



Universidad  
Nacional  
de Córdoba



FCQ  
Facultad de  
Ciencias Químicas



Universidad  
Nacional  
de Córdoba

I F E C

# PARTICIPACIÓN DEL SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA CEREBRAL EN RESPUESTAS NEUROADAPTATIVAS Y VASCULARES INDUCIDAS POR ANFETAMINA

*TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS QUIMICAS*

*Natalia Andrea Marchese*

*Bióloga*

*Directora: Dra. Claudia Bregonzio*

*Universidad Nacional de Córdoba*

*Facultad de Ciencias Químicas- Departamento de Farmacología*

*Instituto de Farmacología Experimental de Córdoba (IFEC-CONICET)*

*Córdoba, Argentina*

*2017*

## **Directora de Tesis**

Dra. Claudia Bregonzio

## **Miembros de la comisión de tesis**

Dra. Mariela F. Pérez

Dra. Ana María Masini-Repiso

Dr. Daniel H. Mascó

## **Evaluadora externa**

Dra. Flavia E. Saravia

El presente trabajo de tesis se realizó en el Instituto de Farmacología Experimental de Córdoba (IFEC-CONICET), Departamento de Farmacología Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, de acuerdo a la reglamentación vigente de esta Facultad para optar por el grado de Doctora en Ciencias Químicas.

Durante la realización, la autora contó con una beca de posgrado otorgada por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), entre el 2012-2017, y realizó tareas docentes en las asignaturas Farmacología General, Farmacología I y Farmacología II, como Profesor Asistente (DS) del Departamento de Farmacología hasta la fecha.

Para la ejecución de este trabajo de tesis se contó con subsidios otorgados por la Secretaría de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional de Córdoba (SECyT) y por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

## Agradecimientos

“*Creo que algunos seres humanos tienen virtudes farmacológicas*”

M. Page (2015)

A Claudia, después de tantos años de trabajo juntas... Gracias... por guiar esta etapa de mi formación académica con tanta dedicación y cariño, por confiar en mi desempeño y por el respeto que siempre mostraste hacia mis ideas e inquietudes. Gracias por el equilibrio entre dirección y libertad que mostraste con mi trabajo.

A los miembros de la comisión de tesis Dra. Pérez, Dra. Masini-Repiso y Dr. Mascó por su excelente disposición y el tiempo dedicado al seguimiento de este trabajo, por sus aportes y las discusiones que se suscitaron a lo largo de las reuniones. A la Dra. Pérez por involucrarse en mi formación de posgrado con tanto ánimo, buena energía y excelentes aportes.

A la Dra. Saravia por aceptar la evaluación de este trabajo.

Al Departamento de Farmacología por brindarme un lugar para la realización de mi tesis doctoral, y a los investigadores del instituto: Victor, Miri, Techí, Irene, Gabriel, Gastón, Susan, (tía) Fla, Negra, Clau H., Liliana y Crhistian por el cálido trato que siempre me brindaron.

A la familia científica inicial: Coti y Brenda. Gracias Coti por tus enseñanzas de laboratorio y tu cariño de hermana mayor en mis comienzos en el departamento. A la hermana del medio Emilce, por las largas horas que colaboraste con este trabajo de tesis y por la amistad que me has brindado todo este tiempo, tu alegría es contagiosa y siempre despierta una sonrisa. A los más peques (pero no tanto), Vicky, Ia y Martín, por alegrar el trabajo en la mesada y compartir horas de hipoxia entre mate y criollos discutiendo resultados, este trabajo de tesis no sería igual sin sus valiosos aportes. Gracias por haberme enseñado tanto en este camino.

A los amigos que encontré en el departamento a fuerza de mate y largas tardes en el laboratorio, amigos que de distintas maneras siempre están presente, sobre todos si hay brasas, carnes y postres de por medio: Noe, Pato, Lau DG, Mirtis, maricecilia, Fabri y Pablo. Y a los que conocí después, pero con los que encontré las mismas mañas: maraquena, Romi, Andre, Leo (y algunos más que ya mencioné). “*La yerba mate hace hermanas a las gentes que no se conocen*”.

A todos mis compañeros del departamento de farmacología con los que he compartido buenos momentos en estos años: Eve, Silvi B, Betha, Marce, Mariana, Coti G, Paulis A., Lucecita, Andre G., Guada, Dai, Ceci G. A las *locas lindas* de fármaco por tantas risas y alegrías: Colorada, Mari, Iva, Lau G, Mara, Vane y Ale.

A Este y Lore por su invaluable ayuda en *las pistas*, gracias por acceder siempre a armar cualquier *kiosquito* de turno conmigo y ayudarme entre mi *despiole*, mi ansiedad y mis errores. A los técnicos del bioterio Yani, Nico y Javi que con su trabajo tanto han contribuido a esta tesis. A Silvi *secre* por rescatarme siempre del papelerío!

Al laboratorio de la Dra. Vivas por el trabajo compartido y por ayudarme siempre con una sonrisa; particularmente a Flor D, una compañera, amiga y colega, con la que tuve el gusto de trabajar y con quien, siempre, compartir un rato es sinónimo de alegría.

A mi familia. A mis padres, que me respaldan en todas mis decisiones y me dan todo en la vida. A mis hermanos que siempre están presentes para la hermana menor. A mis sobrinos, por traer a mi vida la inocencia y la alegría del juego.

A José, por la sonrisa que todos los días sacas en mí. Por ser mi compañero y sostener este puente conmigo, *“que un puente no se sostiene de un sólo lado”*. Te amo pelado.

A CONICET por brindarme el apoyo económico para la realización de este trabajo de tesis y a la educación pública, responsable de mi formación académica desde el jardín de infantes hasta la obtención del título de posgrado.

*“Una hipótesis científica representa una dirección nueva, un camino que se traza a la observación y a la experimentación, el cual, si no conduce inmediatamente a la verdad, suscita siempre investigaciones y críticas que nos aproximan a ella”.*

**Santiago Ramón y Cajal (1895)**

*A mi familia  
que iniciaron mis padres,  
que crece con mis hermanos  
y que construyo día a día con José*

## **Índice**

<b>Abreviaturas</b>	.....	2
<b>Resumen</b>	.....	4
<b>Introducción</b>		
<i>La unidad neurovascular</i>	.....	8
<i>El sistema renina-angiotensina cerebral</i>	.....	14
<i>Anfetamina</i>	.....	23
<b>Hipótesis y objetivos</b>		
<i>Hipótesis</i>	.....	33
<i>Objetivo general</i>	.....	34
<i>Objetivos específicos</i>	.....	34
<b>Materiales y Métodos</b>	.....	36
<b>Resultados</b>		
<i>Objetivo 1- Secuelas inflamatorias en el sistema vascular</i>		
Alteraciones estructurales en carótida	.....	50
Marcadores inflamatorios en microvasos cerebrales	.....	52
<i>Objetivo 2- Alteraciones en corteza prefrontal</i>		
Estructura de la red vascular	.....	56
Reactividad astrocitaria	.....	59
Memoria de trabajo	.....	62
<i>Objetivo 3- Alteraciones en amígdala basolateral e hipocampo</i>		
Estructura de la red vascular	.....	67
Reactividad astrocitaria	.....	69
Plasticidad hipocampal	.....	71
Memoria a largo plazo- Efecto de desafíos	.....	72
Memoria a largo plazo- Neuroadaptaciones	.....	86
<b>Discusión</b>		
<i>Secuelas en vasculatura periférico/central</i>	.....	83
<i>Alteraciones en corteza prefrontal</i>	.....	91
<i>Alteraciones en amígdala basolateral e hipocampo</i>	.....	101
<b>Conclusión</b>	.....	109
<b>Producción científica</b>	.....	112
<b>Bibliografía</b>	.....	115

## **Abreviaturas**

**ABL:** Amígdala Baso-Lateral

**ADHD:** trastorno de déficit de atención con hiperactividad (del inglés Attention Deficit Hyperactivity Disorder)

**AMPA:** ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico (del inglés  $\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-Methyl-4-isoxazole Propionic Acid)

**AngI:** angiotensina I

**AngII:** angiotensina II

**ARBs:** bloqueantes de receptores de angiotensina II (del inglés Angiotensin Receptor Blockers)

**ATV:** Área Tegmental Ventral

**BHE:** Barrera Hemato-Encefálica

**CaMKII:** proteína quinasa II dependiente de  $Ca^{2+}$ /calmodulina (del inglés  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent protein Kinase II)

**COX:** Ciclo-Oxigenasa

**CPF:** Corteza Pre-Frontal

**CPu:** caudado putamen

**CV:** candesartán

**DAG:** Di-Acil-Glicerol

**ECA:** Enzima Convertidora de Angiotensina I

**EGFR:** receptor del factor de crecimiento epidérmico (del inglés Epidermal Growth Factor Receptor)

**eNOS:** óxido nítrico sintasa endotelial (del inglés endothelial Nitric Oxide Synthase)

**ERK:** proteína quinasa regulada por señal extracelular (del inglés Extracellular signal-Regulated Kinase)

**GD:** Girus Dentado de hipocampo

**GFAP:** proteína fibrilar acídica de la glía (del inglés Glial Fibrillary Acidic Protein)

**HPC:** hipocampo

**HSF-1:** factor de transcripción de golpe de calor (del inglés Heat Shock Factor-1)

**HSP:** proteína de golpe de calor (del inglés Heat Shock Protein)

**ICAM-1:** molécula de adhesión intercelular 1 (del inglés Inter-Cellular Adhesion Molecule 1)

**IFN $\gamma$ :** interferón gamma

**IL:** interleucina

**iNOS:** óxido nítrico sintasa inducible (del inglés inducible Nitric Oxide Synthase)

**IP3:** inositol 3-fosfato (del inglés Inositol trisPhosphate)

**JNK:** quinasas c-Jun N-terminal (del inglés c-Jun N-terminal Kinases)

**LC:** Locus Coeruleus

**LTP:** potenciación a largo plazo (del inglés Long Term Potentiation)

**MAO:** Mono-Amino Oxidasa

**MAPK:** proteína quinasa activada por mitógenos (del inglés Mitogen-Activated Protein Kinase)

**MCPI:** proteína quimiotáctica de monocitos 1 (del inglés Monocyte Chemoattractant Protein-1)

**M-CSF:** factor estimulante de colonia de macrófagos (Macrophage Colony-Stimulating Factor)

**NAcc:** Núcleo Accumbens

**NADPH:** nicotinamida adenina di-nucleótido fosfato (del inglés Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate)

**NF- $\kappa$ B:** factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (del inglés Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)

**NMDA:** N-metil-D-aspartato

**NO:** óxido nítrico (del inglés Nitric Oxide)

**PKC:** proteína quinasa C (del inglés Protein Kinase C)

**R-AT<sub>1</sub>:** receptores AT<sub>1</sub>

**R-AT<sub>2</sub>:** receptores AT<sub>2</sub>

**ROS:** especies reactivas del oxígeno (del inglés Reactive Oxygen Species)

**SHR:** ratas espontáneamente hipertensas (del inglés Spontaneously Hypertensive Rats)

**SN:** Sustancia Nigra

**SNC:** Sistema Nervioso Central

**SRA:** Sistema Renina-Angiotensina

**TH:** Tirosina Hidroxilasa

**TNF $\alpha$ :** factor de necrosis tumoral alfa (del inglés Tumoral Necrosis Factor alpha)

**US-FDA:** administración de alimentos y drogas de los Estados Unidos (del inglés United States Food and Drug Administration)

**VCAM-1:** molécula de adhesión vascular 1 (del inglés Vascular Cell Adhesion Molecule 1)

**VEGF-1:** Factor de crecimiento vascular 1 (del inglés Vascular Endothelial Growth Factor 1)



*Resumen*

La unidad neurovascular es responsable de la actividad coordinada de neuronas, astrocitos y células endoteliales, manteniendo el suministro de energía necesario para la correcta actividad neuronal y la homeostasis del microambiente cerebral. La alteración de los componentes de la unidad neurovascular se observa en condiciones patológicas de hipoxia, inflamación, remodelado estructural del tejido y estrés oxidativo, que involucran una respuesta inflamatoria. En este escenario, la disfunción endotelial de la vasculatura cerebral sería un desencadenante en la neuroinflamación presente en múltiples patologías.

El sistema renina-angiotensina cerebral es conocido por su rol modulador en múltiples funciones del sistema nervioso central que abarcan respuestas inflamatorias, control del flujo sanguíneo local y síntesis y liberación de catecolaminas. Todas estas funciones son mediadas por activación de receptores AT<sub>1</sub> de angiotensina II, los cuales están presentes en todos los tipos celulares que conforman la unidad neurovascular.

Los psicoestimulantes, como la anfetamina, aumentan la transmisión catecolaminérgica y promueven cambios plásticos sobre circuitos neuronales que pueden ser observados tiempo después, por exposición a un desafío (farmacológico o fisiológico). Estos cambios alostáticos explican la neuroadaptación que conlleva al desarrollo de sensibilización conductual. Al mismo tiempo, el consumo de sustancias tipo anfetamina estaría relacionado con procesos neuroinflamatorios y múltiples secuelas cognitivas deletéreas.

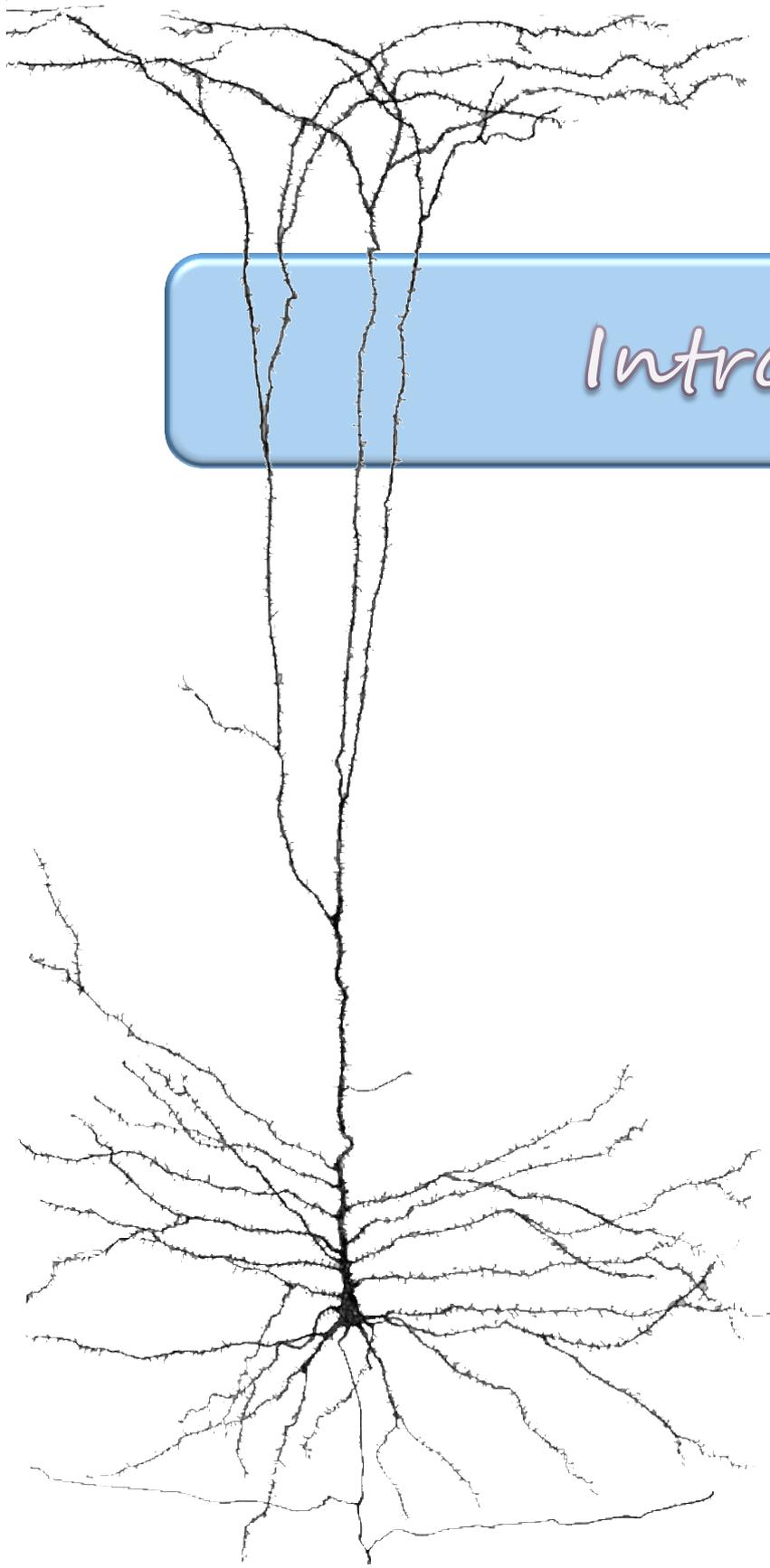
Los antecedentes previos a este trabajo de tesis mostraron que los cambios neuroadaptativos inducidos por anfetamina, involucran activación de receptores AT<sub>1</sub>, al mismo tiempo que altera el sistema angiotensinérgico. Considerando la actividad pro-inflamatoria de receptores AT<sub>1</sub> en múltiples tipos celulares, el presente trabajo tuvo como objetivo evaluar su participación en cambios vasculares y neuroadaptativos inducidos por anfetamina, en áreas relacionadas con procesos cognitivos.

Los resultados obtenidos indican que la exposición repetida a dosis intermedias de anfetamina estimula la expresión de receptores AT<sub>1</sub> en la microvasculatura cerebral, los cuales serían responsables de la susceptibilidad a estrés endotelial frente a un desafío farmacológico o fisiológico, dado que ambos eventos se previenen con el bloqueo de estos receptores.

En relación a las áreas involucradas en procesos cognitivos, se observó un patrón de alteración región-dependiente en los componentes de la unidad neurovascular, luego de la exposición al psicoestimulante. Los cambios observados a nivel de corteza prefrontal conciben con alteraciones estructurales, características de procesos inflamatorios, y se relacionan con el déficit atencional en condiciones basales. Mientras que en las áreas que participan en memoria a largo plazo se

evidenciaron cambios funcionales ante la exposición a un desafío, en ausencia de cambios estructurales. Todas las alteraciones estructurales y funcionales observadas regionalmente, inducidas por anfetamina, fueron prevenidas por el bloqueo de receptores AT<sub>1</sub>.

Los resultados evidencian la participación del sistema renina-angiotensina, vía activación de receptores AT<sub>1</sub>, en las alteraciones estructurales y funcionales inducidas por anfetamina sobre los componentes de la unidad neurovascular, en áreas relacionadas con procesos cognitivos.



*Introducción*

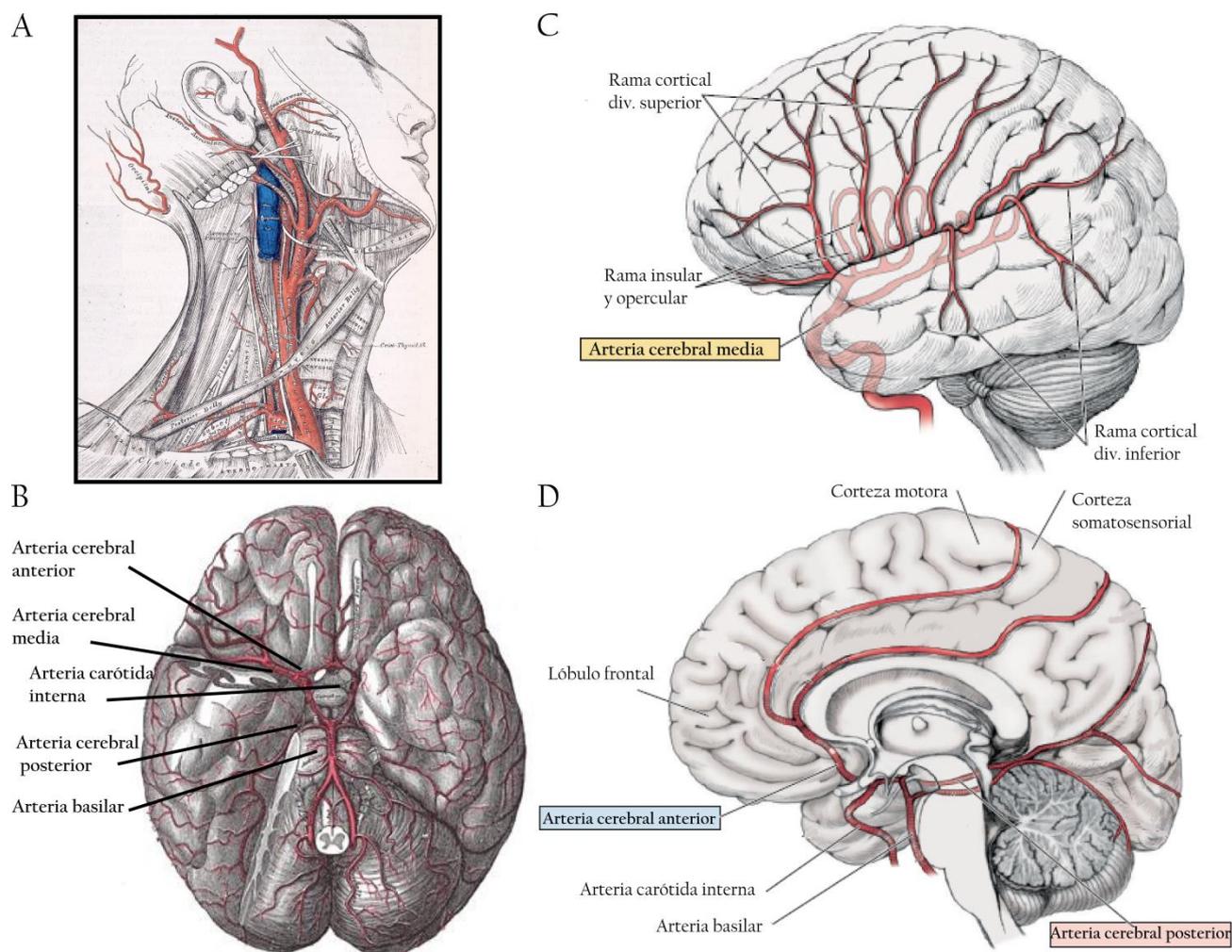
## La unidad neurovascular

### El Sistema Nervioso Central. Irrigación sanguínea

El sistema nervioso central (SNC) es altamente dinámico y presenta un complejo metabolismo energético, siendo el glucógeno el único reservorio de energía en caso de una elevada actividad neuronal y la vasculatura cerebral la responsable del suministro continuo de glucosa y oxígeno (Belanger y *col.*, 2011). El cerebro representa el 2% de la masa corporal, sin embargo, su actividad en condiciones de reposo demanda un 17% del flujo sanguíneo total y consume el 20% del oxígeno y el 25% de la glucosa disponibles (Barr, 1973; Faraci, 2011; Hill, 2006; Jaramillo-Magaña, 2013). Esta elevada tasa metabólica es utilizada para revertir los movimientos de iones, que subyacen a las corrientes post-sinápticas excitatorias y a los potenciales de acción evocados; por esta razón la correcta perfusión sanguínea no sólo es responsable de la viabilidad celular de neuronas y glía, sino también de su comunicación y funcionamiento (del Zoppo, 1997). A nivel cerebral, la reducción del flujo sanguíneo regional lleva a una disminución temporal de la actividad eléctrica de las membranas celulares, la viabilidad neuronal y la integridad del tejido (Iadecola, 2004).

La irrigación sanguínea del SNC se inicia a nivel de la arteria carótida interna y la arteria basilar. Éstas convergen en la base del encéfalo por anastomosis para dar origen al polígono de Willis; estructura que proporciona rutas alternativas cuando alguna de las arterias mayores sufre oclusión. Desde este polígono se originan las tres arterias cerebrales principales (**anterior, media y posterior**), las cuales dan lugar a vasos de menor calibre conocidos como **arterias piales (Figura 1)**. Estas arterias recorren la superficie cerebral por el espacio subaracnoideo hasta que penetran en el tejido cerebral como vasos más pequeños, acompañados por el espacio de *Virchow-Robin*. Finalmente las subsecuentes ramificaciones dan origen a los **vasos parenquimales**, que penetran en el tejido cerebral y mantienen un estrecho contacto con astrocitos (Barr, 1973; Cipolla, 2010). La regulación del flujo sanguíneo a nivel del SNC es compleja e implica la coordinación e integración de cambios regionales y en forma independiente de la circulación sistémica. Esta autorregulación involucra una segmentación vascular, donde la red de arterias piales es responsable de 2/3 de la resistencia vascular cerebral total, mientras que la proporción restante depende de los vasos parenquimales. Los cambios en arterias piales responden a las fluctuaciones de la presión arterial disminuyendo el impacto de alteraciones en la perfusión local. Es así que se observa vasoconstricción frente a un aumento de la presión arterial, y relajación frente a una disminución de la misma (Cipolla, 2010; Faraci, 2011; Faraci y *col.*, 1990). El lecho de vasos parenquimales conformado por arteriolas, capilares y vénulas, controla el flujo sanguíneo local, y su actividad está mediada por señales intrínsecas. Esta regulación recibe el nombre de hiperemia funcional y consiste en la coordinación del flujo sanguíneo con la actividad neuronal, asegurando un correcto

suministro de energía y remoción de productos metabólicos en el sitio activo (Cox y col., 1993; Erinjeri y col., 2002; Iadecola y col., 2007). La existencia de cambios coordinados entre el flujo cerebral y la actividad neuronal fue propuesta a fines del siglo pasado. En una primera instancia, se propuso que los cambios vasculares serían consecuencia de la demanda energética resultante de la activación previa del tejido. Sin embargo, el patrón temporal y la magnitud de los efectos observados en estos procesos, condujo hacia una nueva propuesta que identifica un control por retroalimentación pro-activa. En este caso, los cambios vasculares son simultáneos a la actividad neuronal, supliendo la demanda energética por venir (Attwell y col., 2010).



**Figura 1. Irrigación sanguínea del sistema nervioso central. A)** Arteria carótida interna y arterias vertebrales (lado derecho); **B)** Arterias que conforman el Polígono de Willis; **C)** Territorios de irrigación sanguínea cerebral de arteria cerebral media (panel superior), anterior y posterior (panel inferior). Modificado de Blumenfeld, H. (2010) y Cipolla, M.J. (2010). Esta distribución anatómica condice con la observada en roedores.

## La unidad neurovascular

La hiperemia funcional es crucial en el mantenimiento de la homeostasis del microambiente cerebral y resulta del acoplamiento neurovascular. Ésta es una actividad coordinada entre neuronas, astrocitos y vasculatura (células endoteliales), que está enmarcada en la relación cercana que existe entre estos tipos celulares, a nivel espacial y temporal. De este modo, estas células conforman una unidad anatómica y funcionalmente integrada denominada **unidad neurovascular (Figura 2)** (Girouard y col., 2006a; Haydon y col., 2006; Zacchigna y col., 2008).

### *Endotelio*

Las células endoteliales están presentes en todos los tipos de vasos sanguíneos y constituyen una de las estructuras de mayor superficie continua en el organismo. A nivel de vasos parenquimales, estas células son el principal tipo celular, rodeado únicamente por pies perivasculares de astrocitos y células contráctiles (pericitos) (**Figura 2**). Se estima, que la superficie total de capilares en el cerebro humano supera los 15km<sup>2</sup>, siendo el principal sitio de intercambio de oxígeno y nutrientes, y el centro de control del **tono vascular** y las **respuestas inflamatorias** (Cipolla, 2010; Faraci y col., 1998; Tesfamariam y col., 2007). Los capilares a nivel del SNC no están fenestrados, las células endoteliales están selladas por uniones estrechas y uniones adherentes, delimitando la barrera hemato-encefálica (BHE). Esta característica particular permite controlar el movimiento de iones, el transporte pasivo de nutrientes y metabolitos esenciales, impedir la acción cruzada de mediadores centrales y periféricos, y prevenir la entrada de sustancias tóxicas (Abbott y col., 2010).

La regulación del tono vascular está dada por la liberación controlada de múltiples mediadores, vasoconstrictores y vasodilatadores, derivados del endotelio. Entre los mediadores vasoconstrictores, podemos mencionar endotelina-1, prostanoides derivados de la ciclo-oxigenasa (COX), especies reactivas del oxígeno (ROS) y angiotensina II (AngII). Los mediadores vasodilatadores más estudiados son el óxido nítrico (NO), prostaciclina y factores hiperpolarizantes derivados del endotelio. El NO, producido por la acción catalítica de la enzima constitutiva óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) sobre l-arginina, difunde hacia la célula contráctil y promueve su relajación. Además, este mediador presenta función anti-agregante plaquetaria y antiinflamatoria. Sin embargo, el aumento de este mediador, por actividad de la isoenzima de expresión inducible iNOS, es clave en el desarrollo y progresión de desórdenes vasculares. En estas condiciones el NO reacciona con anión superóxido generando peroxinitrito, un potente factor oxidante que en exceso produce citotoxicidad. Al mismo tiempo los niveles de prostaciclina se alteran de manera más compleja produciendo efectos vasodilatadores o vasoconstrictores, por alteración en la expresión de COX-1/COX-2 (MacKenzie, 2011). Los mediadores de vasodilatación son reconocidos como indicadores de la funcionalidad endotelial ya

que son esenciales para el mantenimiento basal de la presión y el flujo sanguíneo (MacKenzie, 2011).

El endotelio participa en la respuesta inflamatoria promoviendo la síntesis de moléculas de adhesión de membrana y la liberación de citocinas; atrayendo y guiando a las células inflamatorias circulantes hacia el sitio de injuria. El aumento en la expresión de selectina-E y de las moléculas de adhesión intercelular-1 (ICAM-1) y vascular-1 (VCAM-1) es determinante para la interacción entre las células endoteliales y las células inflamatorias circulantes. Mientras que los mediadores químicos liberados, como interleucina-1 (IL-1), factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) e interferón  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ), participan en el reclutamiento de leucocitos, activación de neutrófilos y aumento de la permeabilidad vascular. Además, estos mediadores promueven la liberación de NO y sus radicales, así como la producción de ROS. En condiciones patológicas las células inflamatorias y endoteliales serían las principales fuentes de ROS (Teshfamariam y col., 2007). El aumento de estas especies reactivas es responsable del estrés oxidativo que conduce a la acumulación de proteínas dañadas o mal plegadas, aumento en la tasa de mutagénesis, exacerbación de la respuesta inflamatoria y daño endotelial (El Assar y col., 2013).

### *Astroцитos*

A fines del siglo XIX, Ramón y Cajal describió de manera detallada las características estructurales de los astroцитos y propuso las posibles funciones que podían atribuirse para este tipo celular dadas sus características morfológicas. En la actualidad, sus ideas mantienen vigencia y han sido corroboradas con el advenimiento de nuevas técnicas experimentales (Araque, 2017). Los astroцитos presentan una estructura anatómica polarizada; por un lado, a través de finos procesos perisinápticos rodean la mayoría de las sinapsis neuronales, y por otro, sus prolongaciones celulares anchas (pies perivascuales) cubren más del 99% de la superficie vascular en el SNC (**Figura 2**) (Araque, 2017; Haydon y col., 2006; Iadecola y col., 2007). Desde un punto de vista funcional y en condiciones fisiológicas, los astroцитos modulan la neurotransmisión glutamatérgica y gabaérgica (sinapsis tripartitas), regulan el tono vascular por liberación de mediadores vasoactivos, mantienen el suministro de energía y la homeostasis extracelular (Belanger y col., 2011; Diniz y col., 2012; Diniz y col., 2014; Haydon y col., 2006; Ni y col., 2007; Sofroniew y col., 2010; Takano y col., 2005).

El patrón temporal y espacial observado durante la hiperemia funcional, se explica por la acción mediadora de los astroцитos sobre la actividad sináptica y la respuesta vascular (**Figura 2**). Esta acción dependería de la señalización intracelular de corrientes de  $\text{Ca}^{+2}$  en astroцитos, dado que este ion muestra oscilaciones en micro-dominios a nivel de procesos astrocíticos durante la transmisión sináptica (Haydon y col., 2006). El modelo de acoplamiento neurovascular propone que la

actividad sináptica es codificada por los astrocitos en distintas frecuencias de oscilación de  $Ca^{+2}$ ; las cuales median la liberación de compuestos vasodilatadores derivados del ácido araquidónico a nivel del pie perivascular, promoviendo cambios en el tono vascular (**Figura 2**) (Haydon y col., 2006; Zonta y col., 2003a; Zonta y col., 2003b).

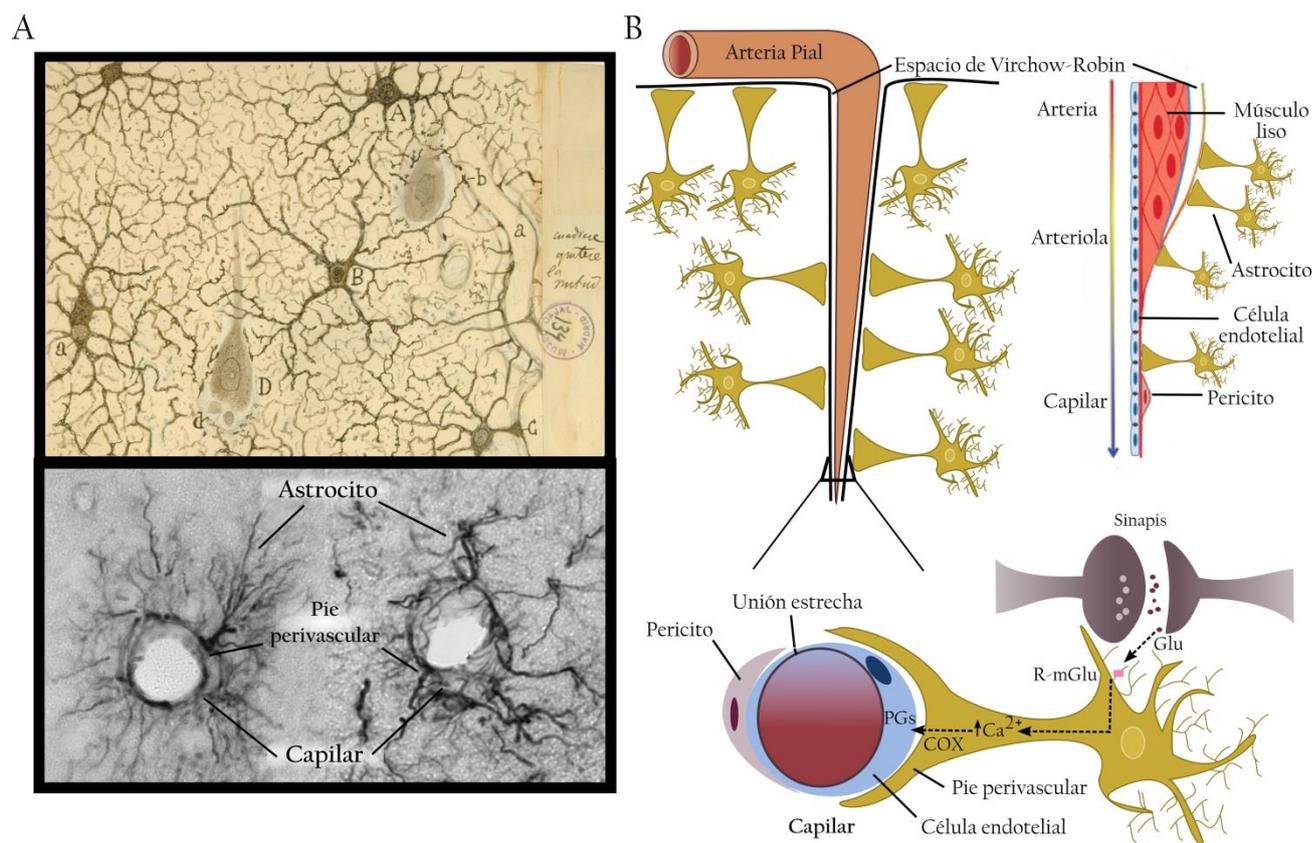
Los astrocitos responden a las injurias del SNC a través de una respuesta conocida como astrogliosis o reactividad astrocitaria. Esta respuesta no cumple con la dinámica del *todo o nada*, sino que se manifiesta de manera variable y heterogénea según el contexto en el que se desarrolle (Sofroniew, 2014; Sofroniew y col., 2010). Diversos mediadores pro-inflamatorios (IL-1,  $TNF\alpha$  e  $IFN\gamma$ ) inducen reactividad astrocitaria que, a su vez, promueve la síntesis de citocinas, quimiocinas y factores de transcripción pro-inflamatorios por parte de los astrocitos. En condiciones inflamatorias, la astrogliosis iría acompañada de pérdida y ganancia de funciones. En este sentido, los astrocitos perderían funciones tróficas, metabólicas y moduladoras sobre neuronas y vasculatura; mientras que ganarían funciones en detrimento de la viabilidad celular por producción de citocinas pro-inflamatorias, ROS, factor de crecimiento endotelial vascular 1 (VEGF-1) y glutamato en concentraciones excitotóxicas (Sofroniew, 2014; Sofroniew y col., 2010). La reactividad astrocitaria implica un cambio morfológico que involucra proteínas del citoesqueleto, como la proteína ácida fibrilar de glía (GFAP), la cual se ve aumentada tras la injuria del SNC y es un indicador de astrogliosis (Brenner, 2014).

### *Neuronas*

El fenómeno de hiperemia funcional no puede explicarse por una interacción directa entre terminales nerviosos y vasos sanguíneos exclusivamente. Considerando su disposición espacial en el SNC, la comunicación entre estos tipos celulares necesita de un mecanismo de difusión extracelular que no cumpliría con la coordinación temporal entre los eventos de actividad sináptica y vasodilatación (Iadecola y col., 2007). Sin embargo, se ha observado que durante la hiperemia funcional la interacción neurona-vasculatura puede tener lugar en paralelo. En este sentido, se ha descrito la regulación del tono vascular por neurotransmisores en áreas de inervación dopaminérgica, particularmente a nivel de corteza prefrontal (CPF). Esta área presenta una estrecha relación espacial entre terminales dopaminérgicos y vasculatura concomitante con una expresión elevada de receptores de dopamina a nivel de los microvasos (Choi y col., 2006; Iadecola, 1998; Krimer y col., 1998). En este caso, los efectos finales de la liberación del neurotransmisor sobre el tono vascular dependerán de la activación de receptores dopaminérgicos, noradrenérgicos y serotoninérgicos presentes en la vasculatura (Choi y col., 2006; Iadecola, 1998).

*La unidad neurovascular en condiciones patológicas*

En patologías del SNC, la incoordinación entre la actividad sináptica y el flujo sanguíneo cerebral reflejan la importancia del acoplamiento neurovascular en el mantenimiento de la homeostasis cerebral. En condiciones patológicas, alteraciones de la unidad neurovascular indican la ocurrencia de hipoxia, inflamación, remodelado estructural del tejido y estrés oxidativo (Gorelick y *col.*, 2011; Iadecola y *col.*, 2008; Stanimirovic y *col.*, 2012; Zacchigna y *col.*, 2008). En la actualidad se propone que la disfunción vascular cumple un rol preponderante en el desarrollo y la progresión de enfermedades crónicas y progresivas que afectan la funcionalidad de la unidad neurovascular, incluyendo hipertensión, accidentes cerebro-vasculares, demencias por trastornos vasculares, diabetes mellitus, enfermedades neurodegenerativas, esquizofrenia y envejecimiento (del Zoppo, 2006; El Assar y *col.*, 2013; Girouard y *col.*, 2006a; Gorelick y *col.*, 2011; Iadecola, 2010; Iadecola y *col.*, 2008; MacKenzie, 2011; Zacchigna y *col.*, 2008). Las alteraciones en la unidad neurovascular repercutirían en la entrega de nutrientes y la remoción de metabolitos en áreas activas, modificando el microambiente cerebral y contribuyendo a la disfunción neuronal (Girouard y *col.*, 2006a).

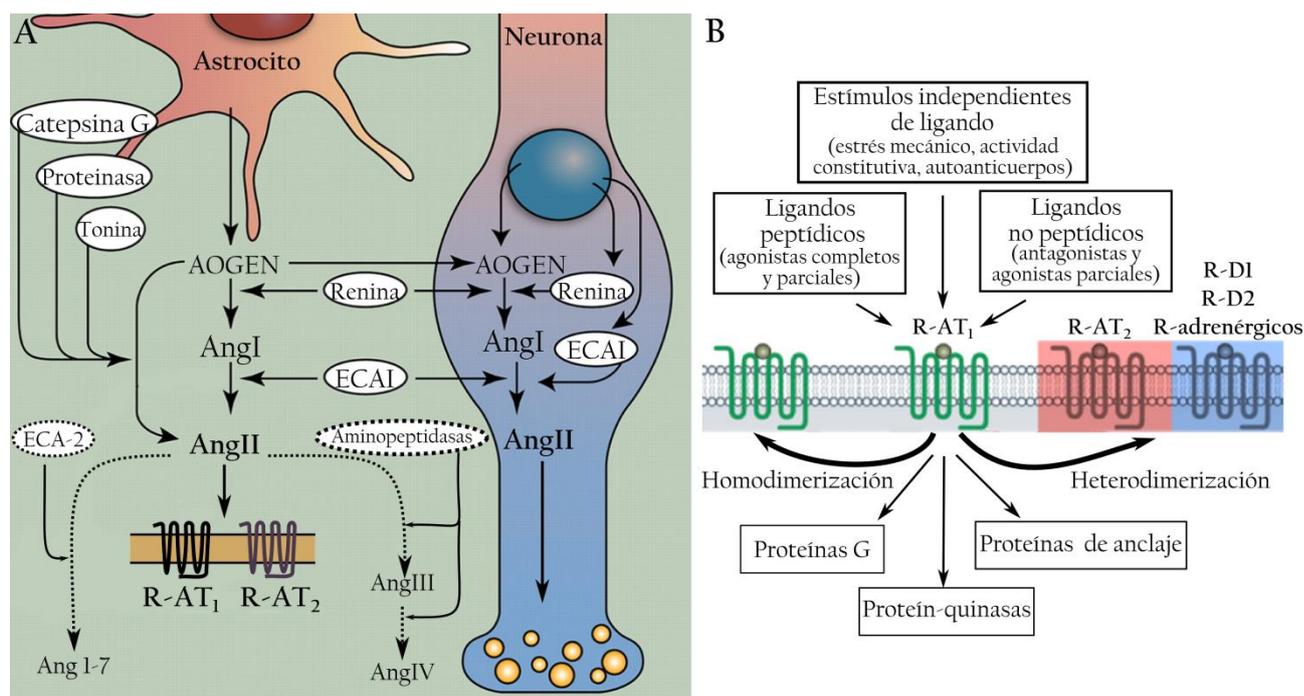


**Figura 2. La unidad neurovascular.** A) Representación gráfica de la localización de astrocitos realizada por Ramón y Cajal (panel superior) y microfotografías representativas de la localización de vasos sanguíneos y astrocitos (panel inferior); B) Esquema representativo de la estructura vascular en el sistema nervioso central (panel superior) y modelo simplificado del acoplamiento neurovascular (panel inferior).

## *El sistema renina-angiotensina cerebral*

La primera caracterización del sistema renina-angiotensina (SRA) se realizó en nuestro país en 1940, cuando se identificó la formación de un agente vasopresor, conocido actualmente como AngII, a partir de un sustrato proteico presente en plasma como consecuencia de la acción enzimática de renina (Braun-Menendez y *col.*, 1940). Esto motivó que los primeros estudios del SRA se focalizaran en su rol como sistema humoral circulante, encargado del control de la presión arterial y la homeostasis de electrolitos (Peach, 1977). Posteriormente, se observó que AngII presentaba acciones centrales como consecuencia de la estimulación directa de sus receptores, presentes en los órganos circunventriculares, debido a la llegada del péptido a través de capilares fenestrados. A su vez, se consideraban efectos indirectos de AngII, dado que estas áreas proyectan hacia otros centros nerviosos. De este modo, estos mecanismos permitían explicar la modulación de AngII sobre la actividad autónoma, tono simpático vascular, liberación de vasopresina y apetito por el sodio. Sin embargo, luego se conoció que estos efectos ocurren de manera conjunta por acción directa, indirecta y local en distintas áreas cerebrales (Saavedra, 1992; Wright y *col.*, 2013; Wright y *col.*, 2008). En la actualidad, se reconoce la actividad parácrina del SRA (complementaria a la sistémica) dado que todos sus componentes han sido identificados en distintos tipos de tejidos, tales como corazón, riñones, músculo liso vascular, vasculatura cerebral y cerebro (Ganong, 1994; Paul y *col.*, 2006; Paz, 2012; Poisner, 1998; von Bohlen und Halbach y *col.*, 2006; Zhou y *col.*, 2006). Las funciones tisulares y sistémicas de AngII muestran diferencias y sugieren que, aún con bajos niveles plasmáticos del péptido, el SRA puede presentar actividad parácrina exacerbada por producción local de AngII y/o elevada expresión de sus receptores (Hunyady y *col.*, 2000).

A nivel del SNC todos los componentes del SRA (precursores, enzimas, receptores, péptidos activos) se han detectado mediante diversas técnicas, tales como radioinmunoensayo, inmunohistoquímica, hibridación *in situ* y *northern blot* (Antunes-Rodrigues y *col.*, 2004; Saavedra, 1992). El angiotensinógeno es el precursor del sistema que, por actividad de renina, da lugar a angiotensina I (AngI), un decapeptido inactivo que es posteriormente clivado por peptidasas. La enzima convertidora de angiotensina I (ECA) es la responsable del clivaje de AngI en el octapéptido AngII, uno de los mediadores más estudiados del sistema que ejerce sus funciones vía dos tipos de receptores: AT<sub>1</sub> y AT<sub>2</sub> (R-AT<sub>1</sub> y R-AT<sub>2</sub>). Además, la síntesis de AngII en el SNC puede ocurrir por vías no canónicas que involucran la actividad de catepsina G, elastasa, proteinasa 3 y tonina (**Figura 3**). El posterior procesamiento de AngII da lugar a la formación de otros neuropéptidos activos como angiotensina IV y angiotensina 1-7, que poseen sus propios receptores (Albrecht, 2010; Saavedra, 2005; von Bohlen und Halbach y *col.*, 2006; Wright y *col.*, 2013; Wright y *col.*, 2008).



**Figura 3. El sistema renina angiotensina cerebral. A)** Esquema representativo de la vía de síntesis de angiotensinas bio-activas en el SNC; **B)** Receptores AT<sub>1</sub> estímulos para su activación y vías de señalización intracelular. Modificado de Karnink, S.S. y col (2015) y Paul, M. y col (2006)

La presencia y síntesis de angiotensinógeno se ha determinado a nivel neuronal y astrocitario; siendo estos últimos la principal fuente cerebral del precursor considerando que los astrocitos positivos para angiotensinógeno presentan un amplio patrón de distribución en el SNC (Imboden y col., 1987; Intebi y col., 1990; Thomas, 1999; Yang y col., 1999). En el caso de neuronas, su distribución es restringida y se ha observado que angiotensinógeno, AngII y sus receptores colocalizan en ciertas regiones del cerebro a nivel de terminales nerviosas, lo que sugiere que podrían estar actuando a lo largo de las sinapsis (Allen y col., 2001; Antunes-Rodrigues y col., 2004; Lenkei y col., 1997; Song y col., 1992). Esta idea es acompañada por las evidencias que muestran que la administración exógena de AngII, en estos sitios de colocalización, evoca respuestas fisiológicas atribuidas al péptido, indicando su rol modulador en la actividad sináptica (Lind y col., 1985). Por otro lado, la presencia de renina cerebral fue muy cuestionada en un principio debido a sus bajos niveles de expresión; sin embargo, hoy en día se reconoce su localización intra y extracelular en el SNC. Esta enzima puede ser secretada en su forma activa (renina) o inactiva (pro-renina) y, además de su acción sobre angiotensinógeno, actúa sobre receptores propios para regular la actividad de la ECA (Grobe y col., 2008; Karamyan y col., 2007; McKinley y col., 2003; von Bohlen und Halbach y col., 2006). Finalmente, la ECA muestra una localización ubicua en el SNC, presentándose en su forma soluble o unida a membrana a nivel extracelular y participando del clivaje de AngI, así como también en el catabolismo de otros péptidos activos (Karamyan y col., 2007; McKinley y col., 2003).

Hasta el momento, no se ha podido identificar un patrón de distribución definido en la expresión de los componentes del sistema, razón por la cual algunos autores sostienen que la formación de las angiotensinas bioactivas en el cerebro es el resultado de múltiples interacciones celulares locales (von Bohlen und Halbach y *col.*, 2006). Esta idea es acompañada por las evidencias que indican que angiotensinógeno, AngI y AngII no atraviesan la BHE en condiciones fisiológicas (Harding y *col.*, 1988; Van Houten y *col.*, 1983). Mientras que, el ingreso de AngII al SNC se observa tras la disrupción de la BHE en condiciones de disfunción cerebrovascular, promovida por la sobreestimulación del SRA presente en la microvasculatura cerebral (Biancardi y *col.*, 2014). Más aún, las evidencias recientes proponen la existencia de un SRA intraneuronal, además del reconocido a nivel intersticial en el SNC (Albrecht, 2010; Grobe y *col.*, 2008; Thomas, 1999). La existencia del sistema intraneuronal se corroboró por el aumento en los niveles de  $Ca^{+2}$  observado en respuesta a la administración intracelular de AngII, mediado por activación de sus receptores en la membrana endolisosomal (Deliu y *col.*, 2014; Wondergem, 2014).

### *Receptores de angiotensina II*

La actividad de AngII esta mediada por R-AT<sub>1</sub> y R-AT<sub>2</sub>, los cuales presentan una conformación de siete dominios transmembrana y pertenecen a la superfamilia de receptores que se acoplan a proteínas G (Goodman y *col.*, 2011; Iwai y *col.*, 1991; Mukoyama y *col.*, 1993; Murphy y *col.*, 1991). De estos dos tipos de receptores el R-AT<sub>1</sub> es reconocido por mediar la mayor parte de las acciones atribuidas a AngII (Goodman y *col.*, 2011). En ratas, ratones y humanos se han identificado dos isoformas de R-AT<sub>1</sub> designados como AT<sub>1A</sub> y AT<sub>1B</sub>; estos muestran una similitud en el 95% de su secuencia de aminoácidos, en la afinidad por ligando y en sus propiedades de activación y difieren en cuanto a su localización cromosómica, regulación transcripcional y distribución en los tejidos (de Gasparo y *col.*, 2000). El subtipo AT<sub>1A</sub> es el responsable de las funciones asociadas a AngII en el SNC, y su transcripción y expresión es promovida por glucocorticoides y otras hormonas (de Gasparo y *col.*, 2000; Saavedra, 1999), por lo tanto nos referiremos a éste como R-AT<sub>1</sub>.

Los R-AT<sub>1</sub> activan múltiples cascadas de señalización dependiendo del tipo celular. Los efectos fisiológicos y patofisiológicos más importantes que se inician de manera rápida por AngII son mediados por proteínas G que actúan vía IP<sub>3</sub>/DAG  $Ca^{2+}$ ; regulando canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje de tipo L y T; o bien activando la proteína quinasa C (PKC). También se han descrito respuestas secundarias para AngII vía señalización de quinasas intracelulares (MAPK, ERK o JNK), relacionadas con la regulación celular a largo plazo, que modifican la producción de factores de crecimiento, proliferación, migración, apoptosis y transcripción (Faraci y *col.*, 2006; Hunyady y *col.*, 2006; Hunyady y *col.*, 2000; Karnik y *col.*, 2015). Además, existe un mecanismo de

señalización, estimulado por R-AT<sub>1</sub>, que es independiente de proteína G e involucra tirosina quinasas y arrestinas (Hunyady *y col.*, 2000). Estas últimas se unen al receptor una vez que ha sido activado por el ligando y, rompiendo su unión con la proteína G, promueven la desensibilización del receptor. Posteriormente, se desencadena la endocitosis e internalización del receptor vía clatrina. Este receptor puede sufrir el mismo efecto por la unión de una gran variedad de proteínas en su dominio citoplasmático C-terminal; o también puede modificarse su acción por efecto de homo o hetero-dimerización (**Figura 3**) (Hunyady *y col.*, 2006; Karnik *y col.*, 2015).

El R-AT<sub>1</sub> presenta una amplia distribución en el SNC de los mamíferos incluyendo los órganos circunventriculares (órgano subfornical y órgano vascular de la lámina terminalis), regiones del tronco encefálico (núcleo del tracto solitario y médula ventrolateral caudal), y regiones del cerebro medio y anterior tales como: hipotálamo, núcleo paraventricular sustancia nigra (SN), área tegmental ventral (ATV), caudado putamen (CPu), hipocampo, amígdala y corteza (Allen *y col.*, 2001; Allen *y col.*, 1999a; Allen *y col.*, 1999b; Fogarty *y col.*, 2001; Gonzalez *y col.*, 2012; McKinley *y col.*, 2003; von Bohlen und Halbach *y col.*, 2006; Wright *y col.*, 2013; Wright *y col.*, 2008). Esta distribución anatómica explica en parte la multiplicidad de funciones descritas para AngII en el SNC que abarcan el control autonómico y neuroendócrino de la presión arterial, la respuesta a estrés y a estímulos de recompensa, la modulación de procesos de memoria y aprendizaje, el control motor y las respuestas inflamatorias en la neurodegeneración (Albrecht, 2010; Labandeira-Garcia *y col.*, 2014; Labandeira-Garcia *y col.*, 2012; Maul *y col.*, 2005; McKinley *y col.*, 2003; Moore *y col.*, 2007; von Bohlen und Halbach *y col.*, 2006; Wright *y col.*, 2013; Wright *y col.*, 2008). En condiciones basales, los R-AT<sub>1</sub> son sintetizados de manera activa por neuronas, astrocitos, microglía y células endoteliales. Mientras que, en condiciones inflamatorias, su expresión aumenta en estos tipos celulares con la consecuente ocurrencia de astrogliosis y microgliosis, acompañada de alteraciones funcionales de la microvasculatura cerebral y de estrés oxidativo neuronal (Case *y col.*, 2013; de Kloet *y col.*, 2015; Haack *y col.*, 2013; Li *y col.*, 2009; Mitra *y col.*, 2010; Zhou *y col.*, 2005).

Por otro lado, los R-AT<sub>2</sub>, difieren del R-AT<sub>1</sub> en peso molecular, vías de señalización y distribución específica en tejidos. Su transcripción y expresión presentan un pico máximo durante el período fetal y disminuyen de manera drástica al momento del nacimiento, quedando reducida su expresión sólo a algunos tejidos en el adulto (de Gasparo *y col.*, 2000; Karnik *y col.*, 2015). Los R-AT<sub>2</sub> actúan principalmente a través de la activación de proteína G inhibitoria y fosfatasas de tirosina/serina, y no presentan mecanismos de desensibilización o internalización. En condiciones fisiológicas, los efectos de la activación de estos receptores parecen contrarrestar aquellos promovidos por R-AT<sub>1</sub>, ya que incluyen la inhibición de la proliferación celular; el control en la

diferenciación y regeneración celular; y la vasodilatación (de Gasparo y *col.*, 2000; Karnik y *col.*, 2015).

### *Bloqueantes de receptores de angiotensina II*

Los primeros intentos farmacológicos para bloquear los efectos de AngII se realizaron a través de análogos peptídicos de la misma. Posteriormente, a partir de derivados del imidazol, se generaron antagonistas no peptídicos, selectivos, sin acción agonista parcial y activos por vía oral, los cuales en conjunto se conocen como bloqueantes de receptores de AngII (ARBs). El primero de ellos, losartán, fue aprobado para consumo humano por la *United States Food and Drug Administration* (FDA) a mediados de los 90, y desde entonces se han aprobado cinco fármacos más. Todos estos poseen una elevada afinidad por R-AT<sub>1</sub>, mostrando una selectividad por este receptor 10000 veces más fuerte que para el R-AT<sub>2</sub> (Goodman y *col.*, 2011). Los rangos de afinidad del R-AT<sub>1</sub> por sus antagonistas son candesartán> irbesartán> telmisartán= valsartán= EXP 3174 (metabolito activo de losartán)> losartán (Mimran y *col.*, 1999a; Mimran y *col.*, 1999b). Estos compuestos bloquean todos los efectos de AngII mediados por R-AT<sub>1</sub>; sin embargo se ha propuesto que, al mismo tiempo y de manera indirecta, el aumento en los niveles del péptido circulante estaría favoreciendo la estimulación de los R-AT<sub>2</sub> (Goodman y *col.*, 2011). Los ARBs son un grupo farmacológico reconocido en la clínica por su efectividad en el tratamiento de la hipertensión arterial, al mismo tiempo que son bien tolerados por los pacientes ya que no generan efectos secundarios importantes (de Gasparo y *col.*, 2000). Además, en condiciones experimentales, se ha observado que los ARBs modifican la expresión y funcionalidad de heterodímeros de R-AT<sub>1</sub> y receptores catecolaminérgicos (Barki-Harrington y *col.*, 2003; Dong y *col.*, 2012; Martínez-Pinilla y *col.*, 2015).

Candesartán Cilexetilo es una pro-droga administrada por vía oral que, por actividad de esterasas intestinales durante su absorción, se convierte en el compuesto activo candesartán (CV). CV se une en gran proporción a proteínas plasmáticas, alcanzando su concentración máxima luego de 2-3hs de ser administrado, y su eliminación es por vía renal (Oparil, 2000). Este antagonista tiene dos características importantes: antagonismo reversible insalvable y capacidad de “re-acoplamiento” (Vauquelin y *col.*, 2001). La primera hace referencia a su capacidad de disminuir en un 94% el efecto máximo de AngII, por la formación de uniones electrostáticas fuertes y una lenta velocidad de disociación (Takezako y *col.*, 2004). Mientras que el “re-acoplamiento” se debe a su potencia antagónica, lo que le permite volver a unirse a un receptor activo al ser liberado de su unión antagónica inicial. Estas características explican sus efectos prolongados una vez discontinuada su administración y disminuidos sus niveles plasmáticos (Morsing, 1999; Morsing y *col.*, 1999; Vanderheyden y *col.*, 2000; Vauquelin y *col.*, 2001).

CV administrado periféricamente atraviesa la BHE y bloquea R-AT<sub>1</sub> centrales (Gohlke y *col.*, 2002). Luego de tratamientos repetidos se observa una disminución en el contenido de angiotensinógeno, ECA y AngII, y en la expresión de R-AT<sub>1</sub> a nivel del SNC (Bregonzio y *col.*, 2008; Nishimura y *col.*, 2000; Pelisch y *col.*, 2010; Seltzer y *col.*, 2004). Además, sus efectos alcanzan otros sistemas de neurotransmisión, como el catecolaminérgico. En este sentido, el bloqueo de R-AT<sub>1</sub> modifica el contenido basal de metabolitos de dopamina en CPu y previene el aumento de ARNm de su enzima de síntesis, en respuesta a AngII central o por exposición a bajas temperaturas (Bregonzio y *col.*, 2008; Jenkins, 2008; Seltzer y *col.*, 2004).

## Los receptores AT<sub>1</sub> en la unidad neurovascular

### *Microvasos cerebrales*

Los microvasos cerebrales presentan un SRA local altamente susceptible a los efectos de la activación de R-AT<sub>1</sub>, independientemente de la actividad sistémica del péptido (Faraci, 2011; Kumai y *col.*, 2008; Zhou y *col.*, 2006). Estos efectos se evidencian en diversos modelos animales de hipertensión y están ampliamente estudiados en las ratas espontáneamente hipertensas (SHR), que presentan una sobre-expresión de los componentes del SRA en la microvasculatura cerebral (Pelisch y *col.*, 2011; Zhou y *col.*, 2006). Estos modelos animales evidencian que la sobre-estimulación de R-AT<sub>1</sub> desencadena disfunción endotelial a través de dos mecanismos: producción de ROS y estimulación de una respuesta inflamatoria (MacKenzie, 2011).

A nivel endotelial, la señalización de R-AT<sub>1</sub>, vía PKC, conlleva a la fosforilación de la subunidad p47 phox para el ensamblado de la enzima NADPH oxidasa (isoforma 2) y el aumento en la producción de ROS; siendo ésta la principal vía de señalización por la cual contribuye al estrés oxidativo endotelial (Faraci, 2011; Iadecola y *col.*, 2008; Lassegue y *col.*, 2001; Tan y *col.*, 2012; Touyz y *col.*, 2003). La sobreproducción de NO mediada por R-AT<sub>1</sub> es otra fuente de ROS que incrementa el daño endotelial y afecta el flujo sanguíneo regional (Girouard y *col.*, 2006b, 2007; Tesfamariam y *col.*, 2007; Yamakawa y *col.*, 2003).

Los R-AT<sub>1</sub> participan en eventos claves de la respuesta inflamatoria aumentando la permeabilidad vascular, al mismo tiempo que reclutan y activan células inflamatorias (Negro, 2008). Estos eventos estarían mediados por la activación inicial del factor de transcripción nuclear  $\kappa$ -B (NF- $\kappa$ B) (MacKenzie, 2011). En SHR la sobre-estimulación de R-AT<sub>1</sub> aumenta la expresión de moléculas de adhesión, tales como ICAM-1, y la infiltración de macrófagos; concomitante con el aumento en los niveles de NF- $\kappa$ B, TNF $\alpha$ , IL-1 y de los miembros de la familia de proteínas de estrés celular (proteína de golpe de calor -HSP-) (Ando y *col.*, 2004a; Ando y *col.*, 2004b; Zhou y *col.*, 2005) (**Figura 4**).

En condiciones patológicas, la estimulación de R-AT<sub>1</sub> conduciría a un triángulo disfuncional, donde las ROS promueven la formación de AngII y la liberación de NF-κB, mientras que, por otro lado, este mediador inflamatorio promueve la síntesis de angiotensinógeno y ROS (MacKenzie, 2011; Marchesi *y col.*, 2008).

#### *Astrocitos*

En condiciones basales los R-AT<sub>1</sub> participan de manera parácrina en el mantenimiento de la funcionalidad de astrocitos, controlando el flujo sanguíneo cerebral y el recambio glial (Fogarty *y col.*, 2001). Sin embargo, durante la respuesta neuroinflamatoria, se destaca el rol de R-AT<sub>1</sub> en este tipo celular ya que actúa de manera sinérgica en la producción de ROS y mediadores inflamatorios (de Kloet *y col.*, 2015). En este sentido, en cultivos de astrocitos estimulados con AngII, o cuando éstos son expuestos a condiciones de hipoxia, el bloqueo R-AT<sub>1</sub> previene la liberación de mediadores pro-inflamatorios clásicos (Danielyan *y col.*, 2007; Gowrisankar *y col.*, 2016). Además, se ha observado que su activación promueve el aumento en la producción del factor de crecimiento transformador β (TGF-β), por parte de los astrocitos, generando un nicho permisivo en el SNC para la activación de células inflamatorias (**Figura 4**) (Lanz *y col.*, 2010).

#### *Neuronas*

Las acciones de los R-AT<sub>1</sub> son complejas y diversas dependiendo del tipo neuronal evaluado y de las condiciones fisiopatológicas. Dentro de sus funciones en el SNC el control de la transmisión catecolaminérgica resulta de interés para el desarrollo del presente trabajo. En este sentido, los R-AT<sub>1</sub> modulan de manera directa la actividad noradrenérgica central, en áreas de control autónomo, mediante la estimulación de cascadas intracelulares que conducen a un aumento en la expresión de transportadores de noradrenalina y enzimas de síntesis (Gelband *y col.*, 1998; Griendling *y col.*, 1994; Johnson *y col.*, 2015; von Bohlen und Halbach *y col.*, 2006; Wang *y col.*, 2001; Watanabe *y col.*, 2010). Sin embargo, sus efectos pueden observarse también de manera indirecta, a nivel de locus coeruleus (LC), que si bien no presenta R-AT<sub>1</sub>, AngII regula su actividad y la transcripción de tirosina hidroxilasa (TH) en condiciones de estrés (Armando *y col.*, 2001; Peng *y col.*, 2001; Saavedra *y col.*, 2006; Seltzer *y col.*, 2004). Además, se ha detectado la presencia de estos receptores en áreas ricas en dopamina como CPu, SN, hipotálamo, pálido ventral; tanto a nivel del soma como de las terminales neuronales (Allen *y col.*, 1992; Allen *y col.*, 1999a; Allen *y col.*, 1991; Allen *y col.*, 1999b; Daubert *y col.*, 1999; Paz *y col.*, 2014; Zhuo *y col.*, 1998). Mas aún, se propone una regulación cruzada entre el sistema dopaminérgico y el SRA local, dado que bajos niveles del neurotransmisor o de sus receptores promueven un aumento en los niveles de R-AT<sub>1</sub>; mientras que el bloqueo de éstos modifica los niveles de receptores dopaminérgicos D1 y D2, con los que además forma heterodímeros funcionales en CPu (Daubert *y col.*, 1999; Dominguez-Meijide *y col.*, 2014;

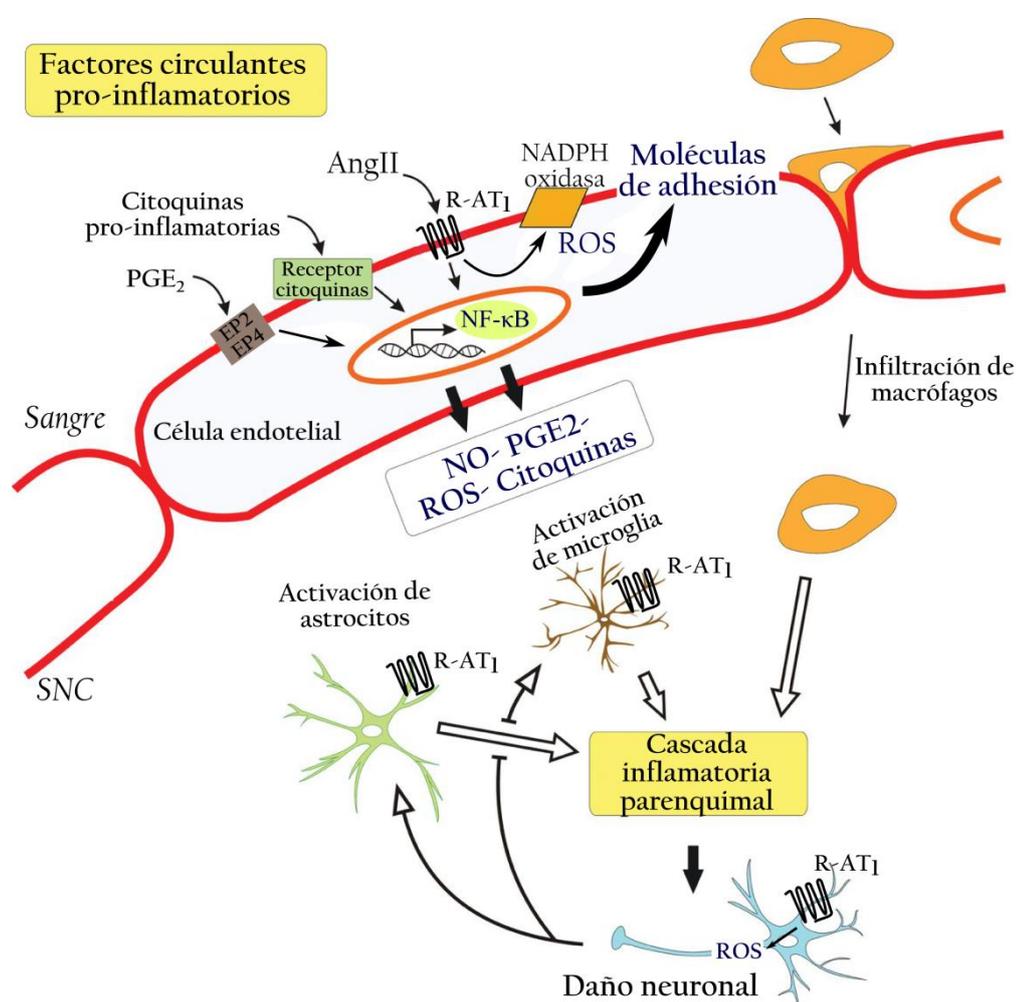
Labandeira-García y col., 2011; Martínez-Pinilla y col., 2015; Villar-Cheda y col., 2014; Villar-Cheda y col., 2010). A nivel funcional, los R-AT<sub>1</sub> presinápticos promueven la síntesis y liberación de dopamina en condiciones tónicas y evocadas, lo que explica los efectos observados a nivel conductual (Brown y col., 1996; Dwoskin y col., 1992; Hoebel y col., 1994; Jenkins y col., 1995a; Jenkins y col., 1995b; Mendelsohn y col., 1993; Narayanaswami y col., 2013; Simonnet y col., 1979). En este sentido, las funciones motoras dependientes de actividad dopaminérgica en CPU, como la actividad locomotora y la estereotipia, se ven incrementadas luego de la administración de AngII; al mismo tiempo, potencia los efectos de agonistas dopaminérgicos y sus efectos son prevenidos por antagonistas de dopamina (Georgiev, 1990; Georgiev y col., 1985; Jenkins y col., 1995b; Raghavendra y col., 1998; Tchekalarova y col., 1998).

Numerosos estudios, realizados *in vitro* con la línea celular CATH.a, extienden las respuestas mediadas por R-AT<sub>1</sub> al mantenimiento de la homeostasis local a nivel del SNC y la viabilidad neuronal. Estas células en cultivo presentan propiedades de neuronas catecolaminérgicas tales como la expresión de TH y dopamina beta-hidroxilasa, producción de dopamina y noradrenalina, y expresión de R-AT<sub>1</sub> (Du y col., 2004). La administración de AngII a estos cultivos indujo un aumento en la expresión de R-AT<sub>1</sub>, vía NFκB, y un aumento en la producción de ROS mitocondrial (Case y col., 2013; Haack y col., 2013; Li y col., 2013; Mitra y col., 2010). En el caso de sobreestimulación de R-AT<sub>1</sub> se observó apoptosis por un aumento en la producción de ROS vía estimulación de NADPH oxidasa (Ou y col., 2016; Zhao y col., 2015). Estos mismos mecanismos por activación de R-AT<sub>1</sub> están involucrados en la apoptosis neuronal y neuroinflamación inducida por exceso de sodio en animales hipertensos (Yamamoto y col., 2008b).

### **Los receptores AT<sub>1</sub> en la disfunción de la unidad neurovascular**

Considerando la multiplicidad de acciones descritas para AngII vía R-AT<sub>1</sub>, algunos estudios se centraron en las alteraciones que afectan de manera conjunta a distintos tipos celulares del SNC y comprometen su funcionalidad. En relación a la hiperemia funcional, los estudios iniciales indicaron que AngII, administrada de manera sistémica, altera el acoplamiento neurovascular por mecanismos independientes a cambios en la presión arterial o la actividad simpática, dado que también se observa por aplicación local del péptido (Kazama y col., 2003). Más tarde se corroboró que estos efectos a nivel cortical responden a una alteración de la homeostasis en el microambiente neuronal por un aumento en las ROS, mediado por activación de NADPH oxidasa (Girouard y col., 2006a; Girouard y col., 2006b, 2007; Kazama y col., 2004). Además, estas alteraciones funcionales inducidas por AngII involucran la actividad de COX-1 y la liberación de prostaglandinas por parte de células gliales (Capone y col., 2011). El estrés oxidativo vascular inducido por AngII, se ha

propuesto como desencadenante de la disfunción cerebrovascular observadas en hipertensión, demencias por trastornos vasculares y Alzheimer; acompañando la astrogliosis, neurodegeneración y alteraciones conductuales y cognitivas asociadas a estas patologías (Girouard y *col.*, 2006a; Iadecola, 2010; Iadecola y *col.*, 2008; Rodriguez-Arellano y *col.*, 2016). En modelos de hipertensión, con dieta rica en sodio o administración de acetato de desoxicorticosterona, se observó la participación de R-AT<sub>1</sub> en el desarrollo de alteraciones cerebrovasculares que afectan el desempeño cognitivo (Pelisch y *col.*, 2011; Sharma y *col.*, 2012). Mientras que, AngII, en dosis bajas y repetidas, promueve la deposición de placas de  $\beta$ -amiloide, un desencadenante de la disfunción cerebrovascular en el modelo animal de Alzheimer por hipertensión (Faraco y *col.*, 2016)



**Figura 4. El sistema renina angiotensina en la neuroinflamación.** Esquema representativo de la localización de receptores AT<sub>1</sub> y los mediadores pro-inflamatorios estimulados por su activación. Modificado de Saavedra (2012)

En el envejecimiento y la enfermedad de Parkinson, la neurodegeneración dopaminérgica involucra al SRA dado que la hiperactividad de R-AT<sub>1</sub> incrementa la vulnerabilidad neuronal por acciones intácrinas e intersticiales (Labandeira-Garcia y *col.*, 2012; Labandeira-Garcia y *col.*, 2011;

Villar-Cheda y *col.*, 2012). Estos trabajos muestran que la activación inicial del SRA ocurre por múltiples estímulos de origen neuronal (disminución de dopamina), astrocitario o vascular (hipoperfusión regional) (Labandeira-Garcia y *col.*, 2014; Rodriguez-Perez y *col.*, 2013; Villar-Cheda y *col.*, 2014). La consecuente hiperactividad de los R-AT<sub>1</sub> promueve la exacerbación del estrés oxidativo (vía NADPH oxidasa y ROS mitocondrial) y la activación de una respuesta inflamatoria glial, lo que se considera como eventos claves en el inicio de la neurodegeneración (Borrajo y *col.*, 2014; Grammatopoulos y *col.*, 2007; Labandeira-Garcia y *col.*, 2014; Munoz y *col.*, 2014; Rodriguez-Perez y *col.*, 2016; Rodriguez-Perez y *col.*, 2013; Villar-Cheda y *col.*, 2010; Villar-Cheda y *col.*, 2012). En los últimos años, el bloqueo de R-AT<sub>1</sub> se encuentra en constante revisión y se propone como una alternativa terapéutica para la neuroinflamación (Saavedra y *col.*, 2011; Villapol y *col.*, 2015).

### **Anfetamina**

La anfetamina (1-metil-2-fenetilamina), sintetizada por primera vez en 1887, es un compuesto con propiedades psicoestimulantes que se encuentra dentro del grupo farmacológico de las aminas simpático-miméticas de acción indirecta (Lieberman y *col.*, 1990; Robinson y *col.*, 1986). Posteriormente, surgieron otros compuestos con propiedades estructurales y biológicas similares, conocidas como sustancias tipo anfetaminas, entre las que se encuentra la metanfetamina. Actualmente el uso clínico de anfetamina, aprobado por la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT), se limita al tratamiento de la narcolepsia y el trastorno de hiperactividad con déficit atencional (ADHD) (Belixán y *col.*, 2008). Debido a su alto poder adictivo, el uso terapéutico se realiza únicamente bajo prescripción médica y estricta observación periódica (Berman y *col.*, 2008). En la actualidad, se estima que la anfetamina es la medicación de mayor abuso, que sumado al uso recreacional, alcanza 35 millones de usuarios a nivel mundial. La tasa de aumento en el consumo ilegal se incrementó de manera notable desde fines del siglo pasado y, según el último reporte mundial de drogas, presentan el mayor número de incautaciones a nivel mundial (Berman y *col.*, 2008; World Drug Report 2016).

### **Mecanismo de acción y efectos farmacológicos**

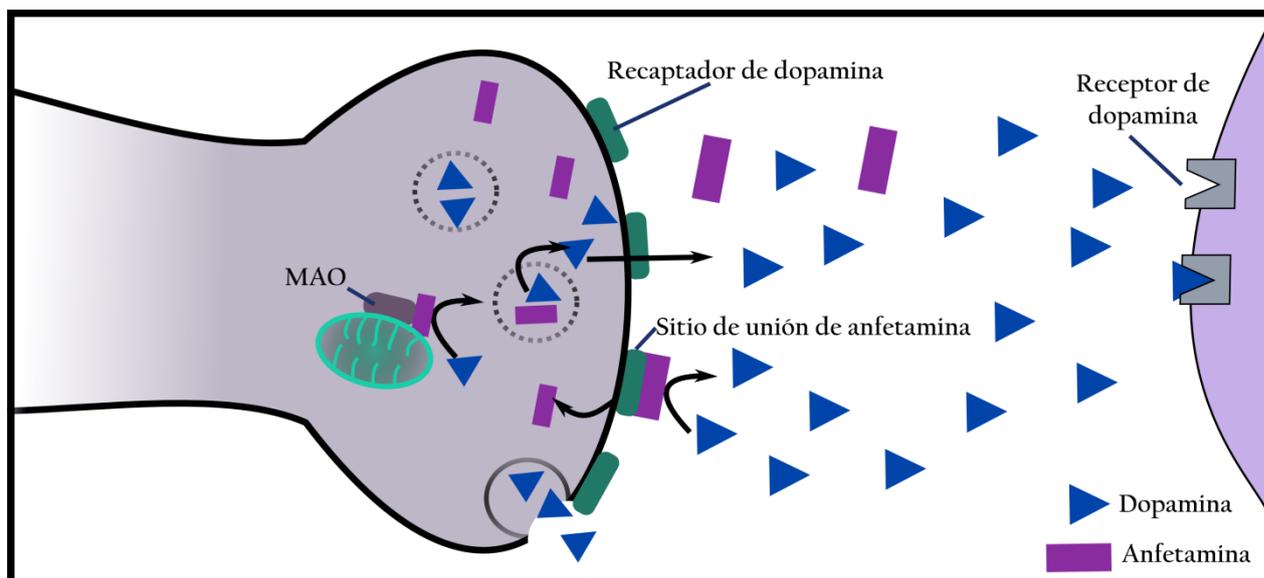
La anfetamina actúa a nivel de transportadores de monoaminas y sus efectos pueden observarse en distintos sistemas de neurotransmisión; sin embargo su acción a nivel de la terminal dopaminérgica es el mecanismo mayormente estudiado. En este sentido, anfetamina modifica la actividad de los transportadores de dopamina e interfiere con la remoción del neurotransmisor desde el espacio sináptico. Al mismo tiempo facilita el transporte de dopamina en dirección inversa a

través de la membrana sináptica, desde el espacio intracelular hacia la hendidura sináptica. Además, bloquea el almacenamiento vesicular de dopamina e inhibe las enzimas metabólicas mono-amino oxidasas (MAO) tipo A y B, por lo que dopamina se acumula en el citosol (**Figura 5**) (Berman y col., 2008; Egleton y col., 2014; Moore, 1977; Rang y col., 2014). Esta redistribución del neurotransmisor conduce al aumento de la liberación tónica y fásica de monoaminas a nivel central y periférico (Berman y col., 2008). Los principales circuitos de dopamina en el SNC son: la *Vía Nigroestriatal*, con cuerpos neuronales localizados en SN que proyectan hacia CPU; el *Sistema tuberoinfundibular*, de neuronas cortas desde hipotálamo hasta la eminencia media e hipófisis; y la *Vía mesocorticolímbica*, cuyos cuerpos neuronales se localizan en el ATV y proyectan hacia núcleo accumbens (NAcc) y CPF (Anden y col., 1965; Juárez y col., 2016). Además, las proyecciones dopaminérgicas desde núcleos mesencefálicos alcanzan un gran número de áreas cerebrales que forman parte del sistema límbico, como el hipocampo y la amígdala. Esta amplia distribución condice con las diversas funciones descritas para dopamina que incluyen respuestas de recompensa y castigo, motivación, movimientos voluntarios, aprendizaje y memoria de trabajo (Buchta y col., 2015; Juárez y col., 2016; Moratalla y col., 2015).

El efecto agudo de anfetamina genera aumento en la frecuencia cardíaca y la presión arterial, estimulación del eje hipotálamo-hipofisario-adrenal, euforia y un mejor rendimiento en tareas ejecutivas simples (Egleton y col., 2014; Rang y col., 2014). En animales de experimentación, dependiendo de la dosis utilizada, los efectos farmacológicos a nivel conductual son el aumento en la actividad locomotora o comportamiento estereotipado (Di Chiara y col., 1988; Kuczenski y col., 1983; Lieberman y col., 1990; Torregrossa y col., 2008). Además, existen numerosas evidencias que indican que la exposición repetida a este psicoestimulante está asociada con secuelas deletéreas, tales como neuroinflamación, disfunciones cognitivas, cambios neuroadaptativos y dependencia (Egleton y col., 2014).

### **Efectos deletéreos en la unidad neurovascular**

Los psicoestimulantes inducen un aumento de catecolaminas a nivel sináptico alterando la funcionalidad neuronal. El aumento exacerbado en los niveles de dopamina resulta en estrés oxidativo, alteración en los componentes de la unidad neurovascular y, en última instancia, degeneración neuronal; lo que explica los efectos tóxicos descritos para anfetamina y metanfetamina. Mientras que, en la toxicidad en áreas de escasa transmisión catecolaminérgica, estaría involucrando la exitotoxicidad por glutamato. En el caso de otros derivados de anfetamina, como el éxtasis, se observa neurotoxicidad mediada por serotonina (Bowyer y col., 2014; Cunha-Oliveira y col., 2008; Egleton y col., 2014; Yamamoto y col., 2010).

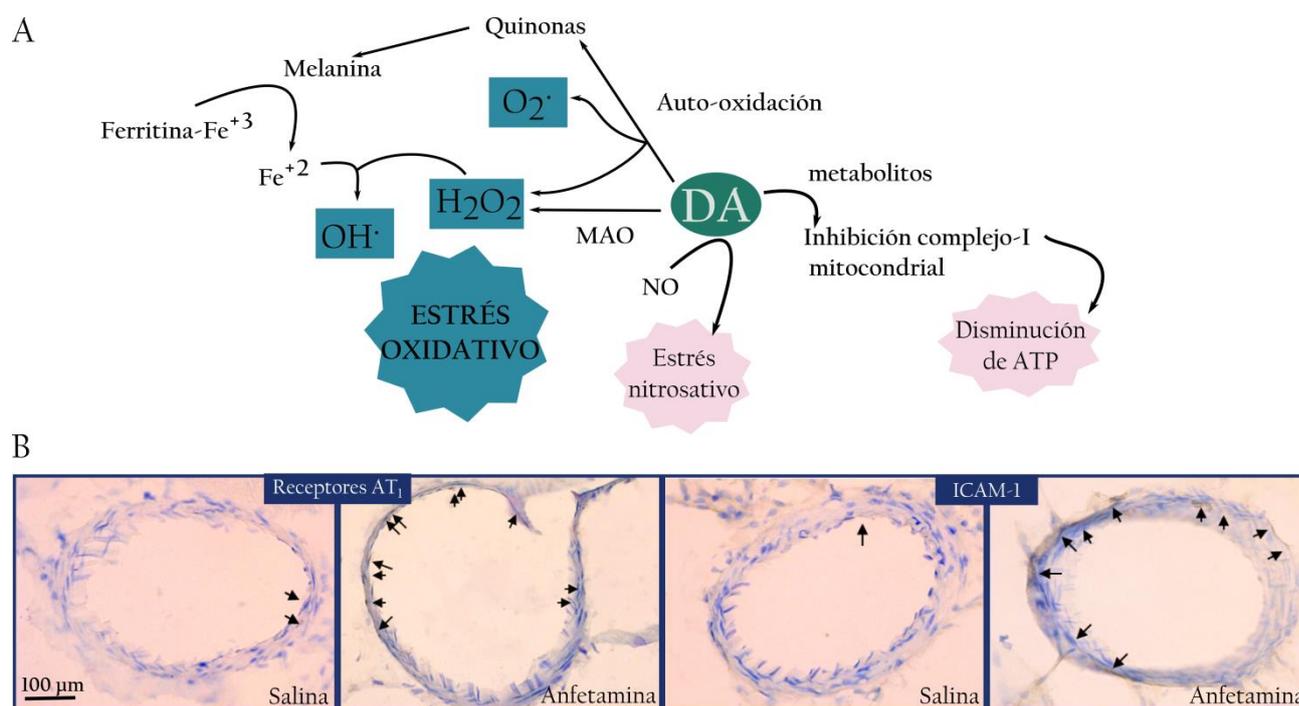


**Figura 5. Mecanismo de acción de anfetamina.** Esquema representativo de los sitios de actividad de anfetamina (recaptador, vesícula y MAO) promoviendo aumento en la neurotransmisión dopaminérgica.

Los efectos tóxicos de dopamina son consecuencia del estrés oxidativo en el microambiente en el que se libera, debido a su elevada tasa de oxidación. La metabolización intracelular, por actividad de la MAO, y su auto-oxidación producen peróxido de hidrógeno y anión superóxido, que reaccionan posteriormente con iones metálicos y NO generando radicales hidroxilo y peroxinitrito. Este aumento en los niveles de ROS promueve el daño local cuando los mecanismos anti-oxidantes no son suficientes, o cuando su liberación es exacerbada; por lo que la dopamina es considerada como una neurotoxina (**Figura 6**) (Cunha-Oliveira *et al.*, 2008; Yamamoto *et al.*, 2010; Yamamoto *et al.*, 2008b). Este desbalance promueve un escenario de neuroinflamación, que involucra la alteración vascular, glial y neuronal; al mismo tiempo que compromete la actividad metabólica de la unidad neurovascular, similar a lo que ocurre en enfermedades neurodegenerativas (Downey *et al.*, 2014; Egleton *et al.*, 2014; O'Callaghan *et al.*, 2008; Yamamoto *et al.*, 2008a).

La estimulación simpática, evocada por anfetamina, activa receptores de monoaminas presentes en células endoteliales de la microvasculatura cerebral, cuyo efecto final dependerá de la región cerebral analizada y el tipo de receptor activado (Egleton *et al.*, 2014). Además, anfetamina y sus derivados pueden ejercer efectos vasoconstrictores, por acción directa sobre receptores de trazas de aminas presentes en el endotelio, independientemente de su acción a nivel simpático (Broadley, 2010). La vasoconstricción sumada a la posible estimulación de la síntesis endotelial de dopamina, sustentan la potencialidad de estas sustancias para ejercer efectos deletéreos a nivel endotelial. En este sentido, se identificaron numerosas secuelas vasculares que incluyen vaso-espasmos, oclusión vascular y vasculitis en consumidores de psicoestimulantes (Buxton *et al.*, 2000; Fredericks *et al.*, 1991). La vasculitis refiere a un estado de inflamación vascular con signos de infiltración de células

inflamatorias, edema intersticial, alteración y daño endotelial, y permeabilidad vascular aumentada. Esta alteración se considera como desencadenante de eventos de hipoxia y hemorragia a nivel local, con pérdida de mielina o degeneración neuronal (Arroyo y *col.*, 2006; Siva, 2001). Asimismo, se ha identificado que las anfetaminas generan condiciones de estrés oxidativo, con aumento de mediadores pro-inflamatorios y HSP a nivel de la vasculatura cerebral (Bowyer y *col.*, 2013; Egleton y *col.*, 2014; Zhang y *col.*, 2009). En estudios preliminares, encontramos aumento de marcadores pro-inflamatorios (R-AT<sub>1</sub> e ICAM-1) a nivel de las arterias cerebrales principales, como consecuencia de la exposición a anfetamina bajo el protocolo experimental seleccionado en el presente trabajo (**Figura 6**). Más aún, la presencia de MAO y de receptores y transportadores monoaminérgicos en astrocitos indican una interacción entre la transmisión dopaminérgica y la actividad astrocitaria (Bowyer y *col.*, 2013; Egleton y *col.*, 2014; Zhang y *col.*, 2009). Funcionalmente, los astrocitos participan en la liberación excesiva de dopamina en condiciones de hipoxia; y se activan por dopamina o metanfetamina liberando ROS (Lau y *col.*, 2000; Oliva y *col.*, 2013; Vaarmann y *col.*, 2010a; Vaarmann y *col.*, 2010b).



**Figura 6. Efectos deletéreos de anfetamina.** **A)** Esquema representativo de las vías oxidativas de dopamina que conducen a aumento del estrés oxidativo. **B)** Imágenes representativas de la inmunomarcación de R-AT<sub>1</sub> e ICAM-1 en arteria cerebral media, una semana después de la exposición repetida a anfetamina, las flechas indican sitios positivos de inmunomarcación.

## **Alteraciones funcionales**

### *Neuroadaptación*

La exposición a anfetamina induce un aumento progresivo y duradero de sus efectos estimulantes y reforzantes; fenómeno conocido como sensibilización o tolerancia inversa (Stewart y *col.*, 1993). El mismo involucra procesos de neuroplasticidad, lo que refiere a una reorganización estructural y funcional del SNC en respuesta a estímulos o experiencias. Estos cambios pueden evidenciarse en el momento o con el paso del tiempo y en el caso de drogas de abuso, como anfetamina, se considera que los cambios plásticos inducidos por el psicoestimulante resultan en un tipo de neuroplasticidad que involucra la actividad dopaminérgica (Kalivas, 2007; Kalivas y *col.*, 2008; Seo y *col.*, 2015). La neuroadaptación que acompaña al fenómeno de sensibilización presenta dos etapas claramente distinguibles: inducción y expresión. La primera requiere la activación de núcleos mesencefálicos generando un cambio en su conectividad, que persiste hasta años después. La segunda etapa revela los cambios neuroquímicos y conductuales ante la exposición a un desafío farmacológico o fisiológico, luego de un período libre de droga. La conectividad dopaminérgica alterada a nivel del circuito mesolímbico es el principal foco de estudio en los cambios neuroadaptativos inducidos por psicoestimulantes y se evidencian a nivel neuroquímico, como una hiper-reactividad dopaminérgica en CPu y NAcc, y conductualmente como un aumento en la actividad locomotora (Kalivas, 2007; Pierce y *col.*, 1997; Robinson y *col.*, 2004; Vanderschuren y *col.*, 2000). Sin embargo, la alteración en la conectividad puede presentarse al mismo tiempo en otras áreas del sistema límbico, que participan en la regulación de procesos cognitivos, y que reciben inervación dopaminérgica (Ahn y *col.*, 2013; Ahn y *col.*, 2014; Ito y *col.*, 2010; Robbins y *col.*, 2008; Wolf y *col.*, 2004).

### *Alteraciones cognitivas- Corteza prefrontal*

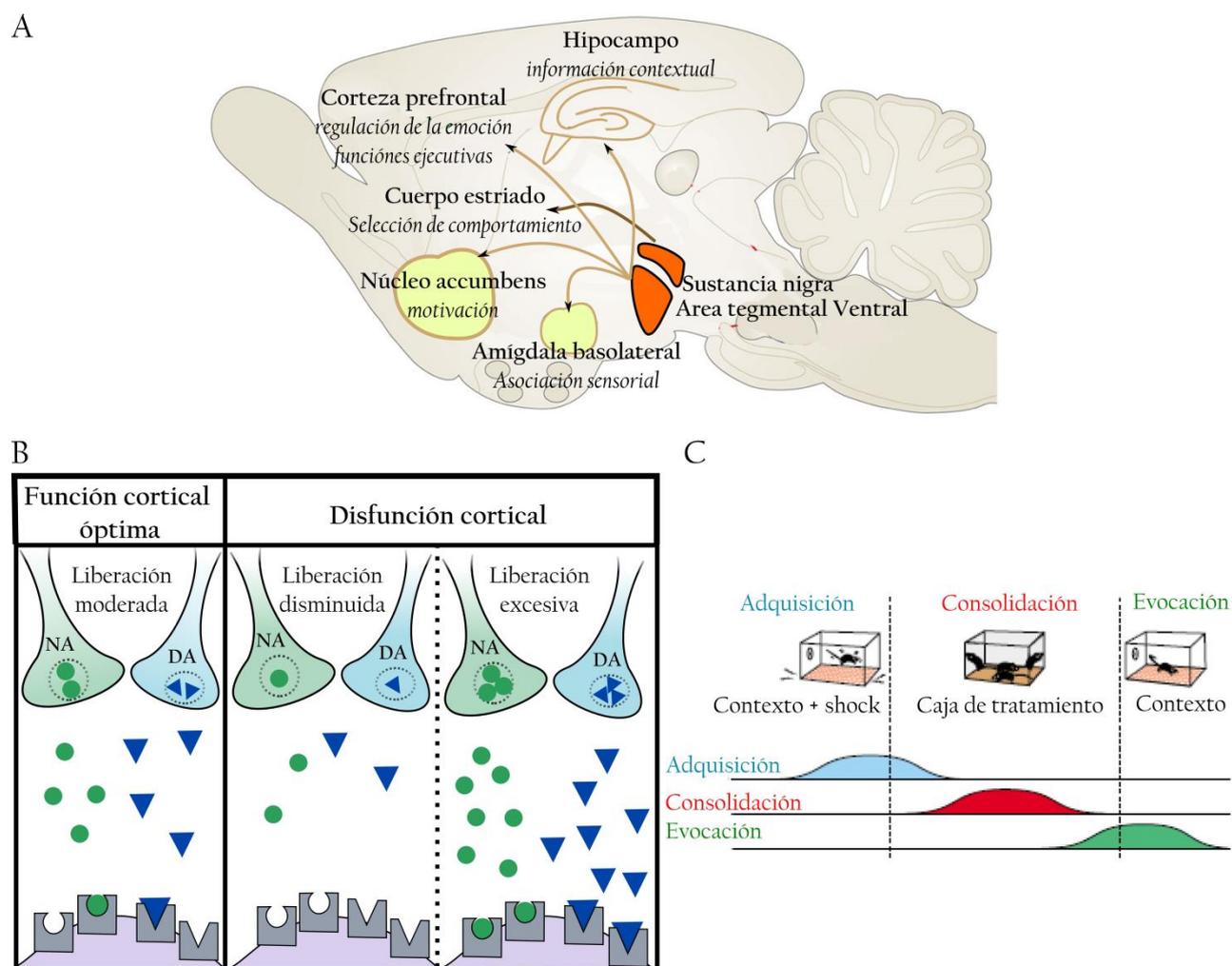
La CPF se considera como el área de asociación de mayor jerarquía en la corteza de mamíferos y está implicada en una plétora de funciones. A lo largo de su eje dorso-ventral se reconocen 4 sub-áreas: área medial pre-central, corteza cingulata anterior, corteza pre-límbica y corteza infra-límbica. La CPF presenta una relación bidireccional con el centro dopaminérgico ATV, dado que recibe inervación dopaminérgica al mismo tiempo que envía proyecciones glutamatérgicas hacia las neuronas que la inervan en ATV. La dopamina liberada en CPF actúa de manera directa sobre células piramidales o indirecta por modulación gabaérgica local (Krugel y *col.*, 2013; Riga y *col.*, 2014). Estas características topológicas sustentan su rol funcional en el desarrollo de sensibilización a psicoestimulantes (Vanderschuren y *col.*, 2000; Wolf, 1998). Los psicoestimulantes modifican la actividad cortical de manera diferencial, según la administración aguda o repetida, el patrón temporal y las condiciones en las que se realice la evaluación (Hedou y *col.*, 2001; Jedema y *col.*,

2014; Lu y col., 1999). Debido a las neuroadaptaciones inducidas por anfetamina, esta droga es utilizada como una herramienta farmacológica para modelar los síntomas positivos y negativos de la esquizofrenia en animales (Featherstone y col., 2007; Peleg-Raibstein y col., 2008; Peleg-Raibstein y col., 2006). Se ha descrito que el psicoestimulante, administrado de manera repetida, promueve la hiper-reactividad meso-límbica y la hipo-actividad cortical. Este patrón de actividad se asemeja al observado en pacientes esquizofrénicos y sustenta la teoría dopaminérgica de la patología (Buchta y col., 2015; Featherstone y col., 2007; Slifstein y col., 2015). La hipo-actividad cortical explicaría el déficit cognitivo característico de la esquizofrenia que, en animales de experimentación, se evidencia como déficit en la memoria de trabajo durante la abstinencia (Featherstone y col., 2007; Peleg-Raibstein y col., 2008; Peleg-Raibstein y col., 2006; Slifstein y col., 2015). La memoria de trabajo es un tipo de procesamiento complejo a nivel cerebral que refiere al almacenamiento temporal de la información, en una escala de segundos a minutos, necesario para la realización de una tarea cognitiva (Cowan, 2008; Riga y col., 2014). La actividad catecolaminérgica cumple un rol preponderante sobre la memoria de trabajo, dado que una actividad moderada de catecolaminas en CPF es necesaria para el funcionamiento óptimo de la misma; mientras que una hipo-función, o un exceso de dopamina y noradrenalina, serían responsables de una disfunción cortical y un déficit en la memoria de trabajo (**Figura 7**) (Arnsten, 1998; Lalonde, 2002; Lapish y col., 2015; Riga y col., 2014). Los tests conductuales de *laberinto en Y de libre elección* y *campo perforado*, que se fundamentan en la actividad exploratoria de roedores, permiten evaluar la memoria de trabajo. El primer test es un paradigma conductual que consta de un laberinto de 3 brazos, donde se cuantifica la exploración como alternaciones espontáneas entre ellos. En condiciones fisiológicas, los animales muestran un porcentaje de alternación que supera las probabilidades de alternación aleatoria o por azar (Lalonde, 2002). Por otro lado, el test de campo perforado consiste en evaluar la exploración de una arena con orificios, considerando el tiempo y la frecuencia de visitas a cada uno de ellos. Este paradigma conductual depende de la integridad de la actividad de CPF y es sensible a disfunciones cognitivas, tales como las alteraciones tempranas observadas en modelos animales de demencia, así como también pone de manifiesto síntomas de tipo maníaco (Baiardi y col., 2007; Marinzalda, 2015; Souza y col., 2016).

#### *Alteraciones cognitivas- Hipocampo y amígdala basolateral*

Existen numerosas evidencias que indican que las sustancias liberadoras de catecolaminas tienen efectos moduladores sobre procesos de memoria y aprendizaje (Blaiss y col., 2007; Cabib y col., 1997; Hall y col., 2011; Haycock y col., 1977; Kovacs y col., 1978; Lee y col., 1995a; Murnane y col., 2012; Seliger, 1975, 1977; Simon y col., 2006). Al mismo tiempo, se reconoce que el estado emocional y de vigilia influye sobre el aprendizaje, de modo que estados emocionales moderados

tienen efectos reforzantes, mientras que en niveles elevados presentan efectos deletéreos (Izquierdo y *col.*, 1997). Estos dos cuerpos de evidencias convergen en el rol de catecolaminas en la vigilia y el control de las emociones; así como también en la presencia de sus receptores en áreas involucradas en el procesamiento de memorias a largo plazo con valencia emocional, como CPF, hipocampo (HPC) y amígdala basolateral (ABL) (**Figura 7**) (Izquierdo y *col.*, 2006; Maren y *col.*, 2013; Nieh y *col.*, 2013; Pezze y *col.*, 2004; Stevenson, 2011).



**Figura 7. Regulación dopaminérgica en áreas involucradas en tareas cognitivas.** A) Esquema representativo de la regulación de la función cortical de acuerdo a la actividad catecolaminérgica. B) Esquema representativo de la inervación dopaminérgica en estructuras límbicas y su principal función en estas áreas. C) Etapas de la generación de una memoria a largo plazo (panel superior) y representación de la duración y el momento del efecto con intervención farmacológica en las distintas etapas (panel inferior), modificado de Abel y *col.* (2001).

Las memorias asociativas a largo plazo conforman el vasto cuerpo de conocimientos almacenados a lo largo de la vida (Cowan, 2008). La formación de este tipo de memoria requiere del procesamiento secuencial de la información en tres etapas: adquisición, consolidación y evocación. En la primera, se establece una asociación lábil entre dos estímulos, uno condicionado y

uno incondicionado; que posteriormente es integrada por los circuitos de memoria, durante la consolidación, para alcanzar un estado firme (traza de memoria). Finalmente, la evocación ocurre ante la re-exposición al estímulo incondicionado, que evidencia la formación de una traza de memoria a través de una respuesta conductual asociada al estímulo condicionado (**Figura 7**) (Abel y col., 2001; Dudai, 2002, 2004).

La consolidación inicia inmediatamente realizada la asociación y comprende un período posterior de 6hs, durante el cual la información original puede ser modificada (Dudai, 2002, 2004). A lo largo de la consolidación, esta nueva traza en formación debe ser asimilada e integrada a aquellas memorias consolidadas previamente (Moscovitch y col., 2005). La nueva memoria queda codificada como un patrón específico de actividad sincronizada, espacial y temporalmente, en una red neuronal (Bruel-Jungerman y col., 2007; Dudai, 2002). De este modo, la memoria a largo plazo es el resultado de un cambio plástico producto de la experiencia. La hipótesis de *plasticidad sináptica*, propuesta por Donald Hebb a mediados del siglo pasado, estableció que estos cambios reflejan una mejora en la eficacia sináptica producto de la activación reverberante de una red neuronal (Carasatorre y col., 2013; Hebb, 2005). Actualmente se considera que la plasticidad sináptica dependiente de la actividad es el principal mecanismo para la formación de ensamblados neuronales y, por lo tanto, para la consolidación de una memoria (Bruel-Jungerman y col., 2007; Carasatorre y col., 2013; Dudai, 2002). Los mecanismos moleculares que sustentan estos cambios involucran actividad de quinasas y genes de transcripción temprana, re-estructuración de conexiones sinápticas y modificaciones epigenéticas y funcionales (Barco y col., 2006; Frey y col., 1997; Guan y col., 2002; Hsieh y col., 2005; Kida y col., 2002). La potenciación a largo plazo (LTP) es el fenómeno que define los cambios en la actividad eléctrica neuronal y, a nivel hipocampal, subyace a la formación de una memoria a largo plazo. En este caso, el principal neurotransmisor involucrado es el glutamato, que tras ser liberado, activa secuencialmente receptores AMPA y NMDA. Estos últimos aumentan de manera notoria las concentraciones intracelulares de  $Ca^{+2}$  que, vía la quinasa CaMKII y adenilato ciclasa, refuerzan las conexiones sinápticas. Esto ocurre por un aumento en la liberación del neurotransmisor desde el terminal pre-sináptico y en la expresión de receptores AMPA de membrana, así como también por modificación de las propiedades estructurales de estos canales iónicos (Barco y col., 2006; Carasatorre y col., 2013; Izquierdo y col., 2006).

En memorias a largo plazo con valencia emocional, la actividad dopaminérgica juega un rol preponderante. De este modo, la estimulación de receptores dopaminérgicos guía de manera directa, o en paralelo, la ocurrencia de cambios *hebbianos* en HPC, ABL y CPF, contribuyendo a los distintos fenómenos moleculares que tienen lugar durante el procesamiento de memorias con componentes emocionales y afectivos (Abraham y col., 2014; Lisman y col., 2011; Nieh y col.,

2013; Paz y col., 2013b; Pezze y col., 2004; Srinivasan, 2009). En concordancia, la exposición aguda o repetida a anfetamina altera la conectividad de estas áreas. Esta alteración funcional tiene dos efectos en paralelo; uno es el aprendizaje que acompaña el desarrollo de sensibilización y el otro implica la modificación de procesos de memoria y aprendizaje independientes de la droga (Hall y col., 2011; Lodge y col., 2006, 2008). Si bien el rol de dopamina es claro cuando se analiza su participación en memorias de recompensa, su rol esta menos definido en relación a memorias con valencia negativa (Abraham y col., 2014; Wise, 2004). Esto explica la multiplicidad de efectos descriptos para psicoestimulantes en el estudio de memorias a largo plazo, en donde las memorias pueden ser potenciadas, o interferidas de acuerdo al tipo de memoria evaluada, el test conductual seleccionado, el protocolo de administración de la droga y el esquema temporal del mismo (Blaiss y col., 2007; Hall y col., 2011; Haycock y col., 1977; Kovacs y col., 1978; Sahgal y col., 1983; Shoblock y col., 2003; Simon y col., 2006).

La prueba de *evitación inhibitoria* es un paradigma experimental clásico para la evaluación bioquímica e intervención farmacológica de memorias a largo plazo. Este test involucra una represión específica de la tendencia natural de los roedores a evitar los lugares iluminados, sin afectar la conducta exploratoria. Los animales asocian el paso de un contexto iluminado hacia un contexto oscuro con un shock eléctrico. De este modo, ante una nueva exposición al contexto iluminado, los animales permanecen en el mismo durante más tiempo a pesar de su preferencia por el compartimiento oscuro (Izquierdo y col., 2006; Izquierdo y col., 1997). El test de evitación inhibitoria involucra una asociación simple y rápida entre los estímulos, por lo que una única exposición es suficiente para la generación de una traza de memoria estable. Tal como se mencionó anteriormente, la consolidación de este tipo de memoria a largo plazo requiere de la actividad coordinada entre HPC y ABL y es modulada por actividad catecolaminérgica (Izquierdo y col., 2006; Izquierdo y col., 1997).



*Hipótesis  
y objetivos*

## **Antecedentes**

Los antecedentes descritos previamente, permiten plantear la existencia de un escenario de acción común para AngII y anfetamina. Los resultados previos del grupo de trabajo permitieron identificar el rol de R-AT<sub>1</sub> en el desarrollo de neuroadaptaciones conductuales y neuroquímicas, características de la sensibilización a psicoestimulantes (Paz y col., 2011; Paz y col., 2013a). Más aún, evidenciamos que la exposición al psicoestimulante promueve cambios en la expresión de componentes del SRA en el sistema límbico, y además modifica la funcionalidad de R-AT<sub>1</sub> en áreas de control neuroendócrino como el núcleo paraventricular (Casarsa y col., 2015; Paz y col., 2014).

Los psicoestimulantes tienen efectos deletéreos sobre la actividad neuronal, vascular y astrocitaria a dosis elevadas. Sin embargo, algunos autores sugieren que la exposición repetida a dosis intermedias permite identificar patrones selectivos de toxicidad cerebral (Ellison y col., 1993). En este sentido, se reconoce que las alteraciones que ocurren por exposición a drogas de abuso involucran cambios en los componentes de la unidad neurovascular (Egleton y col., 2014).

Dado que AngII, vía R-AT<sub>1</sub>, media respuestas neuroadaptativas e inflamatorias en los distintos componentes de la unidad neurovascular; nuestros experimentos están focalizados en extender el rol de estos receptores a alteraciones en áreas de inervación dopaminérgica involucradas en tareas cognitivas (CPF, HPC y ABL), producidas por exposición repetida a dosis intermedias de anfetamina. Para ello evaluamos cambios en los distintos componentes de la unidad neurovascular, considerando que la interacción de éstos es esencial para la correcta funcionalidad cerebral. Se utilizó un esquema experimental de exposición repetida a anfetamina, el cual induce sensibilización conductual, donde se evaluaron los cambios estructurales y funcionales a largo plazo, en condiciones basales o luego de la exposición a un desafío. Se seleccionaron dos modalidades para los desafíos, uno farmacológico (anfetamina en dosis baja) y otro fisiológico (exposición a frío). La re-exposición al psicoestimulante, estrés u otras drogas de abuso es una metodología clásica para poner de manifiesto las respuestas neuroadaptativas. El protocolo de exposición a frío utilizado permite evaluar la respuesta a un estímulo en donde predomina la estimulación simpática y el aumento de AngII circulante (Yang y col., 1993; Zavala y col., 2007; Zhang y col., 2014).

## **Hipótesis**

*Angiotensina II cerebral, a través de sus receptores AT<sub>1</sub>, participa en las alteraciones neuroadaptativas y cerebrovasculares inducidas por anfetamina.*

**Objetivo general**

Evaluar la participación de angiotensina II cerebral, a través de sus receptores AT<sub>1</sub>, en cambios plásticos y cerebrovasculares inducidos por exposición repetida a anfetamina, que involucran alteraciones cognitivas.

**Objetivos específicos**

**Objetivo 1:** Evaluar la participación de R-AT<sub>1</sub> en las secuelas inflamatorias sobre el sistema vascular periférico-central por exposición a anfetamina.

**Objetivo 1a.**

- Evaluar la participación de receptores AT<sub>1</sub> en los cambios estructurales inducidos por anfetamina sobre la arteria carótida.

**Objetivo 1b.**

- Identificar los cambios inducidos por anfetamina en la expresión de marcadores inflamatorios (R-AT<sub>1</sub> y HSP70) en la microvasculatura cerebral.
- Evaluar la participación de receptores AT<sub>1</sub> en el desarrollo de estos cambios.

**Objetivo 2:** Evaluar la participación de R-AT<sub>1</sub> en alteraciones estructurales y funcionales inducidas por anfetamina a nivel de la corteza prefrontal.

**Objetivo 2a.**

- Identificar las alteraciones en la red vascular inducidas por anfetamina en corteza prefrontal.
- Evaluar la participación de receptores AT<sub>1</sub> en el desarrollo de estos cambios.

**Objetivo 2b.**

- Evaluar la participación de receptores AT<sub>1</sub> en la reactividad astrocitaria inducida por anfetamina en corteza prefrontal.

**Objetivo 2c.**

- Evaluar la participación de receptores AT<sub>1</sub> en alteraciones de la memoria de trabajo inducidas por anfetamina.

**Objetivo 3:** Evaluar la participación de R-AT<sub>1</sub> en alteraciones estructurales y funcionales inducidas por anfetamina en amígdala e hipocampo.

**Objetivo 3a.**

- Identificar las alteraciones en la red vascular inducidas por anfetamina en amígdala basolateral e hipocampo.
- Evaluar la participación de receptores AT<sub>1</sub> en el desarrollo de estos cambios.

**Objetivo 3b.**

- Evaluar la participación de receptores AT<sub>1</sub> en la reactividad astrocitaria inducida por anfetamina en amígdala basolateral e hipocampo.

**Objetivo 3c:**

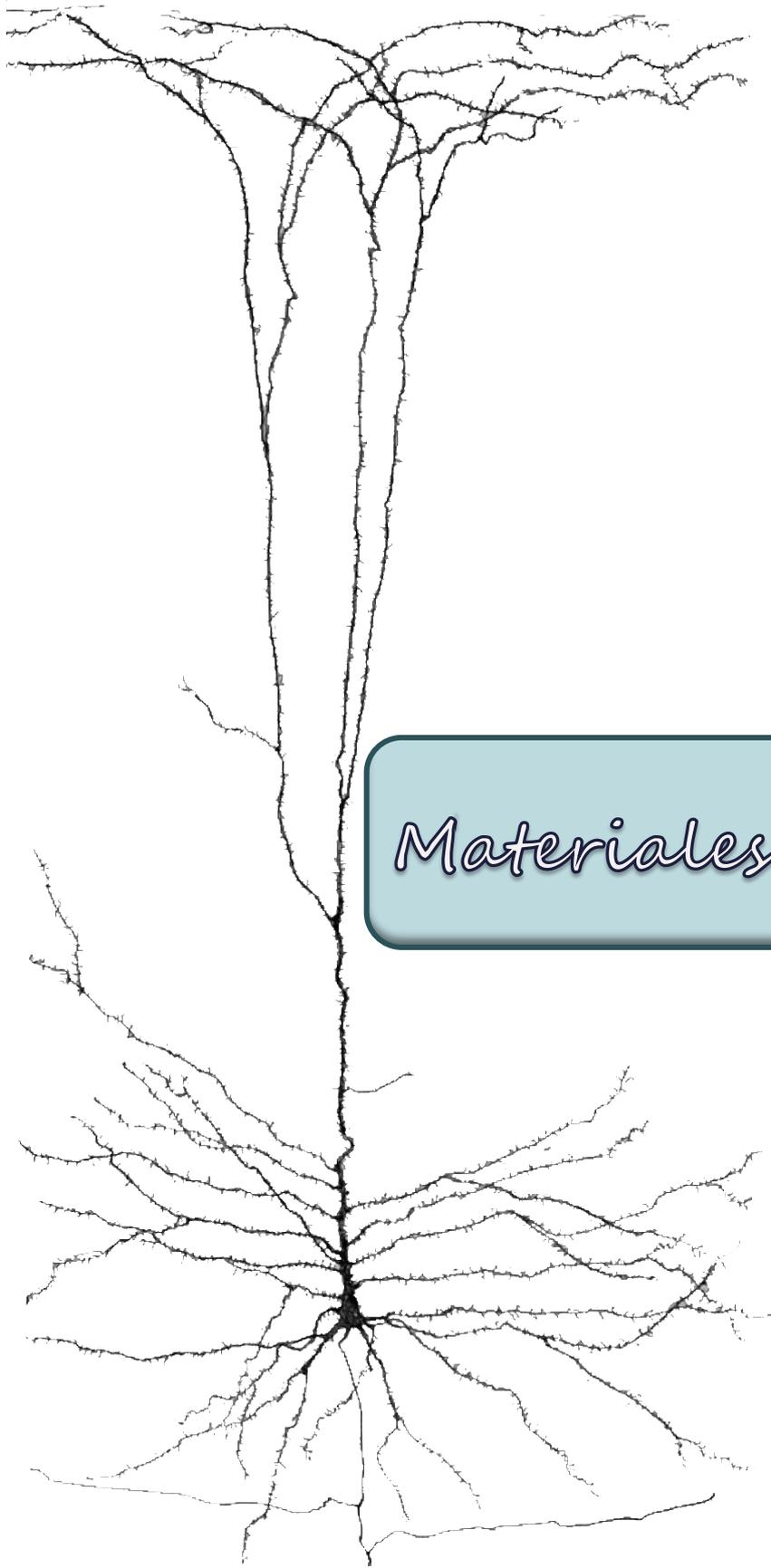
- Evaluar la neuroadaptación inducida por anfetamina a nivel de la plasticidad hipocampal y la participación de receptores AT<sub>1</sub> en este evento.

**Objetivo 3d.**

- Identificar el protocolo de condicionamiento apropiado para evaluar memoria a largo plazo con un test de evitación inhibitoria
- Evaluar los efectos agudos de un desafío farmacológico en la tarea de evitación inhibitoria y la participación de receptores AT<sub>1</sub> en estos eventos.
- Comparar los efectos agudos sobre la tarea de evitación inhibitoria observados con un desafío farmacológico y fisiológico.

**Objetivo 3e:**

- Evaluar la neuroadaptación inducida por anfetamina en la memoria a largo plazo y la participación de receptores AT<sub>1</sub> en estos eventos.



*Materiales y métodos*

## Animales

Los experimentos se realizaron con ratas macho de la cepa Wistar de 250-280g (60 días), criadas en el bioterio del departamento de Farmacología (FCQ, UNC). En todos los casos, una semana antes del inicio del protocolo, los animales fueron asignados al azar a los distintos grupos experimentales y se mantuvieron agrupados en un máximo de cuatro por caja con libre acceso a comida y agua.

Los animales fueron mantenidos en condiciones estándar de laboratorio con temperatura controlada (21-23°C), bajo un ciclo de luz-oscuridad de 12 hs, siendo las 7:00 hs el inicio del horario de luz.

Todos los experimentos fueron realizados según la reglamentación establecida por el Comité de Cuidado y Uso de Animales de la Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina; basada en la Guía para el Cuidado y el Uso de Animales del Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos (NIH) y aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Ciencias químicas Res. N° 46/2015.

## Drogas

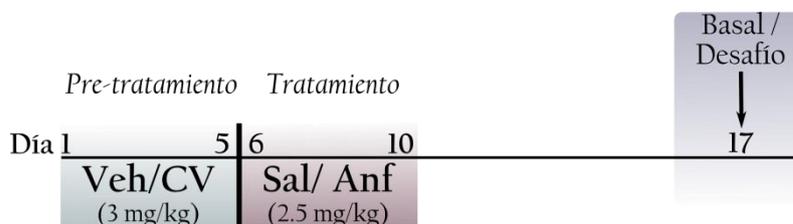
Sulfato de d-anfetamina (Sigma Chemical Co.) disuelto en solución fisiológica (cloruro de sodio 0,9%).

Candesartán cilexetilo (Laboratorios Phoenix) disuelto en una solución de bicarbonato de sodio 0,1N (Vehículo).

Losartan (Sigma-Aldrich) disuelto en solución fisiológica (cloruro de sodio 0,9%).

## Protocolo experimental

Con el objetivo de evaluar la participación de los receptores AT<sub>1</sub> de AngII en el desarrollo de respuestas neuroadaptativas inducidas por anfetamina los animales fueron expuestos al psicoestimulante siguiendo un protocolo experimental de sensibilización conductual modificado. Tal como se muestra en el **esquema 1**, los animales recibieron diariamente Candesartan/ Vehículo (CV 3mg/kg /Veh, vía intragástrica) durante 5 días (día1-5), seguido por 5 días (día 6-10) de inyección diaria de anfetamina/Salina (Anf 2,5mg/kg/ Sal, vía intraperitoneal -i.p.-). Las evaluaciones se realizaron una semana después de la última administración de Anf (día 17), siendo éste un período libre de droga y sin perturbaciones. De acuerdo al objetivo, los estudios se realizaron en condiciones basales (cloruro de sodio 0,9% i.p.; Basal), luego de la exposición a un desafío farmacológico (anfetamina 0,5mg/kg, i.p.; Des. Anfetamina) o fisiológico (4 hs a 4°C; Des. Frío).



**Esquema 1.** Esquema general del protocolo utilizado para evaluar la participación de receptores AT<sub>1</sub> en los cambios a largo plazo inducidos por anfetamina.

*Bloqueo de receptores AT<sub>1</sub>*

La administración de CV propuesta para este trabajo tiene efectos centrales, observado como la disminución de la actividad eléctrica espontánea de neuronas noradrenérgicas en LC, sin afectar el número de células activas (Marchese y col., 2017). Además, este esquema previene el desarrollo de sensibilización conductual y neuroquímica inducida por una única administración de Anf, sin embargo, no impide el efecto agudo del psicoestimulante administrado 24 hs después (Paz y col., 2011; Paz y col., 2013a).

*Sensibilización a Anfetamina/Desafío anfetamina*

El protocolo de administración de Anf seleccionado para este trabajo está validado dentro de los múltiples esquemas descritos para el desarrollo de sensibilización al psicoestimulante. Esta administración intermitente de dosis bajas-moderadas permite poner de manifiesto, con una dosis desafío, la hiper-actividad locomotora y la hiper-funcionalidad dopaminérgica en CPU luego de un período libre de drogas mayor a 3 días (Nordquist y col., 2008; Vanderschuren y col., 1999; Vanderschuren y col., 2002).

*Exposición a frío/Desafío frío*

El protocolo fue seleccionado de la literatura y consistió en el alojamiento de los animales en un cámara fría a 4°C e iluminada durante 4hs (Cassis y col., 1998). Se ha comprobado que este procedimiento induce un aumento en la concentración de AngII plasmática de hasta 10 veces el valor normal durante 24hs. Durante la exposición a frío los animales estuvieron separados físicamente de su compañero de caja por una pared transparente; de esta manera no hubo aislamiento social pero tampoco contacto físico.

**Toma de muestras***Diseción de la carótida*

Los animales fueron anestesiados con hidrato de cloral (400mg/kg; i.p.) y, una vez anestesiados, se removió la piel a la altura del cuello para poder identificar y aislar las carótidas. Una vez realizada la identificación con hilo de sutura, se procedió a la apertura de la cavidad torácica y a la obstrucción del flujo sanguíneo a través de la aorta descendente, para realizar una perfusión intracardiaca con solución de lavado de cloruro de sodio 0.9% con heparina 500U/l (30ml). Las carótidas identificadas fueron removidas e inmediatamente colocadas una mezcla fijadora denominada Líquido de Karnovsky, el cual se compone de formaldehído y glutaraldehído. Posteriormente se conservaron a 4°C hasta su procesamiento para la obtención de cortes semi-finos.

*Perfusión*

Los animales fueron anestesiados con hidrato de cloral (400mg/kg; i.p.) y preparados para perfusión intracardiaca. Una vez anestesiados, se expuso la cavidad torácica de los animales y se obstruyó el flujo sanguíneo a través de la aorta descendente. Se perfundió inicialmente con una solución de lavado de cloruro de sodio 0,9% con heparina 500 U/l (250 ml), seguido por una solución fijadora de paraformaldehído al 4% en buffer fosfato 0,1M (BF; pH 7,4; 350ml).

Una vez finalizada la perfusión se extrajeron los cerebros y fueron post-fijados durante la noche con la misma solución fijadora. Al día siguiente los cerebros fueron colocados en una solución crioprotectora de sucrosa al 30% en BF 0,1M y mantenidos a 4°C hasta realizarse el procedimiento inmunohistoquímico, momento en el cual fueron retirados de la sucrosa y congelados rápidamente con spray congelante (Biopack).

*Congelación inmediata*

Los animales fueron sacrificados por decapitación. Se extrajeron los cerebros y se congelaron inmediatamente con spray congelante. Las muestras fueron conservadas a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

*Aislamiento de microvasos cerebrales*

La técnica de aislamiento de microvasos cerebrales fue realizada con modificaciones del protocolo establecido por Yamakawa y col (Yamakawa y col., 2003). Los animales fueron anestesiados con hidrato de cloral (400mg/kg; i.p.) y preparados para perfusión intracardíaca. Una vez anestesiados, se expuso la cavidad torácica, se obstruyó el flujo sanguíneo a través de la aorta descendente y se perfundió con una solución de lavado de cloruro de sodio 0,9% con heparina 500U/l (30ml). A continuación, se extrajeron los cerebros y se cortaron con tijera en buffer sucrosa frío (BS), se homogenizaron y cada muestra fue trasvasada a 3 tubos de Khan (volumen final por tubo 3ml). Posteriormente, los homogenatos fueron sometidos a centrifugación diferencial en gradientes de sucrosa a  $4^{\circ}\text{C}$ . Para ello se utilizaron 2 centrifugas, una Allegra<sup>TM</sup> GR Centrifuge (BECKMAN COULTER, para centrifugaciones de 1000g) y una centrifuga 1K15 (SIGMA Laborzentrifugen, para el resto de las centrifugaciones). En primer lugar, las muestras fueron centrifugadas 2 veces a 1000g (10min), entre ellas el pellet fue re-suspendido en 2ml BS y en ambos casos se descartó el sobrenadante. Al finalizar la segunda centrifugación los sedimentos fueron reunidos en un mismo tubo Khan re-suspendidos en 2,5ml de BS y trasvasados a 3 tubos en un volumen final de 1,2ml. A continuación se realizaron 3 centrifugaciones a 100g (1min) y en cada una de ellas se reservó el sobrenadante y se re-suspendieron los pellet en 1 ml BS. Los sobrenadantes reservados fueron luego trasvasados a 6 tubos con un volumen final de 1,2ml y se centrifugaron a 200g (3min). Luego de descartar el sobrenadante, los pellet fueron reunidos en un mismo tubo Khan re-suspendidos en 3ml de BS y trasvasados a 3 tubos en un volumen final de 1,2ml. Las muestras se centrifugaron nuevamente a 200g (2min) y se descartó el sobrenadante. Los pellet fueron reunidos en un mismo tubo Khan, re-suspendidos en 2,5 ml de buffer fosfato-salina con 1mg/mL de albúmina de suero bovino (BFS-ASB) frío, y trasvasados a 2 tubos en un volumen final de 1,2ml. Posteriormente se centrifugó a 200g (3min); se descartó el sobrenadante, se reunieron los pellet en un mismo tubo y se re-suspendieron en 1 ml BFS-ASB. Finalmente se realizó la última centrifugación a 14000g (10min) para descartar sobrenadante y conservar el pellet (microvasos aislados) que fue mantenido a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

En cada aislamiento realizado, se tomó una muestra del sedimento final para realizar, bajo lupa microscópica, la identificación morfológica de los microvasos aislados (tinción con Azul de Toluidina 0,25% (en tampón ácido acético/acetato) por 10s (**Figura 8**).

**Obtención de cortes semi-finos**

Se eliminó todo el líquido fijador, lavando la muestra con agua bidestilada (miliQ) para realizar una segunda fijación con una solución de partes iguales de Tetróxido de Osmio al 1% y Buffer Cacodilato 0,1M. A continuación se extrajo toda el agua tisular para el ingreso de la resina epóxica: en un primer paso se realizó el lavado abundante de la muestra con agua miliQ y posteriormente la deshidratación se llevó a cabo con una graduación creciente de acetonas (50%, 70%, 90% y 100%). Una vez deshidratada la muestra, la resina se incorporó paulatinamente en tres etapas, previas a la inclusión final. La primera fue una mezcla en partes iguales de resina: acetona, le siguió una proporción 3:1 y finalmente la resina pura. La última etapa consistió en la inclusión de la muestra en un molde de silicona con resina pura recién preparada que se llevó a la estufa, a  $60^{\circ}\text{C}$ , por 48hs. Finalmente se obtuvieron cortes semi-finos a partir del tallado del taco y posterior corte con

ultramicrotomo con cuchilla de vidrio. Lo cortes se suspendieron en una gota de agua sobre un porta objetos y se secaron sobre una platina a 200°C y finalmente se colorearon con Azul de Toluidina por 20s. Luego de lavar y secar el vidrio, los cortes fueron almacenados hasta ser observados al microscopio óptico.

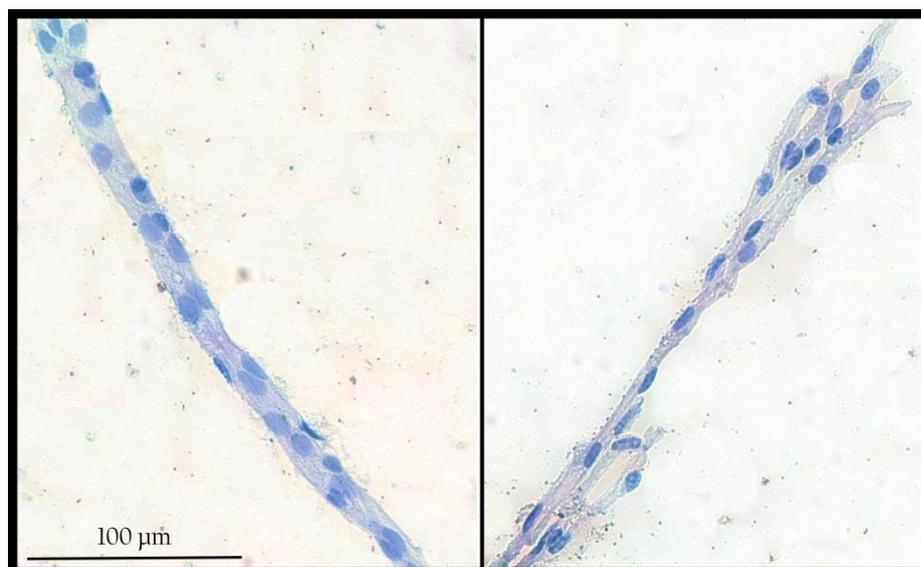
### Inmunohistoquímica

#### *Procedimiento general de inmunomarcación*

El día del experimento los cerebros fueron adheridos a un soporte con medio para congelamiento tisular (Biopack). Luego de 20min a -20°C se obtuvieron cortes seriados coronales de la muestra utilizando un Crióstato Leica CM1510S. Los cortes de tejido fijado fueron incubados con una solución de metanol 10% y peróxido de hidrógeno 10% (30Vol) en agua destilada (2hs), lo cual permite el agotamiento de la actividad de peroxidasa endógena. Luego de enjuagar por tres intervalos de 5min con buffer 0,01M se realizó el bloqueo de las uniones inespecíficas con suero al 10% en buffer 0,1M (2hs). Posteriormente se realizó la incubación durante la noche con el anticuerpo primario correspondiente en una solución que contiene 2% de suero y 0,3% de Tritón X-100 (Flucka Analytical) en buffer 0,1M. La señal fue amplificada al día siguiente, luego de tres lavados con buffer 0,01M, mediante la incubación con el anticuerpo secundario biotinilado correspondiente en una solución con 2% de suero en buffer 0,1M (2hs). Finalmente los cortes fueron lavados con buffer 0,01M (3 lavados de 5min) y se incubaron con el complejo Avidina-Biotina-Peroxidasa (Vector Laboratories Inc.) en buffer 0,1M con 2% suero, el cual permite una nueva amplificación de la señal y lleva la enzima que participa en la reacción de revelado.

La señal (marca) fue revelada utilizando peróxido de hidrógeno como sustrato de la enzima y Diaminobenzidina (Sigma Chemical Co.) como cromógeno. Este fue modificado por una reacción intensificadora con solución de cloruro de cobalto 1% y de sulfato de níquel 1%, que se agregaron al medio de revelado. De este modo el producto final es una marca de color violeta oscuro.

Una vez finalizada la marcación se realizaron 3 lavados de 10min con buffer 0,01M y las secciones montadas en portaobjetos gelatinizados (5g/l) se dejaron secar a temperatura ambiente. Finalmente fueron aclaradas con xilol, cubiertas con medio de montaje DPX (Flucka Analytical) y un cubre objetos para su posterior visualización.



**Figura 8.** Microfotografía (400x) representativa de la morfología de microvasos aislados teñidos con Azul de Toluidina.

*Inmunomarcación de Factor de von Willebrand*

Se obtuvieron muestras por congelación inmediata. El día del experimento, luego de 20min a -20°C, los cerebros fueron adheridos al soporte con el medio para congelamiento tisular. Los cortes de 40µm de espesor fueron directamente adheridos a portaobjetos gelatinizados, secados durante la noche y fijados al día siguiente con un solución de metanol durante 15min a -20°C para, luego de realizar 3 lavados de 10min, proceder inmediatamente con el protocolo de inmunohistoquímica. El procedimiento general de inmunomarcación se realizó utilizando: buffer TRIS-salina, suero normal de cabra (NATOCOR), el anticuerpo primario policlonal hecho en conejo anti-Factor de von Willebrand (Dako) en una dilución 1:200, y el anticuerpo secundario biotinilado hecho en cabra anti-conejo (Vector) en una dilución de 1:500.

*Inmunomarcación de Proteína Acídica Fibrilar de Glía*

Se obtuvieron muestras por perfusión y se recogieron cortes de 20µm de espesor en buffer 0,01M y se realizó el procedimiento general de inmunomarcación utilizando: BFS, suero normal de cabra (NATOCOR), el anticuerpo primario monoclonal hecho en ratón anti-GFAP (Sigma-Aldrich) en una dilución 1:1000, y el anticuerpo secundario biotinilado hecho en cabra anti-ratón (Jackson) en una dilución de 1:3000.

*Inmunomarcación de factor de transcripción c-Fos*

Se obtuvieron muestras por perfusión y se recogieron cortes de 40µm de espesor en buffer 0,01M y se realizó el procedimiento general de inmunomarcación utilizando: BF, suero normal de caballo (NATOCOR), el anticuerpo primario hecho en conejo anti-c-Fos (Oncogen Science) en una dilución 1:20000, y el anticuerpo secundario universal biotinilado hecho en burro (Jackson) en una dilución de 1:2000.

**Inmunofluorescencia**

Los microvasos cerebrales aislados sembrados a la lupa en portaobjetos con carga positiva, se dejaron secar en una estufa a 37°C y posteriormente se delimitó la zona de incubación con lápiz impermeable (Dakopen). El procesamiento posterior de las muestras se llevó a cabo en una cámara húmeda. En un primer paso se realizó el bloqueo de las uniones inespecíficas con albumina bovina al 1% en BFS 0,01M (BFS-SAB) durante 1h y luego fueron lavados 2 veces con BFS 0,01M. La incubación con el anticuerpo primario correspondiente en BFS-SAB se realizó durante la noche a 4°C. Al día siguiente se realizaron 2 lavados con BFS-tween 0,05% y uno con BFS 0,01M (5min cada uno) y el resto del protocolo se realizó protegiendo las muestras de la luz. Estas fueron incubadas con el anticuerpo secundario conjugado a un fluorocromo durante 30min y posteriormente se realizaron 2 lavados con BFS-tween 0,05% y uno con BFS 0,01M (5min cada uno). Finalmente se realizó la incubación con Hoechst (dilución 1:3000) durante 7min, se lavó el excedente de la misma manera que en los pasos anteriores y se cubrieron las muestras con cubreobjetos, utilizando glicerol al 90% en BFS como medio de montaje.

*Inmunomarcación de receptores AT<sub>1</sub>*

Los microvasos cerebrales sembrados fueron secados durante 4hs en una estufa a 37°C y posteriormente se realizó el procedimiento descrito para inmunofluorescencia utilizando: el anticuerpo primario monoclonal hecho en ratón anti-R-AT<sub>1</sub> (donación del Dr. Hans Imboden) en una dilución 1:100 y el anticuerpo secundario policlonal de cabra anti-ratón (Alexa Fluor 555 - abcam), en una dilución 1:400.

*Inmunomarcación de proteína de estrés celular*

Los microvasos cerebrales sembrados fueron secados durante 30 min en estufa y posteriormente fijados con parformaldehído al 4% en BFS 0,01M (7min) y permeabilizados con tritón X-100 al 1% en BFS (10min). Luego de lavar el excedente se realizó el procedimiento descrito para inmunofluorescencia utilizando: el anticuerpo primario monoclonal de ratón anti-HSP70 (Sigma) en una dilución 1:400 y el anticuerpo secundario policlonal de cabra anti-ratón (Alexa Fluor 555 - abcam), diluido 1:400.

**Obtención y análisis de imágenes- Microscopía óptica**

La visualización del tejido se llevó a cabo utilizando un microscopio Leica DM 4000B, el cual tiene acoplado una cámara digital Leica DFC Camera que permitió capturar y almacenar las imágenes en la computadora, que luego fueron procesadas con el programa Image J (versión 1.47, Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos).

En los casos de análisis cuantitativos de cortes cerebrales coronales se obtuvieron cuatro fotografías por muestra (dos láminas de cada área cerebral y ambos hemisferios). El valor final de la variable para cada muestra (y para cada área analizada) se obtuvo del promedio de la cuantificación de las 4 muestras. Teniendo en cuenta que en todos los casos el grosor del corte se mantuvo constante para cada experimento, cualquier error sistemático se considera igual para todos los grupos experimentales. Los valores finales obtenidos dan cuenta de una expresión relativa entre los grupos, pero no son tomados como estimativos de valores absolutos totales. Para asegurar la obtención de resultados objetivos el análisis se realizó a ciego al momento del estudio.

*Análisis estructural de la carótida*

Se obtuvieron imágenes de 3 secciones por muestra de corte semi-fino de carótida a un aumento de 1000x y se midió el espesor (nm) de las tres capas no musculares de la arteria carótida: endotelio, lámina basal y túnica media.

*Análisis de la estructura microvascular*

Se obtuvieron imágenes a un aumento de 200x correspondiente a un área de estudio de 0.38 mm<sup>2</sup>. Los parámetros analizados se basaron en trabajos previos (Beauquis y col., 2010a; Chalothorn y col., 2010; Tata y col., 2002) y fueron: 1) área positiva para factor de von Willebrand (definiendo umbral de grises en 120-140) expresado como porcentaje del área ocupada por la vasculatura; 2) n° de puntos de ramificación (punto de unión de 3 vasos) expresado en relación al área vascular; 3) diámetro vascular (3 mediciones por vaso, de al menos 3 vasos); y 4) el índice de tortuosidad obtenido del cociente entre la distancia más corta entre dos puntos de ramificación (D1) y la distancia real entre ellos (D2), este parámetro adquiere valores de entre 1-infinito y valores más elevados indican mayor tortuosidad (**Figura 9**).

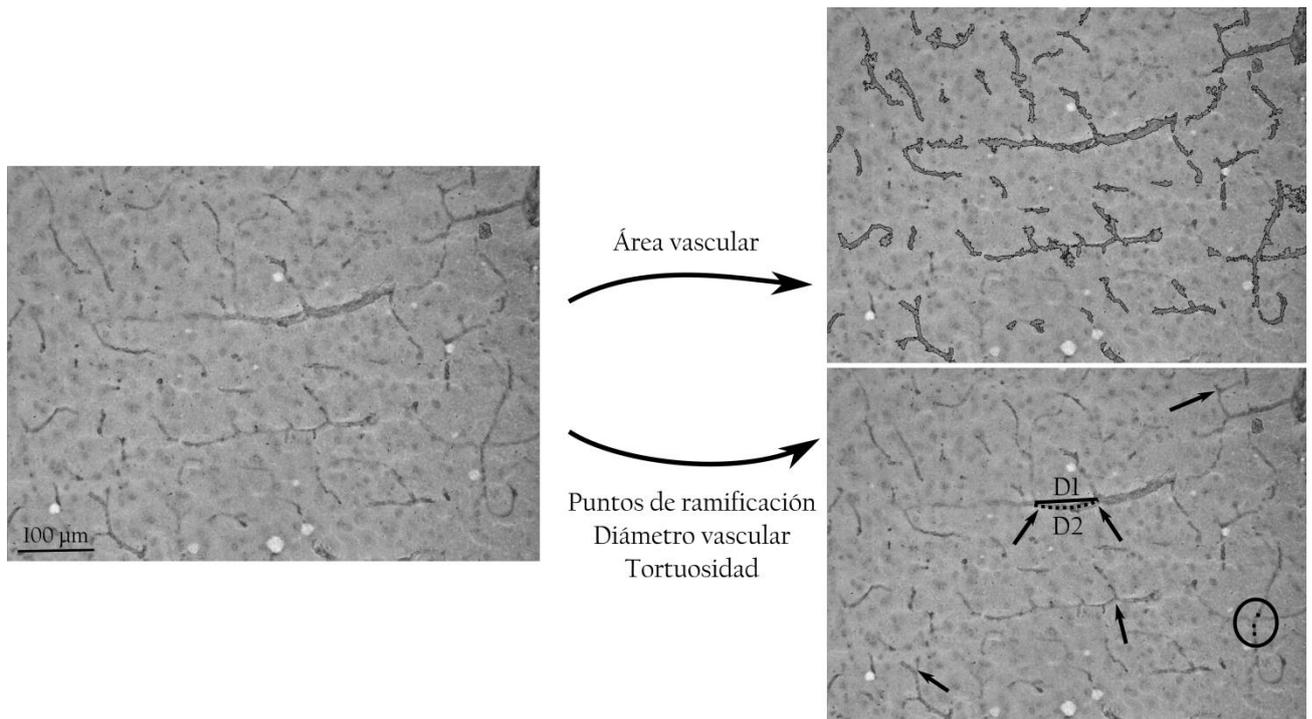
*Análisis de reactividad astrocitaria*

Se obtuvieron imágenes a un aumento de 400x correspondiente a un área de estudio de 0.091 mm<sup>2</sup>. Se cuantificaron el n° de astrocitos inmunopositivos y área inmunopositiva para la proteína ácida fibrilar de glía (área GFAP+), definiendo umbral de grises en 120-140 para el segundo parámetro (**Figura 10**).

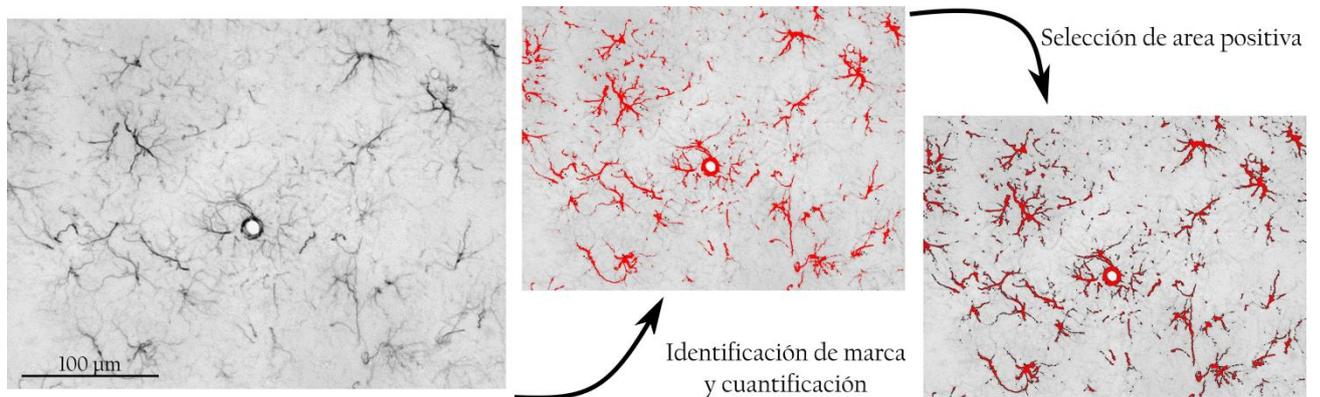
*Análisis de la activación neuronal*

Se obtuvieron imágenes a un aumento de 200x correspondiente a un área de estudio de 0.38 mm<sup>2</sup>. Se cuantificó el n° de neuronas inmunopositivas para el factor de transcripción c-Fos,

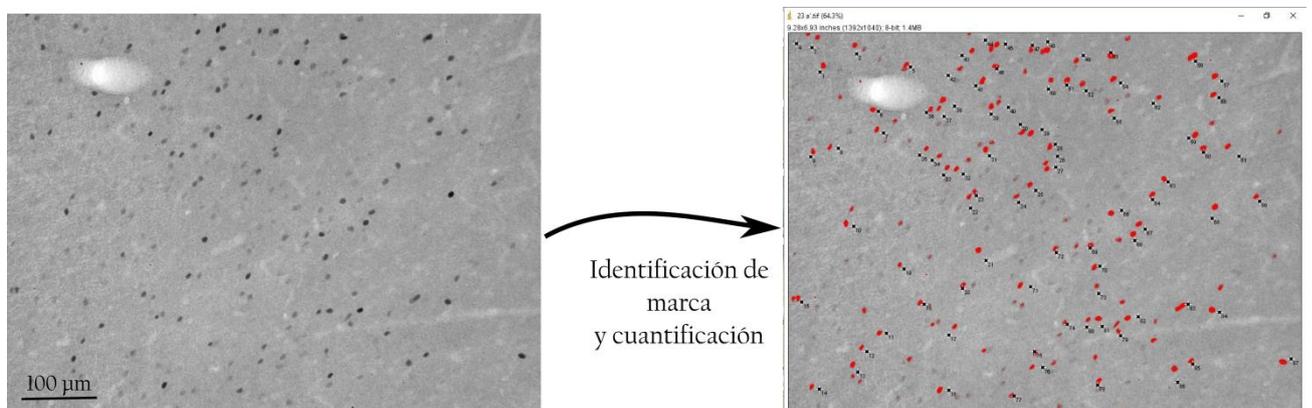
definiendo umbral de grises en 120-140. Las neuronas positivas fueron identificadas por una marcación nuclear intensa de un diámetro aproximado entre 8-12  $\mu\text{m}$  (**Figura 11**).



**Figura 9.** Identificación de los parámetros analizados de la estructura microvascular con la inmunohistoquímica para Factor de von Willebrand.



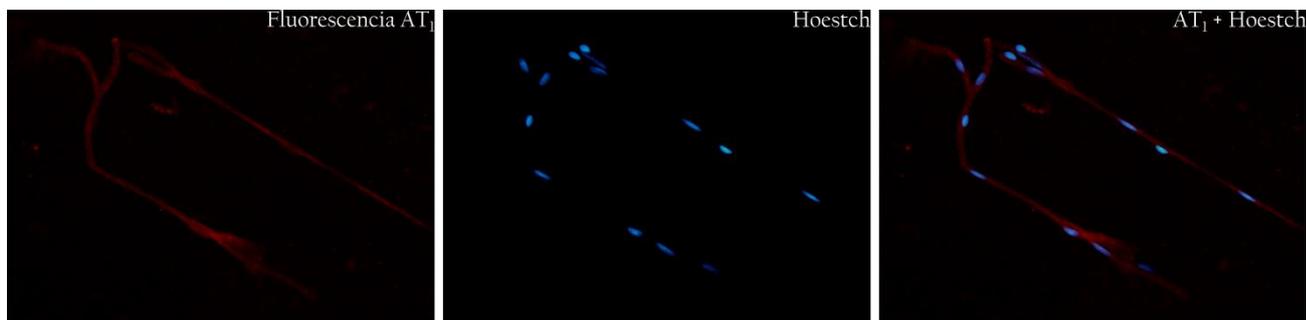
**Figura 10.** Análisis de la reactividad astrocitaria con la inmunohistoquímica para Proteína Acídica Fibrilar de Glía.



**Figura 11.** Análisis de la actividad neuronal por inmunohistoquímica para factor de transcripción c-Fos

### Obtención y análisis de imágenes- Microscopía de fluorescencia

La visualización de los microvasos cerebrales se llevó a cabo a través de un microscopio Leica DM 4000B el cual tiene acoplado una cámara digital Leica DFC Camera que permitió capturar y almacenar las imágenes en la computadora que luego fueron procesadas con el programa Image J (versión 1.47, Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos). Las imágenes fueron obtenidas a un aumento de 400x y se obtuvieron 6 fotos por muestra, en las cuales se analizó un máximo de 5 vasos por fotografía. Las señales fluorescentes resultantes de la inmunomarcación de R-AT<sub>1</sub> y de la HSP70 fueron obtenidas por excitación a 543nm y emisión a 590nm. Se cuantificó la intensidad de la fluorescencia en unidades arbitrarias tomando 3 medidas de intensidad para cada vaso analizado. En todos los casos el valor real de intensidad fue considerado luego de restar la intensidad del fondo (más 3 veces la desviación estándar) y como valor final se tomó un único valor promedio por muestra. Los distintos grupos experimentales fueron procesados al mismo tiempo y al momento de la captura de imágenes se mantuvieron constantes la intensidad de la lámpara (55%), el tiempo de exposición (1s) y los parámetros del histograma obtenido. La marcación nuclear con Hoechst observada por excitación a 388nm y emisión a 425nm permitió corroborar la identificación de señal específicamente en microvasos aislados (**Figura 12**).



**Figura 12.** Inmunofluorescencia de receptores AT<sub>1</sub>.

### Test conductuales- Memoria de trabajo

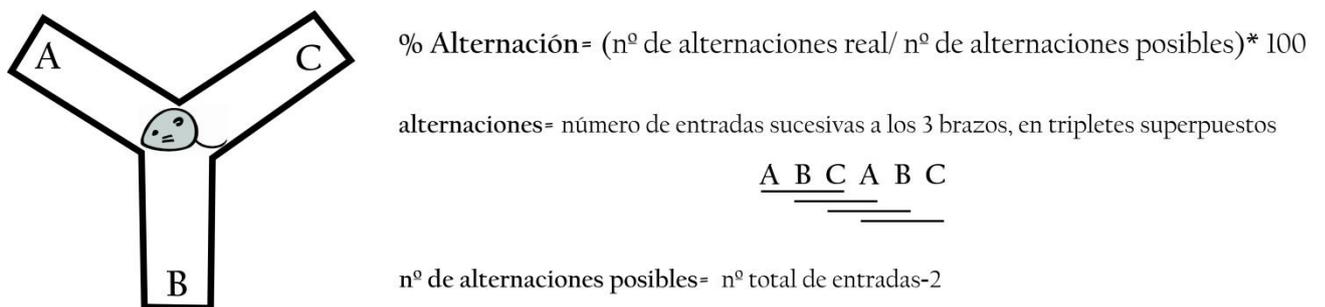
#### *Laberinto en Y*

Los animales fueron expuestos por única vez a un laberinto de 3 brazos cerrados (10cm de ancho x 50cm de largo x 39cm de alto) ubicados en forma de “Y”, tal como se observa en la figura 13. Los brazos fueron nombrados al azar y el test se inicia al colocar el animal al final de uno de ellos. Durante 8min se registró la secuencia de entradas a cada brazo para luego calcular el porcentaje de alternación, la variable analizada. Las alternaciones se definen como el número de entradas sucesivas a los 3 brazos, en tripletes superpuestos y se calcula como el cociente entre el número real y el número posible de alternaciones, multiplicado por 100. El número posible de alternaciones se calcula como el número de entradas totales menos 2 (Fig. 13). Menor porcentaje de alternación es considerado como peor desempeño en el test, por lo tanto indica un déficit en la memoria de trabajo. Los animales que durante el registro presentaron un período de inmovilidad mayor a 2min en cualquiera de los brazos, no fueron considerados para el análisis final.

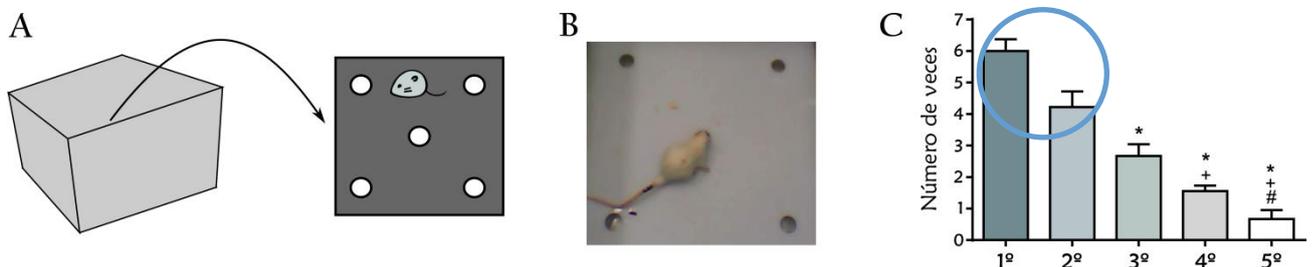
#### *Prueba de campo perforado*

Los animales fueron expuestos por única vez a una arena (60cm de ancho x 60cm de largo x 30cm de alto) que contiene un orificio central y 4 laterales localizados a 10cm del borde, cada uno de ellos de 3cm de diámetro (Fig. 14). Se registró el comportamiento a través de la filmación con

cámara de video en una habitación con iluminación ambiente. Durante 5min de libre exploración se midieron los siguientes parámetros: el número de veces que el animal introdujo la cabeza en cada orificio y el tiempo que olfateó cada orificio, para luego calcular la frecuencia de visitas en cada orificio y el porcentaje de tiempo de exploración (en relación al tiempo de duración del test) respectivamente. Los datos obtenidos fueron ordenados en forma decreciente en exploración de cada orificio para cada animal (Fig. 14C). Teniendo en cuenta que déficit en la memoria de trabajo, producto de una disfunción cortical, se observa como diferencias significativas entre el primer y el segundo orificio más explorado (circulo en figura 14 C- (Baiardi y *col.*, 2007)), se consideró como variable final de análisis las diferencias en la frecuencia y el porcentaje de tiempo entre estos 2 orificios. De este modo, un mayor valor en la diferencia entre los 2 orificios más explorados es indicativo de un déficit en la memoria de trabajo.



**Figura 13. Laberinto en Y.** (A) Esquema del laberinto utilizado para el análisis de memoria de trabajo y los parámetros considerados para obtener valor final de la variable **% de alternación**.



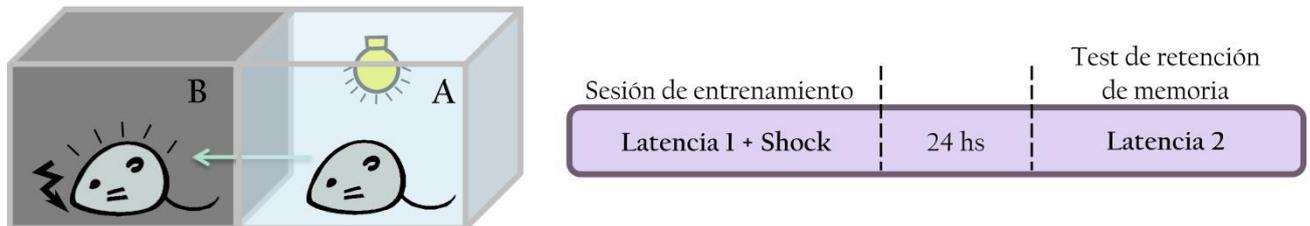
**Figura 14. Prueba de campo perforado.** (A) Esquema y (B) Fotografía de la arena utilizada para el análisis de memoria de trabajo (C) Número de visitas realizadas a cada orificio y ordenados de modo decreciente de exploración para grupo sin tratamiento. El círculo indica los orificios que fueron considerados para el análisis.

## Test conductuales- Memoria a largo plazo

### Prueba de Evitación Inhibitoria

La respuesta de evitación inhibitoria fue analizada utilizando un aparato que consiste en una caja de 60 x 30 x 30cm (largo, ancho, alto) dividida en dos compartimentos contiguos separados por una puerta tipo guillotina de 8 x 5cm. El compartimento A estaba iluminado (25w) y el compartimento B estaba oscuro. El piso consiste en una rejilla metálica que, sólo en el lado B, está conectada a una fuente de electricidad (Fig. 15). Todos los experimentos se realizaron a la misma hora (entre las 9:30-12:30hs) durante dos días consecutivos. El primer día, sesión de entrenamiento, los animales se colocaron en el compartimento A y se registró el tiempo que

demoraron en entrar al compartimiento B (Latencia 1). Una vez allí, se cerró la puerta de guillotina y se les administró 3 shocks eléctricos en las patas de (0,2/0,5mA), de 3s de duración y separados por 30s. Los animales fueron devueltos a su caja y 24hs después se realizó el test de retención de memoria. En el mismo, los animales se colocaron nuevamente en el compartimiento A y se registró el tiempo que tarda en entrar nuevamente en el compartimiento B (**Latencia 2**) (Fig. 15). Esta última variable adquiere valores mayores en caso de una mejor retención de la memoria. Para Latencia 2 se consideró un máximo de 300s, una vez finalizado este tiempo el test se dio por terminado. Los animales con latencia 1 mayor a 60s no fueron tenidos en cuenta para el análisis final.



**Figura 15. Prueba evitación inhibitoria. Izquierda.** Esquema del aparato utilizado para evaluar memoria a largo plazo por el test de evitación inhibitoria (A -compartimiento iluminado-; B -compartimiento oscuro-). **Derecha.** Esquema del protocolo utilizado para la generación y evaluación de una memoria a largo plazo.

## Microinyección cerebral

### Cirugía

Los animales (270-290g) fueron anestesiados con una mezcla de ketamina (Holliday) y xilazina (König) 55/11mg/kg (i.p.), y colocados en un estereotáxico (Stoelting), con la barra dental de los incisivos ubicada a 3,3mm por debajo de la línea interaural. En condiciones asépticas, el cráneo fue expuesto y se implantaron 2 cánulas guía, fijadas al cráneo con cemento acrílico y tornillos de acero inoxidable. Las cánulas guía (aguja de acero inoxidable, 10mm, 22G, Terumo) para microinyecciones se colocaron bilateralmente 2mm por encima del sitio final de inyección. Las coordenadas fueron tomadas del atlas estereotáxico de Paxinos y Watson (Paxinos y *col.*, 2009) y la medición de los mismos fue realizada desde el cráneo y respecto de bregma. Para ventrículos laterales: antero-posterior= -0.9mm; laterales= -1.6 mm; dorso-ventral = -2.0mm. Luego de la cirugía los animales recibieron dos dosis de Norciclina (5000000U.I., i.p. Laboratorios NORT, Buenos Aires, Argentina), separadas por 24hs, y fueron devueltos a sus cajas para su recuperación durante 7 días sin perturbaciones.

### Administración intracerebroventricular

Para la infusión se introdujo un inyector (aguja de acero inoxidable, 11,7mm, 30G, Delta-jet) dentro de las cánulas guía hasta alcanzar el sitio final de inyección. Los inyectores se conectaron vía un catéter de polietileno (P10) a una jeringa (Hamilton) de 10µl conectada a una bomba de infusión (Harvard modelo 22). Se liberó en cada ventrículo un volumen de 0,5µl de Losartan/Salina (LOS 20µg/µl, en un período de 1min. Finalizada la infusión, los inyectores se mantuvieron en el sitio de inyección durante 30s para permitir la liberación completa de la solución. La dosis de LOS utilizada fue seleccionada en base a reportes previos (Paz y *col.*, 2014).

### *Control Histológico*

Los animales fueron decapitados y se removieron los cerebros. Estos fueron conservados en formol 4% v/v durante una semana para la fijación del tejido. Posteriormente se cortaron secciones coronales de 60µm en el criostato y se observaron bajo lupa microscópica para la confirmación histológica de la localización de los implantes. Para el análisis estadístico, se tuvieron en cuenta sólo aquellos animales en los que se observó una correcta ubicación de los sitios de inyección.

### **Electrofisiología**

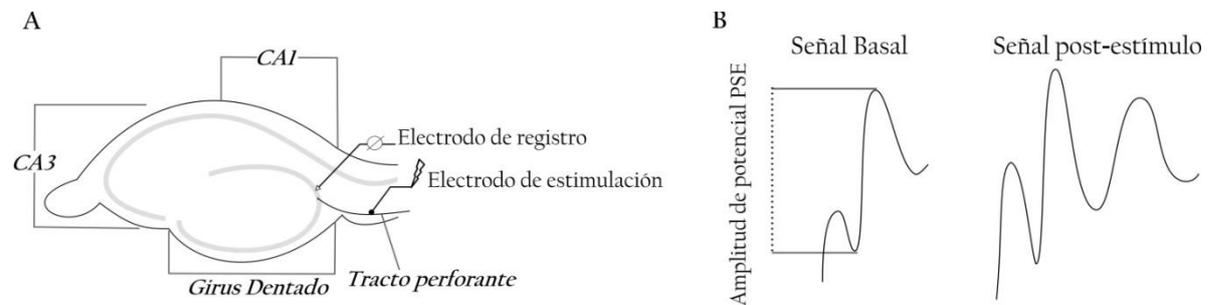
Los experimentos electrofisiológicos se realizaron in vitro en cortes transversales de hipocampo, en la vía del tracto perforante- girus dentado (GD) hipocampal (Perez y col., 2010). Para ello, los animales fueron sacrificados entre las 10:00 y las 11:00hs para evitar variaciones causadas por el ritmo circadiano o estresores no específicos (Teyler y col., 1987). Se disecó inmediatamente el hipocampo y se obtuvieron cortes transversales de aproximadamente 400µm de espesor. Los mismos fueron mantenidos durante todo el experimento en condiciones fisiológicas en la cámara de registro (BSC-BU Harvard Apparatus) mediante la perfusión continua con líquido cefalorraquídeo artificial (NaCl, 124,3mM; KCl, 4,9mM; MgSO<sub>4</sub> • 7H<sub>2</sub>O, 1,3mM; H<sub>2</sub>KPO<sub>4</sub>, 1,25mM; HNaCO<sub>3</sub>, 25,6mM; glucosa, 10,4mM; de CaCl<sub>2</sub> • 2H<sub>2</sub>O, 2,3mM; Sigma Chemical Company), saturado con carbógeno (95% de O<sub>2</sub> / 5% de CO<sub>2</sub>) y a 28°C (regulado por un controlador de temperatura TC-202A Harvard Apparatus). Los potenciales de campo postsinápticos excitatorios (potenciales PSE) fueron evocados mediante la administración de pulsos eléctricos con un electrodo de estimulación colocado en el tracto perforante y conectado a un generador de pulsos (A310 Accupulser- World Precision Instruments Inc.); mientras que el electrodo de registro fue colocado en la capa de células granulares del GD y conectado a un amplificador que envió las señales a un osciloscopio donde se observaron los potenciales PSE generados (Fig. 16). En un primer paso se identificó la presencia de una señal estable, considerada como una amplitud estable de los potenciales PSE en respuesta a pulsos de 0,2Hz (0,5ms; 10mA cada uno), medidos cada 5min durante un período de 20 a 30min (registro basal). Una vez finalizado el registro basal se aplicó el protocolo de estimulación de frecuencia variable para determinar el umbral de frecuencia (Hz) para la generación de LTP. El mismo consistió en un tren de pulsos de 2 segundos de duración (0,5ms; 10mA cada uno), de frecuencia variable creciente (5-200Hz) otorgado al tracto perforante por el generador de pulsos. Veinte minutos después de cada estímulo, se realizó un nuevo registro de la señal a 0,2Hz, y cuando no se observó LTP, se aplicó un nuevo estímulo en la siguiente frecuencia. Se considera que el LTP se ha generado cuando se produce un aumento en algún parámetro de la señal superior al 30% con respecto a los mismos parámetros de la señal basal, y persiste durante 60min (**Figura 16**). Los parámetros registrados son la amplitud de la señal, la presencia de nuevos picos y la espiga poblacional. Una vez que se logró el LTP, ningún otro estímulo fue otorgado y la frecuencia umbral para generar LTP en los distintos grupos experimentales fue considerada como variable experimental, la cual a menor frecuencia umbral indica mayor eficacia sináptica. Sólo los cortes que mostraron una respuesta estable fueron incluidos en el análisis.

### **Análisis Estadístico**

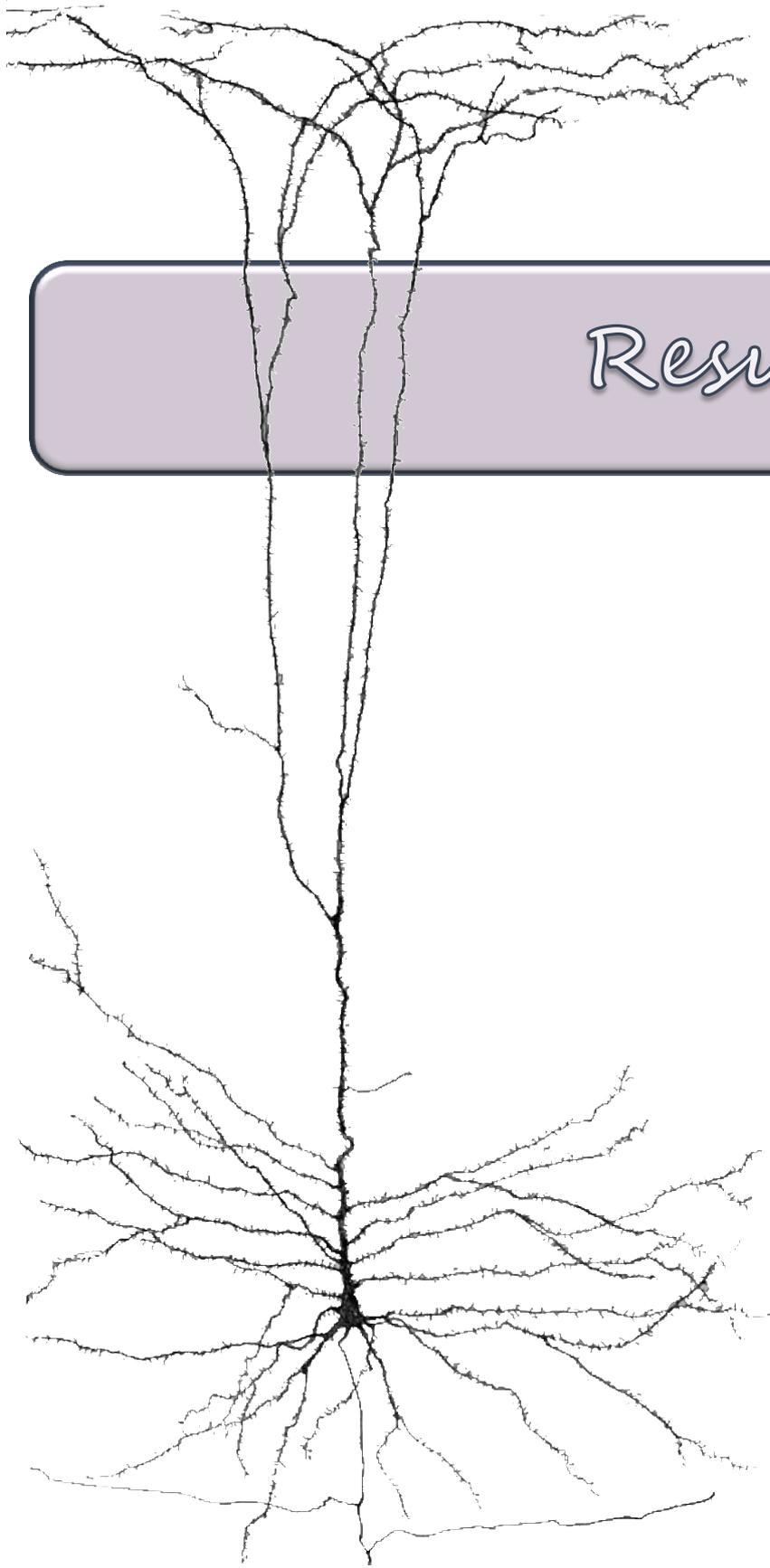
El tipo de análisis realizado, se detalla en la descripción de cada experimento en particular. Cuando los datos cumplieron con las premisas de distribución normal y homogeneidad de varianza se realizó el análisis de la varianza (ANOVA) de una o dos vías o medidas repetidas, seguidos por el post-test Bonferroni (si correspondiese). En este caso los valores de las variables se expresan

como la media  $\pm$  error estándar (ES). Cuando los datos no cumplieron las premisas, se realizaron pruebas no paramétricas de una o dos vías seguidos por test de Mann-Whitney con corrección de Bonferroni (si correspondiese). En estos casos los datos se expresan como mediana  $\pm$  rango intercuartílico.

Los análisis estadísticos se realizaron con Graph Pad PRISM 6 (San Diego, CA, USA) e IBM SPSS Statistic 22 (SPSS Software for Business Analytics, IBM Software). Se consideró significativo un valor de  $p < 0,05$ .



**Figura 16. Electrofisiología.** (A) Esquema de la localización en hipocampo de los electrodos de estimulación y registro. (B) Esquema de los posibles cambios observados en la señal antes y después de la ocurrencia de LTP.

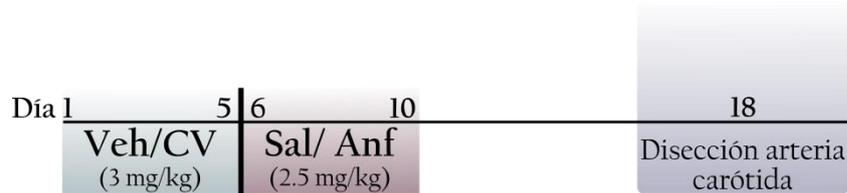


Resultados

**Objetivo 1:** Evaluar la participación de R-AT<sub>1</sub> en las secuelas inflamatorias sobre el sistema vascular periférico-central por exposición a anfetamina

**Objetivo 1a.**

- Evaluar la participación de receptores AT<sub>1</sub> en los cambios estructurales inducidos por anfetamina sobre la arteria carótida



**Esquema 2.** Protocolo experimental para la evaluación de la participación de R-AT<sub>1</sub> en los cambios morfológicos inducidos por anfetamina en las capas no musculares de la arteria carótida.

*Resultados*

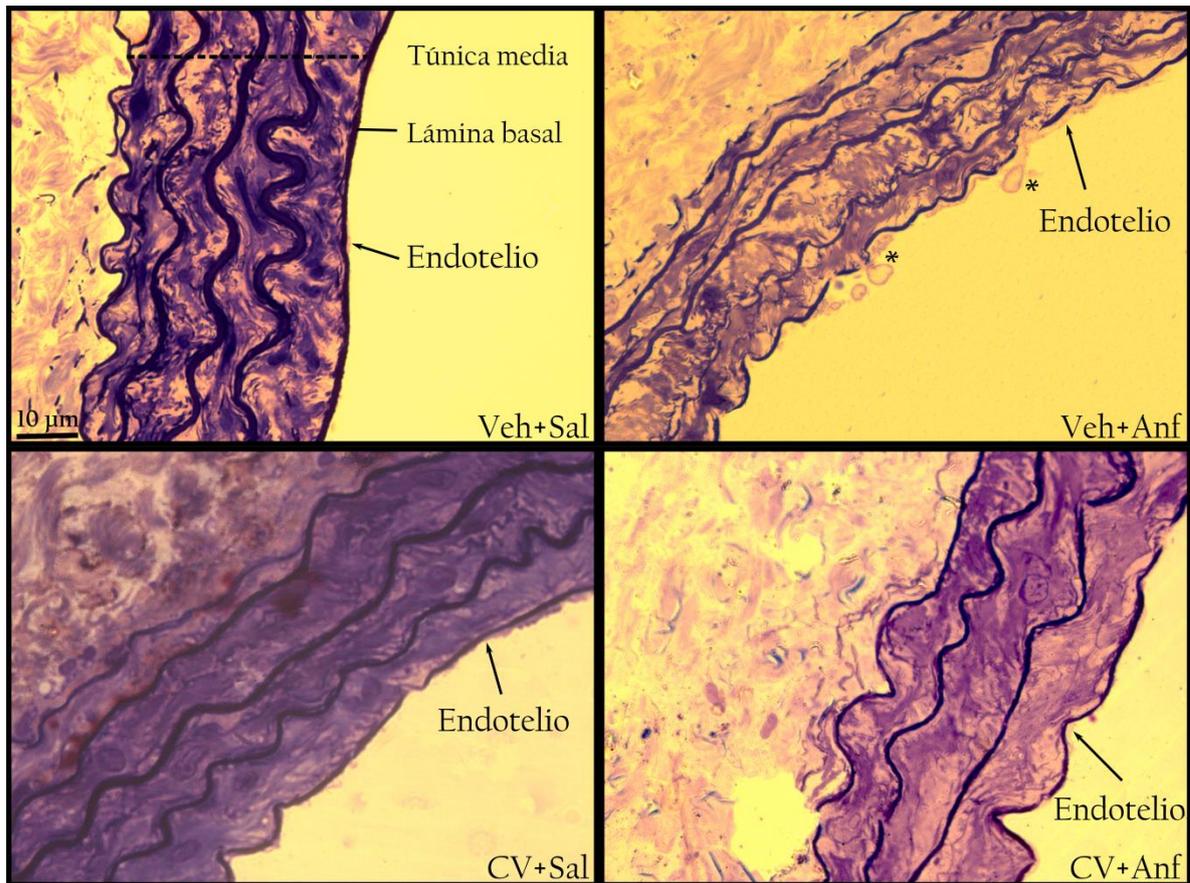
La caracterización morfológica permitió identificar un engrosamiento endotelial y células plasmáticas en estrecha proximidad con células endoteliales luego de la exposición a anfetamina. Estos cambios no se evidenciaron en los animales que recibieron el pretratamiento con CV.

No se encontraron alteraciones en el resto de las capas no musculares de la carótida (lámina basal y túnica media).

La tabla 1 muestra los valores promedios obtenidos de 30-50 mediciones (n=2) y en la **figura 17** se ilustra de manera representativa los resultados observados.

**Tabla 1. Capas no musculares de carótida.** Promedio del grosor de las capas no musculares de carótida en los 4 grupos experimentales (nm, 30-50 mediciones, n=2).

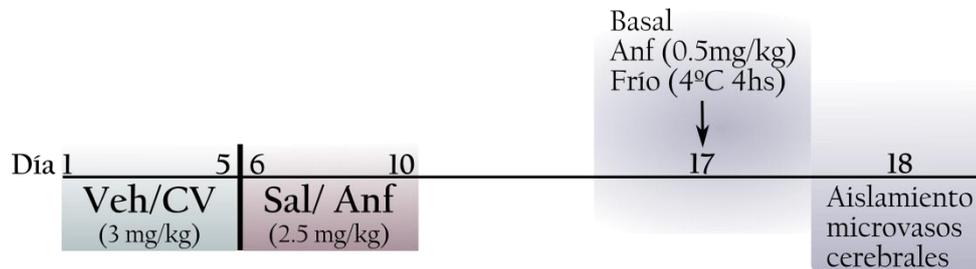
	Veh + Sal	Veh + ANF	CV + Sal	CV + ANF
Endotelio	1,26	2,02	1,30	1,20
Lámina Basal	1,14	1,44	1,05	0,94
Túnica media	49,6	49,4	52,9	46,5



**Figura 17. Engrosamiento endotelial de arteria carótida.** Microfotografías (1000X) representativas de los 4 grupos experimentales (Veh+Sal/Veh+Anf/CV+Sal/CV+Anf) en condiciones basales, 7 días después de la última inyección de Anf/Sal. En el recuadro superior izquierdo se identifican las 3 capas no musculares evaluadas. Las flechas señalan la capa endotelial en los 4 grupos experimentales; \*Células plasmáticas en contacto con endotelio.

**Objetivo 1b.**

- Identificar los cambios inducidos por anfetamina en la expresión de marcadores inflamatorios (R-AT<sub>1</sub> y HSP70) en la microvasculatura cerebral.
- Evaluar la participación de receptores AT<sub>1</sub> en el desarrollo de estos cambios.



**Esquema 3.** Protocolo experimental para la evaluación de la participación de R-AT<sub>1</sub> en los cambios en la expresión de marcadores inflamatorios inducidos por anfetamina en la microvasculatura cerebral.

*Análisis estadístico*

Se realizó un ANOVA de dos vías, considerando **pre-tratamiento** (Veh/CV) y **tratamiento** (Sal/Anf) como las fuentes de variabilidad seguidos por el test de Bonferroni *post-hoc*. Los datos fueron analizados separando los 4 grupos experimentales (Veh+Sal/Veh+Anf/CV+Sal/CV+Anf) de acuerdo al desafío administrado (Basal/ Des. Anfetamina/ Des. Frío).

*Resultados*Expresión de receptores AT<sub>1</sub>

La exposición a anfetamina produjo un aumento en la expresión de R-AT<sub>1</sub> en microvasos cerebrales en condiciones basales, cambio que no se observó con el pre-tratamiento con CV (**Figura 18 A y 19**).

La administración de un desafío (Des. Anfetamina/ Des. Frío) produjo, 24hs después, un aumento en la expresión de R-AT<sub>1</sub> en los 4 grupos experimentales. En este sentido, el aumento observado en la expresión de R-AT<sub>1</sub> producto del Des. Anfetamina ocultó las diferencias observadas en condiciones basales. Sin embargo, con el Des. Frío el aumento en la expresión de R-AT<sub>1</sub> fue menor lo cual permitió observar que bajo estas condiciones se mantienen las diferencias basales observadas entre los grupos experimentales (**Figura 18 B y C**).

**Basal.** El análisis estadístico indica efecto significativo para **pre-tratamiento**  $F_{(1, 15)} = 28,9$ ; **tratamiento**  $F_{(1, 15)} = 10,4$ ; e **interacción pre-tratamiento\*tratamiento**  $F_{(1, 15)} = 12,5$  ( $p < 0,05$ ). El test de Bonferroni indica que el grupo Veh-Anf mostró un aumento significativo de la expresión de R-AT<sub>1</sub> respecto de los demás grupos ( $p < 0,05$ ). (**Figura 18 A**)

**Des. Anfetamina.** El análisis estadístico muestra que no se observan efectos significativos para: **pre-tratamiento**  $F_{(1, 15)} = 0,3$ ; **tratamiento**  $F_{(1, 15)} = 0,2$  e **interacción pre-tratamiento\*tratamiento**  $F_{(1, 15)} = 0,001$  ( $p > 0,05$ ). (**Figura 18 B**)

**Des. Frío.** El análisis estadístico muestra un efecto significativo para **tratamiento**  $F_{(1, 13)} = 6,1$  e **interacción pre-tratamiento\*tratamiento**  $F_{(1, 13)} = 5,0$  ( $p < 0,05$ ). No hay efecto significativo de **pre-tratamiento**  $F_{(1, 13)} = 3,7$  ( $p > 0,05$ ). El test de Bonferroni indica que el grupo Veh-Anf mostró

un aumento significativo de la expresión de R-AT<sub>1</sub> respecto de los demás grupos ( $p < 0,05$ ). (**Figura 18 C**)

Expresión de proteína de estrés celular

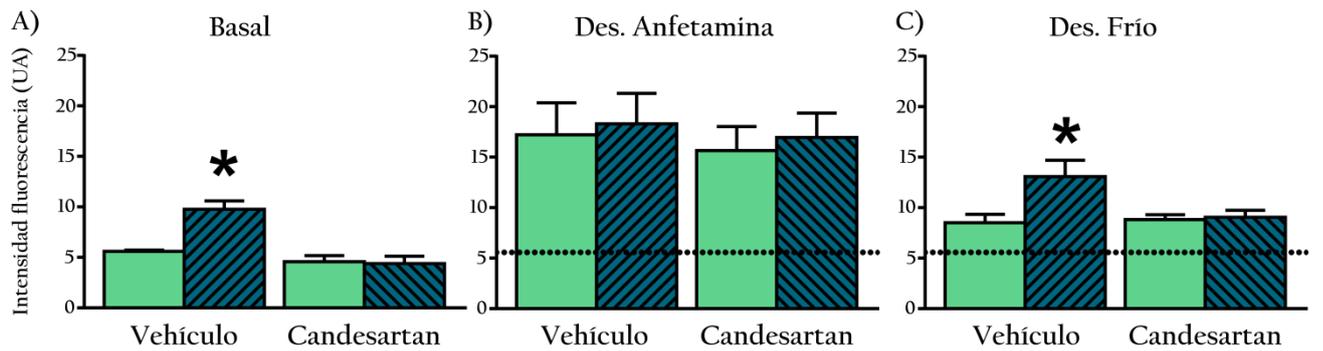
La exposición a anfetamina no modificó la expresión de HSP70 en microvasos cerebrales en condiciones basales (desafío salina). Se observó una disminución en la expresión de HSP70 luego del pre-tratamiento con CV (**Figura 18 D**).

La administración de un desafío (Des. Anfetamina/ Des. Frío) evidenció una respuesta sensibilizada inducida por exposición previa a Anf en la expresión de HSP70, en microvasos cerebrales, 24hs después de recibida la noxa. El desarrollo de la respuesta sensibilizada de la HSP70 se previno con el pre-tratamiento con CV (**Figura 18 E, F y 20**).

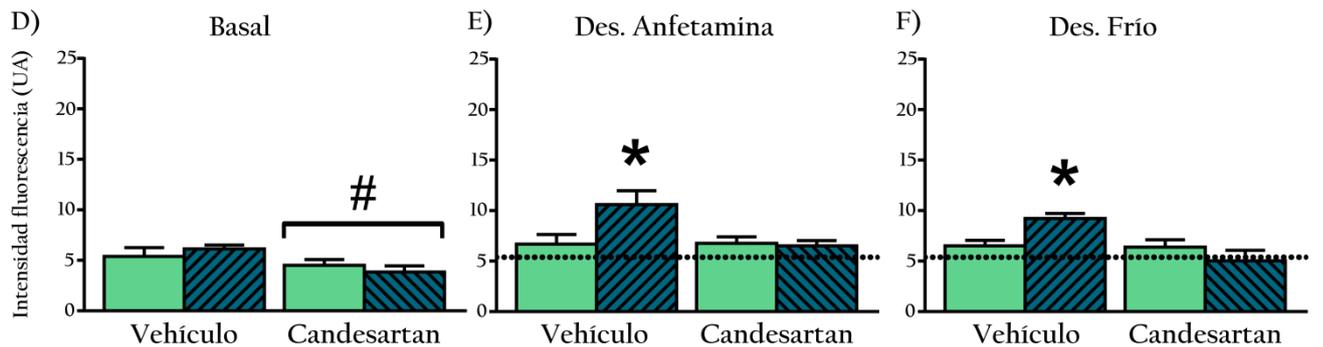
**Basal.** El análisis estadístico indica un efecto significativo para **pre-tratamiento**  $F_{(1, 15)} = 5,8$  ( $p < 0,05$ ); mientras que no se observan efectos para **tratamiento**  $F_{(1, 15)} = 0,005$  e **interacción pre-tratamiento\*tratamiento**  $F_{(1, 15)} = 1,1$  ( $p > 0,05$ ) (**Figura 18 D**).

**Des. Anfetamina.** El análisis estadístico indica un efecto significativo para **interacción pre-tratamiento\*tratamiento**  $F_{(1, 15)} = 4,6$  ( $p < 0,05$ ); mientras que no se observan efectos para **pre-tratamiento**  $F_{(1, 15)} = 4,2$  y **tratamiento**  $F_{(1, 15)} = 3,5$  ( $p > 0,05$ ). El test de Bonferroni indica un aumento significativo en la expresión de HSP70 en el grupo Veh-Anf respecto de los demás grupos ( $p < 0,05$ ) (**Figura 18 E**).

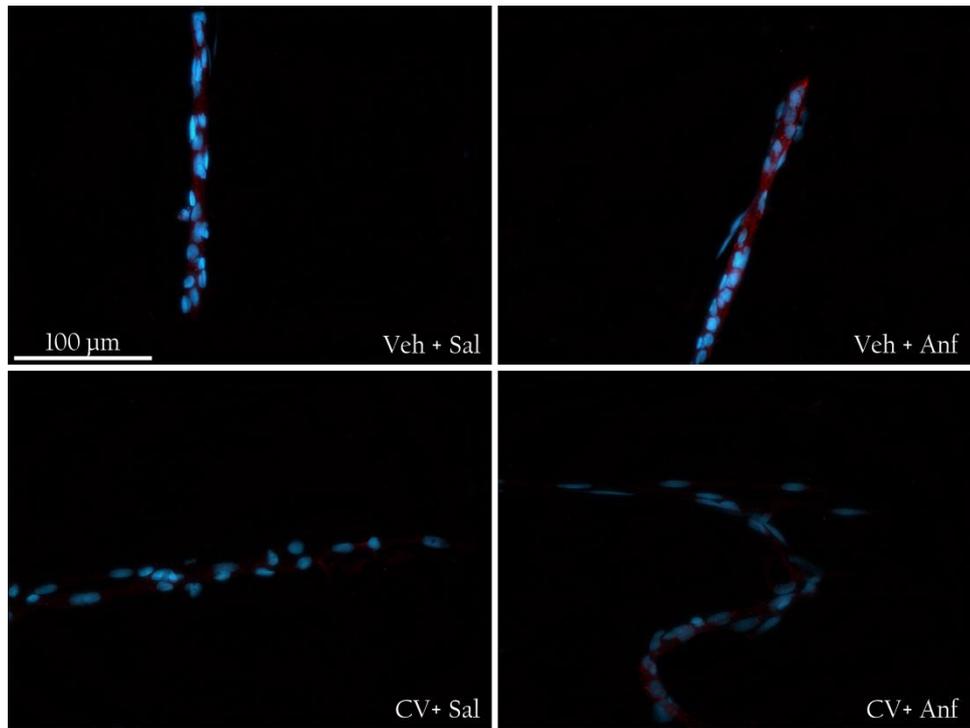
**Des. Frío.** El análisis estadístico indica un efecto significativo para **pre-tratamiento**  $F_{(1, 16)} = 8,7$  e **interacción pre-tratamiento\*tratamiento**  $F_{(1, 16)} = 7,6$  ( $p < 0,05$ ). No se hay efecto para **tratamiento**  $F_{(1, 16)} = 0,9$  ( $p > 0,05$ ). El test de Bonferroni indica un aumento significativo en la expresión de HSP70 en el grupo Veh-Anf respecto de los demás grupos ( $p < 0,05$ ) (**Figura 18 F**).

Receptores AT<sub>1</sub>

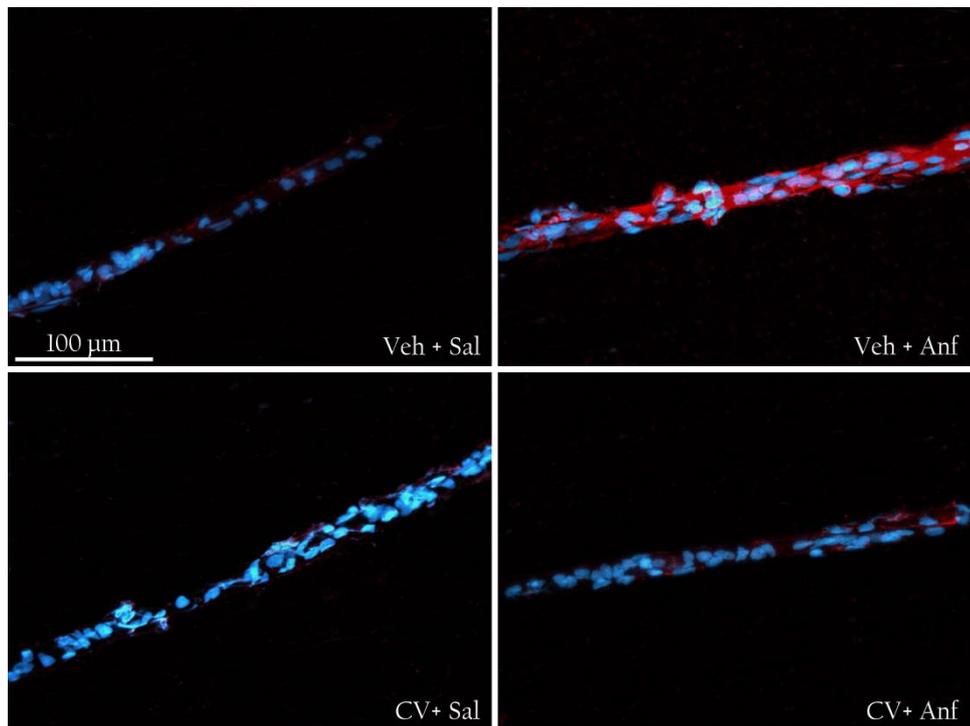
## Proteína de golpe de calor-70



**Figura 18. Expresión de receptores AT<sub>1</sub> y proteína de estrés celular en microvasos cerebrales.** **Panel superior:** Expresión de R-AT<sub>1</sub> en unidades arbitrarias (UA), en los 4 grupos experimentales 24 hs después de recibido el desafío: (A) Basal, (B) Des. Anfetamina, (C) Des. Frío. **Panel inferior:** Expresión de HSP70 (UA) en los 4 grupos experimentales 24 hs después de recibido el desafío: (D) Basal, (E) Des. Anfetamina, (F) Des. Frío. La línea punteada indica los valores de expresión observados en el grupo Veh+Sal en condiciones basales para cada marcador. \* diferente de Veh+Sal y CV+Anf con el mismo desafío. # diferente de grupos pre-tratados con Vehículo, p<0,05, n=4-6. Los valores se expresan como la media±EE.



**Figura 19. Inmunofluorescencia de receptores AT1- Basal.** Microfotografías (400X) representativas de los 4 grupos experimentales en condiciones basales. En azul se observan los núcleos de las células endoteliales y en rojo la inmunomarcación de R-AT<sub>1</sub>.

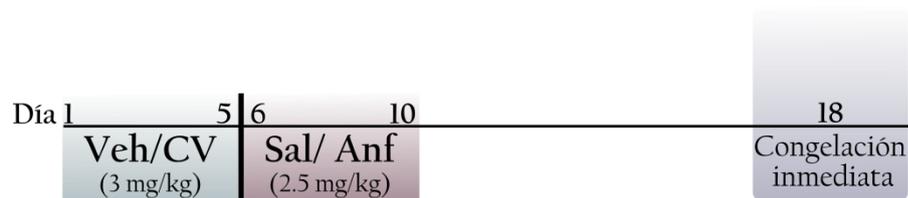


**Figura 20. Inmunofluorescencia de proteína de estrés celular- Des. Anfetamina.** Microfotografías (400X) representativas de los 4 grupos experimentales con Des. Anfetamina (0,5mg/kg). En azul se observan los núcleos de las células endoteliales y en rojo la inmunomarcación de HSP70.

**Objetivo 2:** Evaluar la participación de R-AT<sub>1</sub> en alteraciones estructurales y funcionales inducidas por anfetamina nivel de la corteza prefrontal.

### Objetivo 2a.

- Identificar las alteraciones en la red vascular inducidas por anfetamina en corteza prefrontal.
- Evaluar la participación de receptores AT<sub>1</sub> en el desarrollo de estos cambios.



**Esquema 4.** Protocolo experimental para la evaluación de la participación de R-AT<sub>1</sub> en las alteraciones inducidas por anfetamina en la red vascular de CPF.

#### Análisis estadístico

Se realizó un ANOVA de dos vías, considerando **pre-tratamiento** (Veh/CV) y **tratamiento** (Sal/Anf) como las fuentes de variabilidad, seguidos por el test de Bonferroni *post-hoc*.

#### Resultados

##### Corteza prefrontal prelímbica

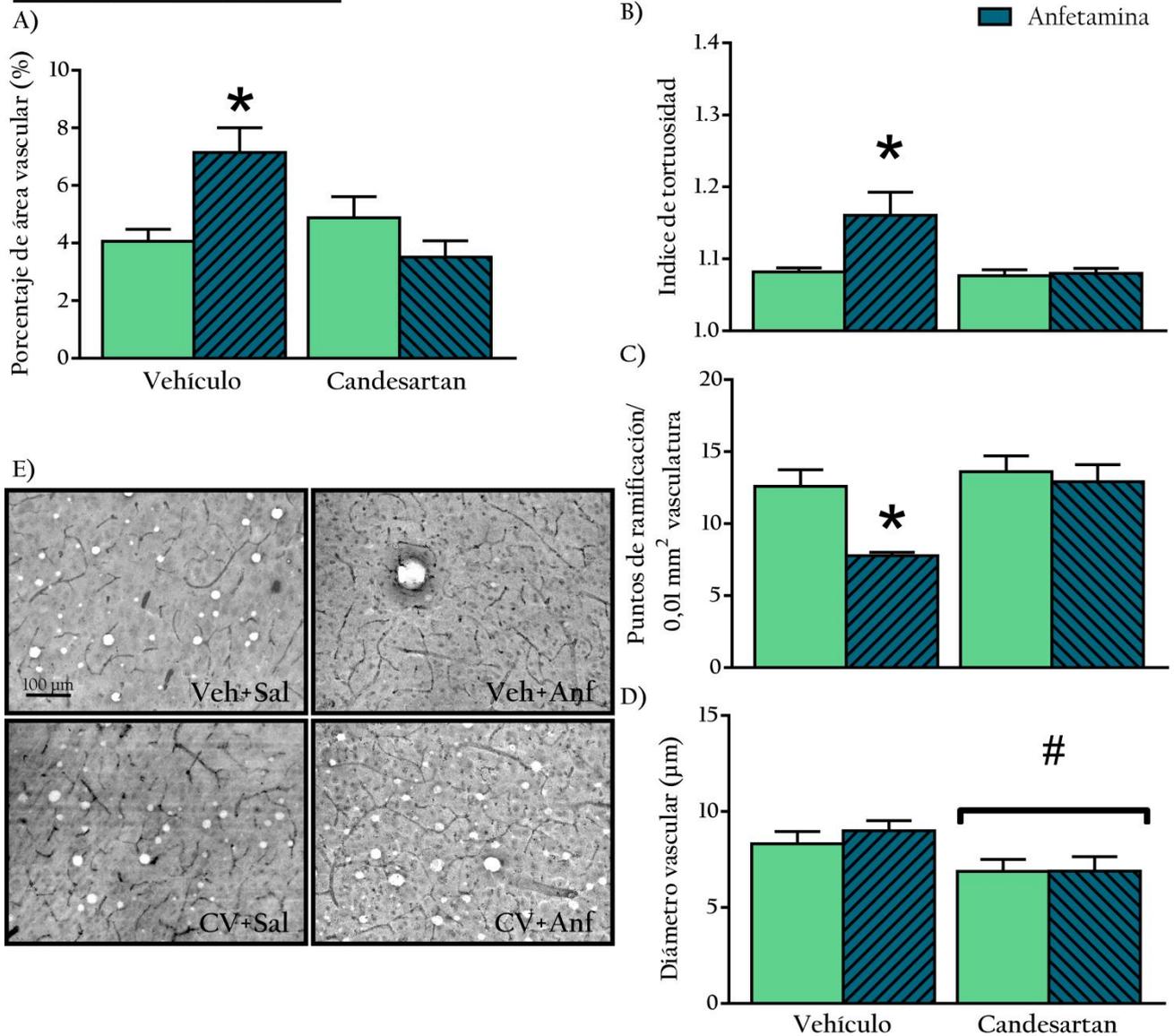
La exposición a anfetamina modificó la estructura de la red vascular hacia un crecimiento longitudinal del vaso, considerando que se observó un aumento en el porcentaje de área ocupada por vasculatura, una disminución del número de puntos de ramificación y un mayor índice de tortuosidad. Estos cambios estructurales no se observaron con el pre-tratamiento con CV (**Figura 21**).

**Porcentaje de área ocupada por vasculatura.** El análisis indica un efecto significativo para **pre-tratamiento**  $F_{(1, 27)} = 4,5$  e **interacción pre-tratamiento\*tratamiento**  $F_{(1, 27)} = 11,3$  ( $p < 0,05$ ); mientras que no se observan efectos para el factor **tratamiento**  $F_{(1, 27)} = 1,6$  ( $p > 0,05$ ). El test de Bonferroni indica que el grupo Veh-Anf presentó un mayor porcentaje de área ocupada por vasculatura respecto de los demás grupos ( $p < 0,05$ ) (**Figura 21A**).

**Puntos de ramificación.** El análisis indica un efecto significativo para **pre-tratamiento**  $F_{(1, 27)} = 9,6$ , **tratamiento**  $F_{(1, 27)} = 7,7$  e **interacción pre-tratamiento\*tratamiento**  $F_{(1, 27)} = 4,3$  ( $p < 0,05$ ). El test de Bonferroni indica que el grupo Veh-Anf presentó un menor número de puntos de ramificación por área vascular respecto de los demás grupos ( $p < 0,05$ ) (**Figura 21B**).

**Tortuosidad.** El análisis indica un efecto significativo para **pre-tratamiento**  $F_{(1, 27)} = 5,9$ , **tratamiento**  $F_{(1, 27)} = 5,3$  e **interacción pre-tratamiento\*tratamiento**  $F_{(1, 27)} = 4,9$  ( $p < 0,05$ ). El test de Bonferroni indica que el grupo Veh-Anf presentó un mayor índice de tortuosidad respecto de los demás grupos ( $p < 0,05$ ) (**Figura 21C**).

**Diámetro.** El análisis indica un efecto significativo para **pre-tratamiento**  $F_{(1, 27)} = 7,5$  ( $p < 0,05$ ), mientras que no hay efecto significativo para los factores **tratamiento**  $F_{(1, 27)} = 0,3$  e **interacción pre-tratamiento\*tratamiento**  $F_{(1, 27)} = 0,3$  ( $p > 0,05$ ) (**Figura 21D**).

Corteza prefrontal prelámbica

**Figura 21. Estructura de la red vascular en corteza prefrontal prelámbica.** Valores de los parámetros analizados de la estructura vascular en los 4 grupos experimentales en condiciones basales: (A) Porcentaje de área ocupada por vasculatura, (B) Índice de tortuosidad, (C) Puntos de ramificación, (D) Diámetro vascular. \* diferente de Veh+Sal y CV+Anf. # diferente de grupos pre-tratados con Vehículo,  $p < 0,05$ ,  $n = 7-8$ . Los valores se expresan como la media  $\pm$  EE. (E) Microfotografías (200X) representativas de los 4 grupos experimentales.

Corteza prefrontal infralámbica

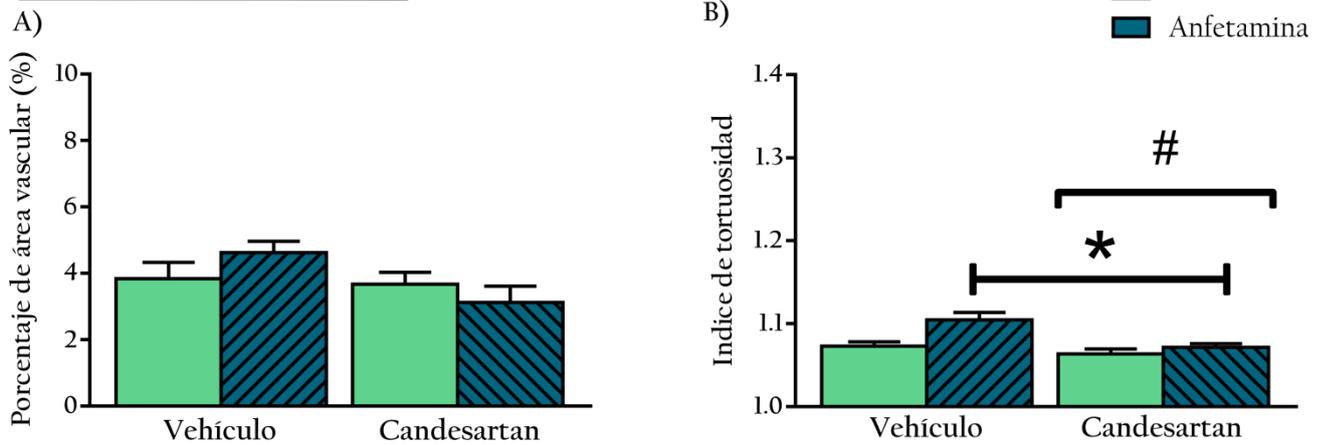
La exposición a anfetamina no modificó de manera significativa la estructura de la red vascular en ésta región cortical.

**Porcentaje de área ocupada por vasculatura.** El análisis indica que no hay efecto significativo para **pre-tratamiento**  $F_{(1, 26)} = 3,6$ ; **tratamiento**  $F_{(1, 26)} = 0,07$  e **interacción pre-tratamiento\*tratamiento**  $F_{(1, 26)} = 2,3$  ( $p > 0,05$ ). (Figura 22A).

**Tortuosidad.** El análisis indica un efecto significativo para **pre-tratamiento**  $F_{(1, 26)} = 11,3$  y **tratamiento**  $F_{(1, 26)} = 9,7$  ( $p < 0,05$ ). No se observa efecto significativo para **interacción pre-tratamiento\*tratamiento**  $F_{(1, 26)} = 3,6$  ( $p > 0,05$ ) (Figura 22B).

No se encontraron diferencias significativas para **puntos de ramificación y diámetro**.

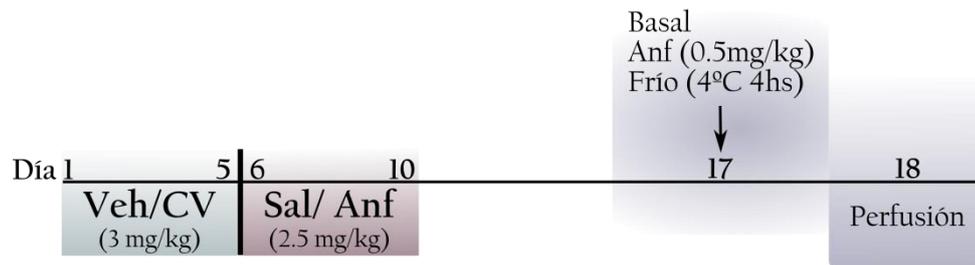
Corteza prefrontal infralímbica



**Figura 22. Estructura de la red vascular en corteza prefrontal infralímbica.** Valores de 2 de los parámetros analizados de la estructura vascular de los 4 grupos experimentales en condiciones basales: **(A)** Porcentaje de área ocupada por vasculatura, **(B)** Índice de tortuosidad. \* diferente de grupos tratados con Salina, # diferente de grupos pre-tratados con Vehículo, n=7-8. Los valores se expresan como la media±EE.

**Objetivo 2b.**

- Evaluar la participación de receptores AT<sub>1</sub> en la reactividad astrocitaria inducida por anfetamina en corteza prefrontal.



**Esquema 5.** Protocolo experimental para la evaluación de la participación de R-AT<sub>1</sub> en las alteraciones astrocitarias inducidas por anfetamina en CPF.

*Análisis estadístico*

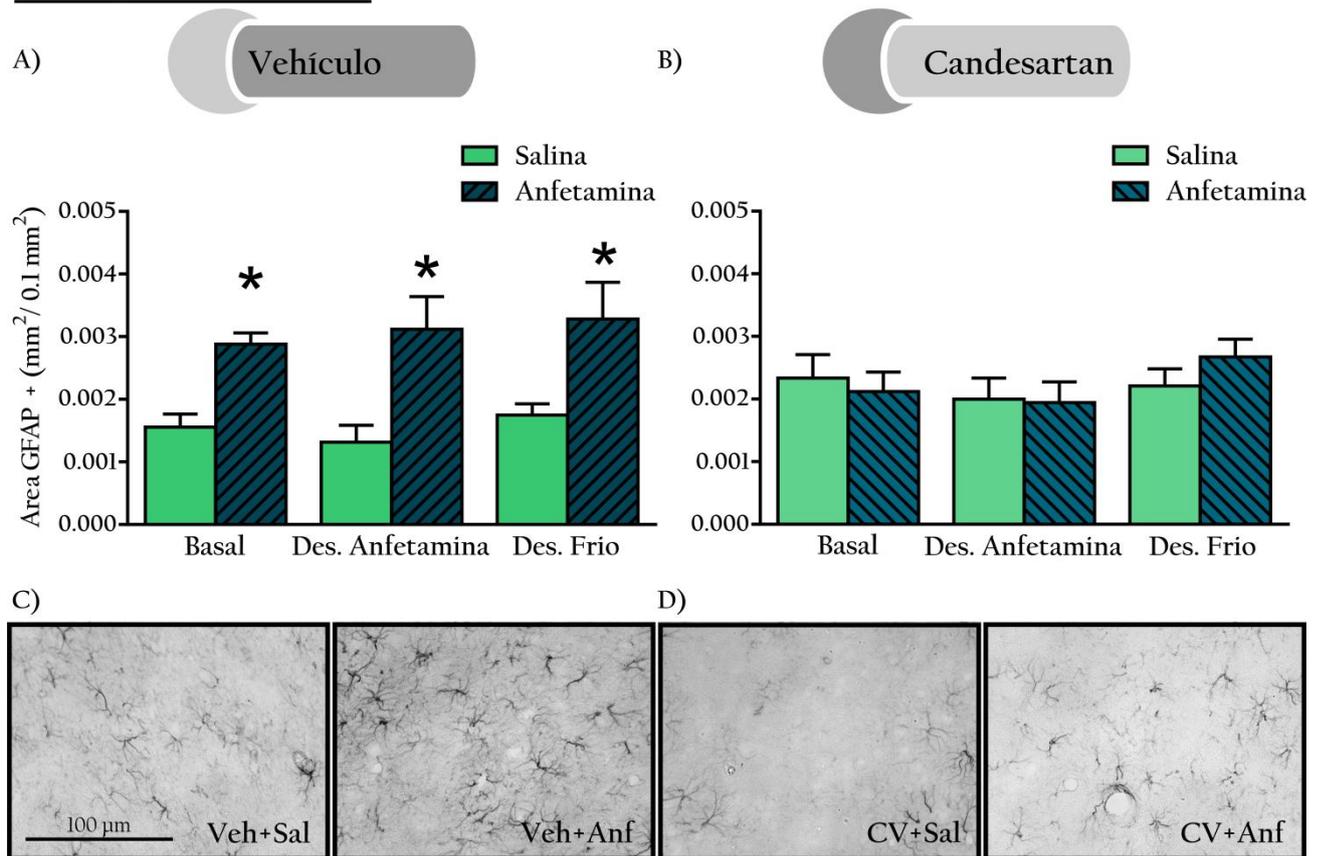
Los datos fueron analizados por separado según el pre-tratamiento con Veh o CV. En cada caso, se realizó un ANOVA de dos vías, considerando **tratamiento** (Sal/Anf) y **desafío** (Basal/ Des. Anfetamina/ Des. Frío) como las fuentes de variabilidad, seguidos por el test de Bonferroni en caso de ser necesario.

*Resultados*Corteza prefrontal prelámbica

La exposición a anfetamina aumentó la reactividad astrocitaria en ésta área, evidenciada como un aumento en el área GFAP+. Este aumento se observa en condiciones basales y no se modifica por la administración de un desafío. Además, estas alteraciones involucran la actividad de R-AT<sub>1</sub>, ya que no se observó astrogliosis cuando los animales recibieron un pre-tratamiento con CV. (**Figura 23 A y 23 B**).

**Pre-tratamiento Vehículo.** El análisis indica un efecto significativo para **tratamiento**  $F_{(1, 33)} = 24,1$  ( $p < 0,05$ ); mientras que no se observan efectos para el factor **desafío**  $F_{(2,33)} = 0,4$  e **interacción tratamiento\*desafío**  $F_{(2, 33)} = 0,2$  ( $p > 0,05$ ). El test de Bonferroni indica que el grupo Veh-Anf presentó mayor reactividad glial que Veh-Sal para todos los desafíos recibidos ( $p < 0,05$ ). (**Figura 23 A y 23 C**).

**Pre-tratamiento Candesartan.** El análisis indica que no existen diferencias entre los distintos grupos analizados ya que no se observan efectos significativos para los factores **tratamiento**  $F_{(1, 29)} = 0,06$ , **desafío**  $F_{(2,29)} = 1,1$  e **interacción tratamiento\*desafío**  $F_{(2, 29)} = 0,6$  ( $p > 0,05$ ). (**Figura 23 B y 23 D**).

Corteza prefrontal Prelimbica

**Figura 23. Reactividad astrocitaria en corteza prefrontal prelámbica.** Área GFAP + para todos los grupos experimentales según el pre-tratamiento recibido: **(A)** Vehículo **(B)** Candesartan. \*diferente de Veh+Sal con igual desafío  $p < 0,05$ ,  $n = 5-8$ . Los valores se expresan como la media  $\pm$  EE. **(C)** y **(D)** Microfotografías (400X) representativas de los 4 grupos experimentales en condiciones basales.

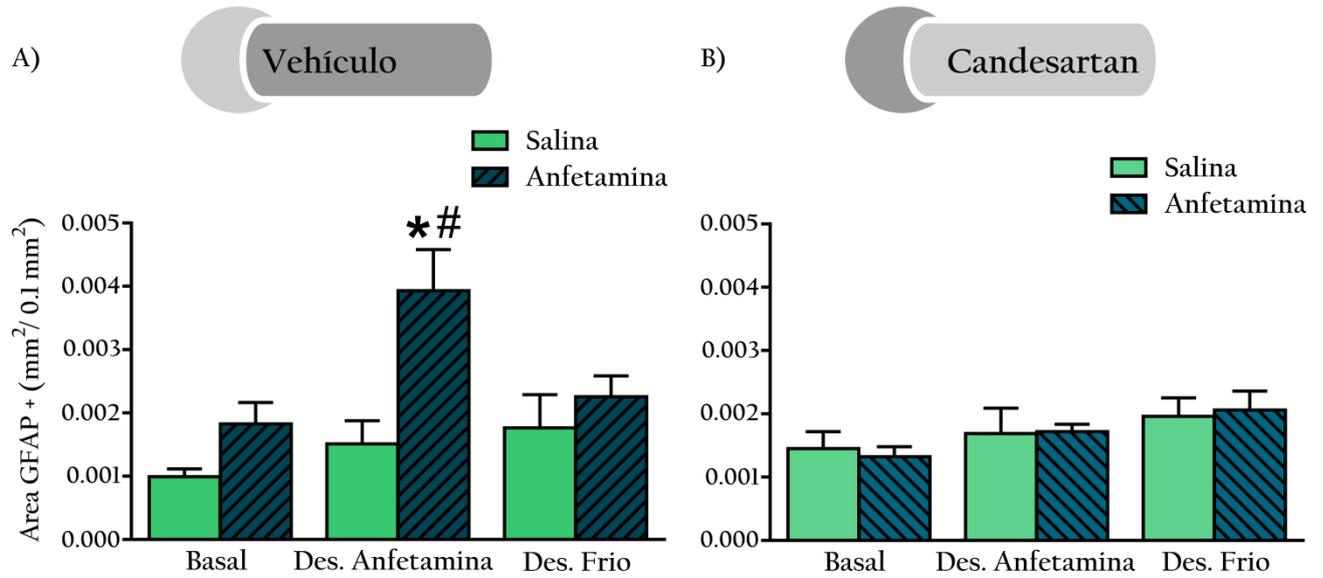
Corteza prefrontal infralímbica

Las adaptaciones inducidas por exposición a anfetamina a nivel astrocitario no se observaron en condiciones basales, sin embargo se observó una respuesta sensibilizada de la reactividad astrocitaria en el grupo Veh+Anf sólo ante la re-exposición al psicoestimulante (Des. Anfetamina). Estos cambios inducidos por Anf no se observaron en los animales que recibieron un pre-tratamiento con CV. (**Figura 24 A y 24 B**).

**Pre-tratamiento Vehículo.** El análisis indica un efecto significativo para **tratamiento**  $F_{(1, 33)} = 15,1$ , **desafío**  $F_{(2,33)} = 5,8$  e **interacción tratamiento\*desafío**  $F_{(2, 33)} = 3,3$  ( $p < 0,05$ ). El test de Bonferroni indica que el grupo Veh-Anf presenta mayor reactividad glial que su control (Veh-Sal con Des. Anfetamina) y que los grupos Veh-Anf en condiciones basales y con Des. Frío ( $p < 0,05$ ). (**Figura 24 A**).

**Pre-tratamiento Candesartan.** El análisis indica que no existen diferencias entre los distintos grupos analizados, ya que no se observa efecto significativo para los factores **tratamiento**  $F_{(1, 30)} = 5,4 \times 10^{-5}$ , **desafío**  $F_{(2,30)} = 2,6$  e **interacción tratamiento\*desafío**  $F_{(2, 30)} = 0,09$  ( $p > 0,05$ ). (**Figura 24 B**)

## Corteza prefrontal Infralímbica



**Figura 24. Reactividad astrocitaria en corteza prefrontal infralímbica.** Área GFAP + para todos los grupos experimentales según el pre-tratamiento recibido: **(A)** Vehículo **(B)** Candesartan. \*diferente de Veh+Sal con igual desafío, #diferente de Veh+Anf en condiciones basales y con Des. Frio,  $p < 0,05$ ,  $n = 5-8$ . Los valores se expresan como la media  $\pm$  EE.

**Objetivo 2c.**

- Evaluar la participación de receptores AT<sub>1</sub> en alteraciones de la memoria de trabajo inducidas por anfetamina



**Esquema 6.** Protocolo experimental para la evaluación de la participación de R-AT<sub>1</sub> en las alteraciones inducidas por anfetamina sobre la memoria de trabajo.

*Análisis estadístico*

Los datos fueron analizados por separado según el pre-tratamiento con vehículo ó CV. En cada caso, se realizó un ANOVA de dos vías, considerando **tratamiento** (Sal/Anf) y **desafío** (Basal/Des. Anfetamina/ Des. Frío) como las fuentes de variabilidad, seguidos por el test de Bonferroni en caso de ser necesario.

*Resultados*Laberinto en Y

Se observó un déficit en la memoria de trabajo una semana después de la exposición a anfetamina en condiciones basales, evidenciado por un menor porcentaje de alternaciones del grupo Veh+Anf (Basal). Este déficit fue prevenido por el bloqueo de receptores AT<sub>1</sub> ya que no se observó en el grupo pre-tratado con CV (**Figura 25 A y 25 B- Basal**).

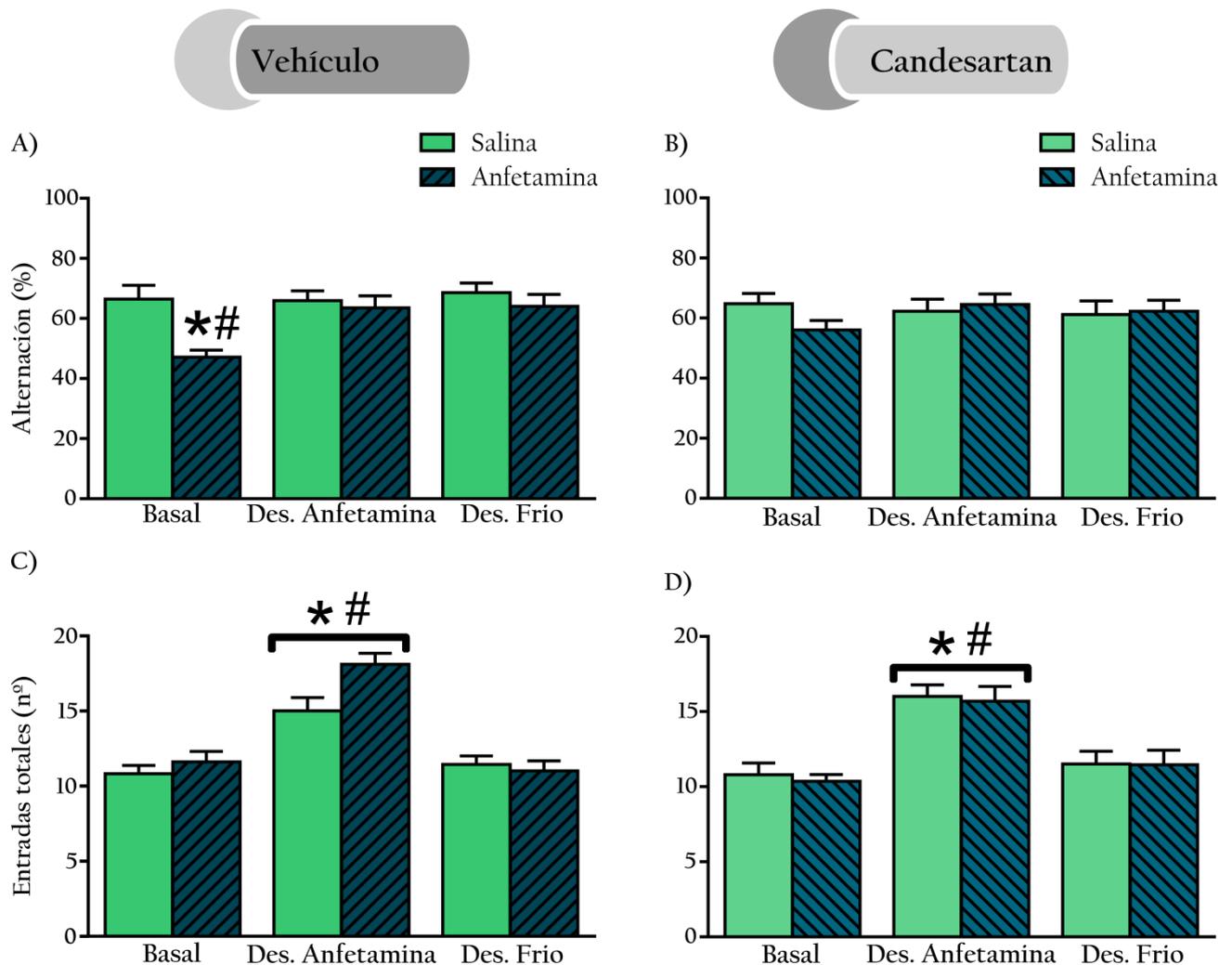
El déficit observado por la exposición al psicoestimulante no fue evidente cuando se administró Des. Anfetamina o Des. Frío 2hs antes de la ejecución del test. Esta mejora transitoria sólo se observó en animales con déficit basal y no en los demás grupos experimentales que mostraban un correcto desempeño en condiciones basales (**Figura 25 A y 25 B**).

Cabe destacar que no se encontraron diferencias en la exploración total de los grupos experimentales, excepto para los grupos que recibieron Des. Anfetamina en los cuales se hace evidente el efecto estimulante locomotor del psicoestimulante (**Figura 25 C y 25 D**).

**Porcentaje de alternación**

**Pre-tratamiento Vehículo.** El análisis indica un efecto significativo para **tratamiento**  $F_{(1, 58)}= 8,5$ , **desafío**  $F_{(2,58)}= 4,4$  e **interacción tratamiento\*desafío**  $F_{(2, 58)}= 3,5$  ( $p < 0,05$ ). El test de Bonferroni indica que el grupo Veh+Anf presentó menor porcentaje de alternaciones respecto a su control (Veh+Sal) en condiciones basales y a los grupos Veh+Anf con Des. Anfetamina y Des. Frío ( $p < 0,05$ ). (**Figura 25 A**).

**Pre-tratamiento Candesartan.** El análisis indica que no existen diferencias entre los distintos grupos analizados ya que no se observa efecto significativo para los factores: **tratamiento**  $F_{(1, 64)}= 1,1$ , **desafío**  $F_{(2, 64)}= 0,2$  e **interacción tratamiento\*desafío**  $F_{(2, 64)}= 0,2$  ( $p > 0,05$ ). (**Figura 25 B**).



**Figura 25. Memoria de trabajo evaluada en laberinto en Y.** Resultados obtenidos para todos los grupos experimentales según el pre-tratamiento recibido: (A) y (C) Vehículo (B) y (D) Candesartan. **Panel superior:** Porcentaje de alternaciones. \*diferente de Veh+Sal con igual desafío, #diferente de Veh+Anf con Des. Anfetamina y Des. Frío,  $p < 0,05$ . **Panel inferior:** Número de entradas totales. \*diferente de los grupos en condiciones basales, #diferente de los grupos con Des. Frío,  $n = 8-17$ . Los valores se expresan como la media  $\pm$  EE.

### Entradas totales

**Pre-tratamiento Vehículo.** El análisis indica un efecto significativo para, **desafío**  $F_{(2,58)} = 35,3$  ( $p < 0,05$ ). No se observa efecto para **tratamiento**  $F_{(1, 58)} = 3,8$  e **interacción tratamiento\*desafío**  $F_{(2, 58)} = 2,9$  ( $p > 0,05$ ). El test de Bonferroni indica que los grupos administrados con Des. Anfetamina mostraron un mayor n° de entradas totales que los grupos en condiciones basales o con Des. Frío ( $p < 0,05$ ). (Figura 25 C).

**Pre-tratamiento Candesartan.** El análisis indica un efecto significativo para, **desafío**  $F_{(2, 64)} = 22,9$  ( $p < 0,05$ ). No se observa efecto para **tratamiento**  $F_{(1, 64)} = 0,2$  e **interacción tratamiento\*desafío**  $F_{(2, 64)} = 0,03$  ( $p > 0,05$ ). El test de Bonferroni indica que los grupos administrados con Des. Anfetamina muestran mayor n° de entradas totales que los grupos que en condiciones basales o con Des. Frío ( $p < 0,05$ ). (Figura 25 D).

Campo perforado

Se corroboró el déficit en la memoria de trabajo en condiciones basales luego de la exposición a Anf, en este caso evidenciado por una mayor diferencia, entre el primer y segundo hueco más explorado, en relación a la frecuencia de visitas y el porcentaje de tiempo de exploración. Este déficit fue prevenido por el bloqueo previo de receptores AT<sub>1</sub> (**Figura 26 A-B y 27 A-B** –desafío salina-).

El déficit basal en animales tratados con Anf no se observó con la administración de Des. Anfetamina ó Des. Frío 2 hs antes de la ejecución del test. (**Figura 26 A y 27 A**).

No se encontraron diferencias en la exploración total de los grupos experimentales excepto para los grupos que recibieron Des. Anfetamina en los cuales se hace evidente el efecto estimulante locomotor del psicoestimulante (**Figura 26 C-D y 27 C-D**).

**Diferencia en frecuencia de visitas**

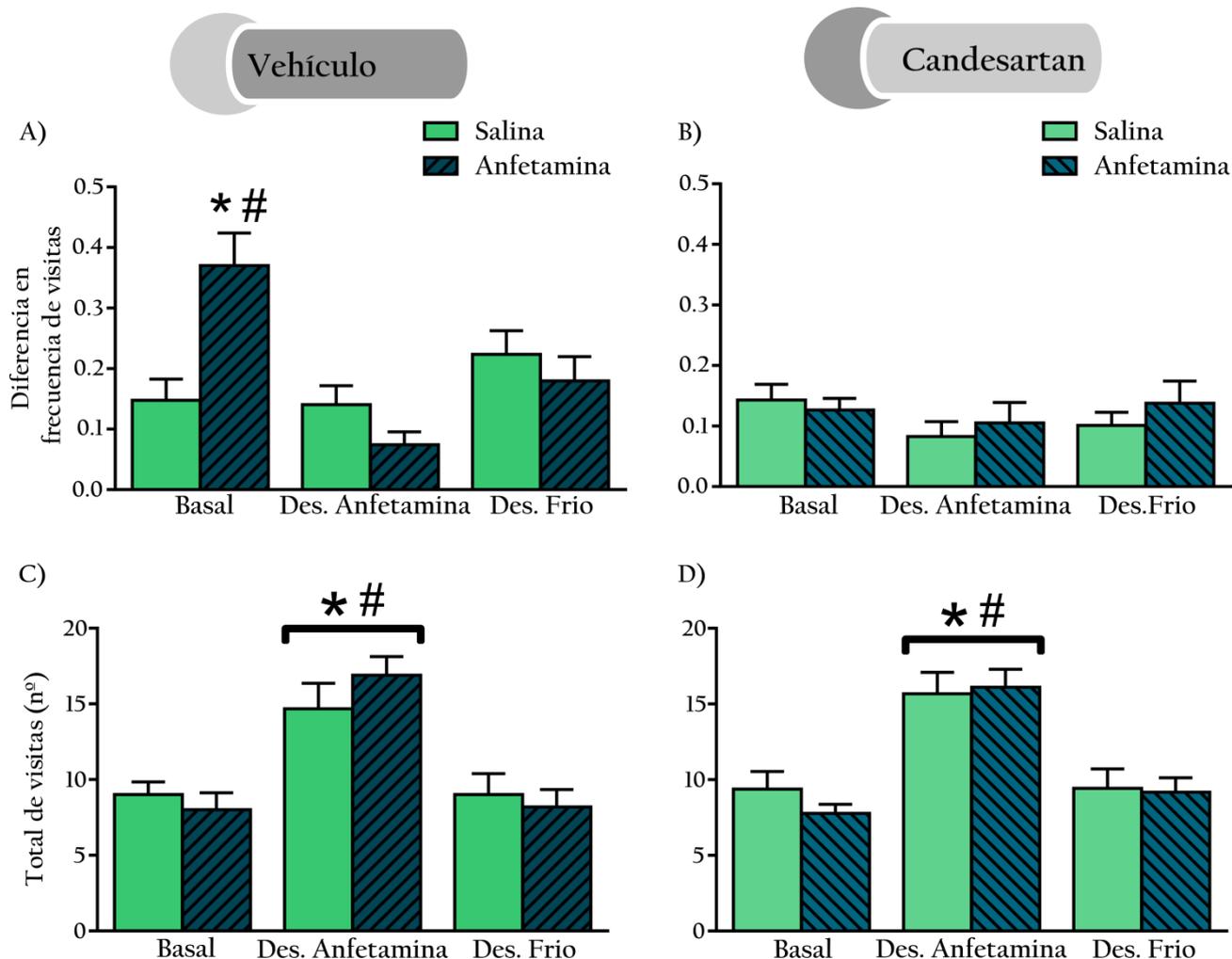
**Pre-tratamiento Vehículo.** El análisis indica un efecto significativo para **desafío**  $F_{(2,53)} = 8,4$  e **interacción tratamiento\*desafío**  $F_{(2, 53)} = 8,6$  ( $p < 0,05$ ). No hay efecto significativo para **tratamiento**  $F_{(1, 53)} = 1,5$  ( $p > 0,05$ ). El test de Bonferroni indica que en condiciones basales el grupo Veh-Anf presentó mayor diferencia en la frecuencia de visitas al primer y segundo hueco más explorado respecto a su control (Veh+Sal) y a los grupos Veh-Anf con Des. Anfetamina y Des. Frío ( $p < 0,05$ ). (**Figura 26 A**).

**Pre-tratamiento Candesartan.** El análisis indica que no existen diferencias entre los distintos grupos analizados ya que no se observa efecto significativo para los factores **tratamiento**  $F_{(1, 57)} = 0,4$ , **desafío**  $F_{(2, 57)} = 1,1$  e **interacción tratamiento\*desafío**  $F_{(2, 57)} = 0,4$  ( $p > 0,05$ ). (**Figura 26 B**).

**Visitas totales**

**Pre-tratamiento Vehículo.** El análisis indica un efecto significativo para, **desafío**  $F_{(2,53)} = 20,2$  ( $p < 0,05$ ). No se observa efecto para **tratamiento**  $F_{(1, 53)} = 0,02$  e **interacción tratamiento\*desafío**  $F_{(2, 53)} = 0,9$  ( $p > 0,05$ ). El test de Bonferroni indica que los grupos administrados con Des. Anfetamina realizan mayor n° de visitas que los grupos en condiciones basales y con Des. Frío ( $p < 0,05$ ). (**Figura 26 C**).

**Pre-tratamiento Candesartan.** El análisis indica un efecto significativo para, **desafío**  $F_{(2, 57)} = 22,9$  ( $p < 0,05$ ). No observa efecto para **tratamiento**  $F_{(1, 57)} = 0,2$  e **interacción tratamiento\*desafío**  $F_{(2, 57)} = 0,03$  ( $p > 0,05$ ). El test de Bonferroni indica que los grupos administrados con Des. Anfetamina realizan mayor n° de visitas que los grupos en condiciones basales y con Des. Frío ( $p < 0,05$ ). (**Figura 26 D**).

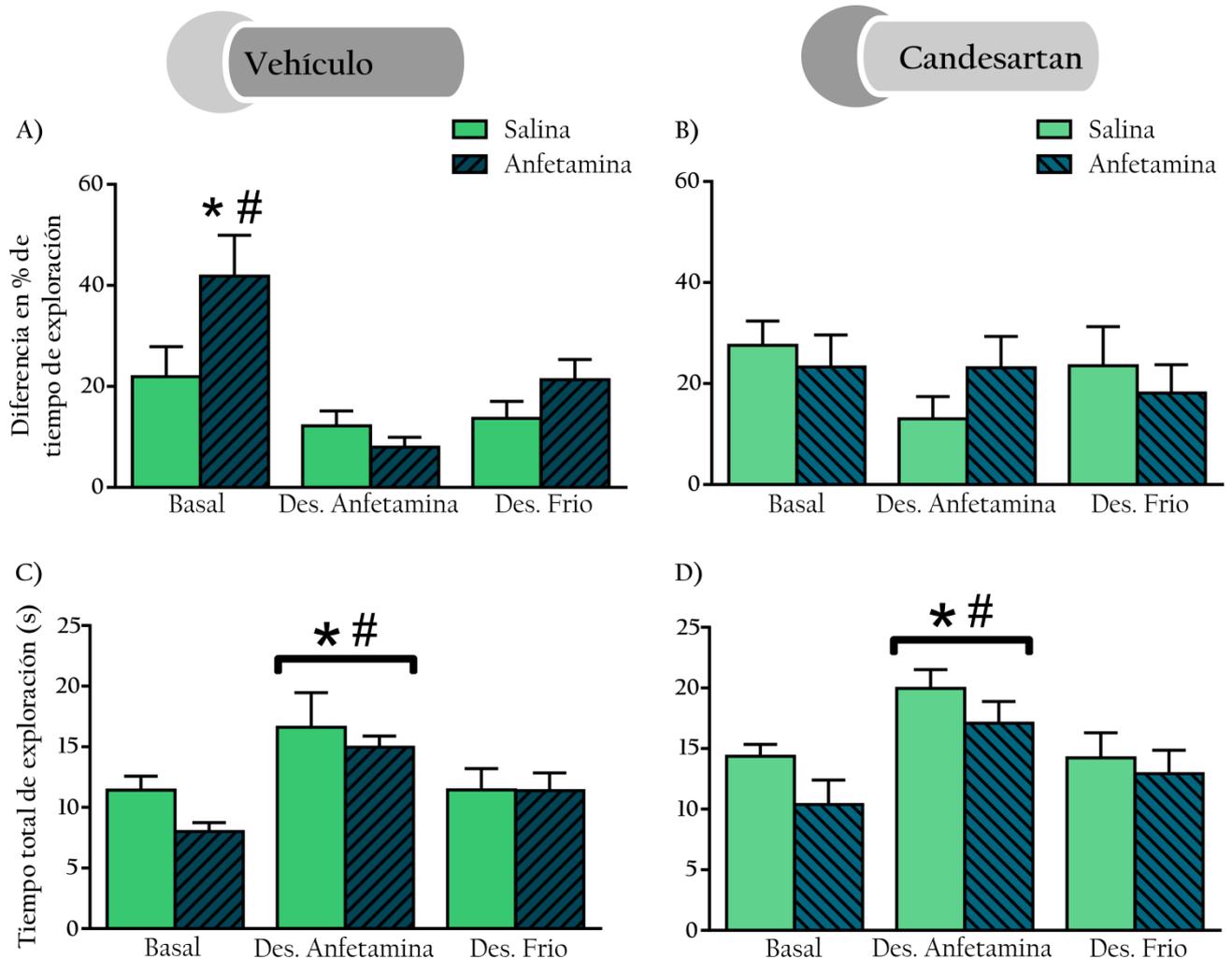


**Figura 26. Memoria de trabajo evaluada en campo perforado- Frecuencia de visitas.** Resultados de todos los grupos experimentales según el pre-tratamiento recibido: (A) y (C) Vehículo, (B) y (D) Candesartan. **Panel superior:** Diferencia en la frecuencia de visitas al primer y segundo hueco más explorado. \*diferente de Veh+Sal con igual desafío, #diferente de Veh+Anf con Des. Anfetamina y Des. Frío,  $p < 0,05$ . **Panel inferior:** Número total de visitas a todos los huecos. \*diferente de los grupos en condiciones basales, #diferente de los grupos con Des. Frío,  $n=9-12$ . Los valores se expresan como la media $\pm$ EE.

### Diferencia en porcentaje de tiempo de exploración

**Pre-tratamiento Vehículo.** El análisis indica un efecto significativo para **tratamiento**  $F_{(1, 53)} = 4,4$ , **desafío**  $F_{(2, 53)} = 11,4$  e **interacción tratamiento\*desafío**  $F_{(2, 53)} = 3,5$  ( $p < 0,05$ ). El test de Bonferroni indica que en condiciones basales el grupo Veh-Anf presentó mayor diferencia en el porcentaje de tiempo de exploración al primer y segundo hueco más explorado, respecto a su control (Veh+Sal) y a los grupos Veh-Anf con Des. Anfetamina y Des. Frío ( $p < 0,05$ ). (**Figura 27 A**).

**Pre-tratamiento Candesartan.** El análisis indica que no existen diferencias entre los distintos grupos analizados ya que no se observa efecto significativo para los factores **tratamiento**  $F_{(1, 57)} = 5 \times 10^{-4}$ , **desafío**  $F_{(2, 57)} = 0,7$  e **interacción tratamiento\*desafío**  $F_{(2, 57)} = 1$  ( $p > 0,05$ ). (**Figura 27 B**).



**Figura 27. Memoria de trabajo evaluada en campo perforado- Tiempo de exploración.** Resultados de todos los grupos experimentales según el pre-tratamiento recibido: (A) y (C) Vehículo, (B) y (D) Candesartan. **Panel superior:** Diferencia en el porcentaje de tiempo de exploración entre el primer y segundo hueco más explorado. \*diferente de Veh+Sal con igual desafío, #diferente de Veh+Anf con Des. Anfetamina y Des. Frío,  $p < 0,05$ . **Panel inferior:** Tiempo total de exploración de todos los huecos. \*diferente de los grupos en condiciones basales, #diferente de los grupos con Des. Frío,  $n=9-12$ . Los valores se expresan como la media $\pm$ EE.

### Tiempo total de exploración

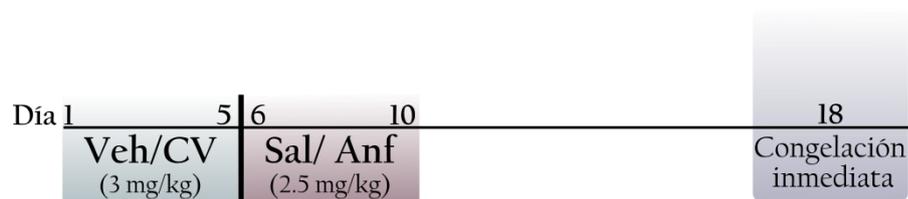
**Pre-tratamiento Vehículo.** El análisis indica un efecto significativo para, **desafío**  $F_{(2,53)} = 6,4$  ( $p < 0,05$ ). No se observa efecto para **tratamiento**  $F_{(1, 53)} = 1,4$  e **interacción tratamiento\*desafío**  $F_{(2, 53)} = 0,5$  ( $p > 0,05$ ). El test de Bonferroni indica que los grupos administrados con Des. Anfetamina exploraron más tiempo que los grupos en condiciones basales y con Des. Frío ( $p < 0,05$ ). (**Figura 27 C**).

**Pre-tratamiento Candesartan.** El análisis indica un efecto significativo para, **desafío**  $F_{(2, 57)} = 6,5$  ( $p < 0,05$ ). No se observa efecto para **tratamiento**  $F_{(1, 57)} = 3,3$  e **interacción tratamiento\*desafío**  $F_{(2, 57)} = 0,3$  ( $p > 0,05$ ). El test de Bonferroni indica que los grupos administrados con Des. Anfetamina exploraron más tiempo que los grupos en condiciones basales y con Des. Frío ( $p < 0,05$ ). (**Figura 27 D**).

**Objetivo 3:** Evaluar la participación de R-AT<sub>1</sub> en alteraciones estructurales y funcionales inducidas por anfetamina en amígdala basolateral e hipocampo.

### Objetivo 3a.

- Identificar las alteraciones en la red vascular inducidas por anfetamina en amígdala basolateral e hipocampo.
- Evaluar la participación de receptores AT<sub>1</sub> en el desarrollo de estos cambios.



**Esquema 7.** Protocolo experimental para la evaluación de la participación de R-AT<sub>1</sub> en las alteraciones inducidas por anfetamina en la red vascular de ABL e HPC.

#### Análisis estadístico

Los datos fueron analizados con ANOVA de dos vías, considerando **pre-tratamiento** (Veh/CV) y **tratamiento** (Sal/Anf) como las fuentes de variabilidad seguidos por el test de Bonferroni *post-hoc*.

#### Resultados

##### Amígdala basolateral

La exposición a anfetamina no modificó de manera significativa la estructura de la red vascular en ésta área analizada.

**Porcentaje de área ocupada por vasculatura.** El análisis indica que no hay efecto significativo para **pre-tratamiento**  $F_{(1, 15)} = 0,7$ ; **tratamiento**  $F_{(1, 15)} = 0,5$  e **interacción pre-tratamiento\*tratamiento**  $F_{(1, 15)} = 0,2$  ( $p > 0,05$ ). (**Figura 28 A**).

**Tortuosidad.** El análisis indica que no hay efecto significativo para **pre-tratamiento**  $F_{(1, 15)} = 1,4$ ; **tratamiento**  $F_{(1, 15)} = 0,008$  e **interacción pre-tratamiento\*tratamiento**  $F_{(1, 15)} = 0,1$  ( $p > 0,05$ ). (**Figura 28 B**).

No se observan diferencias significativas para **puntos de ramificación y diámetro**.

##### Hipocampo- Girus dentado

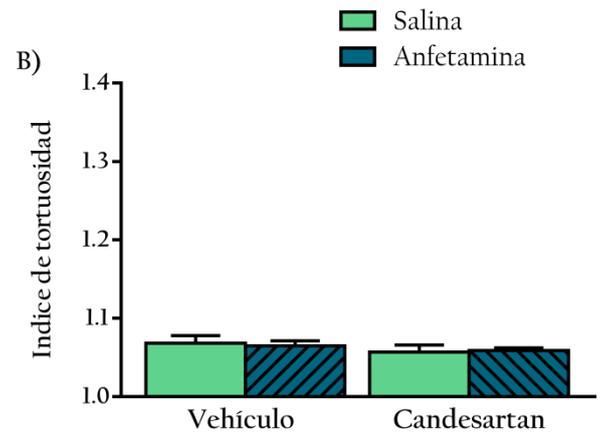
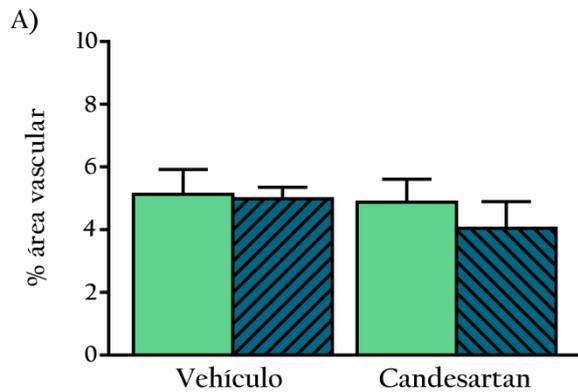
La exposición a Anf no modificó de manera significativa la estructura de la red vascular a nivel hipocampal.

**Porcentaje de área ocupada por vasculatura.** El análisis indica que no hay efecto significativo para **pre-tratamiento**  $F_{(1, 20)} = 0,08$ ; **tratamiento**  $F_{(1, 20)} = 0,1$  e **interacción pre-tratamiento\*tratamiento**  $F_{(1, 20)} = 2,9$  ( $p > 0,05$ ). (**Figura 28 C**).

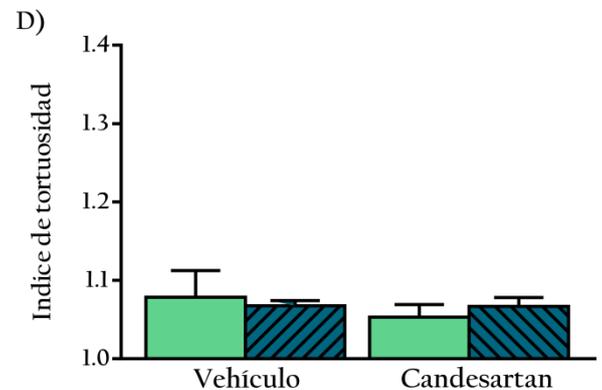
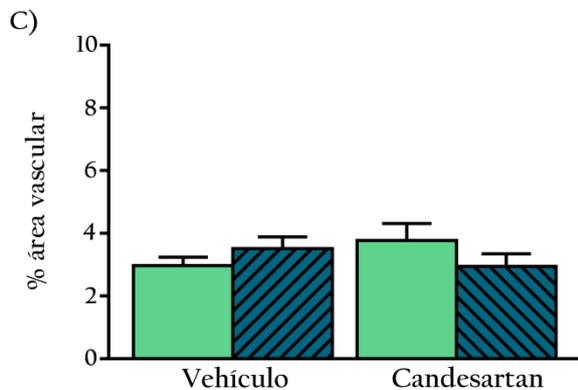
**Tortuosidad.** El análisis indica que no hay efecto significativo para **pre-tratamiento**  $F_{(1, 20)} = 0,4$ ; **tratamiento**  $F_{(1, 20)} = 0,004$  e **interacción pre-tratamiento\*tratamiento**  $F_{(1, 20)} = 0,4$  ( $p > 0,05$ ). (**Figura 28 D**).

No se observan diferencias significativas para **puntos de ramificación y diámetro.**

#### Amígdala basolateral



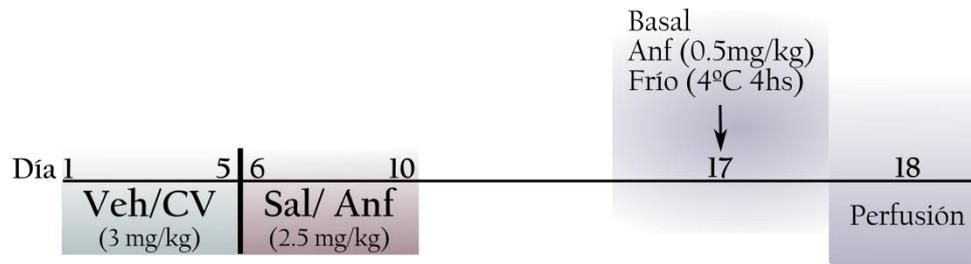
#### Hipocampo- Girus Dentado



**Figura 28. Estructura de la red vascular en amígdala basolateral e hipocampo.** Valores de dos de los parámetros evaluados para los 4 grupos experimentales en condiciones basales. **Panel superior:** Estructura vascular en ABL (A) Porcentaje de área ocupada por vasculatura (B) Índice de tortuosidad. n=4-5. **Panel inferior:** Estructura vascular en el GD (A) Porcentaje de área ocupada por vasculatura (B) Índice de tortuosidad. n=5-7. Los valores se expresan como la media±EE.

**Objetivo 3b.**

- Evaluar la participación de receptores AT<sub>1</sub> en la reactividad astrocitaria inducida por anfetamina en amígdala basolateral e hipocampo.



**Esquema 8.** Protocolo experimental para la evaluación de la participación de R-AT<sub>1</sub> en las alteraciones astrocitarias inducidas por anfetamina en ABL e HPC.

*Análisis estadístico*

Los datos fueron analizados por separado según el pre-tratamiento con Veh ó CV. En cada caso, se realizó un ANOVA de dos vías, considerando **tratamiento** (Sal/Anf) y **desafío** (Basal/ Des. Anfetamina/ Des. Frío) como las fuentes de variabilidad, seguidos por el test de Bonferroni en caso de ser necesario.

*Resultados*Amígdala basolateral

De manera similar a lo observado en CxPF infralímbica, no se observó astrogliosis luego de la exposición a anfetamina en condiciones basales, sin embargo se observó una respuesta sensibilizada de la reactividad astrocitaria en el grupo Veh+Anf sólo ante la re-exposición al psicoestimulante (Des. Anfetamina) y no con Des. Frío. Estas alteraciones inducidas por Anf no se observaron en los animales que recibieron un pre-tratamiento con CV. (**Figura 29 A y B**).

**Pre-tratamiento Vehículo.** El análisis indica un efecto significativo para **tratamiento**  $F_{(1, 31)} = 10,9$  y **desafío**  $F_{(2,31)} = 4,1$  ( $p < 0,05$ ). No hay efecto para **interacción tratamiento\*desafío**  $F_{(2, 31)} = 2,1$  ( $p > 0,05$ ). El test de Bonferroni indica que con Des. Anfetamina el grupo Veh-Anf presenta mayor reactividad glial que su control (Veh-Sal con Des. Anfetamina) y que los grupos Veh-Anf en condiciones basales y con Des. Frío ( $p < 0,05$ ) (**Figura 29 A**).

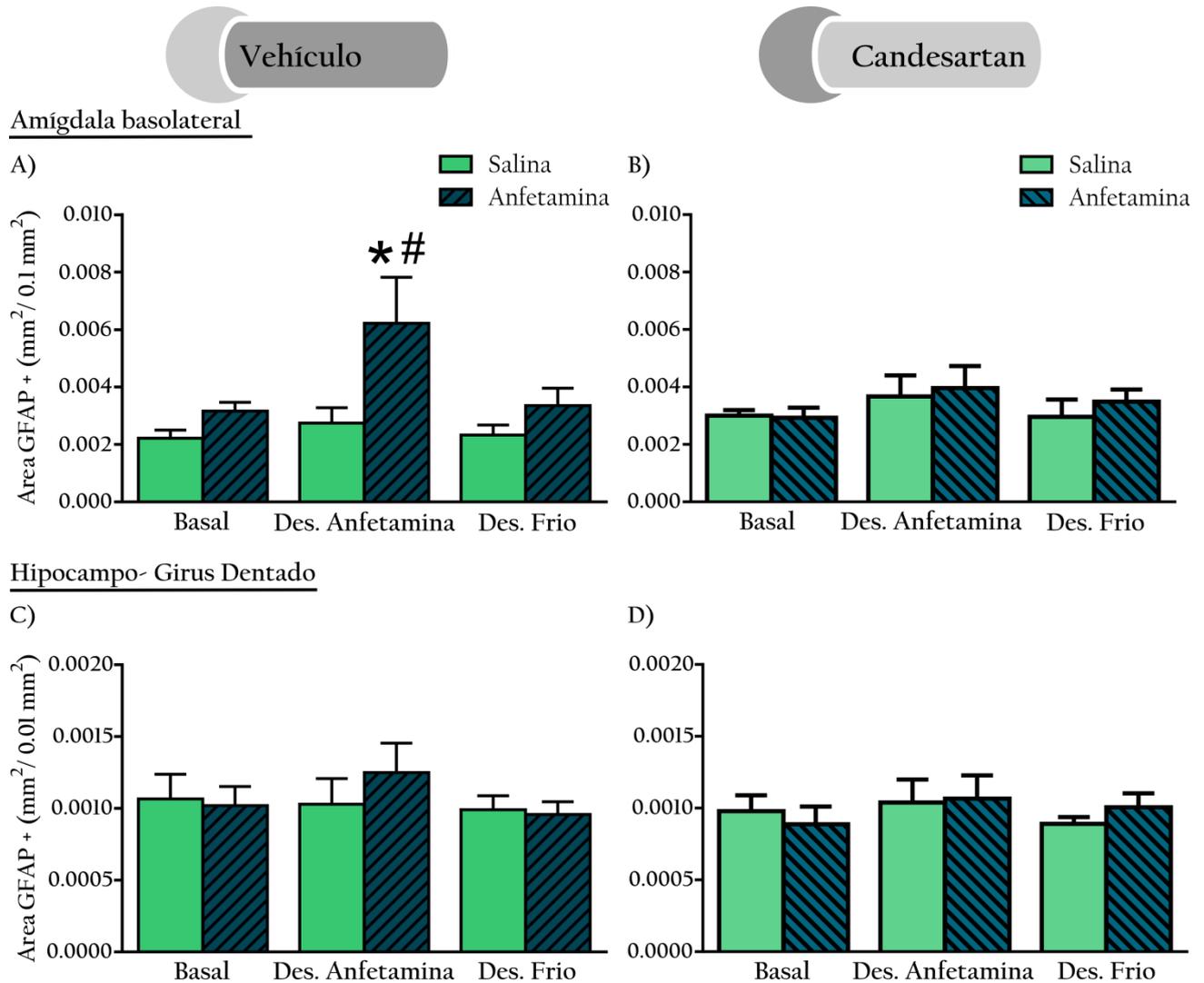
**Pre-tratamiento Candesartan.** El análisis indica que no existen diferencias entre los distintos grupos analizados ya que no se observa efecto significativo para los factores: **tratamiento**  $F_{(1, 27)} = 0,3$ , **desafío**  $F_{(2,27)} = 1,2$  e **interacción tratamiento\*desafío**  $F_{(2, 27)} = 0,2$  ( $p > 0,05$ ). (**Figura 29 B**)

Hipocampo- Girus dentado

La exposición a Anf no modificó de manera significativa la reactividad astrocitaria en ésta área ni en condiciones basales, ni frente a la administración de un desafío, independientemente del pretratamiento recibido (**Figura 29 C y D**).

**Pre-tratamiento Vehículo.** No se observa efecto significativo para los factores: **tratamiento**  $F_{(1, 34)} = 0,1$ , **desafío**  $F_{(2,34)} = 0,6$  e **interacción tratamiento\*desafío**  $F_{(2, 34)} = 0,5$  ( $p > 0,05$ ). (**Figura 29 A y C**).

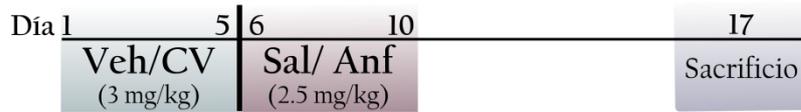
**Pre-tratamiento Candesartan.** No se observa efecto significativo para los factores: **tratamiento**  $F_{(1, 28)} = 0,03$ , **desafío**  $F_{(2,28)} = 0,6$  e **interacción tratamiento\*desafío**  $F_{(2, 28)} = 0,4$  ( $p > 0,05$ ). (Figura 29 B y D).



**Figura 29. Reactividad astrocitaria en amígdala basolateral e hipocampo.** Área GFAP + para todos los grupos experimentales según el pretratamiento recibido: (A) y (C) Vehículo (B) y (D) Candesartan **Panel superior:** resultados obtenidos en ABL. \*diferente de Veh+Sal con igual desafío, #diferente de Veh+Anf en condiciones basales y con Des. Frío,  $p < 0,05$ ,  $n = 4-8$ . **Panel inferior:** resultados obtenidos GD,  $n = 5-8$ . Los valores se expresan como la media  $\pm$  EE.

**Objetivo 3c:**

- Evaluar la neuroadaptación inducida por anfetamina a nivel de la plasticidad hipocampal y la participación de receptores AT<sub>1</sub> en este evento.



**Esquema 9.** Protocolo experimental para la evaluación de la participación de R-AT<sub>1</sub> en las alteraciones inducidas por anfetamina sobre la plasticidad hipocampal.

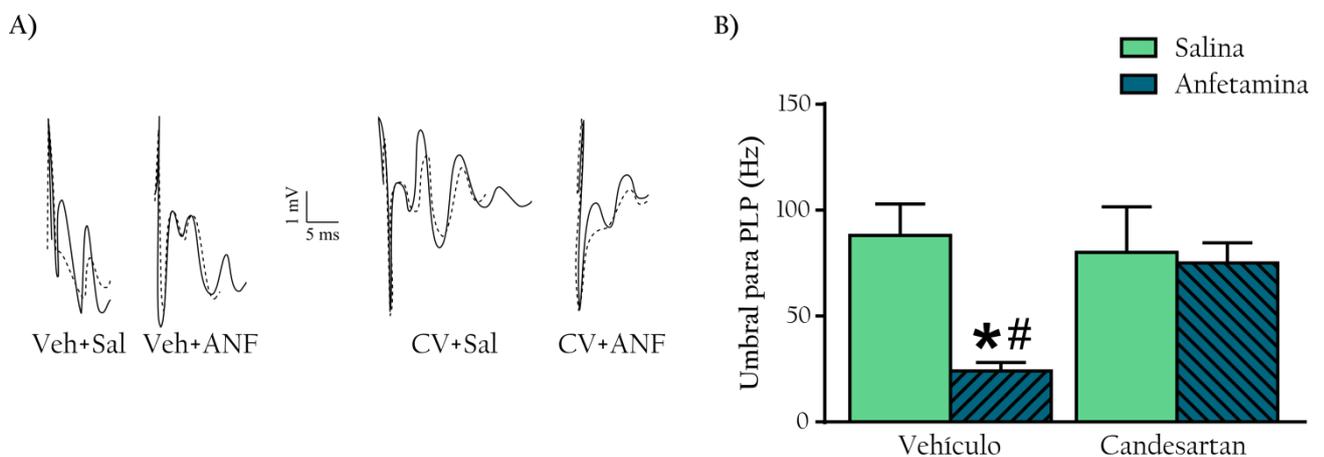
*Análisis estadístico*

El valor umbral necesario para la generación de LTP en los 4 grupos experimentales se analizó con ANOVA de dos vías considerando **pre-tratamiento** (Veh/ CV) y **tratamiento** (Sal/Anf) como fuentes de variabilidad. Se aplicó el test de Bonferroni *post-hoc*.

*Resultados*

La exposición al psicoestimulante modificó la eficacia sináptica a nivel hipocampal, observado como un menor umbral para la generación de LTP en condiciones basales. Esta neuroadaptación no fue observada con un pre-tratamiento con CV (**Figura 30**).

El análisis indica un efecto significativo para **tratamiento**  $F_{(1, 14)} = 6,4$  e **interacción pre-tratamiento\*tratamiento**  $F_{(1, 14)} = 4,7$  ( $p < 0,05$ ); mientras que no hay efecto para el factor **pre-tratamiento**  $F_{(1, 14)} = 2,5$  ( $p > 0,05$ ). El test de Bonferroni indica que el grupo Veh-Anf presentó menor valor umbral para generar LTP respecto de los demás grupos ( $p < 0,05$ ) (**Figura 30 B**).



**Figura 30. Plasticidad hipocampal.** (A) Esquemas representativos de las señales analizadas en cada grupo experimental, las líneas punteadas muestran la señal basal y la línea continua la señal una vez alcanzada la LTP. (B) Valor umbral para la generación de LTP.\*diferente de grupos Veh+Sal, #diferente de grupo CV+ANF,  $n=4-5$ ,  $p < 0,05$ . Los valores se muestran como la media  $\pm$  EE.

### Objetivo 3d.

- Identificar el protocolo de condicionamiento apropiado para evaluar memoria a largo plazo con un test de evitación inhibitoria
- Evaluar los efectos agudos de un desafío farmacológico en la tarea de evitación inhibitoria y la participación de receptores AT<sub>1</sub> en estos eventos.
- Comparar los efectos agudos sobre la tarea de evitación inhibitoria observados para un desafío farmacológico y fisiológico.

### *Intensidad del shock*

#### *Análisis estadístico*

Los datos de **Latencia 2** fueron analizados con el test de Kruskal-Wallis, considerando las **intensidades del shock** eléctrico como las fuentes de variabilidad (Sin shock; 0,2mA y 0,5mA), seguido por el test de Dunn *post-hoc*.

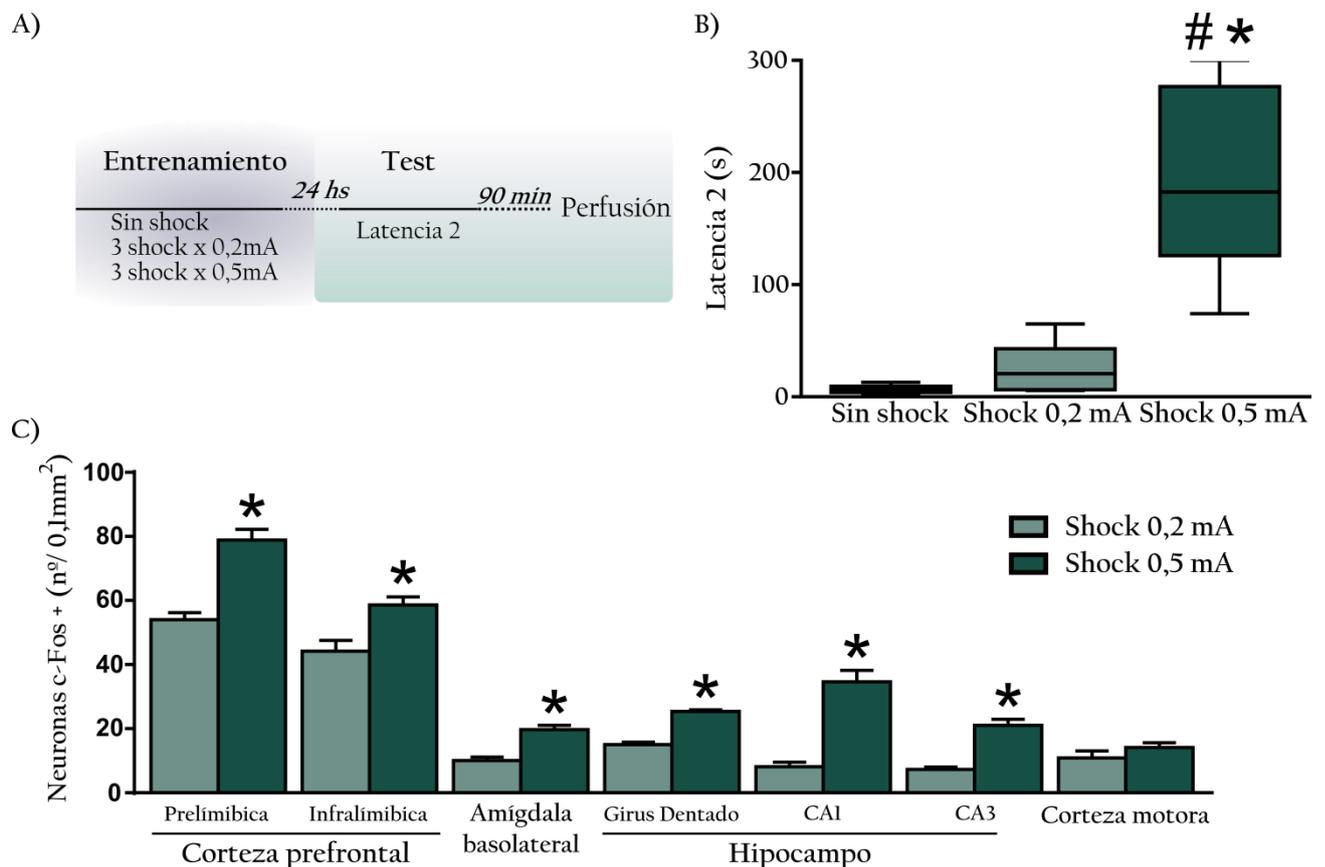
El análisis estadístico utilizado para evaluar el **patrón de actividad neuronal**, medida como el número de neuronas positivas para el factor de transcripción c-Fos, fue ANOVA de una vía considerando las 2 **intensidades de shock** eléctrico (0,2 y 0,5mA) como fuente de variabilidad, seguido por el test de Bonferroni *post-hoc* para el análisis por parejas en las distintas áreas evaluadas.

#### *Resultados*

Los valores de **Latencia 2**, medidos durante el test de evitación inhibitoria, fueron significativamente mayores para el grupo que recibió 3 shocks de 0,5mA en comparación con el grupo que no recibió shock o 3 shocks de 0,2mA. Esto es considerado como un mejor desempeño en el test, consecuencia de la formación de una traza de memoria, que fue coincidente con un aumento de la **actividad neuronal** en áreas clásicamente relacionadas con la expresión de memoria a largo plazo. Por estas razones el protocolo con 3 shocks de 0,5mA fue seleccionado para realizar el resto de los experimentos.

**Latencia 2.** El análisis indica que existen diferencias significativas entre los grupos  $H_{(2)} = 20,6$  ( $p < 0,05$ ). El análisis *post-hoc* indica que el grupo que recibe shock de 0,5mA presentó mayor valor de Latencia 2 que los grupos que no recibieron shock o 3 shocks de 0,2mA (**Figura 31 B**).

**Patrón de actividad neuronal.** El análisis indica que existen diferencias significativas entre los grupos  $F_{(13, 76)} = 105, 5$  ( $p < 0,05$ ). El análisis *post-hoc* indica que el grupo que recibe shock de 0,5mA presentó mayor número de neuronas c-Fos positivas que el grupo que recibió shock de 0,2mA para todas las áreas analizadas que participan en la expresión de memorias a largo plazo: CPF prelímbica e infralímbica, ABL e HPC (GD, CA1 y CA3) ( $p < 0,05$ ). No se observan diferencias en corteza motora, la cual fue considerada en este estudio como área control negativo (**Figura 31 C**).



**Figura 31. Evitación inhibitoria: intensidad de shock y patrón de activación neuronal:** (A) Esquema del protocolo experimental utilizado para seleccionar la intensidad del shock (B) Valores de Latencia 2 para las 3 condiciones evaluadas, #diferente de grupo sin shock, \*diferente de grupo que recibió 3 shocks de 0,2mA,  $p < 0,05$ ,  $n = 6-11$ . Los valores se muestran como la mediana con rango intercuartílico y valores mínimo y máximo (C) Patrón de activación neuronal 90 min después del test, \*diferente de grupo que recibió 3 shocks de 0,2mA para la misma área analizada,  $p < 0,05$ ,  $n = 5-8$ . Los valores se expresan como la media  $\pm$  EE.

### Efecto agudo de desafío anfetamina. Rol de receptores $AT_1$

#### Análisis estadístico

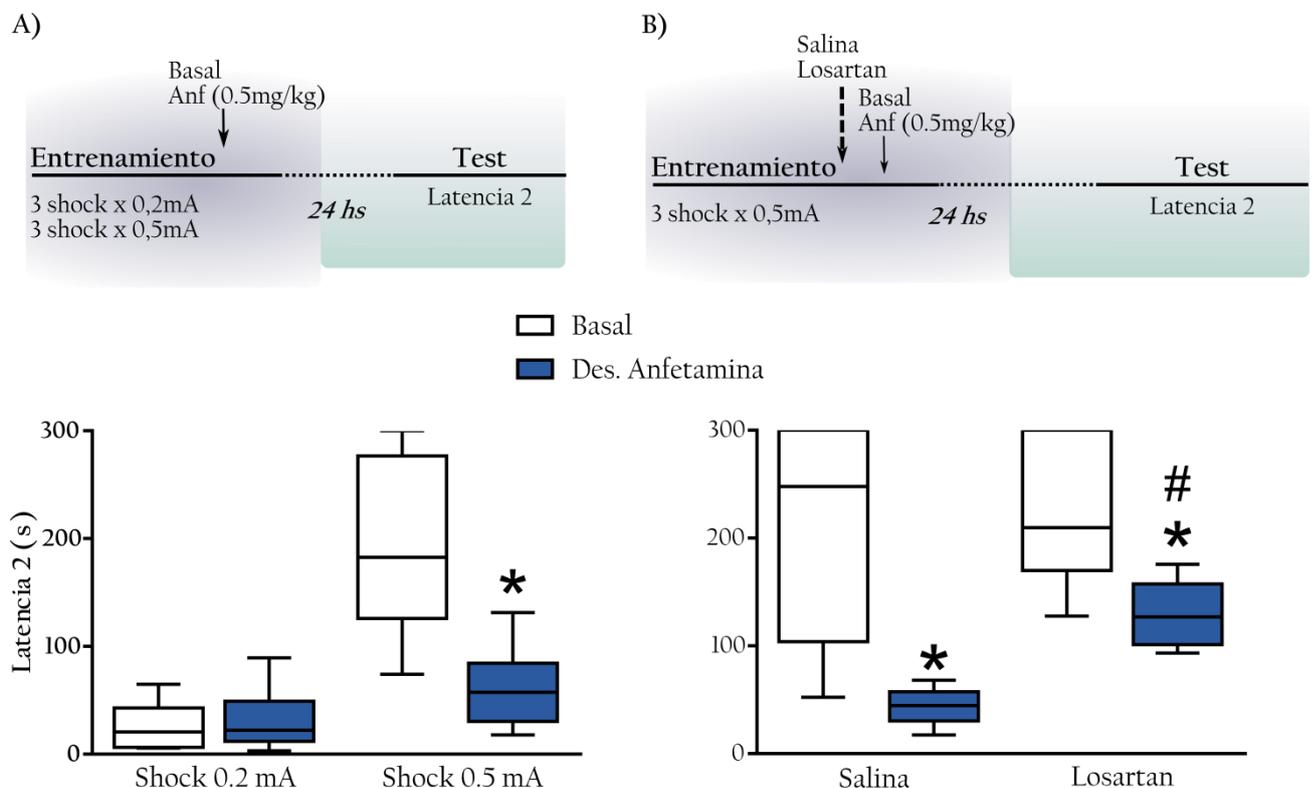
Los valores de **Latencia 2** fueron analizados con el test de Scheirer-Ray-Hare. En el primer caso se tomaron como fuentes de variabilidad la **intensidad del shock** durante el entrenamiento (0,2 y 0,5mA) y el **desafío** administrado inmediatamente después del entrenamiento (Basal/ Des. Anfetamina). En el segundo caso, se trabajó sólo con shock de 0,5mA y las variables tenidas en cuenta fueron el **pretratamiento** agudo recibido inmediatamente después del entrenamiento (Salina/Losartan) y el **desafío** administrado a continuación (Basal/ Des. Anfetamina). En ambos casos se utilizó el test Mann-Whitney con corrección de Bonferroni *post-hoc*.

#### Resultados

Se identificó que el Des. Anfetamina tiene un efecto de interferencia en la consolidación de una memoria de evitación inhibitoria. Este efecto involucra la actividad de receptores  $AT_1$  ya que se observó una reversión parcial cuando se administró un antagonista previo al desafío. Cabe destacar que no se observó efecto alguno de Des. Anfetamina cuando la intensidad del shock es menor.

**Efecto agudo de Des. anfetamina.** El análisis indica que existe efecto significativo para **intensidad del shock**  $H_{(1)}= 23,5$  e **interacción intensidad del shock\*desafío**  $H_{(1)}= 3,9$  ( $p<0,05$ ). No hay efecto significativo para **desafío**  $H_{(1)}= 2,8$  ( $p>0,05$ ). El análisis *post-hoc* corrobora que el grupo que recibe shock de 0,5mA en condición basal presentó mayor Latencia 2 que los grupos que recibieron un shock de 0,2mA; mientras que el grupo entrenado con shock de 0,5mA que recibe Des. Anfetamina mostró significativamente menor Latencia 2 que su control ( $p< 0,0125$ ) (**Figura 32 A**).

**Efecto agudo de Des. Anfetamina. Rol de receptores AT<sub>1</sub>.** El análisis indica que existe efecto significativo para **pretratamiento**  $H_{(1)}= 5,3$  y **desafío**  $H_{(1)}= 15,2$  ( $p<0,05$ ). No hay efecto significativo para **interacción pretratamiento\*desafío**  $H_{(1)}= 1,4$  ( $p>0,05$ ). El análisis *post-hoc* indica menor Latencia 2 para los grupos que reciben Des. Anfetamina después del entrenamiento; a su vez, dentro de los grupos que reciben éste desafío, los animales pretratados en forma aguda con Losartan presentaron mayor Latencia 2 que aquellos que reciben Salina i.c.v. ( $p<0,125$ ) (**Figura 32 B**)



**Figura 32. Evitación inhibitoria: Efecto agudo de Anfetamina- Rol de receptores AT<sub>1</sub>:** (A) Esquema del protocolo experimental utilizado para evaluar el efecto de Des. Anfetamina luego del entrenamiento; debajo el gráfico muestra la Latencia 2 de los 4 grupos evaluados, \*diferente del grupo que recibió shock de 0,5mA en condición basal,  $p<0,0125$ ,  $n=10-14$ . (B) Esquema del protocolo experimental utilizado para evaluar el rol de receptores AT<sub>1</sub> en el efecto de Des. Anfetamina luego del entrenamiento; debajo el gráfico muestra la Latencia 2 de los 4 grupos evaluados, \*diferente de su grupo control (Basal), #diferente de grupo Salina+ Des. Anfetamina,  $p<0,0125$ ,  $n=8-9$ . Los valores se muestran como la mediana con rango intercuartílico y valores mínimo y máximo.

### Efecto agudo de desafíos

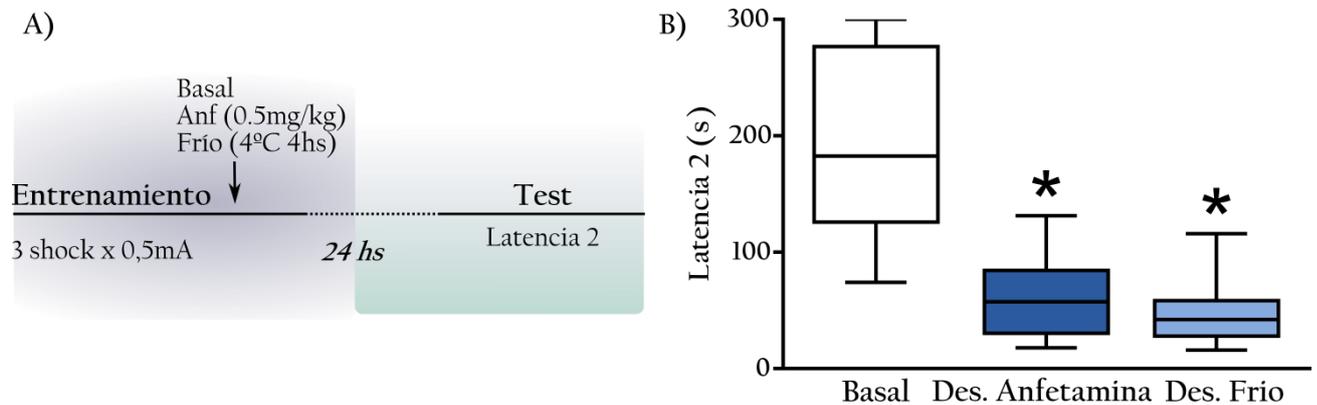
#### Análisis estadístico

Los valores de **Latencia 2** fueron analizados con el test de Kruskal-Wallis considerando **desafío** administrado inmediatamente después del entrenamiento como las fuentes de variabilidad (Basal/ Des. Anfetamina/ Des. Frío), seguido por el test de Dunn *post-hoc*.

#### Resultados

Este experimento permitió identificar un efecto interferente similar sobre la consolidación de una memoria de evitación inhibitoria para ambos desafíos utilizados en el presente trabajo: Des. Anfetamina y Des. Frío.

El análisis indica que existen diferencias significativas entre los grupos  $H_{(2)} = 19,5$  ( $p < 0,05$ ). El análisis *post-hoc* indica que los grupos que reciben Des. Anfetamina y Des. Frío inmediatamente después del entrenamiento mostraron menor Latencia 2 que las del grupo Basal ( $p < 0,05$ ) (**Figura 33 B**).



**Figura 33. Evitación inhibitoria: Efecto agudo de desafíos:** (A) Esquema del protocolo experimental utilizado para evaluar el efecto agudo de los desafíos luego del entrenamiento (B) Valores de Latencia 2 obtenidos para los desafíos administrados inmediatamente después del entrenamiento, \*diferente de grupo Basal,  $p < 0,05$ ,  $n = 10-15$ . Los valores se muestran como la mediana con rango intercuartílico y valores mínimo y máximo.

### Objetivo 3e:

- Evaluar la neuroadaptación inducida por anfetamina en la memoria a largo plazo y la participación de receptores AT<sub>1</sub> en estos eventos.

#### *Análisis estadístico*

Los valores de **Latencia 2** fueron analizados por separado según el pre-tratamiento con vehículo/CV con el test de Scheirer-Ray-Hare. Se tomó como fuentes de variabilidad el **tratamiento** (Sal/ Anf) y el **desafío** recibido inmediatamente después del entrenamiento (Basal/ Des. Anfetamina/ Des. Frío). Se utilizó el test de Mann-Whitney con corrección de Bonferroni *post-hoc*.

El patrón de **actividad neuronal** fue evaluado en estos grupos experimentales en las áreas que presentaron una mayor actividad en el experimento X. En este caso, el número de neuronas positivas para el factor de transcripción c-Fos, fue analizado por separado según el pre-tratamiento con vehículo/CV. Para ello se utilizó ANOVA de dos vías, considerando como fuentes de variabilidad el **tratamiento** (Sal/ Anf) y el **desafío** recibido inmediatamente después del entrenamiento (Basal/ Des. Anfetamina/ Des. Frío). En caso de ser necesario se aplicó el test de Bonferroni *post-hoc*.

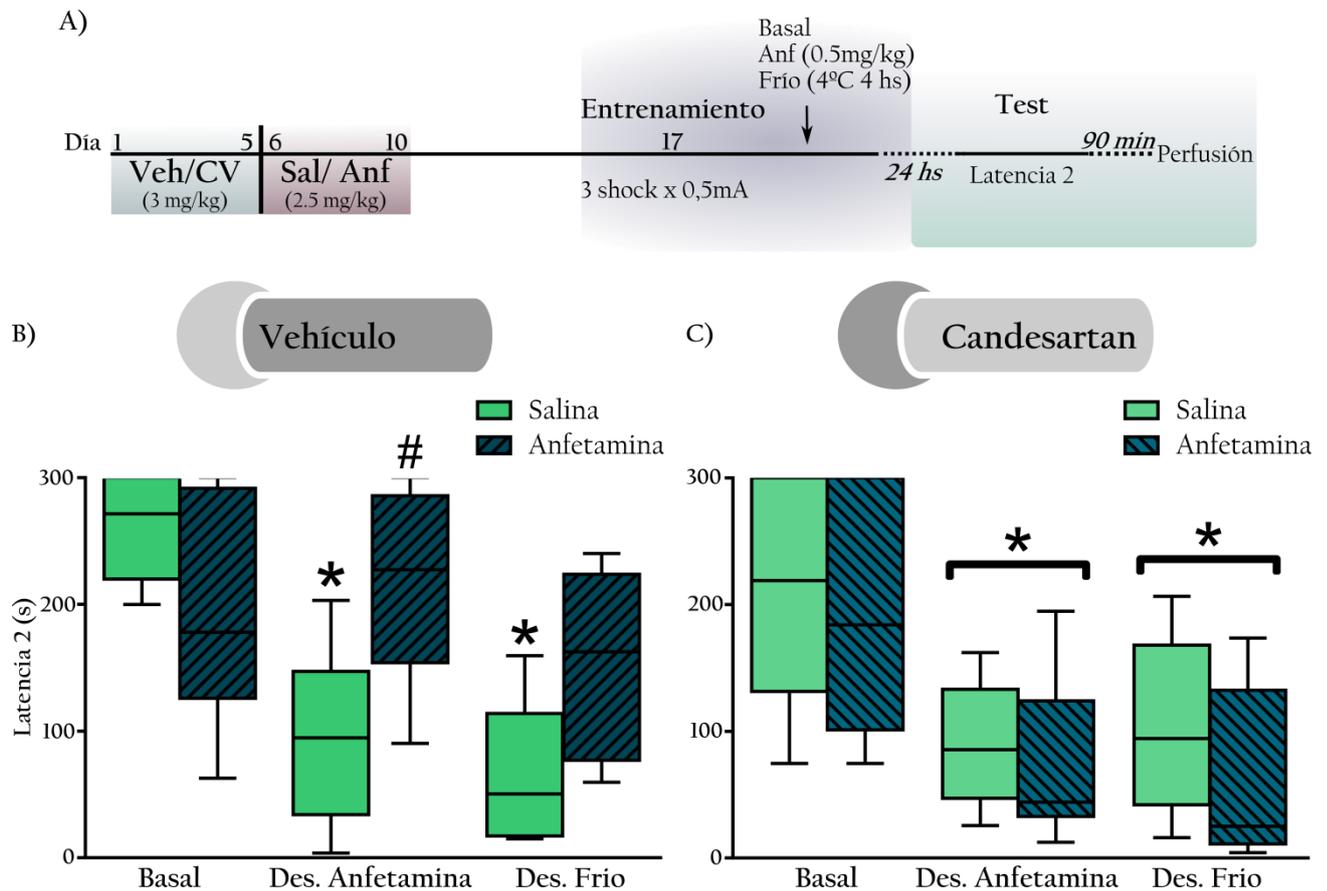
#### *Resultados*

##### **Evitación inhibitoria**

Se corroboró la interferencia con Des. Anfetamina y Des. Frío en la consolidación de una memoria de evitación inhibitoria en los grupos controles (Veh+Sal/ CV+Sal). Las adaptaciones inducidas por exposición previa a Anf fueron observadas como una resistencia al efecto de interferencia de Des. Anfetamina y Des. Frío. El desarrollo de estos cambios involucra a receptores AT<sub>1</sub> ya que el grupo pre-tratado con CV mostró el mismo patrón de comportamiento que los grupos controles, siendo evidente el efecto de interferencia de Des. Anfetamina y Des. Frío.

**Pre-tratamiento Vehículo.** El análisis indica un efecto significativo para **desafío**  $H_{(2)}= 15,3$  e **interacción tratamiento\*desafío**  $H_{(2)}= 13,4$  ( $p < 0,05$ ). No hay efecto para **tratamiento**  $H_{(1)}= 3,8$  ( $p > 0,05$ ). El test Mann-Whitney con corrección de Bonferroni indica que los grupos controles (Veh+Sal) presentaron menor Latencia 2 cuando recibieron Des. Anfetamina y Des. Frío inmediatamente después del entrenamiento, que el mismo grupo en condición basal ( $p < 0,007$ ). Los grupos Veh-Anf no presentaron diferencias entre sí en Latencia 2 independientemente del desafío recibido (**Figura 34 B**).

**Pre-tratamiento Candesartan.** El análisis indica un efecto significativo para **desafío**  $H_{(2)}= 24,1$  ( $p < 0,05$ ). No se observa efecto para **tratamiento**  $H_{(1)}= 2,5$  e **interacción tratamiento\*desafío**  $H_{(2)}= 0,8$  ( $p > 0,05$ ). El test Mann-Whitney con corrección de Bonferroni indica que, independientemente del tratamiento recibido, los grupos que reciben Des. Anfetamina y Des. Frío inmediatamente después del entrenamiento presentaron menor Latencia 2 que aquellos en condiciones basales ( $p < 0,025$ ) (**Figura 34 C**).



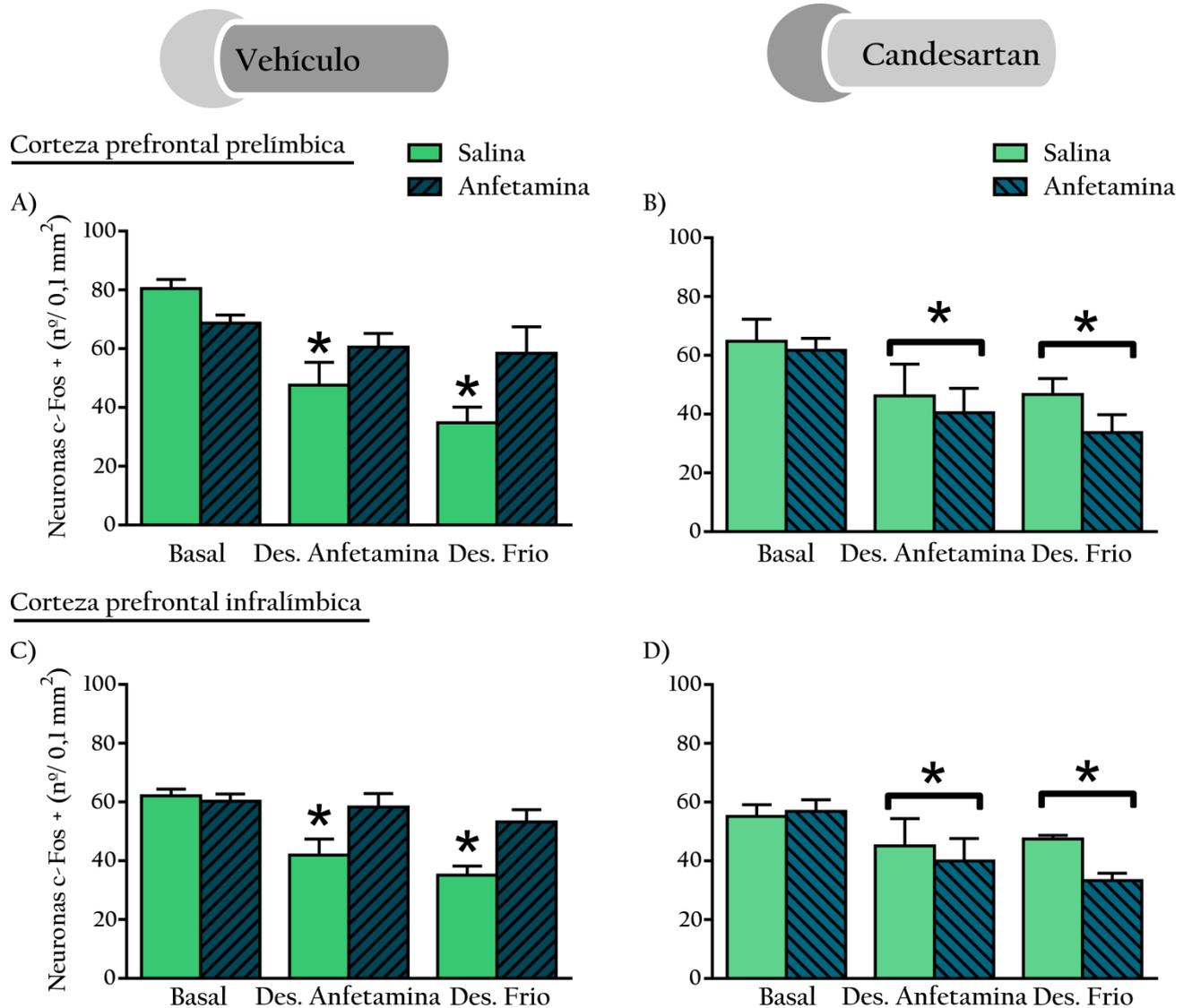
**Figura 34. Evitación inhibitoria: neuroadaptación inducida por Anfetamina y rol de receptores AT<sub>1</sub>** (A) Esquema del protocolo experimental utilizado para evaluar el efecto agudo de los desafíos luego de la exposición al psicoestimulante y la participación de receptores AT<sub>1</sub> en estos eventos (B) Valores de Latencia 2 para los grupos pre-tratados con Vehículo.\*diferente del mismo grupo en condiciones basales, #diferente de grupo Veh+Sal con igual desafío,  $p < 0,007$ ,  $n = 9-14$ . (C) El gráfico muestra los valores de Latencia 2 para los grupos pre-tratados con candesartan.\*diferente de los grupo en condiciones basales,  $p < 0,025$ ,  $n = 10-15$ . Los valores se muestran como la mediana con rango intercuartílico y valores mínimo y máximo.

### Patrón de activación neuronal. Corteza Prefrontal

En áreas corticales se observó un patrón de activación neuronal coincidente con la expresión de una memoria de evitación inhibitoria. En este sentido se observó que aquellos grupos experimentales que conductualmente expresan el efecto de interferencia de los desafíos (menor Latencia 2) muestran también un menor número de neuronas activas. Al igual que ocurre con los valores de Latencia 2 esta disminución de la actividad neuronal no se observó en los grupos que recibieron tratamiento de Anf (Veh+Anf) y fue prevenido por el pre-tratamiento con CV.

**Pre-tratamiento Vehículo.** El análisis indica efecto significativo para **interacción tratamiento\*desafío** en *CPF prelímbica* ( $F_{(2, 21)} = 4,6$ ) y *CPF infralímbica* ( $F_{(2, 21)} = 4,2$ ) ( $p < 0,05$ ). En ambos casos, el test de Bonferroni indica que los grupos controles (Veh+Sal) presentaron menor número de neuronas c-Fos positivas cuando recibieron Des. Anfetamina y Des. Frío inmediatamente después del entrenamiento, que el mismo grupo en condición basal ( $p < 0,05$ ). Los grupos Veh-Anf no presentaron diferencias entre sí en Latencia 2 independientemente del desafío recibido (Figura 35 A y C).

**Pre-tratamiento Candesartan.** El análisis indica un efecto significativo para **desafío** en *CPF prelímbica* ( $F_{(2, 24)} = 6,5$ ) y *CPF infralímbica* ( $F_{(2, 24)} = 5,5$ ) ( $p < 0,05$ ). En ambos casos, el test de Bonferroni indica que, independientemente del tratamiento recibido, los grupos que reciben Des. Anfetamina y Des. Frío inmediatamente después del entrenamiento presentaron menor número de neuronas c-Fos positivas que aquellos en condiciones basales ( $p < 0,05$ ) (**Figura 35 B y D**).



**Figura 35. Evitación inhibitoria: Patrón de activación neuronal en corteza prefrontal.** Número de neuronas c-Fos positivas en CPF prelímbica e infralímbica para todos los grupos experimentales según el pretratamiento recibido: **(A)** y **(C)** Vehículo, \*diferente del grupo Veh+Sal en condición basal,  $p < 0,05$ ,  $n = 4-5$ . **(B)** y **(D)** Candesartan, \*diferente de los grupos en condiciones basales,  $p < 0,05$ ,  $n = 4-6$ . Los valores se muestran como la media  $\pm$  EE.

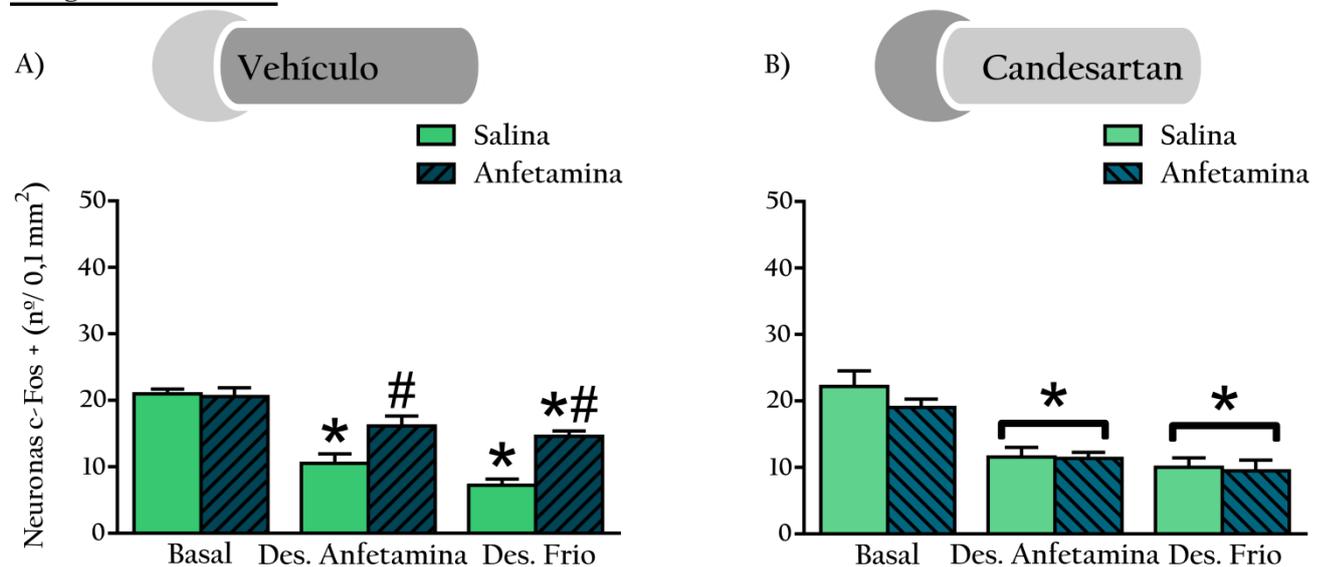
### Patrón de activación neuronal- amígdala basolateral

En ABL se observó un resultado similar al obtenido en CPF. Nuevamente aquellos grupos experimentales que conductualmente expresan el efecto de interferencia de los desafíos (menor Latencia 2) muestran menor número de neuronas activas en ésta área. La disminución de la actividad neuronal no se observó en los grupos que recibieron tratamiento con Anf (Veh+Anf) y fue prevenido por el pre-tratamiento con CV.

**Pre-tratamiento Vehículo.** El análisis indica un efecto significativo para **interacción tratamiento\*desafío**  $F_{(2, 22)} = 6,7$  ( $p < 0,05$ ). El test de Bonferroni indica que los grupos controles (Veh+Sal) presentaron menor número de neuronas c-Fos positivas cuando recibieron Des. Anfetamina y Des. Frío inmediatamente después del entrenamiento, que el mismo grupo en condición basal ( $p < 0,05$ ). Los grupos Veh-ANF no presentan diferencias entre ellos independientemente del desafío recibido y cuando reciben Des. Anfetamina y Des. Frío presentan significativamente mayor número de neuronas c-Fos positivas que el grupo Veh+Sal con igual desafío ( $p < 0,05$ ) (**Figura 36 A**).

**Pre-tratamiento Candesartan.** El análisis indica un efecto significativo para **desafío**  $F_{(2, 24)} = 26,7$  ( $p < 0,05$ ). El test de Bonferroni indica que, independientemente del tratamiento recibido, los grupos que reciben Des. Anfetamina y Des. Frío inmediatamente después del entrenamiento presentaron menor Latencia 2 que aquellos en condiciones basales ( $p < 0,05$ ) (**Figura 36 B**).

### Amígdala basolateral



**Figura 36. Evitación inhibitoria: Patrón de activación neuronal en amígdala basolateral.** Número de neuronas c-Fos positivas para todos los grupos experimentales según el pretratamiento recibido. (A) Vehículo, \*diferente del mismo grupo de tratamiento en condición basal, #diferente de grupo Veh+Sal con igual desafío  $p < 0,05$ ,  $n = 4-6$ . (B) Candesartan. \*diferente de los grupos en condiciones basales,  $p < 0,05$ ,  $n = 4-7$ . Los valores se muestran como la media  $\pm$  EE.

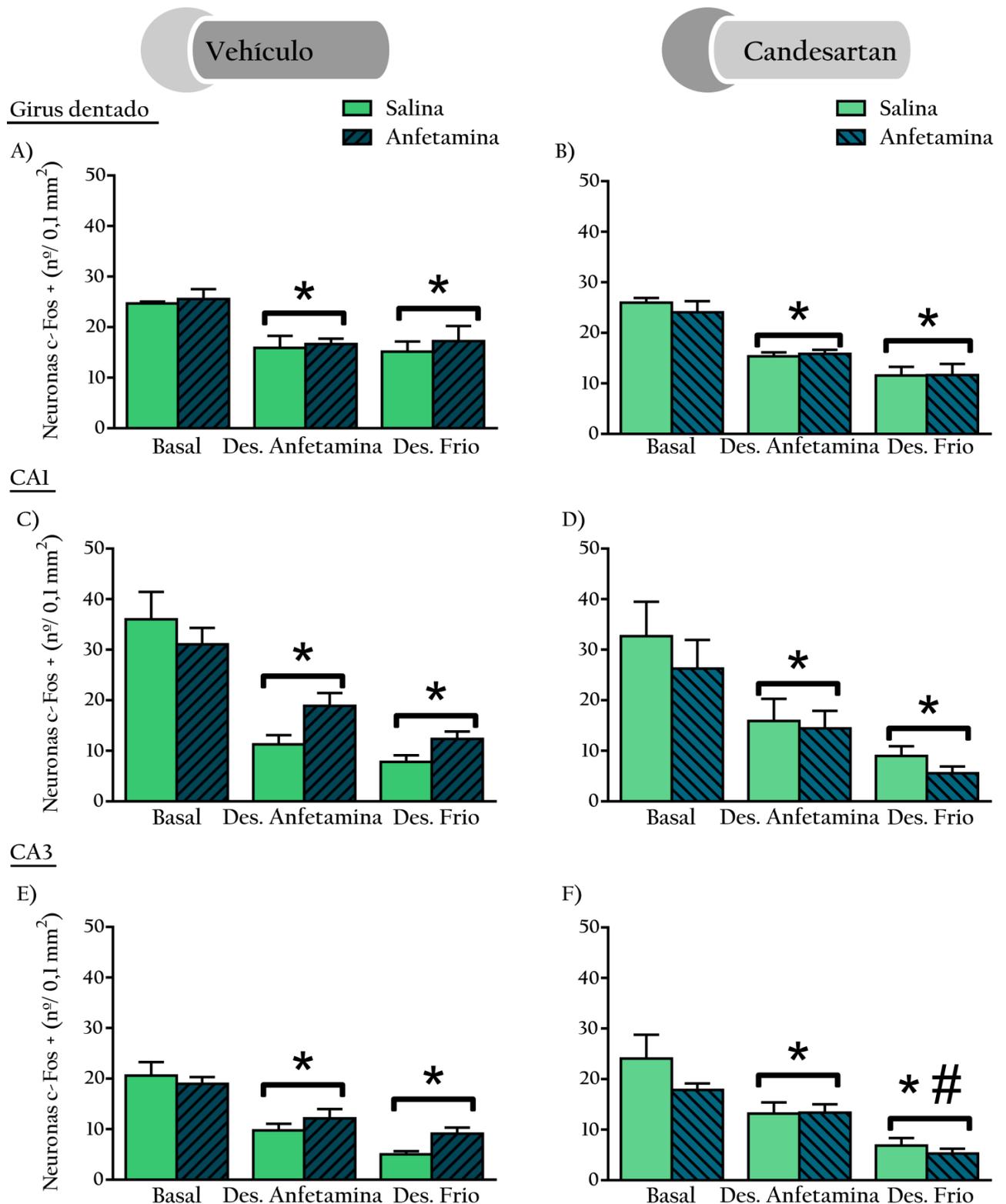
### Patrón de activación neuronal- áreas hipocampales

En línea con los casos anteriores se observó que aquellos grupos experimentales que conductualmente expresan el efecto de interferencia de los desafíos (menor Latencia 2) muestran también un menor número de neuronas activas. Sin embargo, en este caso la neuroadaptación inducida por Anf queda en evidencia Des. Anfetamina y Des. Frío ya que, a pesar de presentar valores elevados de Latencia 2, se observó una disminución en el número de neuronas activas en las regiones hipocampales evaluadas.

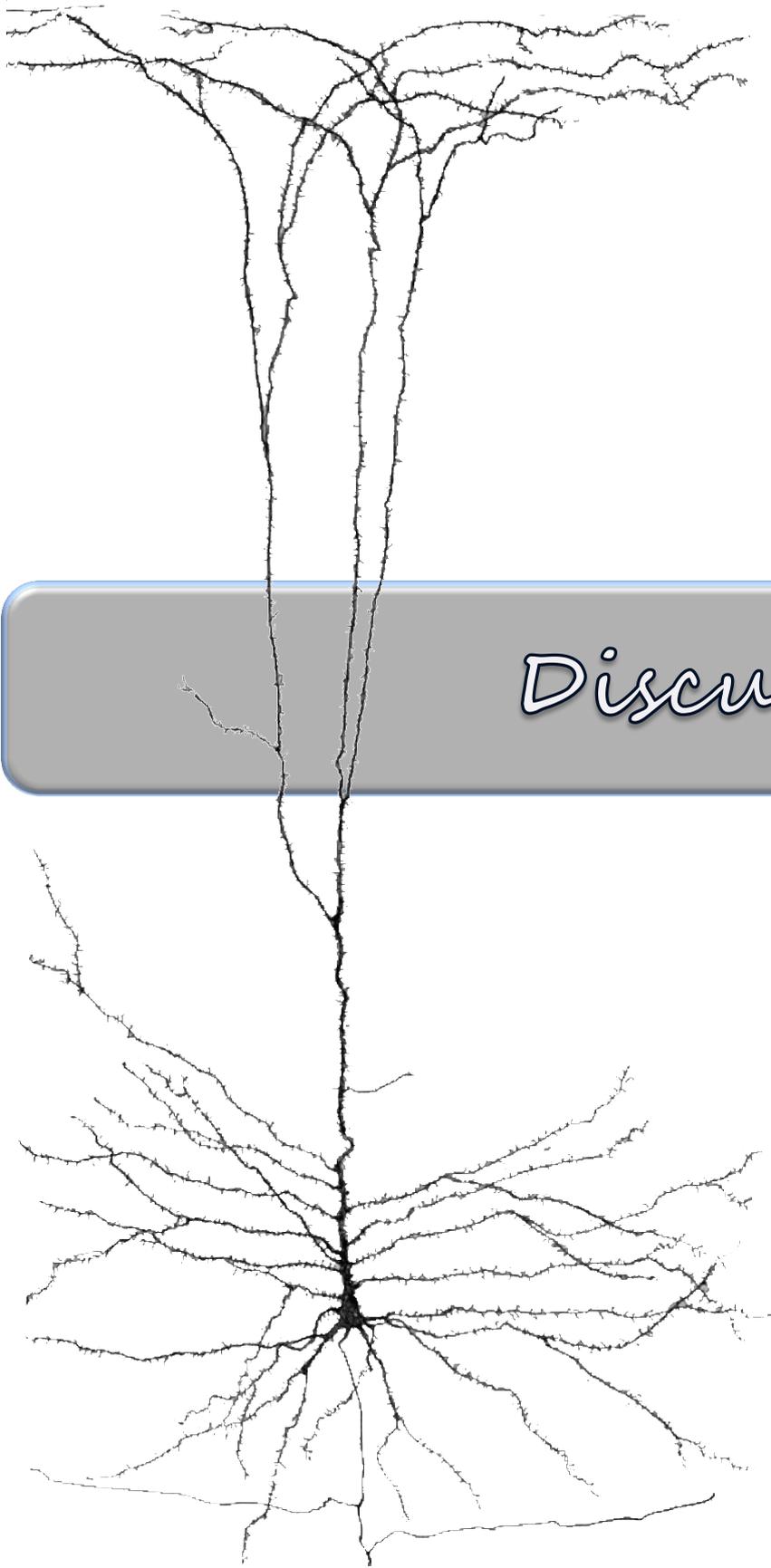
**Pre-tratamiento Vehículo.** El análisis indica un efecto significativo para **desafío** en *GD* ( $F_{(2, 21)} = 8,7$ ), *CA1* ( $F_{(2, 21)} = 37,5$ ) y *CA3* ( $F_{(2, 21)} = 34,2$ ) ( $p < 0,05$ ). En todos los casos, el test de Bonferroni indica que, independientemente del tratamiento recibido, los grupos que reciben Des.

Anfetamina y Des. Frío inmediatamente después del entrenamiento presentaron menor Latencia 2 que aquellos en condiciones basales ( $p < 0,05$ ) (**Figura 37 A, C y E**).

**Pre-tratamiento Candesartan.** El análisis indica un efecto significativo para **desafío** en *GD* ( $F_{(2, 24)} = 28,4$ ), *CA1* ( $F_{(2, 24)} = 17,1$ ) y *CA3* ( $F_{(2, 24)} = 26,9$ ) ( $p < 0,05$ ). En todos los casos, el test de Bonferroni indica que, independientemente del tratamiento recibido, los grupos que reciben Des. Anfetamina y Des. Frío inmediatamente después del entrenamiento presentaron menor Latencia 2 que aquellos en condiciones basales ( $p < 0,05$ ) (**Figura 37 B, D y F**).



**Figura 37. Evitación inhibitoria: Patrón de activación neuronal en áreas hipocámpales.** Número de neuronas c-Fos positivas en GD, CA1 y CA3 para todos los grupos experimentales según el pretratamiento recibido. (A) (C) y (E) Vehículo, n=4-5. (B) (D) y (F) Candesartan, n=4-6. \* diferente de los grupos en condiciones basales, #diferente de los grupos que recibieron Des. Anfetamina,  $p < 0,05$ . Los valores se muestran como la media  $\pm$  EE.



*Discusión*

## ***Alteraciones inducidas por anfetamina sobre la vasculatura periférico/central. Rol de receptores AT<sub>1</sub>***

### *Inflamación y disfunción endotelial*

Las células endoteliales juegan un rol central en la regulación del tono vascular, a través de la liberación controlada y balanceada de agentes vasodilatadores y vasoconstrictores en respuesta a múltiples estímulos. Asimismo, su actividad es fundamental en el mantenimiento de la homeostasis local por regulación continua de mediadores anti-inflamatorios, anti-oxidantes, pro-fibrinolíticos y anti-coagulantes (Radenkovic y col., 2013).

El término *disfunción endotelial* hace referencia a alteraciones en este tipo celular que promueven vasoconstricción, inflamación, aumento de la permeabilidad vascular, arterosclerosis y trombosis. Si bien estos eventos son fundamentales en el inicio de patologías vasculares, también los son para su mantenimiento y progresión (Faraci, 2011). En el SNC, la disfunción endotelial, así como también la alteración de los otros componentes de la unidad neurovascular, estaría implicada en el desarrollo de múltiples enfermedades neuroinflamatorias (Girouard y col., 2006a; Zacchigna y col., 2008).

### *Disfunción endotelial y alteraciones fenotípicas*

La arteria carótida interna es la principal responsable del suministro de flujo sanguíneo al cerebro y su anastomosis con la arteria basilar en la base cerebral, da origen al polígono de Willis, considerado como el nexo entre la circulación periférica y central (Barr, 1973; Cipolla, 2010). Si bien la actividad contráctil de la arteria carótida no es el principal mecanismo involucrado en el mantenimiento del flujo sanguíneo cerebral, su disfunción endotelial es considerada como un indicador epidemiológico y clínico de futuras alteraciones cerebro-vasculares (Barr, 1973; Faraci, 2011).

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran un aumento en la expresión de marcadores inflamatorios (R-AT<sub>1</sub> y ICAM-1) en las arterias cerebrales principales y un aumento del grosor endotelial en la arteria carótida, una semana después de la administración repetida de anfetamina (Fig. 6 y 17); evidenciando consecuencias deletéreas del psicoestimulante sobre el endotelio vascular. Este tipo de alteraciones se consideran como incipientes en la disfunción endotelial y en el desarrollo de un estado inflamatorio patológico. El engrosamiento de la capa endotelial, por aumento del volumen celular, se observa también en diversas enfermedades inflamatorias que afectan localmente a diferentes tipos de tejidos (Girard y col., 1995; Hernandez-Fonseca y col., 2009; Teng y col., 2016; Tesfamariam y col., 2007). En este sentido esta alteración se observa en la primera etapa de la artritis reumatoide, acompañada de un aumento en la permeabilidad vascular

(FitzGerald y *col.*, 1991; Middleton y *col.*, 2004). Asimismo, en la patogenia de la vasculitis, el daño endotelial es considerado el paso inicial del proceso inflamatorio y se caracteriza por morfología alterada, aumento de permeabilidad, edema y necrosis (Teshamariam y *col.*, 2007).

Numerosos autores proponen que el aumento local de citoquinas sería un evento clave en el inicio de la disfunción endotelial (FitzGerald y *col.*, 1991; Middleton y *col.*, 2004; Munro y *col.*, 1989; Teshamariam y *col.*, 2007). En este sentido, la modificación del fenotipo endotelial, con hipertrofia y aumento en la expresión de ICAM-1, se observa luego de la administración local de TNF- $\alpha$  (Munro y *col.*, 1989). En presencia de esta citoquina, las células endoteliales adquieren el fenotipo necesario para la adhesión de leucocitos activados, en respuesta a un aumento en la expresión de moléculas de adhesión, y liberación de otros mediadores pro-inflamatorios (Teshamariam y *col.*, 2007). Estos últimos incluyen citoquinas, quimioquinas y ROS que, en este escenario, son parte del advenimiento y la perpetuación de la disfunción endotelial (Faraci, 2011; Teshamariam y *col.*, 2007).

#### *Anfetamina y vasculatura. Receptores AT<sub>1</sub>*

El uso ocasional de psicoestimulantes está relacionado de manera directa con la ocurrencia de derrame cerebral, asociado con hemorragia o isquemia, representando el 2% de los casos de apoplejías ingresadas al servicio neurovascular (Fredericks y *col.*, 1991; Goplen y *col.*, 1995; Ho y *col.*, 2009). En pacientes intoxicados con sustancias de tipo anfetamina se han observado irregularidades endoteliales en las principales arterias cerebrales, consistentes con vasculitis, y daño directo de la capa íntima (sin infiltración de leucocitos) (Hara y *col.*, 2008; Shibata y *col.*, 1991). Más aún, estos eventos vasculares se observaron hasta varias semanas después de una dosis única o repetida del psicoestimulante (Cohle, 2013; De Silva y *col.*, 2007; McGee y *col.*, 2004; Ohta y *col.*, 2005). En primates, alteraciones vasculares similares se han descrito luego de un protocolo de exposición repetida (14 días) a metanfetamina. En este caso, los animales mostraron una vasoconstricción generalizada minutos después de la administración de la droga que, en algunos casos, se mantuvo hasta una semana después, afectando la carótida interna, las arterias cerebrales principales y ramas vasculares pequeñas (Rumbaugh y *col.*, 1971).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que los efectos deletéreos inducidos por anfetamina se evidencian también en la microvasculatura cerebral, observándose un aumento en la expresión de R-AT<sub>1</sub> en condiciones basales (Fig. 18). Más aún, luego de un desafío se observó un aumento de la expresión de estos receptores, cuya magnitud estuvo relacionada a la modalidad del mismo. En este sentido, la magnitud del aumento en los niveles de R-AT<sub>1</sub> inducido por Des. Anfetamina no permitió evidenciar diferencias entre los 4 grupos experimentales; mientras que con Des. Frio este aumento fue menor y permitió observar diferencias entre los grupos. La ausencia de

diferencias entre los grupos experimentales con Des. Anfetamina podría deberse a un efecto techo en la expresión de R-AT<sub>1</sub>, quedando en evidencia la potencia del psicoestimulante en la estimulación del SRA a nivel de la microvasculatura cerebral, en comparación con el Des. Frío. Por otro lado, los resultados con Des. Frío ponen de manifiesto la selectividad del estímulo seleccionado para aumentar los niveles circulantes de AngII y estimular la actividad simpática, mediando el aumento de R-AT<sub>1</sub> (Bregonzio y *col.*, 2008; Cassis y *col.*, 1998; Zavala y *col.*, 2007). Por lo tanto, sugerimos que las diferencias observadas respecto a los efectos de Des. Anfetamina sobre este receptor, podrían deberse a acciones tóxicas y no sólo vasoconstrictoras del psicoestimulante. Esto último se sustenta en los resultados que muestran diferencias basales en la expresión de R-AT<sub>1</sub> como secuela de la exposición repetida a anfetamina.

Dentro de la multiplicidad de factores desencadenantes de disfunción endotelial, las drogas vasoactivas se consideran como inductores debido a 3 mecanismos principales: tensión de roce, citotoxicidad directa y eventos mediados por inmunidad (Tsfamariam y *col.*, 2007). La anfetamina es catalogada como un análogo sintético de las trazas de aminas, las cuales son sustancias biológicamente activas, relacionadas estructural y funcionalmente con las catecolaminas (Broadley, 2010). Estas sustancias son reconocidas por su efecto vasoconstrictor directo, a través de receptores de trazas de aminas, e indirecto, vía activación del sistema simpático. Estos receptores muestran una actividad independiente de la activación autónoma ya que los efectos vasculares de estas aminas no son bloqueados por antagonistas  $\alpha$  y  $\beta$  adrenérgicos, bloqueantes del transporte neuronal o inhibidores de la MAO; y además no sufren taquifilaxia directa o cruzada entre ellos (Broadley y *col.*, 2013). Por lo tanto, la capacidad de anfetamina para generar vasoconstricción, y el consecuente aumento de la tensión de roce, excede la acción directa por estimulación simpática, pudiendo ocurrir por acción directa y sostenida sobre los receptores de trazas de aminas.

En relación al efecto tóxico de los psicoestimulantes, se ha propuesto que éstos podrían estar interaccionando con blancos moleculares de membrana para desencadenar cascadas de señalización que resultan en eventuales lesiones (Tsfamariam y *col.*, 2007). En relación con esto último, se ha observado que los consumidores de cocaína presentan niveles elevados de marcadores de disfunción endotelial a nivel plasmático, antes y después de un período de desintoxicación (Pereira y *col.*, 2011; Saez y *col.*, 2011). Más aún, cuando las células endoteliales en cultivo son expuestas a cocaína se observa un aumento de apoptosis, activación de caspasas y disminución en la producción de NO (He y *col.*, 2001). Con respecto a este mediador, se ha descrito que su producción vía iNOS tiene consecuencias a corto y largo plazo sobre la disfunción endotelial (Faraci, 2011). Además, la exposición a cocaína genera un aumento de ROS y promueve el fenotipo pro-adhesivo en cultivos de células endoteliales, medido como un aumento en la deposición de factor de von Willebrand y de la adhesión de plaquetas (Saez y *col.*, 2014). Lo más importante a destacar es que el mismo

fenotipo, pero sin acumulación de ROS, se observa cuando el cultivo se expone a plasma libre de plaquetas obtenido de consumidores de cocaína (Saez y *col.*, 2014). Esto permite recrear el microambiente al cual está expuesto el endotelio de pacientes consumidores e identificar la disfunción endotelial, con acumulación de ROS, como el primer evento que promueve la adhesión plaquetaria inducida por cocaína (Saez y *col.*, 2014). De manera similar, la administración de metanfetamina a células endoteliales en cultivo induce una disminución de la viabilidad celular. El mecanismo involucrado en este fenómeno sería un aumento del estrés oxidativo, que se evidencia por un aumento en la producción de ROS y una disminución de la actividad de la glutatión peroxidasa (Zhang y *col.*, 2009). En el mismo sentido, se ha descrito que anfetamina induce un aumento en la expresión de genes asociados a respuestas inflamatorias (ICAM-1 e IL-6) y de estrés celular (HSP70) en la vasculatura asociada a las meninges (Thomas y *col.*, 2009). Los efectos tóxicos, secundarios a la exposición a anfetamina sobre la vasculatura cerebral, también se ven reflejados en el aumento de los genes involucrados en el estrés del retículo endoplásmico y en la señalización de la respuesta al mal plegamiento proteico (Thomas y *col.*, 2010). Estas últimas evidencias permiten identificar los cambios inducidos por sustancias tipo anfetamina sobre la vasculatura cerebral, independientemente de la hipertermia que estas generan y bajo condiciones en donde no existe alteración física de la BHE (Bowyer y *col.*, 2014; Bowyer y *col.*, 2013).

#### *Receptores AT<sub>1</sub> y disfunción endotelial*

La participación de AngII en el advenimiento de la disfunción endotelial se ha estudiado ampliamente en modelos de hipertensión. Sin embargo, estos efectos se relacionan a la estimulación sinérgica de respuestas inflamatorias y de estrés oxidativo por estimulación de R-AT<sub>1</sub>, independientemente de su efecto vasoconstrictor y sobre la presión arterial (Faraci, 2011; Groeschel y *col.*, 2011; Kumai y *col.*, 2008; Marchesi y *col.*, 2008; Schrader y *col.*, 2007). Dentro de estos modelos y particularmente, en los animales espontáneamente hipertensos (SHR), el SRA local es el principal mediador de las respuestas inflamatorias en la microvasculatura cerebral. Estos animales poseen niveles elevados de los componentes del SRA, especialmente sobre-expresión de R-AT<sub>1</sub> (Zhou y *col.*, 2006).

En su rol pro-inflamatorio AngII, vía activación de R-AT<sub>1</sub>, aumenta la permeabilidad vascular, el reclutamiento de leucocitos y la reparación tisular (Benigni y *col.*, 2010; Groeschel y *col.*, 2011; Marchesi y *col.*, 2008). Luego de la estimulación continua con AngII se detectan niveles elevados de MCP1, M-CSF, IL-6, TNF $\alpha$  e ICAM-1 y un mayor número de macrófagos adheridos a endotelio, tanto en arteria aorta como en arteria carótida (Ando y *col.*, 2004a; Didion y *col.*, 2009; Loria y *col.*, 2010; Tham y *col.*, 2002). A nivel de la microvasculatura cerebral de SHR se ha descrito aumento

en la expresión de estos mediadores y en el número de macrófagos y leucocitos infiltrantes (Ando y *col.*, 2004b; Nagai y *col.*, 2011; Zhou y *col.*, 2005). Además, se ha identificado un desbalance en la relación eNOS/iNOS, en comparación con la relación existente en su control normotenso (Yamakawa y *col.*, 2003). Esto podría indicar un cambio en la funcionalidad de estas isoenzimas, desde un rol fisiológico hacia uno patológico, como consecuencia de la sobre-expresión de R-AT<sub>1</sub> (Yamakawa y *col.*, 2003). Se ha descrito que AngII interviene en las respuestas inflamatorias a través del aumento en la actividad del factor de transcripción NF-κB. Esta acción, mediada por la activación de R-AT<sub>1</sub>, induce la degradación de la subunidad inhibitoria IκB, la translocación nuclear de la subunidad activadora p65, su unión al ADN y la transcripción de genes pro-inflamatorios, tales como IL-6 y MCP-1 (Marchesi y *col.*, 2008; Tham y *col.*, 2002; Zhou y *col.*, 2005).

Es conocido que AngII regula de manera directa la actividad de la enzima oxidasa de NADPH, principal fuente de ROS a nivel vascular (da Cunha y *col.*, 2005; Schrader y *col.*, 2007). A nivel endotelial, la activación de esta enzima produce un aumento en la producción de anión superóxido y el desacople de la eNOS, lo que provoca disfunción endotelial y amplificación de la respuesta inflamatoria (Marchesi y *col.*, 2008; Touyz y *col.*, 2003). Estos efectos también tienen lugar en la microvasculatura cerebral, donde el aumento de ROS y la disfunción endotelial inducida por AngII, esta mediada por la estimulación directa de la expresión de la subunidad Nox2 de la NADPH oxidasa (Girouard y *col.*, 2006b). Este efecto estimulador, mediado por R-AT<sub>1</sub>, tiene dos etapas: una inicial vía PKC, que estimula la expresión de subunidades de membrana y activa subunidades citosólicas; y una segunda etapa donde el aumento de la actividad de NADPH oxidasa es consecuencia de la trans-activación del receptor del factor de crecimiento endotelial (EGFR) (Balakumar y *col.*, 2014; Chabrashvili y *col.*, 2003; Hunyady y *col.*, 2006; Tan y *col.*, 2012). Las oxidasas mitocondriales son otra fuente celular de ROS estimulada por actividad R-AT<sub>1</sub>, lo que indica una participación directa de AngII en la disfunción mitocondrial (Marchesi y *col.*, 2008; Vazquez-Medina y *col.*, 2013).

A partir de las evidencias expuestas, se considera que la disfunción endotelial mediada por AngII sería el resultado de la actividad conjunta de R-AT<sub>1</sub>, mediadores inflamatorios y ROS. En este escenario, NF-κB amplifica la respuesta por estimulación de la síntesis de angiotensinógeno, mientras que las ROS generan un ambiente en el cual el precursor en su forma oxidada es más rápidamente transformado a AngII. De este modo, se potencian las cascadas de señalización activadas por R-AT<sub>1</sub>, al mismo tiempo que se estimula la respuesta inflamatoria vía NF-κB (Faraci, 2011; Hunyady y *col.*, 2006; Marchesi y *col.*, 2008).

*Anfetamina y vasculatura. Estrés celular*

En el presente trabajo se muestra que la exposición repetida a anfetamina facilita la expresión de HSP70 a nivel de la microvasculatura cerebral. El aumento de HSP70, luego de la administración de ambos desafíos, se observó sólo en animales que fueron previamente expuestos a anfetamina repetida. Ésta proteína en su forma inducible se incrementa por exposición a estímulos nocivos, tales como radiación UV o aumento de la temperatura, que generan estrés celular (Horowitz y *col.*, 2007). En esta situación se las identifica como mediadores anti-apoptóticos ya que previenen el daño proteico, reestablecen la función proteica y previenen la muerte celular (Horowitz y *col.*, 2007). Su síntesis está regulada por el factor de transcripción HSF-1, que se activa cuando la célula está bajo condiciones de estrés o en situaciones patológicas que incrementan los niveles intracelulares de ROS (Horowitz y *col.*, 2007; Lee y *col.*, 2015; Oh y *col.*, 2005; Yoo y *col.*, 2014). En este marco, HSF-1 es liberado como monómero de su complejo inhibitorio en citoplasma, forma trímeros que son fosforilados y translocados al núcleo donde conduce la síntesis de HSP (Shamovsky y *col.*, 2008). Es interesante destacar la universalidad de este tipo de respuesta en condiciones patológicas, ya que la inducción en la expresión de HSP70 se ha observado en diferentes condiciones de estrés celular. En este sentido, la exposición aguda a anfetamina induce la expresión de esta proteína en la microvasculatura asociada a meninges; mientras que a nivel de la microvasculatura cerebral se produce por estimulación crónica de R-AT<sub>1</sub>, concomitante con un aumento en la expresión de HSF-1. La expresión de HSP70 también se evidencia luego de la exposición a estrés o hipotermia y, bajo estas condiciones, se potencia luego de una isquemia (Terao y *col.*, 2009; Thomas y *col.*, 2009; Udelsman y *col.*, 1993; Zhou y *col.*, 2005).

Considerando que el aumento en HSP70 se observó en el grupo experimental que presenta niveles elevados de R-AT<sub>1</sub> en condiciones basales, se propone que la facilitación en la expresión de HSP70, inducida por anfetamina, guardaría relación directa con el aumento inducido en la expresión de R-AT<sub>1</sub>. Una señalización exacerbada, vía activación de R-AT<sub>1</sub>, incrementaría la actividad de NADPH oxidasa, los niveles de ROS y la consecuente activación HSF-1 para la producción de HSP70. Esta idea se sustenta además por una exacerbación de los niveles de peroxidación lipídica observada en microvasos cerebrales, en respuesta a un Des. Anfetamina, bajo las mismas condiciones experimentales (Casarsa, 2015).

*Anfetamina y Vasculatura. Bloqueo de receptores AT<sub>1</sub>*

Nuestros resultados muestran que los R-AT<sub>1</sub> participan de manera activa en los cambios inducidos por anfetamina en la microvasculatura cerebral. Los animales pre-tratados con el antagonista no muestran el aumento en la expresión de R-AT<sub>1</sub> en condiciones basales ni la respuesta

sensibilizada en la expresión de HSP70 ante la exposición a un desafío. Además, estos animales no presentan la alteración morfológica inducida por anfetamina en el endotelio de arteria carótida.

Se ha descrito que el bloqueo de R-AT<sub>1</sub> previene las acciones deletéreas de AngII a nivel vascular en múltiples modelos animales. En este sentido, en ratones que presentan una mutación para este receptor en la vasculatura, se observa una atenuación en el reclutamiento de leucocitos, inducido por la administración crónica de AngII o por inducción de isquemia/reperfusión, en la vasculatura cerebral (Nagai y *col.*, 2011). En SHR la restauración del flujo sanguíneo cerebral por ARBs no sólo estaría relacionada con el cambio estructural y funcional de las arterias principales del cerebro, sino también con el efecto anti-inflamatorio directo sobre la microvasculatura cerebral (Benicky y *col.*, 2011). Asimismo en este mismo modelo animal, el tratamiento con ARBs revierte el aumento en la expresión de NF- $\kappa$ B, IL-6, TNF $\alpha$ , HSP70 y HSF-1, junto con el restablecimiento de la relación eNOS/iNOS, disminución en la expresión de ICAM-1 e infiltración de macrófagos (Ando y *col.*, 2004a; Ando y *col.*, 2004b; Yamakawa y *col.*, 2003; Zhou y *col.*, 2005).

Los efectos protectores del bloqueo de R-AT<sub>1</sub> involucran también una disminución del estrés oxidativo vascular. De este modo, el tratamiento de SHR con dosis bajas de ARBs reduce los niveles de superóxido y revierte la hipertrofia vascular de las arterias aorta y carótida, en conjunto con el restablecimiento de la autoregulación del flujo sanguíneo cerebral, de manera independiente al efecto anti-hipertensivo (Kumai y *col.*, 2008). La administración de ARBs a animales con dieta rica en sodio y colesterol, disminuye los niveles centrales de superóxido al mismo tiempo que aumenta la expresión de factores de neuroprotección (Mogi y *col.*, 2007). En el mismo sentido, la desregulación de la respuesta vasodilatadora por AngII en la vasculatura cerebral puede ser revertida por ARBs, inhibidores de la oxidasa de NADPH o bien secuestradores de ROS; lo que resalta el rol del estrés oxidativo en las disfunciones vasculares inducidas por AngII (Girouard y *col.*, 2006b). Por último, los ARBs participan en el mantenimiento de la integridad de la BHE, lo que contribuiría a sus acciones anti-inflamatorias (Saavedra y *col.*, 2011).

#### *Anfetamina y Vasculatura. Rol clave de receptores AT<sub>1</sub>*

El concepto de *plasticidad vascular* se ha propuesto para el fenómeno de sobre-expresión de receptores vasoconstrictores a nivel de la vasculatura cerebral, observada luego de un evento isquémico (Edvinsson y *col.*, 2011). Para el caso de R-AT<sub>1</sub> se ha descrito que su aumento se corresponde con el curso temporal de la isquemia cerebral retrasada, y el bloqueo de su actividad mejora el desempeño neurológico posterior (Edvinsson y *col.*, 2011). En el mismo sentido, la sobre-expresión de R-AT<sub>1</sub> estaría relacionada con un mayor daño isquémico cerebral en SHR; lo que se revierte con ARBs por la preservación de la perfusión sanguínea en la zona periférica de la penumbra (Ito y *col.*, 2002; Nishimura y *col.*, 2000). Además, la exposición a frío en edades

tempranas sensibiliza al sistema vascular a una posterior exposición a AngII, tanto para sus efectos hipertensores como pro-inflamatorios (Loria y *col.*, 2010). Se ha propuesto que la vasculatura comprometida, por inflamación o disfunción endotelial, estaría asociada a una mayor vulnerabilidad al desarrollo y progresión de desórdenes vasculares (Teshamariam y *col.*, 2007).

La microvasculatura cerebral presenta mayor susceptibilidad al desarrollo de disfunción endotelial, dado que posee un SRA propio que media la respuesta de estos vasos a AngII sintetizada localmente (Faraci, 2011). A este nivel la sobre-estimulación de R-AT<sub>1</sub> conduce al detrimento de la función endotelial (Faraci, 2011; Zhou y *col.*, 2006). Al mismo tiempo, las células endoteliales de la vasculatura cerebral presentan mayor producción de superóxido que los vasos periféricos y mayor contenido de ácidos grasos poli-insaturados, lo que les otorga mayor susceptibilidad a los efectos deletéreos de ROS por exposición a psicoestimulantes (Faraci, 2011; Hobbs y *col.*, 2013; Zhang y *col.*, 2009). La ocurrencia de eventos pro-inflamatorios a nivel de la microvasculatura cerebral tiene implicancias importantes en el desarrollo regional de patologías neuroinflamatorias (Faraci, 2011). Más aún, la alteración regional de la microvasculatura cerebral repercute de manera directa en la regulación del flujo sanguíneo cerebral con posibles consecuencias de daño tisular (El Assar y *col.*, 2013).

El análisis de los resultados obtenidos en el presente trabajo nos lleva a sugerir que la sobre-expresión de R-AT<sub>1</sub>, a nivel de la microvasculatura cerebral, puede ser considerada una secuela deletérea como consecuencia de la exposición repetida a anfetamina. Asimismo, esta expresión exacerbada de R-AT<sub>1</sub> facilitaría la inducción de HSP70 en la microvasculatura cerebral en respuesta a un desafío. Más aún, nuestros resultados sugieren que los R-AT<sub>1</sub> juegan un rol clave en el desarrollo de un microambiente pro-inflamatorio en la microvasculatura cerebral por exposición repetida a anfetamina.

## ***Alteraciones estructurales y funcionales inducidas por anfetamina en corteza prefrontal. Rol de receptores AT<sub>1</sub>***

### *Psicoestimulantes y actividad de corteza prefrontal*

Los efectos metabólicos de las drogas psicoestimulantes son variados según se esté evaluando su efecto agudo o la secuela por exposición repetida (Devous y *col.*, 2001; Downey y *col.*, 2014). Las evidencias obtenidas en consumidores de sustancias tipo anfetamina, indican que el consumo repetido de estas drogas conduce a alteraciones estructurales, metabólicas y energéticas de manera región-dependiente a nivel cerebral (Downey y *col.*, 2014). En el análisis de los múltiples resultados reportados en humanos, realizado por Mackey (Mackey y *col.*, 2013), se identifica que la disminución de un 10% del volumen cortical, particularmente de la subdivisión ventromedial de la CPF, es una evidencia consistente entre usuarios de psicoestimulantes. A esta secuela estructural se le suman evidencias de una disminución en la integridad neuronal, acompañada de un aumento de marcadores gliales en esta misma región cerebral (Berman y *col.*, 2008; Berman y *col.*, 2009; Mackey y *col.*, 2013). Mediante la cuantificación del metabolismo de glucosa se han identificado diferencias temporales en el índice de actividad cerebral durante la abstinencia al psicoestimulante. A este respecto, al inicio del período libre de drogas (5 días) se observa una disminución en el metabolismo cortical; el cual se revierte, e incluso aumenta de manera anormal, hacia el mes de abstinencia (Berman y *col.*, 2008; Berman y *col.*, 2009). Este aumento tardío de la actividad cortical puede ser interpretado como un proceso compensatorio del bajo metabolismo observado en las etapas iniciales, que previene alteraciones y daños locales; o bien, estar asociado con la ocurrencia de nuevas alteraciones durante la abstinencia (Berman y *col.*, 2009). Los cambios metabólicos se evidencian también a nivel glial, lo que se observa como una disminución del 50% de la tasa oxidativa a nivel cortical en consumidores en abstinencia al psicoestimulante (7 días) (Sailasuta y *col.*, 2010). Las alteraciones corticales en la utilización de la energía, el estrés oxidativo y las respuestas inflamatorias, inducidas por sustancias tipo anfetamina, están asociadas con déficits cognitivos y alteraciones del humor que persisten en el tiempo (Downey y *col.*, 2014).

Numerosos estudios señalan la existencia de déficit cognitivo en consumidores de psicoestimulantes en tareas de atención, toma de decisiones, planeamiento y memoria de trabajo (Sofuoglu, 2010). En el caso de cocaína, se identificó una correlación negativa entre la performance en el test y el tiempo o la frecuencia del consumo de la droga (Rosselli y *col.*, 1996). Mientras que, para el consumo de metanfetamina, se observó una relación entre el hipo-metabolismo frontal con una disfunción de tareas dependientes de esta área (Kim y *col.*, 2009). Del mismo modo, el déficit puede identificarse en usuarios crónicos de anfetamina sometidos a una batería de test cognitivos, que permiten identificar hipo-funcionalidad cortico-estriatal (Ornstein y *col.*, 2000). Es importante

destacar, que este último trabajo incluye consumidores y pacientes con tratamiento crónico con anfetaminas en dosis bajas, no-tóxicas, del psicoestimulante (Ornstein y *col.*, 2000).

#### *Alteraciones vasculares inducidas por anfetamina*

En el presente trabajo, los resultados obtenidos indican que la exposición repetida a anfetamina induce alteraciones en la red microvascular. En este sentido, a nivel de CPF pre-límbica se observó un aumento en el área ocupada por la vasculatura, que se explicaría por el aumento en la tortuosidad de los vasos, dado que hay una disminución en el número de puntos de ramificación. En CPF infra-límbica, los efectos angiogénicos se observan como un aumento incipiente de la tortuosidad sin cambios en el área ocupada por la vasculatura, lo cual podría ser explicado por el carácter temporal de los cambios estructurales descritos durante la abstinencia por otros autores (Berman y *col.*, 2009). En conjunto, nuestros resultados muestran que anfetamina promueve la elongación de los microvasos en CPF, una hipertrofia que involucra la elongación y el aplanamiento de las células endoteliales (Bar, 1983). Cambios vasculares similares se han descrito en condiciones de hipoxia moderada (sin pérdida de volumen cortical), donde el aumento en la densidad vascular es acompañado de un aumento en el largo y la tortuosidad de vasos corticales, sin cambios en su ramificación (Mironov y *col.*, 1994). En estas condiciones, la elongación de segmentos capilares existentes daría como resultado una mayor tortuosidad de los mismos en la corteza cerebral (Mironov y *col.*, 1994). En la actualidad, se propone que la patología vascular es un evento clave en el desarrollo de demencias vasculares, enfermedades neurodegenerativas e hipertensión (Girouard y *col.*, 2006a; Gorelick y *col.*, 2011; Iadecola y *col.*, 2008; Saavedra, 2016). En este sentido, en un modelo animal de Alzheimer, se ha descrito un aumento en la tortuosidad de vasos corticales en paralelo al desarrollo temporal de la patología (Dorr y *col.*, 2012). Además, estos cambios morfológicos son acompañados por un compromiso progresivo de la función vascular, evidenciado por alteraciones en el flujo vascular y una menor capacidad de respuesta a estímulos vasodilatadores (Dorr y *col.*, 2012). Mediante el uso de modelos matemáticos y computacionales, se ha podido predecir que el aumento de tortuosidad potencia la pérdida de energía cinética del flujo sanguíneo, así como también aumenta la probabilidad de la ocurrencia de trombos (Chesnutt y *col.*, 2011; Moody y *col.*, 1991). Esto último podría explicar por qué los cambios vasculares serían responsables de una alteración inicial en la funcionalidad neuronal y promoverían la neurodegeneración en etapas avanzadas, en enfermedades de disfunción cortical (Udrisoiu y *col.*, 2016).

El cambio en la estructura vascular, por un aumento de ramificaciones o tortuosidad (angiogénesis), es un fenómeno que existe en un amplio espectro de escenarios fisiológicos y

patológicos (Simons, 2005). En estos últimos, los procesos angiogénicos e inflamatorios estarían en íntima relación, ya que pueden ser desencadenados por estímulos similares, asociándose con los mismos factores de crecimiento y citoquinas (Costa y col., 2007). El principal mediador común en estos dos procesos es el factor de crecimiento vascular (VEGF), que también está implicado en los cambios vasculares observados en procesos de neuroinflamación crónica (Costa y col., 2007; Kirk y col., 2003; Simons, 2005; Ward y col., 2004). Se pueden identificar mecanismos comunes, independientemente de la etiología, que llevan al acoplamiento de la angiogénesis y la inflamación en condiciones patológicas (Costa y col., 2007). En este sentido, el aumento en la tortuosidad en un contexto local de inflamación es un evento característico de soriasis y retinopatía diabética (Costa y col., 2007; Noda y col., 2014). Durante la inflamación crónica, el crecimiento vascular permitiría la llegada de células inflamatorias, nutrientes y oxígeno al sitio de inflamación, y, a su vez, aumentaría el área endotelial encargada de la producción de citoquinas y moléculas de adhesión (Costa y col., 2007; Kirk y col., 2003).

#### *Angiotensina II y angiogénesis*

Los resultados del presente trabajo ponen en evidencia el rol fundamental de los R-AT<sub>1</sub> en la remodelación de la red microvascular en CPF; dado que el bloqueo de estos receptores previno el aumento del área vascular y la tortuosidad inducida por exposición repetida a anfetamina.

La estructura microvascular, establecida durante el desarrollo, mantiene la capacidad de ser remodelada en el individuo adulto ante estímulos químicos o físicos. La activación del SRA es un punto en común entre diversos estímulos que conducen a un cambio en la arquitectura vascular, por angiogénesis o retracción de vasos (Greene y col., 2002; Heffelfinger, 2007). El VEGF-1 es uno de los principales efectores de la acción angiogénica y pro-inflamatoria de AngII; al mismo tiempo, su síntesis es estimulada por actividad de R-AT<sub>1</sub> (Greene y col., 2002; Tamarat y col., 2002; Zhao y col., 2004). La dirección que presentan los cambios vasculares inducidos por AngII depende del tipo de tejido, de la injuria recibida y de los mediadores involucrados. A nivel del SNC, sus efectos angiogénicos son locales e independientes de su efecto vasopresor a nivel sistémico (Heffelfinger, 2007). Se ha descrito que, en condiciones de isquemia cerebral local, el bloqueo previo de R-AT<sub>1</sub> tiene un efecto protector, pro-angiogénico, ya que disminuye la hipoxia mediante el aumento en la densidad y el área vascular total (Forder y col., 2005; Li y col., 2008). Para el caso de patologías neurodegenerativas, se ha descrito a nivel de CPu en un modelo de parkinsonismo, que el bloqueo de R-AT<sub>1</sub> previene el aumento de los niveles de VEGF-1 e IL-1 $\beta$  que acompañan la progresión de la neurodegeneración (Munoz y col., 2014). Esta prevención también se evidencia en condiciones de liberación exacerbada de estos mediadores producto del tratamiento con L-dopa (Munoz y col., 2014). Dado que dopamina genera tanto efectos inflamatorios como angiogénicos, los resultados

obtenidos con ARBs pueden ser explicados tanto por su acción anti-inflamatoria como por su acción moduladora sobre la expresión de receptores dopaminérgicos (Munoz y *col.*, 2014). En relación a la angiogénesis, se observa una acción diferencial para dopamina según se activen receptores D1 (pro-angiogénicos) o D2 (anti-angiogénicos) (Lindgren y *col.*, 2009). En eventos de re-vascularización por isquemia, el efecto anti-angiogénico, vía receptores D2, implica una disminución en la expresión y actividad de R-AT<sub>1</sub> (Sarkar y *col.*, 2017).

#### *Reactividad astrocitaria inducida por anfetamina*

En la actualidad se conoce que la reactividad astrocitaria contribuye a la ocurrencia y al desarrollo de diversas patologías, y permiten la identificación de alteraciones locales (Sofroniew y *col.*, 2010). Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que la exposición a anfetamina, en un régimen de sensibilización, induce astrogliosis en CPF. En este sentido, CPF pre-límbica presentó un aumento en la expresión de GFAP en condiciones basales, que no se modificó por exposición a un desafío. Mientras que, en CPF infra-límbica, sólo se registró aumento en la reactividad astrocitaria luego del Des. Anfetamina. Tal como ocurre con la arquitectura de la red vascular, existen diferencias locales entre estas sub-áreas, lo que condice con la premisa de que los cambios funcionales y estructurales de astrocitos son contexto-dependiente (Anderson y *col.*, 2014). Además, estas características particulares explicarían porque, bajo protocolos de sensibilización por psicoestimulantes, otros autores no reportan cambios cuando analizan la totalidad de la CPF (Armstrong y *col.*, 2004). De este modo, nuestros resultados muestran que la exposición repetida a anfetamina aumenta la reactividad astrocitaria en CPF, evidenciado en condiciones basales (pre-límbica), o permaneciendo susceptible a la reactividad (infra-límbica), la cual se expresa frente a una nueva exposición al psicoestimulante.

La reactividad astrocitaria se define como el proceso mediante el cual los astrocitos responden a múltiples tipos de injurias del SNC (Anderson y *col.*, 2014). Este fenómeno presenta cuatro componentes claves: (1) un amplio espectro de potenciales cambios moleculares, celulares y funcionales; (2) una variación, graduada y progresiva de las alteraciones, que depende de la gravedad de la injuria; (3) una regulación contexto-dependiente por señales intra- e inter-celulares; y (4) ganancia o pérdida de función como consecuencia de su activación (Anderson y *col.*, 2014; Sofroniew y *col.*, 2010). La reactividad de intensidad *media a moderada* se asocia con injurias leves y consiste en cambios en la expresión génica que ocurren junto a la hipertrofia celular, sin proliferación astrocitaria. Dentro de las proteínas estructurales modificadas en estas condiciones se puede destacar GFAP, cuyo aumento se considera como proporcional a la reactividad evocada (Anderson y *col.*, 2014; O'Callaghan y *col.*, 1995; Pekny y *col.*, 2005). En el caso de reactividad

moderada, se considera que el aumento de la expresión de GFAP acompañado por un aumento en el número de células GFAP positivas no son indicadores de proliferación, sino de un mayor número de astrocitos que expresan esta proteína en niveles detectables (Anderson y *col.*, 2014; Sofroniew y *col.*, 2010). La cuantificación de GFAP es considerada un marcador sensible de reactividad astrocitaria y, en el caso de su detección por inmunohistoquímica, permite identificar los astrocitos que están respondiendo a una injuria (Anderson y *col.*, 2014; Brenner, 1994). En este sentido, la injuria tóxica de terminales dopaminérgicos, por metanfetamina, condice con aumento de GFAP en estas mismas áreas (O'Callaghan y *col.*, 1995). No obstante, considerando la exacerbación glutamatérgica y dopaminérgica provocada por estas drogas, algunos autores proponen que los eventos de toxicidad forman parte del fenómeno de sensibilización (Armstrong y *col.*, 2004; Ellison y *col.*, 1993; Kadota y *col.*, 2004). A este respecto, el aumento de GFAP se observa en estructuras límbicas de animales sometidos a un protocolo de sensibilización con psicoestimulantes (Armstrong y *col.*, 2004; Bowers y *col.*, 2003). A nivel de CPF se observan efectos neurotóxicos, medidos como un aumento en el número de células apoptóticas y una disminución en terminales dopaminérgicos, luego de un protocolo de sensibilización a metanfetamina (Kadota y *col.*, 2004; Kim y *col.*, 2014). Asimismo, en esta área, se detectan niveles elevados de TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-6 e IL-10 luego de la exposición repetida a anfetamina (Valvassori y *col.*, 2015).

En condiciones reactivas, los astrocitos tienen la potencialidad de afectar todos los aspectos de la función neuronal a través de la regulación del flujo sanguíneo, la provisión de energía o la regulación de la actividad y la plasticidad sináptica (Sofroniew y *col.*, 2010). Luego de su activación por injuria, los astrocitos reactivos ganarían función y exacerbarían la respuesta inflamatoria en detrimento de la actividad neuronal. Los principales mecanismos identificados son la sobreexpresión de mediadores pro-inflamatorios (citoquinas, factores de crecimiento y moléculas de adhesión), la exacerbación en la generación de ROS, la liberación de glutamato y la alteración de la función vascular (por aumento de VEGF) (Anderson y *col.*, 2014; Sofroniew, 2014; Sofroniew y *col.*, 2010).

### *Receptores AT<sub>1</sub> y reactividad astrocitaria*

Existe un importante número de evidencias que muestran que la activación de R-AT<sub>1</sub> media el efecto pro-inflamatorio de AngII a nivel astrocitario. En el presente trabajo se observó que el bloqueo de R-AT<sub>1</sub> previene la reactividad astrocitaria inducida por la exposición repetida a anfetamina en CPF. Considerando la interrelación existente entre astrogliosis y respuestas inflamatorias, nuestros resultados refuerzan el rol inflamatorio descrito para este receptor. En este sentido, se ha descrito que la expresión aumentada de R-AT<sub>1</sub> sería responsable de la disminución

en la viabilidad celular y el aumento de TNF- $\alpha$  y lactato deshidrogenasa, en cultivos astrocitarios bajo condiciones de hipoxia (Danielyan y *col.*, 2007). Asimismo, la administración de AngII a cultivos de astrocitos, promueve un aumento en la expresión y secreción de IL-6, vía activación de R-AT<sub>1</sub>/ NF $\kappa$ -B/ ROS (Gowrisankar y *col.*, 2016). Si bien este tipo celular es la principal fuente cerebral de angiotensinógeno, existen controversias en relación a la expresión de R-AT<sub>1</sub> en astrocitos en condiciones basales. Sin embargo, las evidencias muestran que hay un aumento de la expresión de R-AT<sub>1</sub> en astrocitos asociado a eventos inflamatorios (de Kloet y *col.*, 2015). Estos efectos también se evidencian luego de una injuria local, donde el aumento en la expresión de los R-AT<sub>1</sub> astrocitarios estaría relacionado con su rol activo en la regulación de la infiltración de leucocitos (Fuchtbauer y *col.*, 2011). Además, en condiciones de inflamación crónica, estos receptores promueven la liberación de mediadores que favorecen la infiltración y activación de células inflamatorias (Lanz y *col.*, 2010). Más aún, se ha reportado que la administración periférica de LPS aumenta la expresión de GFAP y de citoquinas pro-inflamatorias a nivel de CPF. En estas condiciones, el bloqueo de R-AT<sub>1</sub> disminuye la inflamación de esta área, evidenciado en la disminución de los niveles locales de TNF- $\alpha$  IL-6 e IL1- $\beta$  (Benicky y *col.*, 2011; De Geyter y *col.*, 2012). Cabe destacar que la activación de R-AT<sub>1</sub> puede tener un efecto indirecto sobre la reactividad astrocitaria, como consecuencia de su rol estimulador en microglia (Benicky y *col.*, 2011; Rodriguez-Perez y *col.*, 2016).

### *Memoria de trabajo y corteza prefrontal*

La memoria de trabajo implica la retención de información por cortos períodos de tiempo, lo que permite el planeamiento y el desarrollo del comportamiento durante su ejecución (Arnsten, 1998; Cowan, 2008). Este tipo de memoria se regula a nivel de CPF, un área encargada de guiar la atención, impulsividad, flexibilidad mental y ejecución de movimientos (Arnsten, 2006). Particularmente, la subdivisión pre-límbica se ha identificado como un área esencial para esta actividad (Riga y *col.*, 2014). En el presente estudio, los resultados obtenidos en las dos tareas de memoria de trabajo evaluadas, laberinto en “Y” y campo perforado, permiten identificar un déficit en la memoria de trabajo en los animales expuestos al psicoestimulante. De este modo, observamos que las alteraciones vasculares y astrocitarias en CPF están acompañadas de un déficit en la memoria de trabajo. Si bien hay un amplio número de cambios estructurales y funcionales descriptos a nivel de esta área inducidos por psicoestimulantes, las evidencias convergen en los efectos deletéreos sobre la memoria de trabajo como consecuencia de un régimen de sensibilización. La disminución en la neurotransmisión glutamatérgica y dopaminérgica en CPF, que acompaña al desarrollo de sensibilización, estaría relacionado con la hipo-funcionalidad de esta

región (Lee y *col.*, 2011; Lu y *col.*, 2010; Mizoguchi y *col.*, 2011). Esta idea se ve fortalecida por las alteraciones en la actividad eléctrica neuronal, particularmente a nivel de las ondas gamma, en animales sensibilizados a psicoestimulantes (Janetsian y *col.*, 2015). Estas ondas, que son clave durante la ejecución de tareas que implican memoria de trabajo, se ven modificadas a largo plazo luego del tratamiento con metanfetamina y se relacionan de manera directa con el déficit atencional observado durante la abstinencia (Janetsian y *col.*, 2015). Más aún, los déficits observados en el laberinto en “Y”, luego de la sensibilización a anfetamina, se relacionan con alteraciones estructurales de oligodendrocitos en CPF y aumento en los niveles cerebrales de TNF- $\alpha$  y peroxidación lipídica (El-Sayed El-Sisi y *col.*, 2016; Yang y *col.*, 2011). El tratamiento con anti-inflamatorios no-esteroides previene el aumento de estas citoquinas pro-inflamatorias, al mismo tiempo que revierte el déficit cognitivo inducido por anfetamina (El-Sayed El-Sisi y *col.*, 2016).

En el presente trabajo, el bloqueo de R-AT<sub>1</sub> previno la disfunción cognitiva, al mismo tiempo que las alteraciones estructurales de CPF, inducidas por el psicoestimulante. En concordancia con nuestros resultados, otros autores mostraron que el tratamiento con bloqueante de R-AT<sub>1</sub> previene el desarrollo de disfunción cognitiva inducida por anfetamina, cuando se evalúa inmediatamente después del tratamiento (de Souza Gomes y *col.*, 2015). El efecto protector del bloqueo de R-AT<sub>1</sub> también se observó en el desarrollo de déficit cognitivo, en un modelo de hipertensión inducido por administración continua de AngII, así como también en otros modelos de hipertensión arterial (Inaba y *col.*, 2009; Mogi y *col.*, 2007; Pelisch y *col.*, 2011; Sharma y *col.*). Las acciones de AngII estarían relacionadas con eventos de estrés oxidativo y desregulación del flujo sanguíneo cerebral y no con su efecto hipertensor, ya que la disminución de la presión arterial con vasodilatadores no tiene efecto alguno sobre el desempeño cognitivo (Inaba y *col.*, 2009). Estos mismos eventos, a nivel de CPU y en relación con la actividad dopaminérgica, mediarían la participación de AngII en el déficit cognitivo que acompaña al envejecimiento (Labandeira-Garcia y *col.*, 2011; Villar-Cheda y *col.*, 2014).

Como se mencionó anteriormente, el déficit cognitivo observado en consumidores de psicoestimulantes se relaciona con una hipo-funcionalidad cortical (Downey y *col.*, 2014; Ornstein y *col.*, 2000; Sofuoglu, 2010). De la misma manera, la asociación disfunción cortical/déficit de memoria de trabajo se ha establecido para otras patologías. En el caso de la esquizofrenia, la disfunción cognitiva se relaciona con la hipo-frontalidad de los pacientes, observada como menor consumo de oxi-hemoglobina (Kinou y *col.*, 2013). De manera similar, en pacientes de edad avanzada con demencia vascular o demencia post-aneurisma, la atrofia neuronal a nivel cortical se relaciona con un mal desempeño en tareas cognitivas (Foster y *col.*, 2014). La relación entre la disfunción de CPF y el déficit en memoria de trabajo es también evidente en etapas tempranas de la hipertensión arterial (pacientes entre 20-60 años) (Grant y *col.*, 2015). Estos resultados se

correlacionan con los obtenidos en animales SHR, donde se evidencian cambios en los niveles de los neurotransmisores junto con una disminución de la actividad cortical y déficit cognitivo (Meneses y *col.*, 2011; Mook y *col.*, 1994). Es importante destacar que, el uso de esta cepa de roedores, está validado para el estudio del trastorno de hiperactividad con déficit de atención (ADHD), una patología compleja que cursa con déficit cognitivo e hipo-funcionalidad cortical (Oades y *col.*, 2005; Paule y *col.*, 2000).

Por último, el efecto de los desafíos, durante la ejecución de los test de memoria de trabajo, se explica por la disfunción cortical inducida por el psicoestimulante. Frente a ambos desafíos, se observó una mejora en el desempeño en aquellos animales con déficit basal inducido por anfetamina. Es ampliamente reconocido el rol regulatorio que ejercen las catecolaminas sobre la actividad de CPF. Esta idea surge inicialmente por el déficit atencional, que se observa de manera similar en animales con lesión o depleción local de catecolaminas a nivel de CPF (Brozoski y *col.*, 1979). Actualmente, se conoce que NA y DA son los principales moduladores de la actividad cortical, presentando una relación en U invertida entre los niveles de estos neurotransmisores y el desempeño en tests de memoria de trabajo (Arnsten, 1998, 2006; Riga y *col.*, 2014). Bajo este concepto, niveles bajos de NA y DA en condiciones basales, como los observados durante la abstinencia a psicoestimulantes, estarían directamente relacionados con disfunciones corticales. Mientras que, a dosis intermedias, se observaría una mejora en tareas de atención como consecuencia del aumento transitorio en los niveles de catecolaminas (Arnsten, 1998). Particularmente, en condiciones de déficit cortical, dosis bajas de psicoestimulantes tendrían un efecto positivo sobre su actividad, y por lo tanto, mejoraría la respuesta en test de memoria de trabajo. Del mismo modo, los resultados obtenidos en ex-consumidores de metanfetamina, indican que una mejora en la memoria de trabajo, frente a dosis bajas y agudas de metanfetamina, sólo es evidente en aquellos individuos que presentan un mal desempeño atencional en condiciones basales (Mahoney y *col.*, 2011). En el mismo sentido, la administración aguda de dosis bajas de anfetamina mejora el déficit atencional en SHR (Meneses y *col.*, 2011; Mook y *col.*, 1994; Paule y *col.*, 2000). Estas acciones presentan un correlato clínico, ya que anfetamina y su derivado, metilfenidato, son utilizados actualmente para el tratamiento de ADHD por sus propiedades estimulantes sobre la actividad cortical, vía aumento local de catecolaminas (Arnsten, 2006; Oades y *col.*, 2005). Asimismo, los resultados obtenidos con Des. Frío implicarían un mecanismo similar, ya que este estímulo activa el sistema nervioso simpático y otros centros noradrenérgicos, entre los que se destaca el LC (Yuan y *col.*, 2002). Este núcleo es el principal centro de proyecciones noradrenérgicas hacia estructuras corticales y regula la actividad de CPF de manera directa, e indirecta a través de la estimulación local de DA (Arnsten, 1998, 2006; Heidbreder y *col.*, 2003). Nuestros resultados están en concordancia con otros trabajos que muestran un mejor desempeño en

tests de memoria de trabajo, luego de la exposición a frío, tanto en animales de experimentación como en humanos (Duncko *y col.*, 2009; Porcelli *y col.*, 2008; Zheng *y col.*, 2008).

#### *Anfetamina y neuroinflamación. Rol de receptores AT<sub>1</sub>*

La neuroinflamación es un proceso que implica el aumento de mediadores pro-inflamatorios, activación de microglia y astroglia, y el advenimiento de un círculo vicioso de activación que acompaña a la neurodegeneración (O'Callaghan *y col.*, 2008). Eventos similares tendrían lugar en la neurotoxicidad inducida por drogas de abuso y, para el caso particular de anfetamina y metanfetamina, se propone que los efectos deletéreos serían a consecuencia del aumento en la liberación de dopamina y glutamato (Cunha-Oliveira *y col.*, 2008; O'Callaghan *y col.*, 2008; Yamamoto *y col.*, 2010). Por un lado, la dopamina es fácilmente oxidada por mecanismos enzimáticos y no-enzimáticos (auto-oxidación) que lleva al aumento de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, superóxido y radicales hidroxilos (Cunha-Oliveira *y col.*, 2008; O'Callaghan *y col.*, 2008; Yamamoto *y col.*, 2010; Yamamoto *y col.*, 2008a). De este modo, cambios en el metabolismo dopaminérgico serían desencadenantes de estrés oxidativo, disfunción mitocondrial, estrés del retículo endoplásmico y activación de microglia (Cunha-Oliveira *y col.*, 2008; Go *y col.*, 2016; Yamamoto *y col.*, 2010). Por otro lado, el rol deletéreo de glutamato se relaciona con eventos de excitotoxicidad, que contribuirían en la activación de astrocitos y al estrés oxidativo y mitocondrial (Cunha-Oliveira *y col.*, 2008; Yamamoto *y col.*, 2010). Considerando que la neurotoxicidad de sustancias tipo anfetamina implica alteraciones metabólicas, aumento del estrés oxidativo y respuestas inflamatorias, varios autores sostienen que estos cambios pueden incluirse en un marco de neuroinflamación, similar a lo que ocurre con las enfermedades neurodegenerativas (Cunha-Oliveira *y col.*, 2008; Downey *y col.*, 2014; Yamamoto *y col.*, 2010).

A nivel neuronal, el efecto pro-inflamatorio y deletéreo mediado por R-AT<sub>1</sub>, está relacionado con múltiples mecanismos intracelulares. La administración de AngII a cultivos de neuronas con fenotipo catecolaminérgico, promueve apoptosis por un desbalance de los mediadores pro- y anti-inflamatorios, estrés oxidativo y disfunción mitocondrial (por actividad de NADPH oxidasa y producción de superóxido, respectivamente) (Agarwal *y col.*, 2013; Case *y col.*, 2013; Li *y col.*, 2013; Ou *y col.*, 2016; Zhao *y col.*, 2015). Estos efectos deletéreos se han identificado localmente en neuronas dopaminérgicas estriatales en modelos animales de parkinsonismo, que implican neurodegeneración y neuroinflamación por administración de toxinas (Grammatopoulos *y col.*, 2007; Labandeira-Garcia *y col.*, 2014; Labandeira-Garcia *y col.*, 2012). En este sentido AngII potencia y media estos eventos tóxicos, vía activación de R-AT<sub>1</sub>, incrementando la actividad de NADPH oxidasa, producción de ROS, peroxidación proteica y lipídica, producción de citoquinas

pro-inflamatorias, reactividad glial y desbalance del metabolismo del hierro (Dominguez-Meijide y *col.*, 2017; Labandeira-Garcia y *col.*, 2014). Estos efectos representarían mecanismos comunes mediante los cuales los R-AT<sub>1</sub> participan en la neuroinflamación en diversas patologías neurodegenerativas a nivel cortical (Benicky y *col.*, 2011; Labandeira-Garcia y *col.*, 2014; Ongali y *col.*, 2014; Takeda y *col.*, 2009; Yamamoto y *col.*, 2008b).

Considerando las evidencias discutidas a lo largo de esta sección, la alteración observada en la red microvascular y en la reactividad astrocitaria, soportan la ocurrencia de eventos inflamatorios a nivel de CPF por exposición repetida a anfetamina. Estos cambios acompañarían la disfunción cortical, descrita por otros autores e identificada en el presente trabajo como un déficit en tareas de memoria de trabajo. Dado que el bloqueo de R-AT<sub>1</sub> previno el desarrollo de los cambios vasculares, astrocitarios y conductuales inducidos por el psicoestimulante, nuestros resultados corroboran el efecto pro-inflamatorio descrito para estos receptores y sustentan su rol clave en el desarrollo de procesos inflamatorios en CPF, inducidos por administración repetida de anfetamina.

***Alteraciones estructurales y funcionales inducidas por Anfetamina en Amígdala basolateral e Hipocampo. Rol de receptores AT<sub>1</sub>***

*Memoria a largo plazo. Regulación catecolaminérgica*

La conducta refleja las experiencias aprendidas a lo largo del tiempo a través de los procesos secuenciales de adquisición, consolidación y evocación, que dan lugar a la formación de memorias a largo plazo. Este tipo de memoria implica la asociación y la organización de una nueva experiencia con aquellas previamente adquiridas. La consolidación es el fenómeno por el cual la asociación se traslada desde un estado lábil a uno estable (traza de memoria), por medio de cambios fisiológicos, moleculares y estructurales. Esta etapa se caracteriza por presentar una ventana temporal durante la cual la información puede ser modificada con facilidad. De este modo, es posible potenciar o interferir la generación de una memoria a largo plazo dentro de un período que abarca desde los primeros minutos hasta 6hs después de la adquisición (Abel y col., 2001; Dudai, 2004; McGaugh, 2000). Inicialmente se postuló que la consolidación de una memoria involucra la representación contextual a nivel de las redes hipocampo-corticales y, en el caso de memorias emocionales, se acompaña por el procesamiento de la asociación *contexto-estímulo aversivo* a nivel de la ABL (Dudai, 2002, 2004; Sah y col., 2003; Tronson y col., 2012). Actualmente, se acepta que para la formación de este tipo de memoria, se establece un patrón de actividad sincronizado en el espacio y el tiempo, en una red neuronal compleja, característica de cada asociación (Bruehl-Jungerman y col., 2007; Dudai, 2002).

El estado emocional del individuo juega un rol importante en los eventos que tienen lugar durante la generación de una memoria a largo plazo. En este sentido, cuando el estímulo tiene valencia emocional, la información es procesada de manera más eficiente por la acción moduladora de las catecolaminas (Gupta, 2009; Paz y col., 2013b). Actualmente, la teoría que incluye a la neurotransmisión catecolaminérgica en los cambios plásticos que acompañan la formación de trazas de memoria, se conoce como *neoplasticidad hebbiana* (Johansen y col., 2011; Lisman y col., 2011). Tanto a nivel de HPC como de ABL se han identificado proyecciones dopaminérgicas desde estructuras límbicas, e inervación noradrenérgica desde LC (Abraham y col., 2014; Lemon y col., 2009; Roozendaal y col., 1999; Thierry y col., 2000; Wise, 2004). La acción final de esta neurotransmisión es compleja cuando se considera el tipo de receptor, su cascada de señalización y la experiencia conductual evaluada (Abraham y col., 2014; Gelinas y col., 2008; Wise, 2004). En líneas generales, se considera que las drogas o eventos que movilizan al sistema catecolaminérgico, tienen un efecto facilitador en dosis moderadas, o interferente en dosis elevadas, sobre la consolidación de una memoria a largo plazo (Izquierdo y col., 1997).

*Alteraciones estructurales inducidas por anfetamina*

Numerosas evidencias señalan la ocurrencia de cambios en la vasculatura y la glía en ABL e HPC, que acompañan el desarrollo de diversas patologías y que, a su vez, involucran alteraciones funcionales de las mismas. Los resultados obtenidos en el presente trabajo indican que la administración repetida a anfetamina no produce alteraciones en la red vascular de ABL e HPC. Además, bajo este esquema experimental, tampoco se evidenciaron cambios basales en la reactividad glial de estas estructuras. En línea con nuestras evidencias, otros autores han descrito que la exposición a anfetamina produce un aumento en los niveles de citoquinas pro-inflamatorias en corteza y CPu, sin cambios a nivel hipocampal (Valvassori y col., 2015). Mientras que, los resultados obtenidos con tratamiento repetido con metanfetamina, muestran alteraciones dopaminérgicas en corteza sin cambios en HPC (Lu y col., 2010). Asimismo, en un régimen de toxicidad con anfetamina, se observó degeneración de terminales dopaminérgicas en CPu sin pérdida de aferencias serotoninérgicas en HPC (Belcher y col., 2005). Las diferencias regionales observadas podrían explicarse por la menor inervación catecolaminérgica de ABL e HPC, en comparación con CPF y CPu (Belcher y col., 2005; Lu y col., 2010; Richtand y col., 1995; Thierry y col., 2000; Valvassori y col., 2015). Es así que el efecto neurotóxico de los psicoestimulantes en estas áreas sólo se identifica en condiciones de ruptura de la BHE, producto de la administración de dosis tóxicas (Bowyer y col., 2008). A nivel hipocampal, las alteraciones estructurales en la vasculatura y la glia se identifican en modelos animales de diabetes, envejecimiento y Alzheimer, en paralelo con déficit en la memoria a corto plazo (Beauquis y col., 2010a; Beauquis y col., 2010b; Beauquis y col., 2014; Saravia y col., 2007; Saravia y col., 2006).

Como se mencionó anteriormente, nuestros resultados destacan la especificidad de este tipo de protocolo experimental para identificar la toxicidad región-específica, que acompaña el fenómeno de sensibilización a anfetamina (Ellison y col., 1993). Es así que ABL evidencia una mayor susceptibilidad a la reactividad astrocitaria, dado que ésta sólo se manifiesta ante una nueva exposición a la droga; similar a lo observado en CPF infralímbica. En la depresión, la ansiedad y otros trastornos emocionales, se identifican cambios estructurales, asociados a alteraciones volumétricas, en ABL (Boccardi y col., 2011; Gosselin y col., 2009; Leventopoulos y col., 2007; Rubinow y col., 2016).

*Alteraciones funcionales inducidas por anfetamina. Rol de receptores AT<sub>1</sub>*

Los cambios plásticos inducidos por psicoestimulantes involucran la participación activa de ABL e HPC, las cuales son áreas que cumplen un rol fundamental en el proceso de aprendizaje que

acompaña al fenómeno de sensibilización (Kelley, 2004; Lodge *y col.*, 2008; Rademacher *y col.*, 2010). Al mismo tiempo, como consecuencia de la exposición a drogas, o a estímulos nocivos, se evidencian modificaciones funcionales persistentes en estas áreas, sin cambios estructurales de glía o vasculatura (Hoffman *y col.*, 2017; Kelley, 2004). El resultado electrofisiológico, obtenido en el presente trabajo, concuerda con estas evidencias dado que indica una alteración funcional en condiciones basales a nivel del GD de HPC, luego de la administración repetida a anfetamina. En este sentido, observamos una disminución en el umbral de estimulación eléctrica necesario para la inducción de LTP. Esto se interpreta como un aumento en la sensibilidad neuronal en HPC frente a futuros desafíos, resultando en la potenciación de la respuesta evocada. Considerando que las vías dopaminérgicas inervan las estructuras hipocampales, éstas podrían estar implicadas en el cambio funcional inducido por anfetamina en esta estructura. En este sentido, un fenómeno similar en el umbral de activación en HPC, se identifica cuando se realiza un tratamiento con agonistas dopaminérgicos o luego de la exposición repetida a cocaína (Gabach *y col.*, 2013; Perez *y col.*, 2010; Roggenhofer *y col.*, 2013). Asimismo, la ocurrencia de LTP durante el proceso de consolidación estaría modulada por activación de receptores D1, a través de una conexión bidireccional con estructuras límbicas en etapas tempranas y tardías de dicho proceso (Izquierdo *y col.*, 2006; Lemon *y col.*, 2006, 2012). En el mismo sentido, se ha descrito que la exposición aguda o repetida a anfetamina, modifica diferencialmente la transmisión inhibitoria y excitatoria en el circuito ABL-CPF (Tse *y col.*, 2011). Estas evidencias muestran que no existen diferencias basales en su conectividad, luego del tratamiento repetido con el psicoestimulante. Sin embargo, las alteraciones en este circuito se observan como una modificación en la sensibilidad a un estímulo necesario para evocar respuestas y, además, como una resistencia al efecto agudo de anfetamina o agonistas dopaminérgicos (Tse *y col.*, 2011).

Nuestros resultados indican que el bloqueo de R-AT<sub>1</sub> previene el cambio funcional inducido por exposición repetida a anfetamina, en GD de HPC. La prevención del cambio, por bloqueo de estos receptores, podría deberse a su efecto modulador sobre la actividad dopaminérgica. En este sentido, se conoce que AngII interviene en respuestas conductuales mediadas por dopamina vía activación de R-AT<sub>1</sub> (Brown *y col.*, 1996; Mendelsohn *y col.*, 1993). Además, un amplio número de evidencias resaltan que los efectos observados en procesos cognitivos por estimulación con AngII, dependen de manera directa de la integridad del sistema dopaminérgico (Winnicka, 1998; Winnicka *y col.*, 1997a; Winnicka *y col.*, 1997b). Sin embargo, el rol de AngII en tareas cognitivas es controversial y deben ser considerados dentro del marco experimental en el que se evalúa su función. Mientras algunos grupos señalan efectos estimulantes sobre la generación de una traza de memoria, otros autores refieren un efecto inhibitorio sobre la actividad eléctrica neuronal en HPC y ABL (Gard, 2002; Wright *y col.*, 2013; Wright *y col.*, 2008).

En resumen, los resultados del presente trabajo indican que, la exposición repetida a anfetamina, promueve cambios funcionales a nivel hipocampal que involucran la participación de R-AT<sub>1</sub>, en ausencia de cambios estructurales en HPC y ABL. Sin embargo, queda por analizar si estos cambios funcionales tienen consecuencias conductuales cuando se evalúa una memoria a largo plazo. En los próximos apartados se abordarán los resultados obtenidos en relación a este interrogante.

*Evitación inhibitoria. Interferencia por exposición a un desafío*

La evitación inhibitoria es un acercamiento experimental que permite el estudio del fenómeno de consolidación, donde el tiempo de permanencia en el compartimiento claro durante la sesión de testeo (**Latencia 2**), es un indicador del aprendizaje adquirido (Izquierdo y col., 2006; Izquierdo y col., 1997). En esta prueba conductual la asociación es inmediata y la consolidación de esta memoria depende de la actividad de áreas corticales, hipocampales y extra-hipocampales, entre las que se encuentra ABL (Izquierdo y col., 2006). Se seleccionó el protocolo de 3 shocks eléctricos de 0.5mA, que genera una traza de memoria estable que puede ser evocada 24hs después y se expresa como mayor **Latencia 2**. Concomitante con esta conducta, se observó aumento en la expresión del factor de transcripción c-Fos en CPF, ABL e HPC; lo que se interpreta como la activación de estas áreas al momento del test. La inmunomarcación del factor de transcripción de genes de expresión temprana, c-Fos, es una de las herramientas más utilizadas para el análisis del patrón de activación neuronal en proceso (Herdegen y col., 1998; Morgan y col., 1991). Este factor heterodimeriza con proteínas de la familia Jun para formar el complejo AP-1 y dirigir la transcripción génica, en respuesta a múltiples estímulos fisiológicos y patológicos (Alberini, 2009). La expresión de c-Fos se observa luego de estimulación sensorial, eléctrica o epileptogénica, y es considerado indicador de actividad neuronal y no de plasticidad sináptica (Alberini, 2009). En este sentido, se ha descrito un patrón temporal en sus niveles de expresión en CPF e HPC, observado como un aumento de c-Fos, 90min luego de un condicionamiento contextual, que regresa a sus niveles basales a las 8hs (Barry y col., 2017). Estas evidencias soportan su rol como indicador de la actividad neuronal que ocurre al momento de la evocación de la memoria durante la sesión de test, independientemente de los eventos que tienen lugar durante el condicionamiento. Nuestros resultados están en concordancia con lo descrito para memorias de miedo, donde se observa aumento en la expresión de c-Fos en ABL, CPF y sub-regiones de HPC, indicando la activación de éstas áreas al momento de la expresión de la memoria a largo plazo (Fukushima y col., 2014; Goshen y col., 2011). Estos resultados conciben con el déficit en la expresión de memorias de miedo, observado luego de la inactivación farmacológica de ABL y CPF (Stevenson, 2011).

Anfetamina produce alteraciones en procesos cognitivos; sin embargo considerando las múltiples conexiones involucradas en la generación de memorias, resulta complejo encontrar un patrón que permita predecir los efectos de este psicoestimulante. Las discrepancias en los resultados obtenidos en memoria a largo plazo pueden atribuirse a los protocolos experimentales utilizados (múltiples sesiones de entrenamiento con administración repetida del psicoestimulante), ruta de administración de la droga, cepa de roedores (ya que también difieren en su respuesta a estrés, anfetamina o dopamina) o tipo de test conductual (memorias de miedo o asociadas a estímulo reforzante) (Brown y col., 2000; Cestari y col., 1992; Fenu y col., 2003; Holahan y col., 2005; Kaminsky y col., 2001; Kehayov y col., 1989; Leri y col., 2013; Nelson y col., 2006; Schwienbacher y col., 2005; Simon y col., 2006). Por ejemplo, se considera que el efecto estimulante post-entrenamiento de anfetamina, para el caso de un condicionamiento *pavloviano*, estaría relacionado con la participación de este tipo de aprendizaje en el desarrollo de la adicción (Blaiss y col., 2007; Simon y col., 2006). En líneas generales se propone que, en memorias no-reforzantes, la administración del psicoestimulante luego del entrenamiento tendría un efecto en U sobre el fenómeno de consolidación; donde dosis intermedias del psicoestimulante interfieren, mientras que dosis bajas o altas mejoran, dicho proceso (Cabib y col., 1997; Seliger, 1975, 1977). En el presente trabajo, el test conductual seleccionado nos permitió evaluar un tipo de memoria clásica con etapas claramente identificables; donde se utilizó la exposición a un desafío post-entrenamiento para evaluar los efectos en el proceso activo de consolidación y excluir efectos interferentes de la droga en la adquisición de la memoria (McGaugh, 1973). De este modo, nuestro protocolo permite identificar un efecto interferente de Des. Anfetamina en la consolidación de una memoria de evitación inhibitoria. Cabe destacar que el desafío sólo tiene efecto frente a un shock de alta intensidad, resaltando la especificidad del fenómeno interferente. Del mismo modo, otros autores han reportado un déficit en memoria a largo plazo, por anfetamina post-entrenamiento, en la tarea de evitación inhibitoria, evitación por discriminación e inhibición por pre-pulso (tarea que depende de manera directa de la actividad dopaminérgica) (Cabib y col., 1997; Crabbe y col., 1975; Haycock y col., 1977; James, 1975; Sanday y col., 2013; Seliger, 1977; van den Buuse y col., 2005). Además, efectos interferentes similares se han observado por administración aguda de cocaína, estrés o agonistas dopaminérgicos, y, en todos los casos, el efecto se ha prevenido por antagonistas de dopamina (Cabib y col., 1997; Castellano y col., 1991; Cestari y col., 1992; Kovacs y col., 1978; Puglisi-Allegra y col., 1994). El bloqueo de R-AT<sub>1</sub>, después del entrenamiento y previo a la administración del Des. Anfetamina, indujo una reversión parcial del efecto agudo de la droga, indicando un rol para estos receptores en el efecto interferente del psicoestimulante. Estos resultados podrían ser explicados como consecuencia del rol modulador de R-AT<sub>1</sub> en la neurotransmisión dopaminérgica en condiciones tónicas y evocadas (Brown y col., 1996; Dwoskin y

*col.*, 1992; Jenkins *y col.*, 1997; Mendelsohn *y col.*, 1993; Narayanaswami *y col.*, 2013; Simonnet *y col.*, 1979). En el mismo sentido, otros autores observaron que el efecto interferente de amfetamina y de agonistas dopaminérgicos, en la tarea de inhibición por pre-pulso no se evidencia en ratones transgénicos con baja expresión de ECA (van den Buuse *y col.*, 2005).

Por último, observamos que la exposición a Des. Frío, luego del entrenamiento, tiene un efecto interferente sobre la consolidación de la tarea de evitación inhibitoria, al igual que lo observado para Des. Anfetamina. Resultados similares se observaron en la memoria espacial, evaluada en el laberinto de agua de Morris a temperaturas bajas, y en la tarea de evitación inhibitoria, cuando la exposición a frío se combinó con estrés por inmovilización (Klenerova *y col.*, 2003a; Klenerova *y col.*, 2003b; Panakhova *y col.*, 1984; Tchekalarova *y col.*, 1998). Los efectos observados en el presente trabajo deben ser analizados en el marco del efecto selectivo de Des. Frío en la estimulación simpática y del SRA. Noradrenalina es un reconocido modulador de la consolidación de memorias de miedo por su acción a nivel de ABL y la consiguiente regulación indirecta de la actividad hipocampal (McIntyre *y col.*, 2003; Roozendaal *y col.*, 1999). Las evidencias indican que el aumento en su liberación en ABL es proporcional a la intensidad del shock recibido y que su actividad es necesaria para la consolidación de una memoria de miedo (Ferry *y col.*, 1999; McCarty *y col.*, 1981). En condiciones de estrés, la adrenalina plasmática liberada estimularía de manera directa al núcleo del tracto solitario, e indirectamente al LC, aumentando la liberación de noradrenalina en ABL (Ferry *y col.*, 1999; McGaugh *y col.*, 2002). Este aumento explica el efecto potenciador del estrés sobre la consolidación de memorias a largo plazo (Ferry *y col.*, 1999; Schwabe *y col.*, 2012). Aunque se ha observado que el estrés puede interferir con la generación de una memoria a largo plazo en tareas de evitación inhibitoria (Cabib *y col.*, 1997; Raghavendra *y col.*, 1999). Estas evidencias controversiales se explicarían por el nivel de adrenalina plasmática alcanzado en cada situación (Ferry *y col.*, 1999; McCarty *y col.*, 1981). En el mismo sentido, dosis elevadas de corticotropina, glucocorticoides, vasopresina, noradrenalina y adrenalina interfieren con la consolidación de la memoria a largo plazo (Izquierdo *y col.*, 1997). En relación al SRA, se observó que el bloqueo de R-AT<sub>1</sub> previene el efecto interferente en la consolidación del estrés por inmovilización (Raghavendra *y col.*, 1999). En paralelo, diversos estudios mostraron el efecto interferente de AngII, vía R-AT<sub>1</sub>, en la consolidación de la memoria, cuando se administra a nivel central inmediatamente después del condicionamiento; similares a los obtenidos con la administración intracerebroventricular de renina (de Souza *y col.*, 2004; DeNoble *y col.*, 1991; Koller *y col.*, 1979; Lee *y col.*, 1995b; Morgan *y col.*, 1977; Raghavendra *y col.*, 1999). En conjunto, estas evidencias indican que la activación simpática con estimulación del SRA, descrita para Des. Frío, podría estar mediando el efecto interferente que éste presenta en la consolidación de una memoria de miedo.

*Evitación inhibitoria. Alteraciones inducidas por anfetamina y rol de receptores AT<sub>1</sub>*

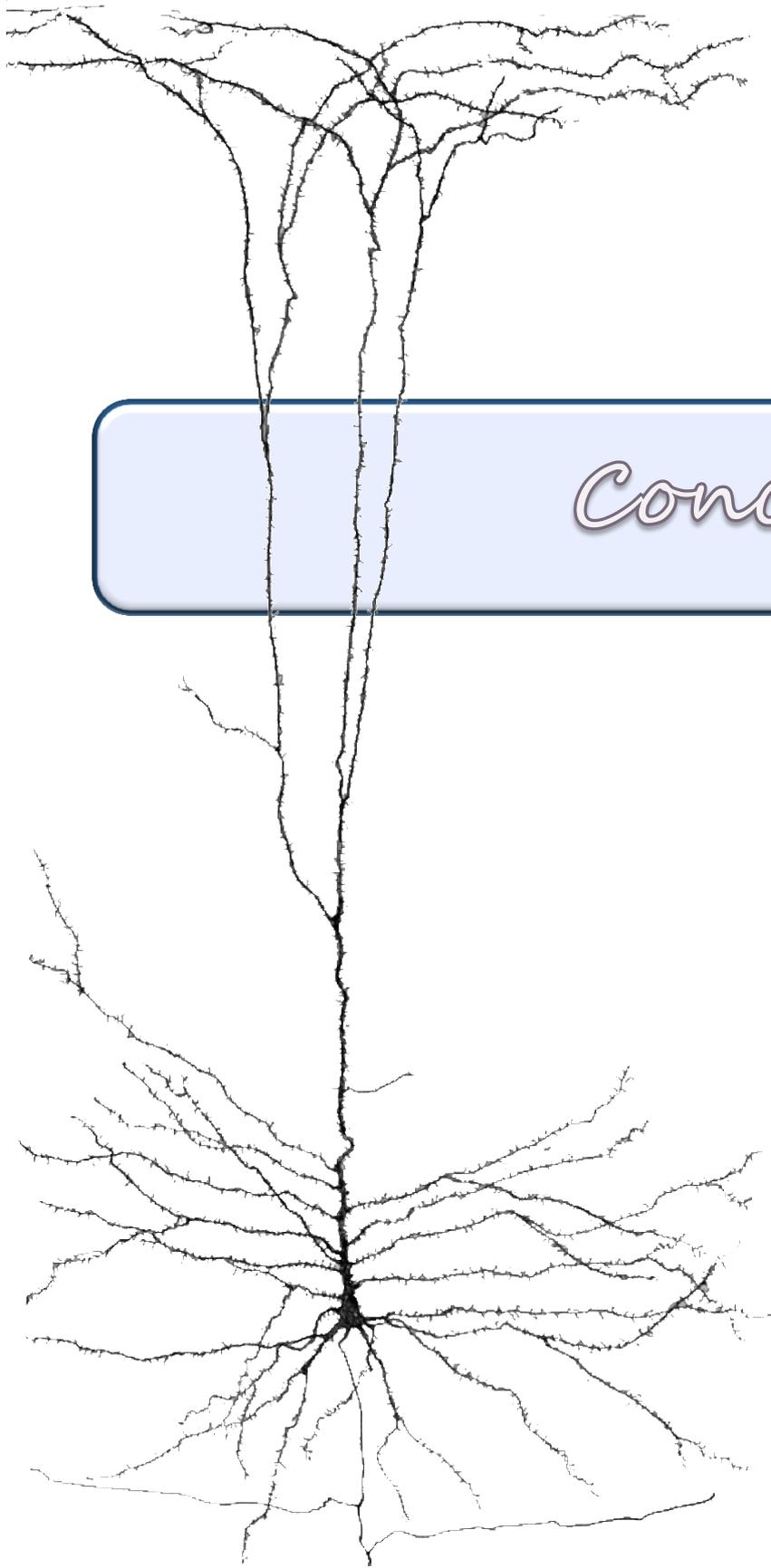
La administración repetida de psicoestimulantes induce sensibilización conductual, un fenómeno que implica cambios neuroquímicos a largo plazo, en áreas cerebrales que conforman el sistema límbico y que se expresa por exposición a un desafío (Pierce y *col.*, 1997; Vanderschuren y *col.*, 2000). El aumento de la actividad locomotora, a consecuencia de la exacerbación dopaminérgica en CPu y corteza evocada por el desafío, es ampliamente reconocido como la expresión conductual de la sensibilización (Robinson y *col.*, 1997, 2004; White y *col.*, 1998). No obstante, las alteraciones en la conectividad neuronal inducidas por anfetamina también se evidencian en áreas involucradas en procesos de memoria y aprendizaje. En el presente trabajo, la generación de una memoria a largo plazo no se altera, luego de la administración repetida de anfetamina, en condiciones basales. En el mismo sentido, otros autores encontraron que la administración del psicoestimulante no modifica la adquisición de memorias espaciales o dependientes de la actividad conjunta de HPC-ABL (Eldred y *col.*, 2013; Ito y *col.*, 2010; Kokkinidis, 1983). Al igual que ocurre en la sensibilización conductual, nuestros resultados muestran que las alteraciones en la memoria a largo plazo sólo se evidencian ante la exposición a un desafío. En este sentido, el tratamiento con el psicoestimulante genera resistencia al efecto interferente de ambos desafíos. Esto último puede interpretarse como la expresión conductual de una alteración funcional subyacente en circuitos involucrados en tareas de memoria y aprendizaje. Este patrón de resistencia a la interferencia se identificó también en otros modelos experimentales que evalúan la misma conducta. Por ejemplo, en el caso de estrés por restricción de comida se observa resistencia al efecto interferente de anfetamina y estrés por inmovilización, mientras que el efecto amnésico de histamina no se observa en animales pre-tratados con histamina (Ahmadi y *col.*, 2010; Cabib y *col.*, 1997). Se ha demostrado que estos eventos descritos involucran la neurotransmisión dopaminérgica (Ahmadi y *col.*, 2010; Cabib y *col.*, 1997). De manera similar, pero en tareas de toma de decisiones, la administración repetida de cocaína, genera resistencia al efecto interferente del psicoestimulante en esta conducta (Winstanley y *col.*, 2007).

En el presente trabajo, el análisis del patrón de activación neuronal durante la sesión del test, permite un acercamiento a las posibles alteraciones funcionales que subyacen a este efecto resistente. En primer lugar, se observó que los animales controles que manifiestan el efecto interferente a nivel conductual (menor latencia 2), presentan una menor actividad neuronal en CPF, HPC y ABL. Estos resultados se complementan con lo descrito anteriormente, donde la activación de estas mismas áreas se observa en aquellos animales expuestos al protocolo que genera traza de memoria. En segundo lugar, se observó que la resistencia a la interferencia, en los animales tratados

con el psicoestimulante a nivel conductual, condice con la activación de CPF y ABL. Otros autores han descrito que la exposición repetida al psicoestimulante genera resistencia a la disrupción de la conexión ABL-CPF, por administración aguda de anfetamina o agonistas dopaminérgicos, en ausencia de cambios basales (Tse *y col.*, 2011). Por último, en el presente trabajo, los animales tratados con anfetamina y expuestos a un desafío, mostraron una disminución en el número de neuronas activas a nivel hipocampal, pese a la latencia 2 elevada. Considerando los cambios funcionales observados a nivel de GD del HPC por administración repetida del psicoestimulante, se interpreta que la ausencia en el incremento de neuronas activas en esta área podría ser explicada por los niveles elevados de funcionalidad que estas neuronas presentan.

Finalmente, nuestros resultados indican que el bloqueo de R-AT<sub>1</sub> previno el desarrollo de los cambios funcionales. Es así que los animales que recibieron el pre-tratamiento con el ARBs evidencian el efecto interferente de los desafíos, concomitante con una disminución en la activación neuronal en CPF, ABL e HPC. Cabe destacar que este grupo experimental (CV-Anf) no se diferencia de su control en condiciones basales, en ninguno de los parámetros evaluados. Estos resultados conciben con trabajos previos de nuestro grupo que muestran la participación de R-AT<sub>1</sub> en los cambios neuroadaptativos, inducidos por anfetamina, a nivel del circuito de recompensa (Paz *y col.*, 2011; Paz *y col.*, 2013a; Paz *y col.*, 2014). Más aún, nuestros resultados recientes extienden el rol de los R-AT<sub>1</sub> a alteraciones inducidas por el psicoestimulante en áreas fuera del sistema límbico (Marchese *y col.*, 2017; Occhieppo *y col.*, 2017).

Los resultados obtenidos, y discutidos en esta sección, permiten identificar alteraciones funcionales en áreas involucradas en el control de la memoria y el aprendizaje por exposición repetida a anfetamina. Estas alteraciones se evidencian a nivel funcional, en condiciones basales, y se expresan conductualmente ante la exposición a un desafío, en ausencia de cambios estructurales. Las evidencias obtenidas en el presente trabajo soportan la participación de los R-AT<sub>1</sub> en la neuroadaptación inducida por anfetamina, en este caso sobre los circuitos que procesan memorias a largo plazo.



*Conclusión*

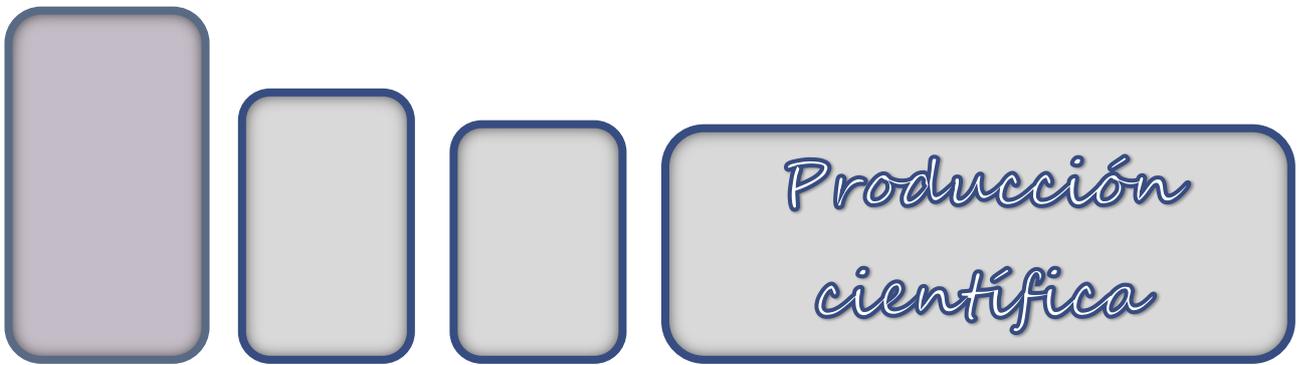
El concepto de unidad neurovascular, desarrollado en las últimas décadas, plantea un nuevo escenario en el estudio de patologías del SNC, en particular en aquellas que cursan con neuroinflamación. La actividad coordinada de neuronas, astrocitos y células endoteliales mantiene la integridad y la homeostasis del microambiente cerebral. Esta interrelación parácrina presenta diferencias regionales que dependen del tipo de inervación que reciben, densidad vascular que las irriga e interacción local de sus componentes.

En el campo de estudio de drogas de abuso, los principales efectos considerados han sido los cambios neuroadaptativos involucrados en el desarrollo de adicción. Los mismos, implican cambios persistentes en la conectividad de áreas encargadas del procesamiento de respuestas de recompensa. Dentro de las drogas de abuso, las sustancias tipo anfetamina son el segundo grupo de drogas de mayor consumo a nivel mundial y ejercen sus acciones a nivel de vías catecolaminérgicas. La exposición repetida a este tipo de sustancias, está asociada con déficits neurofisiológicos en el dominio de tareas ejecutivas y cognitivas. Más aún, estos cambios se mantienen años después de discontinuado su uso y se relacionan con alteraciones neuropatológicas a nivel cortical. Al mismo tiempo, su efecto sobre la vasculatura es particularmente importante, pudiendo afectar su integridad de manera directa o indirecta.

En el presente trabajo de tesis se evidencia el aumento de marcadores pro-inflamatorios en la microvasculatura cerebral, y se corrobora la ocurrencia de efectos deletéreos regionales, por exposición a dosis intermedias, no tóxicas, de anfetamina. Se muestra un aumento en la expresión de receptores AT<sub>1</sub> de angiotensina II en microvasos cerebrales, involucrados en la susceptibilidad de la respuesta de estrés celular a futuros estímulos vasoconstrictores, farmacológicos o fisiológico. Al respecto, nuestros resultados ponen de manifiesto que las alteraciones inducidas por psicoestimulantes también afectan futuras respuestas a estímulos ambientales. Por otro lado, las diferencias regionales observadas para los efectos deletéreos de anfetamina, conciben con las evidencias que proponen la susceptibilidad de áreas corticales al desarrollo de eventos neurodegenerativos. En este sentido, en CPF, la interacción directa de terminales nerviosos con la microvasculatura es particularmente elevada y altamente dependiente de la actividad dopaminérgica, en comparación con lo que se observa a nivel hipocampal. Además, es un área cuya funcionalidad está influenciada por el microambiente cerebral, en mayor medida que en otras áreas, y es la principal y primer estructura afectada en casos de alteraciones vasculares del SNC. Los efectos deletéreos corticales inducidos por el psicoestimulante, se evidenciaron a nivel conductual como déficit en la memoria de trabajo, en condiciones basales. Más aún, los resultados obtenidos a nivel hipocampal y de ABL, refuerzan la existencia de cambios región-específicos al no presentar alteraciones estructurales ni conductuales en condiciones basales. Los cambios funcionales se

evidenciaron ante un desafío, en concordancia con el fenómeno descrito para las neuroadaptaciones inducidas por exposición a psicoestimulantes.

El rol modulador del SRA cerebral, en diversas funciones del SNC, ha tomado relevancia en los últimos años por estudios epidemiológicos que resaltan los efectos neuroprotectores de los bloqueantes de receptores de angiotensina II. Este grupo farmacológico, ampliamente utilizado como tratamiento para la hipertensión arterial, ha sido relacionado con una menor incidencia de trastornos neurodegenerativos y/o neuroinflamatorios, tales como depresión, Alzheimer, Parkinson, esquizofrenia, hipertensión arterial y envejecimiento. Estas evidencias dan lugar a numerosas líneas de investigación que relacionan el desarrollo de estos trastornos con el rol modulador de los receptores AT<sub>1</sub> en la actividad catecolaminérgica, flujo sanguíneo cerebro-vascular y respuestas neuroinflamatorias. Nuestros resultados se suman y extienden este amplio cuerpo de evidencias, identificando la participación del receptor AT<sub>1</sub> en el desarrollo de respuestas neuroadaptativas y vasculares inducidas por una noxa farmacológica como la anfetamina. Considerando las múltiples acciones de este receptor a nivel del SNC y la baja incidencia de efectos adversos e hipotensores (en individuos normotensos) que presentan sus bloqueantes, los estudios más recientes promueven nuevos usos terapéuticos para este grupo farmacológico. El presente trabajo aporta evidencias de la participación de receptores AT<sub>1</sub> en las alteraciones regionales inflamatorias en la unidad neurovascular, y sustenta su bloqueo como una potencial estrategia terapéutica en la prevención del desarrollo de patologías neuroinflamatorias.



### Publicación con datos de este trabajo de tesis

- **Marchese NA\***, Artur de la Villarmois E\*, Basmadjian M, Baiardi G, Perez M, Bregonzio C. *Brain Angiotensin II AT<sub>1</sub> receptors are involved in the acute and long-term amphetamine-induced neurocognitive alterations.* **Psychopharmacology** (2016) DOI10.1007/s00213-015-4153-1  
\*contribuyen de igual forma

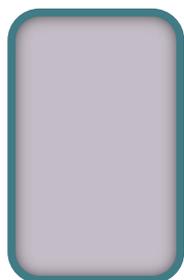
### Publicaciones relacionadas con este trabajo de tesis

- Basmadjian, OM; Occhieppo, VB; **Marchese, NA**, Baiardi, G and Bregonzio, C. *Brain angiotensin II involvement in central nervous system chronic disorders.* Special Issue in **Protein & Peptide Letters**: “Renin-Angiotensin System: Role in chronic diseases”. DOI: 10.2174/0929866524666170728144801
- Occhieppo V\*, **Marchese NA\***, Rodriguez ID, Basmadjian OM, Baiardi G, Bregonzio C. *Enhancement of thermal nociception and astrocyte reactivity induced by amphetamine involves central AT<sub>1</sub> receptor activation.* **European Journal of Neuroscience**. 2017 Apr 27. doi: 10.1111/ejn.13594  
\*contribuyen de igual forma
- **Marchese NA\***, Paz MC\*; Caeiro X, Dadam FM, Baiardi G, Perez MF, Bregonzio C. *Angiotensin II AT<sub>1</sub> receptors mediate neuronal sensitization and sustained blood pressor response induced by a single injection of amphetamine.* **Neuroscience** 340 (2017) 521–529. \* contribuyen de igual forma
- Casarsa, B.S.; Marinzalda, M.A; **Marchese, N.A.**; Paz, M.C.; Vivas, L.; Baiardi, G.; Bregonzio, C. *A previous history of repeated amphetamine exposure modifies brain angiotensin II AT<sub>1</sub> receptor functionality.* **Neuroscience** 307 (2015) 1-13.
- Paz MC\*, **Marchese NA\***, Stroppa MM, Gerez de Burgos NM, Imboden H, Baiardi G, Cancela LM1, Bregonzio C. *Involvement of the brain renin-angiotensin system (RAS) in the neuroadaptive responses induced by amphetamine in a two-injection protocol.* **Behavioural Brain Research**. 2014 Oct 1;272:314-23. \* contribuyen de igual forma.
- **Marchese NA**, Rodríguez I, Occhieppo V, Paz MC, Baiardi G, Bregonzio C. *New insights of brain renin-angiotensin system far beyond blood pressure: central angiotensin II as a key modulator in the stress response and amphetamine induced-neuroadaptations.* **Revista de Farmacología de Chile** (2014) 7(3) 17-25.
- Paz MC\*, **Marchese NA\***, Cancela LM, Bregonzio C. *Angiotensin II AT<sub>1</sub> receptors are involved in the neuronal activation induced by amphetamine in a two-injection protocol.* **BioMed Research International**. Volume 2013 (2013), Article ID 534817 \* contribuyen de igual forma.

### Capítulos de Libro

- **Libro:** Psychiatry and neuroscience update: bridging the divide. Vol II.  
**Capítulo:** *Cognitive alterations induced by psychostimulants: targeting the central AT<sub>1</sub> receptors.*  
**Autores:** **Marchese NA**, Basmadjian OM, Occhieppo VB, Baiardi G, Bregonzio C.  
**Editorial:** Springer.  
**ISBN:** 978-3-319-53125-0
- **Libro:** Psychiatry and neuroscience update: bridging the divide. Vol II.  
**Capítulo:** *The extent of neuroadaptive responses to psychostimulants: focus on brain angiotensin system*  
**Autores:** Bregonzio C, **Marchese NA**, Paz MC, Artur de la Villarmois E, Baiardi G, Pérez MF.  
**Editorial:** Springer  
**ISBN:** 978-3-319-53125-0

- **Libro:** Psychiatry and neuroscience update: bridging the divide.  
**Capítulo:** *Neurovascular cognitive alterations: implication of brain renin-angiotensin system (RAS). Therapeutic opportunities and risk factors.*  
**Autores:** Marchese, N.A.; Casarsa, B; Bregonzio C.  
**Editorial:** Springer (2015)  
**ISBN:** 978-3-319-17102-9
- **Libro:** Psychiatry and neuroscience update: bridging the divide.  
**Capítulo:** *Brain renin-angiotensin system: A novel therapeutic target for psychostimulant and alcohol related disorders?*  
**Autores:** Paz, MC; Marchese NA; Bregonzio, C; Baiardi, G.  
**Editorial:** Springer (2015)  
**ISBN:** 978-3-319-17102-9
- **Libro:** Angiotensin New Research  
**Capítulo:** *New roles for the neuropeptide Angiotensin II: Stress and drug abuse*  
**Autores:** Bregonzio C, Casarsa BS, Marchese NA, Baiardi G.  
**Editorial:** Nova Science Publishers, Inc. (2012)  
**ISBN:** 978-1-62100-807-1



*Bibliografía*

- Abbott, N.J., Patabendige, A.A., Dolman, D.E., Yusof, S.R., and Begley, D.J. (2010).** Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiology of disease* 37, 13-25.
- Abel, T., and Lattal, K.M. (2001).** Molecular mechanisms of memory acquisition, consolidation and retrieval. *Current opinion in neurobiology* 11, 180-187.
- Abraham, A.D., Neve, K.A., and Lattal, K.M. (2014).** Dopamine and extinction: a convergence of theory with fear and reward circuitry. *Neurobiology of learning and memory* 108, 65-77.
- Agarwal, D., Dange, R.B., Raizada, M.K., and Francis, J. (2013).** Angiotensin II causes imbalance between pro- and anti-inflammatory cytokines by modulating GSK-3 $\beta$  in neuronal culture. *British journal of pharmacology* 169, 860-874.
- Ahmadi, S., Malekmohammadi, N., and Zarrindast, M.R. (2010).** Repeated histamine pretreatment decreased amnesia induced by post-training administration of the drug in a step-down inhibitory avoidance test in mice. *Archives of Iranian medicine* 13, 209-216.
- Ahn, S., Linsenbardt, D.N., Lapish, C.C., and Rubchinsky, L.L. (2013).** Repeated injections of D-Amphetamine evoke rapid and dynamic changes in phase synchrony between the prefrontal cortex and hippocampus. *Frontiers in behavioral neuroscience* 7, 92.
- Ahn, S., Rubchinsky, L.L., and Lapish, C.C. (2014).** Dynamical reorganization of synchronous activity patterns in prefrontal cortex-hippocampus networks during behavioral sensitization. *Cerebral cortex* 24, 2553-2561.
- Alberini, C.M. (2009).** Transcription factors in long-term memory and synaptic plasticity. *Physiological reviews* 89, 121-145.
- Albrecht, D. (2010).** Physiological and pathophysiological functions of different angiotensins in the brain. *British journal of pharmacology* 159 1392–1401.
- Allen, A.M., Giles, M.E., Lee, J., Oldfield, B.J., Mendelsohn, F.A., and McKinley, M.J. (2001).** Review: AT1-receptors in the central nervous system. *Journal of the renin-angiotensin-aldosterone system : JRAAS* 2, S95-S101.
- Allen, A.M., MacGregor, D.P., Chai, S.Y., Donnan, G.A., Kaczmarczyk, S., Richardson, K., Kalnins, R., Ireton, J., and Mendelsohn, F.A. (1992).** Angiotensin II receptor binding associated with nigrostriatal dopaminergic neurons in human basal ganglia. *Annals of neurology* 32, 339-344.
- Allen, A.M., MacGregor, D.P., McKinley, M.J., and Mendelsohn, F.A. (1999a).** Angiotensin II receptors in the human brain. *Regulatory peptides* 79, 1-7.
- Allen, A.M., Paxinos, G., McKinley, M.J., Chai, S.Y., and Mendelsohn, F.A. (1991).** Localization and characterization of angiotensin II receptor binding sites in the human basal ganglia, thalamus, midbrain pons, and cerebellum. *The Journal of comparative neurology* 312, 291-298.
- Allen, A.M., Zhuo, J., and Mendelsohn, F.A. (1999b).** Localization of angiotensin AT1 and AT2 receptors. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 10 *Suppl* 11, S23-29.
- Anden, N.E., Dahlstrom, A., Fuxe, K., and Larsson, K. (1965).** Mapping out of catecholamine and 5-hydroxytryptamine neurons innervating the telencephalon and diencephalon. *Life sciences* 4, 1275-1279.
- Anderson, M.A., Ao, Y., and Sofroniew, M.V. (2014).** Heterogeneity of reactive astrocytes. *Neuroscience letters* 565, 23-29.
- Ando, H., Jezova, M., Zhou, J., and Saavedra, J.M. (2004a).** Angiotensin II AT1 receptor blockade decreases brain artery inflammation in a stress-prone rat strain. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1018, 345-350.
- Ando, H., Zhou, J., Macova, M., Imboden, H., and Saavedra, J.M. (2004b).** Angiotensin II AT1 receptor blockade reverses pathological hypertrophy and inflammation in brain microvessels of spontaneously hypertensive rats. *Stroke* 35, 1726-1731.
- Antunes-Rodrigues, J., de Castro, M., Elias, L.L., Valenca, M.M., and McCann, S.M. (2004).** Neuroendocrine control of body fluid metabolism. *Physiological reviews* 84, 169-208.
- Araque, A.N., M (2017).** El ayer y hoy de los astrocitos. *MENTE Y CEREBRO* 53.
- Armando, I., Carranza, A., Nishimura, Y., Barontini, M., Ito, T., and Saavedra, J.M. (2001).** Candesartan decreases the sympatho-adrenal and hormonal response to isolation stress. *Journal of the renin-angiotensin-aldosterone system : JRAAS* 2, S130-S135.
- Armstrong, V., Reichel, C.M., Doti, J.F., Crawford, C.A., and McDougall, S.A. (2004).** Repeated amphetamine treatment causes a persistent elevation of glial fibrillary acidic protein in the caudate-putamen. *European journal of pharmacology* 488, 111-115.
- Arnsten, A.F. (1998).** Catecholamine modulation of prefrontal cortical cognitive function. *Trends in cognitive sciences* 2, 436-447.

- Arnsten, A.F.** (2006). Stimulants: Therapeutic actions in ADHD. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 31, 2376-2383.
- Arroyo, H.A., Russo, R.A., and Rugilo, C.** (2006). [Cerebral vasculitis]. *Revista de neurologia* 42, 176-186.
- Attwell, D., Buchan, A.M., Charpak, S., Lauritzen, M., Macvicar, B.A., and Newman, E.A.** (2010). Glial and neuronal control of brain blood flow. *Nature* 468, 232-243.
- Baiardi, G., Ruiz, A.M., Beling, A., Borgonovo, J., Martinez, G., Landa, A.I., Sosa, M.A., and Gargiulo, P.A.** (2007). Glutamatergic ionotropic blockade within accumbens disrupts working memory and might alter the endocytic machinery in rat accumbens and prefrontal cortex. *Journal of neural transmission* 114, 1519-1528.
- Balakumar, P., and Jagadeesh, G.** (2014). A century old renin-angiotensin system still grows with endless possibilities: AT1 receptor signaling cascades in cardiovascular physiopathology. *Cellular signalling* 26, 2147-2160.
- Bar, T.** (1983). Patterns of vascularization in the developing cerebral cortex. *Ciba Foundation symposium* 100, 20-36.
- Barco, A., Bailey, C.H., and Kandel, E.R.** (2006). Common molecular mechanisms in explicit and implicit memory. *Journal of neurochemistry* 97, 1520-1533.
- Barki-Harrington, L., Luttrell, L.M., and Rockman, H.A.** (2003). Dual inhibition of beta-adrenergic and angiotensin II receptors by a single antagonist: a functional role for receptor-receptor interaction in vivo. *Circulation* 108, 1611-1618.
- Barr, M.L.** (1973). *Sistema Nervioso Humano: un punto de vista anatómico.* (Harper & Row Latinoamericana).
- Barry, D.N., and Commins, S.** (2017). Temporal dynamics of immediate early gene expression during cellular consolidation of spatial memory. *Behavioural brain research* 327, 44-53.
- Beauquis, J., Homo-Delarche, F., Giroix, M.H., Ehses, J., Coulaud, J., Roig, P., Portha, B., De Nicola, A.F., and Saravia, F.** (2010a). Hippocampal neurovascular and hypothalamic-pituitary-adrenal axis alterations in spontaneously type 2 diabetic GK rats. *Experimental neurology* 222, 125-134.
- Beauquis, J., Roig, P., De Nicola, A.F., and Saravia, F.** (2010b). Short-term environmental enrichment enhances adult neurogenesis, vascular network and dendritic complexity in the hippocampus of type 1 diabetic mice. *PloS one* 5, e13993.
- Beauquis, J., Vinuesa, A., Pomilio, C., Pavia, P., Galvan, V., and Saravia, F.** (2014). Neuronal and glial alterations, increased anxiety, and cognitive impairment before hippocampal amyloid deposition in PDAPP mice, model of Alzheimer's disease. *Hippocampus* 24, 257-269.
- Belanger, M., Allaman, I., and Magistretti, P.J.** (2011). Brain energy metabolism: focus on astrocyte-neuron metabolic cooperation. *Cell metabolism* 14, 724-738.
- Belcher, A.M., O'Dell, S.J., and Marshall, J.F.** (2005). Impaired object recognition memory following methamphetamine, but not p-chloroamphetamine- or d-amphetamine-induced neurotoxicity. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 30, 2026-2034.
- Belixán, N., Miguens, F., Doctorovich, B., and Álvarez Constantino, M.** (2008). *Psicotrópicos y estupeficientes. Visión farmacológica y normativa.* (Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica -ANMAT-), pp. Capítulo V- 117-142.
- Benicky, J., Sanchez-Lemus, E., Honda, M., Pang, T., Orecna, M., Wang, J., Leng, Y., Chuang, D.M., and Saavedra, J.M.** (2011). Angiotensin II AT1 receptor blockade ameliorates brain inflammation. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 36, 857-870.
- Benigni, A., Cassis, P., and Remuzzi, G.** (2010). Angiotensin II revisited: new roles in inflammation, immunology and aging. *EMBO molecular medicine* 2, 247-257.
- Berman, S., O'Neill, J., Fears, S., Bartzokis, G., and London, E.D.** (2008). Abuse of amphetamines and structural abnormalities in the brain. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1141, 195-220.
- Berman, S.M., Kuczenski, R., McCracken, J.T., and London, E.D.** (2009). Potential adverse effects of amphetamine treatment on brain and behavior: a review. *Molecular psychiatry* 14, 123-142.
- Biancardi, V.C., Son, S.J., Ahmadi, S., Filosa, J.A., and Stern, J.E.** (2014). Circulating angiotensin II gains access to the hypothalamus and brain stem during hypertension via breakdown of the blood-brain barrier. *Hypertension* 63, 572-579.

- Blaiss, C.A., and Janak, P.H. (2007).** Post-training, but not post-reactivation, administration of amphetamine and anisomycin modulates Pavlovian conditioned approach. *Neurobiology of learning and memory* 87, 644-658.
- Blumenfeld, H. (2010).** *Neuroanatomy through clinical cases*, 2nd edn (Sinauer Associates).
- Boccardi, M., Frisoni, G.B., Hare, R.D., Cavedo, E., Najt, P., Pievani, M., Rasser, P.E., Laakso, M.P., Aronen, H.J., Repo-Tiihonen, E., et al. (2011).** Cortex and amygdala morphology in psychopathy. *Psychiatry research* 193, 85-92.
- Borrajo, A., Rodriguez-Perez, A.I., Diaz-Ruiz, C., Guerra, M.J., and Labandeira-Garcia, J.L. (2014).** Microglial TNF-alpha mediates enhancement of dopaminergic degeneration by brain angiotensin. *Glia* 62, 145-157.
- Bowers, M.S., and Kalivas, P.W. (2003).** Forebrain astroglial plasticity is induced following withdrawal from repeated cocaine administration. *The European journal of neuroscience* 17, 1273-1278.
- Bowyer, J.F., and Hanig, J.P. (2014).** Amphetamine- and methamphetamine-induced hyperthermia: Implications of the effects produced in brain vasculature and peripheral organs to forebrain neurotoxicity. *Temperature* 1, 172-182.
- Bowyer, J.F., Patterson, T.A., Saini, U.T., Hanig, J.P., Thomas, M., Camacho, L., George, N.I., and Chen, J.J. (2013).** Comparison of the global gene expression of choroid plexus and meninges and associated vasculature under control conditions and after pronounced hyperthermia or amphetamine toxicity. *BMC genomics* 14, 147.
- Bowyer, J.F., Thomas, M., Schmued, L.C., and Ali, S.F. (2008).** Brain region-specific neurodegenerative profiles showing the relative importance of amphetamine dose, hyperthermia, seizures, and the blood-brain barrier. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1139, 127-139.
- Braun-Menendez, E., Fasciolo, J.C., Leloir, L.F., and Munoz, J.M. (1940).** The substance causing renal hypertension. *The Journal of physiology* 98, 283-298.
- Bregonzio, C., Seltzer, A., Armando, I., Pavel, J., and Saavedra, J.M. (2008).** Angiotensin II AT(1) receptor blockade selectively enhances brain AT(2) receptor expression, and abolishes the cold-restraint stress-induced increase in tyrosine hydroxylase mRNA in the locus coeruleus of spontaneously hypertensive rats. *Stress* 11, 457-466.
- Brenner, M. (1994).** Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP). *Brain Pathology*, 21 29-220.
- Brenner, M. (2014).** Role of GFAP in CNS injuries. *Neuroscience letters* 565, 7-13.
- Broadley, K.J. (2010).** The vascular effects of trace amines and amphetamines. *Pharmacology & therapeutics* 125, 363-375.
- Broadley, K.J., Fehler, M., Ford, W.R., and Kidd, E.J. (2013).** Functional evaluation of the receptors mediating vasoconstriction of rat aorta by trace amines and amphetamines. *European journal of pharmacology* 715, 370-380.
- Brown, D.C., Steward, L.J., Ge, J., and Barnes, N.M. (1996).** Ability of angiotensin II to modulate striatal dopamine release via the AT1 receptor in vitro and in vivo. *British journal of pharmacology* 118, 414-420.
- Brown, R.W., Bardo, M.T., Mace, D.D., Phillips, S.B., and Kraemer, P.J. (2000).** D-amphetamine facilitation of morris water task performance is blocked by eticlopride and correlated with increased dopamine synthesis in the prefrontal cortex. *Behavioural brain research* 114, 135-143.
- Brozoski, T.J., Brown, R.M., Rosvold, H.E., and Goldman, P.S. (1979).** Cognitive deficit caused by regional depletion of dopamine in prefrontal cortex of rhesus monkey. *Science* 205, 929-932.
- Bruel-Jungerman, E., Davis, S., and Laroche, S. (2007).** Brain plasticity mechanisms and memory: a party of four. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry* 13, 492-505.
- Buchta, W.C., and Riegel, A.C. (2015).** Chronic cocaine disrupts mesocortical learning mechanisms. *Brain research* 1628, 88-103.
- Buxton, N., and McConachie, N.S. (2000).** Amphetamine abuse and intracranial haemorrhage. *Journal of the Royal Society of Medicine* 93, 472-477.
- Cabib, S., and Castellano, C. (1997).** Impairments produced by amphetamine and stress on memory storage are reduced following a chronic stressful experience. *Psychopharmacology* 129, 161-167.
- Capone, C., Faraco, G., Park, L., Cao, X., Davisson, R.L., and Iadecola, C. (2011).** The cerebrovascular dysfunction induced by slow pressor doses of angiotensin II precedes the development of hypertension. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 300, H397-407.
- Carasatorre, M., and Ramirez-Amaya, V. (2013).** Network, cellular, and molecular mechanisms underlying long-term memory formation. *Current topics in behavioral neurosciences* 15, 73-115.

- Casarsa, B.** (2015). PARTICIPACIÓN DEL SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA EN LAS RESPUESTAS NEUROQUÍMICAS E INFLAMATORIAS A NIVEL CEREBRAL INDUCIDAS POR ANFETAMINA. (Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales- UNC).
- Casarsa, B.S., Marinzalda, M.A., Marchese, N.A., Paz, M.C., Vivas, L., Baiardi, G., and Bregonzio, C.** (2015). A previous history of repeated amphetamine exposure modifies brain angiotensin II AT1 receptor functionality. *Neuroscience* 307, 1-13.
- Case, A.J., Li, S., Basu, U., Tian, J., and Zimmerman, M.C.** (2013). Mitochondrial-localized NADPH oxidase 4 is a source of superoxide in angiotensin II-stimulated neurons. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 305, H19-28.
- Cassis, L., Laughter, A., Fettingner, M., Akers, S., Speth, R., Burke, G., King, V., and Dwoskin, L.** (1998). Cold exposure regulates the renin-angiotensin system. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 286, 718-726.
- Castellano, C., Cestari, V., Cabib, S., and Puglisi-Allegra, S.** (1991). Post-training dopamine receptor agonists and antagonists affect memory storage in mice irrespective of their selectivity for D1 or D2 receptors. *Behavioral and neural biology* 56, 283-291.
- Cestari, V., Castellano, C., Cabib, S., and Puglisi-Allegra, S.** (1992). Strain-dependent effects of post-training dopamine receptor agonists and antagonists on memory storage in mice. *Behavioral and neural biology* 58, 58-63.
- Cipolla, M.J.** (2010). *The Cerebral Circulation*, Vol 2 (Morgan & Claypool Life Sciences).
- Cohle, S.D.** (2013). Fatal coronary artery intimal hyperplasia due to amphetamine use. *Cardiovascular pathology : the official journal of the Society for Cardiovascular Pathology* 22, e1-4.
- Costa, C., Incio, J., and Soares, R.** (2007). Angiogenesis and chronic inflammation: cause or consequence? *Angiogenesis* 10, 149-166.
- Cowan, N.** (2008). What are the differences between long-term, short-term, and working memory? *Progress in brain research* 169, 323-338.
- Cox, S.B., Woolsey, T.A., and Rovainen, C.M.** (1993). Localized dynamic changes in cortical blood flow with whisker stimulation corresponds to matched vascular and neuronal architecture of rat barrels. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 13, 899-913.
- Crabbe, J.C., and Alpern, H.P.** (1975). d-Amphetamine: disruptive effects on the long-term store of memory and proactive facilitatory effects on learning in inbred mice. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 3, 647-652.
- Cunha-Oliveira, T., Rego, A.C., and Oliveira, C.R.** (2008). Cellular and molecular mechanisms involved in the neurotoxicity of opioid and psychostimulant drugs. *Brain research reviews* 58, 192-208.
- Chabrashvili, T., Kitiyakara, C., Blau, J., Karber, A., Aslam, S., Welch, W.J., and Wilcox, C.S.** (2003). Effects of ANG II type 1 and 2 receptors on oxidative stress, renal NADPH oxidase, and SOD expression. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 285, R117-124.
- Chalothorn, D., and Faber, J.E.** (2010). Formation and maturation of the native cerebral collateral circulation. *Journal of molecular and cellular cardiology* 49, 251-259.
- Chesnutt, J.K., and Han, H.C.** (2011). Tortuosity triggers platelet activation and thrombus formation in microvessels. *Journal of biomechanical engineering* 133, 121004.
- Choi, J.K., Chen, Y.I., Hamel, E., and Jenkins, B.G.** (2006). Brain hemodynamic changes mediated by dopamine receptors: Role of the cerebral microvasculature in dopamine-mediated neurovascular coupling. *NeuroImage* 30, 700-712.
- da Cunha, V., Tham, D.M., Martin-McNulty, B., Deng, G., Ho, J.J., Wilson, D.W., Rutledge, J.C., Vergona, R., Sullivan, M.E., and Wang, Y.X.** (2005). Enalapril attenuates angiotensin II-induced atherosclerosis and vascular inflammation. *Atherosclerosis* 178, 9-17.
- Danielyan, L., Lourhmati, A., Verleysdonk, S., Kabisch, D., Proksch, B., Thiess, U., Umbreen, S., Schmidt, B., and Gleiter, C.H.** (2007). Angiotensin receptor type 1 blockade in astroglia decreases hypoxia-induced cell damage and TNF alpha release. *Neurochemical research* 32, 1489-1498.
- Daubert, D.L., Meadows, G.G., Wang, J.H., Sanchez, P.J., and Speth, R.C.** (1999). Changes in angiotensin II receptors in dopamine-rich regions of the mouse brain with age and ethanol consumption. *Brain research* 816, 8-16.
- de Gasparo, M., Catt, K.J., Inagami, T., Wright, J.W., and Unger, T.** (2000). International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacological reviews* 52, 415-472.

- De Geyter, D., Stoop, W., Zgavc, T., Sarre, S., Michotte, Y., De Keyser, J., and Kooijman, R. (2012).** Spontaneously hypertensive rats display reduced microglial activation in response to ischemic stroke and lipopolysaccharide. *Journal of neuroinflammation* 9, 114.
- de Kloet, A.D., Liu, M., Rodriguez, V., Krause, E.G., and Sumners, C. (2015).** Role of neurons and glia in the CNS actions of the renin-angiotensin system in cardiovascular control. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 309, R444-458.
- De Silva, D.A., Wong, M.C., Lee, M.P., Chen, C.L., and Chang, H.M. (2007).** Amphetamine-associated ischemic stroke: clinical presentation and proposed pathogenesis. *Journal of stroke and cerebrovascular diseases : the official journal of National Stroke Association* 16, 185-186.
- de Souza, F.A., Sanchis-Segura, C., Fukada, S.Y., de Bortoli, V.C., Zangrossi, H., Jr., and de Oliveira, A.M. (2004).** Intracerebroventricular effects of angiotensin II on a step-through passive avoidance task in rats. *Neurobiology of learning and memory* 81, 100-103.
- de Souza Gomes, J.A., de Souza, G.C., Berk, M., Cavalcante, L.M., de Sousa, F.C., Budni, J., de Lucena, D.F., Quevedo, J., Carvalho, A.F., and Macedo, D. (2015).** Antimanic-like activity of candesartan in mice: Possible involvement of antioxidant, anti-inflammatory and neurotrophic mechanisms. *European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology* 25, 2086-2097.
- del Zoppo, G.J. (1997).** Microvascular responses to cerebral ischemia/inflammation. *Annals of the New York Academy of Sciences* 823, 132-147.
- del Zoppo, G.J. (2006).** Stroke and neurovascular protection. *The New England journal of medicine* 354, 553-555.
- Deliu, E., Brailoiu, G.C., Eguchi, S., Hoffman, N.E., Rabinowitz, J.E., Tilley, D.G., Madesh, M., Koch, W.J., and Brailoiu, E. (2014).** Direct evidence of intracrine angiotensin II signaling in neurons. *American journal of physiology Cell physiology* 306, C736-744.
- DeNoble, V.J., DeNoble, K.F., Spencer, K.R., Chiu, A.T., Wong, P.C., and Timmermans, P.B. (1991).** Non-peptide angiotensin II receptor antagonist and angiotensin-converting enzyme inhibitor: effect on a renin-induced deficit of a passive avoidance response in rats. *Brain research* 561, 230-235.
- Devous, M.D., Sr., Trivedi, M.H., and Rush, A.J. (2001).** Regional cerebral blood flow response to oral amphetamine challenge in healthy volunteers. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* 42, 535-542.
- Di Chiara, G., and Imperato, A. (1988).** Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85, 5274-5278.
- Didion, S.P., Kinzenbaw, D.A., Schrader, L.I., Chu, Y., and Faraci, F.M. (2009).** Endogenous interleukin-10 inhibits angiotensin II-induced vascular dysfunction. *Hypertension* 54, 619-624.
- Diniz, L.P., Almeida, J.C., Tortelli, V., Vargas Lopes, C., Setti-Perdigao, P., Stipursky, J., Kahn, S.A., Romao, L.F., de Miranda, J., Alves-Leon, S.V., et al. (2012).** Astrocyte-induced synaptogenesis is mediated by transforming growth factor beta signaling through modulation of D-serine levels in cerebral cortex neurons. *The Journal of biological chemistry* 287, 41432-41445.
- Diniz, L.P., Tortelli, V., Garcia, M.N., Araujo, A.P., Melo, H.M., Silva, G.S., Felice, F.G., Alves-Leon, S.V., Souza, J.M., Romao, L.F., et al. (2014).** Astrocyte transforming growth factor beta 1 promotes inhibitory synapse formation via CaM kinase II signaling. *Glia* 62, 1917-1931.
- Dominguez-Meijide, A., Rodriguez-Perez, A.I., Diaz-Ruiz, C., Guerra, M.J., and Labandeira-Garcia, J.L. (2017).** Dopamine modulates astroglial and microglial activity via glial renin-angiotensin system in cultures. *Brain, behavior, and immunity* 62, 277-290.
- Dominguez-Meijide, A., Villar-Cheda, B., Garrido-Gil, P., Sierrra-Paredes, G., Guerra, M.J., and Labandeira-Garcia, J.L. (2014).** Effect of chronic treatment with angiotensin type 1 receptor antagonists on striatal dopamine levels in normal rats and in a rat model of Parkinson's disease treated with L-DOPA. *Neuropharmacology* 76 Pt A, 156-168.
- Dong, J., Wong, S.L., Lau, C.W., Lee, H.K., Ng, C.F., Zhang, L., Yao, X., Chen, Z.Y., Vanhoutte, P.M., and Huang, Y. (2012).** Calcitriol protects renovascular function in hypertension by down-regulating angiotensin II type 1 receptors and reducing oxidative stress. *European heart journal* 33, 2980-2990.
- Dorr, A., Sahota, B., Chinta, L.V., Brown, M.E., Lai, A.Y., Ma, K., Hawkes, C.A., McLaurin, J., and Stefanovic, B. (2012).** Amyloid-beta-dependent compromise of microvascular structure and function in a model of Alzheimer's disease. *Brain : a journal of neurology* 135, 3039-3050.

- Downey, L.A., and Loftis, J.M. (2014).** Altered energy production, lowered antioxidant potential, and inflammatory processes mediate CNS damage associated with abuse of the psychostimulants MDMA and methamphetamine. *European journal of pharmacology* 727, 125-129.
- Du, J.Q., Sun, C.W., and Tang, J.S. (2004).** Effect of angiotensin II type 1 receptor on delayed rectifier potassium current in catecholaminergic CATH.a cells. *Acta pharmacologica Sinica* 25, 1145-1150.
- Dudai, Y. (2002).** Molecular bases of long-term memories: a question of persistence. *Current opinion in neurobiology* 12, 211-216.
- Dudai, Y. (2004).** The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? *Annual review of psychology* 55, 51-86.
- Duncko, R., Johnson, L., Merikangas, K., and Grillon, C. (2009).** Working memory performance after acute exposure to the cold pressor stress in healthy volunteers. *Neurobiology of learning and memory* 91, 377-381.
- Dwoskin, L.P., Jewell, A.L., and Cassis, L.A. (1992).** DuP 753, a nonpeptide angiotensin II-1 receptor antagonist, alters dopaminergic function in rat striatum. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 345, 153-159.
- Edvinsson, L.I., and Povlsen, G.K. (2011).** Vascular plasticity in cerebrovascular disorders. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 31, 1554-1571.
- Egleton, R.D., and Abbruscato, T. (2014).** Chapter Fifteen-Drug Abuse and the Neurovascular Unit. *Advances in pharmacology* 71, 451-480.
- El-Sayed El-Sisi, A., Sokkar, S.S., El-Sayed El-Sayad, M., Sayed Ramadan, E., and Osman, E.Y. (2016).** Celecoxib and omega-3 fatty acids alone and in combination with risperidone affect the behavior and brain biochemistry in amphetamine-induced model of schizophrenia. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* 82, 425-431.
- El Assar, M., Angulo, J., and Rodriguez-Manas, L. (2013).** Oxidative stress and vascular inflammation in aging. *Free radical biology & medicine* 65, 380-401.
- Eldred, K.C., and Palmiter, R.D. (2013).** Amphetamine-induced sensitization has little effect on multiple learning paradigms and fails to rescue mice with a striatal learning defect. *PloS one* 8, e59964.
- Ellison, G., and Switzer, R.C., 3rd (1993).** Dissimilar patterns of degeneration in brain following four different addictive stimulants. *Neuroreport* 5, 17-20.
- Erinjeri, J.P., and Woolsey, T.A. (2002).** Spatial integration of vascular changes with neural activity in mouse cortex. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 22, 353-360.
- Faraci, F.M. (2011).** Protecting against vascular disease in brain. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 300, H1566-1582.
- Faraci, F.M., and Heistad, D.D. (1990).** Regulation of large cerebral arteries and cerebral microvascular pressure. *Circulation research* 66, 8-17.
- Faraci, F.M., and Heistad, D.D. (1998).** Regulation of the cerebral circulation: role of endothelium and potassium channels. *Physiological reviews* 78, 53-97.
- Faraci, F.M., Lamping, K.G., Modrick, M.L., Ryan, M.J., Sigmund, C.D., and Didion, S.P. (2006).** Cerebral vascular effects of angiotensin II: new insights from genetic models. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 26, 449-455.
- Faraco, G., Park, L., Zhou, P., Luo, W., Paul, S.M., Anrather, J., and Iadecola, C. (2016).** Hypertension enhances A $\beta$ -induced neurovascular dysfunction, promotes beta-secretase activity, and leads to amyloidogenic processing of APP. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 36, 241-252.
- Featherstone, R.E., Kapur, S., and Fletcher, P.J. (2007).** The amphetamine-induced sensitized state as a model of schizophrenia. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* 31, 1556-1571.
- Fenu, S., and Di Chiara, G. (2003).** Facilitation of conditioned taste aversion learning by systemic amphetamine: role of nucleus accumbens shell dopamine D1 receptors. *The European journal of neuroscience* 18, 2025-2030.
- Ferry, B., Roozendaal, B., and McGaugh, J.L. (1999).** Role of norepinephrine in mediating stress hormone regulation of long-term memory storage: a critical involvement of the amygdala. *Biological psychiatry* 46, 1140-1152.

- FitzGerald, O., Soden, M., Yanni, G., Robinson, R., and Bresnihan, B. (1991).** Morphometric analysis of blood vessels in synovial membranes obtained from clinically affected and unaffected knee joints of patients with rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases* 50, 792-796.
- Fogarty, D.J., and Matute, C. (2001).** Angiotensin receptor-like immunoreactivity in adult brain white matter astrocytes and oligodendrocytes. *Glia* 35, 131-146.
- Forder, J.P., Munzenmaier, D.H., and Greene, A.S. (2005).** Angiogenic protection from focal ischemia with angiotensin II type 1 receptor blockade in the rat. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 288, H1989-1996.
- Foster, V., Oakley, A.E., Slade, J.Y., Hall, R., Polvikoski, T.M., Burke, M., Thomas, A.J., Khundakar, A., Allan, L.M., and Kalaria, R.N. (2014).** Pyramidal neurons of the prefrontal cortex in post-stroke, vascular and other ageing-related dementias. *Brain : a journal of neurology* 137, 2509-2521.
- Fredericks, R.K., Lefkowitz, D.S., Challa, V.R., and Troost, B.T. (1991).** Cerebral vasculitis associated with cocaine abuse. *Stroke* 22, 1437-1439.
- Frey, U., and Morris, R.G. (1997).** Synaptic tagging and long-term potentiation. *Nature* 385, 533-536.
- Fuchtbauer, L., Groth-Rasmussen, M., Holm, T.H., Lobner, M., Toft-Hansen, H., Khorooshi, R., and Owens, T. (2011).** Angiotensin II Type 1 receptor (AT1) signaling in astrocytes regulates synaptic degeneration-induced leukocyte entry to the central nervous system. *Brain, behavior, and immunity* 25, 897-904.
- Fukushima, H., Zhang, Y., Archbold, G., Ishikawa, R., Nader, K., and Kida, S. (2014).** Enhancement of fear memory by retrieval through reconsolidation. *eLife* 3, e02736.
- Gabach, L.A., Carlini, V.P., Monti, M.C., Maglio, L.E., De Barioglio, S.R., and Perez, M.F. (2013).** Involvement of nNOS/NO/sGC/cGMP signaling pathway in cocaine sensitization and in the associated hippocampal alterations: does phosphodiesterase 5 inhibition help to drug vulnerability? *Psychopharmacology* 229, 41-50.
- Ganong, W.F. (1994).** What regulates the production and secretion of angiotensinogen in the brain? *Frontiers in neuroendocrinology* 15, 78-81.
- Gard, P.R. (2002).** The role of angiotensin II in cognition and behaviour. *European journal of pharmacology* 438, 1-14.
- Gelband, C.H., Sumners, C., Lu, D., and Raizada, M.K. (1998).** Angiotensin receptors and norepinephrine neuromodulation: implications of functional coupling. *Regulatory peptides* 73, 141-147.
- Gelinas, J.N., Tenorio, G., Lemon, N., Abel, T., and Nguyen, P.V. (2008).** Beta-adrenergic receptor activation during distinct patterns of stimulation critically modulates the PKA-dependence of LTP in the mouse hippocampus. *Learning & memory* 15, 281-289.
- Georgiev, V. (1990).** Involvement of transmitter mechanisms in the behavioural effects of angiotensin II. *Polish journal of pharmacology and pharmacy* 42, 553-562.
- Georgiev, V., Gyorgy, L., Getova, D., and Markovska, V. (1985).** Some central effects of angiotensin II. Interactions with dopaminergic transmission. *Acta physiologica et pharmacologica Bulgarica* 11, 19-26.
- Girard, J.P., and Springer, T.A. (1995).** High endothelial venules (HEVs): specialized endothelium for lymphocyte migration. *Immunology today* 16, 449-457.
- Girouard, H., and Iadecola, C. (2006a).** Neurovascular coupling in the normal brain and in hypertension, stroke, and Alzheimer disease. *Journal of applied physiology* 100, 328-335.
- Girouard, H., Park, L., Anrather, J., Zhou, P., and Iadecola, C. (2006b).** Angiotensin II attenuates endothelium-dependent responses in the cerebral microcirculation through nox-2-derived radicals. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 26, 826-832.
- Girouard, H., Park, L., Anrather, J., Zhou, P., and Iadecola, C. (2007).** Cerebrovascular nitrosative stress mediates neurovascular and endothelial dysfunction induced by angiotensin II. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 27, 303-309.
- Go, B.S., Kim, J., Yang, J.H., and Choe, E.S. (2016).** Psychostimulant-Induced Endoplasmic Reticulum Stress and Neurodegeneration. *Molecular neurobiology*.
- Gohlke, P., Kox, T., Jurgensen, T., von Kugelgen, S., Rascher, W., Unger, T., and Culman, J. (2002).** Peripherally applied candesartan inhibits central responses to angiotensin II in conscious rats. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 365, 477-483.
- Gonzalez, A.D., Wang, G., Waters, E.M., Gonzales, K.L., Speth, R.C., Van Kempen, T.A., Marques-Lopes, J., Young, C.N., Butler, S.D., Davison, R.L., et al. (2012).** Distribution of angiotensin type 1a receptor-containing cells in the brains of bacterial artificial chromosome transgenic mice. *Neuroscience* 226, 489-509.

- Goodman, L., Brunton, L.L., Chabner, B., and Knollmann, B. (2011).** Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics, 12th edn (New York : McGraw-Hill).
- Goplen, A.K., Berg-Johnsen, J., and Dullerud, R. (1995).** [Fatal cerebral hemorrhage in young amphetamine addicts]. *Tidsskrift for den Norske laegeforening : tidsskrift for praktisk medicin, ny raeke* 115, 832-834.
- Gorelick, P.B., Scuteri, A., Black, S.E., Decarli, C., Greenberg, S.M., Iadecola, C., Launer, L.J., Laurent, S., Lopez, O.L., Nyenhuis, D., et al. (2011).** Vascular contributions to cognitive impairment and dementia: a statement for healthcare professionals from the american heart association/american stroke association. *Stroke* 42, 2672-2713.
- Goshen, I., Brodsky, M., Prakash, R., Wallace, J., Gradinaru, V., Ramakrishnan, C., and Deisseroth, K. (2011).** Dynamics of retrieval strategies for remote memories. *Cell* 147, 678-689.
- Gosselin, R.D., Gibney, S., O'Malley, D., Dinan, T.G., and Cryan, J.F. (2009).** Region specific decrease in glial fibrillary acidic protein immunoreactivity in the brain of a rat model of depression. *Neuroscience* 159, 915-925.
- Gowrisankar, Y.V., and Clark, M.A. (2016).** Angiotensin II induces interleukin-6 expression in astrocytes: Role of reactive oxygen species and NF-kappaB. *Molecular and cellular endocrinology* 437, 130-141.
- Grammatopoulos, T.N., Jones, S.M., Ahmadi, F.A., Hoover, B.R., Snell, L.D., Skoch, J., Jhaveri, V.V., Poczobutt, A.M., Weyhenmeyer, J.A., and Zawada, W.M. (2007).** Angiotensin type 1 receptor antagonist losartan, reduces MPTP-induced degeneration of dopaminergic neurons in substantia nigra. *Molecular neurodegeneration* 2, 1.
- Grant, H., Bhambhani, Y., and Singhal, A. (2015).** Hemodynamic changes in the prefrontal cortex during working memory in essential hypertension. *Journal of the American Society of Hypertension : JASH* 9, 628-639.
- Greene, A.S., and Amaral, S.L. (2002).** Microvascular angiogenesis and the renin-angiotensin system. *Current hypertension reports* 4, 56-62.
- Griendling, K.K., Lassegue, B., Murphy, T.J., and Alexander, R.W. (1994).** Angiotensin II receptor pharmacology. *Advances in pharmacology* 28, 269-306.
- Grobe, J.L., Xu, D., and Sigmund, C.D. (2008).** An intracellular renin-angiotensin system in neurons: fact, hypothesis, or fantasy. *Physiology* 23, 187-193.
- Groeschel, M., and Braam, B. (2011).** Connecting chronic and recurrent stress to vascular dysfunction: no relaxed role for the renin-angiotensin system. *American journal of physiology Renal physiology* 300, F1-10.
- Guan, Z., Giustetto, M., Lomvardas, S., Kim, J.H., Miniaci, M.C., Schwartz, J.H., Thanos, D., and Kandel, E.R. (2002).** Integration of long-term-memory-related synaptic plasticity involves bidirectional regulation of gene expression and chromatin structure. *Cell* 111, 483-493.
- Gupta, R.S., N (2009).** Cognitive Neuroscience of Emotional Memory. *Advances in Developmental Neuroscience and Imaging*.
- Haack, K.K., Mitra, A.K., and Zucker, I.H. (2013).** NF-kappaB and CREB are required for angiotensin II type 1 receptor upregulation in neurons. *PloS one* 8, e78695.
- Hall, D.A., and Gulley, J.M. (2011).** Disruptive effect of amphetamines on Pavlovian to instrumental transfer. *Behavioural brain research* 216, 440-445.
- Hara, T., Fujii, R., Ohno, S., Tomita, Y., Tsunoda, A., Maruki, C., and Kurokawa, S. (2008).** [Case of intracerebral hemorrhage due to amphetamine abuse]. *No shinkei geka Neurological surgery* 36, 1145-1148.
- Harding, J.W., Sullivan, M.J., Hanesworth, J.M., Cushing, L.L., and Wright, J.W. (1988).** Inability of [125I]Sar1, Ile8-angiotensin II to move between the blood and cerebrospinal fluid compartments. *Journal of neurochemistry* 50, 554-557.
- Haycock, J.W., Van Buskirk, R., and Gold, P.E. (1977).** Effects on retention of posttraining amphetamine injections in mice: interaction with pretraining experience. *Psychopharmacology* 54, 21-24.
- Haydon, P.G., and Carmignoto, G. (2006).** Astrocyte control of synaptic transmission and neurovascular coupling. *Physiological reviews* 86, 1009-1031.
- He, J., Xiao, Y., and Zhang, L. (2001).** Cocaine-mediated apoptosis in bovine coronary artery endothelial cells: role of nitric oxide. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 298, 180-187.
- Hebb, D.O. (2005).** The organization of behavior: A neuropsychological theory (Psychology Press).
- Hedou, G., Homberg, J., Feldon, J., and Heidbreder, C.A. (2001).** Expression of sensitization to amphetamine and dynamics of dopamine neurotransmission in different laminae of the rat medial prefrontal cortex. *Neuropharmacology* 40, 366-382.
- Heffelfinger, S.C. (2007).** The renin angiotensin system in the regulation of angiogenesis. *Current pharmaceutical design* 13, 1215-1229.

- Heidbreder, C.A., and Groenewegen, H.J. (2003).** The medial prefrontal cortex in the rat: evidence for a dorso-ventral distinction based upon functional and anatomical characteristics. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 27, 555-579.
- Herdegen, T., and Leah, J.D. (1998).** Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, Fos and Krox, and CREB/ATF proteins. *Brain research Brain research reviews* 28, 370-490.
- Hernandez-Fonseca, J.P., Rincon, J., Pedreanez, A., Viera, N., Arcaya, J.L., Carrizo, E., and Mosquera, J. (2009).** Structural and ultrastructural analysis of cerebral cortex, cerebellum, and hypothalamus from diabetic rats. *Experimental diabetes research* 2009, 329632.
- Hill, R.W.W., G.A.; Anderson, M. (2006).** *Fisiologia Animal* (Editorial Medica Panamericana S.A.).
- Ho, E.L., Josephson, S.A., Lee, H.S., and Smith, W.S. (2009).** Cerebrovascular complications of methamphetamine abuse. *Neurocritical care* 10, 295-305.
- Hobbs, W.E., Moore, E.E., Penkala, R.A., Bolgiano, D.D., and Lopez, J.A. (2013).** Cocaine and specific cocaine metabolites induce von Willebrand factor release from endothelial cells in a tissue-specific manner. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 33, 1230-1237.
- Hoebel, B.G., Rada, P., Mark, G.P., and Hernandez, L. (1994).** The power of integrative peptides to reinforce behavior by releasing dopamine. *Annals of the New York Academy of Sciences* 739, 36-41.
- Hoffman, A.N., Paode, P.R., May, H.G., Ortiz, J.B., Kemmou, S., Lifshitz, J., Conrad, C.D., and Currier Thomas, T. (2017).** Early and Persistent Dendritic Hypertrophy in the Basolateral Amygdala following Experimental Diffuse Traumatic Brain Injury. *Journal of neurotrauma* 34, 213-219.
- Holahan, M.R., Hong, N.S., Chan, C., and McDonald, R.J. (2005).** Post-training intra-amygdala amphetamine injections given during acquisition of a stimulus-response (S-R) habit task enhance the expression of stimulus-reward learning: further evidence for incidental amygdala learning. *Brain research bulletin* 66, 222-228.
- Horowitz, M., and Robinson, S.D. (2007).** Heat shock proteins and the heat shock response during hyperthermia and its modulation by altered physiological conditions. *Progress in brain research* 162, 433-446.
- Hsieh, J., and Gage, F.H. (2005).** Chromatin remodeling in neural development and plasticity. *Current opinion in cell biology* 17, 664-671.
- Hunyady, L., and Catt, K.J. (2006).** Pleiotropic AT1 receptor signaling pathways mediating physiological and pathogenic actions of angiotensin II. *Molecular endocrinology* 20, 953-970.
- Hunyady, L., Catt, K.J., Clark, A.J., and Gaborik, Z. (2009).** Mechanisms and functions of AT(1) angiotensin receptor internalization. *Regulatory peptides* 91, 29-44.
- Iadecola, C. (1998).** Neurogenic control of the cerebral microcirculation: is dopamine minding the store? *Nature neuroscience* 1, 263-265.
- Iadecola, C. (2004).** Neurovascular regulation in the normal brain and in Alzheimer's disease. *Nature reviews Neuroscience* 5, 347-360.
- Iadecola, C. (2010).** The overlap between neurodegenerative and vascular factors in the pathogenesis of dementia. *Acta neuropathologica* 120, 287-296.
- Iadecola, C., and Davisson, R.L. (2008).** Hypertension and cerebrovascular dysfunction. *Cell metabolism* 7, 476-484.
- Iadecola, C., and Nedergaard, M. (2007).** Glial regulation of the cerebral microvasculature. *Nature neuroscience* 10, 1369-1376.
- Imboden, H., Harding, J.W., Hilgenfeldt, U., Celio, M.R., and Felix, D. (1987).** Localization of angiotensinogen in multiple cell types of rat brain. *Brain research* 410, 74-77.
- Inaba, S., Iwai, M., Furuno, M., Tomono, Y., Kanno, H., Senba, I., Okayama, H., Mogi, M., Higaki, J., and Horiuchi, M. (2009).** Continuous activation of renin-angiotensin system impairs cognitive function in renin/angiotensinogen transgenic mice. *Hypertension* 53, 356-362.
- Intebi, A.D., Flaxman, M.S., Ganong, W.F., and Deschepper, C.F. (1990).** Angiotensinogen production by rat astroglial cells in vitro and in vivo. *Neuroscience* 34, 545-554.
- Ito, R., and Canselier, M. (2010).** Amphetamine exposure selectively enhances hippocampus-dependent spatial learning and attenuates amygdala-dependent cue learning. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 35, 1440-1452.
- Ito, T., Yamakawa, H., Bregonzio, C., Terron, J.A., Falcon-Neri, A., and Saavedra, J.M. (2002).** Protection against ischemia and improvement of cerebral blood flow in genetically hypertensive rats by chronic pretreatment with an angiotensin II AT1 antagonist. *Stroke* 33, 2297-2303.

- Iwai, N., Yamano, Y., Chaki, S., Konishi, F., Bardhan, S., Tibbetts, C., Sasaki, K., Hasegawa, M., Matsuda, Y., and Inagami, T. (1991).** Rat angiotensin II receptor: cDNA sequence and regulation of the gene expression. *Biochemical and biophysical research communications* 177, 299-304.
- Izquierdo, I., Bevilacqua, L.R., Rossato, J.I., Bonini, J.S., Medina, J.H., and Cammarota, M. (2006).** Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation. *Trends in neurosciences* 29, 496-505.
- Izquierdo, I., and Medina, J.H. (1997).** Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiology of learning and memory* 68, 285-316.
- James, D.T. (1975).** Posttrial d-amphetamine sulfate and one-trial learning in mice. *Journal of comparative and physiological psychology* 89, 626-635.
- Janetsian, S.S., Linsenbardt, D.N., and Lapish, C.C. (2015).** Memory impairment and alterations in prefrontal cortex gamma band activity following methamphetamine sensitization. *Psychopharmacology* 232, 2083-2095.
- Jaramillo-Magaña, J.J. (2013).** Metabolismo cerebral. *Revista Mexicana de Anestesiología Volumen 36*, S183-S185.
- Jedema, H.P., Narendran, R., and Bradberry, C.W. (2014).** Amphetamine-induced release of dopamine in primate prefrontal cortex and striatum: striking differences in magnitude and timecourse. *Journal of neurochemistry* 130, 490-497.
- Jenkins, T.A. (2008).** Effect of angiotensin-related antihypertensives on brain neurotransmitter levels in rats. *Neuroscience letters* 444, 186-189.
- Jenkins, T.A., Allen, A.M., Chai, S.Y., and Mendelsohn, F.A. (1995a).** Interactions of angiotensin II with central catecholamines. *Clinical and experimental hypertension* 17, 267-280.
- Jenkins, T.A., Chai, S.Y., Howells, D.W., and Mendelsohn, F.A. (1995b).** Intra-striatal angiotensin II induces turning behaviour in 6-hydroxydopamine lesioned rats. *Brain research* 691, 213-216.
- Jenkins, T.A., Chai, S.Y., and Mendelsohn, F.A. (1997).** Effect of angiotensin II on striatal dopamine release in the spontaneous hypertensive rat. *Clinical and experimental hypertension* 19, 645-658.
- Johansen, J.P., Cain, C.K., Ostroff, L.E., and LeDoux, J.E. (2011).** Molecular mechanisms of fear learning and memory. *Cell* 147, 509-524.
- Johnson, A.K., Zhang, Z., Clayton, S.C., Beltz, T.G., Hurley, S.W., Thunhorst, R.L., and Xue, B. (2015).** The roles of sensitization and neuroplasticity in the long-term regulation of blood pressure and hypertension. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 309, R1309-1325.
- Juarez, B., and Han, M.H. (2016).** Diversity of Dopaminergic Neural Circuits in Response to Drug Exposure. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 41, 2424-2446.
- Kadota, T., and Kadota, K. (2004).** Neurotoxic morphological changes induced in the medial prefrontal cortex of rats behaviorally sensitized to methamphetamine. *Archives of histology and cytology* 67, 241-251.
- Kalivas, P.W. (2007).** Cocaine and amphetamine-like psychostimulants: neurocircuitry and glutamate neuroplasticity. *Dialogues in clinical neuroscience* 9, 389-397.
- Kalivas, P.W., and O'Brien, C. (2008).** Drug addiction as a pathology of staged neuroplasticity. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 33, 166-180.
- Kaminsky, O., Klenerova, V., Stohr, J., Sida, P., and Hynie, S. (2001).** Differences in the behaviour of Sprague-Dawley and Lewis rats during repeated passive avoidance procedure: effect of amphetamine. *Pharmacological research* 44, 117-122.
- Karamyan, V.T., and Speth, R.C. (2007).** Enzymatic pathways of the brain renin-angiotensin system: unsolved problems and continuing challenges. *Regulatory peptides* 143, 15-27.
- Karnik, S.S., Unal, H., Kemp, J.R., Tirupula, K.C., Eguchi, S., Vanderheyden, P.M., and Thomas, W.G. (2015).** International Union of Basic and Clinical Pharmacology. XCIX. Angiotensin Receptors: Interpreters of Pathophysiological Angiotensinergic Stimuli [corrected]. *Pharmacological reviews* 67, 754-819.
- Kazama, K., Anrather, J., Zhou, P., Girouard, H., Frys, K., Milner, T.A., and Iadecola, C. (2004).** Angiotensin II impairs neurovascular coupling in neocortex through NADPH oxidase-derived radicals. *Circulation research* 95, 1019-1026.

- Kazama, K., Wang, G., Frys, K., Anrather, J., and Iadecola, C. (2003).** Angiotensin II attenuates functional hyperemia in the mouse somatosensory cortex. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 285, H1890-1899.
- Kehayov, R., Markovska, V., and Kamburova, T. (1989).** Significance of the cerebral dopaminergic neurotransmission for the individual differences in learning and memory (experiments on rats). *Acta physiologica et pharmacologica Bulgarica* 15, 76-82.
- Kelley, A.E. (2004).** Memory and addiction: shared neural circuitry and molecular mechanisms. *Neuron* 44, 161-179.
- Kida, S., Josselyn, S.A., Pena de Ortiz, S., Kogan, J.H., Chevere, I., Masushige, S., and Silva, A.J. (2002).** CREB required for the stability of new and reactivated fear memories. *Nature neuroscience* 5, 348-355.
- Kim, A., and Mandyam, C.D. (2014).** Methamphetamine affects cell proliferation in the medial prefrontal cortex: a new niche for toxicity. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 126, 90-96.
- Kim, Y.T., Lee, S.W., Kwon, D.H., Seo, J.H., Ahn, B.C., and Lee, J. (2009).** Dose-dependent frontal hypometabolism on FDG-PET in methamphetamine abusers. *Journal of psychiatric research* 43, 1166-1170.
- Kinou, M., Takizawa, R., Marumo, K., Kawasaki, S., Kawakubo, Y., Fukuda, M., and Kasai, K. (2013).** Differential spatiotemporal characteristics of the prefrontal hemodynamic response and their association with functional impairment in schizophrenia and major depression. *Schizophrenia research* 150, 459-467.
- Kirk, S.L., and Karlik, S.J. (2003).** VEGF and vascular changes in chronic neuroinflammation. *Journal of autoimmunity* 21, 353-363.
- Klenerova, V., Jurcovicova, J., Kaminsky, O., Sida, P., Krejci, I., Hlinak, Z., and Hynie, S. (2003a).** Combined restraint and cold stress in rats: effects on memory processing in passive avoidance task and on plasma levels of ACTH and corticosterone. *Behavioural brain research* 142, 143-149.
- Klenerova, V., Kaminsky, O., Sida, P., Hlinak, Z., Krejci, I., and Hynie, S. (2003b).** Impaired passive avoidance acquisition in Wistar rats after restraint/cold stress and/or stresscopin administration. *General physiology and biophysics* 22, 115-120.
- Kokkinidis, L. (1983).** The effects of chronic amphetamine administration on the acquisition and extinction of an active and passive avoidance response in mice. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 19, 593-598.
- Koller, M., Krause, H.P., Hoffmeister, F., and Ganten, D. (1979).** Endogenous brain angiotensin II disrupts passive avoidance behavior in rats. *Neuroscience letters* 14, 71-75.
- Kovacs, G.L., and de Wied, D. (1978).** Effects of amphetamine and haloperidol on avoidance behavior and exploratory activity. *European journal of pharmacology* 53, 103-107.
- Krimer, L.S., Muly, E.C., 3rd, Williams, G.V., and Goldman-Rakic, P.S. (1998).** Dopaminergic regulation of cerebral cortical microcirculation. *Nature neuroscience* 1, 286-289.
- Krugel, U., Koles, L., and Illes, P. (2013).** Integration of neuronal and glial signalling by pyramidal cells of the rat prefrontal cortex; control of cognitive functions and addictive behaviour by purinergic mechanisms. *Neuropsychopharmacologia Hungarica : a Magyar Pszichofarmakologiai Egyesulet lapja = official journal of the Hungarian Association of Psychopharmacology* 15, 206-213.
- Kuczenski, R., Leith, N.J., and Applegate, C.D. (1983).** Striatal dopamine metabolism in response to apomorphine: the effects of repeated amphetamine pretreatment. *Brain research* 258, 333-337.
- Kumai, Y., Ooboshi, H., Ago, T., Ishikawa, E., Takada, J., Kamouchi, M., Kitazono, T., Ibayashi, S., and Iida, M. (2008).** Protective effects of angiotensin II type 1 receptor blocker on cerebral circulation independent of blood pressure. *Experimental neurology* 210, 441-448.
- Labandeira-Garcia, J.L., Garrido-Gil, P., Rodriguez-Pallares, J., Valenzuela, R., Borrajo, A., and Rodriguez-Perez, A.I. (2014).** Brain renin-angiotensin system and dopaminergic cell vulnerability. *Frontiers in neuroanatomy* 8, 67.
- Labandeira-Garcia, J.L., Rodriguez-Pallares, J., Rodriguez-Perez, A.I., Garrido-Gil, P., Villar-Cheda, B., Valenzuela, R., and Guerra, M.J. (2012).** Brain angiotensin and dopaminergic degeneration: relevance to Parkinson's disease. *American journal of neurodegenerative disease* 1, 226-244.
- Labandeira-Garcia, J.L., Rodriguez-Pallares, J., Villar-Cheda, B., Rodriguez-Perez, A.I., Garrido-Gil, P., and Guerra, M.J. (2011).** Aging, Angiotensin system and dopaminergic degeneration in the substantia nigra. *Aging and disease* 2, 257-274.
- Lalonde, R. (2002).** The neurobiological basis of spontaneous alternation. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 26, 91-104.

- Lanz, T.V., Ding, Z., Ho, P.P., Luo, J., Agrawal, A.N., Srinagesh, H., Axtell, R., Zhang, H., Platten, M., Wyss-Coray, T., et al. (2010).** Angiotensin II sustains brain inflammation in mice via TGF-beta. *The Journal of clinical investigation* 120, 2782-2794.
- Lapish, C.C., Balaguer-Ballester, E., Seamans, J.K., Phillips, A.G., and Durstewitz, D. (2015).** Amphetamine Exerts Dose-Dependent Changes in Prefrontal Cortex Attractor Dynamics during Working Memory. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 35, 10172-10187.
- Lassegue, B., Sorescu, D., Szocs, K., Yin, Q., Akers, M., Zhang, Y., Grant, S.L., Lambeth, J.D., and Griendling, K.K. (2001).** Novel gp91(phox) homologues in vascular smooth muscle cells : nox1 mediates angiotensin II-induced superoxide formation and redox-sensitive signaling pathways. *Circulation research* 88, 888-894.
- Lau, J.W., Senok, S., and Stadlin, A. (2000).** Methamphetamine-induced oxidative stress in cultured mouse astrocytes. *Annals of the New York Academy of Sciences* 914, 146-156.
- Lee, E.H., and Ma, Y.L. (1995a).** Amphetamine enhances memory retention and facilitates norepinephrine release from the hippocampus in rats. *Brain research bulletin* 37, 411-416.
- Lee, E.H., Ma, Y.L., Wayner, M.J., and Armstrong, D.L. (1995b).** Impaired retention by angiotensin II mediated by the AT1 receptor. *Peptides* 16, 1069-1071.
- Lee, J.H., Lee, Y.K., Lim, J.J., Byun, H.O., Park, I., Kim, G.H., Xu, W.G., Wang, H.J., and Yoon, G. (2015).** Mitochondrial Respiratory Dysfunction Induces Claudin-1 Expression via Reactive Oxygen Species-mediated Heat Shock Factor 1 Activation, Leading to Hepatoma Cell Invasiveness. *The Journal of biological chemistry* 290, 21421-21431.
- Lee, K.W., Kim, H.C., Lee, S.Y., and Jang, C.G. (2011).** Methamphetamine-sensitized mice are accompanied by memory impairment and reduction of N-methyl-d-aspartate receptor ligand binding in the prefrontal cortex and hippocampus. *Neuroscience* 178, 101-107.
- Lemon, N., Aydin-Abidin, S., Funke, K., and Manahan-Vaughan, D. (2009).** Locus coeruleus activation facilitates memory encoding and induces hippocampal LTD that depends on beta-adrenergic receptor activation. *Cerebral cortex* 19, 2827-2837.
- Lemon, N., and Manahan-Vaughan, D. (2006).** Dopamine D1/D5 receptors gate the acquisition of novel information through hippocampal long-term potentiation and long-term depression. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26, 7723-7729.
- Lemon, N., and Manahan-Vaughan, D. (2012).** Dopamine D1/D5 receptors contribute to de novo hippocampal LTD mediated by novel spatial exploration or locus coeruleus activity. *Cerebral cortex* 22, 2131-2138.
- Lenkei, Z., Palkovits, M., Corvol, P., and Llorens-Cortes, C. (1997).** Expression of angiotensin type-1 (AT1) and type-2 (AT2) receptor mRNAs in the adult rat brain: a functional neuroanatomical review. *Frontiers in neuroendocrinology* 18, 383-439.
- Leri, F., Nahas, E., Henderson, K., Limebeer, C.L., Parker, L.A., and White, N.M. (2013).** Effects of post-training heroin and d-amphetamine on consolidation of win-stay learning and fear conditioning. *Journal of psychopharmacology* 27, 292-301.
- Leventopoulos, M., Ruedi-Bettschen, D., Knuesel, I., Feldon, J., Pryce, C.R., and Opacka-Juffry, J. (2007).** Long-term effects of early life deprivation on brain glia in Fischer rats. *Brain research* 1142, 119-126.
- Li, J.J., Lu, J., Kaur, C., Sivakumar, V., Wu, C.Y., and Ling, E.A. (2009).** Expression of angiotensin II and its receptors in the normal and hypoxic amoeboid microglial cells and murine BV-2 cells. *Neuroscience* 158, 1488-1499.
- Li, J.M., Mogi, M., Iwanami, J., Min, L.J., Tsukuda, K., Sakata, A., Fujita, T., Iwai, M., and Horiuchi, M. (2008).** Temporary pretreatment with the angiotensin II type 1 receptor blocker, valsartan, prevents ischemic brain damage through an increase in capillary density. *Stroke* 39, 2029-2036.
- Li, S., Case, A.J., Yang, R.F., Schultz, H.D., and Zimmerman, M.C. (2013).** Over-expressed copper/zinc superoxide dismutase localizes to mitochondria in neurons inhibiting the angiotensin II-mediated increase in mitochondrial superoxide. *Redox biology* 2, 8-14.
- Lieberman, J.A., Kinon, B.J., and Loebel, A.D. (1990).** Dopaminergic mechanisms in idiopathic and drug-induced psychoses. *Schizophrenia bulletin* 16, 97-110.
- Lind, R.W., Swanson, L.W., and Sawchenko, P.E. (1985).** Anatomical evidence that neural circuits related to the subfornical organ contain angiotensin II. *Brain research bulletin* 15, 79-82.
- Lindgren, H.S., Ohlin, K.E., and Cenci, M.A. (2009).** Differential involvement of D1 and D2 dopamine receptors in L-DOPA-induced angiogenic activity in a rat model of Parkinson's disease.

- Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology *34*, 2477-2488.
- Lisman, J., Grace, A.A., and Duzel, E. (2011).** A neoHebbian framework for episodic memory; role of dopamine-dependent late LTP. *Trends in neurosciences* *34*, 536-547.
- Lodge, D.J., and Grace, A.A. (2006).** The hippocampus modulates dopamine neuron responsivity by regulating the intensity of phasic neuron activation. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* *31*, 1356-1361.
- Lodge, D.J., and Grace, A.A. (2008).** Amphetamine activation of hippocampal drive of mesolimbic dopamine neurons: a mechanism of behavioral sensitization. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* *28*, 7876-7882.
- Loria, A.S., Pollock, D.M., and Pollock, J.S. (2010).** Early life stress sensitizes rats to angiotensin II-induced hypertension and vascular inflammation in adult life. *Hypertension* *55*, 494-499.
- Lu, P., Mamiya, T., Lu, L., Mouri, A., Niwa, M., Kim, H.C., Zou, L.B., Nagai, T., Yamada, K., Ikejima, T., et al. (2010).** Silibinin attenuates cognitive deficits and decreases of dopamine and serotonin induced by repeated methamphetamine treatment. *Behavioural brain research* *207*, 387-393.
- Lu, W., and Wolf, M.E. (1999).** Repeated amphetamine administration alters AMPA receptor subunit expression in rat nucleus accumbens and medial prefrontal cortex. *Synapse* *32*, 119-131.
- MacKenzie, A. (2011).** Endothelium-derived vasoactive agents, AT1 receptors and inflammation. *Pharmacology & therapeutics* *131*, 187-203.
- Mackey, S., and Paulus, M. (2013).** Are there volumetric brain differences associated with the use of cocaine and amphetamine-type stimulants? *Neuroscience and biobehavioral reviews* *37*, 300-316.
- Mahoney, J.J., 3rd, Jackson, B.J., Kalechstein, A.D., De La Garza, R., 2nd, and Newton, T.F. (2011).** Acute, low-dose methamphetamine administration improves attention/information processing speed and working memory in methamphetamine-dependent individuals displaying poorer cognitive performance at baseline. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* *35*, 459-465.
- Marchese, N.A., Paz, M.C., Caeiro, X., Dadam, F.M., Baiardi, G., Perez, M.F., and Bregonzio, C. (2017).** Angiotensin II AT1 receptors mediate neuronal sensitization and sustained blood pressure response induced by a single injection of amphetamine. *Neuroscience* *340*, 521-529.
- Marchesi, C., Paradis, P., and Schiffrin, E.L. (2008).** Role of the renin-angiotensin system in vascular inflammation. *Trends in pharmacological sciences* *29*, 367-374.
- Maren, S., Phan, K.L., and Liberzon, I. (2013).** The contextual brain: implications for fear conditioning, extinction and psychopathology. *Nature reviews Neuroscience* *14*, 417-428.
- Marinzalda, M. (2015).** Rol de los receptores AT1 de angiotensina II en un modelo animal de demencia. (Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales- UNC).
- Martinez-Pinilla, E., Rodriguez-Perez, A.I., Navarro, G., Aguinaga, D., Moreno, E., Lanciego, J.L., Labandeira-Garcia, J.L., and Franco, R. (2015).** Dopamine D2 and angiotensin II type 1 receptors form functional heteromers in rat striatum. *Biochemical pharmacology* *96*, 131-142.
- Maul, B., Krause, W., Pankow, K., Becker, M., Gembardt, F., Alenina, N., Walther, T., Bader, M., and Siems, W.E. (2005).** Central angiotensin II controls alcohol consumption via its AT1 receptor. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* *19*, 1474-1481.
- McCarty, R., and Gold, P.E. (1981).** Plasma catecholamines: effects of footshock level and hormonal modulators of memory storage. *Hormones and behavior* *15*, 168-182.
- McGaugh, J.L. (1973).** Drug facilitation of learning and memory. *Annual review of pharmacology* *13*, 229-241.
- McGaugh, J.L. (2000).** Memory--a century of consolidation. *Science* *287*, 248-251.
- McGaugh, J.L., McIntyre, C.K., and Power, A.E. (2002).** Amygdala modulation of memory consolidation: interaction with other brain systems. *Neurobiology of learning and memory* *78*, 539-552.
- McGee, S.M., McGee, D.N., and McGee, M.B. (2004).** Spontaneous intracerebral hemorrhage related to methamphetamine abuse: autopsy findings and clinical correlation. *The American journal of forensic medicine and pathology* *25*, 334-337.
- McIntyre, C.K., Power, A.E., Roozendaal, B., and McGaugh, J.L. (2003).** Role of the basolateral amygdala in memory consolidation. *Annals of the New York Academy of Sciences* *985*, 273-293.
- McKinley, M.J., Albiston, A.L., Allen, A.M., Mathai, M.L., May, C.N., McAllen, R.M., Oldfield, B.J., Mendelsohn, F.A., and Chai, S.Y. (2003).** The brain renin-angiotensin system: location and physiological roles. *The international journal of biochemistry & cell biology* *35*, 901-918.

- Mendelsohn, F.A., Jenkins, T.A., and Berkovic, S.F. (1993).** Effects of angiotensin II on dopamine and serotonin turnover in the striatum of conscious rats. *Brain research* 613, 221-229.
- Meneses, A., Ponce-Lopez, T., Tellez, R., Gonzalez, R., Castillo, C., and Gasbarri, A. (2011).** Effects of d-amphetamine on short- and long-term memory in spontaneously hypertensive, Wistar-Kyoto and Sprague-Dawley rats. *Behavioural brain research* 216, 472-476.
- Middleton, J., Americh, L., Gayon, R., Julien, D., Aguilar, L., Amalric, F., and Girard, J.P. (2004).** Endothelial cell phenotypes in the rheumatoid synovium: activated, angiogenic, apoptotic and leaky. *Arthritis research & therapy* 6, 60-72.
- Mimran, A., and Ribstein, J. (1999a).** Angiotensin receptor blockers: pharmacology and clinical significance. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 10 Suppl 12, S273-277.
- Mimran, A., Ribstein, J., and DuCailar, G. (1999b).** Angiotensin II receptor antagonists and hypertension. *Clinical and experimental hypertension* 21, 847-858.
- Mironov, V., Hritz, M.A., LaManna, J.C., Hudetz, A.G., and Harik, S.I. (1994).** Architectural alterations in rat cerebral microvessels after hypobaric hypoxia. *Brain research* 660, 73-80.
- Mitra, A.K., Gao, L., and Zucker, I.H. (2010).** Angiotensin II-induced upregulation of AT(1) receptor expression: sequential activation of NF-kappaB and Elk-1 in neurons. *American journal of physiology Cell physiology* 299, C561-569.
- Mizoguchi, H., Ibi, D., Takase, F., Nagai, T., Kamei, H., Toth, E., Sato, J., Takuma, K., and Yamada, K. (2011).** Nicotine ameliorates impairment of working memory in methamphetamine-treated rats. *Behavioural brain research* 220, 159-163.
- Mogi, M., Tsukuda, K., Li, J.M., Iwanami, J., Min, L.J., Sakata, A., Fujita, T., Iwai, M., and Horiuchi, M. (2007).** Inhibition of cognitive decline in mice fed a high-salt and cholesterol diet by the angiotensin receptor blocker, olmesartan. *Neuropharmacology* 53, 899-905.
- Moody, D.M., Santamore, W.P., and Bell, M.A. (1991).** Does tortuosity in cerebral arterioles impair down-autoregulation in hypertensives and elderly normotensives? A hypothesis and computer model. *Clinical neurosurgery* 37, 372-387.
- Mook, D.M., and Neuringer, A. (1994).** Different effects of amphetamine on reinforced variations versus repetitions in spontaneously hypertensive rats (SHR). *Physiology & behavior* 56, 939-944.
- Moore, K.E. (1977).** The actions of amphetamine on neurotransmitters: a brief review. *Biological psychiatry* 12, 451-462.
- Moore, R., Krstew, E.V., Kirchhoff, J., Davisson, R.L., and Lawrence, A.J. (2007).** Central overexpression of angiotensin AT(1A) receptors prevents dopamine D(2) receptor regulation of alcohol consumption in mice. *Alcoholism, clinical and experimental research* 31, 1128-1137.
- Moratalla, R., Khairnar, A., Simola, N., Granado, N., Garcia-Montes, J.R., Porceddu, P.F., Tizabi, Y., Costa, G., and Morelli, M. (2015).** Amphetamine-related drugs neurotoxicity in humans and in experimental animals: Main mechanisms. *Progress in neurobiology*.
- Morgan, J.I., and Curran, T. (1991).** Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun. *Annual review of neuroscience* 14, 421-451.
- Morgan, J.M., and Routtenberg, A. (1977).** Angiotensin injected into the neostriatum after learning disrupts retention performance. *Science* 196, 87-89.
- Morsing, P. (1999).** Candesartan: a new-generation angiotensin II AT1 receptor blocker: pharmacology, antihypertensive efficacy, renal function, and renoprotection. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 10 Suppl 11, S248-254.
- Morsing, P., Adler, G., Brandt-Eliasson, U., Karp, L., Ohlson, K., Renberg, L., Sjoquist, P.O., and Abrahamsson, T. (1999).** Mechanistic differences of various AT1-receptor blockers in isolated vessels of different origin. *Hypertension* 33, 1406-1413.
- Moscovitch, M., Rosenbaum, R.S., Gilboa, A., Addis, D.R., Westmacott, R., Grady, C., McAndrews, M.P., Levine, B., Black, S., Winocur, G., et al. (2005).** Functional neuroanatomy of remote episodic, semantic and spatial memory: a unified account based on multiple trace theory. *Journal of anatomy* 207, 35-66.
- Mukoyama, M., Nakajima, M., Horiuchi, M., Sasamura, H., Pratt, R.E., and Dzau, V.J. (1993).** Expression cloning of type 2 angiotensin II receptor reveals a unique class of seven-transmembrane receptors. *The Journal of biological chemistry* 268, 24539-24542.
- Munoz, A., Garrido-Gil, P., Dominguez-Mejide, A., and Labandeira-Garcia, J.L. (2014).** Angiotensin type 1 receptor blockage reduces l-dopa-induced dyskinesia in the 6-OHDA model of Parkinson's disease. Involvement of vascular endothelial growth factor and interleukin-1beta. *Experimental neurology* 261, 720-732.

- Munro, J.M., Pober, J.S., and Cotran, R.S. (1989).** Tumor necrosis factor and interferon-gamma induce distinct patterns of endothelial activation and associated leukocyte accumulation in skin of *Papio anubis*. *The American journal of pathology* 135, 121-133.
- Murnane, K.S., Perrine, S.A., Finton, B.J., Galloway, M.P., Howell, L.L., and Fantegrossi, W.E. (2012).** Effects of exposure to amphetamine derivatives on passive avoidance performance and the central levels of monoamines and their metabolites in mice: correlations between behavior and neurochemistry. *Psychopharmacology* 220, 495-508.
- Murphy, T.J., Alexander, R.W., Griendling, K.K., Runge, M.S., and Bernstein, K.E. (1991).** Isolation of a cDNA encoding the vascular type-1 angiotensin II receptor. *Nature* 351, 233-236.
- Nagai, M., Terao, S., Vital, S.A., Rodrigues, S.F., Yilmaz, G., and Granger, D.N. (2011).** Role of blood cell-associated angiotensin II type 1 receptors in the cerebral microvascular response to ischemic stroke during angiotensin-induced hypertension. *Experimental & translational stroke medicine* 3, 15.
- Narayanaswami, V., Somkuwar, S.S., Horton, D.B., Cassis, L.A., and Dwoskin, L.P. (2013).** Angiotensin AT1 and AT2 receptor antagonists modulate nicotine-evoked [(3)H]dopamine and [(3)H]norepinephrine release. *Biochemical pharmacology* 86, 656-665.
- Negro, R. (2008).** Endothelial effects of antihypertensive treatment: focus on irbesartan. *Vascular health and risk management* 4, 89-101.
- Nelson, A., and Killcross, S. (2006).** Amphetamine exposure enhances habit formation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26, 3805-3812.
- Ni, Y., Malarkey, E.B., and Parpura, V. (2007).** Vesicular release of glutamate mediates bidirectional signaling between astrocytes and neurons. *Journal of neurochemistry* 103, 1273-1284.
- Nieh, E.H., Kim, S.Y., Namburi, P., and Tye, K.M. (2013).** Optogenetic dissection of neural circuits underlying emotional valence and motivated behaviors. *Brain research* 1511, 73-92.
- Nishimura, Y., Ito, T., Hoe, K., and Saavedra, J.M. (2000).** Chronic peripheral administration of the angiotensin II AT(1) receptor antagonist candesartan blocks brain AT(1) receptors. *Brain research* 871, 29-38.
- Noda, K., Nakao, S., Zandi, S., Sun, D., Hayes, K.C., and Hafezi-Moghadam, A. (2014).** Retinopathy in a novel model of metabolic syndrome and type 2 diabetes: new insight on the inflammatory paradigm. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 28, 2038-2046.
- Nordquist, R.E., Vanderschuren, L.J., Jonker, A.J., Bergsma, M., de Vries, T.J., Pennartz, C.M., and Voorn, P. (2008).** Expression of amphetamine sensitization is associated with recruitment of a reactive neuronal population in the nucleus accumbens core. *Psychopharmacology* 198, 113-126.
- O'Callaghan, J.P., Jensen, K.F., and Miller, D.B. (1995).** Quantitative aspects of drug and toxicant-induced astrogliosis. *Neurochemistry international* 26, 115-124.
- O'Callaghan, J.P., Sriram, K., and Miller, D.B. (2008).** Defining "neuroinflammation". *Annals of the New York Academy of Sciences* 1139, 318-330.
- Oades, R.D., Sadile, A.G., Sagvolden, T., Viggiano, D., Zuddas, A., Devoto, P., Aase, H., Johansen, E.B., Ruocco, L.A., and Russell, V.A. (2005).** The control of responsiveness in ADHD by catecholamines: evidence for dopaminergic, noradrenergic and interactive roles. *Developmental science* 8, 122-131.
- Occhieppo, V.B., Marchese, N.A., Rodriguez, I.D., Basmadjian, O.M., Baiardi, G., and Bregonzio, C. (2017).** Neurovascular unit alteration in somatosensory cortex and enhancement of thermal nociception induced by amphetamine involves central AT1 receptor activation. *The European journal of neuroscience*.
- Oh, S.Y., Kim, J.H., Park, M.J., Kim, S.M., Yoon, C.S., Joo, Y.M., Park, J.S., Han, S.I., Park, H.G., and Kang, H.S. (2005).** Induction of heat shock protein 72 in C6 glioma cells by methyl jasmonate through ROS-dependent heat shock factor 1 activation. *International journal of molecular medicine* 16, 833-839.
- Ohta, K., Mori, M., Yoritaka, A., Okamoto, K., and Kishida, S. (2005).** Delayed ischemic stroke associated with methamphetamine use. *The Journal of emergency medicine* 28, 165-167.
- Oliva, I., Fernandez, M., and Martin, E.D. (2013).** Dopamine release regulation by astrocytes during cerebral ischemia. *Neurobiology of disease* 58, 231-241.
- Ongali, B., Nicolakakis, N., Tong, X.K., Aboukassim, T., Papadopoulos, P., Rosa-Neto, P., Lecrux, C., Imboden, H., and Hamel, E. (2014).** Angiotensin II type 1 receptor blocker losartan prevents and rescues cerebrovascular, neuropathological and cognitive deficits in an Alzheimer's disease model. *Neurobiology of disease* 68, 126-136.
- Oparil, S. (2000).** Newly emerging pharmacologic differences in angiotensin II receptor blockers. *American journal of hypertension* 13, 18S-24S.

- Ornstein, T.J., Iddon, J.L., Baldacchino, A.M., Sahakian, B.J., London, M., Everitt, B.J., and Robbins, T.W. (2000).** Profiles of cognitive dysfunction in chronic amphetamine and heroin abusers. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 23, 113-126.
- Ou, Z., Jiang, T., Gao, Q., Tian, Y.Y., Zhou, J.S., Wu, L., Shi, J.Q., and Zhang, Y.D. (2016).** Mitochondrial-dependent mechanisms are involved in angiotensin II-induced apoptosis in dopaminergic neurons. *Journal of the renin-angiotensin-aldosterone system : JRAAS* 17.
- Panakhova, E., Buresova, O., and Bures, J. (1984).** The effect of hypothermia on the rat's spatial memory in the water tank task. *Behavioral and neural biology* 42, 191-196.
- Paul, M., Poyan Mehr, A., and Kreutz, R. (2006).** Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiological reviews* 86, 747-803.
- Paule, M.G., Rowland, A.S., Ferguson, S.A., Chelonis, J.J., Tannock, R., Swanson, J.M., and Castellanos, F.X. (2000).** Attention deficit/hyperactivity disorder: characteristics, interventions and models. *Neurotoxicology and teratology* 22, 631-651.
- Paxinos, G., and Watson, C. (2009).** *The Rat Brain in stereotaxic coordinates*, 6th edn (Elsevier).
- Paz, M.C., Assis, M.A., Cabrera, R.J., Cancela, L.M., and Bregonzio, C. (2011).** The AT(1) angiotensin II receptor blockade attenuates the development of amphetamine-induced behavioral sensitization in a two-injection protocol. *Synapse* 65, 505-512.
- Paz, M.C., Marchese, N.A., Cancela, L.M., and Bregonzio, C. (2013a).** Angiotensin II AT(1) receptors are involved in neuronal activation induced by amphetamine in a two-injection protocol. *BioMed research international* 2013, 534817.
- Paz, M.C., Marchese, N.A., Stroppa, M.M., Gerez de Burgos, N.M., Imboden, H., Baiardi, G., Cancela, L.M., and Bregonzio, C. (2014).** Involvement of the brain renin-angiotensin system (RAS) in the neuroadaptive responses induced by amphetamine in a two-injection protocol. *Behavioural brain research* 272, 314-323.
- Paz, M.C.M., M.; Bregonzio, C.; Baiard, G. (2012).** Renin-Angiotensin System Modulating Functions in the CPu. In *Horizons in Neuroscience Research*, A.C.a.E. Villalba, ed. (NOVA), pp. 141-158.
- Paz, R., and Pare, D. (2013b).** Physiological basis for emotional modulation of memory circuits by the amygdala. *Current opinion in neurobiology* 23, 381-386.
- Peach, M.J. (1977).** Renin-angiotensin system: biochemistry and mechanisms of action. *Physiological reviews* 57, 313-370.
- Pekny, M., and Nilsson, M. (2005).** Astrocyte activation and reactive gliosis. *Glia* 50, 427-434.
- Peleg-Raibstein, D., Knuesel, I., and Feldon, J. (2008).** Amphetamine sensitization in rats as an animal model of schizophrenia. *Behavioural brain research* 191, 190-201.
- Peleg-Raibstein, D., Sydekum, E., and Feldon, J. (2006).** Differential effects on prepulse inhibition of withdrawal from two different repeated administration schedules of amphetamine. *The international journal of neuropsychopharmacology* 9, 737-749.
- Pelisch, N., Hosomi, N., Ueno, M., Masugata, H., Murao, K., Hitomi, H., Nakano, D., Kobori, H., Nishiyama, A., and Kohno, M. (2010).** Systemic candesartan reduces brain angiotensin II via downregulation of brain renin-angiotensin system. *Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension* 33, 161-164.
- Pelisch, N., Hosomi, N., Ueno, M., Nakano, D., Hitomi, H., Mogi, M., Shimada, K., Kobori, H., Horiuchi, M., Sakamoto, H., et al. (2011).** Blockade of AT1 receptors protects the blood-brain barrier and improves cognition in Dahl salt-sensitive hypertensive rats. *American journal of hypertension* 24, 362-368.
- Peng, J.F., and Phillips, M.I. (2001).** Opposite regulation of brain angiotensin type 1 and type 2 receptors in cold-induced hypertension. *Regulatory peptides* 97, 91-102.
- Pereira, J., Saez, C.G., Pallavicini, J., Panes, O., Pereira-Flores, K., Cabrerias, M.J., Massardo, T., and Mezzano, D. (2011).** Platelet activation in chronic cocaine users: effect of short term abstinence. *Platelets* 22, 596-601.
- Perez, M.F., Gabach, L.A., Almiron, R.S., Carlini, V.P., De Barioglio, S.R., and Ramirez, O.A. (2010).** Different chronic cocaine administration protocols induce changes on dentate gyrus plasticity and hippocampal dependent behavior. *Synapse* 64, 742-753.
- Pezze, M.A., and Feldon, J. (2004).** Mesolimbic dopaminergic pathways in fear conditioning. *Progress in neurobiology* 74, 301-320.
- Pierce, R.C., and Kalivas, P.W. (1997).** A circuitry model of the expression of behavioral sensitization to amphetamine-like psychostimulants. *Brain research Brain research reviews* 25, 192-216.

- Poisner, A.M.** (1998). The human placental renin-angiotensin system. *Frontiers in neuroendocrinology* 19, 232-252.
- Porcelli, A.J., Cruz, D., Wenberg, K., Patterson, M.D., Biswal, B.B., and Rypma, B.** (2008). The effects of acute stress on human prefrontal working memory systems. *Physiology & behavior* 95, 282-289.
- Puglisi-Allegra, S., Cestari, V., Cabib, S., and Castellano, C.** (1994). Strain-dependent effects of post-training cocaine or nomifensine on memory storage involve both D1 and D2 dopamine receptors. *Psychopharmacology* 115, 157-162.
- Rademacher, D.J., Rosenkranz, J.A., Morshedi, M.M., Sullivan, E.M., and Meredith, G.E.** (2010). Amphetamine-associated contextual learning is accompanied by structural and functional plasticity in the basolateral amygdala. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30, 4676-4686.
- Radenkovic, M., Stojanovic, M., Potpara, T., and Prostran, M.** (2013). Therapeutic approach in the improvement of endothelial dysfunction: the current state of the art. *BioMed research international* 2013, 252158.
- Raghavendra, V., Chopra, K., and Kulkarni, S.K.** (1998). Modulation of motor functions involving the dopaminergic system by AT1 receptor antagonist, losartan. *Neuropeptides* 32, 275-280.
- Raghavendra, V., Chopra, K., and Kulkarni, S.K.** (1999). Brain renin angiotensin system (RAS) in stress-induced analgesia and impaired retention. *Peptides* 20, 335-342.
- Rang, H.P., Ritter, J.M., Flower, R.J., and Henderson, G.** (2014). *Rang & Dale's Pharmacology: With student consult online access* (Elsevier Health Sciences).
- Richtand, N.M., Kelsoe, J.R., Segal, D.S., and Kuczenski, R.** (1995). Regional quantification of dopamine transporter mRNA in rat brain using a ribonuclease protection assay. *Neuroscience letters* 200, 73-76.
- Riga, D., Matos, M.R., Glas, A., Smit, A.B., Spijker, S., and Van den Oever, M.C.** (2014). Optogenetic dissection of medial prefrontal cortex circuitry. *Frontiers in systems neuroscience* 8, 230.
- Robbins, T.W., Ersche, K.D., and Everitt, B.J.** (2008). Drug addiction and the memory systems of the brain. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1141, 1-21.
- Robinson, T.E., and Becker, J.B.** (1986). Enduring changes in brain and behavior produced by chronic amphetamine administration: a review and evaluation of animal models of amphetamine psychosis. *Brain research* 396, 157-198.
- Robinson, T.E., and Kolb, B.** (1997). Persistent structural modifications in nucleus accumbens and prefrontal cortex neurons produced by previous experience with amphetamine. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 17, 8491-8497.
- Robinson, T.E., and Kolb, B.** (2004). Structural plasticity associated with exposure to drugs of abuse. *Neuropharmacology* 47 *Suppl 1*, 33-46.
- Rodriguez-Arellano, J.J., Parpura, V., Zorec, R., and Verkhratsky, A.** (2016). Astrocytes in physiological aging and Alzheimer's disease. *Neuroscience* 323, 170-182.
- Rodriguez-Perez, A.I., Borrajo, A., Diaz-Ruiz, C., Garrido-Gil, P., and Labandeira-Garcia, J.L.** (2016). Crosstalk between insulin-like growth factor-1 and angiotensin-II in dopaminergic neurons and glial cells: role in neuroinflammation and aging. *Oncotarget* 7, 30049-30067.
- Rodriguez-Perez, A.I., Dominguez-Mejide, A., Lanciego, J.L., Guerra, M.J., and Labandeira-Garcia, J.L.** (2013). Dopaminergic degeneration is enhanced by chronic brain hypoperfusion and inhibited by angiotensin receptor blockage. *Age* 35, 1675-1690.
- Roggenhofer, E., Fidzinski, P., Shor, O., and Behr, J.** (2013). Reduced threshold for induction of LTP by activation of dopamine D1/D5 receptors at hippocampal CA1-subiculum synapses. *PloS one* 8, e62520.
- Roosendaal, B., Nguyen, B.T., Power, A.E., and McGaugh, J.L.** (1999). Basolateral amygdala noradrenergic influence enables enhancement of memory consolidation induced by hippocampal glucocorticoid receptor activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 11642-11647.
- Rosselli, M., and Ardila, A.** (1996). Cognitive effects of cocaine and polydrug abuse. *Journal of clinical and experimental neuropsychology* 18, 122-135.
- Rubinow, M.J., Mahajan, G., May, W., Overholser, J.C., Jurjus, G.J., Dieter, L., Herbst, N., Steffens, D.C., Miguel-Hidalgo, J.J., Rajkowska, G., et al.** (2016). Basolateral amygdala volume and cell numbers in major depressive disorder: a postmortem stereological study. *Brain structure & function* 221, 171-184.
- Rumbaugh, C.L., Bergeron, R.T., Scanlan, R.L., Teal, J.S., Segall, H.D., Fang, H.C., and McCormick, R.** (1971). Cerebral vascular changes secondary to amphetamine abuse in the experimental animal. *Radiology* 101, 345-351.
- Saavedra, J.M.** (1992). Brain and pituitary angiotensin. *Endocrine reviews* 13, 329-380.

- Saavedra, J.M.** (1999). Emerging features of brain angiotensin receptors. *Regulatory peptides* 85, 31-45.
- Saavedra, J.M.** (2005). Brain angiotensin II: new developments, unanswered questions and therapeutic opportunities. *Cellular and molecular neurobiology* 25, 485-512.
- Saavedra, J.M.** (2012). Angiotensin II AT(1) receptor blockers as treatments for inflammatory brain disorders. *Clinical science* 123, 567-590.
- Saavedra, J.M.** (2016). Evidence to Consider Angiotensin II Receptor Blockers for the Treatment of Early Alzheimer's Disease. *Cellular and molecular neurobiology* 36, 259-279.
- Saavedra, J.M., Benicky, J., and Zhou, J.** (2006). Angiotensin II: multitasking in the brain. *Journal of hypertension Supplement : official journal of the International Society of Hypertension* 24, S131-137.
- Saavedra, J.M., Sanchez-Lemus, E., and Benicky, J.** (2011). Blockade of brain angiotensin II AT1 receptors ameliorates stress, anxiety, brain inflammation and ischemia: Therapeutic implications. *Psychoneuroendocrinology* 36, 1-18.
- Saez, C.G., Olivares, P., Pallavicini, J., Panes, O., Moreno, N., Massardo, T., Mezzano, D., and Pereira, J.** (2011). Increased number of circulating endothelial cells and plasma markers of endothelial damage in chronic cocaine users. *Thrombosis research* 128, e18-23.
- Saez, C.G., Pereira-Flores, K., Ebensperger, R., Panes, O., Massardo, T., Hidalgo, P., Mezzano, D., and Pereira, J.** (2014). Atorvastatin reduces the proadhesive and prothrombotic endothelial cell phenotype induced by cocaine and plasma from cocaine consumers in vitro. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 34, 2439-2448.
- Sah, P., Faber, E.S., Lopez De Armentia, M., and Power, J.** (2003). The amygdaloid complex: anatomy and physiology. *Physiological reviews* 83, 803-834.
- Sahgal, A., and Wright, C.** (1983). A comparison of the effects of vasopressin and oxytocin with amphetamine and chlordiazepoxide on passive avoidance behaviour in rats. *Psychopharmacology* 80, 88-92.
- Sailasuta, N., Abulseoud, O., Harris, K.C., and Ross, B.D.** (2010). Glial dysfunction in abstinent methamphetamine abusers. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 30, 950-960.
- Sanday, L., Patti, C.L., Zanin, K.A., Tufik, S., and Frussa-Filho, R.** (2013). Amphetamine-induced memory impairment in a discriminative avoidance task is state-dependent in mice. *The international journal of neuropsychopharmacology* 16, 583-592.
- Saravia, F., Beauquis, J., Pietranera, L., and De Nicola, A.F.** (2007). Neuroprotective effects of estradiol in hippocampal neurons and glia of middle age mice. *Psychoneuroendocrinology* 32, 480-492.
- Saravia, F.E., Beauquis, J., Revsin, Y., Homo-Delarche, F., de Kloet, E.R., and De Nicola, A.F.** (2006). Hippocampal neuropathology of diabetes mellitus is relieved by estrogen treatment. *Cellular and molecular neurobiology* 26, 943-957.
- Sarkar, C., Ganju, R.K., Pompili, V.J., and Chakroborty, D.** (2017). Enhanced peripheral dopamine impairs post-ischemic healing by suppressing angiotensin receptor type 1 expression in endothelial cells and inhibiting angiogenesis. *Angiogenesis* 20, 97-107.
- Schrader, L.I., Kinzenbaw, D.A., Johnson, A.W., Faraci, F.M., and Didion, S.P.** (2007). IL-6 deficiency protects against angiotensin II induced endothelial dysfunction and hypertrophy. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 27, 2576-2581.
- Schwabe, L., Joels, M., Roozendaal, B., Wolf, O.T., and Oitzl, M.S.** (2012). Stress effects on memory: an update and integration. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 36, 1740-1749.
- Schwienbacher, I., Fendt, M., and Schnitzler, H.U.** (2005). Amphetamine injections into the nucleus accumbens affect neither acquisition/expression of conditioned fear nor baseline startle response. *Experimental brain research* 160, 538-544.
- Seliger, D.L.** (1975). Dose-response effects of d-amphetamine on passive avoidance learning in the rat. *Psychopharmacologia* 44, 191-193.
- Seliger, D.L.** (1977). Passive avoidance learning in the rat as functions of d-amphetamine dosage and shock intensity. *Psychopharmacology* 54, 241-242.
- Seltzer, A., Bregonzio, C., Armando, I., Baiardi, G., and Saavedra, J.M.** (2004). Oral administration of an AT1 receptor antagonist prevents the central effects of angiotensin II in spontaneously hypertensive rats. *Brain research* 1028, 9-18.
- Seo, D., and Sinha, R.** (2015). Neuroplasticity and Predictors of Alcohol Recovery. *Alcohol research : current reviews* 37, 143-152.
- Shamovsky, I., and Nudler, E.** (2008). New insights into the mechanism of heat shock response activation. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 65, 855-861.

- Sharma, B., and Singh, N.** Experimental hypertension induced vascular dementia: pharmacological, biochemical and behavioral recuperation by angiotensin receptor blocker and acetylcholinesterase inhibitor. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* *102*, 101-108.
- Sharma, B., and Singh, N.** (2012). Experimental hypertension induced vascular dementia: pharmacological, biochemical and behavioral recuperation by angiotensin receptor blocker and acetylcholinesterase inhibitor. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* *102*, 101-108.
- Shibata, S., Mori, K., Sekine, I., and Suyama, H.** (1991). Subarachnoid and intracerebral hemorrhage associated with necrotizing angiitis due to methamphetamine abuse--an autopsy case. *Neurologia medico-chirurgica* *31*, 49-52.
- Shoblock, J.R., Maisonneuve, I.M., and Glick, S.D.** (2003). Differences between d-methamphetamine and d-amphetamine in rats: working memory, tolerance, and extinction. *Psychopharmacology* *170*, 150-156.
- Simon, N.W., and Setlow, B.** (2006). Post-training amphetamine administration enhances memory consolidation in appetitive Pavlovian conditioning: Implications for drug addiction. *Neurobiology of learning and memory* *86*, 305-310.
- Simonnet, G., and Giorgiuff-Chesselet, M.F.** (1979). Stimulating effect of angiotensin II on the spontaneous release of newly synthesized [3H]dopamine in rat striatal slices. *Neuroscience letters* *15*, 153-158.
- Simons, M.** (2005). Angiogenesis: where do we stand now? *Circulation* *111*, 1556-1566.
- Siva, A.** (2001). Vasculitis of the nervous system. *Journal of neurology* *248*, 451-468.
- Slifstein, M., van de Giessen, E., Van Snellenberg, J., Thompson, J.L., Narendran, R., Gil, R., Hackett, E., Girgis, R., Ojeil, N., Moore, H., et al.** (2015). Deficits in prefrontal cortical and extrastriatal dopamine release in schizophrenia: a positron emission tomographic functional magnetic resonance imaging study. *JAMA psychiatry* *72*, 316-324.
- Sofroniew, M.V.** (2014). Multiple roles for astrocytes as effectors of cytokines and inflammatory mediators. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry* *20*, 160-172.
- Sofroniew, M.V., and Vinters, H.V.** (2010). Astrocytes: biology and pathology. *Acta neuropathologica* *119*, 7-35.
- Sofuoglu, M.** (2010). Cognitive enhancement as a pharmacotherapy target for stimulant addiction. *Addiction* *105*, 38-48.
- Song, K., Allen, A.M., Paxinos, G., and Mendelsohn, F.A.** (1992). Mapping of angiotensin II receptor subtype heterogeneity in rat brain. *The Journal of comparative neurology* *316*, 467-484.
- Souza, L.S., Silva, E.F., Santos, W.B., Asth, L., Lobao-Soares, B., Soares-Rachetti, V.P., Medeiros, I.U., and Gavioli, E.C.** (2016). Lithium and valproate prevent methylphenidate-induced mania-like behaviors in the hole board test. *Neuroscience letters* *629*, 143-148.
- Srinivasan, R.G.a.N.** (2009). Cognitive Neuroscience of Emotional Memory. *Advances in Developmental Neuroscience and Imaging*.
- Stanimirovic, D.B., and Friedman, A.** (2012). Pathophysiology of the neurovascular unit: disease cause or consequence? *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* *32*, 1207-1221.
- Stevenson, C.W.** (2011). Role of amygdala-prefrontal cortex circuitry in regulating the expression of contextual fear memory. *Neurobiology of learning and memory* *96*, 315-323.
- Stewart, J., and Badiani, A.** (1993). Tolerance and sensitization to the behavioral effects of drugs. *Behavioural pharmacology* *4*, 289-312.
- Takano, T., Kang, J., Jaiswal, J.K., Simon, S.M., Lin, J.H., Yu, Y., Li, Y., Yang, J., Dienel, G., Zielke, H.R., et al.** (2005). Receptor-mediated glutamate release from volume sensitive channels in astrocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *102*, 16466-16471.
- Takeda, S., Sato, N., Takeuchi, D., Kurinami, H., Shinohara, M., Niisato, K., Kano, M., Ogihara, T., Rakugi, H., and Morishita, R.** (2009). Angiotensin receptor blocker prevented beta-amyloid-induced cognitive impairment associated with recovery of neurovascular coupling. *Hypertension* *54*, 1345-1352.
- Takezako, T., Gogonea, C., Saad, Y., Noda, K., and Karnik, S.S.** (2004). "Network leaning" as a mechanism of insurmountable antagonism of the angiotensin II type 1 receptor by non-peptide antagonists. *The Journal of biological chemistry* *279*, 15248-15257.
- Tamarat, R., Silvestre, J.S., Durie, M., and Levy, B.I.** (2002). Angiotensin II angiogenic effect in vivo involves vascular endothelial growth factor- and inflammation-related pathways. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* *82*, 747-756.
- Tan, Y., Li, X., Prabhu, S.D., Brittian, K.R., Chen, Q., Yin, X., McClain, C.J., Zhou, Z., and Cai, L.** (2012). Angiotensin II plays a critical role in alcohol-induced cardiac nitrative damage, cell death,

- remodeling, and cardiomyopathy in a protein kinase C/nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase-dependent manner. *Journal of the American College of Cardiology* 59, 1477-1486.
- Tata, D.A., and Anderson, B.J.** (2002). A new method for the investigation of capillary structure. *Journal of neuroscience methods* 113, 199-206.
- Tchekalarova, J., and Georgiev, V.** (1998). Further evidence for interaction between angiotensin II and dopamine receptors (experiments on apomorphine stereotypy). *Methods and findings in experimental and clinical pharmacology* 20, 419-424.
- Teng, F., Yin, Y., Cui, Y., Deng, Y., Li, D., Cho, K., Zhang, G., Lu, A., Wu, W., Yang, M., et al.** (2016). Salvianolic acid A inhibits endothelial dysfunction and vascular remodeling in spontaneously hypertensive rats. *Life sciences* 144, 86-93.
- Terao, Y., Miyamoto, S., Hirai, K., Kamiguchi, H., Ohta, H., Shimojo, M., Kiyota, Y., Asahi, S., Sakura, Y., and Shintani, Y.** (2009). Hypothermia enhances heat-shock protein 70 production in ischemic brains. *Neuroreport* 20, 745-749.
- Tesfamariam, B., and DeFelice, A.F.** (2007). Endothelial injury in the initiation and progression of vascular disorders. *Vascular pharmacology* 46, 229-237.
- Teyler, T.J., and DiScenna, P.** (1987). Long-term potentiation. *Annual review of neuroscience* 10, 131-161.
- Tham, D.M., Martin-McNulty, B., Wang, Y.X., Wilson, D.W., Vergona, R., Sullivan, M.E., Dole, W., and Rutledge, J.C.** (2002). Angiotensin II is associated with activation of NF-kappaB-mediated genes and downregulation of PPARs. *Physiological genomics* 11, 21-30.
- Thierry, A.M., Gioanni, Y., Degenetais, E., and Glowinski, J.** (2000). Hippocampo-prefrontal cortex pathway: anatomical and electrophysiological characteristics. *Hippocampus* 10, 411-419.
- Thomas, M., George, N.I., Patterson, T.A., and Bowyer, J.F.** (2009). Amphetamine and environmentally induced hyperthermia differentially alter the expression of genes regulating vascular tone and angiogenesis in the meninges and associated vasculature. *Synapse* 63, 881-894.
- Thomas, M., George, N.I., Saini, U.T., Patterson, T.A., Hanig, J.P., and Bowyer, J.F.** (2010). Endoplasmic reticulum stress responses differ in meninges and associated vasculature, striatum, and parietal cortex after a neurotoxic amphetamine exposure. *Synapse* 64, 579-593.
- Thomas, W.G.** (1999). Regulation of angiotensin II type 1 (AT1) receptor function. *Regulatory peptides* 79, 9-23.
- Torregrossa, M.M., and Kalivas, P.W.** (2008). Microdialysis and the neurochemistry of addiction. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 90, 261-272.
- Touyz, R.M., Tabet, F., and Schiffrin, E.L.** (2003). Redox-dependent signalling by angiotensin II and vascular remodelling in hypertension. *Clinical and experimental pharmacology & physiology* 30, 860-866.
- Tronson, N.C., Corcoran, K.A., Jovasevic, V., and Radulovic, J.** (2012). Fear conditioning and extinction: emotional states encoded by distinct signaling pathways. *Trends in neurosciences* 35, 145-155.
- Tse, M.T., Cantor, A., and Floresco, S.B.** (2011). Repeated amphetamine exposure disrupts dopaminergic modulation of amygdala-prefrontal circuitry and cognitive/emotional functioning. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31, 11282-11294.
- Udelman, R., Blake, M.J., Stagg, C.A., Li, D.G., Putney, D.J., and Holbrook, N.J.** (1993). Vascular heat shock protein expression in response to stress. *Endocrine and autonomic regulation of this age-dependent response. The Journal of clinical investigation* 91, 465-473.
- Udristoiu, I., Marinescu, I., Pirlog, M.C., Militaru, F., Udristoiu, T., Marinescu, D., and Mutica, M.** (2016). The microvascular alterations in frontal cortex during treatment with antipsychotics: a post-mortem study. *Romanian journal of morphology and embryology = Revue roumaine de morphologie et embryologie* 57, 501-506.
- Vaarmann, A., Gandhi, S., and Abramov, A.Y.** (2010a). Dopamine induces Ca<sup>2+</sup> signaling in astrocytes through reactive oxygen species generated by monoamine oxidase. *The Journal of biological chemistry* 285, 25018-25023.
- Vaarmann, A., Gandhi, S., Gourine, A.V., and Abramov, A.Y.** (2010b). Novel pathway for an old neurotransmitter: dopamine-induced neuronal calcium signalling via receptor-independent mechanisms. *Cell calcium* 48, 176-182.
- Valvassori, S.S., Tonin, P.T., Varela, R.B., Carvalho, A.F., Mariot, E., Amboni, R.T., Bianchini, G., Andersen, M.L., and Quevedo, J.** (2015). Lithium modulates the production of peripheral and cerebral cytokines in an animal model of mania induced by dextroamphetamine. *Bipolar disorders* 17, 507-517.
- van den Buuse, M., Zheng, T.W., Walker, L.L., and Denton, D.A.** (2005). Angiotensin-converting enzyme (ACE) interacts with dopaminergic mechanisms in the brain to modulate prepulse inhibition in mice. *Neuroscience letters* 380, 6-11.

- Van Houten, M., Mangiapane, M.L., Reid, I.A., and Ganong, W.F. (1983).** [Sar,Ala]angiotensin II in cerebrospinal fluid blocks the binding of blood-borne [125I]angiotensin II to the circumventricular organs. *Neuroscience* 10, 1421-1426.
- Vanderheyden, P.M., Fierens, F.L., and Vauquelin, G. (2000).** Angiotensin II type 1 receptor antagonists. Why do some of them produce insurmountable inhibition? *Biochemical pharmacology* 60, 1557-1563.
- Vanderschuren, L.J., and Kalivas, P.W. (2000).** Alterations in dopaminergic and glutamatergic transmission in the induction and expression of behavioral sensitization: a critical review of preclinical studies. *Psychopharmacology* 151, 99-120.
- Vanderschuren, L.J., Schoffelmeer, A.N., Mulder, A.H., and De Vries, T.J. (1999).** Dopaminergic mechanisms mediating the long-term expression of locomotor sensitization following pre-exposure to morphine or amphetamine. *Psychopharmacology* 143, 244-253.
- Vanderschuren, L.J., Schoffelmeer, A.N., Van Leeuwen, S.D., Hof, L., Jonker, A.J., and Voorn, P. (2002).** Compartment-specific changes in striatal neuronal activity during expression of amphetamine sensitization are the result of drug hypersensitivity. *The European journal of neuroscience* 16, 2462-2468.
- Vauquelin, G., Fierens, F.L., Verheijen, I., and Vanderheyden, P.M. (2001).** Distinctions between non-peptide angiotensin II AT1-receptor antagonists. *Journal of the renin-angiotensin-aldosterone system : JRAAS* 2, S24-S31.
- Vazquez-Medina, J.P., Popovich, I., Thorwald, M.A., Viscarra, J.A., Rodriguez, R., Sonanez-Organis, J.G., Lam, L., Peti-Peterdi, J., Nakano, D., Nishiyama, A., et al. (2013).** Angiotensin receptor-mediated oxidative stress is associated with impaired cardiac redox signaling and mitochondrial function in insulin-resistant rats. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 305, H599-607.
- Villapol, S., and Saavedra, J.M. (2015).** Neuroprotective effects of angiotensin receptor blockers. *American journal of hypertension* 28, 289-299.
- Villar-Cheda, B., Dominguez-Meijide, A., Valenzuela, R., Granado, N., Moratalla, R., and Labandeira-Garcia, J.L. (2014).** Aging-related dysregulation of dopamine and angiotensin receptor interaction. *Neurobiology of aging* 35, 1726-1738.
- Villar-Cheda, B., Rodriguez-Pallares, J., Valenzuela, R., Munoz, A., Guerra, M.J., Baltatu, O.C., and Labandeira-Garcia, J.L. (2010).** Nigral and striatal regulation of angiotensin receptor expression by dopamine and angiotensin in rodents: implications for progression of Parkinson's disease. *The European journal of neuroscience* 32, 1695-1706.
- Villar-Cheda, B., Valenzuela, R., Rodriguez-Perez, A.I., Guerra, M.J., and Labandeira-Garcia, J.L. (2012).** Aging-related changes in the nigral angiotensin system enhances proinflammatory and pro-oxidative markers and 6-OHDA-induced dopaminergic degeneration. *Neurobiology of aging* 33, 204 e201-211.
- von Bohlen und Halbach, O., and Albrecht, D. (2006).** The CNS renin-angiotensin system. *Cell and tissue research* 326, 599-616.
- Wang, X., Yang, H., and Raizada, M.K. (2001).** Angiotensin II increases vesicular trafficking in brain neurons. *Hypertension* 37, 677-682.
- Ward, N.L., and Lamanna, J.C. (2004).** The neurovascular unit and its growth factors: coordinated response in the vascular and nervous systems. *Neurological research* 26, 870-883.
- Watanabe, M.A., Kucenas, S., Bowman, T.A., Ruhlman, M., and Knuepfer, M.M. (2010).** Angiotensin II and CRF receptors in the central nucleus of the amygdala mediate hemodynamic response variability to cocaine in conscious rats. *Brain research* 1309, 53-65.
- White, F.J., and Kalivas, P.W. (1998).** Neuroadaptations involved in amphetamine and cocaine addiction. *Drug and alcohol dependence* 51, 141-153.
- Winnicka, M.M. (1998).** 6-OHDA bilateral lesions to the amygdala abolish the memory enhancing effect of angiotensin II in rats. *Pharmacological research* 38, 53-58.
- Winnicka, M.M., and Braszko, J.J. (1997a).** 6-OHDA lesions to the central amygdala abolish angiotensins facilitation of object recognition in rats. *General pharmacology* 29, 239-243.
- Winnicka, M.M., Braszko, J.J., and Wisniewski, K. (1997b).** Dopaminergic projection to the septum mediates facilitatory effect of angiotensins on recognition memory in rats. *Pharmacological research* 36, 387-394.
- Winstanley, C.A., LaPlant, Q., Theobald, D.E., Green, T.A., Bachtell, R.K., Perrotti, L.I., DiLeone, R.J., Russo, S.J., Garth, W.J., Self, D.W., et al. (2007).** DeltaFosB induction in orbitofrontal cortex mediates tolerance to cocaine-induced cognitive dysfunction. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27, 10497-10507.
- Wise, R.A. (2004).** Dopamine, learning and motivation. *Nature reviews Neuroscience* 5, 483-494.

- Wolf, M.E.** (1998). The role of excitatory amino acids in behavioral sensitization to psychomotor stimulants. *Progress in neurobiology* 54, 679-720.
- Wolf, M.E., Sun, X., Mangiavacchi, S., and Chao, S.Z.** (2004). Psychomotor stimulants and neuronal plasticity. *Neuropharmacology* 47 Suppl 1, 61-79.
- Wundergem, R.** (2014). Intracellular renin-angiotensin signaling: working from the inside-out in hypothalamic neurons. Focus on "Direct evidence of intracrine angiotensin II signaling in neurons". *American journal of physiology Cell physiology* 306, C721-723.
- . World Drug Report 2016. (United Nations Office on Drugs and Crime. United Nations publication).
- Wright, J.W., and Harding, J.W.** (2013). The brain renin-angiotensin system: a diversity of functions and implications for CNS diseases. *Pflügers Archiv : European journal of physiology* 465, 133-151.
- Wright, J.W., Yamamoto, B.J., and Harding, J.W.** (2008). Angiotensin receptor subtype mediated physiologies and behaviors: new discoveries and clinical targets. *Progress in neurobiology* 84, 157-181.
- Yamakawa, H., Jezova, M., Ando, H., and Saavedra, J.M.** (2003). Normalization of endothelial and inducible nitric oxide synthase expression in brain microvessels of spontaneously hypertensive rats by angiotensin II AT1 receptor inhibition. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 23, 371-380.
- Yamamoto, B.K., Moszczynska, A., and Gudelsky, G.A.** (2010). Amphetamine toxicities: classical and emerging mechanisms. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1187, 101-121.
- Yamamoto, B.K., and Raudensky, J.** (2008a). The role of oxidative stress, metabolic compromise, and inflammation in neuronal injury produced by amphetamine-related drugs of abuse. *Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology* 3, 203-217.
- Yamamoto, E., Tamamaki, N., Nakamura, T., Kataoka, K., Tokutomi, Y., Dong, Y.F., Fukuda, M., Matsuba, S., Ogawa, H., and Kim-Mitsuyama, S.** (2008b). Excess salt causes cerebral neuronal apoptosis and inflammation in stroke-prone hypertensive rats through angiotensin II-induced NADPH oxidase activation. *Stroke* 39, 3049-3056.
- Yang, G., Xi, Z.X., Wan, Y., Wang, H., and Bi, G.** (1993). Changes in circulating and tissue angiotensin II during acute and chronic stress. *Biological signals* 2, 166-172.
- Yang, H., and Raizada, M.K.** (1999). Role of phosphatidylinositol 3-kinase in angiotensin II regulation of norepinephrine neuromodulation in brain neurons of the spontaneously hypertensive rat. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 19, 2413-2423.
- Yang, H.J., Wang, L., Cheng, Q., and Xu, H.** (2011). Abnormal behaviors and microstructural changes in white matter of juvenile mice repeatedly exposed to amphetamine. *Schizophrenia research and treatment* 2011, 542896.
- Yoo, H.J., Im, C.N., Youn, D.Y., Yun, H.H., and Lee, J.H.** (2014). Bis is Induced by Oxidative Stress via Activation of HSF1. *The Korean journal of physiology & pharmacology : official journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology* 18, 403-409.
- Yuan, L., Brewer, C., and Pfaff, D.** (2002). Immediate-early Fos protein levels in brainstem neurons of male and female gonadectomized mice subjected to cold exposure. *Stress* 5, 285-294.
- Zacchigna, S., Lambrechts, D., and Carmeliet, P.** (2008). Neurovascular signalling defects in neurodegeneration. *Nature reviews Neuroscience* 9, 169-181.
- Zavala, L.E., Cierco, M., Gutierrez, A., Garrido, M.R., and Israel, A.** (2007). [Role of the renin-angiotensin system on the sympathetic response induced by the cold pressor test in humans]. *Investigacion clinica* 48, 155-165.
- Zhang, X., Banerjee, A., Banks, W.A., and Ercal, N.** (2009). N-Acetylcysteine amide protects against methamphetamine-induced oxidative stress and neurotoxicity in immortalized human brain endothelial cells. *Brain research* 1275, 87-95.
- Zhang, X., Zhang, S., Wang, C., Wang, B., and Guo, P.** (2014). Effects of moderate strength cold air exposure on blood pressure and biochemical indicators among cardiovascular and cerebrovascular patients. *International journal of environmental research and public health* 11, 2472-2487.
- Zhao, H.R., Jiang, T., Tian, Y.Y., Gao, Q., Li, Z., Pan, Y., Wu, L., Lu, J., and Zhang, Y.D.** (2015). Angiotensin II triggers apoptosis via enhancement of NADPH oxidase-dependent oxidative stress in a dopaminergic neuronal cell line. *Neurochemical research* 40, 854-863.
- Zhao, Q., Ishibashi, M., Hiasa, K., Tan, C., Takeshita, A., and Egashira, K.** (2004). Essential role of vascular endothelial growth factor in angiotensin II-induced vascular inflammation and remodeling. *Hypertension* 44, 264-270.

- Zheng, G., Chen, Y., Zhang, X., Cai, T., Liu, M., Zhao, F., Luo, W., and Chen, J. (2008).** Acute cold exposure and rewarming enhanced spatial memory and activated the MAPK cascades in the rat brain. *Brain research* 1239, 171-180.
- Zhou, J., Ando, H., Macova, M., Dou, J., and Saavedra, J.M. (2005).** Angiotensin II AT1 receptor blockade abolishes brain microvascular inflammation and heat shock protein responses in hypertensive rats. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 25, 878-886.
- Zhou, J., Pavel, J., Macova, M., Yu, Z.X., Imboden, H., Ge, L., Nishioku, T., Dou, J., Delgiacco, E., and Saavedra, J.M. (2006).** AT1 receptor blockade regulates the local angiotensin II system in cerebral microvessels from spontaneously hypertensive rats. *Stroke* 37, 1271-1276.
- Zhuo, J., Moeller, I., Jenkins, T., Chai, S.Y., Allen, A.M., Ohishi, M., and Mendelsohn, F.A. (1998).** Mapping tissue angiotensin-converting enzyme and angiotensin AT1, AT2 and AT4 receptors. *Journal of hypertension* 16, 2027-2037.
- Zonta, M., Angulo, M.C., Gobbo, S., Rosengarten, B., Hossmann, K.A., Pozzan, T., and Carmignoto, G. (2003a).** Neuron-to-astrocyte signaling is central to the dynamic control of brain microcirculation. *Nature neuroscience* 6, 43-50.
- Zonta, M., Sebelin, A., Gobbo, S., Fellin, T., Pozzan, T., and Carmignoto, G. (2003b).** Glutamate-mediated cytosolic calcium oscillations regulate a pulsatile prostaglandin release from cultured rat astrocytes. *The Journal of physiology* 553, 407-414.

*“No debemos olvidar que cuando se descubrió el Radio nadie sabía que sería útil en los hospitales. El trabajo era de ciencia pura. Esta es una prueba de que el trabajo científico no debe ser considerado desde el punto de vista de la utilidad directa. Debe hacerse por sí mismo, por la belleza de la ciencia, y recién entonces porque existe la posibilidad de que un descubrimiento científico se convierta en un beneficio para la humanidad”*

**Marie Curie (1921)**

