, LA INFLAMACIÓN Y EL ESTRÉS OXIDATIVO EN EL MODELO DE DEMENCIA ANIMAL POR STZ

4.1 Evaluación de la conducta

4.1.1 Efecto del pretratamiento con candesartan sobre la memoria de trabajo evaluada en el test de campo perforado

El análisis del número de veces que los animales introdujeron la cabeza en cada orificio, el tiempo y olfateo de los mismos, nos permitió estudiar la distribución de estos parámetros entre los distintos orificios del campo perforado. 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 (figura 8). 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 el análisis de varianza a dos vías (ANOVA II), no se hallaron diferencias significativas en el número de orificios explorados entre tratamientos. El valor del estadístico F para el factor tratamiento (v/aCSF, v/STZ, cv/STZ y cv/aCSF) fue $F_{(3,145)} = 2,26$ $p = 0,084$. Sin embargo, se encontraron diferencias significativas en el orden de exploración (más explorado a menos explorado, 1-5) $F_{(4,145)} = 35,34$ $p < 0,0001$. La interacción entre ambos factores $F_{(12,145)} = 0,86$ no fue significativa, $p = 0,59$. El post test de Bonferroni mostró que el orificio más explorado presentaba mayor número de visitas en el grupo v/STZ con respecto al grupo v/aCSF, $t = 2,65$ $p < 0,05$ (figura 8 A). Este aumento no se encontró en el grupo de animales tratados previamente con candesartan (cv/STZ), ni en aquellos tratados con candesartan *per se* (cv/aCSF).

Al analizar la distribución de la exploración dentro de los tratamientos encontramos que las ratas inyectadas ICV con STZ presentaron una disminución significativa en el número de veces que introdujeron la cabeza en los orificios, entre el más explorado (1) y el siguiente (2) (orificio 1 vs orificio 2, $t = 2,82$ $p < 0,001$) (figura 8 B). Sin embargo, en el grupo de ratas controles (v/aCSF) la disminución se presentó entre el número de veces que introdujeron la cabeza en el tercer orificio con respecto al de mayor exploración (orificio 3

vs orificio 1, $t = 2,55$ $p < 0,05$) (figura 8 B). Los animales pretratados con candesartan e inyectados ICV con STZ presentaron una disminución significativa en la exploración a partir del tercer orificio (orificio 1 vs orificio 3, $t = 3,88$ $p < 0,001$). Del mismo modo, en el grupo tratado con el bloqueante AT_1 *per se* (cv/aCSF), se encontró una disminución significativa a partir del orificio 3 con respecto al orificio más explorado (orificio 1 vs orificio 3, $t = 2,69$ $p < 0,05$).

En el análisis del tiempo de exploración, al igual que en el análisis del número de orificios explorados, no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos, $F_{(3,145)} = 2,08$ $p = 0,105$ (figura 8 B); en tanto que el factor orden de exploración fue altamente significativo $F_{(4,145)} = 31,15$ $p < 0,0001$ y no significativa la interacción entre ambos factores, $F_{(12,145)} = 1,12$ $p = 0,352$. El post test de Bonferroni mostró que las ratas inyectadas ICV con STZ pasaron más tiempo introduciendo la cabeza en el orificio más explorado (1) que las ratas controles (v/STZ vs v/aCSF, $t = 3,39$ $p < 0,01$) y el pretratamiento con candesartan previno este aumento, encontrándose una disminución significativa entre los grupos v/STZ vs cv/STZ, $t = 2,79$ $p < 0,05$.

Al analizar la distribución dentro de los tratamientos, encontramos que las ratas inyectadas ICV con STZ presentaron una disminución significativa en el tiempo de exploración de los orificios entre el más explorado (1) y el siguiente (2) (orificio 1 vs orificio 2, $t = 4,64$ $p < 0,001$) (figura 8 B). Sin embargo, en el grupo de ratas controles (v/aCSF) la disminución se presentó entre el tiempo de exploración del último orificio con respecto al de mayor exploración (orificio 5 vs orificio 1, $t = 2,99$ $p < 0,05$), (figura 8 B). Los animales pretratados con candesartan e inyectados ICV con STZ presentaron una disminución significativa en el tiempo de exploración a partir del cuarto orificio (orificio 1 vs orificio 4, $t = 4,20$ $p < 0,001$). Mientras que en el grupo tratado con el bloqueante *per se*, se encontró una disminución significativa a partir del orificio 3 con respecto al orificio más explorado, (orificio 1 vs orificio 3, $t = 3,44$ $p < 0,01$).

Al igual que en los parámetros descriptos anteriormente, en el análisis del número de veces que los animales olfatearon cada orificio (figura 8 C), no se hallaron diferencias entre los tratamientos $F_{(3,145)} = 3,13$ $p = 0,27$ y diferencias altamente significativas en el factor orden de exploración $F_{(4,145)} = 34,72$, $p < 0,0001$. La interacción entre ambos factores no fue significativa $F_{(12,145)} = 1,005$ $p = 0,44$. En el caso del grupo v/STZ se observó una disminución significativa a partir del segundo orificio más explorado con respecto al primero (orificio 2 vs orificio 1, $t = 5,55$ $p < 0,001$). En cambio las ratas

controles presentaron una disminución significativa a partir del tercer orificio (orificio 3 vs orificio 1, $t = 2,97$ $p < 0,05$). Los animales que recibieron el pretratamiento con candesartan presentaron, al igual que los controles, una disminución significativa a partir del tercer orificio (orificio 3 vs orificio 1, $t = 3,45$ $p < 0,05$).

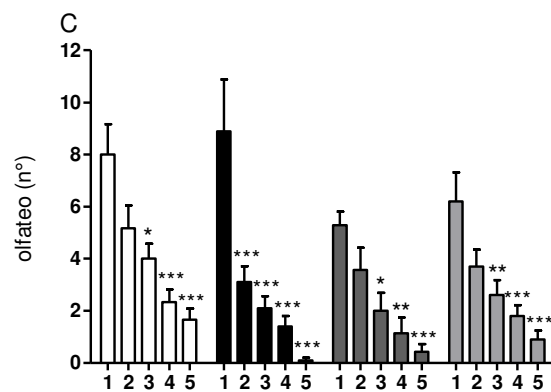
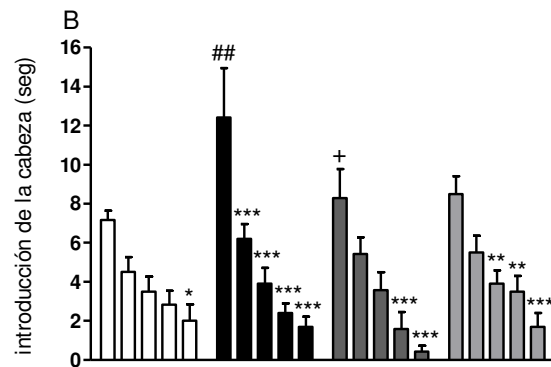
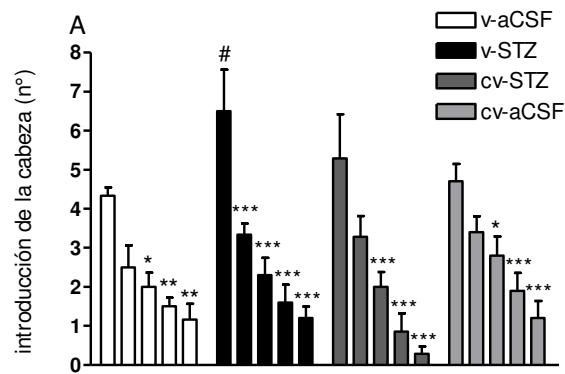


Figura 8. Efecto del pretratamiento con candesartan sobre: A) el número de veces que los animales introdujeron la cabeza en cada orificio, B) el tiempo que cada animal mantuvo la cabeza dentro de cada orificio, expresado en segundos, C) el número de veces que cada animal olfateó cada orificio. Los orificios se encuentran en orden decreciente de exploración (del más explorado al menos explorado). Los datos se expresan como la media \pm ESM de los tratamientos v/aCSF (control, barras blancas), v/STZ (barras negras), cv/STZ (barras gris oscura) y cv/aCSF (barras gris clara). # $p < 0,05$ ## $p < 0,01$ con respecto al mismo orificio entre los tratamientos; + $p < 0,05$ con respecto al mismo orificio

entre los tratamientos; * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ con respecto al orificio más explorado dentro del mismo tratamiento. $n = 9-10$ animales por grupo.

Por último, observamos que los tratamientos no afectaron la locomoción de los animales, ya que no se encontraron diferencias significativas en la distancia recorrida en el campo perforado $F_{(3,34)} = 0,688$, $p = 0,565$ (figura 9).

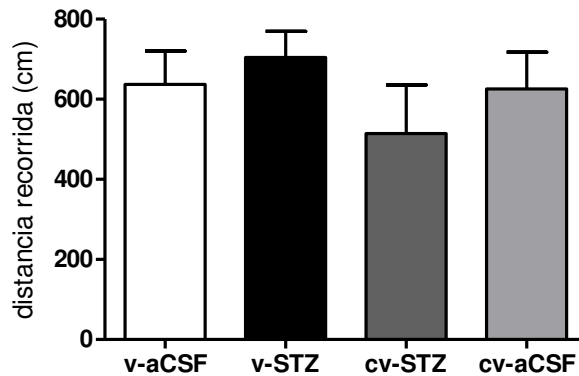


Figura 9. Distancia recorrida, expresada en centímetros, en el campo perforado por los animales sometidos a los tratamientos v/aCSF (control, barra blanca), v/STZ (barra negra), cv/STZ (barra gris oscuro) y cv/aCSF (barra gris claro). Los datos se expresan como la media \pm ESM. $n = 9-10$ animales por grupo.

4.1.2 Efecto del pretratamiento con candesartan sobre la memoria de reconocimiento de objetos

En la figura 10 se muestran el índice de reconocimiento (IR) y el índice de discriminación (ID) para un objeto nuevo con respecto a uno que fue presentado a los animales previamente. En el ANOVA I se encontraron diferencias entre los tratamientos: $F_{(3,46)} = 5,33$ $p = 0,003$. El post test de Newman-Keuls mostró que los animales inyectados ICV con STZ presentaron una disminución significativa en el índice de reconocimiento del objeto nuevo con respecto a las ratas controles en la sesión de prueba (T_2) (v/STZ vs v/aCSF, $q = 5,38$ $p < 0,01$) (figura 10 A) y que el pretratamiento con candesartan previno el deterioro en la memoria de reconocimiento de objetos (cv/STZ vs v/STZ, $q = 3,20$ $p < 0,05$). Igualmente se produjo una disminución significativa en el índice de discriminación del objeto nuevo como consecuencia de la administración de STZ, con respecto a las ratas controles (v/STZ vs v/aCSF, $q = 5,38$ $p < 0,01$), mientras que el pretratamiento con

candesartan previno esta disminución, encontrándose un aumento en los grupos v/STZ vs cv/STZ, $q = 3,20$ $p < 0,05$ (figura 10 B).

Como medida de la motivación de los animales por la exploración, evaluamos el tiempo de exploración total de ambos objetos idénticos durante la sesión de entrenamiento (T_1). No se observaron diferencias significativas entre los tratamientos ($F_{(3,46)} = 0,211$ $p = 0,889$), lo cual significa que el tratamiento no afectó la capacidad de exploración de los animales y que, por lo tanto, los resultados obtenidos durante la sesión de prueba (T_2) revelan un deterioro en la memoria en el grupo v/STZ (figura 11).

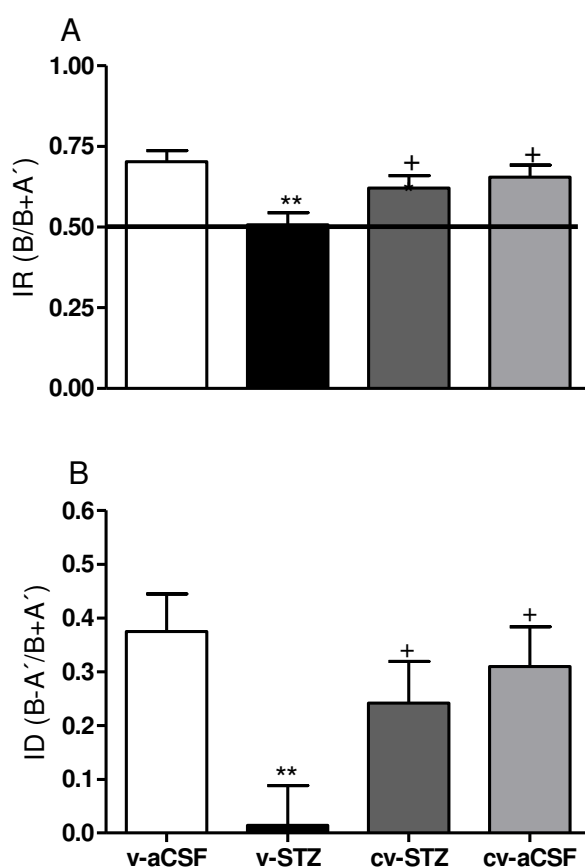


Figura 10. Efecto del pretratamiento con candesartan en el test de reconocimiento de objetos durante la sesión de prueba (T_2). A) índice de reconocimiento, expresado como la relación entre el tiempo de exploración del objeto nuevo con respecto al tiempo de exploración total de ambos objetos nuevo y viejo ($IR = B/B+A'$) y B) el índice de discriminación, expresado como la relación entre la diferencia en el tiempo de exploración del objeto nuevo con respecto al objeto viejo y entre el tiempo de exploración total de ambos objetos nuevo y viejo ($ID = B-A'/B+A'$) de los animales sometidos a los tratamientos v/aCSF (control, barras blancas), v/STZ (barras gris oscuro), cv/STZ (barras gris claro) y cv/aCSF (barras con líneas horizontales). Los valores se expresan como la

media \pm ESM. ** $p < 0,01$ con respecto al grupo control (v/aCSF). + $p < 0,05$ con respecto al grupo v/STZ. $n = 13$ animales por grupo.

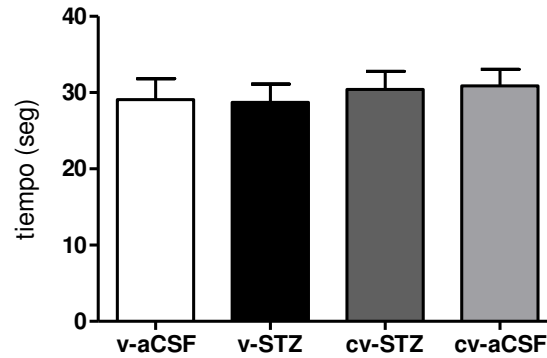


Figura 11. Tiempo de exploración, expresado en segundos, de ambos objetos idénticos (A+A) durante T_1 (entrenamiento) en el test de reconocimiento de objetos para los animales sometidos a los tratamientos v/aCSF (control, barra blanca), v/STZ (barra gris oscuro), cv/STZ (barra gris claro) y cv/aCSF (barra con líneas horizontales). Los valores se expresan como la media \pm ESM. $n = 13$ animales por grupo.

4.1.3 Efecto del pretratamiento con candesartan sobre la memoria espacial y de referencia evaluadas en el test de Morris

La figura 12 muestra el tiempo de latencia de los animales durante la fase de entrenamiento. Se puede observar que las ratas controles fueron capaces de desarrollar un proceso de aprendizaje a medida que las sesiones fueron avanzando, no así, las ratas inyectadas ICV con STZ. En el análisis ANOVA II no se hallaron diferencias significativas entre los tratamientos $F_{(3,120)} = 1,22$ $p = 0,307$. Sin embargo, se encontraron diferencias para el factor día de entrenamiento $F_{(2,120)} = 191,3$ $p < 0,0001$ y la interacción entre ambos factores no fue significativa $F_{(6,120)} = 1,105$ $p = 0,364$. El post test de Bonferroni mostró que las ratas inyectadas ICV con STZ presentaron un aumento significativo en el tiempo de latencia el último día del entrenamiento con respecto a los animales controles (v/STZ vs v/aCSF, $t = 2,53$ $p < 0,05$) (figura 12 A). Las ratas pretratadas con candesartan e inyectadas ICV con STZ se comportaron de la misma manera que los controles, es decir, presentaron una disminución en el tiempo de latencia los sucesivos días de entrenamiento.

Cuando cada sesión fue analizada por separado se observó que las ratas inyectadas ICV con STZ presentaron un aumento en el tiempo que tardaron en encontrar la plataforma

la última sesión del primer día de entrenamiento con respecto a la sesión correspondiente en las ratas controles. Con el análisis ANOVA II se hallaron diferencias significativas para el factor tratamiento $F_{(3,120)} = 4,77$ $p = 0,004$ y para el factor día de entrenamiento $F_{(2,120)} = 4,83$ $p = 0,009$. La interacción entre ambos factores fue de $F_{(6,120)} = 2,09$ $p = 0,059$. El post test de Bonferroni mostró que los animales que recibieron la administración central de STZ presentaron un aumento significativo del tiempo de latencia la última sesión (sesión 4) del primer día de la fase de entrenamiento con respecto a los animales controles (v/STZ vs v/aCSF, $t = 4,01$ $p < 0,001$) (figura 12 B), mientras que el bloqueo de los RAT_1 previno este aumento (cv/STZ vs v/STZ, $t = 3,71$ $p < 0,001$) (figura 12 B).

El día de la prueba, cuando la plataforma estaba ausente, no se observaron diferencias significativas en cuanto al tiempo que los animales nadaron en el cuadrante que contenía la plataforma ($F_{(3,44)} = 0,791$ $p = 0,454$) (figura 13 A), ni en la distancia recorrida por éstos para llegar hasta el punto donde se encontraba la plataforma ($F_{(3,44)} = 0,877$ $p = 0,460$) (figura 13 B).

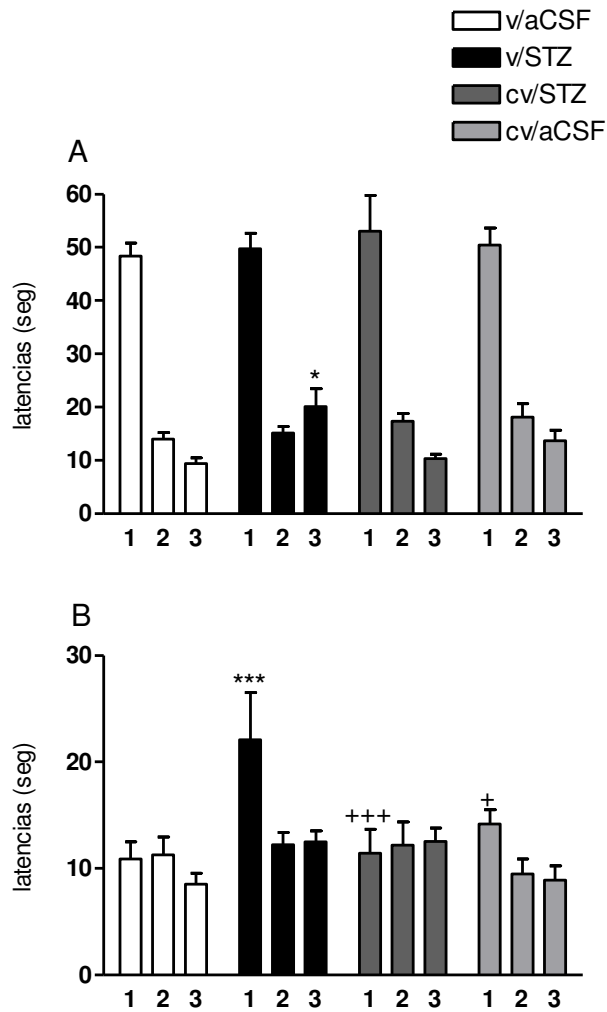


Figura 12. Tiempo de latencia, expresado en segundos, durante la fase de entrenamiento en el test de Morris. A) promedio de las cuatro sesiones de los días 1, 2 y 3 B) sesión 4 de los días 1, 2 y 3 de la fase de entrenamiento. Los animales fueron sometidos a los tratamientos v/aCSF (control, barras blancas), v/STZ (barras negras), cv/STZ (barras gris oscuro) y cv/aCSF (barras gris claro). Los datos se expresan como la media \pm ESM. * $p < 0,05$ *** $p < 0,001$ con respecto a la sesión correspondiente del grupo control (v/aCSF). + $p < 0,05$ +++ $p < 0,001$ con respecto a la sesión correspondiente del grupo v/STZ. $n = 12$ animales por grupo.

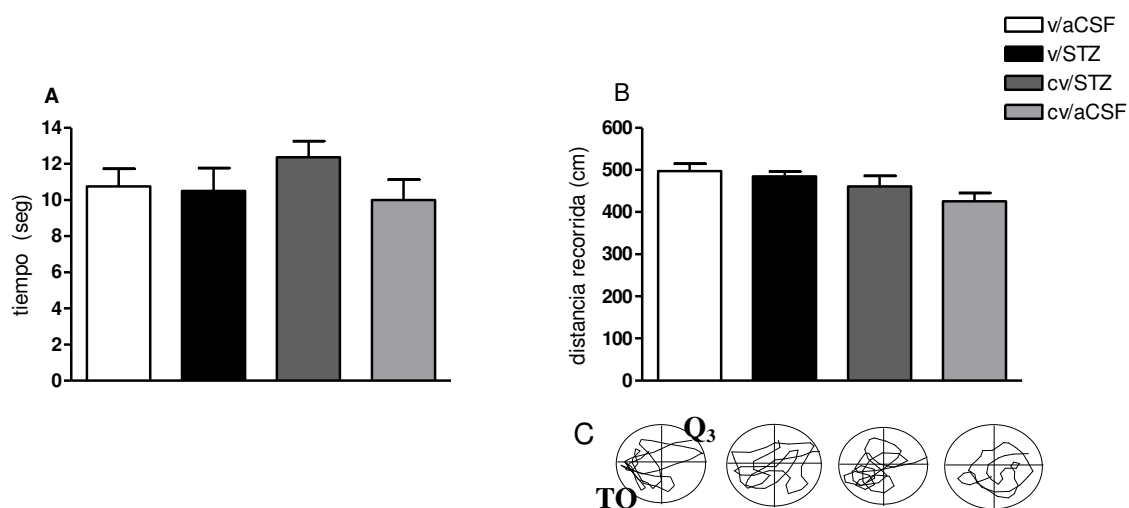


Figura 13. A) Tiempo de exploración, expresado en segundos, sobre el cuadrante donde se encontraba la plataforma (TQ). B) Distancia recorrida, expresada en centímetros, por los animales desde el punto de partida (Q₃) hasta el punto en que se encontraba la plataforma durante la fase de adquisición. C) Esquema representativo de la trayectoria recorrida por un animal. Los valores se expresan como la media ± ESM en los tratamientos v/aCSF (control, barras blancas), v/STZ (barras negras), cv/STZ (barras gris oscuro) y cv/aCSF (barras gris claro). n = 12 animales por grupo.

4.1.4 Efecto del pretratamiento con candesartan sobre la memoria de evitación pasiva

No se encontraron diferencias significativas en la memoria de evitación pasiva entre los distintos tratamientos (tabla 2). En el ANOVA I el valor del estadístico $F_{(3,28)} = 0,445$ $p = 0,723$.

Tabla 2. Tiempo de adquisición y tiempo de retención, expresado en segundos, en el test de evitación pasiva. Los datos se expresan como la media ± ESM de los tratamientos v/aCSF (control), v/STZ, cv/STZ y cv/aCSF. n = 9-10 animales por grupo.

Tratamiento	Tiempo de latencia (seg)	
	Tiempo de adquisición	Tiempo de retención
v/aCSF	27,4 ± 11,3	133,3 ± 30,1
v/STZ	30,4 ± 9,9	166,6 ± 13,3
cv/STZ	29,5 ± 9,6	133,0 ± 24,3
cv/aCSF	27,6 ± 14,7	144,2 ± 35,8

4.2 Efecto del bloqueo de los receptores AT_1 sobre los marcadores histomorfológicos, el estrés oxidativo y la inflamación

4.2.1 Efecto del pretratamiento con candesartan sobre los cambios histológicos en la zona CA_1 del hipocampo

Se analizó la arquitectura del hipocampo en cortes teñidos con hematoxilina-eosina y se observó que la administración ICV de STZ produjo una alteración en el reordenamiento de las células piramidales de la región CA_1 , figura 14. En cuanto a la morfología de las células, pudimos observar que los animales tratados con STZ presentaron menor cantidad de neuronas en esta región. Algunas de las células presentes perdieron la conservación de su forma presentando núcleos piramidales, bordes ahusados y cromatina más compacta. Mientras que, el pretratamiento con candesartan previno las alteraciones producidas por la administración ICV de STZ.

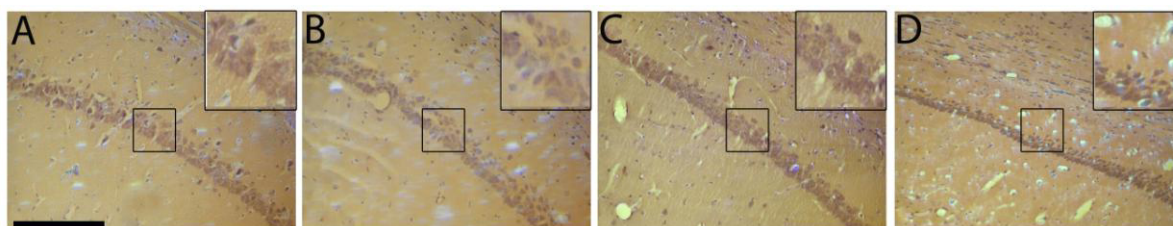


Figura 14. Microfotografías de la región CA_1 (cornu ammonis uno) del hipocampo coloreadas con hematoxilina-eosina de los animales sometidos a los tratamientos A) v/aCSF (control), B) v/STZ, C) cv/STZ y D) cv/aCSF. Barra de calibración: 100 μ m. Aumento 200x. Recuadro superior derecho, detalle a magnificación 400x.

4.2.2 Efecto del pretratamiento con candesartan sobre la expresión del marcador de activación neuronal Fos

La inmunoreactividad de Fos se evaluó en las regiones CA_1 , CA_3 y GD del hipocampo, así como en la región dorso medial del núcleo caudado putamen (CPu) y en la corteza primaria motora (CxP).

En la figura 15 se puede observar que en todas las regiones del hipocampo analizadas la inyección ICV de STZ produjo una disminución en el número de células inmunoreactivas para Fos con respecto a las ratas controles. En el ANOVA I los resultados fueron: para la región CA_1 $F_{(3,14)} = 5,45$ $p = 0,010$ (figura 15 A). El post test de Newman-Keuls mostró que la administración ICV de STZ produjo una disminución en el número de

neuronas fos-IR con respecto al número de neuronas fos-IR en el grupo control, (v/STZ vs v/aCSF, $q = 3,96$ $p < 0,05$). El pretratamiento con candesartan previno el fenómeno observado, encontrándose un incremento con respecto al grupo v/STZ (cv/STZ vs v/STZ, $q = 3,28$ $p < 0,05$). Igualmente en la región CA₃ del hipocampo el valor del estadístico F fue: $F_{(3,18)} = 12,57$ $p = 0,0001$ (figura 15 B). El post test de Newman-Keuls mostró que la administración ICV de STZ produjo una disminución en el número de neuronas fos-IR con respecto al número de neuronas fos-IR de los animales controles (v/STZ vs v/aCSF, $q = 5,14$ $p < 0,01$), mientras que el pretratamiento con el bloqueante de los RAT₁ previno el descenso observado, hallándose un incremento con respecto al grupo v/STZ (cv/STZ vs v/STZ, $q = 8,57$ $p < 0,001$).

Resultados similares se encontraron en la activación neuronal del GD (figura 15 C): $F_{(3,17)} = 14,02$ $p = 0,77$. El post test de Newman-Keuls mostró que la inyección ICV de STZ produjo una disminución en el número de neuronas fos-IR en la región GD con respecto a los animales controles (v/STZ vs v/aCSF, $q = 7,36$ $p < 0,001$) y candesartan fue capaz de prevenir esta disminución, observándose un incremento con respecto al grupo v/STZ (cv/STZ vs v/STZ, $q = 7,07$ $p < 0,001$).

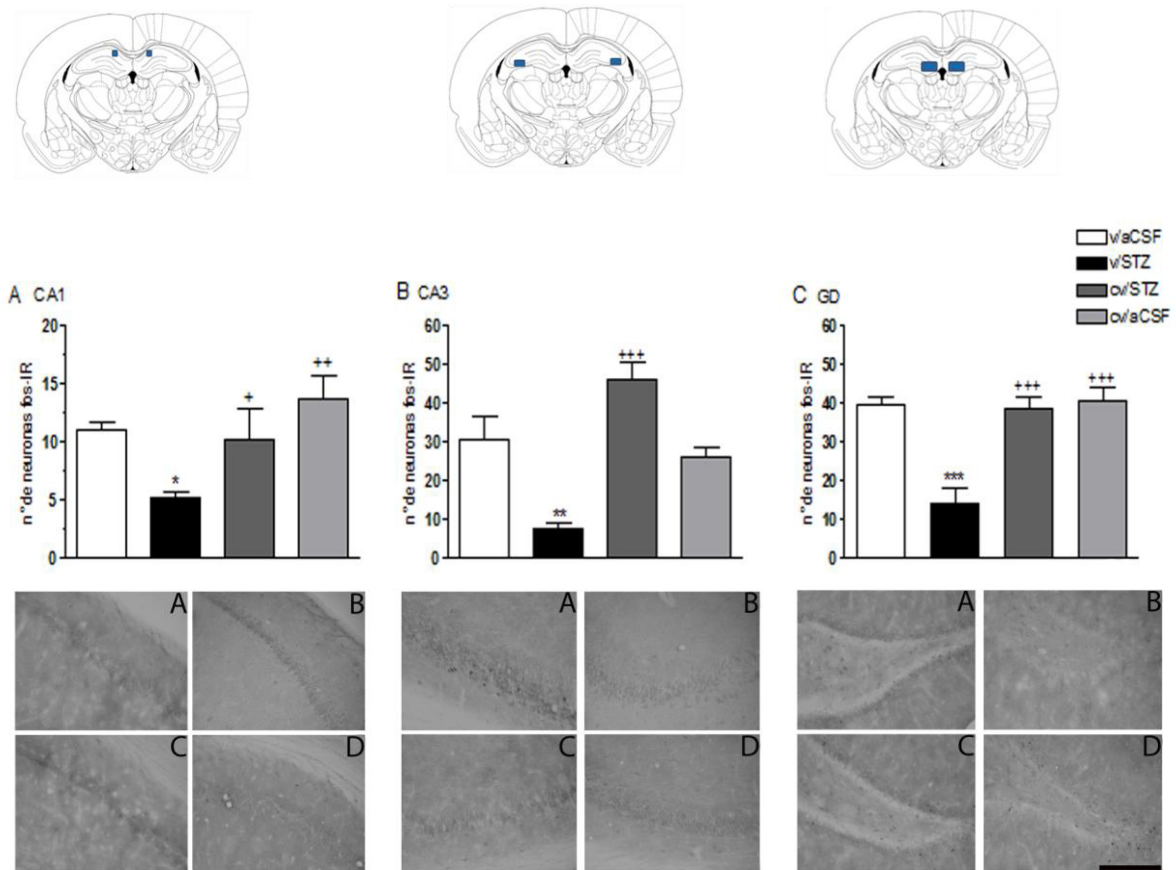


Figura 15. Panel superior: secciones transversales del hipocampo a -3,30 mm con respecto a bregma, se muestra con un recuadro las zonas correspondientes a CA₁, CA₃ y GD. Panel central: Efecto del pretratamiento con candesartan sobre el número de neuronas inmunoreactivas para Fos, expresadas como n° de neuronas Fos-IR, en las regiones: A) CA₁ (cornu ammonis uno), B) CA₃ (cornu ammonis tres) y C) GD (girus dentado) del hipocampo en los animales sometidos a los tratamientos v/aCSF (control, barras blancas), v/STZ (barras negras), cv/STZ (barras gris oscuro) y cv/aCSF (barras gris claro). Los datos se expresan como la media ± ESM. * p < 0,05 ** p < 0,01 *** p < 0,001 con respecto al grupo control (v/aCSF) en cada una de las regiones analizadas. + p < 0,05 ++ p < 0,01 +++ p < 0,001 con respecto al grupo v/STZ en cada una de las regiones analizadas. n = 5-6 animales por grupo. Panel inferior: microfotografías representativas de las tinciones inmunohistoquímicas de las áreas estudiadas según el tratamiento A) v/aCSF, B) v/STZ, C) cv/STZ y D) cv/aCSF. Barra de calibración: 100 um. Aumento 200x.

Los resultados para la inmunomarcación de Fos en la región dorso medial del CPu (figura 16 A) fueron similares a los obtenidos en CA₁, CA₃ y GD. El estadístico F del ANOVA I fue: $F_{(3,16)} = 7,75$ p = 0,002. Con el post test de Newman-Keuls pudimos observar que la inyección ICV de STZ produjo una disminución significativa en el número

de neuronas Fos inmunoreactivas con respecto a las ratas controles (v/STZ vs v/aCSF, $q = 4,56$ $p < 0,05$) y que el pretratamiento con candesartan fue capaz de prevenir la disminución observada, hallándose un incremento con respecto al grupo v/STZ (cv/STZ vs v/STZ, $q = 5,94$ $p < 0,01$).

En cuanto a los resultados obtenidos para CxP, a diferencia de las otras regiones no se encontraron diferencias significativas entre los distintos tratamientos (figura 16 B) en el número de neuronas Fos-IR. Los resultados del ANOVA I fueron: $F_{(3,18)} = 0,26$ $p = 0,851$.

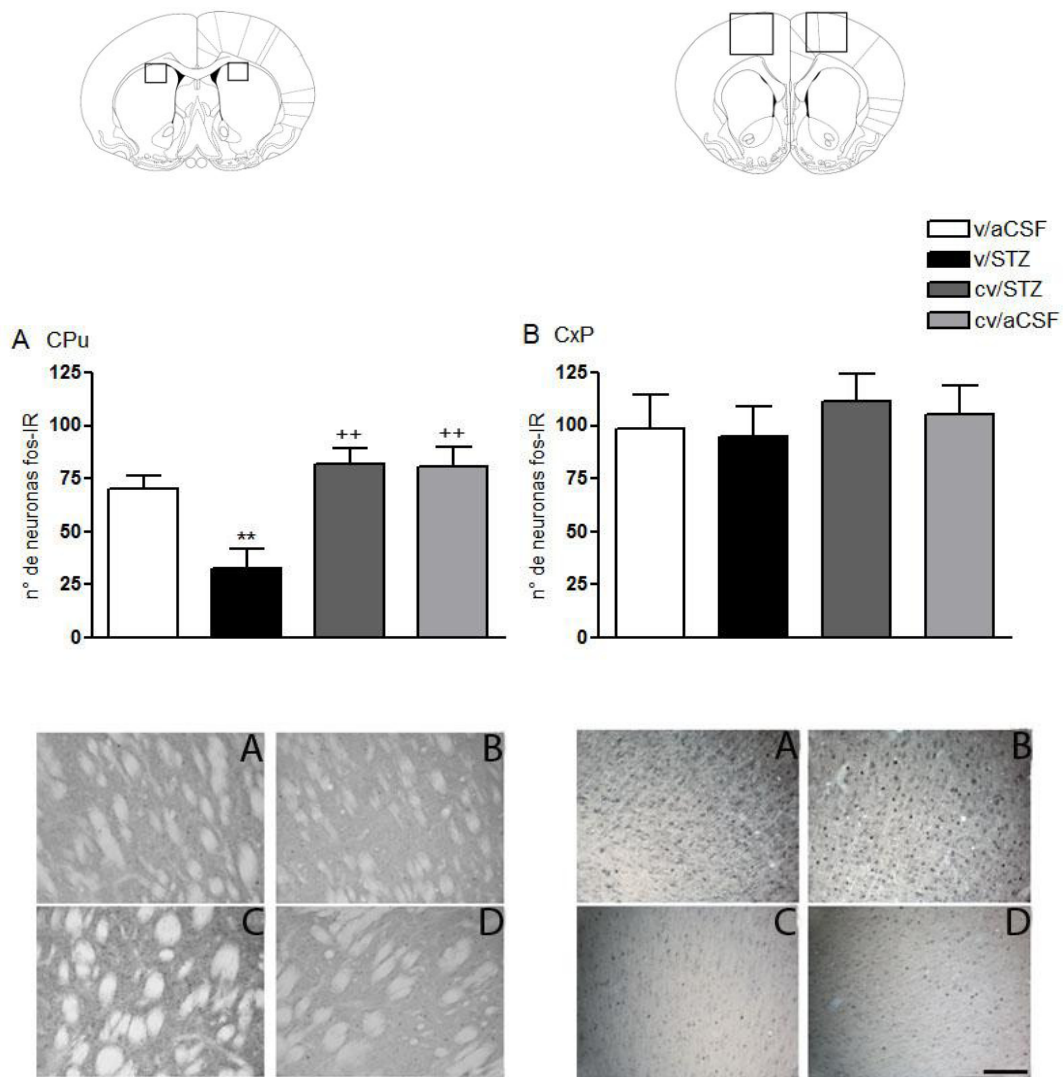


Figura 16. Panel superior: secciones transversales del núcleo CPu dorso medial a 0,48 mm con respecto a bregma y de la CxP a 1,70 mm con respecto a bregma. Panel central: Efecto del pretratamiento con candesartan sobre el número de neuronas Fos inmunoreactivas, expresadas como n° de neuronas Fos-IR en A) CPu (la región dorso medial del núcleo caudado putámen) y B) CxP (corteza primaria motora) en los animales sometidos a los tratamientos v/aCSF (control, barras blancas), v/STZ (barras negras), cv/STZ (barras a

cuadros) y cv/aCSF (barras con líneas horizontales). Los valores se expresan como la media \pm ESM. ** $p < 0,01$ con respecto al grupo control (v/aCSF). ++ $p < 0,01$ con respecto al grupo v/STZ. $n = 5$ animales por grupo. Panel inferior: microfotografías representativas de las tinciones inmunohistoquímicas de las áreas estudiadas según el tratamiento A) v/aCSF, B) v/STZ, C) cv/STZ y D) cv/aCSF. Barra de calibración: 25 μ m. Aumento 200x.

4.2.3 Aislamiento de microvasos

Se obtuvo un conjunto de microvasos compuesto por capilares, vénulas y arteriolas de pequeño calibre (Figura 17).

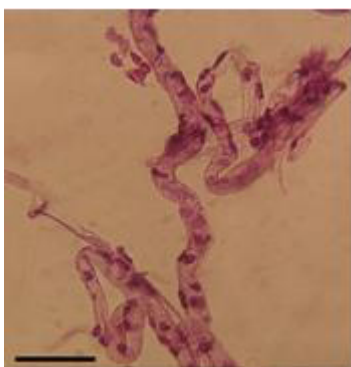


Figura 17. Microfotografía de un microvaso cerebral obtenido según la técnica descrita, coloreado con hematoxilina. Barra de calibración: 50 μ m. Aumento 400x.

4.2.4 Efecto del pretratamiento con candesartan sobre el producto de reacción del ácido tiobarbitúrico (MDA) y sobre los niveles de dienos conjugados en los microvasos cerebrales

Una vez finalizadas las pruebas conductuales, en un grupo de ratas se analizaron los niveles de malondialdehído (umol MDA/ μ g proteínas) en los microvasos cerebrales. El análisis de los resultados por el ANOVA I reveló diferencias significativas entre los tratamientos, $F_{(3,32)} = 6,58$ $p = 0,0014$ (figura 18). El post test de Newman-Keuls mostró que la inyección ICV de STZ produjo un aumento significativo en los niveles de MDA en los microvasos cerebrales de los animales comparado con los niveles de MDA determinados en los microvasos cerebrales de las ratas controles (v/STZ vs v/aCSF, $q = 5,83$ $p < 0,01$). Mientras que, el pretratamiento con candesartan previno este aumento observado como consecuencia de la administración de STZ observándose una disminución del nivel de MDA determinado en los microvasos de este grupo (cv/STZ vs v/STZ, $q =$

5,19 $p < 0,01$). No se observó ningún efecto *per se* de candesartan sobre los niveles de MDA.

No se encontraron diferencias significativas en los niveles de dienos conjugados en los microvasos de los animales sometidos a los distintos tratamientos $F_{(3,31)} = 1,80$ $p = 0,17$ (tabla 3).

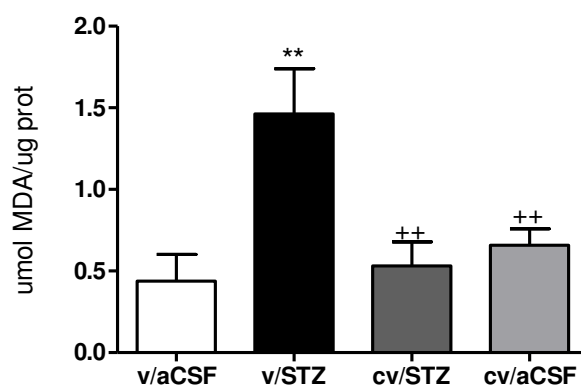


Figura 18. Efecto del pretratamiento con candesartan sobre el nivel de malondialdeído (MDA), expresado en umoles de MDA por ugramos de proteínas (umol MDA/ug prot), en los microvasos cerebrales de los animales sometidos a los tratamientos v/aCSF (control, barra blanca), v/STZ (barra negra), cv/STZ (barra gris oscuro) y cv/aCSF (barra gris claro). Los datos se expresan como la media \pm ESM. ** $p < 0,01$ con respecto al grupo control (v/aCSF). ++ $p < 0,01$ con respecto al grupo v/STZ. $n = 7-10$ animales por grupo.

Tabla 3. Efecto del pretratamiento con candesartan sobre los niveles de dienos conjugados, expresados en umoles de dienos conjugados por ugramos de proteínas (umoles dienos/ug prot) en los microvasos cerebrales. Los datos se expresan como la media \pm ESM. $n = 7-10$ animales por grupo.

v/aCSF	v/STZ	cv/STZ	cv/aCSF
$0,49 \pm 0,13$	$0,52 \pm 0,16$	$0,70 \pm 0,12$	$0,34 \pm 0,05$

4.2.5 Localización del Receptor AT_1 y de la HSP-70 en microvasos cerebrales aislados.

La figura 19 muestra la inmunomarcación de los RAT_1 y de la HSP-70 sobre los microvasos cerebrales aislados de los animales sometidos al diseño experimental planteado. Para los RAT_1 , la marca inmunofluorescente se presenta en forma de líneas rojas que se extienden a lo largo del vaso. Se puede observar que la marca fue más intensa en los animales del grupo v/STZ con respecto a los controles (figura 19 A- a y b), mientras

que los animales del grupo cv/STZ presentaron una marca de intensidad semejante a los controles (figura 19 A- a y c).

Para la HSP-70, la marca inmunofluorescente se presenta como un puntillado rojo que se aprecia en todo el vaso. De manera similar a la expresión de los RAT₁, la expresión de la HSP-70 presentó mayor inmunoreactividad en los animales del grupo v/STZ con respecto a los controles (v/aCSF) (figura 19 B- a y b), mientras que la inmunoreactividad de los animales pretratados con candesartan (cv/STZ) fue muy similar a los controles (figura 19 B- a y c).

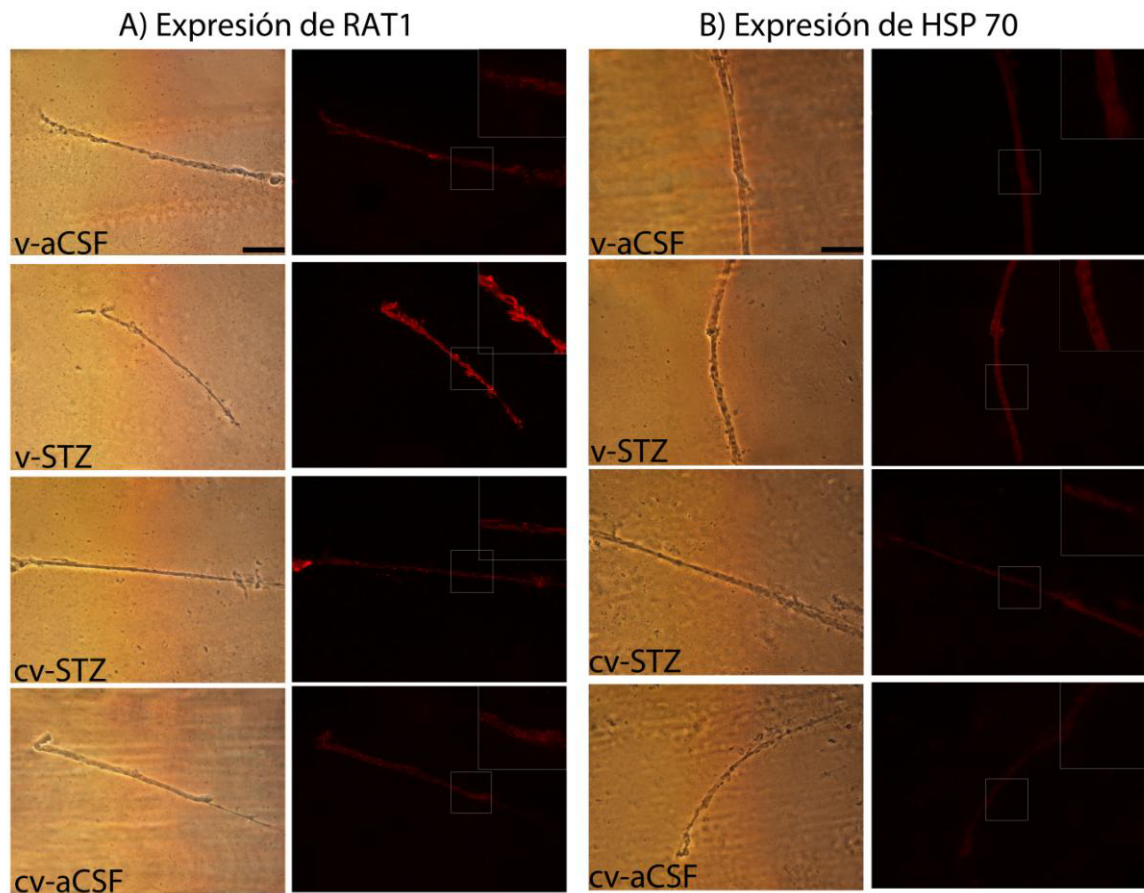


Figura 19. Inmunofluorescencia de A) RAT₁ y de B) HSP-70 en los microvasos cerebrales. Las figuras son representativas de la tinción inmunofluorescente de los microvasos cerebrales de los animales que recibieron los tratamientos: v/aCSF (control), v/STZ, cv/STZ y cv/aCSF. Panel izquierdo: imagen de microscopía 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, magnificación 400x.

4.2.6 Efecto del pretratamiento con candesartan sobre la expresión de GFAP en áreas cerebrales relacionadas al aprendizaje y la memoria

La figura 20 muestra el número de astrocitos GFAP-IR en el GD del hipocampo, en el núcleo CPu dorso medial y en la corteza frontal (CxF) de los animales sometidos a los diferentes tratamientos. Mediante el empleo del ANOVA I, se encontraron diferencias significativas en el número de astrocitos GFAP-IR en el GD entre los diferentes tratamientos, siendo el estadístico $F_{(3,16)} = 6,71$ y $p = 0,004$. El post test de Newman-Keuls mostró que los animales inyectados ICV con STZ presentaron un mayor número de astrocitos GFAP-IR con respecto al número de astrocitos GFAP-IR en los animales controles (v/STZ vs v/aCSF, $q = 4,92$ $p < 0,05$) (figura 20 A). El pretratamiento con candesartan fue capaz de prevenir este aumento, encontrándose además una disminución en el número de astrocitos GFAP-IR con respecto a v/STZ (cv/STZ vs v/STZ, $q = 5,25$ $p < 0,01$). No se observó ningún efecto *per se* de candesartan.

Resultados similares se hallaron para el número de astrocitos GFAP-IR en la región dorso medial de CPu (figura 20 B). El análisis de los resultados por el ANOVA I reveló diferencias significativas entre los tratamientos, $F_{(3,19)} = 6,39$, $p = 0,0035$. El post test de Newman-Keuls mostró que los animales inyectados ICV con STZ presentaron un aumento significativo en el número de astrocitos GFAP-IR con respecto a los animales controles (v/STZ vs v/aCSF, $q = 5,08$ $p < 0,01$). El pretratamiento con el bloqueante de los RAT_1 pudo prevenir este efecto y además, se encontró un descenso con respecto al número de astrocitos del grupo v/STZ (cv/STZ vs v/STZ, $q = 3,87$ $p < 0,05$).

También encontramos diferencias significativas a partir del ANOVA I entre los tratamientos para el número de astrocitos GFAP-IR en la región CxF ($F_{(3,14)} = 5,62$ $p = 0,009$) (figura 20 C). A partir del post test de Newman-Keuls observamos que la administración ICV de STZ produjo un aumento en el número de astrocitos GFAP-IR con respecto a los controles (v/STZ vs v/aCSF, $q = 4,72$ $p < 0,05$). Mientras que el pretratamiento con candesartan logró prevenir este aumento observado, observándose una disminución en el número de astrocitos GFAP-IR con respecto al grupo v/STZ (cv/STZ vs v/STZ, $q = 3,67$ $p < 0,05$). No se observó efecto del bloqueante *per se*.

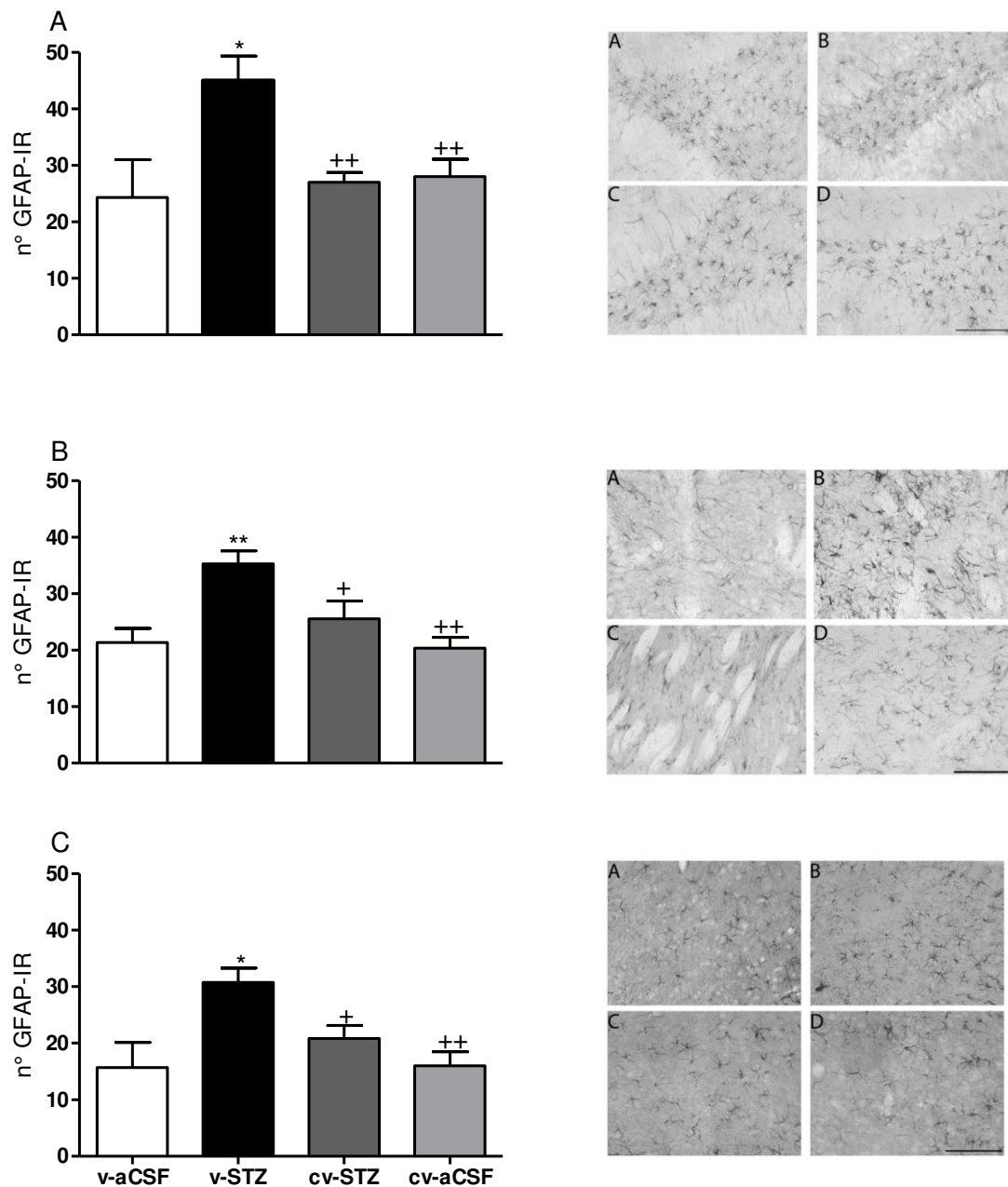


Figura 20. Panel izquierdo: Efecto del pretratamiento con candesartan sobre el número de astrocitos GFAP-IR en: A) el GD (girus dentado) del hipocampo, en B) CPu (caudado putamen) dorso medial y en C) CxF (corteza frontal) de los animales sometidos a los tratamientos v/aCSF (control, barras blancas), v/STZ (barras negras), cv/STZ (barras gris oscuro) y cv/aCSF (barras gris claro). Los datos se expresan como la media \pm ESM. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ con respecto al grupo control (v/aCSF). + $p < 0,05$ ++ $p < 0,01$ con respecto al grupo v/STZ. $n = 4-6$ ratas por grupo. Panel derecho: microfotografías representativas de las tinciones inmunohistoquímicas de las áreas estudiadas según el

tratamiento A) v/aCSF, B) v/STZ, C) cv/STZ y D) cv/aCSF. Barra de calibración: 50 μ m. Aumento 400x.

4.2.7 Efecto del pretratamiento con candesartan sobre los niveles del factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) en el líquido cefalorraquídeo (LCR)

En la figura 21 se observa el efecto de la inyección ICV de STZ en los niveles de TNF α en el LCR de los animales sometidos al diseño experimental planteado. El análisis de los resultados por el ANOVA I mostro diferencias significativas entre los tratamientos: $F_{(3,17)} = 3,45$ $p = 0,040$. El post test de Newman-Keuls mostro que los animales a los que se les administró STZ ICV presentaron un aumento en los niveles del marcador de inflamación en el LCR con respecto a los niveles determinados en el LCR de las ratas controles (v/STZ vs v/aCSF, $q = 4,10$ $p < 0,05$). El pretratamiento con candesartan fue capaz de prevenir el aumento observado y además, se encontró un descenso significativo con respecto a los valores hallados en el grupo v/STZ (cv/STZ vs v/STZ, $q = 3,69$ $p < 0,05$). El bloqueante *per se* no presentó efecto alguno sobre los niveles de TNF α en el LCR.

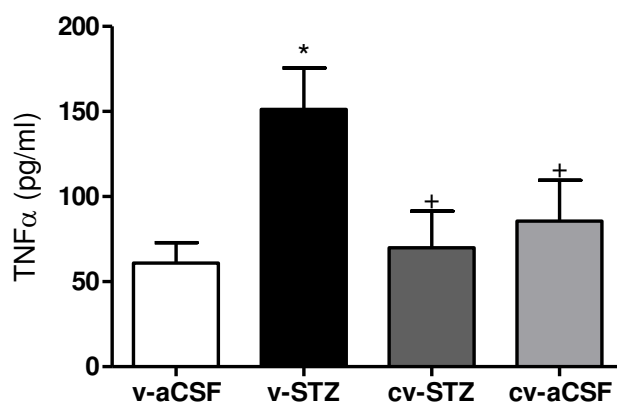


Figura 21. Efecto del pretratamiento con candesartan sobre los niveles de TNF α en el LCR, expresados como picogramos de TNF α por mililitro de LCR (pg TNF α / ml) en los animales sometidos a los tratamientos v/aCSF (control, barra blanca), v/STZ (barra negra), cv/STZ (barra gris oscuro) y cv/aCSF (barra gris claro). Los datos se expresan como la media \pm ESM. * $p < 0,05$ con respecto al grupo control (v/aCSF). + $p < 0,05$ con respecto al grupo v/STZ. $n = 5-6$ animales por grupo.

4.2.8 Efecto del pretratamiento con candesartan sobre el volumen de los ventrículos laterales

Se analizó el volumen de los ventrículos laterales en la región que abarca desde 2,2 hasta -1,4 mm con respecto a bregma de acuerdo al atlas de Paxinos y Watson [119], figura 22. El análisis de los resultados por el ANOVA I reveló diferencias significativas entre los tratamientos: $F_{(3,26)} = 3,99$ $p = 0,018$. A partir del análisis con el post test de Newman-Keuls observamos que la administración ICV de STZ produjo un aumento en el volumen de los ventrículos laterales de los animales con respecto al volumen de los ventrículos laterales medido en los animales controles (v/STZ vs v/aCSF, $q = 3,22$ $p < 0,05$). Mientras que el pretratamiento con candesartan pudo prevenir este fenómeno observándose una disminución del volumen de ambos ventrículos con respecto al grupo v/STZ (cv/STZ vs v/STZ, $q = 4,42$ $p < 0,05$). No se hallaron efectos de candesartan cuando se lo administró a las ratas que recibieron aCSF.

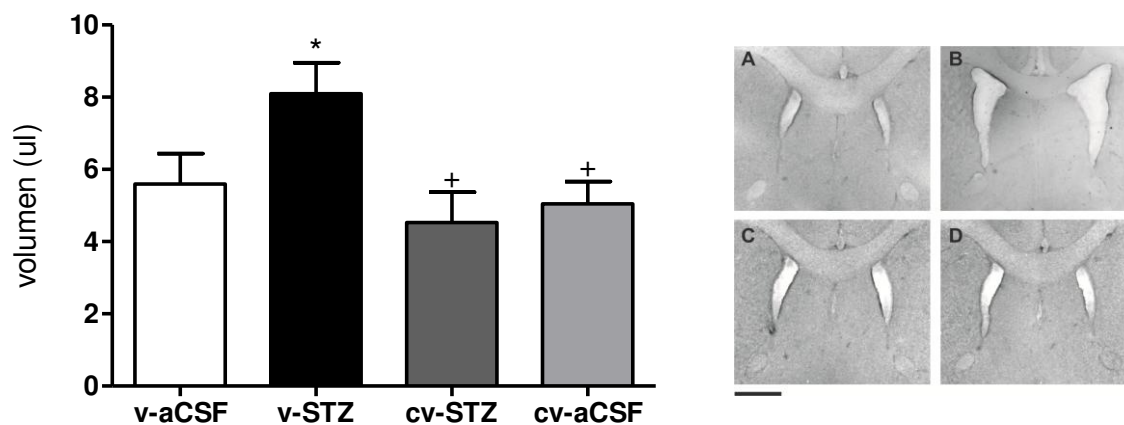


Figura 22. Panel izquierdo: Efecto del pretratamiento con candesartan sobre el volumen de los ventrículos laterales, expresado en microlitros (ul), de los animales sometidos a los tratamientos v/aCSF (control, barra blanca), v/STZ (barra negra), cv/STZ (barra gris oscuro) y cv/aCSF (barra gris claro). Los datos se expresan como la media \pm ESM. * $p < 0,05$ con respecto al grupo control (v/aCSF). + $p < 0,05$ con respecto al grupo v/STZ. $n = 6-9$ animales por grupo. Panel derecho: microscopía óptica de las secciones transversales correspondientes a 0,48 mm con respecto a bregma para los tratamientos A) v/aCSF; B) v/STZ; C) cv/STZ; D) cv/aCSF. Barra de calibración: 400 μ m. Aumento 30x.

5. EFECTO DE LA INHIBICIÓN DE LA ENZIMA CONVERTIDORA DE ANGIOTENSINA CEREBRAL SOBRE LA MEMORIA, LA INFLAMACIÓN Y EL ESTRÉS OXIDATIVO EN EL MODELOS DE DEMENCIA ANIMAL DE STZ

5.1 Evaluación de la conducta

5.1.1 Efecto del pretratamiento con captopril sobre la memoria de reconocimiento de objetos

La figura 23 muestra los resultados obtenidos en el test de reconocimiento de objetos para el índice de reconocimiento (IR, figura 23 A) y para el índice de discriminación (ID, figura 23 B) de un objeto nuevo. En el ANOVA I se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos: $F_{(3,49)} = 4,71$ $p = 0,006$. El post test de Newman-Keuls mostro que los animales que recibieron la administración central de STZ presentaron una disminución significativa de ambos índices en la sesión de prueba T_2 con respecto a los animales controles (v/STZ vs v/aCSF, $q = 4,33$ $p < 0,01$). El pretratamiento con captopril previno el deterioro en la memoria de reconocimiento de objetos inducido por la administración de STZ encontrándose un aumento en ambos índices en el grupo capt/STZ vs v/STZ, $q = 4,78$ $p < 0,01$.

Como medida de la motivación por la exploración, evaluamos el tiempo de exploración de ambos objetos idénticos A en la sesión entrenamiento (T_1). No se observaron diferencias significativas entre los tratamientos ($F_{(3,49)} = 0,138$ $p = 0,937$) (figura 24), de manera que el tratamiento no afectó la capacidad de exploración de los animales y que, por lo tanto, los resultados obtenidos durante la sesión de prueba (T_2) revelan un deterioro en la memoria en el grupo v-STZ.

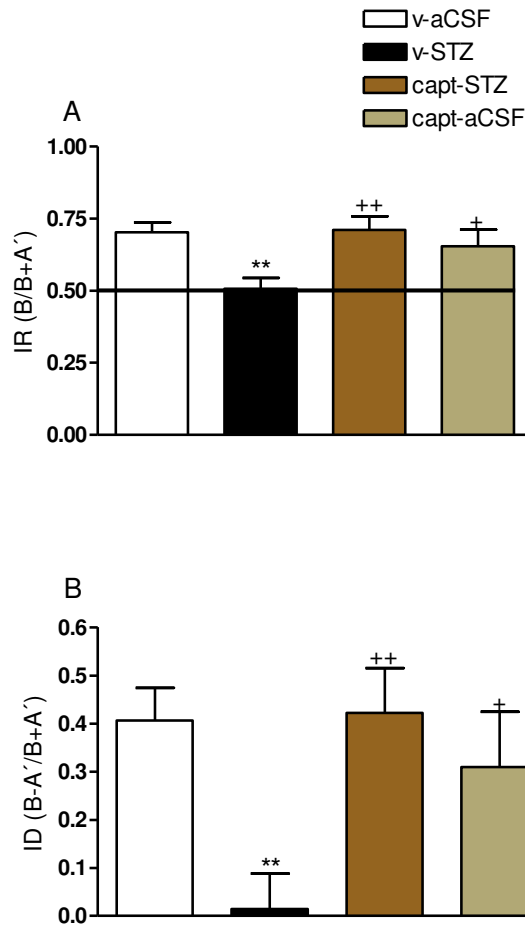


Figura 23. Efecto del pretratamiento con captopril sobre: A) el índice de reconocimiento, expresado como la relación entre el tiempo de exploración del objeto nuevo con respecto al tiempo de exploración total de ambos objetos nuevo y viejo ($IR = B/B+A'$) y B) el índice de discriminación, expresado como la relación entre la diferencia en el tiempo de exploración del objeto nuevo con respecto al objeto viejo y entre el tiempo de exploración total de ambos objetos nuevo y viejo ($ID = B-A'/B+A'$) evaluados en el test de reconocimiento de objetos en los animales sometidos a los tratamientos v/aCSF (control, barras blancas), v/STZ (barras negras), capt/STZ (barras marrón oscuro) y capt/aCSF (barras marrón claro). Los valores se expresan como la media \pm ESM. ** $p < 0,01$ con respecto al grupo control (v/aCSF). + $p < 0,05$ ++ $p < 0,01$ con respecto al grupo v/STZ. $n = 13$ animales por grupo.

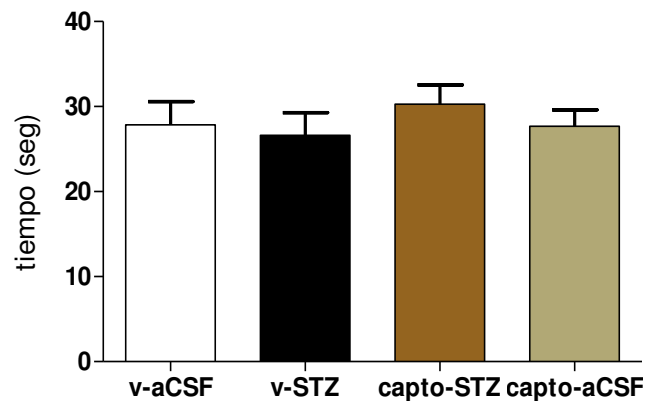


Figura 24. Tiempo de exploración, expresado en segundos, de ambos objetos idénticos (A+A) durante T₁ (entrenamiento) en el test de reconocimiento de objetos de los animales sometidos a los tratamientos v/aCSF (control, barra blanca), v/STZ (barra negra), capt/STZ (barra marrón oscuro) y capt/aCSF (barra marrón claro). Los valores se expresan como la media \pm ESM. n = 13 animales por grupo.

5.1.2 Efecto del pretratamiento con captopril sobre la memoria espacial y de referencia evaluadas en el test de Morris

La figura 25 muestra el tiempo de latencia (tiempo que los animales tardaron en nadar hacia la plataforma de escape) durante la fase de entrenamiento. Se puede observar que las ratas controles fueron capaces de desarrollar un proceso de aprendizaje a medida que las sesiones fueron avanzando, no así las ratas inyectadas ICV con STZ. Los resultados obtenidos a partir del ANOVA II muestran que no se encontraron diferencias significativas para el factor tratamiento $F_{(3,121)} = 1,46$ $p = 0,229$. Sin embargo se hallaron diferencias significativas para el factor día de entrenamiento $F_{(2,121)} = 1,46$ $p < 0,0001$ y la interacción entre ambos factores no fue significativa $F_{(6,121)} = 1,99$ $p = 0,073$. El post test de Bonferroni mostro que los animales inyectados ICV con STZ presentaron un aumento significativo de la latencia el último día de la fase de entrenamiento comparado con la latencia de ese mismo día de los animales controles (v/STZ vs v/aCSF, $t = 2,49$ $p < 0,05$) (figura 25 A). Las ratas pretratadas con captopril e inyectadas ICV con STZ se comportaron de la misma manera que las ratas controles, es decir, el tiempo de latencia fue disminuyendo a medida que el entrenamiento avanzó.

Cuando cada sesión fue analizada por separado se observó que las ratas inyectadas ICV con STZ presentaron un aumento en el tiempo que tardaron en encontrar la plataforma en la última sesión del primer día de entrenamiento con respecto a la sesión correspondiente en las ratas controles. Con el empleo del ANOVA II se hallaron diferencias significativas para el factor tratamiento $F_{(3,121)} = 6,03$ $p = 0,0007$ y para el factor día de entrenamiento $F_{(2,121)} = 3,69$ $p = 0,028$. La interacción entre ambos factores no fue significativa: $F_{(6,121)} = 2,097$ $p = 0,058$. Mediante el post test de Bonferroni observamos que las ratas del grupo v/STZ presentaron un aumento en el tiempo que tardaron en encontrar la plataforma la última sesión (4) del primer día de entrenamiento con respecto a la sesión correspondiente en las ratas controles (v/STZ vs v/aCSF, $t = 3,68$ $p < 0,01$) (figura 25 B), mientras que el pretratamiento con el inhibidor de la ACE fue capaz de prevenir este aumento en el tiempo de latencia observado (capt/STZ vs v/STZ, $t = 4,87$ $p < 0,001$).

El día de la prueba, cuando la plataforma estaba ausente, no se observaron diferencias significativas en cuanto al tiempo que los animales nadaron en el cuadrante que contenía la plataforma ($F_{(3,44)} = 0,48$ $p = 0,72$) (figura 26 A), ni en la distancia recorrida por éstos para llegar hasta el punto donde se encontraba la plataforma ($F_{(3,44)} = 1,13$ $p = 0,35$) (figura 26 B).

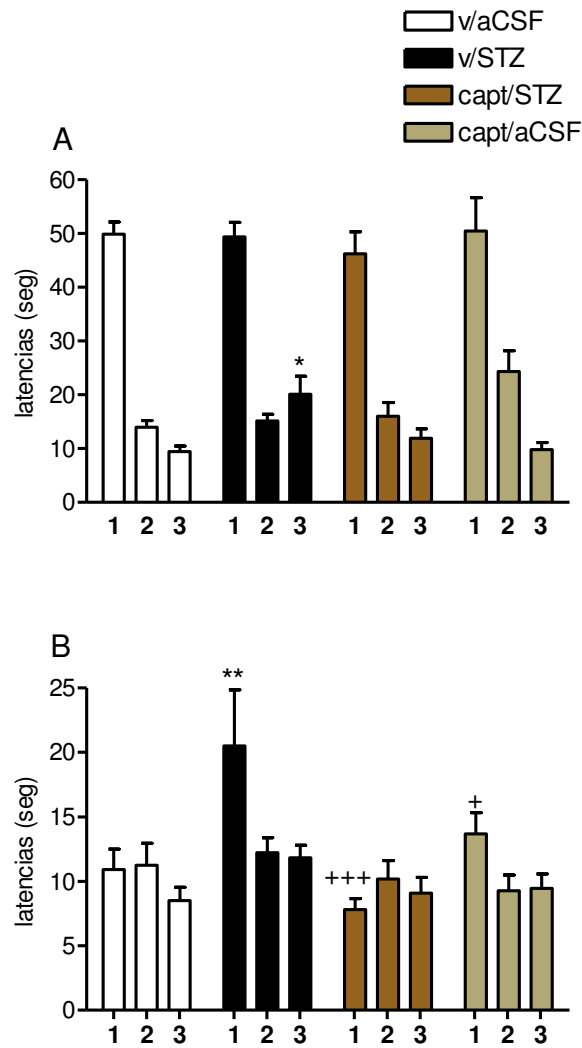


Figura 25. Tiempo de latencia, expresado en segundos, durante la fase de entrenamiento en el test de Morris. A) promedio de las cuatro sesiones de los días 1, 2 y 3; B) sesión 4 de los días 1, 2 y 3 de la fase de entrenamiento de los animales sometidos a los tratamientos v/aCSF (control, barras blancas), v/STZ (barras negras), capt/STZ (barras marrón oscuro) y capt/aCSF (barras marrón claro). Los datos se expresan como la media \pm ESM. * $p < 0,05$ *** $p < 0,001$ con respecto a la sesión correspondiente del grupo control (v/aCSF). + $p < 0,05$ +++ $p < 0,001$ con respecto a la sesión correspondiente del grupo v/STZ. $n = 12$ animales por grupo.

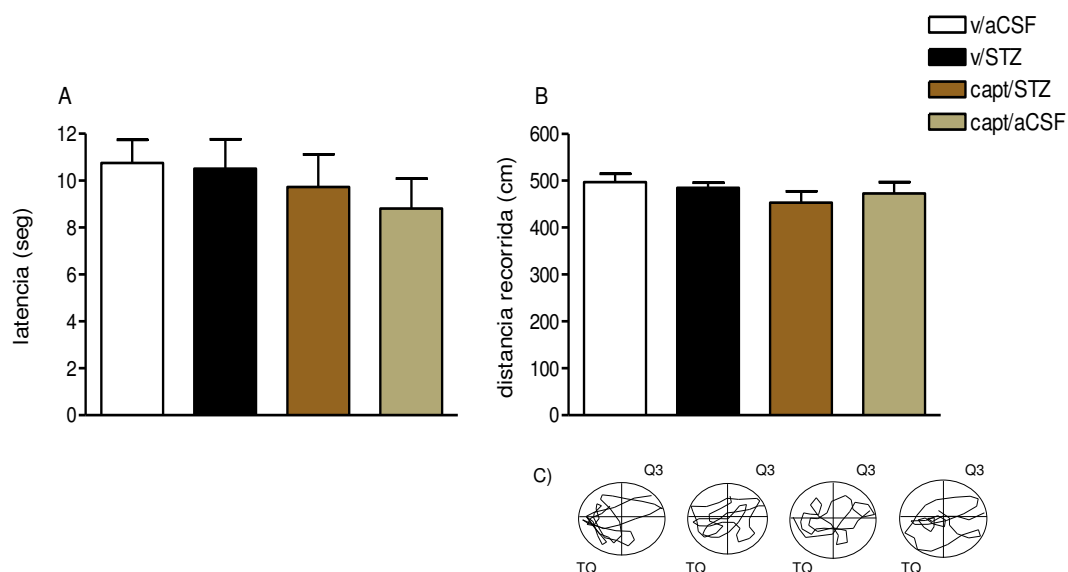


Figura 26. A) Tiempo de exploración, expresado en segundos, sobre el cuadrante donde se encontraba la plataforma (TQ). B) Distancia recorrida, expresada en centímetros, por los animales desde el punto de partida (Q₃) hasta el punto en que se encontraba la plataforma durante la fase de adquisición. C) Esquema representativo de la trayectoria recorrida por un animal según el tratamiento recibido. Los valores se expresan como la media ± ESM entre los tratamientos v/aCSF (control, barras blancas), v/STZ (barras negras), capt/STZ (barras marrón oscuro) y capt/aCSF (barras marrón claro). n = 12 animales por grupo.

5.2 Efecto de la inhibición de la ACE sobre el estrés oxidativo y la inflamación

5.2.1 Efecto del pretratamiento con captopril sobre el producto de peroxidación lipídica, MDA, en los microvasos cerebrales

Una vez finalizadas las pruebas conductuales, en un grupo de ratas se analizaron los niveles de malondialdehído (umol MDA/ug proteínas) en los microvasos cerebrales, como medida de la peroxidación lipídica. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 27. El análisis de los resultados mediante ANOVA I arrojó diferencias significativas en los tratamientos: $F_{(3,23)} = 6,15$ $p = 0,0002$. El post test de Newman-Keuls mostró que la inyección ICV de STZ produjo un aumento en los niveles de MDA en los microvasos cerebrales de los animales comparado con los niveles de MDA determinados en los microvasos cerebrales de los animales controles (v/STZ vs v/aCSF, $q = 5,61$ $p < 0,01$). El pretratamiento con captopril previno el aumento observado como consecuencia de la

administración de STZ, observándose en el grupo capt/STZ una disminución en los niveles de MDA con respecto al grupo v/STZ (capto/STZ vs v/STZ, $q = 4,06$ $p < 0,01$). No se observó efecto *per se* del inhibidor.

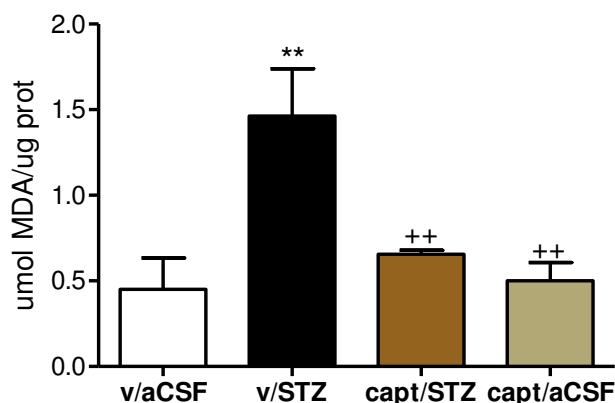


Figura 27. Efecto del pretratamiento con captopril sobre el contenido de malondialdehído MDA, expresado como umoles de MDA por ugramos de proteínas (umol MDA/ug prot), en los microvasos cerebrales de los animales sometidos a los tratamientos v/aCSF (control, barra blanca), v/STZ (barra negra), capt/STZ (barra marrón oscuro) y capt/aCSF (barra marrón claro). Los datos se expresan como la media \pm ESM. ** $p < 0,01$ con respecto al grupo control (v/aCSF). ++ $p < 0,01$ con respecto al grupo v/STZ. $n = 7-10$ ratas por grupo.

5.2.2 Localización del Receptor AT_1 y de la HSP-70 en microvasos cerebrales aislados.

La figura 28 muestra la inmunomarcación de los RAT_1 y de la HSP-70 sobre los microvasos cerebrales aislados de los animales sometidos al diseño experimental planteado. Para los RAT_1 , la marca inmunofluorescente se presenta en forma de líneas rojas que se extienden a lo largo del vaso. Se puede observar que la marca fue más intensa en los animales del grupo v/STZ con respecto a los controles (figura 28 A- a y b), mientras que los animales del grupo capt/STZ presentaron una marca de intensidad semejante a los controles (figura 28 A- a y c).

Para la HSP-70, la marca inmunofluorescente se presenta como un puntillado rojo que se aprecia en todo el vaso. De manera similar a la expresión de los RAT_1 , la expresión de la HSP-70 presentó mayor inmunoreactividad en el grupo v/STZ con respecto a los controles (figura 28 B- a y b), mientras que la inmunoreactividad de los animales pretratados con captopril (capt/STZ) fue muy similar a los controles (figura 28 B- a y c).

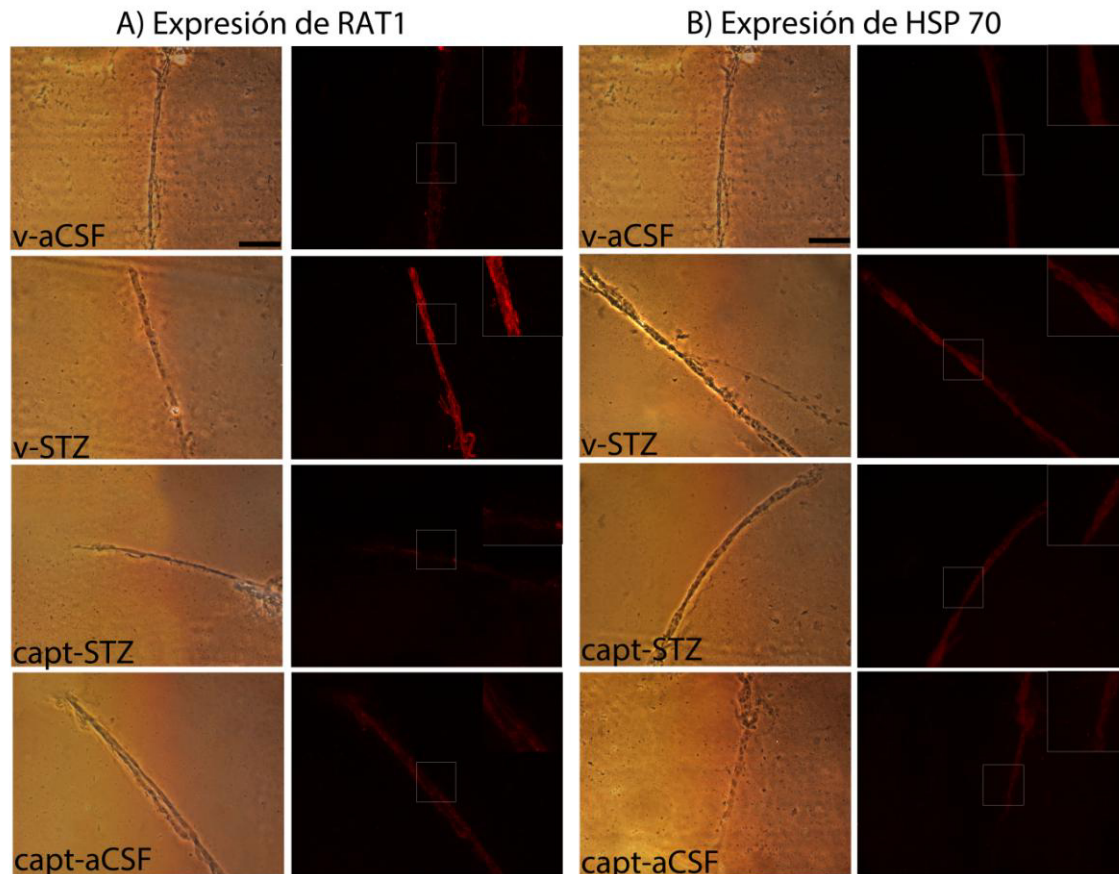


Figura 28. Inmunofluorescencia de A) RAT_1 y de B) HSP-70 en los microvasos cerebrales. Las figuras son representativas de la tinción inmunofluorescente de los microvasos cerebrales de los animales sometidos a los tratamientos: v/aCSF, v/STZ, capt/STZ y capt/aCSF. Panel izquierdo: imagen de microscopía 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, magnificación 400x.

5.2.3 Efecto del pretratamiento con captopril sobre la expresión de GFAP en áreas cerebrales relacionadas al aprendizaje y la memoria

La figura 29 A muestra los resultados para la inmunomarcación de GFAP en el GD del hipocampo. Mediante el empleo del ANOVA I observamos una diferencia significativa entre los tratamientos ($F_{(3,19)} = 7,72$ $p = 0,0014$). El post test de Newman-Keuls mostró que los animales a los que se les administró STZ ICV presentaron un mayor número de astrocitos GFAP-IR con respecto a los controles (v/STZ vs v/aCSF, $q = 5,50$ $p < 0,01$). El pretratamiento con captopril logró prevenir este fenómeno, observándose una disminución en el número de astrocitos GFAP-IR en el grupo capt/STZ con respecto al grupo v/STZ (capt/STZ vs v/STZ, $q = 5,90$ $p < 0,01$). El inhibidor de la ACE no presentó efecto *per se*.

Cuando analizamos el número de astrocitos GFAP-IR en la zona dorso medial de CPu, el análisis mediante ANOVA I también reveló diferencias significativas entre los tratamientos ($F_{(3,20)} = 13,11$ $p < 0,0001$) (figura 29 B). El post test de Newman-Keuls mostró que los animales inyectados ICV con STZ presentaron un aumento significativo en el número de astrocitos GFAP-IR con respecto a los animales controles (v/STZ vs v/aCSF, $q = 5,82$ $p < 0,01$) mientras que aquellos animales que fueron inyectados ICV con STZ pero que recibieron el pretratamiento con captopril presentaron una disminución significativa en el número de astrocitos GFAP-IR con respecto al grupo v/STZ (capt/STZ vs v/STZ, $q = 8,66$ $p < 0,001$).

Resultados semejantes encontramos en el número de astrocitos GFAP-IR en la corteza frontal (CxF). Mediante ANOVA I observamos diferencias significativas entre los tratamientos ($F_{(3,17)} = 5,76$ $p = 0,0066$) (figura 29 C). El post test de Newman-Keuls mostró que los animales inyectados ICV con STZ presentaron un aumento significativo en el número de astrocitos GFAP-IR con respecto al grupo control (v/STZ vs v/aCSF, $q = 3,32$ $p < 0,05$). El pretratamiento con captopril pudo prevenir el fenómeno observado en los animales inyectados ICV con STZ, presentando estos animales una disminución en el número de astrocitos GFAP-IR con respecto al grupo v/STZ (capt/STZ vs v/STZ, $q = 4,53$ $p < 0,05$).

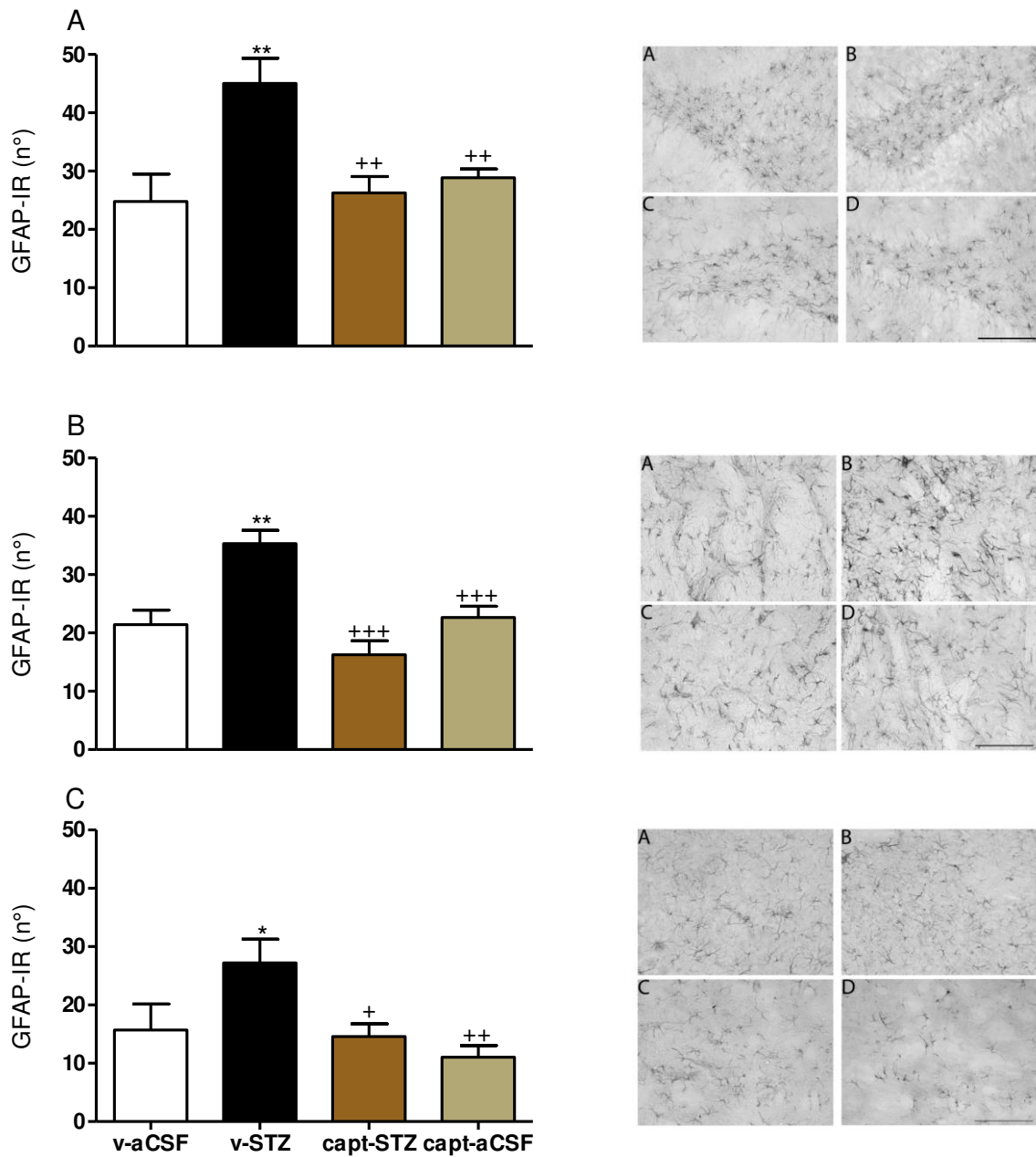


Figura 29. Panel izquierdo: Efecto del pretratamiento con captopril sobre el número de astrocitos GFAP-IR en: A) el GD (girus dentado) del hipocampo, en B) CPU (caudado putamen) dorso medial y en C) CxF (corteza frontal) en los animales sometidos a los tratamientos v/aCSF (control, barras blancas), v/STZ (barras negras), capt/STZ (barras marrón oscuro) y capt/aCSF (barras marrón claro). Los datos se expresan como la media \pm ESM. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ con respecto al grupo control (v/aCSF). + $p < 0,05$ ++ $p < 0,01$ +++ $p < 0,001$ con respecto al grupo v/STZ. $n = 4-6$ ratas por grupo. Panel derecho: microfotografías representativas de las tinciones inmunohistoquímicas de las áreas estudiadas según el tratamiento A) v/aCSF, B) v/STZ, C) capt/STZ y D) capt/aCSF. Barra de calibración: 50 μ m. Aumento 400x.

5.2.4 Efecto del pretratamiento con captopril sobre los niveles del factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) en el líquido cefalorraquídeo (LCR)

A partir del ANOVA I observamos una diferencia significativa en el nivel de TNF α en el LCR de los animales entre los tratamientos ($F_{(3,14)} = 5,59$ $p = 0,009$) (figura 30). El post test de Newman-Keuls mostró que la inyección ICV de STZ produjo un aumento en el marcador de inflamación en el LCR de los animales con respecto a los controles (v/STZ vs v/aCSF, $q = 4,22$ $p < 0,05$). Así mismo, el pretratamiento con captopril no fue capaz de prevenir el aumento producido como consecuencia de la administración de STZ, encontramos un aumento del TNF α en el LCR de estos animales con respecto a los controles (capt/STZ vs v/aCSF, $q = 3,42$ $p < 0,05$). Más aún, hallamos un efecto *per se* del inhibidor de la ACE reflejado en un aumento sobre la producción y liberación de la proteína con respecto a los controles (capt/aCSF vs v/aCSF, $q = 5,46$ $p < 0,01$).

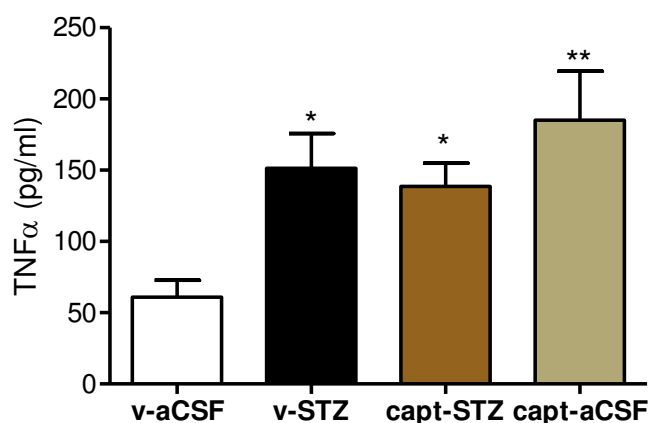


Figura 30. Efecto del pretratamiento con captopril sobre los niveles de TNF α en el LCR, expresados como picogramos de TNF α por mililitro de LCR (pg TNF α / ml) de los animales sometidos a los tratamientos v/aCSF (control, barra blanca), v/STZ (barra negra), capt/STZ (barra marrón oscuro) y capt/aCSF (barra marrón claro). Los datos se expresan como la media \pm ESM. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ con respecto al grupo control (v/aCSF). $n = 5-6$ animales por grupo.

5.2.5 Efecto del pretratamiento con captopril sobre el volumen de los ventrículos laterales

Se analizó el volumen de los ventrículos laterales en la región que abarca desde 2,2 hasta -1,4 mm con respecto a bregma de acuerdo al atlas de Paxinos y Watson [119]. El resultado obtenido a partir del ANOVA I reveló diferencias significativas en el volumen de

los ventrículos laterales entre los tratamientos ($F_{(3,23)} = 3,30$ $p = 0,038$) (figura 31). El post test de Newman-Keuls mostró que ambos ventrículos presentaban un volumen significativamente mayor en las ratas inyectadas ICV con STZ con respecto al volumen de los ventrículos laterales medido en las ratas controles (v/STZ vs v/aCSF, $q = 3,63$ $p < 0,05$). El pretratamiento con captopril no pudo prevenir el fenómeno observado (capt/STZ vs v/STZ, $p > 0,05$) y aún cuando se administró a los animales que recibieron aCSF ICV para evaluar el efecto *per se* del inhibidor, encontramos que producía un aumento significativo sobre el volumen de los ventrículos laterales con respecto a las ratas controles (capt/aCSF vs v/aCSF, $q = 4,01$ $p < 0,05$).

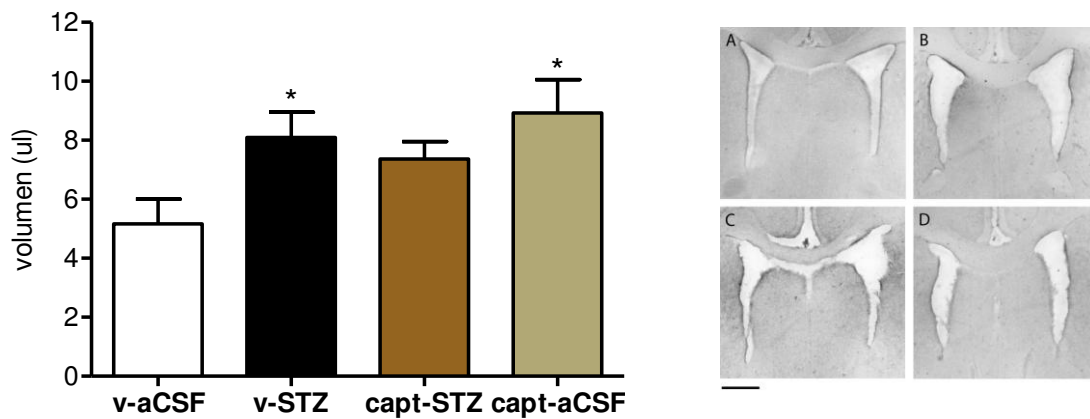


Figura 31. Panel izquierdo: Efecto del pretratamiento con captopril sobre el volumen de los ventrículos laterales, expresado en microlitros (ul) de los animales sometidos a los tratamientos v/aCSF (control, barra blanca), v/STZ (barra negra), capt/STZ (barra marrón oscuro) y capt/aCSF (barra marrón claro). Los datos se expresan como la media \pm ESM. * $p < 0,05$ con respecto al grupo control (v/aCSF). $n = 6-9$ animales por grupo. Panel derecho: microscopía óptica de las secciones transversales correspondientes a 0,48 mm con respecto a bregma para los tratamientos A) v/aCSF; B) v/STZ; C) capt/STZ; D) capt/aCSF. Barra de calibración: 1 mm. Aumento 30x.

DISCUSIÓN

6. DISCUSIÓN

La desorientación topográfica así como los déficits en la percepción visual y espacial se detectan de manera muy temprana durante el desarrollo de la AD y se vuelven más pronunciados e irreversibles a medida que la enfermedad avanza [131]. En primera instancia se observa una pérdida de la memoria a corto plazo y con la progresión de la enfermedad se ve afectada la memoria a largo plazo [132, 133]. Las alteraciones incipientes que preceden al deterioro avanzado de la memoria, se pueden estudiar generando un proceso semejante a una diabetes cerebral por inyección ICV de la neurotoxina STZ. Controlando la dosis y el tiempo de acción de la neurotoxina, este modelo permite estudiar los estadios iniciales de la patología, tales como aquellos en los que se afecta levemente la memoria a corto plazo. Una expresión de este tipo de memoria la representa la memoria de trabajo, la cual es una combinación de la capacidad de atención, concentración y memoria. Hace referencia a la habilidad de poder recordar y manipular una información de manera temporal utilizándola en el corto plazo [134]. Uno de los métodos que se utiliza para evaluar la memoria de trabajo es la prueba de campo perforado que clásicamente emplea una recompensa (alimento) debajo de los orificios. Bajo estas condiciones, los animales desarrollan una estrategia de exploración utilizando como patrón de búsqueda el alimento. De esta manera, se puede evaluar no sólo la memoria de trabajo, sino también la memoria de referencia [135-140]. En nuestro trabajo no empleamos el alimento como recompensa, esto nos permitió valorar solamente la memoria de trabajo [120], pero con la ventaja de no tener interferencia de un componente motivacional como lo es el apetito. Así, se pueden realizar medidas de memoria basadas en el comportamiento de exploración innato de los roedores utilizando una sola exposición al campo perforado en condiciones de novedad [120]. Observamos que la actividad exploratoria en todos los grupos experimentales disminuyó luego de diez minutos, por esta razón, los valores hallados corresponden al periodo que contiene la máxima actividad y que es el más sensible a los cambios inducidos por los tratamientos. El campo perforado se utiliza actualmente como prueba de neofilia en la farmacología experimental [141]. De acuerdo con esto, la frecuencia y la duración de la introducción de la cabeza de los animales en los orificios se asumen como medidas directas de neofilia, o de exploración directa, que resultan ser relativamente independientes de la locomoción de los animales [142, 143]. De todos modos, los tratamientos no afectaron la locomoción de los animales

ya que no encontramos diferencias significativas en la distancia recorrida en el campo perforado durante los diez minutos.

Nuestros resultados mostraron que las ratas inyectadas ICV con STZ presentaron un deterioro en el patrón de exploración en el campo perforado. Analizando la distribución del tiempo y el número de veces que cada animal exploró los orificios cuando fueron tratados con STZ, se encontró una distribución heterogénea en la exploración. El pretratamiento con candesartan previno el efecto de la STZ, mostrando que los RAT_1 participan en el deterioro de la memoria de trabajo inducida por STZ, pero no afectaron su desempeño en ausencia de esta neurotoxina.

Un tipo similar de memoria se puede evaluar mediante el uso de la prueba de reconocimiento de objetos, que al igual que el campo perforado, permite realizar medidas de memoria basadas en el comportamiento de exploración innato de los roedores [144]. Esta memoria declarativa es de tipo episódica y nos brinda información acerca de cuándo, dónde y cómo ocurrió un evento en particular. Cuando los animales se acercan a explorar un objeto nuevo, se asume que ese solo encuentro con el objeto deja un rastro complejo y duradero en la memoria, una representación del objeto que se exploró [145]. El término novedad puede definirse como una alteración en lo que se espera que suceda según la información obtenida previamente. Es así, como la conducta de los animales se afecta por un estímulo considerado como novedoso, porque el animal explora el objeto nuevo debido a su curiosidad innata [146]. La preferencia por el objeto nuevo significaría que se ha formado en la memoria del animal una representación del objeto viejo [147]. Los resultados de la prueba se ven influenciados tanto por lesiones a nivel del lóbulo temporal medial como del hipocampo [146]. Nuestros resultados muestran que tanto el pretratamiento con el bloqueante de los RAT_1 , como con el inhibidor de la ACE previno la interrupción en la memoria de reconocimiento de un objeto nuevo como consecuencia de la administración ICV de STZ.

Cabe destacar, que el hipocampo es una de las regiones de mayor expresión del receptor para la Ang (1-7), Mas, y se ha mostrado que la integridad del eje Ang (1-7)/Mas es necesaria para el normal procesamiento de la memoria de reconocimiento de objetos [148]. Lazaroni y col., evidenciaron a partir del uso de un modelo de ablación genética del receptor Mas (animales MasKO) y también mediante el bloqueo farmacológico del mismo en el hipocampo, que la función de este receptor sería esencial para un adecuado desempeño en la prueba. Estos autores observaron que frente a la ausencia del receptor

Mas, se incrementaban los niveles de Ang (1-7) en el hipocampo provocando una alteración en la memoria de reconocimiento de objetos y que estos niveles incrementados inducirían una activación inespecífica de los RAT_1 , pudiendo ésta ser revertida con el bloqueante de los RAT_1 losartan. Actualmente no existe evidencia directa que muestre que la STZ afecta la función del receptor Mas o que induzca niveles elevados de Ang (1-7), pero nuestros resultados muestran que tanto el bloqueo de los RAT_1 como la inhibición de la ACE previnieron la disminución en los índices de reconocimiento y de discriminación del objeto nuevo inducido por la administración de STZ. De manera coincidente, Braszko y col., utilizando otro modelo de alteración en la memoria, lograron contrarrestar el déficit cognitivo observado en el test de reconocimiento de objetos con la administración de candesartan [121].

En el laberinto de Morris evaluamos la memoria espacial durante la fase de adquisición y encontramos que la inyección ICV de STZ produjo una interrupción en el aprendizaje de la localización de la plataforma, reflejado en el aumento significativo del tiempo de latencia para hallar la plataforma el último día del periodo de aprendizaje. Además, cuando medimos la latencia de las sesiones desarrolladas en un mismo día, observamos que la administración ICV de STZ producía un aumento significativo en la latencia de la última sesión del primer día del periodo de aprendizaje, reflejando una interrupción en la memoria de trabajo, mientras que, tanto la administración previa de candesartan como de captopril previno este aumento de la latencia.

Los animales en la modalidad espacial del laberinto de Morris no sólo tienen que conocer hacia dónde escapar (lo cual es información de tipo declarativa que involucra principalmente al hipocampo y otras áreas del lóbulo temporal) sino que también tienen que aprender un procedimiento (nadar para poder escapar), que depende de la zona dorsal del estriado (núcleo CPu dorsal) [149].

Debido a que tanto el aprendizaje espacial como la memoria de referencia dependen de la integridad del hipocampo, nuestros resultados muestran el rol de la Ang II mediante la activación de los RAT_1 sobre esta área. En condiciones no patológicas la Ang II produciría una inhibición del LTP en el hipocampo. Debido a que no encontramos un mejor desempeño de los animales en el grupo candesartan *per se*, en nuestras condiciones experimentales, el LTP no se encontraría significativamente incrementado por el bloqueo de los RAT_1 , posiblemente porque también tiene una fuerte regulación por parte de los receptores NMDA para glutamato [150], que por menor estimulación podrían compensar el

efecto del bloqueo de los RAT_1 . Sin embargo, en presencia de STZ, el bloqueo de los RAT_1 provocó una mejora significativa del desempeño fundamentalmente porque (como se discutirá más adelante) esta neurotoxina provoca un desbalance que exagera la acción de la Ang II sobre los receptores RAT_1 .

Los animales debieron valerse del uso de claves ubicadas en la sala de experimentación para localizar la plataforma sumergida que estaba fuera de la vista de éstos, y así trazar el camino más corto hacia la plataforma evitando una situación aversiva provocada por el medio acuoso, en este contexto, el aprendizaje y la memoria se adquieren en una situación de evitación activa que depende de la actividad locomotora durante el nado forzado.

Se reportó que el bloqueo de los RAT_1 favorece la extinción de la memoria del miedo [151], sin afectar la adquisición, y que por lo tanto los bloqueantes AT_1 pueden reducir las respuestas al miedo y mejorar los síntomas relacionados al estrés en modelos de roedores que muestran comportamiento de ansiedad [152]. La amígdala es una estructura que integra el circuito neuronal del miedo junto al hipocampo [153]. A medida que se repite la exposición al medio acuoso, disminuye la aversión, el estrés y el miedo. En relación a esto, es posible que el antagonismo de los RAT_1 a nivel de la amígdala pueda influenciar el comportamiento de los animales frente al estímulo aversivo durante la fase de entrenamiento y mejorar el desempeño de aquellos que fueron tratados con el bloqueante. Sin embargo, nosotros no encontramos una diferencia significativa entre las curvas de aprendizaje de los animales tratados solamente con candesartan respecto a los animales controles, posiblemente porque el paradigma, método de empleo y evaluación del laberinto de Morris en nuestro diseño, revela principalmente cambios en el hipocampo y es poco sensible a los cambios en la activación de los RAT_1 de la amígdala.

Con el laberinto de Morris, también se puede evaluar la memoria de referencia a partir de la preferencia de los animales por recorrer el cuadrante donde recuerda que se encontraba la plataforma, cuando ésta ha sido removida. No encontramos diferencias significativas entre los distintos grupos experimentales en el tiempo que los animales nadaron en el cuadrante que contenía la plataforma de escape o en la distancia recorrida por éstos para llegar hasta el punto donde se encontraba previamente.

La memoria a largo plazo también fue evaluada en la prueba de evitación pasiva. El paradigma de condicionamiento consistió en la asociación entre las claves que denotan la preferencia por el lugar oscuro (estímulo condicionado) y la noxa (el estímulo

incondicionado). Entonces, la respuesta condicionada se transforma en un aumento en el tiempo de latencia para moverse desde el compartimiento iluminado hacia el oscuro [17].

Nuestros resultados no mostraron diferencias significativas en el tiempo de retención el día de la prueba entre los distintos grupos experimentales, de manera que la dosis, tiempo y condiciones de administración de la STZ no produjeron alteración en la memoria a largo plazo. La consolidación de la memoria en este esquema también depende de la integridad del hipocampo y de la ocurrencia de múltiples eventos tales como la activación de receptores de NMDA, la activación de PKA y la activación de ERK1/2 [149]. Por estas razones, nosotros consideramos que el daño sobre el hipocampo y las estructuras relacionadas se correlaciona con la extensión del daño ocasionado por la administración de STZ, el cual se incrementa con el tiempo transcurrido entre la administración de la neurotoxina y la realización de las pruebas conductuales. En relación a esto, Rai S. y col. utilizaron dos esquemas experimentales para evaluar la memoria espacial en el test de Morris a partir de la administración ICV de STZ. Estos autores realizaron las pruebas 14 días posteriores a la inyección de la neurotoxina (el test duró 3 días y evaluó solo la fase de aprendizaje). Encontraron una interrupción en la memoria espacial en aquellos animales que recibieron la STZ, y no observaron una disminución significativa en el tiempo de latencia necesario para encontrar la plataforma durante los tres días de la etapa de aprendizaje. Por otro lado, evaluaron si encontraban los mismos resultados realizando las pruebas 7 días posteriores a la administración ICV de STZ. En este caso, los animales inyectados con la neurotoxina se comportaron igual que los animales controles, es decir, presentaron una disminución significativa en la latencia a medida que las sesiones fueron avanzando, sin evidenciar ningún deterioro en la memoria [154]. Cuando iniciaron las pruebas luego de 14 y 15 días después de la primera inyección central de STZ, Tota y col. encontraron que el bloqueante de los RAT_1 mejoró la memoria espacial y perindopril evitó la interrupción en la memoria de referencia ambas evaluadas en el test de Morris [42], pero a diferencia de nuestros hallazgos, también mejoró la latencia en la prueba de evitación pasiva. En nuestro diseño experimental el tiempo transcurrido entre la administración de la neurotoxina y la realización de las pruebas conductuales, fue 5 días menor y 3 días mayor que los extremos mencionados, ya que nosotros iniciamos las pruebas 10 días después de la primera inyección ICV de STZ. Esto explicaría nuestros hallazgos acerca de la interrupción en la memoria de trabajo que observamos en el test del campo perforado, del aprendizaje espacial en el test de Morris y

en la interrupción en la memoria declarativa en el test de reconocimiento de objetos, en donde encontramos un déficit en la memoria a corto plazo, pero no observamos diferencias significativas en la memoria a largo plazo y de referencia evaluadas en el test de evitación pasiva y el test de Morris respectivamente.

Otros autores estudiaron el efecto del bloqueo de los RAT_1 con candesartan [42], telmisartan [59] y de la inhibición de la ACE mediante el uso de perindopril en ratones, sobre el deterioro en la memoria en otros modelos animales de demencia. También observaron que el inhibidor de la ACE producía una mejora del efecto amnésico inducido por la administración de escopolamina, no sólo cuando los animales fueron evaluados en la prueba de Morris, sino también en la prueba de evitación pasiva [45].

Por su parte, utilizando un modelo de ratón transgénico para la proteína APP, Ongali B. y col. utilizaron otro bloqueante de los RAT_1 (losartan) y mostraron que previno la disfunción cognitiva en animales adultos cuando éste fue administrado de forma preventiva durante 10 meses y que aún en animales de edad más avanzada favoreció la consolidación y la adquisición de la memoria después de 3 meses de tratamiento [30]. Por otro lado, en el modelo animal de Alzheimer inducido por la administración de escopolamina, losartan también revirtió el déficit cognitivo [155]. Esto nos indicaría que los efectos no estarían mediados por una acción inespecífica de los fármacos, sino que estaría mediado por su acción sobre los RAT_1 y que la intervención sobre el RAS cerebral podría tener un efecto neuroprotector en estadios aún más avanzados de la AD que los abarcados por nuestro estudio.

No sólo en modelos animales de demencia se observó el efecto benéfico de los inhibidores de la ACE en las pruebas de memoria y aprendizaje. Jenkins y col. trataron ratas de la cepa Sprague Dawley para estudiar el efecto del perindopril en la prueba de Morris. Encontraron que la ratas que fueron tratadas con el inhibidor de la ACE aprendían más rápido la localización de la plataforma sumergida, y que además, aquellas que recibieron la dosis más alta, pasaban más tiempo en el cuadrante blanco cuando la plataforma se encontraba ausente [72], lo cual, sugiere un rol facilitador del perindopril en los procesos de aprendizaje y memoria, aún en condiciones no patológicas. Esto puede deberse en parte, a una menor activación de los RAT_1 y la disminución en la síntesis de Ang II como consecuencia de la inhibición de la ACE, aunque también, cuando la convertasa se encuentra inhibida, los elevados niveles de Ang I pueden incrementar la síntesis de Ang (1-7) y de otros péptidos derivados de angiotensina que se sabe presentan

efectos benéficos sobre la memoria [156]. En relación a esto, se vio que cuando se produce un aumento en los niveles de Ang I, como consecuencia de la inhibición de la ACE, también se ve favorecida la síntesis de Ang IV [14, 157]. En los últimos años se publicaron numerosos trabajos que involucran la participación de Ang IV en los procesos de aprendizaje y memoria. Además, numerosos estudios sugieren que la Ang IV y sus análogos facilitan el LTP en diferentes regiones del hipocampo [158]. Se conoce que la administración de dos ligandos del RAT_4 (Nle-Ang IV y LVV-haemorfina 7) produce un aumento en el aprendizaje espacial en el laberinto radial de Barnes [48]. También se observó que se atenuó la interrupción de la memoria inducida por escopolamina como consecuencia de un aumento en la actividad colinérgica central inducida por Ang IV [47].

Analizamos si los tratamientos que afectaron la memoria provocaban cambios histomorfológicos en el hipocampo. En las secciones coloreadas con HE encontramos que las células piramidales de la región CA_1 de las ratas inyectadas ICV con STZ presentaban un reordenamiento distinto al que encontramos en las ratas controles y que algunas células incluso, presentaron alteraciones en su morfología, mientras que los animales tratados previamente con candesartan no revelaban cambios. La magnitud del daño neuronal inducido por STZ no afectó en forma drástica la citoarquitectura. Sin embargo, se conoce que la administración ICV de STZ produce una disminución en el número de células del hipocampo, de la corteza cerebral y de áreas periventriculares [42]. Saxena y col. también pusieron de manifiesto el efecto neurotóxico de la STZ sobre las células del hipocampo [159]. Esto nos indica, una vez más, que las disfunciones observadas corresponden a un estadio temprano del daño inducido por STZ.

Siendo que no se observaron cambios drásticos en la citoarquitectura de las células del hipocampo, analizamos el marcador de activación neuronal fos. C-fos es un factor de transcripción y su regulación se correlaciona con el aprendizaje y la memoria espacial en roedores [160]. Se le ha asignado un rol durante el proceso de formación de la memoria en base a varios estudios que muestran que su expresión se induce durante la realización de pruebas conductuales [161]. Encontramos que la STZ produjo una disminución en el número de células reactivas a fos (células fos-IR) no sólo en la región CA_1 del hipocampo sino también en la región CA_3 y GD. Esta acción de la STZ es relevante, porque el hipocampo es una estructura esencial para el aprendizaje espacial, junto a la corteza entorrinal adyacente (principal aferencia del hipocampo) y están involucrados en el mapeo cognitivo y la facilitación del comportamiento contexto dependiente y representan uno de

los centros de memoria más importantes del cerebro. Durante el proceso de adquisición del aprendizaje y durante el proceso de recuperación de la información, el hipocampo se mantiene activo por un período de varios días. Sin embargo, luego de varias semanas, esta activación se debilita y otras áreas, como la corteza prefrontal, se vuelven más activas [162].

En nuestro modelo, candesartan previno la disminución en la activación de fos en todas las áreas del hipocampo estudiadas. Incluso también presentó esta acción preventiva en la región dorso medial del núcleo CPu, el cual es una estructura de los ganglios basales que se encuentra estrechamente relacionada a los procesos de aprendizaje y memoria necesarios en el desarrollo de mapas cognitivos espaciales para encontrar la plataforma sumergida en la prueba de Morris [163].

Otros autores reportaron que la administración ICV de STZ producía una disminución en el marcador de activación neuronal fos en distintas áreas del hipocampo [164] y que ratones con delección específica del gen c-fos a nivel del CNS presentaban un déficit selectivo del aprendizaje dependiente del hipocampo, específicamente del aprendizaje espacial en la prueba de Morris. Estos hallazgos ponen en evidencia el rol crítico de este gen de expresión temprana en los procesos de aprendizaje y memoria [165]. Nuestros resultados evidencian la participación de los RAT₁ en la expresión de fos durante el aprendizaje espacial, ya que el bloqueo de los mismos previno la disminución en la expresión del marcador inducido por STZ.

Cuando estudiamos el marcador de activación neuronal en la corteza motora primaria no encontramos diferencias significativas en el número de neuronas fos-IR entre los diferentes tratamientos. Durante el desarrollo de la prueba, la actividad motora tampoco reveló diferencias entre tratamientos sin evidenciar dificultades motoras para la realización del mismo, por lo tanto, las variaciones en el tiempo de latencia observado durante el aprendizaje representarían cambios en la memoria y no en la actividad locomotora de los animales. Además nos muestra que el efecto depresor de la STZ es selectivo con respecto a las áreas cerebrales afectadas, esto se debería al tiempo de acción anteriormente mencionado, pero además, esta área cerebral carece de expresión de RAT₁ [12, 166, 167] por lo tanto observamos que bajo estas condiciones, candesartan no presentó efectos inespecíficos (no mediados por el bloqueo de los RAT₁) en esta área del cerebro.

Cabe destacar, que la expresión de c-fos se utiliza también como marcador de cambios en la actividad metabólica de las neuronas [164] y que la administración ICV de

STZ produce una desensibilización de los receptores de insulina cerebrales ocasionando una disminución en el metabolismo glucídico y energético de las células [107]. La disminución en el metabolismo de la glucosa se encuentra relacionada, a una disminución en la síntesis de acetilCoA [168] y por lo tanto a un déficit colinérgico, y también a un aumento en la producción de radicales libres [169]. Esto guarda relación con los hallazgos de Agrawal y col. que muestran que la interrupción de la memoria en las ratas inyectadas ICV con STZ se produce por una disminución en la vía de señalización luego de la activación de los receptores de insulina en la región CA₃ del hipocampo [170] y que estos receptores son susceptibles al estrés oxidativo [171]. Tota y col., observaron también, un aumento en marcadores de estrés oxidativo a nivel del tejido del hipocampo y de la corteza de los animales como consecuencia de la administración ICV de STZ [42, 44] y tanto la inhibición de la ACE, como el bloqueo de los RAT₁, disminuyeron los niveles de estrés oxidativo. Esto provocaría un efecto protector de los receptores de insulina en el hipocampo frente al daño de la STZ, evitando de este modo la alteración cognitiva, evidenciada por la disminución en el marcador de activación neuronal fos en las distintas áreas del hipocampo así como también en el núcleo CPu dorsal durante el aprendizaje en la prueba de Morris.

Se considera al estrés oxidativo como uno de los mecanismos a partir del cual la STZ ejerce su acción tóxica [114]. La Ang II produce una activación de la NADPH oxidasa con la consecuente liberación del radical superóxido. Cuando ocurre un desequilibrio en este sistema, tal como se observa con la inyección ICV de STZ, hay un aumento en la producción de ROS lo que produce peroxidación lipídica y daño tisular permanente [29].

Tal como ha sido señalado, la peroxidación lipídica es un proceso muy dinámico y complejo de oxidación de lípidos en donde los dienos conjugados se forman en una etapa intermedia y se transforman rápidamente generando otros metabolitos tales como el MDA, teniendo este, reactividad más limitada con otros productos de la cadena.

En relación a nuestros resultados no observamos diferencias significativas en el nivel de dienos conjugados en los microvasos cerebrales entre los distintos tratamientos, posiblemente debido a que, en el proceso de peroxidación lipídica la mayor producción de estos vía NADPH no modificó su concentración debido al incremento en su transformación en MDA. Pero sí encontramos incrementados los niveles de este último metabolito producto de la peroxidación lipídica en los microvasos de las ratas inyectadas con STZ, lo

que nos indica, que en los microvasos cerebrales, la concentración de dienos conjugados no representa el recambio (turn over) y confirma que los RAT_1 están involucrados en los procesos de peroxidación lipídica que se desarrollan en los microvasos cerebrales de las ratas tratadas con STZ, ya que, tanto la inhibición de la enzima responsable de la síntesis de Ang II, así como el bloqueo de los RAT_1 , previnieron el aumento en los niveles de MDA.

Los microvasos cerebrales aislados de las ratas inyectadas con STZ, mostraron una marcada inmunoreactividad de la HSP-70 y esto, se encontraría relacionado con el aumento en los niveles de estrés oxidativo. Esta relación se debería a que las proteínas de shock térmico, cumplen la función de chaperonas moleculares facilitando el plegamiento, el transporte intercelular y el ensamblaje de las proteínas celulares cumpliendo un rol fundamental para la defensa de las neuronas expuestas al daño oxidativo [172]. Nosotros hayamos que el pretratamiento con candesartan o captopril atenuó la expresión de HSP-70 inducida por STZ. Una amplia variedad de estímulos puede producir un aumento en la síntesis de HSP-70, como la hipertensión arterial, la inflamación y el estrés oxidativo [53]. En este sentido, Zhou y col [173], pusieron de manifiesto un aumento en la expresión de esta proteína en los microvasos cerebrales de ratas SHR cuyos niveles de expresión se normalizaron luego del tratamiento con candesartan, a su vez, el bloqueante disminuyó la infiltración de macrófagos en los microvasos cerebrales y revertió el aumento en la liberación de citoquinas pro-inflamatorias. Nuevamente esto señala que los efectos protectores de los bloqueantes de los RAT_1 son efectivos en diversas situaciones en donde los procesos inflamatorios y el estrés oxidativo provocan daño tisular.

En el presente trabajo encontramos que la inyección ICV con STZ aumentó la expresión de los RAT_1 en los microvasos, y que este aumento se atenuó con el pretratamiento con candesartan o captopril. Este efecto revela la importancia que tienen en el desarrollo de la toxicidad estos receptores, dado que la mayor expresión o la sobreestimulación de los mismos a nivel cerebral se encuentra asociada a desórdenes inducidos por estrés, hipertensión, isquemia cerebral, inflamación exacerbada, alteraciones en el comportamiento y pérdida de la función cognitiva [50, 51]. El eje ACE/AngII/ RAT_1 fue ampliamente estudiado por sus propiedades pro-inflamatorias en diferentes modelos animales [5, 6, 25, 174]. El aumento en la expresión de los RAT_1 se encuentra asociado a un estado inflamatorio central y periférico exacerbado [5, 175]. Más aún, el bloqueo de los mismos a nivel de las células endoteliales cerebrovasculares mostró tener un efecto

antiinflamatorio [53, 126] y la inflamación cerebral sostenida constituye un factor principal para el desarrollo de las enfermedades cerebrales debido a que daña las neuronas y contribuye a la incidencia y a la progresión de isquemia cerebral y desórdenes neurodegenerativos [25].

La administración ICV de STZ produjo un aumento en el número de astrocitos GFAP-IR en todas las regiones estudiadas con respecto a los animales controles, mientras que el pretratamiento con candesartan y con captopril previno este aumento en todas las zonas estudiadas. Este hallazgo es relevante porque los astrocitos en condiciones fisiológicas, contribuyen a la homeostasis y a la función del CNS. Sin embargo, frente a un estado de inflamación, se vuelven reactivos y experimentan cambios en su estructura promoviendo el daño neuronal y la muerte celular [176]. La microglia también expresa un número significativo de RAT_1 , en este sentido se conoce que los bloqueantes de estos receptores presentan efectos neuroprotectores directos en cultivos de células de la microglia [175]. La producción sostenida de citoquinas pro-inflamatorias puede activar y alterar la función de estas células. Cuando la microglia es estimulada, se exagera la cascada inflamatoria, produciendo niveles aumentados de moléculas pro-inflamatorias (como el $TNF\alpha$ y la $IL-1\beta$), que dañan el parénquima cerebral y causan alteraciones en la función neuronal o incluso producen la muerte neuronal [25].

De acuerdo con nuestros resultados, utilizando el mismo modelo de inyección ICV de STZ, Prickaerts y col., encontraron un aumento en el contenido de GFAP en el septum, hipocampo y en el estriado de estos animales [115].

Nuestros resultados mostraron que la administración ICV de STZ produjo un aumento en los niveles de $TNF\alpha$ del LCR de los animales y que candesartan previno el aumento observado. Sin embargo, el pretratamiento con captopril no presentó la misma acción preventiva que el bloqueante AT_1 . Más aún, observamos un aumento en los animales tratados solamente con el inhibidor. Esta acción diferencial es de gran importancia porque un aumento en los niveles de proteínas pro-inflamatorias como el $TNF\alpha$ podría contribuir con el proceso degenerativo en la AD [177]. Estudios realizados en ratones transgénicos 3xTg-AD, muestran la participación de citoquinas inflamatorias, particularmente de $TNF\alpha$, en estadios pre-sintomáticos de la enfermedad. Además se ha mostrado que tanto la activación de la glia, como el aumento en los niveles de $TNF\alpha$ y la generación de ROS, preceden a la apoptosis y a la neurotoxicidad sináptica inducida por la administración ICV de STZ [154]. En este contexto, su disminución podría mitigar la

progresión de la enfermedad [94] y evidencian que el tratamiento con bloqueantes de RAT_1 podría ser más efectivo que el tratamiento con los inhibidores de la ACE.

Observamos que la inyección ICV de STZ produjo una dilatación de los ventrículos laterales y que el bloqueo de los RAT_1 previno este fenómeno. Debido a que no observamos un importante daño tisular, este hallazgo podría ser consecuencia del proceso inflamatorio el cual produciría un edema debido a la extravasación de líquido. Estos fenómenos se encuentran generalmente relacionados a las enfermedades inflamatorias del CNS [86]. Cabe resaltar que captopril tampoco previno la dilatación de los ventrículos laterales y que produjo un aumento del volumen de los mismos. Estos resultados estarían relacionados al entrecruzamiento que existe entre el RAS y el KKS. Las kininas, como la bradiquinina, estimulan la liberación de mediadores de la inflamación como citoquinas pro-inflamatorias, radicales libres y eicosanoides [26, 178].

De hecho, el edema es un fenómeno comúnmente asociado al uso de inhibidores de la ACE como consecuencia de la acumulación de bradiquinina [179]. También se reportó que pacientes con injuria cerebral por traumatismo, hemorragia subaracnoidea, hemorragia intracerebral y accidente cerebrovascular isquémico presentaron niveles aumentados de bradiquinina en el LCR, estableciéndose una correlación entre este aumento y la intensidad de la formación del edema [26]. El receptor de bradiquinina B2R se expresa de forma constitutiva y su estimulación media respuestas fisiológicas como la vasodilatación y la producción de NO por parte de la eNOS. Mientras que la expresión de B1R se ve inducida en ciertas condiciones como ser un proceso inflamatorio y su activación produce un aumento sostenido en la producción de NO por parte de la iNOS promoviendo el estrés nitrosativo [26].

El captopril inhibe la síntesis de Ang II y por lo tanto, atenúa los efectos pro-inflamatorios mediados por el RAT_1 . Pero también, inhibe la inactivación de la bradiquinina, lo cual podría explicar no sólo el aumento que observamos en el volumen de los ventrículos laterales de los animales que fueron tratados con captopril, sino que también esta podría ser la causa del aumento en los niveles de $TNF\alpha$ en el LCR de estos animales.

Por otro lado, también fue reportado que la ACE degrada la sustancia P, la cual fue identificada como un neuropéptido pro-inflamatorio que induce la secreción de $TNF\alpha$ por activación de las células endoteliales en la microvasculatura cerebral [180]. De manera que este es otro mecanismo que contribuiría al aumento del $TNF\alpha$ en los animales tratados con

captopril. Además, se observó que el TNF α produce un aumento en la permeabilidad de las células endoteliales de los microvasos cerebrales [181], lo cual explicaría la correlación que encontramos entre el aumento de esta citoquina y la dilatación de los ventrículos laterales en los animales tratados con el inhibidor.

Otro mecanismo propuesto a partir del cual los bloqueantes de los RAT₁ mejoran el déficit cognitivo es su acción como agonista parcial del receptor (PPAR γ) [182, 183]. La activación de este receptor por parte del telmisartan, fue asociada a la mejora del deterioro de la memoria inducida por la inyección ICV del péptido β 1-40 en un modelo murino de AD. También se conoce que tanto el bloqueo de los RAT₁, como la activación del receptor PPAR γ mejoran el flujo sanguíneo cerebral, atenúan el estrés nitrosativo cerebral y disminuyen la expresión del TNF α , todo esto asociado a una mejora en el desempeño de los animales en el test de Morris [184]. De manera complementaria, Singh y col. mostraron los efectos benéficos observados a partir del tratamiento con telmisartan sobre el aumento en la actividad de la AchE, de la mieloperoxidasa y de los TBARS en el cerebro, así como en la disminución de los niveles de glutatión y la interrupción en la memoria inducidos por la inyección ICV de STZ [59].

Tomando estas evidencias en conjunto, mostramos que la sobre-estimulación del eje ACE/AngII/RAT₁ y no el cuadro inflamatorio, sería el responsable principal del deterioro de la memoria a corto plazo en la etapa temprana de la demencia inducida por STZ, ya que la inhibición de la ACE previno el deterioro en la memoria pero no lo hizo con los procesos inflamatorios.

6.1 Relación con enfermedad de Alzheimer en humanos

Numerosas evidencias postulan que, tanto en la AD así como en la demencia vascular, la inflamación y el estrés oxidativo son procesos asociados al desarrollo de la patología [8, 44]. De acuerdo con esto, se han encontrado elevados niveles de citoquinas pro-inflamatorias y de marcadores de estrés oxidativo en el LCR y en el suero de pacientes con AD [77]. Sarah Lee y col. luego de estudiar distintos marcadores de estrés oxidativo y de inflamación en cerebros, fluido ventricular y en el LCR de pacientes que han sido diagnosticados con AD, encontraron que en los estadios más tempranos de la enfermedad podían detectarse niveles aumentados del producto de oxidación 8 hidroxidesoxiguanosina (8OHdG) y de TNF α entre otras citoquinas [185].

Se ha reportado que en la AD los astrocitos pasan de un estado basal a un estado reactivo, relegando su rol neuroprotector, convirtiendo vulnerables a las neuronas a la acción citotóxica de las citoquinas pro-inflamatorias y de las ROS [186].

La estimulación de los astrocitos conlleva a la activación de la cascada NF κ B y a la inducción de la iNOS [187]. En relación a esto, se observaron niveles aumentados en la producción de iNOS en los astrocitos de cerebros con AD [188]. Se reportó que, tanto la IL-1 β como el TNF α pueden estimular por si mismos la inducción de iNOS en los astrocitos [189, 190].

Todos estos resultados están de acuerdo con aquellos obtenidos a partir de estudios realizados en pacientes bajo tratamiento para la hipertensión y controles placebos. En éstos tanto los inhibidores de la ACE, como los bloqueantes de los RAT₁, así como también los bloqueantes de los canales de calcio, presentaron un menor riesgo de desarrollar demencia. En comparación, los tratados con bloqueantes β -adrenérgicos no presentaron una disminución significativa en la incidencia de déficit cognitivo [65, 66, 191, 192].

CONCLUSIONES

7. CONSIDERACIONES FINALES

En el conocimiento actual sobre los mecanismos que conducen al desarrollo de la AD, resalta su complejidad. La AD se inicia con una serie de eventos muchos años antes de la manifestación clínica del declive cognitivo. Los tratamientos existentes ayudan a mejorar la calidad de vida de la persona que padece la enfermedad, sin embargo su eficacia es muy limitada. Esto hace necesario desarrollar herramientas que permitan un diagnóstico temprano y nuevos fármacos que sean capaces de prevenir, o al menos retrasar, la aparición del déficit cognitivo durante las primeras etapas de la enfermedad. Teniendo en cuenta esto, nuestro modelo experimental se enfocó en la prevención y en el estudio de las etapas tempranas de la AD.

A partir de los resultados obtenidos observamos que el bloqueo del RAS cerebral previno el desarrollo de los procesos inflamatorios y oxidativos que conducen a la degeneración neuronal y por lo tanto al declive cognitivo inducidos por la administración ICV de STZ. Sin embargo, fue el bloqueo de los RAT_1 con candesartan, el tratamiento más efectivo debido a la cercana relación que existe entre la activación de este receptor y la respuesta inflamatoria. En tanto que, la inhibición a largo plazo de la convertasa resulta en la acumulación de sustancia P y bradiquinina, las cuales podrían ser responsables de los efectos que presentó captopril sobre los niveles de $TNF\alpha$ en el LCR de los animales, así como en la dilatación de los ventrículos laterales. Es importante destacar que la sobreestimulación del eje ACE/AngII/ RAT_1 , sería el responsable principal del deterioro de la memoria a corto plazo en la etapa temprana de la demencia inducida por STZ. Enfatizamos el rol del estrés oxidativo como mecanismo de daño a partir de la administración ICV de STZ. Porque tanto candesartan como captopril previnieron el aumento de MDA en los microvasos cerebrales.

Destacamos el efecto del bloqueo de los RAT_1 sobre la dilatación de los ventrículos laterales, así como sobre la expresión del marcador de activación neuronal fos en las áreas relacionadas al aprendizaje y la memoria, sobre los niveles de $TNF\alpha$ en el LCR y sobre la peroxidación lipídica en los microvasos cerebrales.

El presente trabajo, contribuye al conocimiento de la fisiopatogenia de la enfermedad de AD, específicamente al rol del RAS cerebral en el desarrollo de los procesos tempranos que conducen a la pérdida de la memoria en un modelo animal de demencia. Además, amplía la posibilidad de investigar la acción de nuevos fármacos u

otras herramientas terapéuticas en la prevención de una enfermedad cuya incidencia se incrementa notablemente con el aumento de la edad promedio de la población, esto se refleja en que actualmente, según la Organización Mundial de la Salud (OMS) 35,6 millones de personas padecen la enfermedad, para el año 2030 las proyecciones son de 65.7 millones de enfermos.

BIBLIOGRAFÍA

8. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Braun-Menendez E, Fasciolo JC, Leloir LF, Munoz JM. The substance causing renal hypertension. *J Physiol.* 1940;98:283-98.
- [2] Fasciolo JC, Houssay BA, Taquini AC. The blood-pressure raising secretion of the ischaemic kidney. *J Physiol.* 1938;94:281-93.
- [3] Ganten D, Boucher R, Genest J. Renin activity in brain tissue of puppies and adult dogs. *Brain Res.* 1971;33:557-9.
- [4] Ganten D, Marquez-Julio A, Granger P, Hayduk K, Karsunky KP, Boucher R, et al. Renin in dog brain. *Am J Physiol.* 1971;221:1733-7.
- [5] Benicky J, Sanchez-Lemus E, Pavel J, Saavedra JM. Anti-inflammatory effects of angiotensin receptor blockers in the brain and the periphery. *Cell Mol Neurobiol.* 2009;29:781-92.
- [6] Bregonzio C, Armando I, Ando H, Jezova M, Baiardi G, Saavedra JM. Anti-inflammatory effects of angiotensin II AT1 receptor antagonism prevent stress-induced gastric injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2003;285:G414-23.
- [7] Baranowska D, Braszko JJ, Wisniewski K. Effect of angiotensin II and vasopressin on acquisition and extinction of conditioned avoidance in rats. *Psychopharmacology (Berl).* 1983;81:247-51.
- [8] Bild W, Hritcu L, Stefanescu C, Ciobica A. Inhibition of central angiotensin II enhances memory function and reduces oxidative stress status in rat hippocampus. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2012;43:79-88.
- [9] Sirett NE, McLean AS, Bray JJ, Hubbard JI. Distribution of angiotensin II receptors in rat brain. *Brain Res.* 1977;122:299-312.
- [10] Fitzsimons JT. Thirst. *Physiol Rev.* 1972;52:468-561.
- [11] Hermann K, Lang RE, Unger T, Bayer C, Ganten D. Combined high-performance liquid chromatography-radioimmunoassay for the characterization and quantitative measurement of neuropeptides. *J Chromatogr.* 1984;312:273-84.
- [12] Phillips MI, Sumners C. Angiotensin II in central nervous system physiology. *Regul Pept.* 1998;78:1-11.
- [13] von Bohlen und Halbach O, Albrecht D. The CNS renin-angiotensin system. *Cell Tissue Res.* 2006;326:599-616.
- [14] Wright JW, Harding JW. The brain renin-angiotensin system: a diversity of functions and implications for CNS diseases. *Pflugers Arch.* 2012;465:133-51.

- [15] Hoe KL, Armando I, Baiardi G, Sreenath T, Kulkarni A, Martinez A, et al. Molecular cloning, characterization, and distribution of the gerbil angiotensin II AT₂ receptor. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2003;285:R1373-83.
- [16] Inagami T, Iwai N, Sasaki K, Guo DF, Furuta H, Yamano Y, et al. Angiotensin II receptors: cloning and regulation. *Arzneimittelforschung*. 1993;43:226-8.
- [17] Wright JW, Yamamoto BJ, Harding JW. Angiotensin receptor subtype mediated physiologies and behaviors: new discoveries and clinical targets. *Prog Neurobiol*. 2008;84:157-81.
- [18] Culman J, Blume A, Gohlke P, Unger T. The renin-angiotensin system in the brain: possible therapeutic implications for AT₁-receptor blockers. *J Hum Hypertens*. 2002;16 Suppl 3:S64-70.
- [19] Zhenfeng Z, Huilan S, Junya J, Dong L, Shan L. A systematic review and meta-analysis of aliskiren and angiotension receptor blockers in the management of essential hypertension. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*. 2011;12:102-12.
- [20] Touyz RM, Berry C. Recent advances in angiotensin II signaling. *Braz J Med Biol Res*. 2002;35:1001-15.
- [21] de Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright JW, Unger T. International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev*. 2000;52:415-72.
- [22] Wright JW, Harding JW. The brain angiotensin system and extracellular matrix molecules in neural plasticity, learning, and memory. *Prog Neurobiol*. 2004;72:263-93.
- [23] Wright JW, Harding JW. Brain renin-angiotensin--a new look at an old system. *Prog Neurobiol*. 2011;95:49-67.
- [24] Xia H, Lazartigues E. Angiotensin-converting enzyme 2 in the brain: properties and future directions. *J Neurochem*. 2008;107:1482-94.
- [25] Saavedra JM. Angiotensin II AT₁ receptor blockers as treatments for inflammatory brain disorders. *Clin Sci (Lond)*. 2012; 123:567-90.
- [26] Naffah-Mazzacoratti Mda G, Gouveia TL, Simoes PS, Perosa SR. What have we learned about the kallikrein-kinin and renin-angiotensin systems in neurological disorders? *World J Biol Chem*. 2014;5:130-40.
- [27] Iadecola C. The overlap between neurodegenerative and vascular factors in the pathogenesis of dementia. *Acta Neuropathol*. 2010;120:287-96.

- [28] Modrick ML, Didion SP, Sigmund CD, Faraci FM. Role of oxidative stress and AT1 receptors in cerebral vascular dysfunction with aging. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2009;296:H1914-9.
- [29] Labandeira-Garcia JL, Rodriguez-Pallares J, Villar-Cheda B, Rodriguez-Perez AI, Garrido-Gil P, Guerra MJ. Aging, Angiotensin system and dopaminergic degeneration in the substantia nigra. *Aging Dis.* 2011;2:257-74.
- [30] Ongali B, Nicolakakis N, Tong XK, Aboukassim T, Papadopoulos P, Rosa-Neto P, et al. Angiotensin II type 1 receptor blocker losartan prevents and rescues cerebrovascular, neuropathological and cognitive deficits in an Alzheimer's disease model. *Neurobiol Dis.* 2014;68:126-36.
- [31] Iwai M, Liu HW, Chen R, Ide A, Okamoto S, Hata R, et al. Possible inhibition of focal cerebral ischemia by angiotensin II type 2 receptor stimulation. *Circulation.* 2004;110:843-8.
- [32] Kramar EA, Harding JW, Wright JW. Angiotensin II- and IV-induced changes in cerebral blood flow. Roles of AT1, AT2, and AT4 receptor subtypes. *Regul Pept.* 1997;68:131-8.
- [33] Horiuchi M, Mogi M. Role of angiotensin II receptor subtype activation in cognitive function and ischaemic brain damage. *Br J Pharmacol.* 2011;163:1122-30.
- [34] Shindo T, Takasaki K, Uchida K, Onimura R, Kubota K, Uchida N, et al. Ameliorative effects of telmisartan on the inflammatory response and impaired spatial memory in a rat model of Alzheimer's disease incorporating additional cerebrovascular disease factors. *Biol Pharm Bull.* 2012;35:2141-7.
- [35] Wayner MJ, Armstrong DL, Polan-Curtain JL, Denny JB. Role of angiotensin II and AT1 receptors in hippocampal LTP. *Pharmacol Biochem Behav.* 1993;45:455-64.
- [36] Otto T, Eichenbaum H. Neuronal activity in the hippocampus during delayed non-match to sample performance in rats: evidence for hippocampal processing in recognition memory. *Hippocampus.* 1992;2:323-34.
- [37] Martinez JL, Jr., Derrick BE. Long-term potentiation and learning. *Annu Rev Psychol.* 1996;47:173-203.
- [38] Bliss TV, Douglas RM, Errington ML, Lynch MA. Correlation between long-term potentiation and release of endogenous amino acids from dentate gyrus of anaesthetized rats. *J Physiol.* 1986;377:391-408.

- [39] Kramar EA, Armstrong DL, Ikeda S, Wayner MJ, Harding JW, Wright JW. The effects of angiotensin IV analogs on long-term potentiation within the CA1 region of the hippocampus in vitro. *Brain Res.* 2001;897:114-21.
- [40] Hellner K, Walther T, Schubert M, Albrecht D. Angiotensin-(1-7) enhances LTP in the hippocampus through the G-protein-coupled receptor Mas. *Mol Cell Neurosci.* 2005;29:427-35.
- [41] Barnes JM, Barnes NM, Costall B, Horovitz ZP, Ironside JW, Naylor RJ, et al. Angiotensin II inhibits acetylcholine release from human temporal cortex: implications for cognition. *Brain Res.* 1990;507:341-3.
- [42] Tota S, Kamat PK, Saxena G, Hanif K, Najmi AK, Nath C. Central angiotensin converting enzyme facilitates memory impairment in intracerebroventricular streptozotocin treated rats. *Behav Brain Res.* 2012;226:317-30.
- [43] Koller M, Krause HP, Hoffmeister F, Ganten D. Endogenous brain angiotensin II disrupts passive avoidance behavior in rats. *Neurosci Lett.* 1979;14:71-5.
- [44] Tota S, Kamat PK, Awasthi H, Singh N, Raghubir R, Nath C, et al. Candesartan improves memory decline in mice: involvement of AT1 receptors in memory deficit induced by intracerebral streptozotocin. *Behav Brain Res.* 2009;199:235-40.
- [45] Tota S, Nath C, Najmi AK, Shukla R, Hanif K. Inhibition of central angiotensin converting enzyme ameliorates scopolamine induced memory impairment in mice: Role of cholinergic neurotransmission, cerebral blood flow and brain energy metabolism. *Behav Brain Res.* 2012;232:66-76.
- [46] Braszko JJ, Walesiuk A, Wielgat P. Cognitive effects attributed to angiotensin II may result from its conversion to angiotensin IV. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2006;7:168-74.
- [47] Pederson ES, Harding JW, Wright JW. Attenuation of scopolamine-induced spatial learning impairments by an angiotensin IV analog. *Regul Pept.* 1998;74:97-103.
- [48] Lee J, Albiston AL, Allen AM, Mendelsohn FA, Ping SE, Barrett GL, et al. Effect of I.C.V. injection of AT4 receptor ligands, NLE1-angiotensin IV and LVV-hemorphin 7, on spatial learning in rats. *Neuroscience.* 2004;124:341-9.
- [49] Wright JW, Stublely L, Pederson ES, Kramar EA, Hanesworth JM, Harding JW. Contributions of the brain angiotensin IV-AT4 receptor subtype system to spatial learning. *J Neurosci.* 1999;19:3952-61.

- [50] Saavedra JM, Ando H, Armando I, Baiardi G, Bregonzio C, Juorio A, et al. Anti-stress and anti-anxiety effects of centrally acting angiotensin II AT1 receptor antagonists. *Regul Pept.* 2005;128:227-38.
- [51] Saavedra JM, Benicky J, Zhou J. Mechanisms of the Anti-Ischemic Effect of Angiotensin II AT(1) Receptor Antagonists in the Brain. *Cell Mol Neurobiol.* 2006;26:1099-111.
- [52] Sanchez-Lemus E, Benicky J, Pavel J, Saavedra JM. In vivo Angiotensin II AT1 receptor blockade selectively inhibits LPS-induced innate immune response and ACTH release in rat pituitary gland. *Brain Behav Immun.* 2009;23:945-57.
- [53] Zhou J, Ando H, Macova M, Dou J, Saavedra JM. Angiotensin II AT1 receptor blockade abolishes brain microvascular inflammation and heat shock protein responses in hypertensive rats. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2005;25:878-86.
- [54] Faraci FM. Protecting against vascular disease in brain. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2011;300:H1566-82.
- [55] Landmesser U, Cai H, Dikalov S, McCann L, Hwang J, Jo H, et al. Role of p47(phox) in vascular oxidative stress and hypertension caused by angiotensin II. *Hypertension.* 2002;40:511-5.
- [56] Buettner GR. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate. *Arch Biochem Biophys.* 1993;300:535-43.
- [57] Alexis JD, Wang N, Che W, Lerner-Marmarosh N, Sahni A, Korshunov VA, et al. Bcr kinase activation by angiotensin II inhibits peroxisome-proliferator-activated receptor gamma transcriptional activity in vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 2009;104:69-78.
- [58] Sigmund CD. A clinical link between peroxisome proliferator-activated receptor gamma and the renin-angiotensin system. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013;33:676-8.
- [59] Singh B, Sharma B, Jaggi AS, Singh N. Attenuating effect of lisinopril and telmisartan in intracerebroventricular streptozotocin induced experimental dementia of Alzheimer's disease type: possible involvement of PPAR-gamma agonistic property. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2012;14:124-36.
- [60] Villapol S, Yaszemski AK, Logan TT, Sanchez-Lemus E, Saavedra JM, Symes AJ. Candesartan, an angiotensin II AT(1)-receptor blocker and PPAR-gamma agonist, reduces lesion volume and improves motor and memory function after traumatic brain injury in mice. *Neuropsychopharmacology.* 2012;37:2817-29.

- [61] Camacho IE, Serneels L, Spittaels K, Merchiers P, Dominguez D, De Strooper B. Peroxisome-proliferator-activated receptor gamma induces a clearance mechanism for the amyloid-beta peptide. *J Neurosci*. 2004;24:10908-17.
- [62] Wada K, Nakajima A, Katayama K, Kudo C, Shibuya A, Kubota N, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-mediated regulation of neural stem cell proliferation and differentiation. *J Biol Chem*. 2006;281:12673-81.
- [63] Caldwell PR, Seegal BC, Hsu KC, Das M, Soffer RL. Angiotensin-converting enzyme: vascular endothelial localization. *Science*. 1976;191:1050-1.
- [64] Brecher P, Tercyak A, Chobanian AV. Properties of angiotensin-converting enzyme in intact cerebral microvessels. *Hypertension*. 1981;3:198-204.
- [65] Hanon O, Forette F. Treatment of hypertension and prevention of dementia. *Alzheimers Dement*. 2005;1:30-7.
- [66] Trenkwalder P. Potential for antihypertensive treatment with an AT(1)-receptor blocker to reduce dementia in the elderly. *J Hum Hypertens*. 2002;16 Suppl 3:S71-5.
- [67] Hajjar I, Catoe H, Sixta S, Boland R, Johnson D, Hirth V, et al. Cross-sectional and longitudinal association between antihypertensive medications and cognitive impairment in an elderly population. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2005;60:67-73.
- [68] Hou DR, Wang Y, Zhou L, Chen K, Tian Y, Song Z, et al. Altered angiotensin-converting enzyme and its effects on the brain in a rat model of Alzheimer disease. *Chin Med J (Engl)*. 2008;121:2320-3.
- [69] Arregui A, Perry EK, Rossor M, Tomlinson BE. Angiotensin converting enzyme in Alzheimer's disease increased activity in caudate nucleus and cortical areas. *J Neurochem*. 1982;38:1490-2.
- [70] Savaskan E, Hock C, Olivieri G, Bruttel S, Rosenberg C, Hulette C, et al. Cortical alterations of angiotensin converting enzyme, angiotensin II and AT1 receptor in Alzheimer's dementia. *Neurobiol Aging*. 2001;22:541-6.
- [71] Hemming ML, Selkoe DJ. Amyloid beta-protein is degraded by cellular angiotensin-converting enzyme (ACE) and elevated by an ACE inhibitor. *J Biol Chem*. 2005;280:37644-50.
- [72] Jenkins TA, Chai SY. Effect of chronic angiotensin converting enzyme inhibition on spatial memory and anxiety-like behaviours in rats. *Neurobiol Learn Mem*. 2007;87:218-24.

- [73] Gustafson DR, Melchior L, Eriksson E, Sundh V, Blennow K, Skoog I. The ACE Insertion Deletion polymorphism relates to dementia by metabolic phenotype, APOEepsilon4, and age of dementia onset. *Neurobiol Aging*. 2008;31:910-6.
- [74] Kehoe PG, Wilcock GK. Is inhibition of the renin-angiotensin system a new treatment option for Alzheimer's disease? *Lancet Neurol*. 2007;6:373-8.
- [75] de la Monte SM, Wands JR. Molecular indices of oxidative stress and mitochondrial dysfunction occur early and often progress with severity of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2006;9:167-81.
- [76] Akiyama H, Barger S, Barnum S, Bradt B, Bauer J, Cole GM, et al. Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2000;21:383-421.
- [77] Giunta B, Fernandez F, Nikolic WV, Obregon D, Rrapo E, Town T, et al. Inflammaging as a prodrome to Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation*. 2008;5:51.
- [78] Nunomura A, Perry G, Aliev G, Hirai K, Takeda A, Balraj EK, et al. Oxidative damage is the earliest event in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2001;60:759-67.
- [79] Federico A, Cardaioli E, Da Pozzo P, Formichi P, Gallus GN, Radi E. Mitochondria, oxidative stress and neurodegeneration. *J Neurol Sci*. 2012;322:254-62.
- [80] Das UN. Is angiotensin-II an endogenous pro-inflammatory molecule? *Med Sci Monit*. 2005;11:RA155-62.
- [81] Hojna S, Kunes J, Zicha J. Alterations of NO synthase isoforms in brain and kidney of rats with genetic and salt hypertension. *Physiol Res*. 2010;59:997-1009.
- [82] Yamada K, Komori Y, Tanaka T, Senzaki K, Nikai T, Sugihara H, et al. Brain dysfunction associated with an induction of nitric oxide synthase following an intracerebral injection of lipopolysaccharide in rats. *Neuroscience*. 1999;88:281-94.
- [83] Yang RF, Yin JX, Li YL, Zimmerman MC, Schultz HD. Angiotensin-(1-7) increases neuronal potassium current via a nitric oxide-dependent mechanism. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2010;300:C58-64.
- [84] AbdAlla S, Langer A, Fu X, Quitterer U. ACE inhibition with captopril retards the development of signs of neurodegeneration in an animal model of Alzheimer's disease. *Int J Mol Sci*. 2013;14:16917-42.
- [85] El Sayed NS, Kassem LA, Heikal OA. Promising therapy for Alzheimer's disease targeting angiotensin converting enzyme and the cyclooxygenase-2 isoform. *Drug Discov Ther*. 2009;3:307-15.

- [86] Guevara-Lora I. Kinin-mediated inflammation in neurodegenerative disorders. *Neurochem Int.* 2012;61:72-8.
- [87] Stozicka Z, Zilka N, Novak M. Risk and protective factors for sporadic Alzheimer's disease. *Acta Virol.* 2007;51:205-22.
- [88] Salkovic-Petrisic M, Knezovic A, Hoyer S, Riederer P. What have we learned from the streptozotocin-induced animal model of sporadic Alzheimer's disease, about the therapeutic strategies in Alzheimer's research. *J Neural Transm.* 2013;120:233-52.
- [89] Kehoe PG, Miners S, Love S. Angiotensins in Alzheimer's disease - friend or foe? *Trends Neurosci.* 2009;32:619-28.
- [90] Salkovic-Petrisic M, Osmanovic-Barilar J, Bruckner MK, Hoyer S, Arendt T, Riederer P. Cerebral amyloid angiopathy in streptozotocin rat model of sporadic Alzheimer's disease: a long-term follow up study. *J Neural Transm.* 2011;118:765-72.
- [91] Lee DC, Rizer J, Selenica ML, Reid P, Kraft C, Johnson A, et al. LPS- induced inflammation exacerbates phospho-tau pathology in rTg4510 mice. *J Neuroinflammation.* 2010;7:56.
- [92] Griffin WS, Stanley LC, Ling C, White L, MacLeod V, Perrot LJ, et al. Brain interleukin 1 and S-100 immunoreactivity are elevated in Down syndrome and Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86:7611-5.
- [93] Blasko I, Schmitt TL, Steiner E, Trieb K, Grubeck-Loebenstien B. Tumor necrosis factor alpha augments amyloid beta protein (25-35) induced apoptosis in human cells. *Neurosci Lett.* 1997;238:17-20.
- [94] Tweedie D, Ferguson RA, Fishman K, Frankola KA, Van Praag H, Holloway HW, et al. Tumor necrosis factor-alpha synthesis inhibitor 3,6'-dithiothalidomide attenuates markers of inflammation, Alzheimer pathology and behavioral deficits in animal models of neuroinflammation and Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation.* 2012;9:106.
- [95] Kehoe PG. Angiotensins and Alzheimer's disease: a bench to bedside overview. *Alzheimers Res Ther.* 2009;1:3.
- [96] Wenk GL, Willard LB. The neural mechanisms underlying cholinergic cell death within the basal forebrain. *Int J Dev Neurosci.* 1998;16:729-35.
- [97] Easton A, Douchamps V, Eacott M, Lever C. A specific role for septohippocampal acetylcholine in memory? *Neuropsychologia.* 2012;50:3156-68.

- [98] Li E, Kim DH, Cai M, Lee S, Kim Y, Lim E, et al. Hippocampus-dependent spatial learning and memory are impaired in growth hormone-deficient spontaneous dwarf rats. *Endocr J*. 2011;58:257-67.
- [99] Skoog I. Hypertension and cognition. *Int Psychogeriatr*. 2003;15 Suppl 1:139-46.
- [100] Kitamura Y, Takata K, Taniguchi T. [Stress proteins and regulation of microglial amyloid-beta phagocytosis]. *Nihon Yakurigaku Zasshi*. 2004;124:407-13.
- [101] Faraci FM. Oxidative stress: the curse that underlies cerebral vascular dysfunction? *Stroke*. 2005;36:186-8.
- [102] Chrissobolis S, Faraci FM. The role of oxidative stress and NADPH oxidase in cerebrovascular disease. *Trends Mol Med*. 2008;14:495-502.
- [103] Faraci FM, Didion SP. Vascular protection: superoxide dismutase isoforms in the vessel wall. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24:1367-73.
- [104] Austin BP, Nair VA, Meier TB, Xu G, Rowley HA, Carlsson CM, et al. Effects of hypoperfusion in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2011;26 Suppl 3:123-33.
- [105] Iadecola C. Neurovascular regulation in the normal brain and in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci*. 2004;5:347-60.
- [106] Salkovic-Petrisic M, Hoyer S. Central insulin resistance as a trigger for sporadic Alzheimer-like pathology: an experimental approach. *J Neural Transm Suppl*. 2007:217-33.
- [107] Lannert H, Hoyer S. Intracerebroventricular administration of streptozotocin causes long-term diminutions in learning and memory abilities and in cerebral energy metabolism in adult rats. *Behav Neurosci*. 1998;112:1199-208.
- [108] Salkovic-Petrisic M, Osmanovic J, Grunblatt E, Riederer P, Hoyer S. Modeling sporadic Alzheimer's disease: the insulin resistant brain state generates multiple long-term morphobiological abnormalities including hyperphosphorylated tau protein and amyloid-beta. *J Alzheimers Dis*. 2009;18:729-50.
- [109] Pathan AR, Viswanad B, Sonkusare SK, Ramarao P. Chronic administration of pioglitazone attenuates intracerebroventricular streptozotocin induced-memory impairment in rats. *Life Sci*. 2006;79:2209-16.
- [110] Plaschke K, Hoyer S. Action of the diabetogenic drug streptozotocin on glycolytic and glycogenolytic metabolism in adult rat brain cortex and hippocampus. *Int J Dev Neurosci*. 1993;11:477-83.

- [111] Nitsch R, Hoyer S. Local action of the diabetogenic drug, streptozotocin, on glucose and energy metabolism in rat brain cortex. *Neurosci Lett.* 1991;128:199-202.
- [112] Hellweg R, Nitsch R, Hock C, Jaksch M, Hoyer S. Nerve growth factor and choline acetyltransferase activity levels in the rat brain following experimental impairment of cerebral glucose and energy metabolism. *J Neurosci Res.* 1992;31:479-86.
- [113] Ishrat T, Khan MB, Hoda MN, Yousuf S, Ahmad M, Ansari MA, et al. Coenzyme Q10 modulates cognitive impairment against intracerebroventricular injection of streptozotocin in rats. *Behav Brain Res.* 2006;171:9-16.
- [114] Sharma M, Gupta YK. Intracerebroventricular injection of streptozotocin in rats produces both oxidative stress in the brain and cognitive impairment. *Life Sci.* 2001;68:1021-9.
- [115] Prickaerts J, Fahrig T, Blokland A. Cognitive performance and biochemical markers in septum, hippocampus and striatum of rats after an i.c.v. injection of streptozotocin: a correlation analysis. *Behav Brain Res.* 1999;102:73-88.
- [116] Shoham S, Bejar C, Kovalev E, Weinstock M. Intracerebroventricular injection of streptozotocin causes neurotoxicity to myelin that contributes to spatial memory deficits in rats. *Exp Neurol.* 2003;184:1043-52.
- [117] Blokland A, Bothmer J, Honig W, Jolles J. Behavioural and biochemical effects of acute central metabolic inhibition: effects of acetyl-L-carnitine. *Eur J Pharmacol.* 1993;235:275-81.
- [118] Shoham S, Bejar C, Kovalev E, Schorer-Apelbaum D, Weinstock M. Ladostigil prevents gliosis, oxidative-nitrative stress and memory deficits induced by intracerebroventricular injection of streptozotocin in rats. *Neuropharmacology.* 2007;52:836-43.
- [119] Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates.* 4th ed. San Diego: Academic Press; 1998.
- [120] Baiardi G, Ruiz AM, Beling A, Borgonovo J, Martinez G, Landa AI, et al. Glutamatergic ionotropic blockade within accumbens disrupts working memory and might alter the endocytic machinery in rat accumbens and prefrontal cortex. *J Neural Transm.* 2007;114:1519-28.
- [121] Braszko JJ, Wincewicz D, Jakubow P. Candesartan prevents impairment of recall caused by repeated stress in rats. *Psychopharmacology (Berl).* 2013;225:421-8.

- [122] Giannoni P, Gaven F, de Bundel D, Baranger K, Marchetti-Gauthier E, Roman FS, et al. Early administration of RS 67333, a specific 5-HT₄ receptor agonist, prevents amyloidogenesis and behavioral deficits in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease. *Front Aging Neurosci.* 2014;5:96.
- [123] Vorhees CV, Williams MT. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nat Protoc.* 2006;1:848-58.
- [124] Li Y, Powers C, Jiang N, Chopp M. Intact, injured, necrotic and apoptotic cells after focal cerebral ischemia in the rat. *J Neurol Sci.* 1998;156:119-32.
- [125] Paz MC, Marchese NA, Cancela LM, Bregonzio C. Angiotensin II AT₁ receptors are involved in neuronal activation induced by amphetamine in a two-injection protocol. *Biomed Res Int.* 2013;2013:534817.
- [126] Yamakawa H, Jezova M, Ando H, Saavedra JM. 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;23:371-80.
- [127] Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* 1979;95:351-8.
- [128] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-54.
- [129] Recknagel RO, Glende EA, Jr. Spectrophotometric detection of lipid conjugated dienes. *Methods Enzymol.* 1984;105:331-7.
- [130] Nirogi R, Kandikere V, Mudigonda K, Bhyrapuneni G, Muddana N, Saralaya 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;178:116-9.
- [131] Terry AV, Jr. *Spatial Navigation (Water Maze) Tasks.* 2009.
- [132] De-Paula VJ, Radanovic M, Diniz BS, Forlenza OV. Alzheimer's disease. *Subcell Biochem.* 2012;65:329-52.
- [133] Ashford JW, Schmitt FA. Modeling the time-course of Alzheimer dementia. *Curr Psychiatry Rep.* 2001;3:20-8.
- [134] Budson AE, Price BH. Memory dysfunction. *N Engl J Med.* 2005;352:692-9.

- [135] Oades RD, Isaacson RL. The development of food search behavior by rats: the effects of hippocampal damage and haloperidol. *Behav Biol.* 1978;24:327-37.
- [136] Oades RD. Impairments of search behaviour in rats after haloperidol treatment, hippocampal or neocortical damage suggest a mesocorticolimbic role in cognition. *Biol Psychol.* 1981;12:77-85.
- [137] Oades RD. Dopaminergic agonistic and antagonistic drugs in the ventral tegmentum of rats inhibit and facilitate changes of food-search behaviour. *Neurosci Lett.* 1981;27:75-80.
- [138] Oades RD. Search strategies on a hole-board are impaired in rats with ventral tegmental damage: animal model for tests of thought disorder. *Biol Psychiatry.* 1982;17:243-58.
- [139] van der Staay FJ, Krechting B, Blokland A, Raaijmakers W. The cone field: a spatial discrimination task for the automatic and simultaneous assessment of working and reference memory in rats. *J Neurosci Methods.* 1990;31:13-22.
- [140] van der Staay FJ. Spatial working memory and reference memory of Brown Norway and WAG rats in a holeboard discrimination task. *Neurobiol Learn Mem.* 1999;71:113-25.
- [141] Kliethermes CL, Crabbe JC. Pharmacological and genetic influences on hole-board behaviors in mice. *Pharmacol Biochem Behav.* 2006;85:57-65.
- [142] File SE, Wardill AG. Validity of head-dipping as a measure of exploration in a modified hole-board. *Psychopharmacologia.* 1975;44:53-9.
- [143] Ljungberg T, Ungerstedt U. Automatic registration of behaviour related to dopamine and noradrenaline transmission. *Eur J Pharmacol.* 1976;36:181-8.
- [144] Ennaceur A, Delacour J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behav Brain Res.* 1988;31:47-59.
- [145] Dere E, Huston JP, De Souza Silva MA. The pharmacology, neuroanatomy and neurogenetics of one-trial object recognition in rodents. *Neurosci Biobehav Rev.* 2007;31:673-704.
- [146] Antunes M, Biala G. The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. *Cogn Process.* 2012;13:93-110.
- [147] Ennaceur A. One-trial object recognition in rats and mice: methodological and theoretical issues. *Behav Brain Res.* 2010;215:244-54.

- [148] Lazaroni TL, Raslan AC, Fontes WR, de Oliveira ML, Bader M, Alenina N, et al. Angiotensin-(1-7)/Mas axis integrity is required for the expression of object recognition memory. *Neurobiol Learn Mem.* 2011;97:113-23.
- [149] Rossato JI, Zinn CG, Furini C, Bevilaqua LR, Medina JH, Cammarota M, et al. A link between the hippocampal and the striatal memory systems of the brain. *An Acad Bras Cienc.* 2006;78:515-23.
- [150] Izquierdo I, Medina JH. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiol Learn Mem.* 1997;68:285-316.
- [151] Marvar PJ, Goodman J, Fuchs S, Choi DC, Banerjee S, Ressler KJ. Angiotensin type 1 receptor inhibition enhances the extinction of fear memory. *Biol Psychiatry.* 2013;75:864-72.
- [152] Marinzalda Mde L, Perez PA, Gargiulo PA, Casarsa BS, Bregonzio C, Baiardi G. Fear-potentiated behaviour is modulated by central amygdala angiotensin II AT1 receptors stimulation. *Biomed Res Int.* 2014;2014:183248.
- [153] Jovanovic T, Ressler KJ. How the neurocircuitry and genetics of fear inhibition may inform our understanding of PTSD. *Am J Psychiatry.* 2010;167:648-62.
- [154] Rai S, Kamat PK, Nath C, Shukla R. Glial activation and post-synaptic neurotoxicity: the key events in Streptozotocin (ICV) induced memory impairment in rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 2013;117:104-17.
- [155] Raghavendra V, Chopra K, Kulkarni SK. Involvement of cholinergic system in losartan-induced facilitation of spatial and short-term working memory. *Neuropeptides.* 1998;32:417-21.
- [156] Passos-Silva DG, Verano-Braga T, Santos RA. Angiotensin-(1-7): beyond the cardio-renal actions. *Clin Sci (Lond).* 2013;124:443-56.
- [157] Ardaillou R, Chansel D. Synthesis and effects of active fragments of angiotensin II. *Kidney Int.* 1997;52:1458-68.
- [158] Wayner MJ, Armstrong DL, Phelix CF, Wright JW, Harding JW. Angiotensin IV enhances LTP in rat dentate gyrus in vivo. *Peptides.* 2001;22:1403-14.
- [159] Saxena G, Bharti S, Kamat PK, Sharma S, Nath C. Melatonin alleviates memory deficits and neuronal degeneration induced by intracerebroventricular administration of streptozotocin in rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 2010;94:397-403.

- [160] Feldman LA, Shapiro ML, Nalbantoglu J. A novel, rapidly acquired and persistent spatial memory task that induces immediate early gene expression. *Behav Brain Funct.* 2010;6:35.
- [161] Tischmeyer W, Grimm R. Activation of immediate early genes and memory formation. *Cell Mol Life Sci.* 1999;55:564-74.
- [162] Taupin P. The hippocampus - neurotransmission and plasticity in the nervous system. New York: Nova Science Publishers, Inc.; 2007.
- [163] Packard MG, Knowlton BJ. Learning and memory functions of the Basal Ganglia. *Annu Rev Neurosci.* 2002;25:563-93.
- [164] Jee YS, Ko IG, Sung YH, Lee JW, Kim YS, Kim SE, et al. Effects of treadmill exercise on memory and c-Fos expression in the hippocampus of the rats with intracerebroventricular injection of streptozotocin. *Neurosci Lett.* 2008;443:188-92.
- [165] Fleischmann A, Hvalby O, Jensen V, Strekalova T, Zacher C, Layer LE, et al. Impaired long-term memory and NR2A-type NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in mice lacking c-Fos in the CNS. *J Neurosci.* 2003;23:9116-22.
- [166] Saavedra JM. Brain and pituitary angiotensin. *Endocr Rev.* 1992;13:329-80.
- [167] Wright JW, Harding JW. Brain angiotensin receptor subtypes in the control of physiological and behavioral responses. *Neurosci Biobehav Rev.* 1994;18:21-53.
- [168] Biessels GJ, van der Heide LP, Kamal A, Bleys RL, Gispen WH. Ageing and diabetes: implications for brain function. *Eur J Pharmacol.* 2002;441:1-14.
- [169] Byrne E. Does mitochondrial respiratory chain dysfunction have a role in common neurodegenerative disorders? *J Clin Neurosci.* 2002;9:497-501.
- [170] Agrawal R, Tyagi E, Shukla R, Nath C. Insulin receptor signaling in rat hippocampus: a study in STZ (ICV) induced memory deficit model. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2011;21:261-73.
- [171] Agrawal R, Tyagi E, Shukla R, Nath C. A study of brain insulin receptors, AChE activity and oxidative stress in rat model of ICV STZ induced dementia. *Neuropharmacology.* 2009;56:779-87.
- [172] Amadio M, Scapagnini G, Laforenza U, Intrieri M, Romeo L, Govoni S, et al. Post-transcriptional regulation of HSP70 expression following oxidative stress in SH-SY5Y cells: the potential involvement of the RNA-binding protein HuR. *Curr Pharm Des.* 2008;14:2651-8.

- [173] Zhou J, Pavel J, Macova M, Yu ZX, Imboden H, Ge L, et al. AT1 receptor blockade regulates the local angiotensin II system in cerebral microvessels from spontaneously hypertensive rats. *Stroke*. 2006;37:1271-6.
- [174] Sanchez-Lemus E, Murakami Y, Larrayoz-Roldan IM, Moughamian AJ, Pavel J, Nishioku T, et al. Angiotensin II AT1 receptor blockade decreases lipopolysaccharide-induced inflammation in the rat adrenal gland. *Endocrinology*. 2008;149:5177-88.
- [175] Benicky J, Sanchez-Lemus E, Honda M, Pang T, Orecna M, Wang J, et al. Angiotensin II AT1 receptor blockade ameliorates brain inflammation. *Neuropsychopharmacology*. 2011;36:857-70.
- [176] Steele ML, Robinson SR. Reactive astrocytes give neurons less support: implications for Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2012;33:423 e1-13.
- [177] Wenk GL, McGann K, Hauss-Wegrzyniak B, Rosi S. The toxicity of tumor necrosis factor-alpha upon cholinergic neurons within the nucleus basalis and the role of norepinephrine in the regulation of inflammation: implications for Alzheimer's disease. *Neuroscience*. 2003;121:719-29.
- [178] Calixto JB, Medeiros R, Fernandes ES, Ferreira J, Cabrini DA, Campos MM. Kinin B1 receptors: key G-protein-coupled receptors and their role in inflammatory and painful processes. *Br J Pharmacol*. 2004;143:803-18.
- [179] Tandon VR, Mahajan A, Khajuria V, Gillani ZH. Angioedema due to fixed dose combination of telmisartan plus ramipril. *J Pharmacol Pharmacother*. 2014;5:214-6.
- [180] Rodriguez PL, Jiang S, Fu Y, Avraham S, Avraham HK. The proinflammatory peptide substance P promotes blood-brain barrier breaching by breast cancer cells through changes in microvascular endothelial cell tight junctions. *Int J Cancer*. 2014;134:1034-44.
- [181] Mark KS, Miller DW. Increased permeability of primary cultured brain microvessel endothelial cell monolayers following TNF-alpha exposure. *Life Sci*. 1999;64:1941-53.
- [182] Saxby BK, Harrington F, Wesnes KA, McKeith IG, Ford GA. Candesartan and cognitive decline in older patients with hypertension: a substudy of the SCOPE trial. *Neurology*. 2008;70:1858-66.
- [183] Trenkwalder P. The Study on COgnition and Prognosis in the Elderly (SCOPE)--recent analyses. *J Hypertens Suppl*. 2006;24:S107-14.
- [184] Tsukuda K, Mogi M, Iwanami J, Min LJ, Sakata A, Jing F, et al. Cognitive deficit in amyloid-beta-injected mice was improved by pretreatment with a low dose of telmisartan

partly because of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activation. *Hypertension*. 2009;54:782-7.

[185] Lee S, Tong M, Hang S, Deochand C, de la Monte S. CSF and Brain Indices of Insulin Resistance, Oxidative Stress and Neuro-Inflammation in Early versus Late Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis Parkinsonism*. 2013;3:128.

[186] Fuller S, Steele M, Munch G. Activated astroglia during chronic inflammation in Alzheimer's disease--do they neglect their neurosupportive roles? *Mutat Res*. 2010;690:40-9.

[187] Akama KT, Albanese C, Pestell RG, Van Eldik LJ. Amyloid beta-peptide stimulates nitric oxide production in astrocytes through an NFkappaB-dependent mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:5795-800.

[188] Wallace MN, Geddes JG, Farquhar DA, Masson MR. Nitric oxide synthase in reactive astrocytes adjacent to beta-amyloid plaques. *Exp Neurol*. 1997;144:266-72.

[189] Lee SC, Dickson DW, Liu W, Brosnan CF. Induction of nitric oxide synthase activity in human astrocytes by interleukin-1 beta and interferon-gamma. *J Neuroimmunol*. 1993;46:19-24.

[190] Chao CC, Hu S, Sheng WS, Tsang M, Peterson PK. Tumor necrosis factor-alpha mediates the release of bioactive transforming growth factor-beta in murine microglial cell cultures. *Clin Immunol Immunopathol*. 1995;77:358-65.

[191] Braszko JJ, Karwowska-Polecka W, Halicka D, Gard PR. Captopril and enalapril improve cognition and depressed mood in hypertensive patients. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*. 2003;14:323-43.

[192] Li NC, Lee A, Whitmer RA, Kivipelto M, Lawler E, Kazis LE, et al. Use of angiotensin receptor blockers and risk of dementia in a predominantly male population: prospective cohort analysis. *BMJ*. 2008;340:b5465.