



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS- DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA**  
**INSTITUTO DE FARMACOLOGÍA EXPERIMENTAL DE CÓRDOBA (IFEC-CONICET)**

TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**ROL DE LOS RECEPTORES AT<sub>1</sub> EN ALTERACIONES CONDUCTUALES,  
NEUROQUÍMICAS, GLIALES Y VASCULARES INDUCIDAS POR  
ANFETAMINA COMO MODELO ANIMAL DE ESQUIZOFRENIA**

**OSVALDO MARTIN BASMADJIAN**

Bioquímico y Farmacéutico

DIRECTORA: DRA. CLAUDIA BREGONZIO

**Córdoba, Argentina**

**2020**

# Índice

<b>Índice</b>	<b>2</b>
<b>Abreviaturas</b>	<b>6</b>
<b>Índice de figuras</b>	<b>7</b>
<b>Índice de tablas</b>	<b>9</b>
<b>Resumen</b>	<b>10</b>
<b>Abstract</b>	<b>11</b>
<b>Introducción</b>	<b>12</b>
Enfermedades neuropsiquiátricas: un problema de la salud universal en continuo crecimiento	12
Esquizofrenia	12
Esquizofrenia y vulnerabilidad genética	13
Esquizofrenia como enfermedad del neurodesarrollo	14
Esquizofrenia y alteraciones neuroquímicas	15
Esquizofrenia y neuroinflamación	16
Esquizofrenia y alteraciones vasculares	17
Abordaje terapéutico de la esquizofrenia	18
Modelos animales de esquizofrenia	19
Anfetaminas	19
Anfetamina: efectos agudos en los sistemas catecolaminérgicos	20
Anfetamina: efectos a largo plazo	21
Anfetamina: memoria de trabajo y corteza prefrontal	22
Anfetamina: estrés oxidativo, alteraciones gliales y vasculares	22
Sistema renina-angiotensina	25
Generalidades	25
Sistema renina-angiotensina y sensibilización a amfetamina	27
Modulación de la función glial por el sistema renina-angiotensina	28
Sistema renina-angiotensina y dinámica de la estructura microvascular	29
<b>Hipótesis y Objetivos</b>	<b>30</b>
Hipótesis	30
Objetivo general	30
	2

Objetivos específicos	30
Objetivo 1	30
Objetivo 2	31
Objetivo 3	31
<b>Materiales y métodos</b>	<b>32</b>
Animales	32
Drogas y reactivos	32
Diseño experimental	33
Protocolo experimental 1	33
Protocolo experimental 2	33
Protocolo experimental 3	34
Protocolo experimental 4	35
Protocolo experimental 5	35
Toma de muestras	36
Perfusión	36
Fijación por inmersión y preparación de las muestras para el análisis de la autofluorescencia del colorante Azul de Evans	36
Inmunohistoquímica	37
Inmunomarcación de Proteína Acídica Fibrilar Glial	37
Inmunomarcación de la integrina CD11b	37
Inmunomarcación del gen de expresión temprana c-FOS	38
Obtención y análisis de imágenes	38
Análisis de la microarquitectura vascular por inmunohistoquímica del factor de von Willebrand	38
Análisis de la reactividad astrocitaria	40
Análisis de la reactividad microglial	40
Análisis de la actividad neuronal	40
Análisis de la microarquitectura vascular por medio de la autofluorescencia del colorante Azul de Evans	40
Análisis de la cinética de recaptación de dopamina	41
Estrés oxidativo	42
Peroxidación lipídica	43
Cuantificación de los productos proteicos de oxidación avanzados	43
Test conductuales	43
	3

Actividad locomotora	43
Interacción social	44
Memoria de trabajo: laberinto en Y elevado	45
Memoria a corto plazo: test de reconocimiento de objetos nuevos	45
Análisis estadístico	46
<b>Resultados</b>	<b>47</b>
Los receptores AT <sub>1</sub> participan en el desarrollo de la sensibilización conductual a anfetamina	47
Los receptores AT <sub>1</sub> participan en el mantenimiento de la sensibilización conductual a anfetamina	49
La interacción social no es afectada por la exposición a anfetamina o por el bloqueo de los R-AT <sub>1</sub>	51
La memoria a corto plazo no es afectada por la exposición a anfetamina o por el bloqueo de los R-AT <sub>1</sub>	52
Los R-AT <sub>1</sub> participan en el desarrollo de la alteración de la memoria de trabajo inducida por anfetamina	53
Los R-AT <sub>1</sub> participan en el mantenimiento de la alteración de la memoria de trabajo inducida por anfetamina	55
Los R-AT <sub>1</sub> participan en el mantenimiento de la sensibilización neuroquímica inducida por anfetamina	56
El antagonismo de los R-AT <sub>1</sub> induce un incremento transiente de la velocidad de recaptación de dopamina estriatal	58
Los R-AT <sub>1</sub> participan en la gliosis cortical inducida por anfetamina	61
El antagonismo de los R-AT <sub>1</sub> previene el estrés oxidativo inducido por anfetamina	66
Los R-AT <sub>1</sub> participan en los cambios angioplásticos corticales inducidos por anfetamina	70
El antagonismo de los R-AT <sub>1</sub> induce capilarización en la corteza prefrontal prelímbica	74
<b>Discusión</b>	<b>79</b>
La exposición repetida a anfetamina como modelo animal de esquizofrenia	79
Sensibilización a anfetamina y su reversión con aripiprazol	79
Anfetamina y deterioro cognitivo	80
Anfetamina e interacción social	81
Rol de los R-AT <sub>1</sub> de angiotensina II en la sensibilización conductual y neuroquímica a anfetamina	81
Receptores AT <sub>1</sub> y desarrollo de sensibilización a anfetamina	81
Receptores AT <sub>1</sub> y mantenimiento de sensibilización a anfetamina	83
Rol de los receptores AT <sub>1</sub> en el deterioro de la memoria de trabajo inducido por anfetamina	83
Sensibilización a anfetamina: cambios neuroplásticos en corteza prefrontal y receptores AT <sub>1</sub>	84
Rol de los receptores AT <sub>1</sub> en la reactividad glial y estrés oxidativo inducidos por anfetamina	84
Rol de los R-AT <sub>1</sub> en los cambios angioplásticos corticales inducidos por anfetamina	85
El antagonismo de los R-AT <sub>1</sub> induce capilarización en la corteza prefrontal	88

**Conclusiones**

**90**

**Bibliografía**

**91**

# Abreviaturas

AE:	alternaciones espontáneas
ANF:	anfetamina
ANG:	angiotensina
ARBs:	antagonistas de R-AT <sub>1</sub>
ARI:	aripiprazol
CAND:	candesartan
CPu:	caudado Putamen
CxM:	corteza motora
CxPF:	corteza prefrontal
CxPF-PL:	corteza prefrontal prelímbica
CxPF-IL:	corteza prefrontal infralímbica
DA:	dopamina
DEM:	desviación estándar de la media
ECA:	enzima convertidora de angiotensina
EQF:	esquizofrenia
GFAP:	proteína ácida fibrilar glial
HIF-1:	factor inducible por hipoxia 1
IP:	índice de preferencia
i.p.:	vía intraperitoneal
FvW:	factor de von Willebrand
MAS:	receptor de ensamblaje mitocondrial
MDA:	malondialdehído
NOX:	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa
NAcc:	núcleo Accumbens
PPOA:	productos proteicos de oxidación avanzados
R-AT <sub>1</sub> :	receptores AT <sub>1</sub>
SAL:	solución salina (fisiológica)
SRA:	sistema renina-angiotensina
VEGF:	factor de crecimiento endotelial vascular
VTA:	área tegmental ventral
U/I:	unidades internacionales

# Índice de figuras

Figura 1 - Neurotoxicidad y alteraciones gliales inducidas por anfetamina	23
Figura 2 - Vías de biosíntesis de angiotensinas	26
Figura 3 - Protocolo experimental 1	33
Figura 4 - Protocolo experimental 2	34
Figura 5 - Protocolo experimental 3	34
Figura 6 - Protocolo experimental 4	35
Figura 7 - Protocolo experimental 5	36
Figura 8 - Representación del análisis vascular a través de la inmunomarcación de von Willebrand	39
Figura 9 - Representación del análisis de la reactividad glial	40
Figura 10 - Test de actividad locomotora	44
Figura 11 - Test de interacción social	44
Figura 12 - Test de laberinto en Y elevado	45
Figura 13 - Imagen representativa del test de reconocimiento de objetos nuevos	46
Figura 14 - Los R-AT <sub>1</sub> participan en el desarrollo de sensibilización a ANF	48
Figura 15 - Los R-AT <sub>1</sub> participan en el mantenimiento de sensibilización a ANF	50
Figura 16 - La interacción social no es afectada por la exposición a ANF o por el bloqueo de los R-AT <sub>1</sub>	52
Figura 17 - La memoria a corto plazo no es afectada por la exposición a ANF o por el bloqueo de los R-AT <sub>1</sub>	53
Figura 18 - Los R-AT <sub>1</sub> participan en el desarrollo de la alteración de la memoria de trabajo inducida por ANF	54
Figura 19 - Los R-AT <sub>1</sub> participan en el mantenimiento de la alteración de la memoria de trabajo por ANF	56
Figura 20 - Los R-AT <sub>1</sub> participan en el mantenimiento de la sensibilización neuroquímica a anfetamina	58
Figura 21 - El antagonismo de los R-AT <sub>1</sub> incrementa la velocidad de recaptación de dopamina estriatal	59
Figura 22 - Los R-AT <sub>1</sub> participan en la gliosis cortical inducida por ANF	62
Figura 23 - Inmunohistoquímica de GFAP en CxPF-PL	63
Figura 24 - Inmunohistoquímica de CD11b en CxPF-PL	63
Figura 25 - ANF no induce cambios en la expresión de GFAP y CD11b en CPu y NAcc	65
Figura 26 - El antagonismo de los R-AT <sub>1</sub> previene el estrés oxidativo inducido por ANF en CxPF y CPu	67
Figura 27 - El antagonismo de los R-AT <sub>1</sub> previene el estrés oxidativo inducido por ANF en CxM e HPC	68

Figura 28 - Cuantificación del área y diámetro vascular en CxPF-PL e IL	71
Figura 29 - Cuantificación de los puntos de ramificación y el índice de tortuosidad en CxPF-PL e IL	72
Figura 30 - Inmunohistoquímica de von Willebrand en CxPF-IL	72
Figura 31 - CAND disminuye el diámetro vascular en CxPF-PL	74
Figura 32 - Autofluorescencia de Azul de Evans en CxPF-PL	75
Figura 33 - CAND no induce cambios en el área y diámetro vascular en CxPF-IL	75
Figura 34 - CAND induce capilarización en CxPF-PL	77
Figura 35 - Esquema teóricos de los cambios angioplásticos inducidos por ANF	87



# Índice de tablas

Tabla 1 - Los R-AT <sub>1</sub> participan en el desarrollo de sensibilización a ANF	48
Tabla 2 - Los R-AT <sub>1</sub> participan en el mantenimiento de la sensibilización a ANF	51
Tabla 3 - La interacción social no es afectada por la exposición a ANF o por el bloqueo de los R-AT <sub>1</sub>	52
Tabla 4 - La memoria a corto plazo no es afectada por la exposición a ANF o por el bloqueo de los R-AT <sub>1</sub>	53
Tabla 5 - Los R-AT <sub>1</sub> participan en el desarrollo de la alteración de la memoria de trabajo inducida por ANF	55
Tabla 6 - Los R-AT <sub>1</sub> participan en el mantenimiento de la Alt. de la memoria de trabajo inducida por ANF	56
Tabla 7 - Los R-AT <sub>1</sub> participan en el mantenimiento de la sensibilización neuroquímica inducida por ANF	57
Tabla 8 - El antagonismo de los R-AT <sub>1</sub> incrementa la velocidad de recaptación de dopamina estriatal	60
Tabla 9 - Los R-AT <sub>1</sub> participan en la gliosis cortical inducida por ANF	64
Tabla 10 - ANF no induce cambios en la expresión de GFAP y CD11b en CPu y NAcc	65
Tabla 11 - El antagonismo de los R-AT <sub>1</sub> previene el estrés oxidativo inducido por ANF en CxPF y CPu	68
Tabla 12 - El antagonismo de los R-AT <sub>1</sub> previene el estrés oxidativo inducido por ANF en CxM e HPC	69
Tabla 13 - Cuantificación del área y diámetro vascular en CxPF-PL e IL	71
Tabla 14 - Cuantificación de los puntos de ramificación y el índice de tortuosidad en CxPF-PL e IL	73
Tabla 15 - CAND reduce el diámetro vascular en la CxPF-PL	76
Tabla 16 - CAND induce capilarización en la CxPF-PL	78

# Resumen

La esquizofrenia es un desorden psiquiátrico crónico, desencadenado por la ocurrencia e interacción de una amplia variedad de factores de riesgo como alteraciones de diversos genes, infecciones prenatales, malnutrición materna y consumo de drogas. En este sentido, el consumo de dosis elevadas de psicoestimulantes, como la *d*-anfetamina, puede inducir estados de psicosis paranoide en individuos no esquizofrénicos y gatillar estos síntomas en individuos esquizofrénicos tras su consumo en dosis bajas. De forma similar a lo observado en la esquizofrenia, el consumo de anfetaminas se asocia frecuentemente con alteraciones en diversos dominios de la memoria, como la memoria de trabajo y de corto plazo. Dada la similitud en las alteraciones comportamentales inducidas por el consumo de anfetamina y la esquizofrenia, como así también con otros fenómenos neurobiológicos asociados a esta patología como la hiperreactividad dopaminérgica, alteraciones gliales y vasculares; la exposición a anfetamina en animales es utilizada como modelo preclínico de esquizofrenia.

A partir de su ubicuidad en el parénquima cerebral, el sistema renina-angiotensina cerebral regula un gran número de funciones cerebrales. Angiotensina II, el principal péptido activo de este sistema, modula la actividad neuronal, glial y vascular; en gran medida a partir de su unión a los receptores AT<sub>1</sub>. La activación de estos receptores altera la neurotransmisión dopaminérgica, noradrenérgica, e induce efectos neuroinflamatorios y tróficos sobre la glia y la vasculatura cerebral. Dado que estos fenómenos son eventos claves para la generación de efectos deletéreos inducidos por anfetamina, el presente trabajo tuvo como objetivo evaluar el rol de los receptores AT<sub>1</sub> en las alteraciones conductuales, gliales y vasculares relacionadas con la exposición repetida a anfetamina y de relevancia en el estudio de la esquizofrenia.

Los resultados obtenidos indican que los receptores AT<sub>1</sub> participan en el desarrollo y mantenimiento de la sensibilización conductual y neuroquímica a anfetamina. A su vez, el antagonismo de estos receptores incrementó la recaptación de dopamina en Caudado Putamen, un área cerebral clave para la generación de sensibilización. A su vez, se observó que los receptores AT<sub>1</sub> participan en el desarrollo y mantenimiento del déficit de la memoria de trabajo inducido por la exposición a anfetamina. En línea con estos hallazgos, se observó que estos receptores participan en la generación de estrés oxidativo, astrogliosis y microgliosis inducidos por anfetamina en la corteza prefrontal prelímbica, la cuál es un área cerebral fundamental para la generación de la memoria de trabajo. El antagonismo de estos receptores indujo también fenómenos de capilarización sobre la corteza prefrontal prelímbica.

Los resultados obtenidos evidencian un rol clave de los receptores AT<sub>1</sub> en el desarrollo y mantenimiento de cambios neuroplásticos inducidos por la exposición repetida a anfetamina que conducen a la sensibilización y al deterioro de la memoria de trabajo. Estos receptores participan también en la inducción de alteraciones gliales y vasculares en la corteza prefrontal inducidas por anfetamina.

# Abstract

Schizophrenia is a chronic psychiatric disorder triggered by the interaction of a wide range of risk factors such as genetic alterations, prenatal infections, maternal malnutrition and drug use. Indeed, high-dose psychostimulants exposure, such as d-amphetamine, can induce a state of paranoid psychosis in non-schizophrenic individuals and trigger these symptoms in schizophrenic individuals after low-dose exposures. As schizophrenia, amphetamine exposure is generally associated with deleterious effects on a variety of memory domains, such as working memory and short-term memory. Similarities in behavioral alterations between schizophrenia and amphetamine exposure, as well as other neurobiological phenomena such as dopaminergic hyperresponsiveness, glial and vascular alterations, make amphetamine exposure a useful preclinical model of schizophrenia.

The brain renin-angiotensin system regulates a wide range of brain functions. Angiotensin II, the main peptide of the system, modulates neuronal, glial and vascular activity; mainly due to its binding to AT<sub>1</sub> receptors. These receptors modulate dopaminergic and noradrenergic neurotransmission and induce neuroinflammatory and trophic effects on the glia and cerebral vasculature. Due to these phenomena are key events for the induction of the deleterious effects of amphetamines, the present work aimed to evaluate the role of AT<sub>1</sub> receptors in behavioral, glial and vascular alterations induced by repeated exposure to amphetamines that are relevant to the study of schizophrenia.

The results showed that AT<sub>1</sub> receptors are involved in the development and maintenance of amphetamine-induced behavioral and neurochemical sensitization. Furthermore, its antagonism increased dopamine reuptake in Caudate Putamen, a brain area deeply involved amphetamines sensitization. Moreover, we observed that these receptors are involved in the development and maintenance of working memory deficit induced by amphetamine. In line with these findings, we observed that AT<sub>1</sub> receptors are involved in amphetamine-induced oxidative stress, astrogliosis, and microgliosis in the prefrontal cortex, which is a brain area deeply involved with working memory performance. Antagonism of these receptors also induced capillarization in the prefrontal cortex.

The results of the present work show a key role of AT<sub>1</sub> receptors in the development and maintenance of neuroplastic changes induced by repetitive amphetamine exposure that induce sensitization and working memory deficits. In addition, these results suggest that AT<sub>1</sub> receptors are involved in amphetamine-induced glial and vascular alterations in the prefrontal cortex.

# 1

## Introducción

### 1 Enfermedades neuropsiquiátricas: un problema de la salud universal en continuo crecimiento

La salud de los individuos se determina por tres dimensiones, altamente entrelazadas e interdependientes, que incluyen el bienestar físico, mental y social. Sin embargo, en la mayor parte del mundo los desórdenes mentales son pobremente abordados, siendo largamente ignorados o negados <sup>1</sup>. Como resultado, existe un marcado incremento de la carga de trastornos mentales desde 1990, el cual se estima que seguirá en aumento los próximos años <sup>1</sup>.

Las consecuencias de las enfermedades neuropsiquiátricas se diseminan en todas las dimensiones de la vida del paciente. Este flagelo impacta en forma directa en la calidad de vida del enfermo a través de un gran número de síntomas e indirecta debido a la generación de desempleo, exclusión y estigma. Estas enfermedades afectan a una gran parte de la población, estimándose que alrededor del 25% de la población adulta sufre en algún momento de la vida uno o más trastornos psiquiátricos <sup>1</sup>.

Los trastornos mentales ocurren como resultado de procesos complejos que involucran la interacción de numerosos factores genéticos y ambientales. En consecuencia, la etiopatología de la mayoría de estas enfermedades es pobremente entendida y las herramientas farmacológicas actualmente disponibles alivian sólo algunos síntomas <sup>2,3</sup>.

### 2 Esquizofrenia

La esquizofrenia (ESQ) es un desorden psiquiátrico crónico, de larga duración y altamente debilitante. Se desencadena como consecuencia de una amplia gama de factores de riesgo que interactuarían tempranamente en el desarrollo, la niñez y la adolescencia para finalmente generar la expresión de los síntomas psicóticos en la edad adulta <sup>4,5</sup>. Esta patología comprende un amplio espectro de manifestaciones clínicas y biológicas, cuyos síntomas cardinales incluyen una profunda distorsión en el pensamiento, la percepción, las emociones, el lenguaje y el comportamiento. Es una enfermedad con una elevada prevalencia que afecta alrededor de 20 millones de personas a nivel mundial <sup>6</sup>.

La sintomatología de la enfermedad se agrupa en 4 grandes clústeres, que incluyen los síntomas positivos, negativos, alteraciones neurocognitivas y déficits en la cognición social. Las alucinaciones y delirios forman parte del clúster de síntomas positivos, mientras que la anhedonia, amotivación, asociabilidad, aplanamiento afectivo son algunos de los síntomas negativos. A su vez, esta patología se asocia con síntomas que afectan múltiples dominios cognitivos, alterando frecuentemente la memoria de trabajo, la memoria episódica y la función ejecutiva entre otras. Los déficits en la cognición social incluyen la alteración en el entendimiento e interpretación de gestos, expresiones faciales así como otros mecanismos verbales y no verbales de comunicación <sup>5</sup>.

La sintomatología de la ESQ es ampliamente variable, pudiendo manifestarse con predominio de síntomas positivos, negativos o una sintomatología mixta con diferentes matices entre los pacientes que la padecen. Este trastorno es generalmente diagnosticado en la adultez temprana con el advenimiento del primer episodio psicótico franco (alucinaciones y/o delirios). El periodo prodrómico ocurre durante la adolescencia y la niñez, con síntomas positivos generalmente ausentes pero con síntomas negativos y cognitivos prominentes. Luego del primer episodio psicótico, la remisión de la enfermedad es rara y la mayoría de los pacientes padece episodios psicóticos fluctuantes junto con síntomas negativos y cognitivos persistentes <sup>5</sup>.

Los intrincados patrones etiopatológicos y sintomatológicos asociados a la ESQ, hacen a esta patología un enigma no totalmente dilucidado hasta el presente. De hecho, más de 100 años después de su primera descripción por Kraepelin y otros psiquiatras, no existe actualmente una teoría que pueda explicar la totalidad de sus características fisiopatológicas y sus consiguientes síntomas. En este sentido, la ESQ sería resultado de la interacción a lo largo del neurodesarrollo de múltiples factores genéticos y ambientales, que finalmente desencadenarían el desbalance de numerosos sistemas de neurotransmisión, llevando a la expresión de los síntomas de la ESQ.

## **1 Esquizofrenia y vulnerabilidad genética**

La valoración de la contribución genética a partir de estudios realizados en familias, hermanos gemelos y adoptados muestra una alta heredabilidad de la ESQ <sup>7</sup>. En este sentido, se han reportado tasas de heredabilidad de alrededor del 80% en gemelos idénticos <sup>8</sup>. A pesar de estos hallazgos, los diversos estudios de asociación genética arrojan resultados dispares, observándose asociación con la ESQ en la mayoría de los 23 pares de cromosomas y una poca reproducibilidad de la localización de los genes de interés hallados <sup>7</sup>. Más aún, es frecuente la falta de asociación entre genes candidatos y la localización cromosomal de regiones de interés <sup>7</sup>. Esta falta de replicabilidad puede deberse a diferentes causas como un tamaño de muestra inadecuado, heterogeneidad genética, sesgos del reclutamiento y otros, pero puede también indicar que la vulnerabilidad genética para el desarrollo de la ESQ no surge de la presencia de variaciones de unos cuantos genes, sino de efectos aditivos o sinérgicos entre clusters específicos de genes <sup>7</sup>.

## 2 Esquizofrenia como enfermedad del neurodesarrollo

El modelo del neurodesarrollo postula que la expresión de la sintomatología de la ESQ sería la consecuencia final de múltiples anomalías en el neurodesarrollo. Las mismas ocurrirían tanto en etapas gestacionales, como durante la niñez y adolescencia <sup>9</sup>. Esta serie de eventos fisiopatológicos daría lugar a una génesis alterada de espinas dendríticas durante la gestación, junto con una excesiva apoptosis neuronal y poda sináptica durante la adolescencia, lo que finalmente llevaría a la pérdida de conectividad cerebral y sus consecuentes síntomas psicóticos al inicio de la edad adulta <sup>7,9</sup>. La ESQ se asocia con anomalías en el neurodesarrollo en numerosas áreas cerebrales, siendo la corteza prefrontal dorsolateral, el neocórtex y la formación hipocámpica, las más consistentemente implicadas en la fisiopatología, tanto en estudios post-mortem como de neuroimagen <sup>9,10</sup>. De esta forma, el desarrollo de la ESQ se ha vinculado con alargamiento ventricular, reducción del volumen cerebral (asociado a pérdida de elementos no neuronales), cambios en el grosor cortical, girificación, déficits en la migración neuronal y signos de pérdida de la conectividad neuronal entre otros <sup>7</sup>.

Numerosos factores de riesgo prenatales y perinatales inducirían alteraciones en el neurodesarrollo predisponentes de ESQ, sobre todo cuando estos factores se presentan durante el primer trimestre de embarazo. Entre ellos, se encuentran las **infecciones prenatales** como influenza, toxoplasmosis, virus del herpes simple tipo 2, rubéola y una variedad de infecciones bacterianas <sup>9,11</sup>. Entre otras observaciones epidemiológicas que sustentan esta hipótesis, se ha observado un incremento en las tasas de diagnóstico por ESQ en individuos in útero al momento de la pandemia por influenza en 1918 (gripe española) <sup>12</sup>. A su vez, se ha reportado que los hijos de madres con altos niveles de inmunoglobulinas contra el *Toxoplasma gondii* tienen un mayor riesgo de sufrir ESQ, así como los infantes que poseen niveles detectables de estos anticuerpos <sup>13,14</sup>. Teniendo en cuenta la diversidad en la etiología infecciosa, el riesgo de sufrir ESQ probablemente se relacione con alteraciones ligadas a la activación inmune y no con mecanismos patogénicos específicos de cada microorganismo. En relación con el punto anterior, la **estación del año** en que se produce el nacimiento incidiría en el riesgo de sufrir ESQ, ya que aquellos que nacen en invierno o a principios de la primavera presentan un mayor riesgo (observación que se asocia con la presencia de infecciones maternas) <sup>15</sup>. A partir de estudios epidemiológicos luego de hambrunas en diversas poblaciones, se ha determinado que la **malnutrición materna** se asocia con un riesgo incrementado de sufrir ESQ. En línea con esta aseveración, se ha observado que aquellos hijos nacidos durante la hambruna holandesa inducida por el bloqueo nazi de 1944 tenían un riesgo dos veces mayor de sufrir ESQ <sup>10</sup>. Este resultado se ha replicado en otras poblaciones como en el caso hambrunas en poblaciones chinas <sup>10</sup>. El **estrés psicosocial** sufrido por madres que cursan el primer trimestre de embarazo aumentaría el riesgo de sufrir ESQ. En este sentido, se ha reportado que eventos como la muerte o el diagnóstico de una enfermedad grave de un familiar incrementa el riesgo de sufrir la patología en el hijo en gestación <sup>16</sup>. Una amplia gama de **complicaciones obstétricas** aumentarían el riesgo de sufrir ESQ, siendo algunos ejemplos el bajo peso al nacer, la preeclampsia, la hipoxia perinatal y la incompatibilidad rhesus <sup>15</sup>.

Durante la niñez, se han propuesto varios factores de riesgo que podrían alterar el neurodesarrollo y que posteriormente incrementarían el riesgo de sufrir enfermedades neuropsiquiátricas como la ESQ. En este sentido, se ha observado un mayor riesgo de sufrir la patología en niños expuestos a **estresores psicosociales**

como pérdidas parentales, interacciones materno-infantiles atípicas y abuso sexual <sup>15</sup>. También se ha sugerido que factores de riesgo físicos como **traumatismos craneales** podrían aumentar el riesgo de sufrir ESQ en la adultez <sup>15</sup>.

Durante la adolescencia y la adultez, existen numerosos factores que inciden en el desarrollo de ESQ entre individuos de alto riesgo. El **consumo de drogas** como los psicoestimulantes (se detalla más adelante en el apartado de anfetaminas) y el cannabis son unos de los factores de riesgo asociados. Así, numerosos estudios reportan que la intoxicación por **cannabis** gatilla la aparición de episodios agudos de psicosis y empeora los síntomas de individuos esquizofrénicos <sup>17-20</sup>. Se ha observado una asociación entre el desarrollo de ESQ y la **migración** con incrementos de hasta 7 veces en el riesgo de sufrir ESQ y/o otros desórdenes psicóticos <sup>15</sup>. Aquellos individuos que viven en áreas urbanas poseen mayor riesgo de padecer ESQ, con riesgos asociados a la **urbanicidad** de entre 35 a 70% mayor al comparar áreas densamente pobladas de aquellas con menor densidad <sup>15</sup>. En este sentido, se han propuesto numerosos factores de riesgo intermediarios que explicarían esta asociación como la exposición a tóxicos, infecciones, clase social y aglomeración de la población. El riesgo de sufrir ESQ se ha asociado también a **eventos sociales adversos** como el aislamiento, el desempleo y otros, siendo en estos casos difícil discernir si estos factores serían parte de las causas de la enfermedad o bien ocurrirían como consecuencia de la misma <sup>15</sup>.

### 3 Esquizofrenia y alteraciones neuroquímicas

La fisiopatología de la ESQ ha sido asociada con alteraciones en numerosos sistemas de neurotransmisión. Entre ellos, el desbalance dopaminérgico es la hipótesis más ampliamente aceptada <sup>21</sup>. Entre las numerosas observaciones que sustentan esta hipótesis, se destaca el hecho de que todas las drogas antipsicóticas comúnmente utilizadas modulan los receptores dopaminérgicos D<sub>2</sub> (ya sea en forma de antagonistas o de agonistas parciales) <sup>7</sup>. A su vez, se observa una correlación lineal entre las concentraciones terapéuticas necesarias y la afinidad del fármaco por el receptor D<sub>2</sub> <sup>22</sup>. A este respecto, se ha reportado que se ejerce un efecto terapéutico al alcanzar un antagonismo de entre el 60 a 80% de los receptores D<sub>2</sub> <sup>22</sup>. En línea con estos resultados, estudios de tomografía muestran una hiperdopaminergia estriatal, junto con una mayor ocupación de los receptores D<sub>2</sub> estriatales de pacientes esquizofrénicos, siendo sus niveles un predictor de la eficacia de los antipsicóticos para el control de los síntomas positivos <sup>23,24</sup>. A su vez, existiría también un aumento en la densidad de receptores D<sub>2</sub> a nivel estriatal <sup>21</sup>. Otra línea de evidencias que sustenta la teoría dopaminérgica de la ESQ es la presencia de alucinaciones y delirios en individuos no esquizofrénicos tras el consumo de psicoestimulantes como la anfetamina (ANF), como así también la precipitación de estos síntomas en individuos esquizofrénicos tras el consumo de dosis subsicotogénicas de estas drogas <sup>25</sup>. A diferencia de la hiperdopaminergia mesolímbica, estudios de tomografía de emisión de positrones indican una menor liberación de dopamina en la corteza prefrontal de pacientes esquizofrénicos, que se corresponde con un desempeño alterado de la memoria de trabajo <sup>26</sup>. En su conjunto, estos hallazgos son conceptualizados en la hipótesis dopaminérgica de la ESQ, la cual sugiere que los síntomas negativos y cognitivos ocurren como consecuencia de una actividad dopaminérgica anormalmente baja de la corteza prefrontal, lo que induce una excesiva actividad dopaminérgica mesolímbica responsable de los síntomas positivos <sup>27</sup>.

La hipótesis dopaminérgica es complementada con las hipótesis que proponen cambios en la neurotransmisión serotoninérgica y glutamatérgica. Así, la hipótesis serotoninérgica sostiene que el antagonismo de los receptores 5-HT<sub>2A</sub> de los antipsicóticos atípicos reduciría la inhibición serotoninérgica de la vía dopaminérgica mesocortical, contribuyendo por lo tanto en el restablecimiento de la hipodopaminergia mesocortical y la subsiguiente hiperdopaminergia mesolímbica <sup>28</sup>. Por otro lado, la teoría glutamatérgica sostiene que existiría una disminución de la neurotransmisión glutamatérgica (junto con un aumento compensatorio de la expresión de receptores NMDA), que contribuiría a la hipodopaminergia mesocortical y aumentaría la liberación de dopamina a nivel mesolímbico a través de la desinhibición indirecta mediada por interneuronas colinérgicas <sup>28</sup>.

#### 4 Esquizofrenia y neuroinflamación

Si bien no se considera a la ESQ una enfermedad neurodegenerativa, las diferentes etapas fisiopatológicas que conducen a su desarrollo se encuentran atravesadas transversalmente por fenómenos neuroinflamatorios. Teniendo en cuenta que variaciones en el **complejo mayor de histocompatibilidad** han sido consistentemente asociados con una alta contribución a la susceptibilidad de sufrir ESQ, parte de la vulnerabilidad genética a esta patología derivaría de variaciones en genes relacionados a la respuesta inmune <sup>29-32</sup>. A su vez, se ha reportado la asociación entre **niveles elevados de citoquinas proinflamatorias en mujeres gestantes** y el riesgo de sufrir ESQ <sup>11</sup>. Estos eventos inflamatorios, junto con las injurias tempranas descritas en el apartado anterior, imprimirían marcas duraderas en la microglía y otras células del sistema inmune, induciendo los altos niveles de citoquinas proinflamatorias, proteína C reactiva y productos de degradación de sustancias inflamatorias reportados en sangre, líquido cefalorraquídeo y tejido cerebral de pacientes esquizofrénicos <sup>33-36</sup>. Esta hiperactividad inmune durante el neurodesarrollo contribuiría al menor desarrollo de espinas dendríticas y aumentaría la **diferenciación de progenitores mesencefálicos en neuronas dopaminérgicas**, promoviendo algunas de las características fisiopatológicas de la ESQ, como la disrupción de la conectividad cortical y la hiperdopaminergia <sup>37,38</sup>. A su vez, la activación prolongada del sistema inmune puede alterar la homeostasis de serotonina y glutamato, a través de la **disminución de la supervivencia de neuronas serotoninérgicas (IL-6)** <sup>39</sup>, o bien por la activación de la enzima indolamina 2,3-dioxigenasa que incrementa los niveles de **ácido quinurénico** (antagonista parcial de receptores NMDA endógeno) <sup>37</sup>. A su vez, se ha reportado que los pacientes esquizofrénicos no medicados muestran un patrón incrementado de citoquinas como IL-6 e IL-10, junto con bajos niveles de interferón-gamma e IL-2, por lo que se ha postulado que en la ESQ existiría un **desbalance entre las respuestas inmunitarias tipo 1 y 2** <sup>40</sup>. Las citoquinas IL-1 $\beta$ , IL-6 y TGF- $\beta$  podrían ser marcadores de exacerbaciones agudas, ya que se ha observado un incremento de sus niveles durante crisis psicóticas que luego retornan a valores normales con el tratamiento antipsicótico <sup>41</sup>. Por otro lado, se ha observado un efecto beneficioso de los **antiinflamatorios no esteroideos** en el tratamiento de síntomas cognitivos, positivos y negativos de la ESQ, donde su mayor utilidad radicaría en la utilización en etapas tempranas luego del diagnóstico de la ESQ <sup>42-46</sup>. Es sabido desde hace tiempo que el tratamiento con **antipsicóticos** induce efectos antiinflamatorios e inmunomoduladores, reduciendo los niveles de citoquinas proinflamatorias como IL-1 $\beta$  e interferón-gamma <sup>37,47</sup>.



Las alteraciones en los niveles de citoquinas arriba mencionados, se acompañan con cambios morfológicos y funcionales en componentes del sistema inmune cerebral. A este respecto, los hallazgos sobre las alteraciones microgliales son más consistentes que los reportados los cambios astrogliales. El meta-análisis realizado por van Kesteren y colaboradores en cerebros postmortem, muestra un **incremento en la densidad microglial** en cerebros de pacientes esquizofrénicos, sobre todo en la corteza temporal <sup>48</sup>. Estos cambios morfológicos se asociaron con incrementos en transcritos y niveles de proteínas de citoquinas proinflamatorias. Por el contrario, estos autores no observaron cambios en la densidad de la macroglia (astrocitos y oligodendrocitos) <sup>48</sup>. A su vez, otro meta-análisis realizado por Reis Marques y colaboradores, observó un **aumento de la activación microglial** en pacientes esquizofrénicos en estudios de tomografía por emisión de positrones <sup>49</sup>. Al analizar la expresión de múltiples genes, en un meta-análisis realizado por Bergon y colaboradores, se observó una **regulación a la baja del receptor de citoquinas CX3CR1** en pacientes esquizofrénicos, el cual en el cerebro se encuentra expresado fundamentalmente en las células de la microglia <sup>50</sup>. La asociación entre astrogliosis y ESQ parece ser menos evidente que la relacionada a la microgliosis, obteniéndose resultados inconsistentes entre los diversos estudios. En este sentido, estudios iniciales reportan signos de **astrogliosis regional**, usualmente asociados con la severidad y evolución de la ESQ <sup>51,52</sup>. A su vez, Arnold y colaboradores reportaron la presencia de astrogliosis sólo en un subgrupo de pacientes con alta prevalencia de deterioros cognitivos severos <sup>53</sup>. Por el contrario, estudios ulteriores reportaron una morfología astrogliar normal en pacientes esquizofrénicos <sup>54-57</sup>, o incluso reportaron una disminución de marcadores astrogliales en pacientes esquizofrénicos <sup>58-62</sup>. Por el contrario, al analizar los perfiles de expresión de proteínas astrocitarias los diferentes estudios muestran resultados consistentes, reportando un **aumento en la expresión de la proteína astrocitaria S100B** en pacientes esquizofrénicos cuyos niveles no se modifican luego del tratamiento <sup>63-65</sup>. En línea con estos resultados, un meta-análisis realizado por Plitman y colaboradores reportó que los pacientes esquizofrénicos poseían **elevados niveles de ácido quinurénico**, el cual es un metabolito principalmente de los astrocitos <sup>66</sup>.

## 5 Esquizofrenia y alteraciones vasculares

La amplia superficie de intercambio generada por la red microvascular, garantiza la provisión continua de oxígeno y nutrientes a todos los tejidos. A pesar de que el cerebro compone sólo un 2% de la masa corporal, su actividad demanda alrededor del 20% del total de energía disponible en estado de reposo, requiriendo aproximadamente del 17% del total del flujo sanguíneo <sup>67</sup>. A su vez, el flujo sanguíneo cerebral se encuentra altamente coordinado con la actividad neuronal, aumentando su magnitud frente a una mayor actividad cerebral en un proceso denominado hiperemia <sup>68,69</sup>. Esta coordinación ocurre gracias a cambios inmediatos en el tono vascular, así como adaptaciones graduales de la morfología microvascular. En este sentido, mientras que la estructura de los grandes vasos se encuentra genéticamente determinada; el número, la longitud y la configuración geométrica de los microvasos emerge como consecuencia de la angioadaptación a las necesidades tisulares (principalmente sus niveles de oxigenación). Este proceso ocurre mediante la generación de nuevos vasos (angiogénesis) o la poda vascular (rarefacción) <sup>70,71</sup>. Luego de la vida embrionaria, la angiogénesis ocurre fundamentalmente a través de la formación de brotes en vasos preexistentes que proliferan dentro de la matriz

extracelular (sprouting), o bien a través de la división de vasos primarios por medio de la formación de pilares internos (intususcepción) <sup>72</sup>.

En pacientes esquizofrénicos se ha reportado en forma consistente alteraciones hemodinámicas regionales a nivel cerebral <sup>73,74</sup>. Los síntomas negativos y cognitivos se asocian generalmente con hipoperfusión de las cortezas frontales, cingulada y temporal superior <sup>74,75</sup>, mientras que los síntomas positivos se asocian con hiperperfusión de áreas tales como el giro temporal, cingulado y superior frontal y en algunas subáreas del hipocampo <sup>74,76</sup>. Mucho menos concluyente son las alteraciones a nivel microvascular halladas en pacientes esquizofrénicos. Se ha reportado alteraciones de la microarquitectura frontocortical incluyendo una angioarquitectura excesivamente simplificada (reducción de la arborización de microvasos) y alteraciones ultraestructurales como deformación de la lámina basal de los capilares y vacuolización de células endoteliales <sup>77</sup>. Por otro lado, estudios realizados por Kreczmanski y colaboradores reportan resultados contrastantes con los anteriores, al no observar diferencias en numerosos parámetros de la microarquitectura vascular en regiones corticales (corteza prefrontal y corteza cingulada anterior) y subcorticales (putamen, caudado, núcleo accumbens entre otros) <sup>78,79</sup>.

## 6 Abordaje terapéutico de la esquizofrenia

El carácter multifactorial de la ESQ y su heterogeneidad sintomatológica hacen que no exista un tratamiento único en todos los casos <sup>22</sup>. El abordaje terapéutico se basa en la asociación entre fármacos neurolépticos (también llamados antipsicóticos) y la terapia psicosocial. La terapia farmacológica actualmente disponible es parcialmente efectiva para el tratamiento de los síntomas positivos, observándose alrededor de un 20 a 30% de pacientes refractarios <sup>80,81</sup>. El resto de los clusters de síntomas son pobremente abordados por estos fármacos. A su vez, muchos de estos fármacos pueden alterar el desempeño mnemotécnico de los pacientes, debido al antagonismo de receptores dopaminérgicos, muscarínicos, histaminérgicos y adrenérgicos <sup>5</sup>. Los efectos terapéuticos de los fármacos antipsicóticos derivan en gran medida de su antagonismo sobre los receptores dopaminérgicos D<sub>2</sub> <sup>82</sup>. En este sentido, se ha observado una relación directamente proporcional entre la afinidad de estos fármacos por los receptores D<sub>2</sub> y la concentración plasmática o en líquido cefalorraquídeo necesaria para alcanzar efectos terapéuticos <sup>22</sup>. La amplia gama de drogas antipsicóticas disponible, es tradicionalmente clasificada dentro de dos grandes grupos: los antipsicóticos típicos y atípicos. Esta diferenciación se cimienta en el perfil de reacciones adversas, donde los antipsicóticos típicos tienen una mayor tendencia a generar reacciones extrapiramidales (disonías agudas, acatisia, parkinsonismo y discinesia tardía) y los atípicos tienden a generar mayores alteraciones metabólicas asociadas con aumento de peso y diabetes tipo 2 <sup>25,82</sup>. Por otro lado, no existen grandes diferencias en torno a la eficacia entre ambos grupos, aunque el antipsicótico atípico clozapina muestra una mayor eficacia en el control de ESQ resistente al tratamiento <sup>25,83</sup>. A su vez, la baja adhesión al tratamiento, repercute negativamente en la eficacia parcial de estos fármacos. A este respecto, el análisis de la tasa de adhesión al tratamiento antipsicótico en un gran estudio multicéntrico, mostró que entre el 64 al 82% de los pacientes descontinuaron el tratamiento crónico con estos fármacos <sup>25</sup>.

## 7 Modelos animales de esquizofrenia

Los modelos se entienden como representaciones simples de sistemas complejos. Los modelos animales intentan representar uno o más aspectos de procesos patológicos observados en humanos, para intentar reducir la brecha entre la investigación básica y la clínica <sup>84</sup>. Se han propuesto numerosos criterios para validar los modelos animales, destacándose por su simplicidad y amplia aceptación la validez de constructo, similitud y predicción postulados por Willner <sup>85</sup>. La **validez de constructo** ocurre cuando el modelo posee una causa etiológica conceptualmente relacionada con el origen del desorden humano. La **validez de similitud** ocurre cuando el modelo exhibe un fenotipo conceptualmente análogo al de los síntomas humanos. La **validez de predicción** se logra cuando el fenotipo del modelo responde al tratamiento clásico utilizado en humanos (éxito de la predicción que se formula en base al modelo).

Dada la multiplicidad de factores de riesgo asociados a la ESQ, su heterogeneidad sintomatológica y de tratamiento; su estudio en modelos animales puede abordarse a partir de la introducción de diversas causas etiológicas (según los factores de riesgo) y de esa forma obtener distintos fenotipos y capacidades de predicción en los modelos. A partir de la limitación que supone modelar una enfermedad psiquiátrica en animales, sólo algunos de los síntomas de la ESQ pueden ser modelados, entre los que se encuentran: síntomas positivos (actividad locomotora y estereotipía), anhedonia (preferencia a la sucrosa), asociabilidad (test de interacción social), memoria y atención (inhibición latente, Y-maze, reconocimiento de objetos, etc), flexibilidad cognitiva, déficit sensoriomotor (inhibición por prepulso) y comportamiento símil-ansioso (laberinto en cruz elevado, etc) <sup>86</sup>. En base al factor introducido, los modelos animales de ESQ se clasifican en modelos genéticos, del desarrollo e inducido por drogas. Los modelos genéticos se basan en animales transgénicos con modificaciones en genes candidatos de ESQ como DISC 1, NRG1, disbindina y la delección en el cromosoma 22q11.2. <sup>86</sup>. Los modelos del neurodesarrollo introducen manipulaciones ambientales similares a los factores de riesgo pre y perinatales asociados a la ESQ, como aislamiento maternal durante la gestación e inducción de la activación inmunitaria materna <sup>86</sup>. Los modelos inducidos por drogas se generan por la exposición de los animales a estimulantes dopaminérgicos (ANF y apomorfin) o a antagonistas del receptor NMDA (PCP y ketamina); utilizándose también, aunque con menor frecuencia, los moduladores serotoninérgicos como LSD y psicocibina <sup>82,86</sup>. **A través de la exposición a ANF, se modela la sensibilización comportamental, el deterioro sensoriomotor y las alteraciones cognitivas; observándose la reversión de algunos de estos fenotipos con la administración de antipsicóticos, por lo que estos modelos animales de ESQ poseen validez de similitud y predicción para los síntomas positivos y cognitivos** <sup>82,87-91</sup>.

## 3 Anfetaminas

Las anfetaminas son sustancias psicoactivas que poseen propiedades estimulantes, eufóricas, anoréxicas y alucinógenas. Estas sustancias pueden ser obtenidas de fuentes naturales o a través de procesos de síntesis. A este respecto, las anfetaminas de origen natural más ampliamente utilizadas incluyen la catinona y la efedrina <sup>92</sup>. A su vez, las sustituciones sintéticas en la molécula  $\beta$ -feniletilamina generan diferentes derivados anfetamínicos,

con diferentes propiedades farmacológicas. La estructura común a todas las anfetaminas es un núcleo de  $\beta$ -feniletilamina, que se compone de una cadena alifática de dos carbonos ( $\alpha$  y  $\beta$ ) y una amina terminal unida a anillo aromático. Las sustituciones, tanto en el anillo aromático como en la cadena alifática, generan una enorme variedad de anfetaminas. A este respecto, los derivados que presentan sustituciones en el anillo aromático tienen efectos estimulantes débiles junto con efectos alucinógenos en algunos casos. Por otro lado, las sustituciones en la cadena alifática generan anfetaminas con potentes efectos estimulantes y anorexígenos <sup>92</sup>. Este es el caso de la *d*-ANF, la cual posee una sustitución por un grupo  $\alpha$ -metilo en la cadena alifática, lo que incrementa su capacidad de atravesar barreras biológicas y previene su degradación por la monoaminoxidasa (MAO, su principal enzima metabolizadora) <sup>92</sup>. Dada la similitud estructural con las catecolaminas, la *d*-ANF altera su recaptación, almacenamiento y metabolismo; induciendo un gran incremento del tono dopaminérgico y noradrenérgico <sup>93</sup>. Este intensivo incremento de monoaminas, gatilla los efectos psicoestimulantes de *d*-ANF, así como muchos de sus efectos deletéreos.

## **1 Anfetamina: efectos agudos en los sistemas catecolaminérgicos**

La similitud estructural con las catecolaminas, le permite a ANF actuar como falso sustrato de proteínas relacionadas con la homeostasis de monoaminas. Por lo tanto, este psicoestimulante altera su recaptación, almacenamiento y catabolismo. Luego de su liberación; dopamina, noradrenalina y serotonina son recicladas gracias a su ingreso a la terminal presináptica por medio de sus correspondientes transportadores de monoaminas. Posteriormente, estos neurotransmisores son almacenados en vesículas o catabolizados principalmente por la MAO. La ANF es reconocida por los transportadores de catecolaminas, lo que desencadena su influjo a la terminal sináptica, con la consecuente inhibición competitiva de la recaptación de monoaminas. Existen notorias diferencias entre la sensibilidad de los diferentes transportadores a la inhibición de ANF, como así también entre los enantiómeros del psicoestimulante. En este sentido, *d*-ANF es considerado un inhibidor moderadamente potente del transportador de noradrenalina ( $K_i = 40 - 50$  nM), un inhibidor débil del transportador de dopamina (DAT) ( $K_i \cong 100$  nM) y un inhibidor muy débil del transportador de serotonina ( $K_i = 1400 - 3800$  nM) <sup>93</sup>. Por otro lado, *l*-ANF es un inhibidor 1.8 veces menos potente del transportador de noradrenalina, 3 a 7 veces menos potente del DAT y la potencia de inhibición del transportador de serotonina es tan baja que no es considerado un inhibidor de la recaptación de serotonina <sup>93</sup>. Una vez dentro del terminal presináptico, ANF compite con el transportador vesicular de monoaminas <sup>2</sup> y con la MAO, lo que reduce el almacenamiento y catabolización de las catecolaminas, aumentando sus niveles intracitoplasmáticos. Como resultado de ambos procesos, el gradiente de monoaminas se ve alterado, lo que revierte la dirección de transporte de los recaptadores y aumenta la liberación de las catecolaminas a la hendidura sináptica <sup>94</sup>. A su vez, ANF reduce la recaptación de noradrenalina y dopamina, al inducir la internalización de sus transportadores <sup>94,95</sup>. Como consecuencia de todos los efectos descritos, ANF induce un extensivo incremento del tono dopaminérgico, noradrenérgico y serotoninérgico. Los efectos descritos se detallan en la figura 1.

## 2 Anfetamina: efectos a largo plazo

La exposición a ANF en roedores induce un incremento progresivo y duradero en la respuesta locomotora a la droga, ante una nueva exposición al psicoestimulante. Este fenómeno, conocido como sensibilización conductual, ocurre a consecuencia de cambios neuroadaptativos en el sistema dopaminérgico en dos fases temporal y anatómicamente distintas, denominadas iniciación y expresión. La iniciación es un proceso transiente, que comprende el incremento en la neurotransmisión dopaminérgica y glutamatérgica en el área tegmental ventral (VTA). Para que este proceso ocurra, es necesaria una adecuada función de la corteza prefrontal (CxPF), ya que las lesiones en esta área cerebral o en las proyecciones mesocorticales previenen la inducción de la sensibilización <sup>96-98</sup>. La expresión ocurre luego de la reexposición a la droga, como una respuesta exacerbada al psicoestimulante. Este es un fenómeno duradero, que involucra el circuito de la motivación y las proyecciones de VTA, siendo claves áreas cerebral como el caudado putamen (CPu) y el núcleo accumbens (NAcc) <sup>99,100</sup>. Por otro lado, la CxPF y VTA no intervendrían en la expresión de la sensibilización <sup>101</sup>. A consecuencia del incremento de la neurotransmisión dopaminérgica mesolímbica se produce sensibilización conductual, que se evidencia como hiperlocomoción y aumento de la autoadministración de la droga <sup>93,102</sup>.

Teniendo en cuenta que la administración crónica de ANF en humanos recrea los síntomas agudos de la psicosis paranoide y que dosis subsicotogénicas pueden gatillar un estado psicótico en pacientes esquizofrénicos, se postula que la sensibilización comparte ciertos mecanismos neurobiológicos subyacentes con la psicosis paranoide y la drogadicción <sup>101,103</sup>. A su vez, se ha reportado que la exposición a ANF puede inducir anhedonia y alteraciones en la interacción social, dos de los síntomas negativos observados en pacientes esquizofrénicos <sup>104-107</sup>.

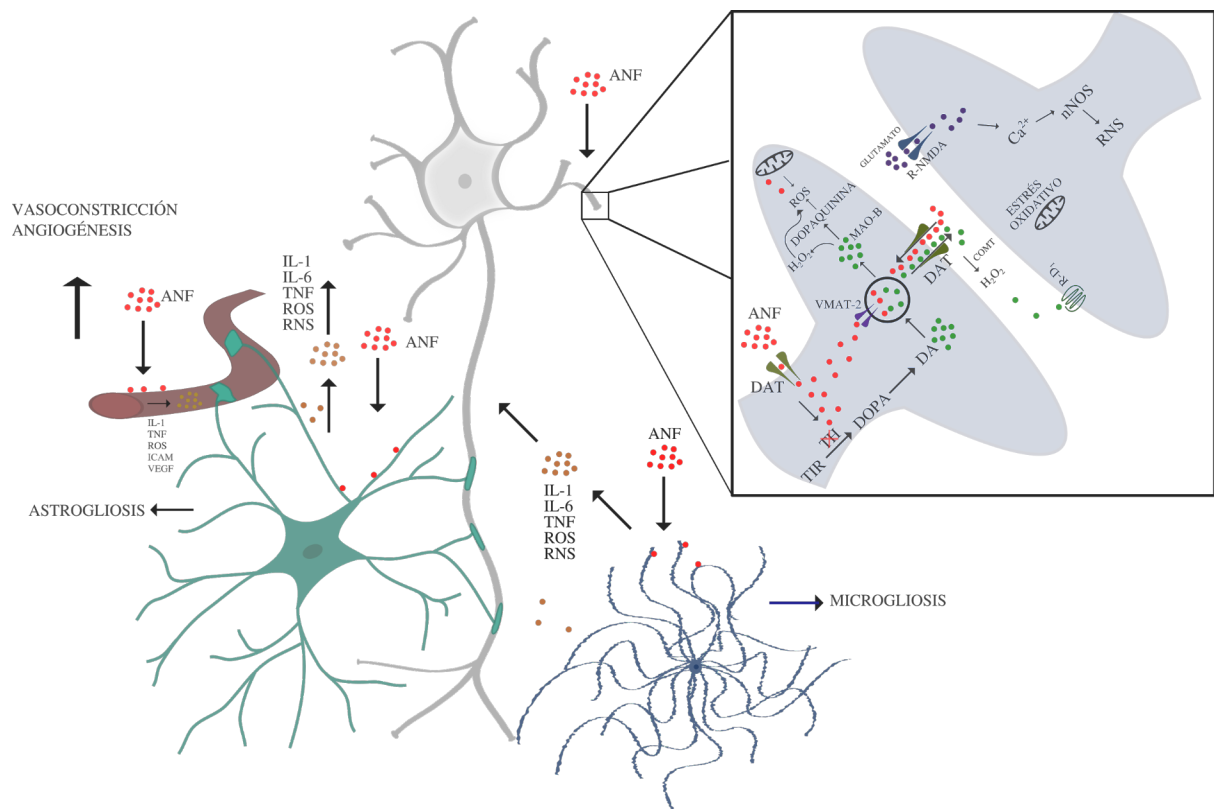
La vasta mayoría de las investigaciones en sensibilización a ANF, se han focalizado en los mecanismos biológicos que desencadenan el desarrollo y expresión de la sensibilización <sup>103</sup>. A este respecto, la neurotransmisión dopaminérgica y glutamatérgica juegan un rol clave en ambos procesos. El desarrollo de la sensibilización ocurre como consecuencia de la excesiva activación de receptores D<sub>1</sub> dopaminérgicos (R-D<sub>1</sub>) y NMDA glutamatérgicos, mientras que la expresión es desencadenada por el aumento en la función de receptores D<sub>2</sub> dopaminérgicos (R-D<sub>2</sub>) y AMPA glutamatérgicos <sup>108-112</sup>. Por el contrario, la reversión de la sensibilización a psicoestimulantes es un fenómeno exigüamente estudiado. Los reportes existentes en la literatura sugieren que los agonistas dopaminérgicos y los moduladores serotoninérgicos revierten dicho proceso, mientras que los antagonistas de receptores D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub> (R-D<sub>1</sub> y R-D<sub>2</sub>) serían inefectivos <sup>103</sup>. De esta forma, se ha reportado que los antagonistas de R-D<sub>2</sub>, como el antipsicóticos típicos haloperidol y los antipsicóticos atípicos sulpirida y risperidona, no son efectivos para revertir la sensibilización a psicoestimulantes <sup>90,113</sup>; mientras que si se ha observado reversión de la sensibilización con antagonistas de los receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>3</sub> y los inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina <sup>103</sup>.

### **3 Anfetamina: memoria de trabajo y corteza prefrontal**

La ANF junto al metilfenidato son actualmente los tratamientos más comúnmente utilizados para tratar los trastornos cognitivos del síndrome de déficit de atención con hiperactividad [114](#). La mejora en funciones cognitivas inducidas por estos estimulantes se produciría, al menos en parte, debido al aumento agudo de los niveles dopaminérgicos en la CxPF [114](#). Por el contrario, con el uso continuado a dosis altas, como sucede en la drogadicción, se observan alteraciones en numerosos dominios cognitivos, tanto en animales como en humanos. En este sentido, se ha reportado que la exposición a ANF en monos rhesus, en dosis suficientes para generar sensibilización, induce deterioro a largo plazo en la adquisición de memoria de trabajo, a corto plazo y a largo plazo en varias tareas cognitivas [115](#). A su vez, este deterioro fue asociado con una disminución del recambio de dopamina en CxPF y estriado. Similarmente, numerosos estudios reportan la asociación entre el consumo de metanfetamina en humanos y el deterioro de múltiples dominios cognitivos evaluados durante el periodo de abstinencia, como la memoria de trabajo, la atención y funciones ejecutivas entre otras [116-119](#). La alteración de estas funciones cognitivas inducida por ANF, ocurriría como consecuencia de cambios neuroadaptativos e injurias inflamatorias y neurotóxicas en múltiples áreas cerebrales, donde la CxPF ocupa un rol clave. Existe una relación bidireccional entre la CxPF y VTA, ya que la CxPF recibe inervación dopaminérgica de VTA y envía proyecciones glutamatérgicas a esta área. La dopamina liberada en CxPF actúa de manera directa sobre células piramidales o indirecta por modulación gabaérgica local [120,121](#). Estas características topológicas sustentan su rol funcional en el desarrollo de sensibilización a psicoestimulantes [122](#). Las neuroadaptaciones inducidas por ANF, promueven hiperreactividad mesolímbica e hipoactividad cortical. La hipoactividad cortical explicaría el déficit cognitivo que se evidencia como déficit atencional, de la memoria de trabajo y otras funciones durante la abstinencia [105](#). La actividad catecolaminérgica cumple un rol preponderante sobre la memoria de trabajo, dado que una actividad moderada de catecolaminas en CxPF es necesaria para el funcionamiento óptimo de la misma; mientras que una hipofunción o un exceso de dopamina y noradrenalina, serían responsables de una disfunción cortical y un déficit en la memoria de trabajo [114,123,124](#).

### **4 Anfetamina: estrés oxidativo, alteraciones gliales y vasculares**

La exposición a ANF induce alteraciones duraderas en todos los componentes de la unidad neurovascular, alterando el funcionamiento de neuronas, células gliales y vasos sanguíneos. En consecuencia, se induce un inadecuado acoplamiento entre la actividad neuronal y transporte de nutrientes [92,125-129](#). Las diferentes alteraciones inducidas por ANF se esquematizan en la figura 1.



**Figura 1. Neurotoxicidad y alteraciones gliales inducidas por anfetamina.** Se esquematiza algunas de las alteraciones neuronales y gliales inducidas por anfetamina. ANF: anfetamina, DAT: transportador de dopamina, R-D1: receptor de dopamina 1, R-NMDA: receptor de glutamato tipo NMDA, ROS: radicales libres del oxígeno, RNS: radicales libres del nitrógeno, TH: tirosina hidroxilasa, TIR: tirosina.

La neurotoxicidad y activación glial inducidas por ANF, ocurren a consecuencia de múltiples mecanismos entre los cuales el estrés oxidativo y la excitotoxicidad ejercen un rol fundamental <sup>130</sup>. El estrés oxidativo inducido por ANF, ocurre principalmente debido al incremento en la producción de radicales libres del oxígeno (ROS) y del nitrógeno, los cuales oxidan y alteran el funcionamiento de numerosos componentes celulares como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. Teniendo en cuenta que las mitocondrias son la principal fuente de ROS, el incremento de su funcionamiento es una de las principales vías por las cuales ANF promueve la generación de estrés oxidativo <sup>130,131</sup>. Otra posible vía de generación de ROS incluye la oxidación de DA mediada por la MAO o bien la autooxidación que producen peróxido de hidrógeno y anión superóxido, que reaccionan posteriormente con iones metálicos y óxido nítrico, generando radicales hidroxilo y peroxinitrito. A su vez, ANF promueve la producción de radicales libres del nitrógeno, estimulando el influjo de  $Ca^{2+}$  y la actividad de la óxido nítrico sintetasa <sup>132</sup>.

Al promover neurotoxicidad a través del daño oxidativo y desbalance dopaminérgico, ANF induce la activación microglial. A través de sus procesos móviles, estas células del sistema inmune se encuentran continuamente monitoreando el parénquima cerebral en búsqueda de señales de alarma. Así, ante la liberación de citoquinas, las células microgliales se activan y retraen sus procesos, transformándose en una forma ameboide, para luego migrar activamente al sitio de injuria cerebral e intentar resolver el daño tisular <sup>133</sup>. Esta actividad centinela de la microglia, permite que la microgliosis sea considerada como un marcador de injuria cerebral <sup>134</sup>. A su vez, una

excesiva activación de estas células puede contribuir en la generación de algunos de los efectos neurotóxicos inducidos por ANF, como la degeneración de terminales dopaminérgicas <sup>134,135</sup>.

Típicamente, la activación microglial precede a la activación astrogial <sup>134</sup>. Los astrocitos son el tipo celular más abundantes del sistema nervioso de mamíferos superiores y se encuentran en íntimo contacto con neuronas y vasos sanguíneos, desarrollando funciones cruciales para su normal funcionamiento. De forma similar a las células microgliales, los astrocitos liberan una variedad de citoquinas proinflamatorias y quimiocinas, que participan en los procesos neuroinflamatorios y neurotóxicos inducidos por ANF <sup>136</sup>. Al activarse, los astrocitos exhiben un fenotipo caracterizado por el engrosamiento de sus somas y sus finos procesos, gracias a la up regulación de varios filamentos de su citoesqueleto, entre los cuales el más estudiado es la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) <sup>137</sup>. Los astrocitos reactivos pueden cumplir funciones neuroprotectoras, o bien contribuir a el esparcimiento del daño neuronal. Estas células ejercen su rol neuroprotector mediante el aclaramiento del glutamato extracelular y los radicales libres, mientras que en base a el esparcimiento de iones y metabolitos nocivos por medio de sus uniones intercelulares, los astrocitos pueden extender el daño neuroinflamatorio <sup>137</sup>.

Los efectos proinflamatorios inducidos por ANF se extienden incluso a la microvasculatura cerebral. En este sentido, 24 horas después de la exposición a ANF se observa un incremento en la expresión de marcadores proinflamatorios, proteínas de choque de calor y estrés oxidativo en la vasculatura asociada a meninges de roedores <sup>138</sup>. En línea con estos hallazgos, resultados previos de nuestro laboratorio muestran que la exposición a ANF induce una respuesta inflamatoria sensibilizada en la microvasculatura cerebral, luego de 7 días de abstinencia a la droga. Así, ante la reexposición al psicoestimulante se observa un incremento exacerbado del estrés oxidativo y de la expresión de la proteína de golpe de calor 70 <sup>139</sup>. A su vez, estas alteraciones proinflamatorias vasculares, se asociaron con cambios regionales en la microarquitectura vascular. Luego de 7 días de abstinencia a la droga se observó angiogénesis, acompañado por una reducción de los puntos de ramificación y aumento de la tortuosidad, en los microvasos de la CxPF-PL y corteza somatosensorial de barril, mientras que ninguno de estas alteraciones se observaron en el HPC y la amígdala basolateral <sup>139</sup>.

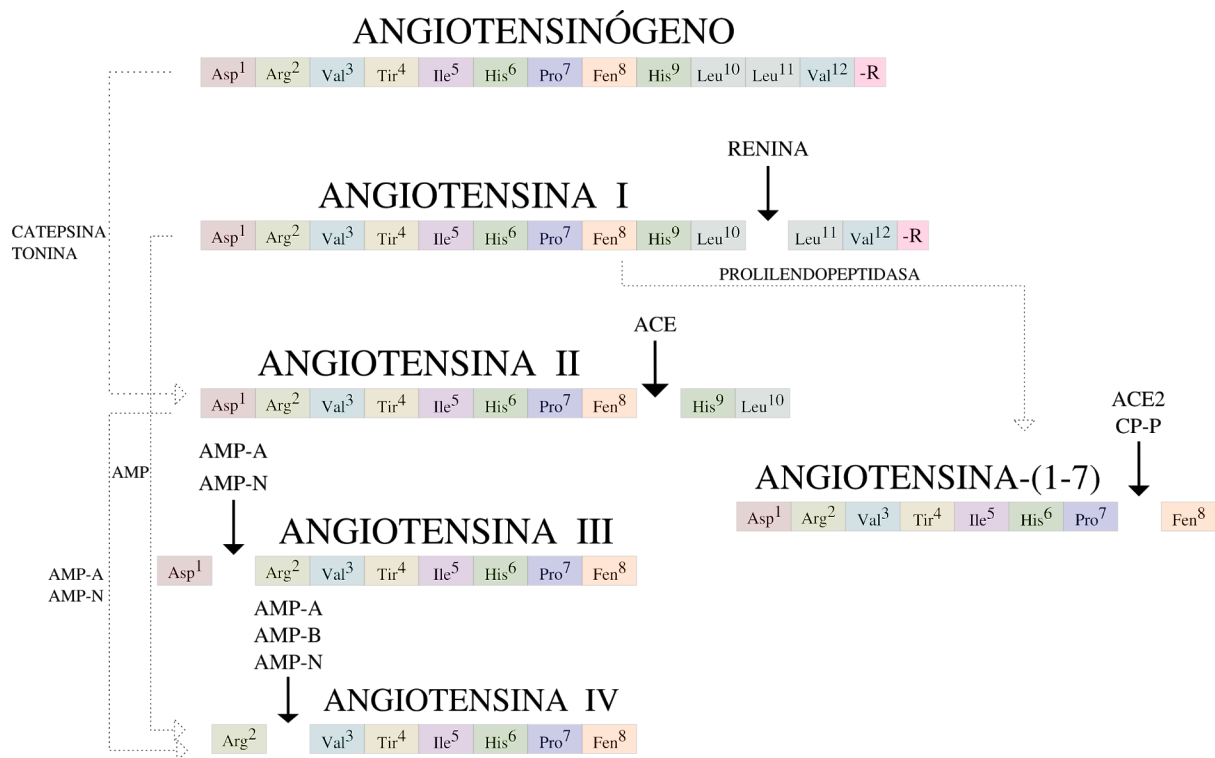
Estudios en roedores muestran que tras la exposición a ANF se generan patrones regionales específicos de activación glial. En este sentido, en aquellas áreas donde se encuentran los cuerpos neuronales dopaminérgicos, se observa una baja sensibilidad a la activación glial inducida por ANF, mientras que aquellas áreas que poseen terminales dopaminérgicas parecen ser más vulnerables al psicoestimulante. De esta forma, a diferencia de VTA y sustancia nigra, en áreas límbicas como CxPF, CPu, hipocampo (HPC) y amígdala es común la inducción de reactividad glial tras la exposición a ANF <sup>134</sup>. A su vez, se ha descrito un patrón de sensibilidad regional diferencial entre los roedores. En ratones, el CPu e HPC se encuentran frecuentemente alterados, mientras que estas áreas presentan una baja sensibilidad en ratas, siendo más común la reactividad glial en áreas cerebrales tales como la corteza parietal y el tálamo <sup>134</sup>. En línea con estas observaciones, resultados previos de nuestro laboratorio muestran que luego de 7 días de la última exposición a ANF, se observa reactividad microglial y astrogial en CxPF y corteza motora (CxM), sin cambios en áreas tales como el HPC y la amígdala <sup>125,139</sup>.



## 4 Sistema renina-angiotensina

### 1 Generalidades

El sistema renina-angiotensina (SRA) es una familia de péptidos bioactivos que se generan por medio de clivajes enzimáticos sucesivos. Sus descripciones iniciales se remontan a 1898 cuando Tigerstedt y Bergman describen la función presora de una proteína de la corteza renal, a la que denominaron renina <sup>140</sup>. En la década de 1930, Braun-Menéndez junto con otros miembros del Instituto de Fisiología de la Universidad de Buenos Aires liderado por Houssay, aislaron la sustancia responsable de la hipertensión renal, al estimular su producción por isquemia renal y llamaron a dicha sustancia hipertensiva. Propusieron también que la hipertensiva (que posteriormente se la denominó angiotensina II), se generaría por una reacción enzima-sustrato con la renina, hipotetizando la presencia de una sustancia precursora a la que llamaron hipertensinógeno (angiotensinógeno) <sup>141,142</sup>. Años más tarde, se describe al SRA como un sistema humoral periférico encargado de la regulación de la homeostasis de la resistencia vascular periférica, así como el volumen y la composición electrolítica de los fluidos corporales <sup>143</sup>. En este modelo endócrino inicial, el angiotensinógeno (péptido de origen hepático) es clivado a nivel yuxtaglomerular por la renina, para dar lugar a la angiotensina I. Este péptido inactivo es subsecuentemente clivado por la enzima convertidora de angiotensina (ECA), generando angiotensina II (ANG II). La ECA es una enzima localizada preferentemente en las células endoteliales. En la actualidad, es sabido que este sistema endócrino coexiste con un SRA parácrino, donde todos sus componentes están presentes en una variedad de tejidos tales como el cerebro, riñón, glándulas suprarrenales, vasos sanguíneos, corazón y órganos reproductivos <sup>144</sup>. En este sentido, se ha descrito SRA locales e independientes en numerosas áreas cerebrales como el hipocampo, amígdala, tálamo, hipotálamo y ganglios basales entre otros <sup>145-147</sup>. ANG II es considerado el principal péptido activo del sistema y ejerce sus funciones a través de sus receptores de tipo 1 y 2 (R-AT<sub>1</sub> y R-AT<sub>2</sub>). El clivaje de ANG II a través de la aminopeptidasa A, da lugar a el heptapéptido ANG III que activa los mismos receptores que su péptido precursor. Posteriormente ANG III, sufre la acción de la aminopeptidasa N dando lugar a ANG IV, la cual ejerce sus efectos uniéndose al receptor AT<sub>4</sub>. A su vez, ANG II puede ser catabolizada en forma alternativa por acción de la ECA II, lo que genera ANG-(1-7), que se une a los receptores de ensamblaje mitocondrial (MAS). Además de la cascada enzimática descrita, existen vías alternativas de formación de los diversos péptidos del RAS que se grafican en la figura 2 <sup>146</sup>.



**Figura 2. Vías de biosíntesis de angiotensinas.** Las líneas continuas indican vías clásicas, mientras que las punteadas indican vías alternativas (AMP: aminopeptidasa, CP: carboxipeptidasa).

En el cerebro, el **angiotensinógeno** es producido en gran parte por los astrocitos. A su vez existe síntesis neuronal, la cual se restringe a ciertas áreas cerebrales como el núcleo supraóptico y paraventricular <sup>148,149</sup>. Sin bien inicialmente se habían detectado muy bajos niveles de **renina** cerebrales, actualmente es sabido que esta enzima existe en el cerebro en forma tanto intra como extracelular, secretándose esta última en forma inactiva o activa (prorenina y renina respectivamente) <sup>150,151</sup>. Se ha descrito extensamente la presencia de **ACE** cerebral, la cual se encuentra en forma soluble o unida a membranas y su actividad se ha asociado con la catálisis de ANG I y de otros péptidos como bradicinina <sup>150,151</sup>. A su vez, ANG II puede producirse por vías enzimáticas alternativas a través de la catálisis por elastasa, proteinasa 3, catepsina G y tonina <sup>151</sup>. Se ha reportado también la presencia de un SRA completo en microvasos cerebrales, donde sus efectos se relacionan fundamentalmente con respuestas inflamatorias y vasoactivas <sup>152</sup>.

Los R-AT<sub>1</sub> se encuentran en múltiples áreas cerebrales, incluyendo los órganos circunventriculares (órgano subfornical y órgano vascular de la lámina terminal), regiones del rombencéfalo (núcleo del tracto solitario y médula ventrolateral caudal), hipotálamo, amígdala, hipocampo y corteza cerebral <sup>146,150</sup>. Esta ubicuidad anatómica, permite que la ANG II, a través de los R-AT<sub>1</sub>, ejerza funciones regulatorias sobre un gran número de funciones cerebrales, como la presión arterial y homeostasis de fluidos, temperatura corporal, respuesta al estrés, consumo de alcohol y cognición entre otras <sup>153-159</sup>. Se ha reportado la expresión de R-AT<sub>1</sub> en neuronas, células endoteliales, astrocitos y microglia. Su síntesis se ve estimulada bajo condiciones inflamatorias, lo que a su vez puede desencadenar la astrogliosis, microgliosis y efectos vasocontráctiles y proliferativos sobre la microvasculatura cerebral <sup>152,160-164</sup>.

Los R-AT<sub>2</sub> se encuentran fundamentalmente en tejidos fetales, observándose un decaimiento de su expresión luego del nacimiento. Si bien los ratones knockout para R-AT<sub>2</sub> se desarrollan normalmente, en ellos se observa una respuesta vasopresora a ANG II aumentada y alteraciones motoras <sup>165,166</sup>. La función de estos receptores en la etapa adulta no se encuentra totalmente dilucidada, observándose funciones opuestas a los R-AT<sub>1</sub> en aquellos tejidos en los que se expresan, así como funciones en el crecimiento y la diferenciación celular, el dolor neuropático y la regeneración axonal <sup>167-170</sup>.

Actualmente, la modulación farmacológica del SRA se utiliza para tratar la hipertensión, mediante los inhibidores de la ECA (IECA) y los antagonistas de R-AT<sub>1</sub> (ARBs). Al inhibir a la ECA, los IECA disminuyen la acción de Ang II limitando la conversión de ANG I en ANG II. Sin embargo, estos compuestos no son capaces de prevenir la formación de Ang II mediante vías enzimáticas alternativas e independientes de la actividad de la ECA, como la degradación producida por catepsina G y tonina. Considerando que la ECA participa en la degradación de múltiples péptidos, su inhibición puede aumentar los niveles de bradicinina y otros péptidos, lo que se ha relacionado con varios de los efectos adversos asociados a los IECA <sup>171</sup>. Los ARBs son antagonistas competitivos de alta afinidad por el R-AT<sub>1</sub> y si bien su unión es competitiva, la mayoría produce un bloqueo sostenido incluso con altos niveles de Ang II. Esta característica se debe a varios mecanismos que incluyen internalización, disociación lenta y uniones sucesivas al receptor <sup>172,173</sup>. Estos efectos permiten que los ARBs produzcan un potente y prolongado antagonismo de los efectos biológicos de la ANG II, sin disminuir la presión arterial en pacientes normotensos y con baja frecuencia de efectos adversos. En este sentido, la terapia con ARBs tiene una buena tolerabilidad (similar al placebo) y alta adherencia al tratamiento (mejor que los IECA) <sup>174-176</sup>.

## 2 Sistema renina-angiotensina y sensibilización a anfetamina

Dado el rol fundamental que ejerce la neurotransmisión dopaminérgica en la sensibilización a ANF, aquellas sustancias que modulan el sistema dopaminérgico tienen la potencialidad de estar implicadas en el desarrollo de sensibilización. Existen numerosas evidencias que denotan una relación ontogénica, anatómica y funcional entre el sistema dopaminérgico y el SRA. En este sentido, durante el período embrionario ANG II promueve la diferenciación de precursores mesencefálicos en células dopaminérgicas <sup>177</sup>. A su vez, existe una elevada expresión de R-AT<sub>1</sub> en los cuerpos neuronales dopaminérgicos de la sustancia nigra pars compacta <sup>178</sup>. Las áreas cerebrales con inervación dopaminérgica, como el caso de CPu, también presentan una alta expresión de R-AT<sub>1</sub>, los cuales modulan positivamente la síntesis y liberación tónica y evocada de DA <sup>179-181</sup>. En CPu de roedores, se ha observado también la presencia de heterodímeros formados R-AT<sub>1</sub> y R-D<sub>2</sub>, en donde el antagonismo de los R-AT<sub>1</sub> con ARBs induce la modulación de la función de los R-D<sub>2</sub> <sup>182</sup>. A su vez, se ha reportado una relación dinámica entre estos dos sistemas de neurotransmisión, donde la depleción dopaminérgica induce una regulación al alza de R-AT<sub>1</sub>, que se restablece cuando se alcanzan niveles normales de dopamina <sup>183</sup>.

En línea con las interacciones entre el sistema dopaminérgico y angiotensinérgico arriba descritas, estudios previos de nuestro laboratorio muestran que los R-AT<sub>1</sub> juegan un rol importante en los cambios

neuroadaptativos inducidos por ANF. En un protocolo de sensibilización a ANF de una única exposición a la droga, observamos que ANF induce hiperreactividad neuronal en CPu y NAcc a través de los R-AT<sub>1</sub> <sup>127</sup>. Se observó también que ANF, a través de los R-AT<sub>1</sub>, induce liberación excesiva de dopamina en CPu <sup>184</sup>. Estos cambios neuroquímicos se acompañaron con fenómenos comportamentales, observándose que los R-AT<sub>1</sub> participan en el desarrollo de sensibilización locomotora a ANF <sup>184</sup>. La exposición a ANF indujo una regulación al alza de los R-AT<sub>1</sub> en CPu y NAcc y de angiotensinógenos en CPu, que se mantuvieron estables al menos 21 días <sup>126</sup>.

### 3 Modulación de la función glial por el sistema renina-angiotensina

Las células gliales expresan varios de los componentes del SRA. El angiotensinógeno es producido principalmente por **astrocitos** y en estas células los R-AT<sub>1</sub> se expresan constitutivamente y modulan su actividad. En este sentido, luego de la activación de los R-AT<sub>1</sub> se observa un incremento intracelular de Ca<sup>2+</sup> en astrocitos, lo que induce la activación de varias vías de señalización intracelular como fosforilación de CREB, JAK2/STAT3 y MAPK/ERK con la consiguiente inducción de transcripción de genes <sup>185,186</sup>. En línea con lo anterior, estudios *in vitro* señalan que el lipopolisacárido induce astrogliosis a través de los R-AT<sub>1</sub>, junto con una regulación al alza de ANG II, R-AT<sub>1</sub> y translocación nuclear de NFκβ, producción de ROS e IL-6 <sup>187</sup>.

En células de la microglia, la activación de los R-AT<sub>1</sub> induce estrés oxidativo por medio de la activación del complejo nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa (NOX), mediado principalmente por PKC <sup>188</sup>. La activación de NOX se amplifica por el propio estrés oxidativo inducido por la activación de la enzima, ya que durante este proceso se induce la producción de superóxido, el cual a su vez estimula las vías de señalización de NFκβ y RhoA/Rho quinasa que luego activan a NOX vía p38 MAPK <sup>188</sup>.

La respuesta inflamatoria es regulada por el SRA por diferentes vías que exceden a la señalización asociada a ANG II y R-AT<sub>1</sub>. En este sentido, la prorenina estimularía la respuesta inflamatoria a través de efectos dependientes e independientes de ANG II. Al unirse al receptor de prorenina, se induce un incremento de 4 a 5 veces de la capacidad de catálisis (tanto de la prorenina como de la renina) del angiotensinógeno, lo que incrementa los niveles de ANG II y sus efectos. A su vez, al unirse a su receptor, la prorenina induce eventos celulares independientes de ANG II pero que también promueven la respuesta inflamatoria <sup>188</sup>. Por medio de la activación de los R-AT<sub>1</sub>, ANG III induce efectos proinflamatorios <sup>189</sup>, mientras que la activación de los R-AT<sub>4</sub>, por ANG IV, induce la activación de NFκβ con el consiguiente aumento en la expresión de genes proinflamatorios <sup>190</sup>. Por el contrario, la activación de receptores MAS, por medio de ANG-(1-7), ejerce efectos antiinflamatorios entre otras acciones biológicas como efectos antifibróticos, vasodilatadores e inhibidores del crecimiento <sup>191</sup>. A su vez, la activación de los R-AT<sub>2</sub>, por ANG II y ANG III, induce efectos antiinflamatorios <sup>192</sup>.

## 4 Sistema renina-angiotensina y dinámica de la estructura microvascular

El SRA ejerce un control activo de la arquitectura microvascular, induciendo efectos agudos a través de la modulación del tono vascular y efectos a largo plazo a través de la modificación de la densidad y arquitectura microvascular. Tanto en sus efectos vasculares agudos como crónicos, los diferentes componentes del SRA ejercen efectos contrapuestos de manera similar a lo descrito en la regulación de la función glial.

La activación de los R-AT<sub>1</sub> inducida por ANG II, induce vasoconstricción y estrés oxidativo por medio de la oxidación del óxido nítrico y la estimulación de la NADPH oxidasa endotelial respectivamente; mientras que la activación de los receptores MAS y AT<sub>2</sub>, inducidos por ANG-(1-7) y ANG II, se contraponen a los efectos anteriores generando vasodilatación y reducción del estrés oxidativo, a través de la inducción de la óxido nítrico sintasa endotelial e inhibiendo a la NADPH oxidasa respectivamente <sup>193,194</sup>.

Con respecto a los cambios en la microarquitectura vascular, el SRA ejerce efectos angiogénicos y también rarefacción (degeneración estructural de los microvasos). La estimulación de los R-AT<sub>1</sub> desencadena efectos angiogénicos a partir de la regulación al alza del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, principal mediador angiogénico) y de su receptor VEGFR2 <sup>195</sup>. A su vez, los R-AT<sub>1</sub> inducen angiogénesis indirectamente por medio de la generación de estrés oxidativo y la consiguiente estimulación del factor inducible por hipoxia 1 (HIF-1). Además de estos efectos, los R-AT<sub>1</sub> estimulan la producción de otros factores angiogénicos claves como el factor de crecimiento similar a insulina 1, el factor de crecimiento derivado de plaquetas, el factor de crecimiento de fibroblastos 2, angiopoyetina 2 y la actividad de metaloproteinasas <sup>195</sup>. Por el contrario, la activación de los R-AT<sub>2</sub> y receptores MAS induce efectos antiangiogénicos por medio del bloqueo de la activación de MAP quinasas y la estimulación de la generación de óxido nítrico respectivamente <sup>193</sup>.

Teniendo en cuenta los efectos proangiogénicos de la activación de los R-AT<sub>1</sub>, resulta plausible hipotetizar que su bloqueo inducido por los ARBs inducirá efectos antiangiogénicos. Si bien esta aproximación se corrobora en varias situaciones patológicas, como en diversos tipos de cáncer, en retinopatías y en enfermedades arteriales periféricas; existen otras situaciones fisiopatológicas en que la administración de ARBs induce angiogénesis, como en el infarto agudo de miocardio y en la isquemia cerebral <sup>196</sup>. En estos casos se ha hipotetizado que el efecto final de los ARBs sobre la angiogénesis dependerá del ambiente celular, pudiendo ser factor influyente el grado de presión sanguínea y el aumento de los niveles de ANG II asociados al tratamiento con ARBs, que en el último caso podría llevar a una eventual estimulación de otros receptores del SRA como los R-AT<sub>2</sub>, R-AT<sub>4</sub> y MAS <sup>196</sup>.

# 2

## Hipótesis y Objetivos

### 1 Hipótesis

Los receptores AT<sub>1</sub> de angiotensina II participan en el desarrollo y mantenimiento de alteraciones conductuales, gliales y vasculares inducidas por la exposición repetida a ANF.

### 2 Objetivo general

Estudiar el rol de los receptores AT<sub>1</sub> en las alteraciones conductuales, gliales y vasculares relacionadas con la exposición repetida a anfetamina y de relevancia en el estudio de la ESQ.

### 3 Objetivos específicos

#### 1 Objetivo 1

Evaluar el rol de los receptores AT<sub>1</sub> en alteraciones conductuales inducidas por la exposición repetida a anfetamina.

- 1 Evaluar la participación de los receptores AT<sub>1</sub> en el desarrollo y mantenimiento de la sensibilización conductual inducida por exposición repetida a anfetamina.
- 2 Determinar el efecto de la exposición repetida a la anfetamina en la interacción social y la participación de los receptores AT<sub>1</sub> en dicho efecto.
- 3 Estudiar la participación de los receptores AT<sub>1</sub> en el desarrollo de alteraciones en la memoria a corto plazo inducida por la exposición repetida a anfetamina.
- 4 Evaluar la participación de los receptores AT<sub>1</sub> en el desarrollo y mantenimiento de la alteración en la memoria de trabajo inducida por la exposición repetida a anfetamina.

## **2        Objetivo 2**

Evaluar la participación de los receptores AT<sub>1</sub> en la sensibilización neuroquímica inducida por exposición repetida a anfetamina.

- 1**    Estudiar la participación de los receptores AT<sub>1</sub> en la reversión de la sensibilización neuroquímica inducida por exposición repetida a anfetamina.
- 2**    Determinar los cambios en la cinética de recaptación de dopamina *in vitro* inducidos por el bloqueo de receptores AT<sub>1</sub> y por anfetamina.

## **3        Objetivo 3**

Analizar la participación de los receptores AT<sub>1</sub> en alteraciones gliales, oxidativas y vasculares inducidas por la exposición repetida a anfetamina.

- 1**    Evaluar el rol de los receptores AT<sub>1</sub> en la reactividad astrogliar y microglial inducida por exposición repetida a anfetamina en áreas cerebrales relevantes para la memoria de trabajo.
- 2**    Estudiar la participación de los receptores AT<sub>1</sub> en la producción de estrés oxidativo inducido por la exposición repetida a anfetamina.
- 3**    Estudiar el rol de los receptores AT<sub>1</sub> en los cambios angioplásticos inducidos por exposición repetida a anfetamina, en áreas cerebrales relevantes para la memoria de trabajo.

# 3

## Materiales y métodos

### 1 Animales

Los experimentos fueron realizados en ratas macho de la cepa Wistar de 60 días de edad (200 - 280 gramos), criadas en el bioterio del Departamento de Farmacología de la Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Una semana antes del inicio del protocolo, los animales fueron divididos al azar en los distintos grupos experimentales y se mantuvieron en grupos de 2 a 3 animales por caja con libre acceso a comida y agua.

Los animales fueron mantenidos en condiciones estándar de laboratorio con temperatura de entre 21 a 23 °C y bajo un ciclo de luz-oscuridad de 12 hs, comenzando a las 7:00 hs el 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. No 46/2015.

### 2 Drogas y reactivos

Los animales recibieron las drogas en una habitación diferente a en la que se dispuso su caja hogar y de donde se realizaron los experimentos comportamentales e inmediatamente después de ser administrados con las drogas fueron retornados a su caja hogar.

Sulfato de d-anfetamina (Sigma Chemical Co.) disuelto en solución fisiológica (cloruro de sodio 0.9%) inmediatamente antes de utilizar. Las dosis fueron elegidas según trabajos previos de nuestro laboratorio [125,139,197](#) y de otros autores [198](#).

Candesartán cilexetilo (CAND, Laboratorios Phoenix) disuelto en una solución de bicarbonato de sodio 0.1 N (Vehículo; VEH) inmediatamente antes de utilizar. La dosis fue elegida según trabajos previos de nuestro laboratorio [125,139,197](#).



Aripiprazol (ARI; Laboratorios Roemmers, Buenos Aires, Argentina) disuelto en una solución de bicarbonato de sodio 0,1N (VEH) inmediatamente antes de utilizar. La dosis fue elegida según trabajos previos [113](#).

Reactivos para los experimentos de electroquímica:

- Dopamina (Sigma Aldrich, MO, USA).
- Nanotubos de carbono de pared múltiple (diámetro de 20 a 50 nm, longitud de 5 a 20  $\mu$ m; Nano-Lab, USA) funcionalizados con polietilenimina (P-3143; Sigma Aldrich, MO, USA).
- El resto de reactivos químicos fueron de grado reactivo y usados sin futuras purificaciones.
- Se utilizó agua ultrapura ( $\eta = 18$  MX; sistema Milipore-MiliQ) para la preparación de todas las soluciones.

### 3 Diseño experimental

#### 1 Protocolo experimental 1

Con el objetivo de evaluar el rol de los R-AT<sub>1</sub> en el desarrollo de la sensibilización a ANF y las posibles alteraciones conductuales, gliales y vasculares asociadas, los animales recibieron VEH o CAND (3 mg/kg) una vez por día durante 5 días por vía oral (gavage) y del día 6 al 10 recibieron una administración diaria conjunta de VEH o CAND y SAL o ANF (2.5 mg/kg, i.p.) obteniéndose 4 grupos experimentales (VEH-SAL, VEH-ANF, CAND-SAL y ANF- CAND). Posteriormente, los animales permanecieron en sus cajas hogar por un periodo de abstinencia de 21 días (día 11 al 31). El día 31 se realizaron los test conductuales y se extrajeron las muestras de tejido cerebral para la posterior evaluación de la reactividad glial y morfología vascular. Dicho protocolo experimental se grafica en la figura 3.

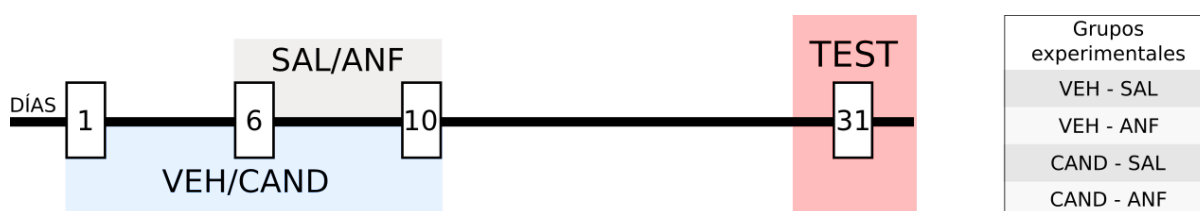


Figura 3. Protocolo experimental 1. VEH: vehículo, CAND: candesartan, SAL: salina y ANF: anfetamina.

#### 2 Protocolo experimental 2

Con el objetivo de evaluar la posible reversión de alteraciones conductuales asociadas a la exposición a ANF a través del bloqueo de R-AT<sub>1</sub> o ARI, los animales recibieron SAL o ANF (2.5 mg/kg, i.p.) una vez al día durante 5 días. Posteriormente, permanecieron en sus cajas hogar por un periodo de abstinencia de 21 días (día 6 al 26).

A su vez, entre los días 19 a 23 los animales recibieron VEH (1 ml/kg), CAND (3 mg/kg) o ARI (1 mg/kg) una vez por día durante 5 días por vía oral (gavage) obteniéndose 6 grupos experimentales (SAL-VEH, ANF-VEH, SAL-CAND, ANF-CAND, SAL-ARI y ANF-ARI). El día 26 se realizaron los test conductuales. Dicho protocolo experimental se grafica en la figura 4.

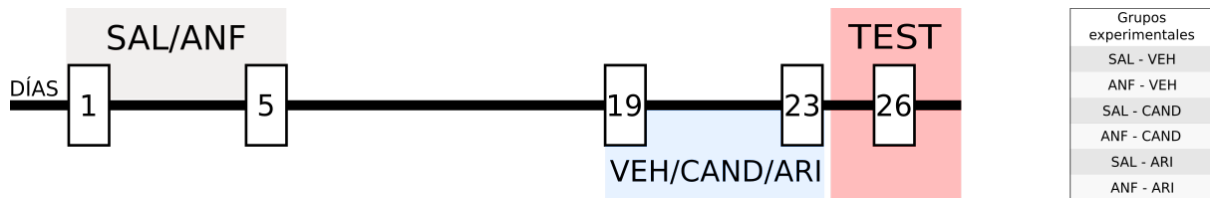


Figura 4. Protocolo experimental 2. VEH: vehículo, CAND: candesartan, ARI: aripiprazol, SAL: salina y ANF: anfetamina.

### 3 Protocolo experimental 3

A fin de evaluar los posibles cambios en la cinética de recaptación de dopamina inducidos por el antagonismo de los R-AT<sub>1</sub> *in vivo* y por la exposición de ANF *in vitro*, los animales recibieron VEH (1 ml/kg) o CAND (3 mg/kg) por vía oral (gavage) una vez por día durante 5 días. Posteriormente, en el día 6 u 8 (protocolos experimentales 3a y 3b, respectivamente) los animales fueron sacrificados por decapitación y el tejido fue preparado para realizar el estudio de la cinética de recaptación de dopamina midiéndose luego la desaparición de un pulso de DA, en homogenato de CPu, en condiciones basales y en presencia de ANF (0.4 μM). De esta forma se obtuvieron 8 grupos experimentales: VEH-BASAL-1ABS (1 día de abstinencia), VEH-BASAL-3ABS, CAND-BASAL-1ABS, CAND-BASAL-3ABS, VEH-ANF-1ABS, VEH-ANF-3ABS, CAND-ANF-1ABS y CAND-ANF-3ABS. Dicho protocolo experimental se grafica en la figura 5.

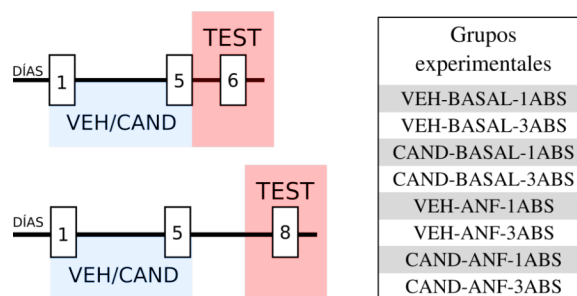


Figura 5. Protocolo experimental 3. VEH-1D: vehículo, CAND: candesartan, SAL: salina y ANF: anfetamina.

## 4 Protocolo experimental 4

Con el objetivo de evaluar el rol de los R-AT<sub>1</sub> en el estrés oxidativo inducido por ANF, los animales recibieron VEH (1 ml/kg) o CAND (3 mg/kg) una vez por día durante 5 días por vía oral (gavage) y del día 6 al 10 recibieron una administración diaria conjunta de VEH o CAND y SAL o ANF (2.5 mg/kg, i.p.) obteniéndose 4 grupos experimentales (VEH-SAL, VEH-ANF, CAND-SAL y ANF-CAND). El día 10, los animales recibieron la dosis diaria de VEH o CAND y 60 minutos más tarde la dosis de SAL o ANF. A los 30 minutos posteriores fueron sacrificados por decapitación extrayéndose los cerebros cuyas muestras de tejidos fueron preparadas para la evaluación del estrés oxidativo medido a través de peroxidación lipídica y proteica. Dicho protocolo experimental se grafica en la figura 6.

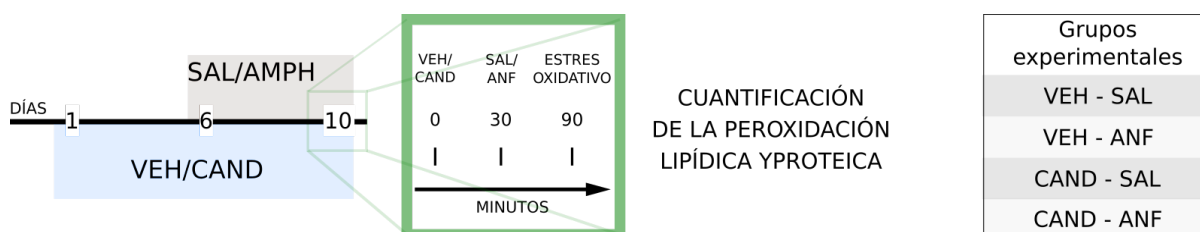


Figura 6. Protocolo experimental 4. VEH: vehículo, CAND: candesartan, SAL: salina y ANF: anfetamina.

## 5 Protocolo experimental 5

Luego de una inyección i.p. del colorante Azul de Evans, éste es absorbido hacia la circulación en donde se une a las proteínas séricas formando un marcador de alto peso molecular que genera contraste entre los vasos sanguíneos y los tejidos circundantes<sup>199</sup>. Por lo tanto, para evaluar los posibles cambios agudos en la microarquitectura vascular producidos por ANF y CAND, evaluamos la morfología de los microvasos de la CxPF a través de la autofluorescencia de Azul de Evans en un protocolo adaptado de Wang et al. y Cavaglia et al.<sup>200,201</sup>.

Los animales recibieron VEH (1 ml/kg) o CAND (3 mg/kg) una vez por día durante 5 días por vía oral (gavage) y del día 6 al 9 recibieron una administración diaria conjunta de VEH o CAND y SAL o ANF (2.5 mg/kg, i.p.) obteniéndose 4 grupos experimentales (VEH-SAL, VEH-ANF, CAND-SAL y ANF-CAND). El día 10, los animales recibieron una inyección del colorante Azul de Evans (80 mg/kg i.p.). A los 30 minutos posteriores, los animales recibieron una dosis de VEH o CAND vía oral (3 mg/kg, gavage), de acuerdo al grupo experimental al que hayan pertenecido, seguido de una dosis de SAL o ANF 90 minutos después de la inyección de Azul de Evans. A los 120 minutos de la inyección del colorante, los animales fueron sacrificados por decapitación extrayéndose los cerebros cuyas muestras de tejidos fueron preparadas para la evaluación de la microarquitectura vascular por autofluorescencia de Azul de Evans. Dicho protocolo experimental se grafica en la figura 7.

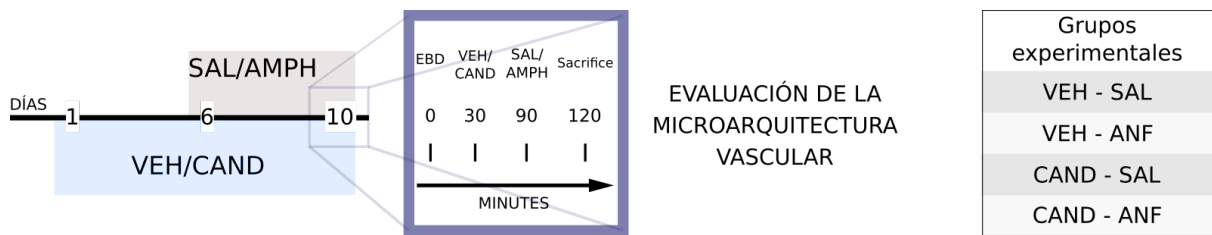


Figura 7. Protocolo experimental 5. VEH: vehículo, CAND: candesartan, SAL: salina y ANF: anfetamina.

## 4 Toma de muestras

### 1 Perfusión

Los animales fueron anestesiados con uretano (100 mg/kg; i.p.) y preparados para perfusión intracardiaca. Una vez obtenida una anestesia profunda, se expuso la cavidad torácica de los animales y se obstruyó el flujo sanguíneo bloqueando la aorta descendente. Se perfundió inicialmente con 100 ml de solución fisiológica (cloruro de sodio 0.9%) adicionada con heparina 500 U/l, seguido de 200 ml de solución fijadora de paraformaldehído al 4% en buffer fosfato 0.1 M (pH 7.4). Una vez finalizada la perfusión se extrajeron los cerebros y fueron colocados en una solución crioprotectora de sucrosa al 30% en buffer 0.1 M 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).

### 2 Fijación por inmersión y preparación de las muestras para el análisis de la autofluorescencia del colorante Azul de Evans

Una vez concluido el protocolo de inyección del colorante Azul de Evans detallado en la sección de protocolo experimental 5, se procedió a sacrificar a los animales por decapitación y los cerebros fueron inmediatamente sumergidos en solución fijadora de paraformaldehído al 4% en buffer fosfato 0.1 M (pH 7.4) y mantenidos a 4 °C al abrigo de la luz por 48 hs. Posteriormente fueron colocados en una solución crioprotectora de sucrosa al 30% en buffer 0.1 M y mantenidos a 4 °C hasta realizarse el procedimiento para el análisis de la microarquitectura vascular por autofluorescencia de Azul de Evans.

El día del experimento los cerebros fueron adheridos a un soporte con medio para congelamiento tisular (Biopack) y conservados durante 30 minutos a -20 °C. Posteriormente se obtuvieron cortes coronales seriados de 40 µm de espesor de la muestra utilizando un crióstato Leica CM1510S que se recogieron en una solución de buffer fosfato 0.01 M. Luego los cortes fueron montados en portaobjetos gelatinizados (5 g/l) dejándose secar a 4 °C durante una noche protegidos de la luz. Finalmente fueron cubiertos con medio de montaje Fluorsave (Sigma-Aldrich, USA) y cubreobjetos para su posterior visualización.

## **5 Inmunohistoquímica**

El día del experimento los cerebros fueron adheridos a un soporte con medio para congelamiento tisular (Biopack) y conservados durante 30 minutos a -20 °C. Posteriormente se obtuvieron cortes coronales seriados de la muestra utilizando un criostato Leica CM1510S. Los cortes de tejido fijado fueron incubados a temperatura ambiente por 2 hs con una solución de metanol 10% y peróxido de hidrógeno 10% (30 volúmenes) en agua destilada (2 hs) con el objetivo de inducir el agotamiento de la actividad de la peroxidasa endógena. Luego se realizaron 3 lavados de 5 minutos con buffer fosfato 0.01 M. A continuación se realizó el bloqueo de las uniones inespecíficas a través de la inmersión de los cortes por 2 hs en suero normal de cabra (NATOCOR) al 10% en buffer fosfato 0.1M (pH 7.4) a temperatura ambiente. Posteriormente se realizó la incubación durante la noche a temperatura ambiente con el anticuerpo primario correspondiente en una solución que contuvo 2% de suero normal de cabra (NATOCOR) y 0,3% de Tritón X-100 (Fluka Analytical) en buffer fosfato 0.1 M (pH 7.4). Al día siguiente, se realizaron tres lavados de 5 minutos con buffer fosfato 0.01 M y luego se incubaron los cortes durante 2 hs a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario biotinilado correspondiente a fin de amplificar la señal. A continuación los cortes fueron lavados 3 veces durante 5 minutos con buffer fosfato 0.01 M, incubándose luego durante 2 hs a temperatura ambiente con el complejo Avidina-Biotina-Peroxidasa (Vector Laboratories Inc.) en buffer fosfato 0.1M (pH 7.4) con 2% suero normal de cabra (NATOCOR), lo que permite una nueva amplificación de la señal y lleva a su vez la enzima peroxidasa que participa en la reacción de revelado. Luego de 3 lavados de 5 minutos con buffer fosfato 0.01 M se procedió al revelado de la señal mediante la incubación de los cortes durante 5 minutos con una solución compuesta por el cromógeno diaminobencidina (0.5 mg/ml; Sigma Chemical Co.) y peróxido de hidrógeno. La reacción fue intensificada con solución de cloruro de cobalto 1% y de sulfato de níquel 1%, que se agregaron al medio de revelado, obteniéndose una marca de color violeta oscuro. Posteriormente se realizaron 3 lavados de 5 minutos con buffer fosfato 0.01 M y los cortes fueron montados en portaobjetos gelatinizados (5 g/l) dejándose secar a temperatura ambiente. Finalmente fueron aclarados con xilol, cubiertos con medio de montaje DPX (Fluka Analytical) y cubreobjetos para su posterior visualización.

### **1 Inmunomarcación de Proteína Acídica Fibrilar Glial**

Se obtuvieron muestras por perfusión y se recogieron cortes de 20 µm de espesor en buffer fosfato 0.01 M. Posteriormente se realizó el procedimiento general de inmunomarcación detallado anteriormente inmunomarcando la Proteína Acídica Fibrilar Glial (GFAP) con 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 immunoResearch Laboratories Inc, USA) en una dilución de 1:3000.

### **2 Inmunomarcación de la integrina CD11b**

Se obtuvieron muestras por perfusión y se recogieron cortes de 20 µm de espesor en buffer fosfato 0.01 M. Posteriormente se realizó el procedimiento general de inmunomarcación detallado anteriormente

inmunomarcando la integrina CD11b con el anticuerpo primario monoclonal hecho en ratón anti-CD11b (Millipore) en una dilución 1:1000, y el anticuerpo secundario biotinilado hecho en cabra anti-ratón (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc, USA) en una dilución de 1:2000.

### **3 Inmunomarcación del gen de expresión temprana c-FOS**

Se obtuvieron muestras por perfusión y se recogieron cortes de 40 µm de espesor en buffer fosfato 0.01 M. Posteriormente se realizó el procedimiento general de inmunomarcación detallado anteriormente inmunomarcando el gen de expresión temprana con el anticuerpo primario monoclonal hecho en conejo anti-c-FOS (Abcam) en una dilución 1:10000, y el anticuerpo secundario biotinilado hecho en cabra anti-conejo (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc, USA) en una dilución de 1:3000.

### **6 Obtención y análisis de imágenes**

El análisis se realizó mediante un microscopio Leica DM 4000B acoplado con una cámara digital Leica DFC. Las imágenes fueron guardadas en formato TIFF (1392 x 1040 píxeles) y procesadas con el programa ImageJ (versión 1.53c)<sup>202</sup>. Las mediciones fueron realizadas en forma bilateral en dos secciones y el valor final se calculó como el promedio de las 4 secciones contadas. La cuantificación de las imágenes fue realizada en la corteza prefrontal subdivisión prelímbica (CxPF-PL) y subdivisión infralímbica (CxPF-IL) (Bregma: 3.20 mm), en Caudado Putamen (CPu) y Núcleo Accumbens (NAcc) (Bregma: 1.6) la cuales fueron identificadas y delimitadas de acuerdo al atlas de Paxinos y Watson (2009). Para asegurar la obtención de resultados objetivos el análisis se realizó a ciego al momento del estudio.

### **1 Análisis de la microarquitectura vascular por inmunohistoquímica del factor de von Willebrand**

El análisis de la microarquitectura vascular se realizó a partir de la visualización de microvasos cerebrales por la marcación del antígeno endotelial factor de von Willebrand (FvW) por inmunohistoquímica. Se obtuvieron imágenes a 200x y se realizó un trazado manual del contorno vascular procediéndose luego al rellenado automático de los vasos y la obtención de imágenes en formato RGB a partir del siguiente procedimiento:

- 1 Sustraer el background en 15 píxeles a través de la herramienta “Rolling ball radius”.
- 2 Generar imágenes binarias a través de la herramienta “Make Binary”.
- 3 Rellenar los vasos contorneados a través de la herramienta “Fill Holes”.
- 4 Transformar el formato de imágenes a 8 bits e invertir su color.

- 5 Transformar en formato RGB. Se cuantificó el área vascular (densidad vascular) y el diámetro vascular utilizando el plugin “Vessels Analysis” del software ImageJ <sup>203</sup>.

A partir de la imagen de densidad vascular obtenida en el punto anterior se calcularon los puntos de ramificación por área vascular y la tortuosidad (cociente entre la distancia real entre dos segmentos vasculares y la distancia más corta entre ellos) según trabajos previos <sup>125,139,204,205</sup> mediante el siguiente procedimiento:

- 1 Esqueletonización de imágenes binarias mediante la herramienta “Skeletonize”.
- 2 Análisis de las imágenes eskeletonizadas mediante la herramienta “Analyze Skeleton (2D/3D)”.
- 3 De los resultados obtenidos en el punto anterior se calcula el número de puntos de ramificación sumando la cantidad de píxeles “Junction” (indican los puntos de intersección entre 3 segmentos vasculares) divididos por el área vascular.
- 4 Se calcula la tortuosidad a partir de los resultados del análisis de imágenes eskeletonizadas por medio de la división entre el valor de la longitud vascular de cada sección “Branch Length” por su distancia Euclídea “Euclidean Distance”).

El procedimiento arriba descrito se esquematiza en la figura 8.

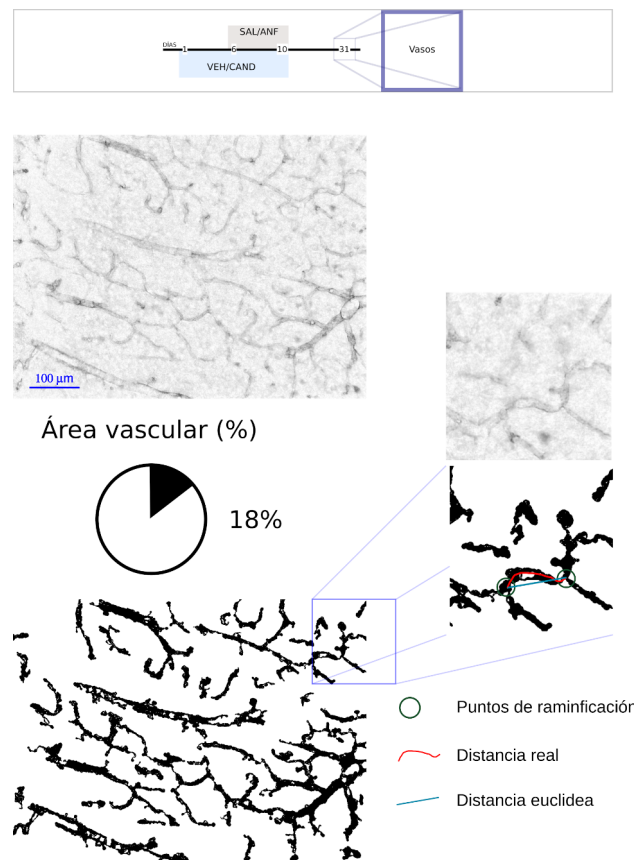


Figura 8. Representación del análisis vascular a través de la inmunomarcación de von Willebrand.

## 2 Análisis de la reactividad astrocitaria

Se obtuvieron imágenes a un aumento de 400x y se cuantificó el área inmunopositiva para GFAP, definiendo umbral de grises en 140-180. Los resultados se expresaron como la proporción en porcentaje del área GFAP+ en relación al área total (figura 9).

## 3 Análisis de la reactividad microglial

Se obtuvieron imágenes a un aumento de 400x y se cuantificó el área inmunopositiva para la integrina CD11b (área CD11b+), definiendo umbral de grises en 130-150. Los resultados se expresaron como la proporción en porcentaje del área inmunopositiva en relación al área total (figura 9).

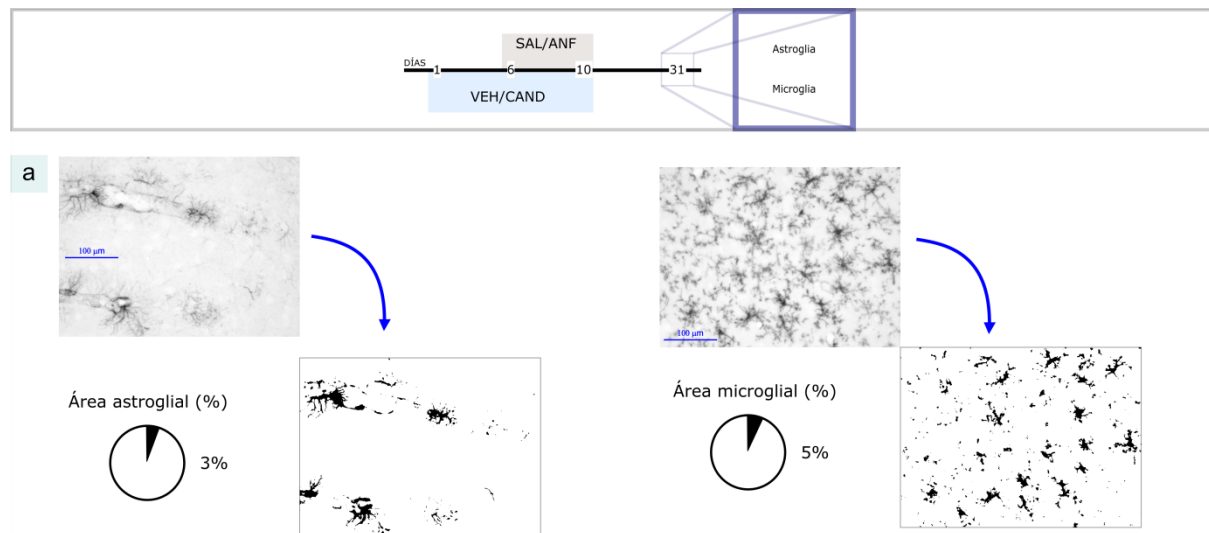


Figura 9. Representación del análisis de la reactividad glial.

## 4 Análisis de la actividad neuronal

Se obtuvieron imágenes a un aumento de 400x y se definió un umbral de grises entre 190-210. Posteriormente se cuantificó el número de células c-FOS positivas (c-FOS+) en forma automática mediante la herramienta “Analyze Particles” sumando aquellas partículas que poseían un tamaño entre 14 a 38 píxeles<sup>2</sup> y una circularidad entre 0.2-1.0.

## 5 Análisis de la microarquitectura vascular por medio de la autofluorescencia del colorante Azul de Evans

El análisis de la microarquitectura vascular se realizó a partir de la visualización de microvasos cerebrales por autofluorescencia del colorante de Azul de Evans. Se obtuvieron imágenes a 400x y las señales fluorescentes



resultantes de la autofluorescencia del colorante Azul de Evans fueron obtenidas por excitación a 620 nm y emisión a 680 nm. 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 (1 s) y los parámetros del histograma obtenido.

Luego se procesaron las imágenes para su posterior análisis mediante el siguiente procedimiento:

- 1 Transformar el formato de imágenes a 8 bits.
- 2 Sustraer el background en 50 píxeles a través de la herramienta “Rolling ball radius”.
- 3 Fijar el umbral de grises y generar imágenes binarias.
- 4 Rellenar los vasos contorneados a través de la herramienta “Fill Holes”.
- 5 Eliminar marcas específicas mediante dos ciclos de 20 pasos de eliminación de partículas con un radio menor a 1 y 2 píxeles respectivamente a través del siguiente código escrito en el lenguaje IJ1 Macro:
  - for (i = 0; i < 20; i++) {run("Remove Outliers...", "radius=1 threshold=50 which=Bright");}
  - for (i = 0; i < 20; i++) {run("Remove Outliers...", "radius=2 threshold=50 which=Bright");}
- 6 Eliminar aquellas partículas menores a 1000 píxeles<sup>2</sup> y que tengan una circularidad superior a 0.6 mediante la herramienta “Analyze particles”.
- 7 Transformar el formato de imágenes a RGB colour.

Una vez procesadas las imágenes, se procedió al análisis de la microarquitectura vascular utilizando el plugin “Vessels Analysis” del software ImageJ<sup>203</sup>. Los parámetros evaluados fueron:

- Proporción del área vascular expresada como porcentaje.
- Diámetro vascular.
- Proporción de área ocupada por capilares y vasos de diámetro medio. De acuerdo a lo publicado previamente por Xiong y colaboradores, aquellos vasos que tuvieran un diámetro vascular promedio menor o igual a 8  $\mu\text{m}$  fueron considerados capilares y aquellos con un diámetro entre 8 a 20  $\mu\text{m}$  fueron considerados vasos de diámetro medio<sup>206</sup>.

## 7 Análisis de la cinética de recaptación de dopamina

La cinética de recaptación de DA fue cuantificada por medio de mediciones amperométricas con un electrodo de carbono vítreo modificado con una dispersión de nanotubos de carbono de pared múltiple funcionalizados con polietilamina, vía ultrasonificación, hacia la detección ultrasensible y selectiva de DA. La señal analítica fue

obtenida midiendo la corriente de oxidación de DA a lo largo del tiempo aplicando un potencial de trabajo de 250 mV en condiciones hidrodinámicas. Las condiciones experimentales se basaron en estudios previos<sup>207,208</sup>.

Los animales recibieron VEH o CAND según los protocolos experimentales 3a y 3b por 5 días ilustrados en la [figura 4](#). Posteriormente, en el día 6 u 8 fueron sacrificados por decapitación y el tejido estriatal fue obtenido por rápida disección del cerebro en vidrio reloj enfriado sobre una superficie de hielo. El tejido estriatal (~40 mg de peso húmedo) fue chopeado a mano con bisturí y homogeneizado 3 veces en 1000 µl de buffer fisiológico a pH 7.4 compuesto de NaCl 3.00 mM, KCl 1.24 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.30 mM MgSO<sub>4</sub>, 2.50 mM CaCl<sub>2</sub>, 26.0 mM NaHCO<sub>3</sub> y 10.0 mM glucosa saturado con una mezcla de 95% O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub>. Luego se adicionaron 2000 µl de buffer fisiológico a la suspensión estriatal y se dividió la muestra en 3 repeticiones del mismo volumen (~1000 ml) que se mantuvieron a 4 °C hasta la realización de las mediciones. En el momento de la medición cada repetición de muestra se incubó a 37 °C en la celda de vidrio de incubación a la que se le adicionó 2000 ml de buffer fisiológico e inmediatamente después se procedió a la cuantificación de la cinética de recaptación de DA en condiciones basales (2 repeticiones) o en presencia de ANF 0.4 µM (1 repetición). Se evaluó la velocidad de recaptación de DA en condiciones basales (R<sub>B</sub>) midiendo la velocidad de desaparición de un pulso instantáneo de 1500 pmoles de DA. La velocidad de recaptación de DA en presencia de ANF (R<sub>ANF</sub>) fue evaluada adicionando 400 pmoles de ANF a la suspensión de tejido estriatal 5 minutos antes de la medición de desaparición del pulso de DA (la cantidad de ANF fue calculada para obtener 20 pmoles de ANF por mg de tejido húmedo y de esa forma obtener un porcentaje de inhibición de la recaptación de DA de ~50%, similar a lo reportado por Wayment et al.<sup>209</sup>. El índice de inhibición de la recaptación de DA (I<sub>ANF</sub>) fue calculado de la siguiente forma:

$$I_{ANF} = 1 - \left( \frac{R_{ANF}}{R_B} \right)$$

## 8 Estrés oxidativo

Siguiendo el protocolo experimental 4 ilustrado en la [figura 5](#), en el día 10 los animales recibieron la dosis diaria de VEH o CAND y 60 minutos más tarde la dosis de SAL o ANF. A los 30 minutos posteriores fueron sacrificados por decapitación e inmediatamente se obtuvo la CxPF (incluyendo las subdivisiones PL, IL y cingulada), CPu, CxM e HPC por rápida disección del cerebro en vidrio reloj enfriado sobre una superficie de hielo que se homogeneizaron en buffer fosfato 0.1M obteniéndose los homogenatos de las distintas estructuras cerebrales. Posteriormente se procedió a la evaluación del estrés oxidativo medido a través de peroxidación lipídica y proteica.

## **1 Peroxidación lipídica**

Inicialmente se cuantificó el contenido proteico por colorimetría a través del método de Bradford a una absorbancia de 595 nm. Subsecuentemente se realizó la cuantificación de la peroxidación lipídica por espectrofotometría a partir de la adaptación del protocolo descrito por Avci et al.<sup>210</sup>.

Se colocaron 100 µl de homogenato de las estructuras cerebrales en un eppendorf junto con 250 µl de ácido tricloroacético y 250 µl de ácido tiobarbitúrico. Inmediatamente después, las muestras fueron mantenidas en baño termostático a 100 °C por 10 minutos. Luego, las muestras fueron centrifugadas a 129 G por 10 minutos para eliminar el precipitado y se procedió a cuantificar la absorbancia a 532 nm. Las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico fueron cuantificadas utilizando un coeficiente de extinción de  $1.56 \times 10^5$  ( $M^{-1} \times cm^{-1}$ ) y se expresaron como nM de malondialdehído (MDA) por mg de proteínas. Todas las muestras fueron analizadas por duplicado.

## **2 Cuantificación de los productos proteicos de oxidación avanzados**

Inicialmente se cuantificó el contenido proteico por colorimetría a través del método de Bradford a una absorbancia de 595 nm. Subsecuentemente se realizó la cuantificación de los productos proteicos de oxidación avanzados (PPOA) por espectrofotometría a partir de la adaptación del protocolo descrito por Witko-Sarsat et al.<sup>211</sup>.

Se colocaron 100 µl de homogenato de las estructuras cerebrales en una placa microtituladora y se adicionaron 10 µl de ioduro de potasio (1.16 M) y 20 µl de ácido acético glacial y se procedió a la medición de la absorbancia de la muestra a 340 nm. La curva de calibración fue construida en base a la absorbancia obtenida de una solución de cloramina T a distintas concentraciones como solución estándar y 200 µl de buffer fosfato 0.1 M como blanco. La concentración de PPOA fue expresada como unidades equivalentes de cloramina (µM) por miligramo de proteínas. Todas las muestras fueron analizadas por duplicado.

## **9 Test conductuales**

Todos los test conductuales fueron realizados en una habitación diferente de la cual fueron alojados en la jaula hogar y también de la habitación en que recibieron las diferentes drogas. Cada animal fue utilizado para sólo un único test conductual, el cual se realizó entre las 9 y las 18 hs bajo luz tenue y en ausencia de ruidos.

### **1 Actividad locomotora**

Los animales fueron colocados en arenas de plástico translúcidas (52 cm x 37 cm x 31 cm, figura 10) localizadas sobre un fondo oscuro para aumentar el contraste entre el animal y el fondo (permite un reconocimiento óptimo del animal por el software utilizado). De manera similar a trabajos previos, la expresión

de la sensibilización fue analizada midiendo la actividad locomotora únicamente durante el periodo de abstinencia <sup>198,212,213</sup>. De manera similar a lo reportado por Beyaert et al. <sup>104</sup>, los animales fueron colocados individualmente en la arena y habituados por un periodo de 1 h. Posteriormente recibieron una inyección de SAL (1 ml/kg i.p.) y se midió su locomoción por 1 h. Luego recibieron una dosis desafío de ANF (0.5 mg/kg i.p.) y se midió su locomoción por un periodo de 1 h. Todas las sesiones fueron grabadas por medio de una cámara posicionada sobre la arena y los videos fueron posteriormente analizados con el software Etho Watcher® <sup>214</sup>. Dicho software detecta el punto central del animal (relativo al contraste del fondo) y realiza un seguimiento de su movimiento registrando las coordenadas en los diferentes puntos del tiempo. La frecuencia de fotogramas de los videos fue estandarizada a 6 fotogramas por segundo.

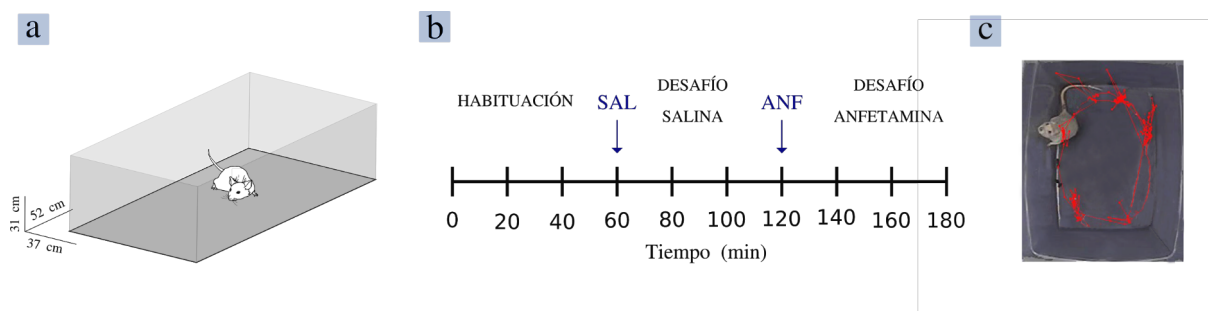


Figura 10. Test de actividad locomotora. Esquema representativo de la arena (a). Esquema temporal (b). Imagen representativa (c).

## 2 Interacción social

El diseño general del test fue adaptado de trabajos previos de otros autores <sup>104,198,215,216</sup>. Los animales fueron colocados en una arena de melamina negra (100 cm x 100 cm x 40 cm, figura 11) y habituados por 5 minutos el día previo al test. En el día del test, se colocaron en la arena dos ratas desconocidas entre ellas y pertenecientes al mismo grupo experimental y se monitorizó su movimiento por 5 minutos con una cámara colocada por encima de la arena. Posteriormente los videos fueron analizados a través del software Tracker video analysis modelling tool®. Se registró el tiempo total de interacción social para cada par de animales y se calculó el tiempo de interacción pasiva (proximidad a menos de 20 cm) y tiempo de interacción positiva (comportamientos asociados a olfateo, seguimiento, acicalamiento y agresividad) de manera similar a trabajos previos <sup>216,217</sup>.

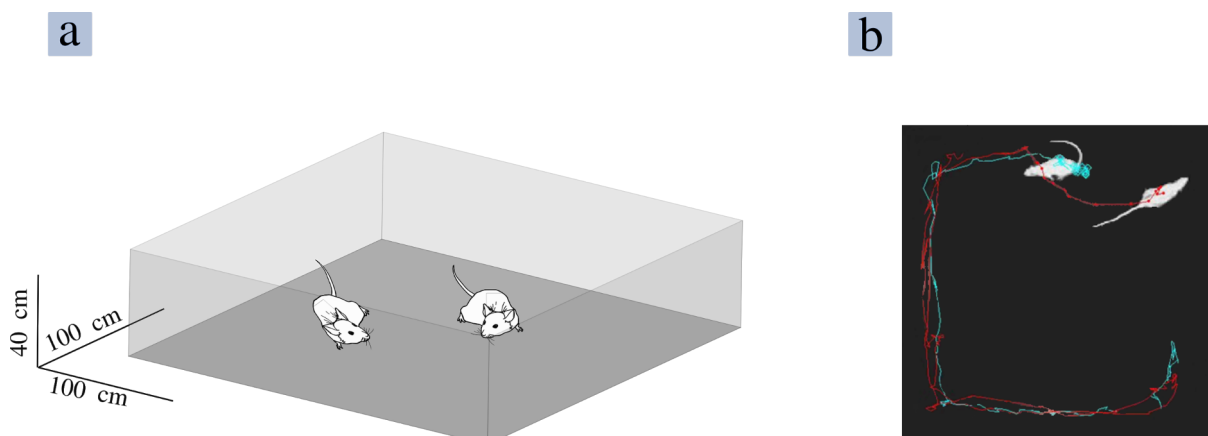


Figura 11. Test de interacción social. Esquema representativo de la arena (a). Imagen representativa (b).

### 3 Memoria de trabajo: laberinto en Y elevado

La memoria de trabajo fue evaluada a partir del paradigma de laberinto en Y elevado adaptado de trabajos previos <sup>139,218-220</sup>. Los animales fueron colocados en el centro de un laberinto en forma de Y con tres brazos iguales (50 cm x 10 cm x 39 cm en ángulos de 120°) y se les permitió explorar libremente por 8 minutos (figura 12). El test fue monitorizado a través de una cámara de video situada arriba del laberinto en Y y se cuantificaron el número de alternaciones espontáneas (% AE) y entradas a los brazos. La entrada a un brazo fue considerada cuando las 4 patas del animal se encontraron simultáneamente dentro del brazo. Las AE se definieron como la elección consecutiva de 3 brazos distintos. El resultado fue expresado como el cociente porcentual entre las AE y el número total de alternaciones posibles (se obtiene restando por 2 al número total de entradas) representado en la fórmula X. En este paradigma comportamental la alteración de la memoria de trabajo se refleja como un menor porcentaje de AE. Aquellos animales que mostraron un periodo de inmovilidad mayor a 2 minutos entre los brazos fueron excluidos del análisis.

$$\% AE = \frac{n^{\circ} \text{alternaciones}}{(n^{\circ} \text{entradas} - 2)} \times 100$$

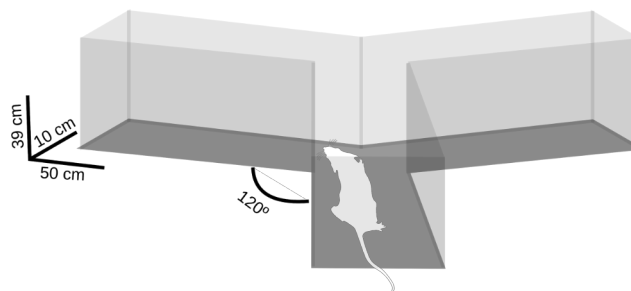


Figura 12. Test de laberinto en Y elevado Esquema representativo de la arena.

### 4 Memoria a corto plazo: test de reconocimiento de objetos nuevos

La memoria a corto plazo fue evaluada en el paradigma de reconocimiento de objetos nuevos adaptado a partir de trabajos previos <sup>218,221,222</sup>. El día previo al test, los animales fueron habituados individualmente en dos sesiones de 5 minutos separadas por 2 hs a la arena vacía, que consistió en una caja de plexiglás negra (60 cm x 60 cm x 40 cm, Figura 13). En la sesión de entrenamiento, en el día del experimento, se les permitió a los animales explorar libremente por 5 minutos la arena que tuvo 2 objetos idénticos alineados a 10 cm en forma aleatoria a una de las paredes (Figura 13). 2 hs después en la sesión de test, los animales fueron colocados en la misma arena en la cual uno de los objetos fue reemplazado en forma aleatoria por uno nuevo de diferente textura y forma (Figura 13) y se les permitió explorar libremente por 5 minutos. Ambas sesiones fueron monitorizadas a través de una cámara de video posicionada arriba de la arena y se cuantificó el tiempo de contacto con cada

objeto. Los resultados fueron expresados como índice de preferencia (IP) del objeto nuevo en la sesión de test e IP del objeto más explorado en la sesión de entrenamiento que se calculó con la siguiente fórmula:

$$IP_{test} = \frac{\text{exploración del objeto nuevo}}{(\text{exploración objeto nuevo} + \text{exploración del objeto viejo})} \left( \frac{s}{s} \right)$$

$$IP_{entrenamiento} = \frac{\text{exploración del objeto más frecuente}}{(\text{exploración objeto 1} + \text{exploración del objeto 2})} \left( \frac{s}{s} \right)$$

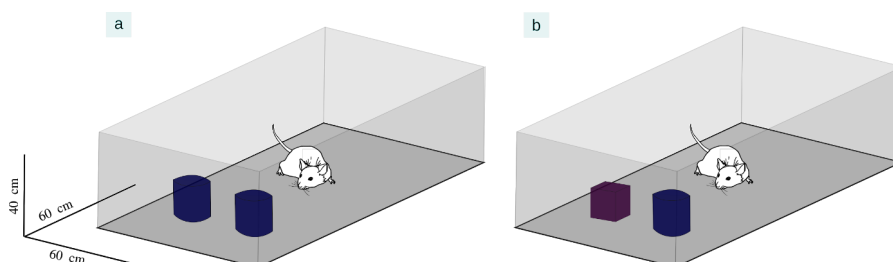


Figura 13. Imagen representativa del test de reconocimiento de objetos nuevos. Sesión de entrenamiento (a) y sesión de test (b).

Un valor de IP mayor a 0.5 en la sesión de test es indicativo de una mayor preferencia en la exploración por el objeto nuevo y por lo tanto de una buena performance de la memoria a corto plazo debido al reconocimiento del objeto viejo presentado previamente en la sesión de entrenamiento. Un IP cercano a 0.5 en la sesión de entrenamiento es indicativo de la ausencia de sesgos en el entrenamiento.

## 10 Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados utilizando ANOVA de dos vías (protocolo experimental 1, 2, 4, y 5), ANOVA de tres vías (protocolo experimental 3) o t-test (protocolo experimental 3) y reportado como la media  $\pm$  SEM. Para el análisis de ANOVA de dos vías se consideró a VEH/CAND o VEH/CAND/ARI como el factor tratamiento y SAL/ANF como el factor droga. Para el análisis de ANOVA de tres vías se consideró a VEH/CAND como el factor tratamiento, a 1ABS/3ABS (1 y 3 días de abstinencia respectivamente) como el factor abstinencia y a BASAL/ANF (recaptación en condiciones basales o en presencia de ANF 0.4  $\mu$ M respectivamente) como el factor desafío. En el caso de observar un efecto significativo de la interacción se realizaron comparaciones múltiples corrigiendo los p-valor por medio del test a posteriori de Tukey. Se consideró como estadísticamente significativo aquellos valores de probabilidad menores a 0.05. El análisis estadístico se realizó utilizando el software Graphpad Prism® 8.02.

# 4

## Resultados

### 1 Los receptores AT<sub>1</sub> participan en el desarrollo de la sensibilización conductual a anfetamina

Objetivo 1: evaluar el rol de los receptores AT<sub>1</sub> en alteraciones conductuales inducidas por la exposición repetida a anfetamina

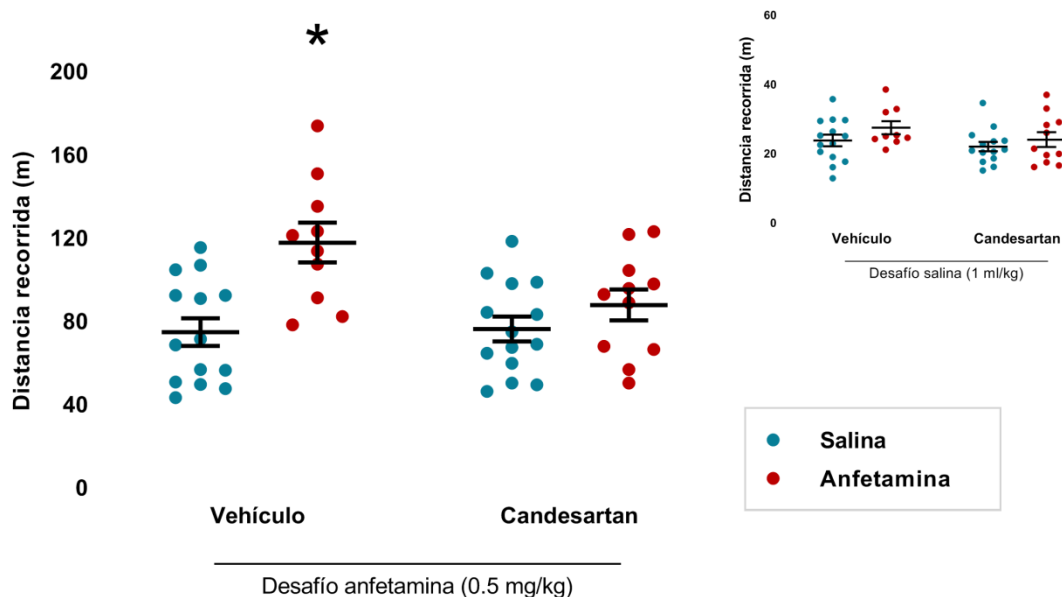
Objetivo 1.1: evaluar la participación de los receptores AT<sub>1</sub> en el desarrollo y mantenimiento de la sensibilización conductual inducida por exposición repetida a anfetamina.

A fin de evaluar si el protocolo de exposición a ANF utilizado en el presente trabajo induce sensibilización conductual y si los R-AT<sub>1</sub> participan en el desarrollo de este fenómeno, se evaluó la actividad locomotora de los animales en respuesta a una reexposición a ANF en una dosis desafío (0.5 mg/kg) en los 4 grupos experimentales (VEH-SAL, VEH-ANF, CAND-SAL y CAND-ANF) generados con el protocolo experimental 1. Se evaluó también la locomoción de los animales en respuesta a una dosis desafío de SAL (1 ml/kg) a fin de evaluar respuestas diferenciales al estrés inducidas por el tratamiento previo.

La exposición a ANF indujo sensibilización conductual evaluada como hiperlocomoción en respuesta a una reexposición a la droga luego de 21 días de abstinencia ([protocolo experimental 1](#)). A su vez, el bloqueo de R-AT<sub>1</sub> previno la sensibilización al psicoestimulante.

La administración de una dosis desafío de ANF (0.5 mg/kg) indujo hiperlocomoción en el grupo VEH-ANF al ser comparado con el resto de los grupos (Figura 14, tabla 1). A su vez, no se observaron diferencias estadísticas entre el grupo CAND-ANF y los grupos controles VEH-SAL y CAND-SAL.

Luego de la administración de una dosis desafío de SAL (1 ml/kg) no se observaron diferencias en la distancia recorrida entre los 4 grupos experimentales (inset figura 14).



**Figura 14. Los R-AT<sub>1</sub> participan en el desarrollo de sensibilización a ANF.** El gráfico muestra la distancia recorrida en el test de actividad locomotora en los cuatro grupos experimentales del protocolo experimental 1. La figura principal muestra la locomoción en respuesta a una dosis desafío de ANF (0.5 mg/kg). La figura insertada muestra la actividad locomotora en respuesta a una dosis desafío de SAL (1 ml/kg). Los valores se expresan como la media  $\pm$  desviación estándar de la media (DEM), \* diferente del resto de los grupos ( $p < 0.05$ );  $n = 10 - 14$ .

ANOVA 2-vías	Distancia recorrida (desafío salina)			Distancia recorrida (desafío anfetamina)		
Interacción	$F_{(1,44)} = 0.216$		$p = 0.644$	$F_{(1,45)} = 4.607$		$*p = 0.037$
tratamiento	$F_{(1,44)} = 2.151$		$p = 0.150$	$F_{(1,45)} = 3.800$		$p = 0.058$
droga	$F_{(1,44)} = 2.613$		$p = 0.113$	$F_{(1,45)} = 13.88$		$*p < 0.001$
Comparaciones múltiples con test a posteriori de Tukey	VEH-SAL	VEH-ANF	-	VEH-SAL	VEH-ANF	$*p < 0.001$
	VEH-SAL	CAND-SAL	-	VEH-SAL	CAND-SAL	$p = 0.999$
	VEH-SAL	CAND-ANF	-	VEH-SAL	CAND-ANF	$p = 0.584$
	VEH-ANF	CAND-SAL	-	VEH-ANF	CAND-SAL	$*p = 0.002$
	VEH-ANF	CAND-ANF	-	VEH-ANF	CAND-ANF	$*p = 0.046$
	CAND-SAL	CAND-ANF	-	CAND-SAL	CAND-ANF	$p = 0.672$

**Tabla 1. Los R-AT<sub>1</sub> participan en el desarrollo de sensibilización a ANF.** La tabla muestra los parámetros estadísticos obtenidos en el análisis de la distancia recorrida en el test de actividad locomotora en los cuatro grupos experimentales del protocolo experimental 1.  $*p < 0.05$ .



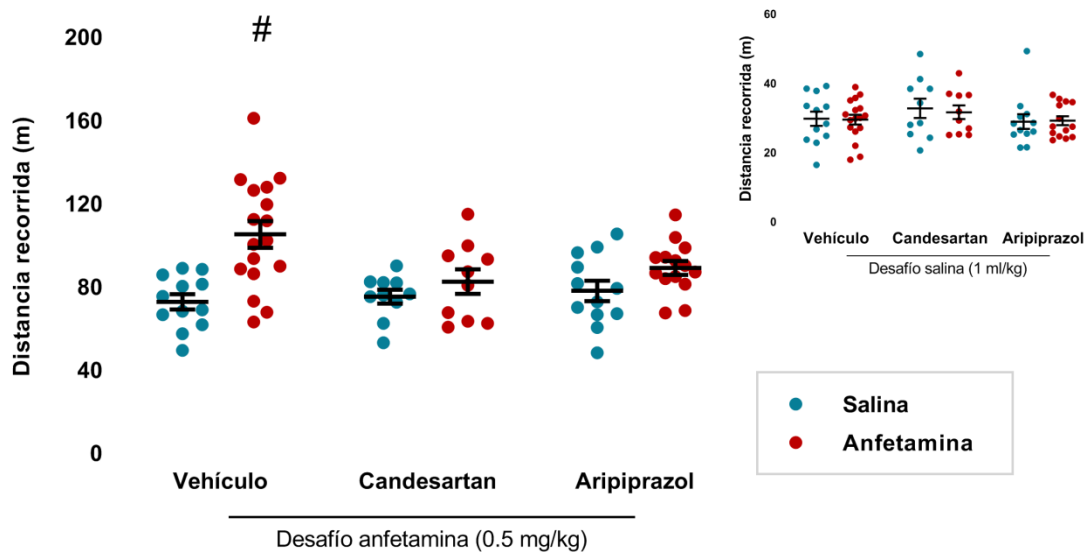
## 2 Los receptores AT<sub>1</sub> participan en el mantenimiento de la sensibilización conductual a anfetamina

Con el objetivo de evaluar si los R-AT<sub>1</sub> participan en el mantenimiento de la sensibilización conductual a ANF y la validez de predicción del modelo (reversión de la sensibilización con el antipsicótico ARI), se evaluó la actividad locomotora de los animales en respuesta a una reexposición a ANF con una dosis desafío (0.5 mg/kg) en los 6 grupos experimentales (SAL-VEH, ANF-VEH, SAL-CAND, ANF-CAND, SAL-ARI y ANF-ARI) generados con el protocolo experimental 2. Se evaluó también la locomoción de los animales en respuesta a una dosis desafío de SAL (1 ml/kg) a fin de evaluar respuestas diferenciales al estrés inducidas por el tratamiento previo.

La exposición a ANF promovió la sensibilización conductual evaluada como hiperlocomoción en respuesta a una reexposición a la droga luego de 21 días de abstinencia ([protocolo experimental 2](#)). A su vez, el antagonismo de R-AT<sub>1</sub> y la administración de ARI revirtieron la sensibilización al psicoestimulante.

La administración de una dosis desafío de ANF (0.5 mg/kg) indujo una respuesta locomotora significativamente mayor en el grupo ANF-VEH comparado con el resto de los grupos excepto el grupo ANF-ARI (figura 15, tabla 2). El antagonismo de los R-AT<sub>1</sub> durante el periodo de abstinencia revirtió la sensibilización a ANF ya que no se observaron diferencias significativas entre el grupo ANF-CAND y SAL-CAND. A su vez, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ANF-ARI y SAL-ARI, por lo que la administración de ARI durante el periodo de abstinencia también revirtió la sensibilización conductual a ANF. No se observaron diferencias significativas entre los grupos controles (SAL-VEH, SAL-CAND y SAL-ARI) ni tampoco al comparar los grupos controles con los grupos ANF-CAND y ANF-ARI.

Luego de la administración de una dosis desafío de SAL (1 ml/kg) no se observaron diferencias en la distancia recorrida entre los 6 grupos experimentales (inset figura 15).



**Figura 15. Los R-AT, participan en el mantenimiento de la sensibilización a ANF.** El gráfico muestra la distancia recorrida en el test de actividad locomotora en los seis grupos experimentales del protocolo experimental 2. El gráfico principal muestra la locomoción en respuesta a una dosis desafío de ANF (0.5 mg/kg). La figura insertada muestra la locomoción en respuesta a una dosis desafío de SAL (1 ml/kg). Los valores se expresan como la media  $\pm$  DEM, # diferente del resto de los grupos excepto ANF-ARI ( $p < 0.05$ );  $n = 10 - 17$ .

ANOVA 2-vías	Distancia recorrida (desafío salina)			Distancia recorrida (desafío anfetamina)		
Interacción	$F_{(2, 69)} = 0.060$	$p = 0.942$		$F_{(2, 69)} = 3.667$	$*p = 0.031$	
tratamiento	$F_{(2, 69)} = 1.360$	$p = 0.263$		$F_{(2, 69)} = 1.817$	$p = 0.162$	
droga	$F_{(2, 69)} = 0.057$	$p = 0.812$		$F_{(2, 69)} = 16.16$	$*p < 0.001$	
Comparaciones múltiples con test a posteriori de Tukey	SAL-VEH	ANF-VEH	-	SAL-VEH	ANF-VEH	$*p < 0.001$
	SAL-VEH	SAL-CAND	-	SAL-VEH	SAL-CAND	$p = 0.999$
	SAL-VEH	ANF-CAND	-	SAL-VEH	ANF-CAND	$p = 0.797$
	SAL-VEH	SAL-ARI	-	SAL-VEH	SAL-ARI	$p = 0.978$
	SAL-VEH	ANF-ARI	-	SAL-VEH	ANF-ARI	$p = 0.196$
	ANF-VEH	SAL-CAND	-	ANF-VEH	SAL-CAND	$*p < 0.001$
	ANF-VEH	ANF-CAND	-	ANF-VEH	ANF-CAND	$*p = 0.026$
	ANF-VEH	SAL-ARI	-	ANF-VEH	SAL-ARI	$*p = 0.002$
	ANF-VEH	ANF-ARI	-	ANF-VEH	ANF-ARI	$p = 0.146$
	SAL-CAND	ANF-CAND	-	SAL-CAND	ANF-CAND	$p = 0.945$
	SAL-CAND	SAL-ARI	-	SAL-CAND	SAL-ARI	$p = 0.999$
	SAL-CAND	ANF-ARI	-	SAL-CAND	ANF-ARI	$p = 0.430$

ANF-CAND	SAL-ARI	-	ANF-CAND	SAL-ARI	p = 0.992
ANF-CAND	ANF-ARI	-	ANF-CAND	ANF-ARI	p = 0.946
SAL-ARI	ANF-ARI	-	SAL-ARI	ANF-ARI	p = 0.616

**Tabla 2. Los R-AT<sub>1</sub> participan en el mantenimiento de la sensibilización a ANF.** La tabla muestra los parámetros estadísticos obtenidos en el análisis de la distancia recorrida en el test de actividad locomotora en los seis grupos experimentales del protocolo experimental 2. \*p < 0.05.

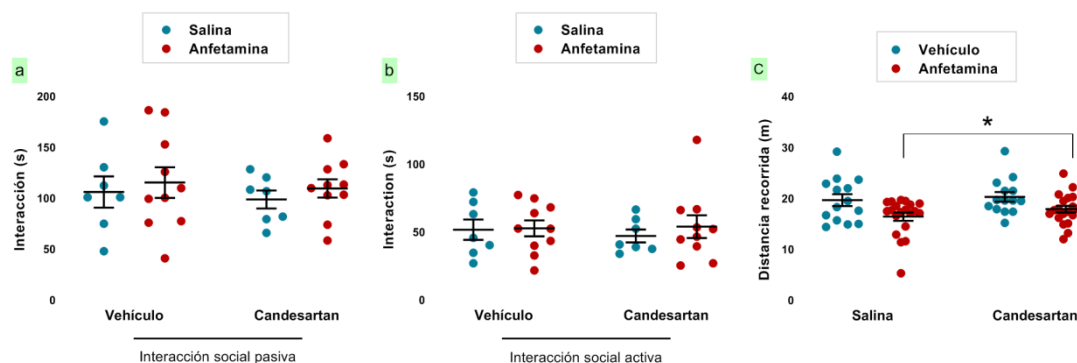
### 3 La interacción social no es afectada por la exposición a anfetamina o por el bloqueo de los R-AT<sub>1</sub>

Objetivo 1.2. Determinar el efecto de la exposición repetida a la anfetamina en la interacción social y la participación de los receptores AT<sub>1</sub> en dicho efecto.

A fin de evaluar si la exposición a ANF o el bloqueo de los R-AT<sub>1</sub> alteran la interacción social, se evaluó el tiempo de interacción social pasiva y activa en condiciones basales en los 4 grupos experimentales (VEH-SAL, VEH-ANF, CAND-SAL y CAND-ANF) generados con el protocolo experimental 1.

No se observaron cambios significativos tanto en la interacción social pasiva como activa relacionados con la exposición a ANF o el bloqueo de R-AT<sub>1</sub> 21 días después de la última exposición a las drogas ([protocolo experimental 1](#)). En este sentido, no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas al analizar la influencia de los factores “droga”, “tratamiento” e “interacción” en el tiempo de interacción social tanto en la interacción social pasiva como en la activa (figura 16, tabla 3).

Al analizar la distancia recorrida durante el test, se obtuvo un efecto significativo del factor “droga” observándose valores de locomoción significativamente menores en los grupos experimentales que previamente recibieron ANF (figura 16, tabla 3). No se observaron diferencias significativas en la locomoción inducidas por el factor “tratamiento” ni por el factor “interacción”.



**Figura 16. La interacción social no es afectada por la exposición a ANF o por el bloqueo de los R-AT<sub>1</sub>.** El gráfico muestra los parámetros analizados en el test de interacción social en los cuatro grupos experimentales del protocolo experimental 1. Tiempo de interacción pasiva (a). Tiempo de interacción activa (b). Distancia recorrida (c). Los valores se expresan como la media ± DEM, \* diferentes de VEH-SAL y VEH-ANF ( $p < 0.05$ );  $n = 14 - 20$ .

ANOVA 2-vías	Interacción social pasiva (s)		Interacción social activa (s)		Distancia recorrida (m)	
Interacción	$F_{(1,30)} = 0.004$	$p = 0.952$	$F_{(1,30)} = 0.170$	$p = 0.683$	$F_{(1,64)} = 0.224$	$p = 0.638$
tratamiento	$F_{(1,30)} = 0.262$	$p = 0.613$	$F_{(1,30)} = 0.056$	$p = 0.814$	$F_{(1,64)} = 1.417$	$p = 0.238$
droga	$F_{(1,30)} = 0.607$	$p = 0.442$	$F_{(1,30)} = 0.300$	$p = 0.588$	$F_{(1,64)} = 10.22$	$*p = 0.002$

**Tabla 3. La interacción social no es afectada por la exposición a ANF o por el bloqueo de los R-AT<sub>1</sub>.** La tabla muestra los parámetros estadísticos obtenidos en el análisis de interacción social en los cuatro grupos experimentales del protocolo experimental 1. \*indica  $p < 0.05$ .

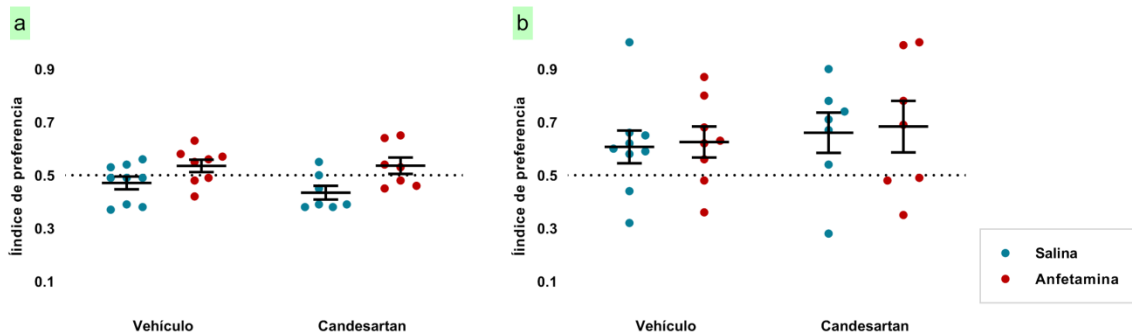
#### 4 La memoria a corto plazo no es afectada por la exposición a anfetamina o por el bloqueo de los R-AT<sub>1</sub>

Objetivo 1.3. Estudiar la participación de los receptores AT<sub>1</sub> en el desarrollo de alteraciones en la memoria a corto plazo inducida por la exposición repetida a anfetamina.

Con el objetivo de evaluar si la exposición a ANF o el bloqueo de los R-AT<sub>1</sub> alteran la memoria a corto plazo, se evaluó la memoria declarativa en el paradigma de reconocimiento del objeto nuevo en condiciones basales en los 4 grupos experimentales (VEH-SAL, VEH-ANF, CAND-SAL y CAND-ANF) generados con el protocolo experimental 1. Se analizó también el desempeño durante la sesión de entrenamiento a fin de evaluar la presencia de sesgos en los resultados relacionados con la sesión de entrenamiento.

La exposición a ANF o el bloqueo de R-AT<sub>1</sub> no generaron cambios significativos en el desempeño de la memoria a corto plazo declarativa evaluada 21 días después de la última exposición a las drogas en el paradigma del reconocimiento del reconocimiento del objeto nuevo ([protocolo experimental 1](#)). En este sentido, todos los

grupos experimentales mostraron mayor preferencia por el objeto nuevo en la sesión test (índices de preferencia por el objeto nuevo superiores a 0.5) sin diferencias estadísticamente significativas al analizar la influencia de los factores “droga”, “tratamiento” e “interacción” (figura 17, tabla 4). Adicionalmente, se observaron valores del índice de preferencia en la sesión de entrenamiento cercanos a 0.5 en todos los grupos experimentales lo que sugiere que no existieron sesgos de preferencia durante el entrenamiento.



**Figura 17. La memoria a corto plazo no es afectada por la exposición a ANF o por el bloqueo de los R-AT<sub>1</sub>.** El gráfico muestra los parámetros analizados en el test de reconocimiento de objetos nuevos en los cuatro grupos experimentales del protocolo experimental 1. Índice de preferencia en la sesión de entrenamiento (a). Índice de preferencia en la sesión test (b). Los valores se expresan como la media ± DEM; n = 7 - 9.

ANOVA 2-vías	Sesión de entrenamiento		Sesión test		Sesión de entrenamiento	
	F <sub>(1,33)</sub>	p	F <sub>(1,33)</sub>	p	F <sub>(1,33)</sub>	p
Interacción	F <sub>(1,33)</sub> = 0.113	p = 0.739	F <sub>(1,33)</sub> = 0.113	p = 0.739	F <sub>(1,33)</sub> = 0.113	p = 0.739
tratamiento	F <sub>(1,33)</sub> = 0.062	p = 0.806	F <sub>(1,33)</sub> = 0.062	p = 0.806	F <sub>(1,33)</sub> = 0.062	p = 0.806
droga	F <sub>(1,33)</sub> = 3.765	p = 0.061	F <sub>(1,33)</sub> = 3.765	p = 0.061	F <sub>(1,33)</sub> = 3.765	p = 0.061

**Tabla 4. La memoria a corto plazo no es afectada por la exposición a ANF o por el bloqueo de los R-AT<sub>1</sub>.** La tabla muestra los parámetros estadísticos obtenidos en el análisis del test de reconocimiento de objetos nuevos en los cuatro grupos experimentales del protocolo experimental 1.

## 5 Los R-AT<sub>1</sub> participan en el desarrollo de la alteración de la memoria de trabajo inducida por anfetamina

Objetivo 1.4. Evaluar la participación de los receptores AT<sub>1</sub> en el desarrollo y mantenimiento de la alteración en la memoria de trabajo inducida por la exposición repetida a anfetamina.

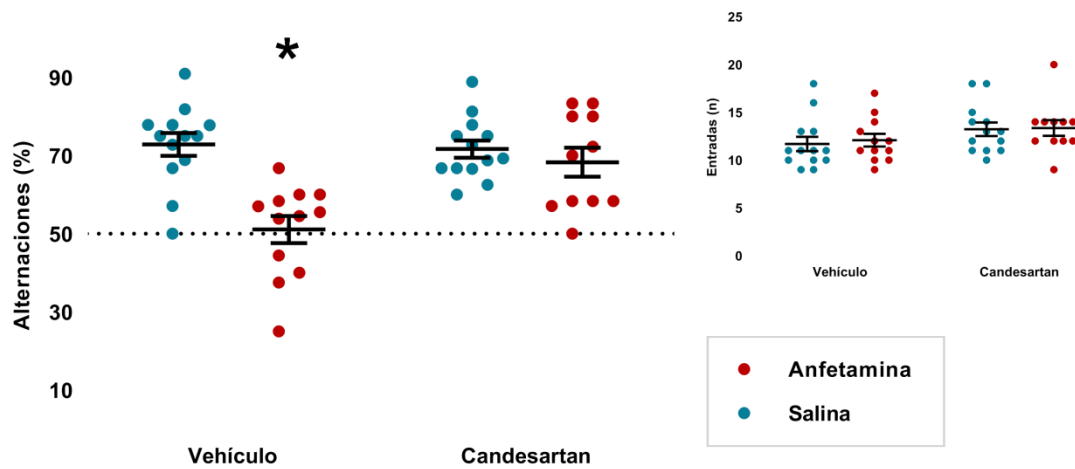
A fin de evaluar si el protocolo de exposición a ANF utilizado en el presente trabajo induce alteración de la memoria de trabajo y si los R-AT<sub>1</sub> participan en el desarrollo de este fenómeno, se evaluó el desempeño en el laberinto en Y elevado en condiciones basales en los animales de los 4 grupos experimentales (VEH-SAL, VEH-ANF, CAND-SAL y CAND-ANF) generados con el protocolo experimental 1. Se evaluó también la locomoción de los animales durante el test a fin de evaluar la

presencia de sesgos en los resultados relacionados con alteraciones en la locomoción debido a los tratamientos experimentales

La exposición a ANF promovió la alteración de la memoria de trabajo espacial evaluada como una disminución del porcentaje de alternaciones en el laberinto en Y elevado en condiciones basales 21 días después de la última exposición a la droga ([protocolo experimental 1](#)). A su vez, el antagonismo de R-AT<sub>1</sub> previno el efecto deletéreo sobre la memoria de trabajo inducido por ANF.

Se observó una significativa disminución del porcentaje de alternaciones en el laberinto en Y elevado en el grupo VEH-ANF comparado con el resto de los grupos (figura 18, tabla 5). El previo antagonismo de los R-AT<sub>1</sub> previno la alteración en la memoria de trabajo inducida por ANF, ya que no se observaron diferencias significativas entre los grupos controles (VEH-SAL y CAND-SAL) y el grupo CAND-ANF. No se observaron diferencias significativas entre los grupos controles.

Adicionalmente, no se observaron diferencias significativas en la actividad locomotora total (cuantificada como la suma de entradas a los brazos) descartando diferencias motoras entre los 4 grupos (inset figura 18, tabla 5).



**Figura 18. Los R-AT<sub>1</sub> participan en el desarrollo de la alteración de la memoria de trabajo inducida por ANF.** El gráfico muestra los parámetros analizados en el test de laberinto en Y elevado en los cuatro grupos experimentales del protocolo experimental 1. La figura principal muestra el porcentaje de alternaciones. La figura insertada muestra la locomoción durante el test. Los valores se expresan como la media  $\pm$  DEM, \*diferente del resto de los grupos ( $p < 0.05$ );  $n = 11 - 13$ .

ANOVA 2-vías	Alternaciones (%)		Entradas (n)		
	VEH-SAL	VEH-ANF	VEH-SAL	VEH-ANF	
Interacción	$F_{(1,45)} = 9.024$	$*p = 0.004$	$F_{(1,45)} = 0.031$	$p = 0.861$	
tratamiento	$F_{(1,45)} = 6.848$	$*p = 0.012$	$F_{(1,45)} = 3.675$	$p = 0.062$	
droga	$F_{(1,45)} = 16.81$	$*p < 0.001$	$F_{(1,45)} = 0.123$	$p = 0.723$	
Comparaciones	VEH-SAL	VEH-ANF	VEH-SAL	VEH-ANF	-

múltiples con test a posteriori de Tukey	VEH-SAL	CAND-SAL	p > 0.999	VEH-SAL	CAND-SAL	-
	VEH-SAL	CAND-ANF	p > 0.999	VEH-SAL	CAND-ANF	-
	VEH-ANF	CAND-SAL	*p < 0.001	VEH-ANF	CAND-SAL	-
	VEH-ANF	CAND-ANF	*p = 0.002	VEH-ANF	CAND-ANF	-
	CAND-SAL	CAND-ANF	p > 0.999	CAND-SAL	CAND-ANF	-

**Tabla 5. Los R-AT<sub>1</sub> participan en el desarrollo de la alteración de la memoria de trabajo inducida por ANF.** La tabla muestra los parámetros estadísticos obtenidos en el análisis del test de laberinto en Y elevado en los cuatro grupos experimentales del protocolo experimental 1. \*p < 0.05.

## 6 Los R-AT<sub>1</sub> participan en el mantenimiento de la alteración de la memoria de trabajo inducida por anfetamina

Con el objetivo de evaluar si los R-AT<sub>1</sub> participan en el mantenimiento de la alteración de la memoria de trabajo inducida por exposición a ANF, se evaluó el desempeño en el laberinto en Y elevado en condiciones basales en los animales de los 4 grupos experimentales (SAL-VEH, ANF-VEH, SAL-CAND y ANF-CAND) generados con el protocolo experimental 2. Se cuantificó también la locomoción de los animales durante el test a fin de evaluar la presencia de sesgos en los resultados relacionados con alteraciones en la locomoción debido a los tratamientos experimentales.

La exposición a ANF promovió la alteración de la memoria de trabajo espacial evaluada como una disminución del porcentaje de alternaciones en el laberinto en Y elevado en condiciones basales 21 días después de la última exposición a la droga ([protocolo experimental 2](#)). A su vez, el antagonismo de R-AT<sub>1</sub> durante el periodo de abstinencia revirtió el efecto deletéreo sobre la memoria de trabajo inducido por ANF.

Se observó una significativa disminución del porcentaje de alternaciones en el laberinto en Y elevado en el grupo ANF-VEH comparado con su grupo control (SAL-VEH) (figura 19, tabla 6). El antagonismo de los R-AT<sub>1</sub> revirtió la alteración en la memoria de trabajo inducida por ANF, ya que no se observaron diferencias significativas entre los grupos controles (SAL-VEH y SAL-CAND) y el grupo ANF-CAND. No se observaron diferencias significativas entre los grupos controles.

Adicionalmente, no se observaron diferencias significativas en la actividad locomotora total (cuantificada como la suma de entradas a los brazos) descartando diferencias motoras entre los 4 grupos (inset figura 19, tabla 6).

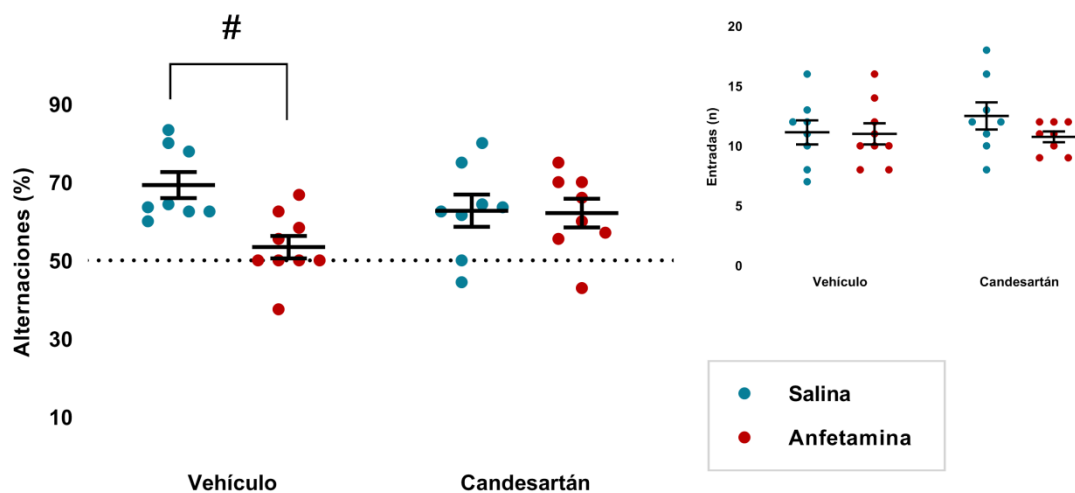


Figura 19. Los R-AT<sub>1</sub> participan en el mantenimiento de la alteración de la memoria de trabajo inducida por ANF. El gráfico muestra los parámetros analizados en el test de laberinto en Y elevado en los cuatro grupos experimentales del protocolo experimental 2. La figura principal muestra el porcentaje de alternaciones. La figura insertada muestra la locomoción durante el test. Los valores se expresan como la media  $\pm$  DEM, # diferente al grupo SAL-VEH ( $p < 0.05$ );  $n = 8 - 9$ .

ANOVA 2-vías	Alternaciones (%)			Entradas (n)		
	F	p		F	p	
Interacción	$F_{(1,29)} = 4.774$	$*p = 0.037$		$F_{(1,29)} = 0.802$	$p = 0.378$	
tratamiento	$F_{(1,29)} = 0.090$	$p = 0.766$		$F_{(1,29)} = 0.384$	$p = 0.540$	
droga	$F_{(1,29)} = 5.572$	$*p = 0.025$		$F_{(1,29)} = 1.068$	$p = 0.310$	
Comparaciones múltiples con test a posteriori de Tukey	SAL-VEH	ANF-VEH	$*p = 0.014$	SAL-VEH	ANF-VEH	-
	SAL-VEH	SAL-CAND	$p = 0.562$	SAL-VEH	SAL-CAND	-
	SAL-VEH	ANF-CAND	$p = 0.488$	SAL-VEH	ANF-CAND	-
	ANF-VEH	SAL-CAND	$p = 0.246$	ANF-VEH	SAL-CAND	-
	ANF-VEH	ANF-CAND	$p = 0.302$	ANF-VEH	ANF-CAND	-
	SAL-CAND	ANF-CAND	$p = 0.999$	SAL-CAND	ANF-CAND	-

Tabla 6. Los R-AT<sub>1</sub> participan en el mantenimiento de la alteración de la memoria de trabajo inducida por ANF. La tabla muestra los parámetros estadísticos obtenidos en el análisis del test de laberinto en Y elevado en los cuatro grupos experimentales del protocolo experimental 2. \* $p < 0.05$ .

## 7 Los R-AT<sub>1</sub> participan en el mantenimiento de la sensibilización neuroquímica inducida por anfetamina

Objetivo 2. Evaluar la participación de los receptores AT<sub>1</sub> en la sensibilización neuroquímica inducida por exposición repetida a anfetamina.

Objetivo 2.1. Estudiar la participación de los receptores AT<sub>1</sub> en la reversión de la sensibilización neuroquímica inducida por exposición repetida a anfetamina.



A fin de evaluar si el antagonismo de los R-AT<sub>1</sub> revierte la sensibilización neuroquímica inducida por exposición a ANF y por lo tanto participan activamente en el mantenimiento de la sensibilización, se cuantificó la actividad cerebral regional mediante la inmunomarcación del gen de activación temprana c-FOS luego de una dosis desafío de ANF en animales previamente expuestos a SAL o ANF que luego en el periodo de abstinencia recibieron VEH o CAND según el protocolo experimental 2.

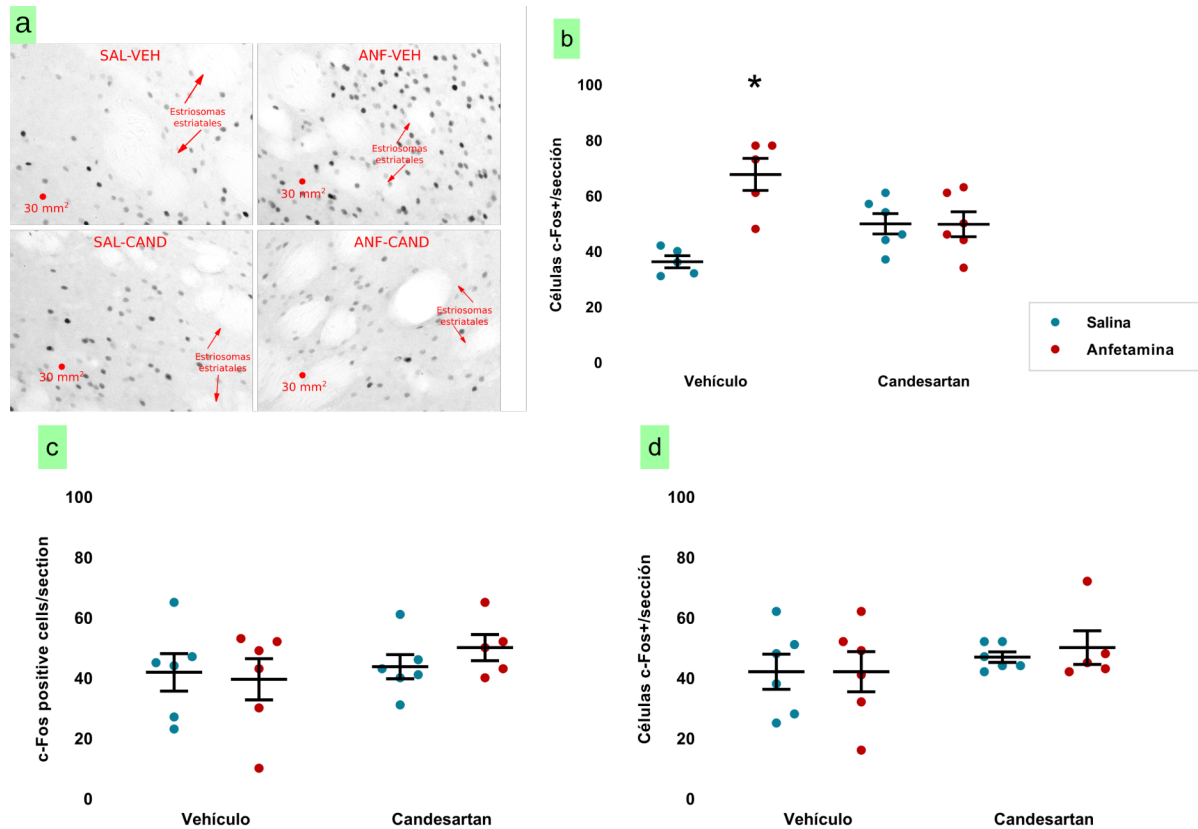
La exposición previa a ANF indujo sensibilización neuroquímica en Cpu, en respuesta a la reexposición al psicoestimulante, evaluada como un aumento del número de células reactivas a c-Fos (marcador ampliamente reconocido de la actividad neuronal). El antagonismo de los R-AT<sub>1</sub> durante el periodo de abstinencia revirtió dicha sensibilización neuroquímica en Cpu, lo que sugiere que estos receptores participan activamente en el mantenimiento de la sensibilización. Por otro lado, en las subdivisiones PL e IL de la CxPF la reexposición a ANF no indujo respuestas diferenciales entre los 4 grupos experimentales.

Luego de una administración desafío de ANF, se observó una hiperactivación neuronal en Cpu en el grupo ANF-VEH al ser comparado con el resto de los grupos experimentales (figura 20; tabla 7). No se observaron diferencias significativas entre los grupos controles (SAL-VEH y SAL-CAND) y el grupo ANF-CAND. No se observaron diferencias significativas entre los grupos controles.

La exposición previa a ANF o el bloqueo de R-AT<sub>1</sub> no generaron cambios significativos en la activación neuronal de CxPF-PL y en CxPF-IL entre los cuatro grupos experimentales luego de una reexposición a ANF. En este sentido, no se observaron diferencias estadísticamente significativas al analizar la influencia de los factores “droga”, “tratamiento” e “interacción” (figura 20, tabla 7).

ANOVA 2-vías	Caudado Putamen			Corteza Prefrontal Prelímbica			Corteza Prefrontal Infralímbica		
Interacción	<b>F<sub>(1,18)</sub> = 13.82</b>		<b>*p = 0.002</b>	F <sub>(1,19)</sub> = 0.596	p = 0.450		F <sub>(1,19)</sub> = 0.089	p = 0.769	
tratamiento	F <sub>(1,18)</sub> = 0.256		p = 0.619	F <sub>(1,19)</sub> = 1.207	p = 0.286		F <sub>(1,19)</sub> = 1.460	p = 0.242	
droga	<b>F<sub>(1,18)</sub> = 13.53</b>		<b>*p = 0.002</b>	F <sub>(1,19)</sub> = 0.127	p = 0.726		F <sub>(1,19)</sub> = 0.089	p = 0.769	
Comparaciones múltiples con test a posteriori de Tukey	<b>SAL-VEH</b>	<b>ANF-VEH</b>	<b>*p &lt; 0.001</b>	SAL-VEH	ANF-VEH	-	SAL-VEH	ANF-VEH	-
	SAL-VEH	SAL-CAND	p = 0.142	SAL-VEH	SAL-CAND	-	SAL-VEH	SAL-CAND	-
	SAL-VEH	ANF-CAND	p = 0.150	SAL-VEH	ANF-CAND	-	SAL-VEH	ANF-CAND	-
	<b>ANF-VEH</b>	<b>SAL-CAND</b>	<b>*p = 0.038</b>	ANF-VEH	SAL-CAND	-	ANF-VEH	SAL-CAND	-
	<b>ANF-VEH</b>	<b>ANF-CAND</b>	<b>*p = 0.036</b>	ANF-VEH	ANF-CAND	-	ANF-VEH	ANF-CAND	-
	SAL-CAND	ANF-CAND	p > 0.999	SAL-CAND	ANF-CAND	-	SAL-CAND	ANF-CAND	-

**Tabla 7. Los R-AT<sub>1</sub> participan en el mantenimiento de la sensibilización neuroquímica inducida por ANF.** La tabla muestra los parámetros estadísticos obtenidos en la inmunohistoquímica de cFOS en los cuatro grupos experimentales del protocolo experimental 2. \*p < 0.05.



**Figura 20. Los R-AT<sub>1</sub> participan en el mantenimiento de la sensibilización neuroquímica inducida por ANF.** El gráfico muestra los parámetros analizados en la inmunohistoquímica de c-FOS en los cuatro grupos experimentales del protocolo experimental 2. Figura representativa de la activación neuronal en CPu (a). Número de células cFos+ en CPu (b). Número de células cFos+ en CxPF-PL(c). Número de células cFos+ en CxPF-IL(d). Los valores se expresan como la media ± DEM, \*diferente del resto de los grupos (p < 0.05); n = 5 - 6.

## 8 El antagonismo de los R-AT<sub>1</sub> induce un incremento transiente de la velocidad de recaptación de dopamina estriatal

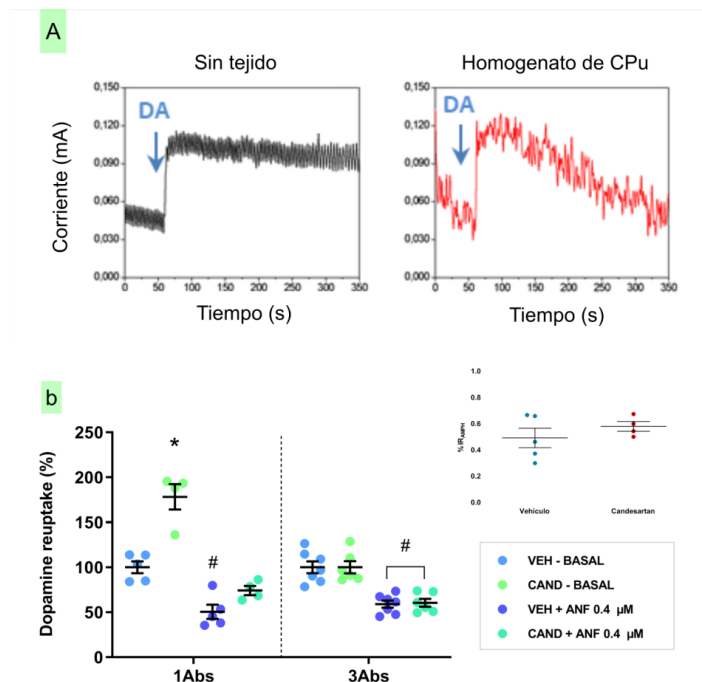
Objetivo 2.2. Determinar los cambios en la cinética de recaptación de dopamina in vitro inducidos por el bloqueo de receptores AT<sub>1</sub> y por anfetamina.

Con el objetivo de evaluar si el antagonismo de los R-AT<sub>1</sub> modula la cinética de recaptación de DA en CPu, se cuantificó la velocidad de desaparición de un pulso de DA en homogenato estriatal 1 y 3 días después de la última administración de VEH o CAND en condiciones basales y en presencia de ANF (0.4 μM) según los protocolos experimentales 3a y 3b. Además se calculó el proporción de inhibición de la velocidad de recaptación de DA por la presencia de ANF ( $I_{ANF}$ ) en los grupos experimentales VEH y CAND luego de 1 día de abstinencia.

El antagonismo de R-AT<sub>1</sub> generó un aumento de la velocidad de recaptación 1 día después de la última administración de VEH o CAND, tanto en condiciones basales como en presencia de ANF. Por otro lado, CAND no indujo cambios significativos en la cinética de recaptación de DA luego de 3 días de la última administración al ser comparado con su grupo control, lo que sugiere un aumento transiente en la velocidad de recaptación de DA inducido por el antagonismo de R-AT<sub>1</sub>. No se observaron cambios significativos inducidos por la administración de VEH o CAND en la proporción de inhibición de la velocidad de recaptación de DA en presencia de ANF.

La administración de una dosis desafío de ANF (0.4 μM) indujo una significativa reducción de la velocidad de recaptación de DA (figura 21, tabla 8). Se observó una interacción estadísticamente significativa entre los factores abstinencia, desafío y tratamiento; donde el antagonismo previo de los R-AT<sub>1</sub> luego de 1 día de abstinencia (grupo experimental: CAND-BASAL-1ABS) indujo un significativo incremento en la velocidad de recaptación, de aproximadamente el doble, observándose diferencias estadísticamente significativas entre el grupo CAND-BASAL-1ABS y el resto de los grupos. Luego de 1 día de abstinencia, el pretratamiento con CAND previno la reducción de la recaptación de DA inducida por el desafío de ANF (0.4 μM), dado que no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos VEH-BASAL-1ABS y CAND-ANF-1ABS. Por el contrario, luego de 3 días de abstinencia el pretratamiento con CAND no atenuó la disminución de la velocidad de recaptación de DA inducida por la dosis desafío de DA ya que el grupo CAND-ANF-3ABS mostró una significativa reducción de la velocidad de recaptación de DA al ser comparado con el grupo CAND-BASAL-3ABS. Luego de 3 días de abstinencia, no se observaron diferencias significativas entre los grupos CAND-BASAL-3ABS y CAND-BASAL-3ABS.

No se observaron diferencias en la proporción de inhibición de la velocidad de recaptación de DA por la presencia de ANF entre los grupos VEH y CAND luego de 1 día de la última administración (p=0.366 (t-test); figura 21, tabla 8).



**Figura 21. El antagonismo de los R-AT<sub>1</sub> incrementa la velocidad de recaptación de dopamina estriatal.** El gráfico muestra el porcentaje de recaptación de DA en los ocho grupos experimentales de los protocolos 3a y 3b. Imagen representativa de la velocidad de recaptación de DA vs tiempo en ausencia y presencia de tejido (a). Porcentaje de recaptación (b). Figura insertada en b muestran la inhibición de la velocidad de recaptación. Los valores se expresan como la media ± DEM, \*diferente del resto de los grupos, #diferente de los grupos VEH-BASAL-1ABS, CAND-BASAL-1ABS, VEH-BASAL-3ABS y CAND-BASAL-3ABS ( $p < 0.05$ );  $n = 4 - 7$ .

ANOVA 3-vías	Velocidad de desaparición de dopamina (%)		
Abstinencia	$F_{(1,36)} = 17.74$		$*p < 0.001$
Desafío	$F_{(1,36)} = 139.9$		$*p < 0.001$
Tratamiento	$F_{(1,36)} = 27.47$		$*p < 0.001$
Abstinencia * Desafío	$F_{(1,36)} = 13.63$		$*p < 0.001$
Abstinencia * Tratamiento	$F_{(1,36)} = 25.68$		$*p < 0.001$
Desafío * Tratamiento	$F_{(1,36)} = 7.186$		$*p = 0.011$
Abstinencia * Desafío * Tratamiento	$F_{(1,36)} = 8.047$		$*p = 0.007$
Comparaciones múltiples con test a posteriori de Tukey	VEH-BASAL-1Abs	CAND-BASAL-1ABS	$*p < 0.001$
	VEH-BASAL-1ABS	VEH-ANF-1ABS	$*p < 0.001$
	VEH-BASAL-1ABS	CAND-ANF-1ABS	$p = 0.275$
	VEH-BASAL-1ABS	CAND-BASAL-3ABS	$p > 0.999$
	VEH-BASAL-1ABS	CAND-BASAL-3ABS	$p > 0.999$
	VEH-BASAL-1ABS	VEH-ANF-3ABS	$*p = 0.002$
	VEH-BASAL-1ABS	CAND-ANF-3ABS	$*p = 0.006$
	CAND-BASAL-1ABS	VEH-ANF-1ABS	$*p < 0.001$
	CAND-BASAL-1ABS	CAND-ANF-1ABS	$*p < 0.001$
	CAND-BASAL-1ABS	CAND-BASAL-3ABS	$*p < 0.001$
	CAND-BASAL-1ABS	CAND-BASAL-3ABS	$*p < 0.001$
	CAND-BASAL-1ABS	VEH-ANF-3ABS	$*p < 0.001$
	CAND-BASAL-1ABS	CAND - ANF 0.4 3Abs	$*p < 0.001$
	VEH-ANF-1ABS	CAND-ANF-1ABS	$p = 0.375$
	VEH-ANF-1ABS	CAND-BASAL-3ABS	$*p < 0.001$
VEH-ANF-1ABS	CAND-BASAL-3ABS	$*p < 0.001$	

VEH-ANF-1ABS	VEH-ANF-3ABS	p = 0.984
VEH-ANF-1ABS	CAND-ANF-3ABS	p = 0.965
CAND-ANF-1ABS	CAND-BASAL-3ABS	p = 0.203
CAND-ANF-1ABS	CAND-BASAL-3ABS	p = 0.229
CAND-ANF-1ABS	VEH-ANF-3ABS	p = 0.795
CAND-ANF-1ABS	CAND-ANF-3ABS	p = 0.888
CAND-BASAL-3ABS	CAND-BASAL-3ABS	p > 0.999
<b>CAND-BASAL-3ABS</b>	<b>VEH-ANF-3ABS</b>	<b>*p &lt; 0.001</b>
<b>CAND-BASAL-3ABS</b>	<b>CAND-ANF-3ABS</b>	<b>*p = 0.002</b>
<b>CAND-BASAL-3ABS</b>	<b>VEH-ANF-3ABS</b>	<b>*p = 0.001</b>
<b>CAND-BASAL-3ABS</b>	<b>CAND-ANF-3ABS</b>	<b>*p = 0.003</b>
VEH-ANF-3ABS	CAND-ANF-3ABS	p > 0.999

**Tabla 8. El antagonismo de los R-AT<sub>1</sub> incrementa la velocidad de recaptación de dopamina estriatal.** La tabla muestra los parámetros estadísticos obtenidos en cuantificación de la velocidad de recaptación de DA en CPu en los ocho grupos experimentales de los protocolos experimentales 3a y 3b. \*p < 0.05.

## 9 Los R-AT<sub>1</sub> participan en la gliosis cortical inducida por anfetamina

Objetivo 3. Analizar la participación de los receptores AT<sub>1</sub> en alteraciones gliales, oxidativas y vasculares inducidas por la exposición repetida a anfetamina.

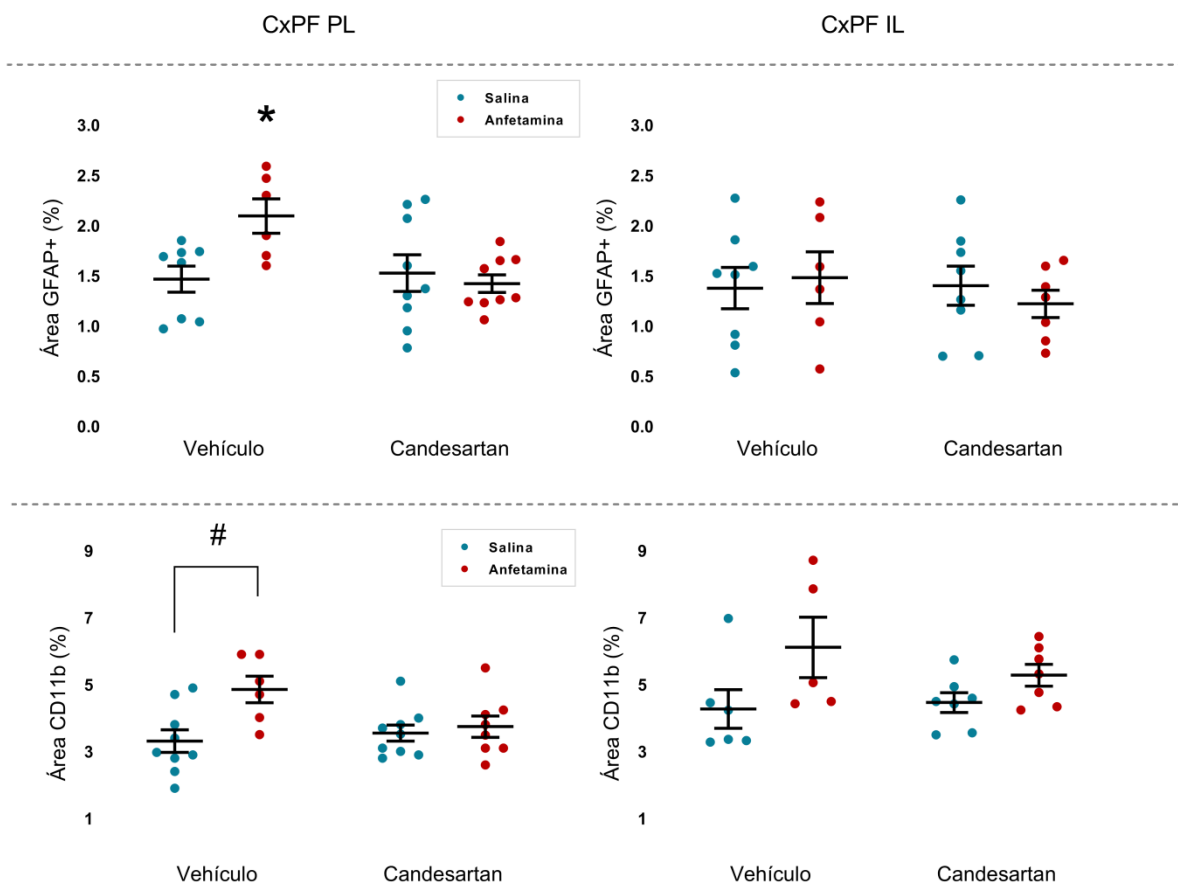
Objetivo 3.1. Evaluar el rol de los receptores AT<sub>1</sub> en la reactividad astrogliar y microglial inducida por exposición repetida a anfetamina en áreas cerebrales relevantes para la memoria de trabajo.

A fin de evaluar si los R-AT<sub>1</sub> participan en la reactividad glial inducida por la exposición a ANF, se cuantificó la inmunomarcación de GFAP y CD11b como marcadores de reactividad astrogliar y microglial en condiciones basales 21 días después de la última exposición ANF en la CxPF-PL, CxPF-IL, CPu y NAcc según el [protocolo experimental 1](#).

ANF indujo un aumento significativo de la reactividad astrogliar y microglial en la CxPF-PL mientras que no se observaron diferencias en otras áreas cerebrales como la CxPF-IL, CPu y NAcc. El aumento en la reactividad glial inducida por ANF en la CxPF-PL fue prevenida por la administración de CAND, lo que indica que los R-AT<sub>1</sub> participan en la generación de estas alteraciones.

Se observó un aumento significativo del área ocupada por GFAP en la CxPF-PL del grupo VEH-ANF cuando se comparó con los grupos VEH-SAL y CAND-ANF (figura 22, tabla 9). No se observaron diferencias significativas al comparar el área ocupada por GFAP del grupo CAND-ANF y los grupos controles. Similarmente, el grupo VEH-ANF presentó un aumento significativo del área ocupada por CD11b al ser comparado con el grupo VEH-SAL. No se observaron diferencias significativas entre el grupo VEH-ANF y CAND-ANF y entre el grupo CAND-ANF y CAND-SAL.

Al comparar el área ocupada por GFAP y CD11b en la CxPF-IL, CPu y NAcc, no se observaron diferencias significativas entre los grupos en las áreas cerebrales analizadas con ninguna de las dos inmunomarcaciones realizadas (figura 23, tabla 10).



**Figura 22. Los R-AT<sub>1</sub> participan en la gliosis cortical inducida por ANF.** El gráfico muestra los parámetros analizados en la inmunohistoquímica de GFAP y CD11b en los cuatro grupos experimentales del protocolo experimental 1 en CxPF-PL e IL. Porcentaje de expresión de GFAP en CxPF-PL (izquierda-arriba). Porcentaje de expresión de GFAP en CxPF-IL (derecha-arriba). Porcentaje de expresión de CD11b en CxPF-PL (izquierda-abajo). Porcentaje de expresión de CD11b en CxPF-IL (derecha-abajo). Los valores se expresan como la media ± DEM, \*diferente al resto de los grupos, #diferente al grupo SAL-VEH ( $p < 0.05$ );  $n = 5 - 9$ .

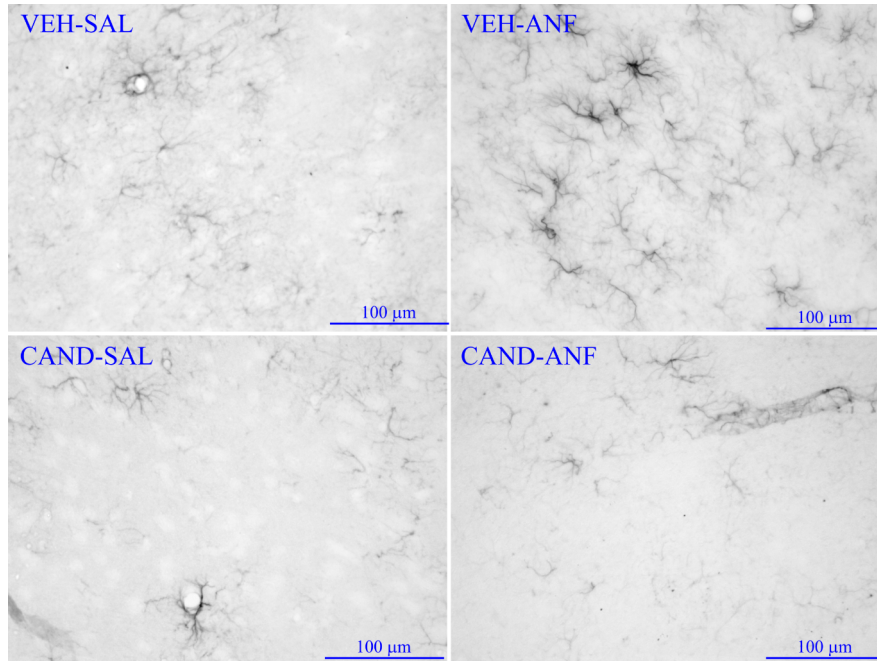


Figura 23. Inmunohistoquímica de GFAP en CxPF-PL. Microfotografías (400X) representativas de los 4 grupos experimentales.

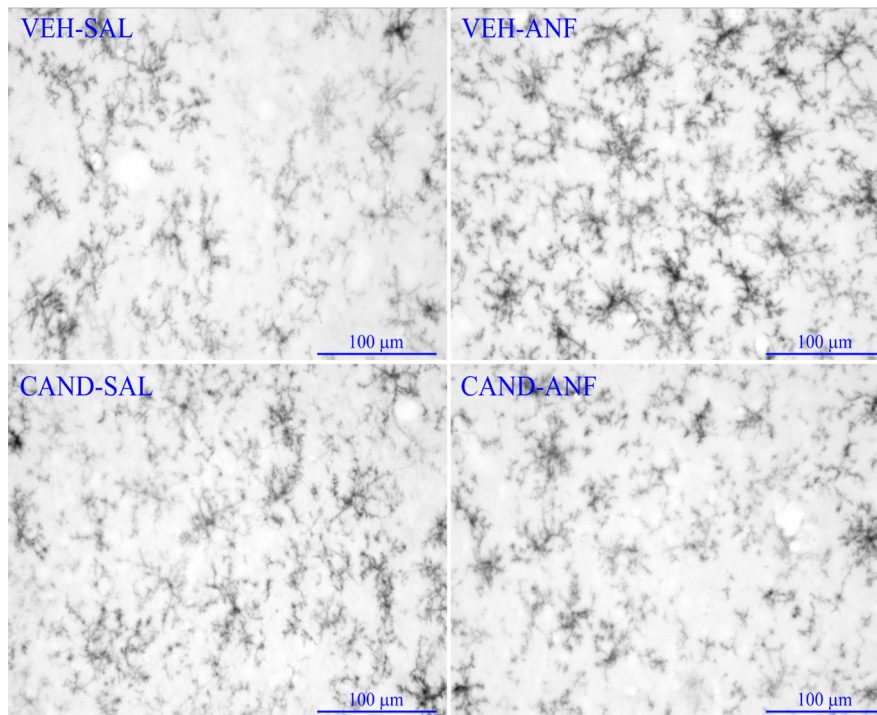


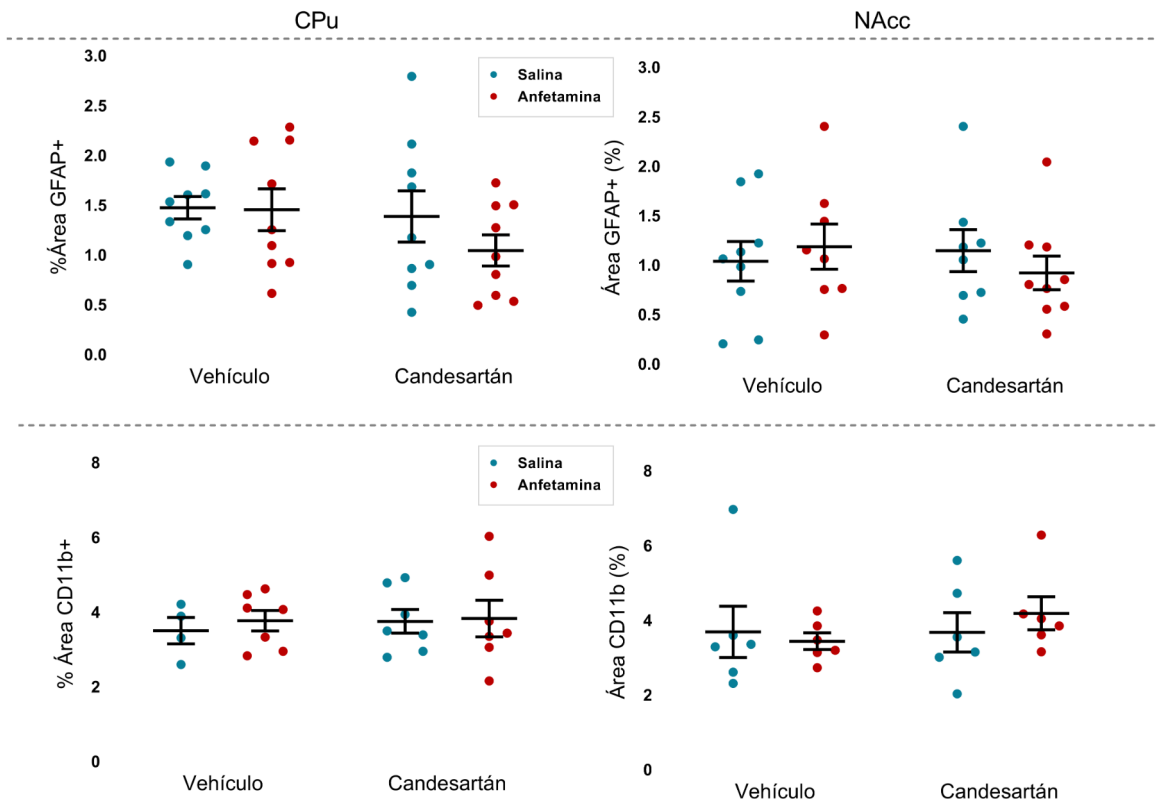
Figura 24. Inmunohistoquímica de CD11b en CxPF-PL. Microfotografías (400X) representativas de los 4 grupos experimentales.

ANOVA 2 vías	% área GFAP+ (CxPF-PL)	% área GFAP+ (CxPF-IL)	% área CD11b+ (CxPF-PL)	% área CD11b+ (CxPF-IL)
VEH SAL	1.465 ± 0.130 (n=8)	1.376 ± 0.206 (n=8)	3.308 ± 0.335 (n=9)	4.270 ± 0.578 (n=6)
VEH ANF	2.093 ± 0.170 (n=6)	1.480 ± 0.256 (n=6)	4.853 ± 0.400 (n=6)	6.108 ± 0.905 (n=5)
CAND	1.524 ± 0.182 (n=9)	1.401 ± 0.194 (n=8)	3.546 ± 0.241 (n=9)	4.460 ± 0.294 (n=7)

SAL							
CAND							
ANF							
	1.421 ± 0.088 (n=9)	1.220 ± 0.136 (n=7)	3.741 ± 0.318 (n=8)	5.277 ± 0.327 (n=7)			
Int.	F <sub>(1,28)</sub> = <b>6.122</b> *p=0.020	F <sub>(1,25)</sub> = 0.501 p=0.486	F <sub>(1,28)</sub> = <b>4.375</b> *p=0.046	F <sub>(1,21)</sub> = 0.972 p=0.335			
Trat.	F <sub>(1,28)</sub> = <b>4.294</b> *p=0.048	F <sub>(1,25)</sub> = 0.343 p=0.563	F <sub>(1,28)</sub> = 1.828 p=0.187	F <sub>(1,21)</sub> = 0.542 p=0.542			
Droga	F <sub>(1,28)</sub> = 3.152 p=0.087	F <sub>(1,25)</sub> = 0.037 p=0.849	F <sub>(1,28)</sub> = <b>7.254</b> *p=0.012	F <sub>(1,21)</sub> = <b>6.573</b> *p=0.018			
	<b>VEH VEH</b> *p=0.041	VEH VEH -	<b>VEH VEH</b> *p=0.018	VEH VEH -			
	<b>SAL ANF</b>	SAL ANF -	<b>SAL ANF</b>	SAL ANF -			
	VEH CAND p=0.991	VEH CAND -	VEH CAND p=0.942	VEH CAND -			
	SAL SAL	SAL SAL -	SAL SAL	SAL SAL -			
Tukey	VEH CAND p=0.996	VEH CAND -	VEH CAND p=0.757	VEH CAND -			
post-	SAL ANF	SAL ANF -	SAL ANF	SAL ANF -			
hoc	VEH CAND p=0.064	VEH CAND -	<b>VEH CAND</b> *p=0.048	VEH CAND -			
	ANF SAL	ANF SAL -	<b>ANF SAL</b>	ANF SAL -			
	<b>VEH CAND</b> *p=0.022	VEH CAND -	VEH CAND p=0.126	VEH CAND -			
	<b>ANF ANF</b>	ANF ANF -	ANF ANF	ANF ANF -			
	CAND CAND p=0.951	CAND CAND -	CAND CAND p=0.970	CAND CAND -			
	SAL ANF	SAL ANF -	SAL ANF	SAL ANF -			

**Tabla 9. Los R-AT<sub>1</sub> participan en la gliosis cortical inducida por ANF.** La tabla muestra los parámetros estadísticos obtenidos en la inmunohistoquímica de GFAP y CD11b en CxPF-PL e IL en los cuatro grupos experimentales del protocolo experimental 1. \*p < 0.05.





**Figura 25. ANF no induce cambios en la expresión de GFAP y CD11b en CPU y NAcc.** El gráfico muestra los parámetros analizados en la inmunohistoquímica de GFAP y CD11b en los cuatro grupos experimentales del protocolo experimental 1 en CPU y NAcc. Porcentaje de expresión de GFAP en CPU (izquierda-arriba). Porcentaje de expresión de GFAP en NAcc (derecha-arriba). Porcentaje de expresión de CD11b en CPU (izquierda-abajo). Porcentaje de expresión de CD11b en NAcc (derecha-abajo). Los valores se expresan como la media  $\pm$  DEM, \*diferente al resto de los grupos, #diferente al grupo SAL-VEH ( $p < 0.05$ );  $n = 4 - 9$ .

ANOVA	% área GFAP+ (CPU)	% área GFAP+ (NAcc)	% área CD11b+ (CPU)	% área CD11b+ (NAcc)
2 vías				
VEH	1.470 $\pm$ 0.112 (n=9)	1.036 $\pm$ 0.201 (n=9)	3.493 $\pm$ 0.354 (n=4)	3.680 $\pm$ 0.686 (n=6)
SAL				
VEH	1.451 $\pm$ 0.210 (n=9)	1.184 $\pm$ 0.228 (n=8)	3.759 $\pm$ 0.275 (n=7)	3.430 $\pm$ 0.222 (n=6)
ANF				
CAND				
SAL	1.382 $\pm$ 0.257 (n=9)	1.143 $\pm$ 0.213 (n=8)	3.743 $\pm$ 0.317 (n=7)	3.667 $\pm$ 0.524 (n=6)
CAND				
ANF	1.041 $\pm$ 0.156 (n=9)	0.918 $\pm$ 0.170 (n=9)	3.817 $\pm$ 0.487 (n=7)	4.175 $\pm$ 0.444 (n=6)
Int.	F <sub>(1,32)</sub> = 0.707    p = 0.407	F <sub>(1,30)</sub> = 0.846    p = 0.365	F <sub>(1,31)</sub> = 0.060    p = 0.808	F <sub>(1,20)</sub> = 0.580    p = 0.455
Trat.	F <sub>(1,32)</sub> = 1.687    p = 0.203	F <sub>(1,30)</sub> = 0.154    p = 0.698	F <sub>(1,31)</sub> = 0.157    p = 0.692	F <sub>(1,20)</sub> = 0.540    p = 0.471
Droga	F <sub>(1,32)</sub> = 0.883    p = 0.355	F <sub>(1,30)</sub> = 0.036    p = 0.852	F <sub>(1,31)</sub> = 0.190    p = 0.667	F <sub>(1,20)</sub> = 0.067    p = 0.798

**Tabla 10. ANF no induce cambios en la expresión de GFAP y CD11b en CPu y NAcc.** La tabla muestra los parámetros estadísticos obtenidos en la inmunohistoquímica de GFAP y CD11b en CPu y Nacc en los cuatro grupos experimentales del protocolo experimental 1.

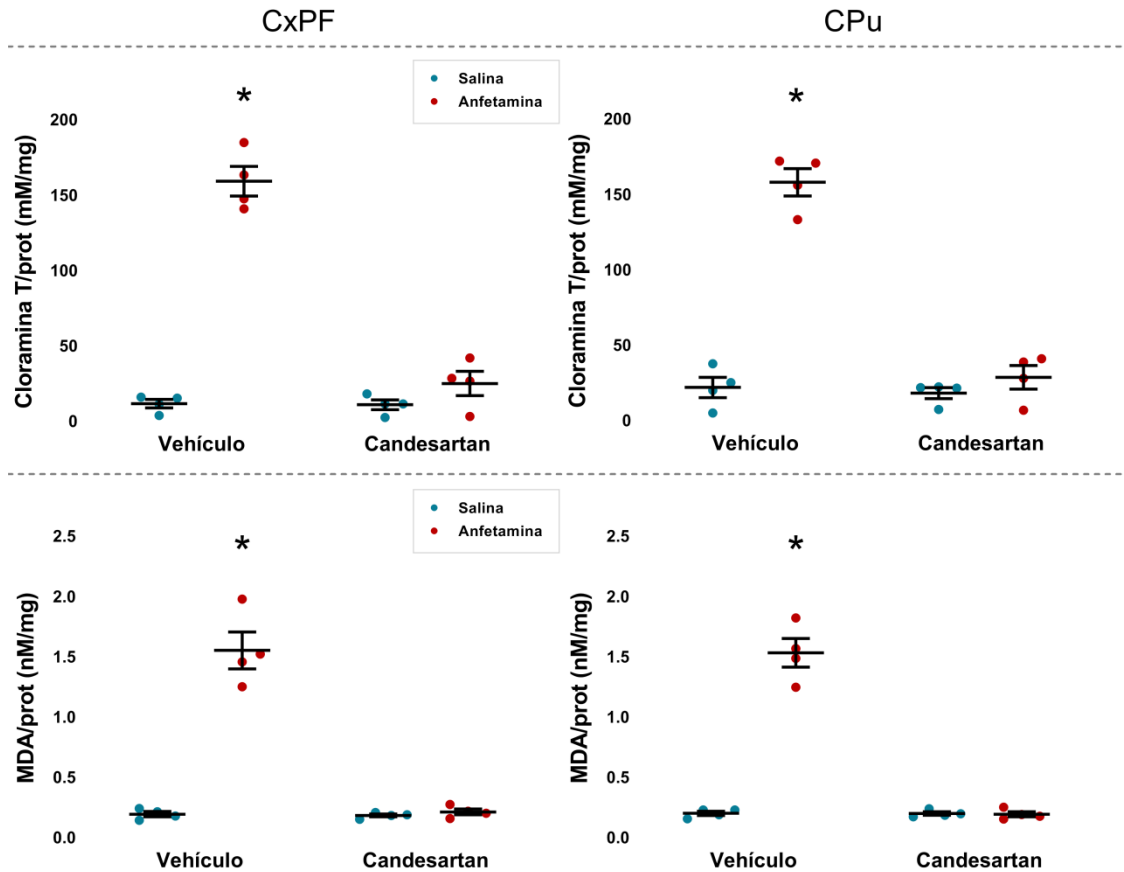
## **10 El antagonismo de los R-AT<sub>1</sub> previene el estrés oxidativo inducido por anfetamina**

Objetivo 3.2. Estudiar la participación de los receptores AT<sub>1</sub> en la producción de estrés oxidativo inducido por la exposición repetida a anfetamina.

A fin de evaluar si los R-AT<sub>1</sub> participan en el estrés oxidativo inducido por ANF, se cuantificó la peroxidación lipídica y proteica 30 minutos después de la última exposición a SAL o ANF en CxPF, CPu, HPC y CxM según el protocolo experimental 4.

ANF indujo un extensivo aumento de la peroxidación tanto proteica como lipídica en las 4 áreas cerebrales estudiadas. La administración de CAND antes y durante las exposiciones al psicoestimulante previno la peroxidación en aquellos animales expuestos a ANF lo que indica que los R-AT<sub>1</sub> participan activamente en este proceso.

Se observó incremento significativo de la peroxidación proteica y lipídica en el grupo VEH-ANF en las 4 áreas cerebrales estudiadas (CxPF, CPu, CxM e HPC), evaluada por medio de la cuantificación de MDA y AOPP respectivamente, cuando se comparó con el resto de los grupos (figuras 24 y 25, tablas 11 y 12). No se observaron diferencias entre el grupo CAND-ANF y los grupos controles.

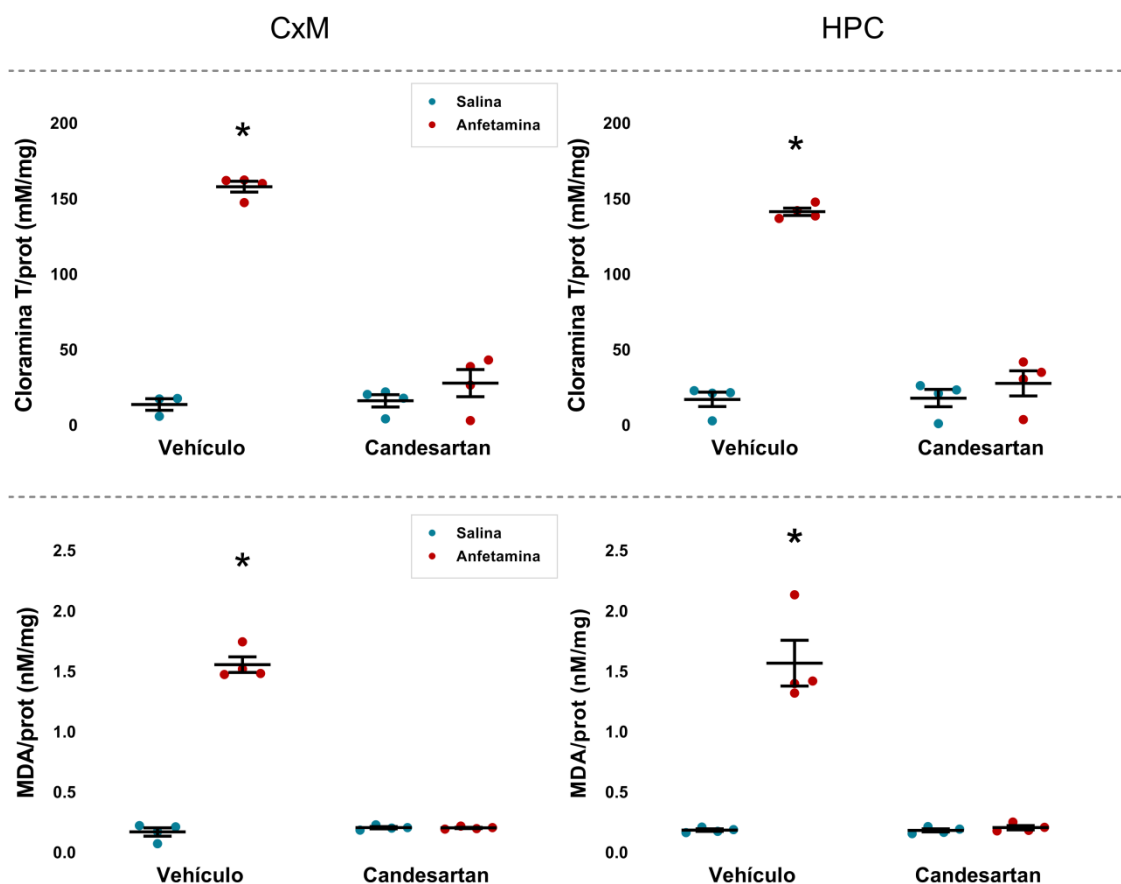


**Figura 26.** El antagonismo de los R-AT<sub>1</sub> previene el estrés oxidativo inducido por ANF en CxPF y CPu. El gráfico muestra los parámetros analizados en la medición del estrés oxidativo en los cuatro grupos experimentales del protocolo experimental 4 en CxPF y CPu. Cuantificación de cloramina T en CxPF (izquierda-arriba). Cuantificación de cloramina T en CPu (derecha-arriba). Cuantificación de MDA en CxPF (izquierda-abajo). Cuantificación de MDA en CPu (derecha-abajo). Los valores se expresan como la media  $\pm$  DEM, \*diferente al resto de los grupos, ( $p < 0.05$ );  $n = 4$ .

ANOVA 2 vías	Peroxidación lipídica: MDA/prot (nM/mg)			
	PFC	CPu	CxM	HPC
VEH SAL	0.192 $\pm$ 0.021 (n=4)	0.198 $\pm$ 0.017 (n=4)	0.167 $\pm$ 0.034 (n=4)	0.182 $\pm$ 0.010 (n=4)
VEH ANF	1.549 $\pm$ 0.153 (n=4)	1.528 $\pm$ 0.119 (n=4)	1.552 $\pm$ 0.064 (n=4)	1.565 $\pm$ 0.190 (n=4)
CAND SAL	0.181 $\pm$ 0.012 (n=4)	0.196 $\pm$ 0.015 (n=4)	0.202 $\pm$ 0.009 (n=4)	0.180 $\pm$ 0.013 (n=4)
CAND ANF	0.210 $\pm$ 0.024 (n=4)	0.191 $\pm$ 0.021 (n=4)	0.200 $\pm$ 0.006 (n=4)	0.202 $\pm$ 0.017 (n=4)
Int.	F <sub>(1,12)</sub> = 71.75 *p<0.001	F <sub>(1,12)</sub> = 118.9 *p<0.001	F <sub>(1,12)</sub> = 360.0 *p<0.001	F <sub>(1,12)</sub> = 50.65 *p<0.001
Trat.	F <sub>(1,12)</sub> = 74.09 *p<0.001	F <sub>(1,12)</sub> = 119.6 *p<0.001	F <sub>(1,12)</sub> = 324.1 *p<0.001	F <sub>(1,12)</sub> = 50.91 *p<0.001
Droga	F <sub>(1,12)</sub> = 78.15 *p<0.001	F <sub>(1,12)</sub> = 116.9 *p<0.001	F <sub>(1,12)</sub> = 357.9 *p<0.001	F <sub>(1,12)</sub> = 54.02 *p<0.001

Tukey post- hoc	VEH	VEH	*p<0.001	VEH	VEH	*p<0.001	VEH	VEH	*p<0.001	VEH	VEH	*p<0.001
	SAL	ANF		SAL	ANF		SAL	ANF		SAL	ANF	
	VEH	CAND	p>0.999	VEH	CAND	p>0.999	VEH	CAND	p=0.900	VEH	CAND	p>0.999
	SAL	SAL		SAL	SAL		SAL	SAL		SAL	SAL	
	VEH	CAND	p=0.998	VEH	CAND	p>0.999	VEH	CAND	p=0.914	VEH	CAND	p=0.999
	SAL	ANF		SAL	ANF		SAL	ANF		SAL	ANF	
	VEH	CAND	*p<0.001	VEH	CAND	*p<0.001	VEH	CAND	*p<0.001	VEH	CAND	*p<0.001
	ANF	SAL		ANF	SAL		ANF	SAL		ANF	ANF	
	VEH	CAND	*p<0.001	VEH	CAND	*p<0.001	VEH	CAND	*p<0.001	VEH	CAND	*p<0.001
	ANF	ANF		ANF	ANF		ANF	ANF		ANF	ANF	
	CAND	CAND	p=0.993	CAND	CAND	p>0.999	CAND	CAND	p>0.999	CAND	CAND	p=0.998
	SAL	ANF		SAL	ANF		SAL	ANF		SAL	ANF	

Tabla 11. El antagonismo de los R-AT<sub>1</sub> previene el estrés oxidativo inducido por ANF en CxPF y CPu. La tabla muestra los parámetros estadísticos obtenidos en la cuantificación del estrés oxidativo en CxPF-PL e IL en los cuatro grupos experimentales del protocolo experimental 4. \*p < 0.05.



**Figura 27. El antagonismo de los R-AT<sub>1</sub> previene el estrés oxidativo inducido por ANF en CxM e HPC.** El gráfico muestra los parámetros analizados en la medición del estrés oxidativo en los cuatro grupos experimentales del protocolo experimental 4 en CxM y HPC. Cuantificación de cloramina T en CxM (izquierda-arriba). Cuantificación de cloramina T en HPC (derecha-arriba). Cuantificación de MDA en CxM (izquierda-abajo). Cuantificación de MDA en HPC (derecha-abajo). Los valores se expresan como la media ± DEM, \*diferente al resto de los grupos, (p < 0.05); n = 3 - 4.

ANOVA 2 vías	Peroxidación Proteica: Cloramina T/prot (mM/mg)							
	PFC:		CPu		CxM		HPC	
VEH SAL	11.38 ± 2.787 (n=4)		21.67 ± 6.742 (n=4)		13.38 ± 3.888 (n=3)		16.80 ± 4.750 (n=4)	
VEH ANF	158.91 ± 9.809 (n=4)		157.71 ± 9.015 (n=4)		157.68 ± 3.562(n=4)		141.05 ± 2.364 (n=4)	
CAND SAL	10.66 ± 3.200 (n=4)		17.94 ± 3.651 (n=4)		15.84 ± 4.049 (n=4)		17.60 ± 5.722 (n=4)	
CAND ANF	24.80 ± 8.061 (n=4)		28.42 ± 7.820 (n=4)		27.58 ± 9.002 (n=4)		27.44 ± 8.332 (n=4)	
Int.	F (1, 12) = <b>99.29</b> *p<0.001		F (1, 12) = <b>78.35</b> *p<0.001		F (1, 11) = <b>126.3</b> *p<0.001		F (1, 12) = <b>100.4</b> *p<0.001	
Trat.	F (1, 12) = <b>101.4</b> *p<0.001		F (1, 12) = <b>87.94</b> *p<0.001		F (1, 11) = <b>117.2</b> *p<0.001		F (1, 12) = <b>97.66</b> *p<0.001	
Droga	F (1, 12) = <b>145.5</b> *p<0.001		F (1, 12) = <b>106.7</b> *p<0.001		F (1, 11) = <b>175.1</b> *p<0.001		F (1, 12) = <b>138.0</b> *p<0.001	
Tukey post- hoc	VEH	VEH	VEH	VEH	VEH	VEH	VEH	VEH
	SAL	ANF	SAL	ANF	SAL	ANF	SAL	ANF
	VEH	CAND	VEH	CAND	VEH	CAND	VEH	CAND
	SAL	SAL	SAL	SAL	SAL	SAL	SAL	SAL
	VEH	CAND	VEH	CAND	VEH	CAND	VEH	CAND
	SAL	ANF	SAL	ANF	SAL	ANF	SAL	ANF
VEH	CAND	VEH	CAND	VEH	CAND	VEH	CAND	
ANF	SAL	ANF	SAL	ANF	SAL	ANF	SAL	
VEH	CAND	VEH	CAND	VEH	CAND	VEH	CAND	
ANF	ANF	ANF	ANF	ANF	ANF	ANF	ANF	
CAND	CAND	CAND	CAND	CAND	CAND	CAND	CAND	
SAL	ANF	SAL	ANF	SAL	ANF	SAL	ANF	

**Tabla 12. El antagonismo de los R-AT<sub>1</sub> previene el estrés oxidativo inducido por ANF en CxM e HPC.** La tabla muestra los parámetros estadísticos obtenidos en la cuantificación del estrés oxidativo en CxM e HPC en los cuatro grupos experimentales del protocolo experimental 4. \*p < 0.05.

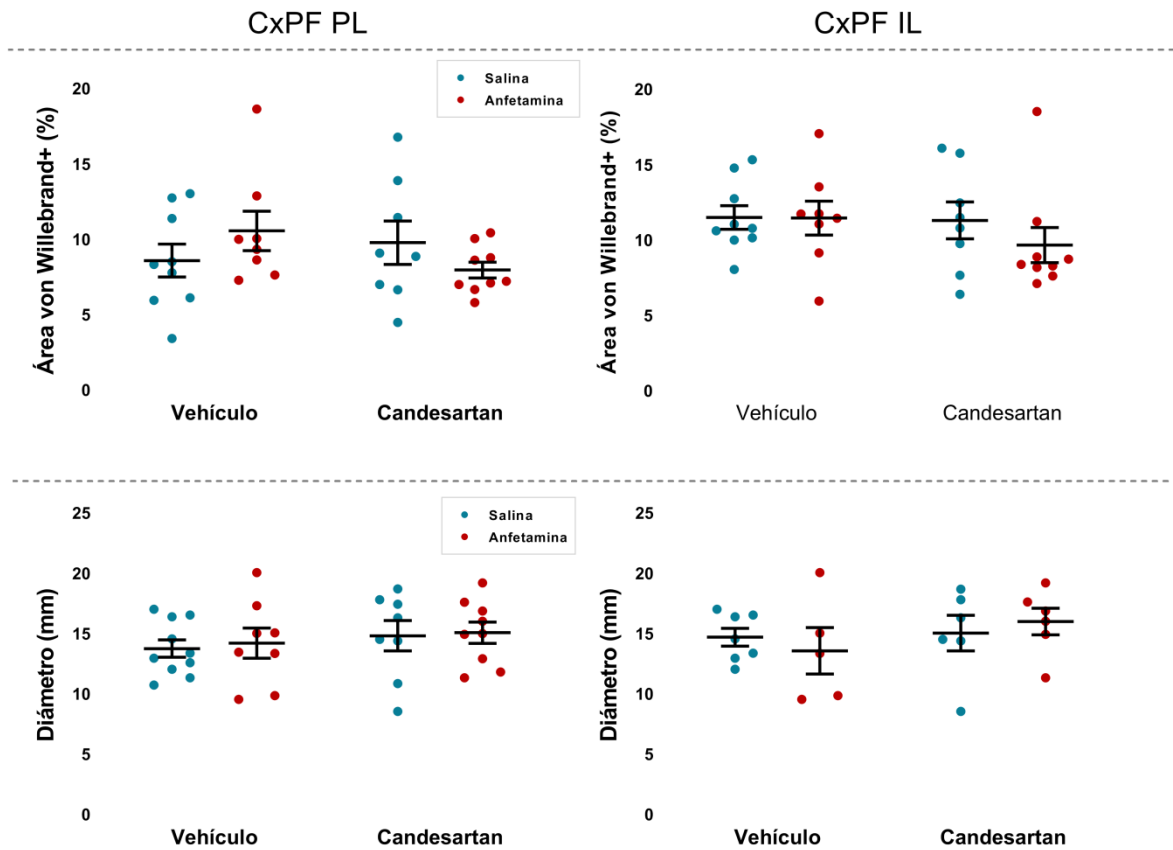
## 11 Los R-AT<sub>1</sub> participan en los cambios angioplásticos corticales inducidos por anfetamina

Objetivo 3.3. Estudiar el rol de los receptores AT<sub>1</sub> en los cambios angioplásticos inducidos por exposición repetida a anfetamina, en áreas cerebrales relevantes para la memoria de trabajo.

A fin de evaluar si la exposición a ANF induce cambios angioplásticos corticales y si los R-AT<sub>1</sub> participan de éstas alteraciones, se estudió la morfología microvascular mediante la inmunomarcación del FvW 21 días después de la última exposición a ANF en la CxPF-PL y la CxPF-IL según el [protocolo experimental 1](#). Se cuantificó el área ocupada por microvasos, el diámetro vascular, los puntos de ramificación y la tortuosidad vascular.

La exposición a ANF incrementó la ramificación de la microarquitectura vascular en la CxPF-IL y la administración previa de CAND previno esta alteración, lo que indica que los R-AT<sub>1</sub> participan en este fenómeno angioplástico inducido por ANF. Por otro lado, no se observaron diferencias significativas en el resto de los parámetros vasculares analizados ni en la CxPF-IL ni en la CxPF-PL.

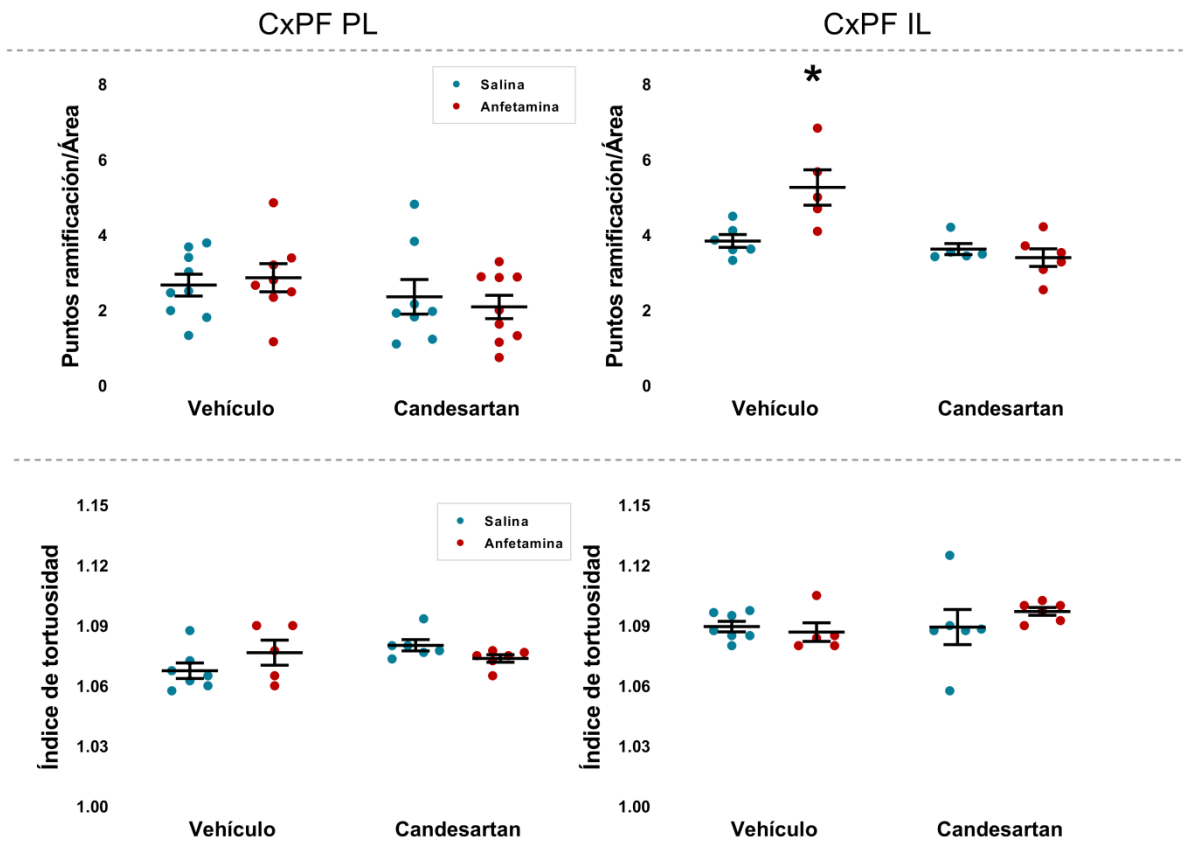
En la CxPF-IL se observó un aumento de los puntos de ramificación en el grupo VEH-ANF cuando se comparó con el resto de los grupos experimentales (figura 27, tabla 14), mientras que no se observaron diferencias significativas entre el grupo CAND-ANF y los grupos controles. Por otro lado, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en el resto de los parámetros analizados entre los 4 grupos experimentales, tanto en la CxPL-IL como en la CxPF-PL (figuras 26 y 27, tablas 13 y 14).



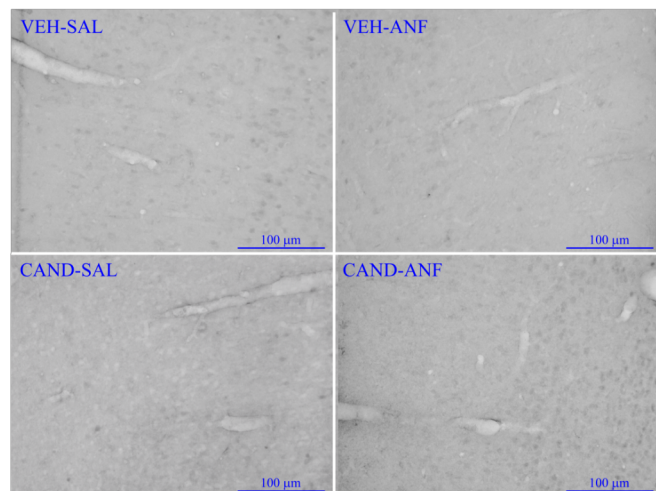
**Figura 28. Cuantificación del área y diámetro vascular en CxPF-PL e IL.** El gráfico muestra la cuantificación del área y el diámetro vascular en los cuatro grupos experimentales del protocolo experimental 1 en CxPF-PL e IL. Cuantificación del área vascular en CxPF-PL (izquierda-arriba). Cuantificación del área vascular en CxPF-IL (derecha-arriba). Cuantificación del diámetro vascular en CxPF-PL (izquierda-abajo). Cuantificación del diámetro vascular en CxPF-IL (derecha-abajo). Los valores se expresan como la media  $\pm$  DEM; n = 6 - 9.

ANOVA	CxPF-PL		CxPF-IL		CxPF-PL		CxPF-IL	
2 vías	Área von Willebrand+ (%)		Área von Willebrand+ (%)		Diámetro (mm)		Diámetro (mm)	
VEH SAL	8.57 $\pm$ 1.089 (n=9)		11.48 $\pm$ 0.785 (n=9)		13.73 $\pm$ 0.715 (n=9)		14.68 $\pm$ 0.747 (n=7)	
VEH ANF	10.54 $\pm$ 1.308 (n=8)		11.44 $\pm$ 1.130 (n=8)		14.19 $\pm$ 1.248 (n=8)		13.55 $\pm$ 1.926 (n=5)	
CAND SAL	9.76 $\pm$ 1.435 (n=8)		11.28 $\pm$ 1.225 (n=8)		14.80 $\pm$ 1.257 (n=8)		15.02 $\pm$ 1.478 (n=6)	
CAND ANF	7.95 $\pm$ 0.529 (n=9)		9.65 $\pm$ 1.172 (n=9)		15.06 $\pm$ 0.889 (n=9)		15.97 $\pm$ 1.104 (n=6)	
Int.	F <sub>(1,30)</sub> = 2.872	p=0.100	F <sub>(1,30)</sub> = 0.543	p=0.467	F <sub>(1,31)</sub> = 0.009	p=0.924	F <sub>(1,20)</sub> = 0.640	p=0.433
Trat.	F <sub>(1,30)</sub> = 0.399	p=0.532	F <sub>(1,30)</sub> = 0.840	p=0.367	F <sub>(1,31)</sub> = 0.899	p=0.350	F <sub>(1,20)</sub> = 1.141	p=0.298
Droga	F <sub>(1,30)</sub> = 0.005	p=0.945	F <sub>(1,30)</sub> = 0.600	p=0.444	F <sub>(1,31)</sub> = 0.123	p=0.728	F <sub>(1,20)</sub> = 0.005	p=0.945

**Tabla 13. Cuantificación del área y diámetro vascular en CxPF-PL e IL.** La tabla muestra los parámetros estadísticos obtenidos en la cuantificación del área y diámetro vascular en CxPF-PL e IL en los cuatro grupos experimentales del protocolo experimental 5.



**Figura 29. Cuantificación de los puntos de ramificación y el índice de tortuosidad en CxPF-PL e IL.** El gráfico muestra la cuantificación de los puntos de ramificación y el índice de tortuosidad en los cuatro grupos experimentales del protocolo experimental 1 en CxPF-PL e IL. Cuantificación de los puntos de ramificación en CxPF-PL (izquierda-arriba). Cuantificación de los puntos de ramificación en CxPF-IL (derecha-arriba). Cuantificación del índice de tortuosidad en CxPF-PL (izquierda-abajo). Cuantificación del índice de tortuosidad en CxPF-IL (derecha-abajo). Los valores se expresan como la media  $\pm$  DEM, \*diferente al resto de los grupos experimentales ( $p < 0.05$ );  $n = 5 - 9$ .



**Figura 30. Inmunohistoquímica de von Willebrand en CxPF-IL.** Microfotografías (200X) representativas de los 4 grupos experimentales.



ANOVA	CxPF-PL		CxPF-IL		CxPF-PL		CxPF-IL	
	Puntos de ramificación/Área		Puntos de ramificación/Área		Índice de tortuosidad		Índice de tortuosidad	
2 vías								
VEH SAL	2.67 ± 0.289 (n=9)		3.84 ± 0.170 (n=6)		1.068 ± 0.004 (n=7)		14.68 ± 0.747 (n=7)	
VEH ANF	2.86 ± 0.371 (n=8)		5.26 ± 0.469 (n=5)		1.077 ± 0.006 (n=5)		13.55 ± 1.926 (n=5)	
CAND SAL	2.36 ± 0.457 (n=8)		3.62 ± 0.147 (n=5)		1.080 ± 0.003 (n=6)		15.02 ± 1.478 (n=6)	
CAND ANF	2.09 ± 0.308 (n=9)		3.39 ± 0.233 (n=6)		1.074 ± 0.002 (n=6)		15.97 ± 1.104 (n=6)	
Int.	F <sub>(1,30)</sub> = 0.426	p=0.519	F <sub>(1,18)</sub> = <b>9.101</b>	*p=0.007	F <sub>(1,31)</sub> = 4.133	p=0.056	F <sub>(1,20)</sub> = 1.043	p=0.319
Trat.	F <sub>(1,30)</sub> = 2.326	p=0.138	F <sub>(1,18)</sub> = <b>14.53</b>	*p=0.001	F <sub>(1,31)</sub> = 1.629	p=0.216	F <sub>(1,20)</sub> = 0.962	p=0.338
Droga	F <sub>(1,30)</sub> = 0.011	p=0.918	F <sub>(1,18)</sub> = <b>4.787</b>	*p=0.042	F <sub>(1,31)</sub> = 0.105	p=0.750	F <sub>(1,20)</sub> = 0.237	p=0.632
Tukey Post- hoc	VEH	VEH	-		VEH	VEH	-	
	SAL	ANF	-	*p=0.010	SAL	ANF	-	
	VEH	CAND	-		VEH	CAND	-	
	SAL	SAL	-	p>0.999	SAL	SAL	-	
	VEH	CAND	-		VEH	CAND	-	
	SAL	ANF	-	p>0.999	SAL	ANF	-	
	VEH	CAND	-		VEH	CAND	-	
	ANF	SAL	-	*p=0.004	ANF	SAL	-	
	VEH	CAND	-		VEH	CAND	-	
	ANF	ANF	-	*p<0.001	ANF	ANF	-	
	CAND	CAND	-		CAND	CAND	-	
	SAL	ANF	-	p>0.999	SAL	ANF	-	

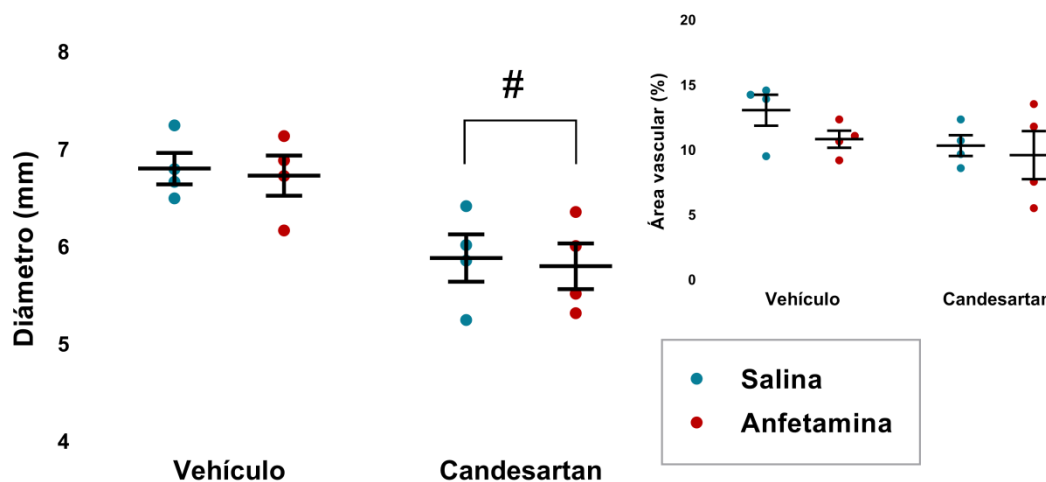
**Tabla 14. Cuantificación de los puntos de ramificación y el índice de tortuosidad en CxPF-PL e IL.** La tabla muestra los parámetros estadísticos obtenidos en la cuantificación de los puntos de ramificación y el índice de tortuosidad en CxPF-PL e IL en los cuatro grupos experimentales del protocolo experimental 5. \*p<0.05.

## 12 El antagonismo de los R-AT<sub>1</sub> induce capilarización en la corteza prefrontal prefrontal prefrontal

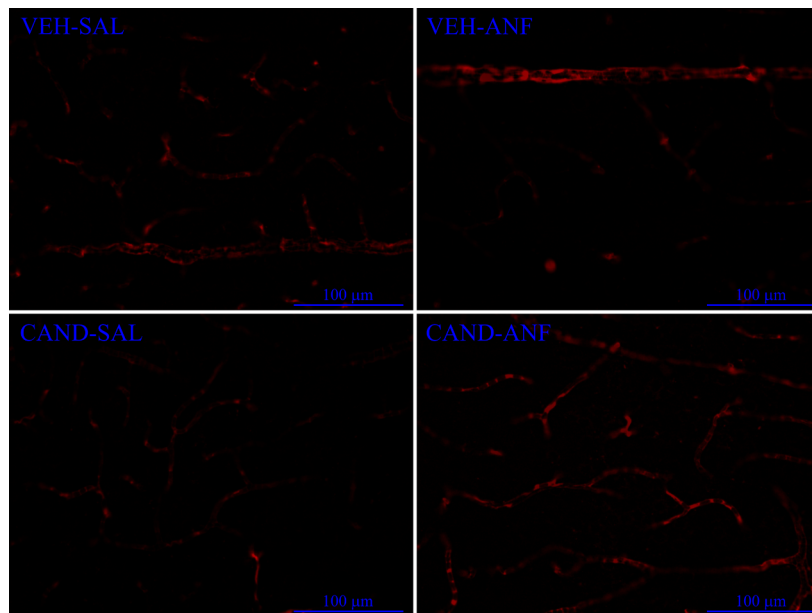
Con el objetivo de evaluar posibles cambios angioplásticos corticales inducidos por ANF o CAND inmediatamente después de la última administración de ambas drogas, se analizó la microarquitectura vascular por medio de la autofluorescencia de Azul de Evans en la CxPF-PL y la CxPF-IL según el protocolo experimental 5, cuantificándose el área ocupada por microvasos y el diámetro vascular. Posteriormente se cuantificó en forma diferenciada ambos parámetros en capilares (diámetro vascular < 8  $\mu\text{m}$ ) y vasos medios (diámetro vascular > 8  $\mu\text{m}$ ).

En la CxPF-PL, CAND indujo una reducción del diámetro vascular sin generar cambios en el área ocupada por microvasos. Por el contrario, no se observaron efectos del tratamiento con CAND o ANF al analizar el área ocupada por microvasos y el diámetro vascular en la CxPL-IL.

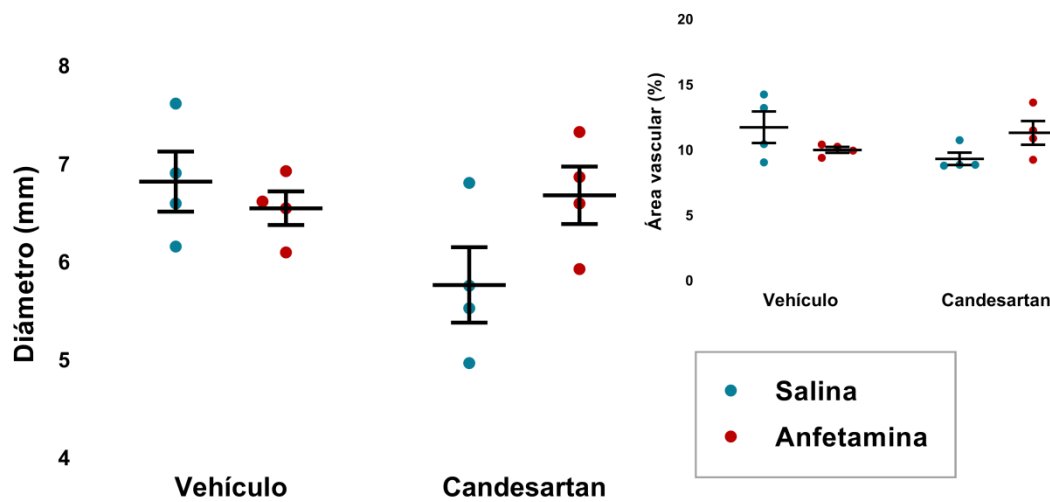
Al analizar el diámetro vascular en la CxPL-PL, el análisis de ANOVA a dos vías reveló un efecto significativo del factor tratamiento mostrando que los grupos tratados con CAND (CAND-SAL y CAND-ANF) tuvieron una reducción del diámetro vascular estadísticamente significativo al ser comparados con los grupos tratados con VEH (VEH-SAL y VEH-ANF) (figura 28, tabla 15). No hubo diferencias estadísticamente significativas entre los 4 grupos experimentales al analizar el área vascular ocupada en la CxPF-PL. Se observó un efecto significativo del factor interacción al analizar el área vascular ocupada por microvasos en la CxPF-IL (figura 29, tabla 15) pero no se observaron diferencias entre ningún grupo experimental al realizar el análisis post-hoc de Tukey. Por otro lado, en la CxPF-IL no se observaron diferencias significativas entre los 4 grupos experimentales en el diámetro vascular (figura 29, tabla 15).



**Figura 31. CAND disminuye el diámetro vascular en CxPF-PL.** El gráfico muestra la cuantificación del área y diámetro vascular en los cuatro grupos experimentales del protocolo experimental 5 en CxPF-PL. La figura principal muestra el la cuantificación del diámetro vascular en CxPF-PL. La figura insertada muestra la cuantificación del área vascular en CxPF-PL. Los valores se expresan como la media  $\pm$  DEM, #diferente de los grupos VEH-SAL y VEH-ANF ( $p < 0.05$ );  $n = 4$ .



**Figura 32. Autofluorescencia de Azul de Evans en CxPF-PL.** Microfotografías (400X) representativas de los 4 grupos experimentales.



**Figura 33. CAND no induce cambios en el área y diámetro vascular en CxPF-IL.** El gráfico muestra la cuantificación del área y diámetro vascular en los cuatro grupos experimentales del protocolo experimental 5 en CxPF-IL. La figura principal muestra el la cuantificación del diámetro vascular en CxPF-IL. La figura insertada muestra la cuantificación del área vascular en CxPF-IL. Los valores se expresan como la media  $\pm$  DEM;  $n = 4$ .

ANOVA	CxPF-PL	CxPF-IL	CxPF-PL	CxPF-IL
2 vías	Diámetro vascular (mm)	Diámetro vascular (mm)	Área vascular (%)	Área vascular (%)
VEH SAL	6.80 $\pm$ 0.161 (n=4)	6.81 $\pm$ 0.307 (n=4)	13.03 $\pm$ 1.191 (n=4)	11.70 $\pm$ 1.202 (n=4)
VEH	6.72 $\pm$ 0.206 (n=4)	6.54 $\pm$ 0.171 (n=4)	10.79 $\pm$ 0.651 (n=4)	9.97 $\pm$ 0.225 (n=4)

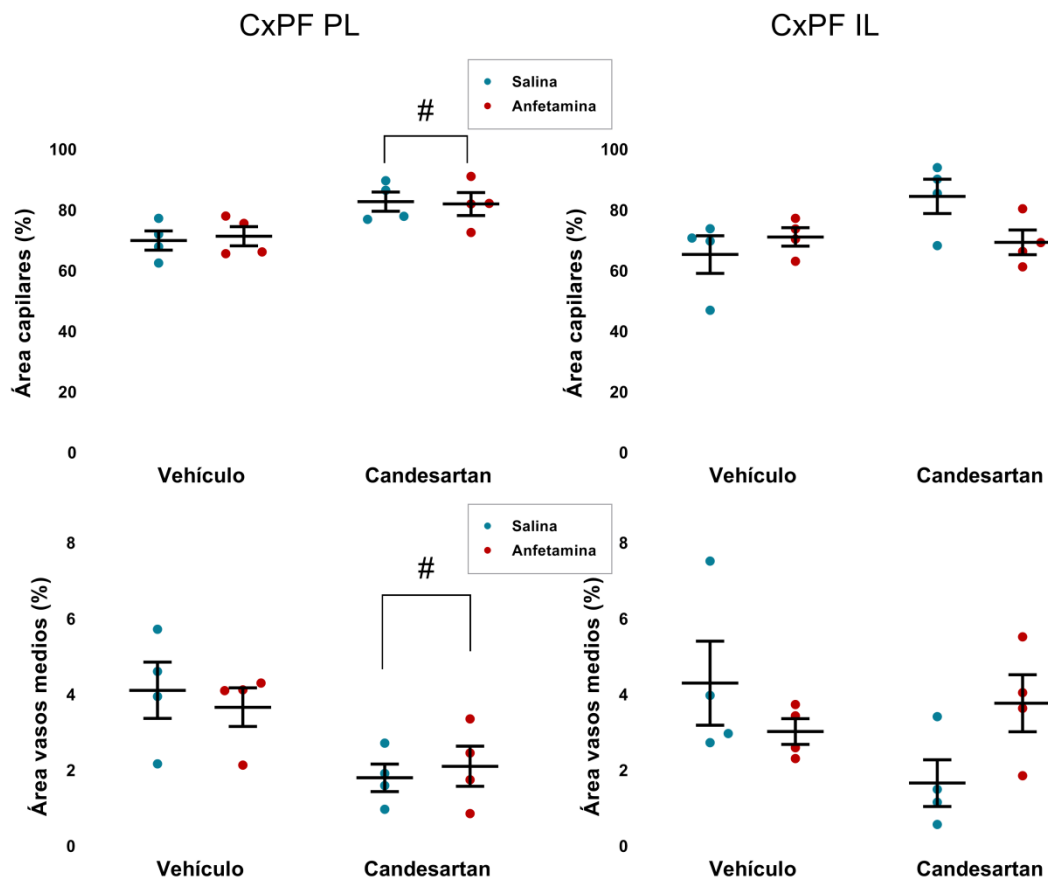
ANF									
CAND SAL	5.88 ± 0.243 (n=4)		5.76 ± 0.385 (n=4)		10.30 ± 0.798 (n=4)		9.29 ± 0.474 (n=4)		
CAND ANF	5.79 ± 0.236 (n=4)		6.67 ± 0.293 (n=4)		9.56 ± 1.852 (n=4)		11.28 ± 0.906 (n=4)		
Int.	F <sub>(1,12)</sub> = 0.001	p=0.977	F <sub>(1,12)</sub> = 3.944	p=0.070	F <sub>(1,12)</sub> = 0.381	p=0.549	F <sub>(1,12)</sub> = <b>5.476</b>	<b>*p=0.037</b>	
Trat.	F <sub>(1,12)</sub> = <b>18.69</b>	<b>*p=0.001</b>	F <sub>(1,12)</sub> = 0.481	p=0.149	F <sub>(1,12)</sub> = 2.648	p=0.123	F <sub>(1,12)</sub> = 0.481	p=0.501	
Droga	F <sub>(1,12)</sub> = 0.136	p=0.719	F <sub>(1,12)</sub> = 0.876	p=0.304	F <sub>(1,12)</sub> = 1.498	p=0.244	F <sub>(1,12)</sub> = 0.876	p=0.876	
Tukey Post- hoc	VEH	VEH	-	VEH	VEH	-	VEH	VEH	p=0.445
	SAL	ANF	-	SAL	ANF	-	SAL	ANF	
	VEH	CAND	-	VEH	CAND	-	VEH	CAND	p=0.194
	SAL	SAL	-	SAL	SAL	-	SAL	SAL	
	VEH	CAND	-	VEH	CAND	-	VEH	CAND	p=0.981
	SAL	ANF	-	SAL	ANF	-	SAL	ANF	
	VEH	CAND	-	VEH	CAND	-	VEH	CAND	p=0.929
	ANF	SAL	-	ANF	SAL	-	ANF	SAL	
	VEH	CAND	-	VEH	CAND	-	VEH	CAND	p=0.659
	ANF	ANF	-	ANF	ANF	-	ANF	ANF	
	CAND	CAND	-	CAND	CAND	-	CAND	CAND	p=0.334
	SAL	ANF	-	SAL	ANF	-	SAL	ANF	

**Tabla 15. CAND reduce el diámetro vascular en la CxPF-PL.** La tabla muestra los parámetros estadísticos obtenidos en la cuantificación del área y diámetro vascular en la CxPF-PL e IL en los cuatro grupos experimentales del protocolo experimental 5. \*p<0.05.

El análisis diferenciado de capilares y vasos medios mostró que en la CxPF-PL, CAND indujo un aumento del área ocupada por capilares a expensas de una disminución del área ocupada por vasos medios. Por otro lado, en la CxPF-IL no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los 4 grupos experimentales al analizar el área ocupada por capilares y vasos medios.

Al analizar el área ocupada por capilares y vasos medios en la CxPL-PL, el análisis de ANOVA a dos vías reveló un efecto del factor tratamiento, mostrando que los grupos tratados con CAND (CAND-SAL y CAND-ANF) tuvieron un aumento del área ocupada por capilares y una reducción del área ocupada por vasos medios estadísticamente significativo al ser comparados con los grupos tratados con VEH (VEH-SAL y VEH-ANF) (figura 30, tabla 16). Al analizar el área ocupada por vasos medios en la CxPF-IL se observó un efecto significativo del factor interacción pero al realizar las comparaciones múltiples no se observó diferencias

significativas entre ninguno de los grupos analizados. No se observaron diferencias significativas entre los 4 grupos experimentales al analizar el área ocupada por capilares en la CxPF-IL (figura 30, tabla 16).



**Figura 34. CAND induce capilarización en CxPF-PL.** El gráfico muestra la cuantificación del área de capilares y vasos medios en los cuatro grupos experimentales del protocolo experimental 5 en CxPF-PL e IL. Porcentaje de área ocupada por capilares en CxPF-PL (izquierda-arriba). Porcentaje de área ocupada por capilares en CxPF-IL (derecha-arriba). Porcentaje de área ocupada por vasos medios en CxPF-PL (izquierda-abajo). Porcentaje de área ocupada por vasos medios en CxPF-IL (derecha-abajo). Los valores se expresan como la media  $\pm$  DEM, #diferente de los grupos VEH-SAL y VEH-ANF; n = 4.

ANOVA	CxPF-PL		CxPF-IL		CxPF-PL		CxPF-IL	
2 vías	Área capilares (%)		Área capilares (%)		Área vasos medios (%)		Área vasos medios (%)	
VEH SAL	69.82 $\pm$ 3.130 (n=4)		65.20 $\pm$ 6.175 (n=4)		4.10 $\pm$ 0.743 (n=4)		4.29 $\pm$ 1.107 (n=4)	
VEH ANF	71.24 $\pm$ 3.183 (n=4)		71.02 $\pm$ 3.029 (n=4)		3.65 $\pm$ 0.510 (n=4)		3.01 $\pm$ 0.339 (n=4)	
CAND SAL	82.66 $\pm$ 3.153 (n=4)		84.38 $\pm$ 5.674 (n=4)		1.79 $\pm$ 0.364 (n=4)		1.65 $\pm$ 0.617 (n=4)	
CAND ANF	81.85 $\pm$ 3.763 (n=4)		69.22 $\pm$ 4.061 (n=4)		2.10 $\pm$ 0.530 (n=4)		3.76 $\pm$ 0.758 (n=4)	
Int.	F <sub>(1,12)</sub> = 0.114	p=0.742	F <sub>(1,12)</sub> = 4.583	p=0.054	F <sub>(1,12)</sub> = 0.462	p=0.501	F <sub>(1,12)</sub> = <b>5.002</b>	<b>*p=0.045</b>
Trat.	F <sub>(1,12)</sub> = <b>12.49</b>	<b>*p=0.004</b>	F <sub>(1,12)</sub> = 3.146	p=0.102	F <sub>(1,12)</sub> = <b>12.19</b>	<b>*p=0.004</b>	F <sub>(1,12)</sub> = 1.566	p=0.235

Droga	F <sub>(1,12)</sub> = 0.008		p=0.927	F <sub>(1,12)</sub> = 0.909		p=0.359	F <sub>(1,12)</sub> = 0.017		p=0.900	F <sub>(1,12)</sub> = 0.299		p=0.594
Tukey Post- hoc	VEH	VEH	-	VEH	VEH	-	VEH	VEH	-	VEH	VEH	p=0.642
	SAL	ANF	-	SAL	ANF	-	SAL	ANF	-	SAL	ANF	
	VEH	CAND	-	VEH	CAND	-	VEH	CAND	-	VEH	CAND	p=0.117
	SAL	SAL	-	SAL	SAL	-	SAL	SAL	-	SAL	SAL	
	VEH	CAND	-	VEH	CAND	-	VEH	CAND	-	VEH	CAND	p=0.958
	SAL	ANF	-	SAL	ANF	-	SAL	ANF	-	SAL	ANF	
	VEH	CAND	-	VEH	CAND	-	VEH	CAND	-	VEH	CAND	p=0.596
	ANF	SAL	-	ANF	SAL	-	ANF	SAL	-	ANF	SAL	
	VEH	CAND	-	VEH	CAND	-	VEH	CAND	-	VEH	CAND	p=0.896
	ANF	ANF	-	ANF	ANF	-	ANF	ANF	-	ANF	ANF	
	CAND	CAND	-	CAND	CAND	-	CAND	CAND	-	CAND	CAND	p=0.252
	SAL	ANF	-	SAL	ANF	-	SAL	ANF	-	SAL	ANF	

**Tabla 16. CAND induce capilarización en la CxPF-PL.** La tabla muestra los parámetros estadísticos obtenidos en la cuantificación del área y diámetro vascular en capilares y vasos medios de la CxPF-PL e IL en los cuatro grupos experimentales del protocolo experimental 5. \*p<0.05.

# 5

## Discusión

### 1 La exposición repetida a anfetamina como modelo animal de esquizofrenia

El carácter multifactorial de la ESQ permite su modelado en animales a través de múltiples abordajes experimentales según los diferentes factores de riesgo que contribuyen a su desarrollo. En este sentido, la exposición a ANF constituye un modelo animal ampliamente utilizado para reproducir algunos de los síntomas de la ESQ en animales <sup>82</sup>. En el presente trabajo observamos que el protocolo de exposición a ANF utilizado genera hiperreactividad dopaminérgica, evaluada a partir de la sensibilización conductual a ANF, y déficit en la memoria de trabajo permitiendo recrear parte de los clusters de síntomas positivos y cognitivos de la ESQ respectivamente <sup>223-225</sup>. Estas observaciones muestran que la administración del psicoestimulante en el régimen utilizado posee validez de similitud como modelo animal para los síntomas positivos y cognitivos de la ESQ. Más aún, observamos que la administración ulterior del antipsicótico atípico ARI revierte la sensibilización conductual lo que indica que el protocolo utilizado también posee validez de predicción para los síntomas positivos. Por otro lado, el protocolo de exposición a ANF utilizado no recreó las alteraciones en la interacción social y la memoria a corto plazo, otros dos importantes síntomas pertenecientes a los clusters de síntomas negativos y cognitivos de la ESQ respectivamente.

### 1 Sensibilización a anfetamina y su reversión con aripiprazol

La sensibilización a psicoestimulantes es un fenómeno ampliamente descrito y reproducido, tanto en animales como en humanos, incluso ante innumerables variaciones reportadas en el diseño experimental según la dosis, el período de abstinencia, la asociación contextual, entre otros. En este sentido, se ha reportado que el mismo esquema de exposición a ANF utilizado en el presente trabajo (2.5 mg/kg por 5 días) induce sensibilización en ratones luego de 5 días de abstinencia <sup>226</sup>. Más aún, se ha reportado la generación de sensibilización conductual con el mismo período de abstinencia pero con diferentes dosis y cantidad de exposiciones a ANF que los utilizados en este trabajo <sup>104,122</sup>.

La administración repetida de ARI durante el periodo de abstinencia previno la generación de hiperlocomoción producida por una dosis desafío de ANF en animales sensibilizados. Este resultado sugiere que ARI podría revertir la sensibilización comportamental establecida por la exposición a ANF. En línea con este resultado, Futamura y cols. reportaron que la administración de ARI durante el período de abstinencia a metanfetamina revierte la sensibilización conductual en ratones <sup>113</sup>. A su vez, dichos autores observaron que la reversión de la sensibilización inducida por ARI es bloqueada si se antagoniza previamente los receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>1A</sub> <sup>113</sup>. Otros reportes muestran que la administración de antagonistas 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>3</sub> o inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina también revierten la sensibilización a psicoestimulantes <sup>227-229</sup>. Estas observaciones sugieren que la desregulación de la neurotransmisión serotoninérgica posee un rol importante en los eventos neuronales que conducen al mantenimiento de la sensibilización a anfetaminas. En este sentido se ha postulado que el agonismo sobre receptores 5-HT<sub>1A</sub> o el antagonismo sobre receptores 5-HT<sub>2A</sub> podría revertir la sensibilización a través de la atenuación de la liberación de serotonina en la CxPF <sup>230</sup>. Dado que el agonismo sobre receptores D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub> también puede revertir la sensibilización comportamental, parte de la capacidad para revertir la sensibilización a psicoestimulantes de ARI podría deberse a su propiedades como agonista parcial de estos receptores <sup>103</sup>.

## 2 Anfetamina y deterioro cognitivo

En el presente trabajo se observó que el régimen de exposición a ANF utilizado indujo alteración de la memoria de trabajo espacial, evaluada a través del paradigma de laberinto en Y elevado, luego de 21 días de abstinencia. Por el contrario, no se observaron efectos deletéreos de ANF en la memoria a corto plazo evaluada a partir del test de reconocimiento de objetos. De manera similar, Tamijani et al. reportaron que la administración de metanfetamina a ratas Wistar, en 3 regímenes distintos con 7 días de abstinencia, indujo alteración de la memoria de trabajo espacial (laberinto en Y elevado) junto con alteración de la memoria de reconocimiento a largo plazo (reconocimiento del objeto nuevo), pero no generó cambios sobre la memoria de reconocimiento a corto plazo (reconocimiento del objeto nuevo) evaluada 90 minutos luego de la fase de entrenamiento <sup>231</sup>. Resultados similares fueron observados en ratones, observándose un déficit del desempeño en el laberinto en Y elevado pero no en el reconocimiento de objetos nuevos tras 5 días de abstinencia al análogo anfetamínico  $\alpha$ -pyrrolidinopropiofenona <sup>232</sup>.

La alteración diferencial de la memoria de trabajo inducida por ANF puede ser consecuencia de diferencias en la susceptibilidad al daño anfetamínico entre las diversas áreas cerebrales. En este sentido, en el presente trabajo hemos observado un aumento de la reactividad astrocitaria y microglial en la CxPF-PL cuyo funcionamiento juega un rol crítico en la generación de una memoria de trabajo apropiada. Por otro lado, no se observaron cambios en la reactividad glial en otras áreas cerebrales como la CxPF-IL, NAcc y CPu. Dada su función centinela, el aumento de la reactividad de astrocitos y microglia es un signo de perturbación cerebral indicando posibles disrupciones de la función de la CxPF-PL que podrían ulteriormente contribuir al deterioro de la memoria de trabajo observado. A su vez, la activación glial sostenida podría generar un escenario neuroinflamatorio sinergizando el propio daño anfetamínico y perturbando aún más la disfunción de la CxPF-PL.



### **3 Anfetamina e interacción social**

Diversos autores han reportado la existencia de síntomas como déficit en la interacción social, anhedonia, amotivación, ansiedad y depresión durante el periodo de abstinencia a ANF tanto en roedores como en humanos<sup>233-239</sup>. Estas alteraciones comportamentales se asemejan al cluster de síntomas negativos de la ESQ. Al evaluar la interacción social en animales con 21 días de abstinencia a ANF, en el presente trabajo no observamos alteraciones tanto en la interacción social pasiva como activa. La expresión de comportamientos similares a los síntomas negativos de la ESQ parece ser altamente dependiente del tiempo de abstinencia a ANF en que se realiza el análisis. En este sentido, estos déficits comportamentales son frecuentemente observados al ser evaluado en los primeros días de abstinencia a ANF<sup>107,237,238,240</sup>. Al evaluar el curso temporal del comportamiento similar depresivo en roedores (analizado a través de la hipoactividad nocturna) durante el periodo de abstinencia a ANF, Paulson y colaboradores observaron que este comportamiento se evidencia durante los primeros 7 días de abstinencia retornando a valores normales hacia el día 28 de abstinencia<sup>237</sup>. A su vez, estos cambios comportamentales temporales se correlacionaron positivamente con cambios en la dinámica y recambio de DA en CPU dorsal, observando bajos valores de DA y sus metabolitos en el día 3 de abstinencia que retornan a valores normales en el día 28 de abstinencia<sup>237</sup>. Estas observaciones no son totalmente concluyentes ya que existen investigaciones que reportan deterioro de la interacción social luego de 21 días de abstinencia a ANF<sup>104</sup>.

## **2 Rol de los R-AT<sub>1</sub> de angiotensina II en la sensibilización conductual y neuroquímica a anfetamina**

### **1 Receptores AT<sub>1</sub> y desarrollo de sensibilización a anfetamina**

En el presente trabajo hemos observado que los R-AT<sub>1</sub> participan activamente en el desarrollo de sensibilización conductual a ANF, ya que la hiperlocomoción inducida por una dosis desafío del psicoestimulante fue prevenida con el antagonismo de los R-AT<sub>1</sub> mediado por la administración de CAND. En investigaciones previas de nuestro laboratorio se obtuvieron hallazgos similares, donde la administración previa de CAND previno la sensibilización conductual inducida por una única administración de ANF a una dosis dos veces superior a la utilizada en el presente trabajo (5 mg/kg)<sup>184</sup>. Además, en dicho trabajo se observó que los R-AT<sub>1</sub> participan en el desarrollo de la sensibilización neuroquímica a ANF, ya que su bloqueo previo previno la hiperreactividad dopaminérgica inducida por la exposición a ANF en NAcc y CPU<sup>184</sup>. En este sentido, Jiang y colaboradores reportaron que el antagonista de R-AT<sub>1</sub> telmisartán previene la inducción de sensibilización conductual a metanfetamina<sup>241</sup>. Más aún, dichos autores encontraron que la sensibilización a metanfetamina es atenuada en ratones knockout para los R-AT<sub>1</sub><sup>241</sup>. A diferencia de telmisartán, losartán no previno el desarrollo de sensibilización conductual, fenómeno que los autores atribuyen a la baja tasa de paso a través de la barrera hematoencefálica de losartán<sup>241</sup>. Utilizando un protocolo de sensibilización a ANF similar al presente trabajo (2 mg/kg x 7 días), Gomez Souza y colaboradores reportaron la prevención de la sensibilización conductual

mediante el pretratamiento o el tratamiento concomitante con dosis incluso 30 veces menores de CAND a las utilizadas en el presente trabajo <sup>242</sup>.

Dado el rol fundamental de la dopamina en la inducción y expresión de la sensibilización a ANF, aquellos elementos que modulan el sistema dopaminérgico pueden estar también implicados en la sensibilización a ANF. Siguiendo esta línea de pensamiento, los hallazgos arriba descritos pueden ser explicados en parte a través de la intensa relación entre el sistema dopaminérgico y angiotensinérgico. En este sentido, existe un interjuego mutuo entre ambos sistemas de neurotransmisión, donde la alteración en los componentes de uno de ellos genera posteriormente cambios en el otro. Hallazgos previos de nuestro laboratorio y de otros autores muestran que la exposición a ANF induce cambios duraderos en diversos componentes del sistema renina-angiotensina. De esta forma, hemos reportado que la exposición a ANF induce una alteración duradera de la expresión de angiotensinógeno y de R-AT<sub>1</sub> en CPu y NAcc <sup>126</sup>. Además de los cambios en la expresión de los receptores, la exposición a ANF también induce cambios en la funcionalidad de los R-AT<sub>1</sub>, ya que se observan respuestas alteradas al administrar angiotensina II por vía intracerebroventricular <sup>243</sup>. En línea con estos hallazgos, Jiang y colaboradores observaron que la exposición a metanfetamina induce un aumento en la expresión de R-AT<sub>1</sub> y angiotensina II en CPu <sup>241</sup>. A su vez, metanfetamina alteró la expresión de diversos receptores dopaminérgicos reportándose una disminución de la expresión de receptores D<sub>3</sub>, fenómeno que no se observó en aquellos animales knockout de los R-AT<sub>1</sub> que fueron expuestos a metanfetamina <sup>241</sup>. Más aún, en trabajos previos hemos observado que los R-AT<sub>1</sub> ejercen un rol fundamental en la hiperreactividad dopaminérgica estriatal, ya que el antagonismo previo de estos receptores mediante la administración de losartán en CPu previene la liberación excesiva de dopamina <sup>184</sup>. En el presente trabajo hemos observado que el antagonismo de R-AT<sub>1</sub> aumenta la velocidad de recaptación de dopamina en CPu tanto en ausencia como en presencia de ANF. Esta propiedad podría contribuir a la inhibición de la sensibilización conductual a ANF disminuyendo el tiempo de permanencia de la dopamina en la hendidura sináptica y por lo tanto reduciendo sus efectos. Los cambios en la cinética de recaptación de dopamina son generalmente asociados a modificaciones en la expresión DAT en superficie por tráfico intracelular, aunque se ha reportado también una regulación de la función del DAT independiente de tráfico <sup>244,245</sup>. Dado que la proporción de inhibición de la velocidad de recaptación de dopamina inducida por ANF fue similar entre los animales expuestos a VEH y expuestos a CAND, una posible hipótesis en cuanto al aumento de la cinética de recaptación de DA es que la cantidad de moléculas de DAT inhibidas sea similar entre ambos grupos y que la mayor recaptación de DA sea debido a un aumento en la eficacia de recaptación de dopamina siguiendo una regulación del DAT independiente del tráfico. Sin embargo, para contrastar esta hipótesis son necesarios estudios de expresión de DAT en superficie.

De manera interesante, el aumento de la cinética de recaptación de dopamina se observó 1 día después de la última administración de CAND pero no luego de 3 días. Esta diferencia puede ser producto de un efecto agudo de CAND, que se mantiene por lo menos hasta 24 hs después, posiblemente gracias a la baja velocidad de disociación de los R-AT<sub>1</sub>, lo que induce un bloqueo prácticamente irreversible del receptor <sup>246</sup>.

## 2 Receptores AT<sub>1</sub> y mantenimiento de sensibilización a anfetamina

Nuestros resultados muestran que el bloqueo de R-AT<sub>1</sub> revierte la sensibilización locomotora y la hiperreactividad neuronal en CPu (medida a través de la inmunohistoquímica de c-FOS) en respuesta a una dosis desafío de ANF. Esta evidencia denota el rol clave de dichos receptores en el mantenimiento de la sensibilización conductual y neuroquímica a ANF. De manera similar a lo expuesto en la sección anterior, estos hallazgos podrían basarse en la interrelación que existe entre el sistema dopaminérgico y angiotensinérgico <sup>126</sup>. En este sentido, durante la sensibilización a ANF se genera un desbalance de varios componentes del sistema renina-angiotensina que posteriormente podrían contribuir a la expresión de la sensibilización. De esta forma, el bloqueo sostenido de los R-AT<sub>1</sub> durante el periodo de abstinencia podría restablecer el equilibrio en el sistema angiotensinérgico y revertir el fenómeno de sensibilización a ANF. En línea con lo anteriormente expuesto, resultados previos de nuestro laboratorio y de otros autores muestran que la exposición a ANF o metanfetamina induce un aumento en la expresión de R-AT<sub>1</sub> en CPu. A su vez, estos receptores desempeñan un rol fundamental en la expresión de la sensibilización a ANF, ya que su bloqueo intraestriatal bloquea dicha expresión <sup>126,241</sup>.

Si bien el sistema dopaminérgico junto con el glutamatérgico son ampliamente reconocidos como los principales sistemas de neurotransmisión involucrados en los cambios a largo plazo inducidos por ANF, el sistema serotoninérgico parecería tener una mayor implicancia en el mantenimiento de la sensibilización a ANF <sup>103</sup>. A diferencia de la ineficacia de los antagonistas de receptores dopaminérgico, se ha reportado que el antagonismo de los receptores 5-HT<sub>2A</sub> y 5-HT<sub>3</sub> revierte la sensibilización a ANF <sup>103,247,248</sup>. En este sentido, se ha postulado que el mantenimiento de la sensibilización a metanfetamina se produce, en parte gracias al aumento del tono serotoninérgico en la CxPF y que los antagonistas de receptores 5-HT<sub>2A</sub> revierten la sensibilización al modular este efecto <sup>230</sup>. En línea con este razonamiento, la reversión de la sensibilización inducida por el bloqueo de R-AT<sub>1</sub> podría radicar en los efectos que estos receptores ejercen sobre el sistema serotoninérgico ya que estos receptores ejercen efectos moduladores en la tasa de recambio y liberación de serotonina en CPu y corteza frontal <sup>249,250</sup>.

## 3 Rol de los receptores AT<sub>1</sub> en el deterioro de la memoria de trabajo inducido por anfetamina

En el presente trabajo hemos observado que el antagonismo de los R-AT<sub>1</sub> previene el deterioro en la memoria de trabajo inducido por ANF. Más aún, el antagonismo de estos receptores durante el periodo de abstinencia revierte dicho déficit cognitivo. Ambos hallazgos indican que los R-AT<sub>1</sub> están implicados tanto en el desarrollo como en el mantenimiento de las alteraciones que producen el deterioro de la memoria de trabajo por exposición a ANF. Estos hallazgos están en línea con resultados previos de nuestro laboratorio que denotan el rol clave de los R-AT<sub>1</sub> en el desarrollo del déficit de la memoria de trabajo inducida por la exposición a ANF. Dichos resultados muestran que la exposición a ANF en un esquema de sensibilización igual al utilizado en el presente trabajo genera un déficit de la memoria de trabajo evaluada luego de 7 días de abstinencia a la droga en el paradigma del laberinto en Y elevado y del campo perforado <sup>139</sup>. De manera similar, de Souza Gomez y colaboradores observaron que el deterioro en la memoria de trabajo inducida por ANF fue prevenido al bloquear los R-AT<sub>1</sub> en

forma previa o concomitante con la exposición al psicoestimulante <sup>242</sup>. En referencia a lo último descrito, resulta importante destacar que la prevención del déficit cognitivo se obtuvo con la administración de CAND a dosis 10 veces inferiores a las utilizadas en el presente trabajo (0.3 mg/kg).

Dado que estos receptores forman parte tanto de neuronas como de astrocitos, microglia y vasos sanguíneos cerebrales, surgen múltiples hipótesis por las cuáles estos hallazgos pueden tener lugar. A continuación se procederá a describir estas posibles hipótesis tomando como centro la CxPF-PL dado que es una de las principales áreas cerebrales encargadas de regular esta tarea cognitiva <sup>251</sup>.

## **1 Sensibilización a anfetamina: cambios neuroplásticos en corteza prefrontal y receptores AT<sub>1</sub>**

Un amplio cuerpo de evidencia recabada tanto en consumidores de sustancias de tipo anfetamínica como en primates no humanos y roedores señala la coexistencia entre la sensibilización a psicoestimulantes y la generación de hipofunción de la CxPF <sup>252-258</sup>. Dado que la inervación dopaminérgica del circuito mesocortical desempeña un rol fundamental en la integridad de las funciones de la CxPF, los cambios neuroplásticos que ocurren a lo largo de este circuito durante el proceso de sensibilización a ANF pueden a su vez estar asociados con reorganizaciones sinápticas y disrupciones funcionales de la CxPF <sup>99,252</sup>. En este sentido, la señalización dopaminérgica vía receptores D<sub>1</sub> ejercería efectos en forma de U invertida sobre la memoria de trabajo en esta área cerebral <sup>256,259,260</sup>. Por lo que una insuficiente estimulación de los receptores D<sub>1</sub> resultaría en un estado hipodopaminérgico lo que induciría el déficit de la memoria de trabajo <sup>252</sup>. En línea con estas aseveraciones, resultados previos de nuestro laboratorio muestran que una dosis desafío de ANF revierte el déficit de la memoria de trabajo inducido por un esquema de sensibilización a ANF igual al utilizado en el presente trabajo y evaluado luego de 7 días de abstinencia <sup>139</sup>.

Siguiendo la línea de razonamiento arriba descrita, la prevención y reversión de la sensibilización a ANF asociada al bloqueo de R-AT<sub>1</sub> observada en el presente trabajo podría a su vez ejercer efectos preventivos o revertir la alteración de la función de la CxPF asociada a la exposición a ANF y por consiguiente el deterioro de la memoria de trabajo.

## **2 Rol de los receptores AT<sub>1</sub> en la reactividad glial y estrés oxidativo inducidos por anfetamina**

En el presente trabajo hemos observado que ANF induce un extensivo incremento del estrés oxidativo en forma aguda en áreas cerebrales como la CxPF, CxM, CPu e HPC. La génesis de ese estrés oxidativo es altamente dependiente de los R-AT<sub>1</sub>, ya que el antagonismo previo de estos receptores con CAND previno totalmente su desarrollo en todas las áreas cerebrales. Parte de este efecto puede resultar de la modulación que estos receptores ejercen sobre el funcionamiento mitocondrial y la actividad del complejo nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidasa, las dos principales fuentes de ROS celulares <sup>261</sup>. Recientemente, Valenzuela y

colaboradores mostraron que los R-AT<sub>1</sub> están presentes en mitocondrias de células dopaminérgicas y su activación incrementa la actividad mitocondrial con la consiguiente producción de superóxido a través de la inducción de la actividad del complejo NADPH oxidasa <sup>262</sup>. Los R-AT<sub>1</sub> inducen también la actividad de la NADPH oxidasa microglial, generando altas concentraciones de ROS lo que induce un ambiente oxidativo regional al ser liberados al medio extracelular <sup>263</sup>. Existen también otras posibles fuentes que podrían contribuir a la generación de radicales libres por ANF vía R-AT<sub>1</sub> como es el caso de la oxidación de dopamina y el aumento de la actividad de la óxido nítrico sintetasa <sup>132</sup>. Dichas alteraciones oxidativas formarían parte de un ciclo por el cual bajas concentraciones intraneuronales de ROS, generados por vía R-AT<sub>1</sub>, actuarían como segundos mensajeros gatillando respuestas inflamatorias con la consiguiente migración y activación de células inflamatorias como la microglía. Ante la activación microglial se generarían bajos niveles intracelulares de ROS que generarían una auto-exacerbación de su activación, junto con la producción de altos niveles de radicales libres que serían expulsados al medio extracelular induciendo un ambiente oxidativo e inflamatorio asociado a daño neuronal <sup>188,263</sup>. Los daños de los componentes celulares y el ambiente oxidativo e inflamatorio pueden a su vez exacerbar la respuesta inflamatoria potenciando aún más la injuria regional.

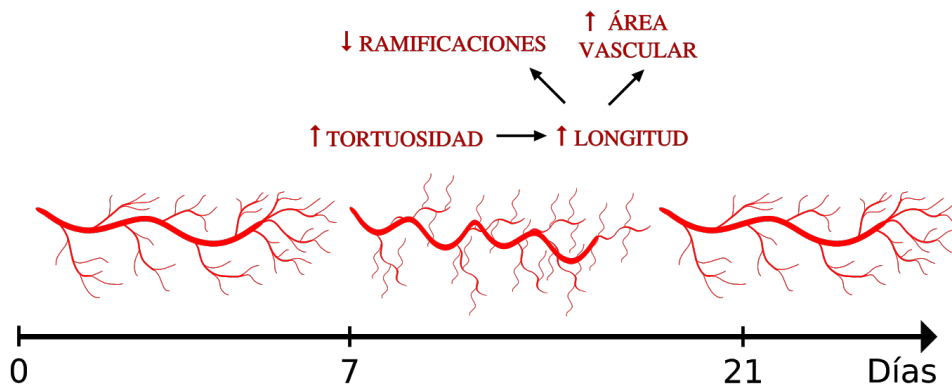
Aunque todas las áreas cerebrales analizadas exhibieron un extensivo aumento del estrés oxidativo, únicamente en la CxPF-PL se correlacionó este fenómeno con un aumento de la reactividad microglial y astrogliar. Estos hallazgos sugieren que existe una susceptibilidad incrementada de la CxPF-PL a la injuria anfetamínica y el estrés oxidativo. Resultados similares se reportaron en estudios previos de nuestro laboratorio en donde se observó un aumento de la reactividad astrogliar y microglial luego de 7 días de abstinencia a ANF en CxPF-PL, pero no en CxPF-IL e HPC <sup>139</sup>. En línea con estos resultados, al analizar la reactividad astrogliar durante la abstinencia a alcohol, Bull y colaboradores reportaron un patrón similar a los hallazgos anteriormente descritos, observándose reactividad astrocitaria en la CxPF-PL pero no en la subdivisión infralímbica <sup>264</sup>. Por lo tanto la susceptibilidad de la CxPF-PL parecería exceder al daño anfetamínico.

### **3 Rol de los R-AT<sub>1</sub> en los cambios angioplásticos corticales inducidos por anfetamina**

En estudios previos hemos observado que ANF, vía R-AT<sub>1</sub>, induce angiogénesis en la CxPF-PL luego de 7 días de abstinencia, evaluado como un aumento de la densidad microvascular. A su vez, se observó alteraciones de parámetros morfológicos de la microvasculatura como la disminución de los puntos de ramificación y un aumento de la tortuosidad (los cambios en los parámetros microvasculares se esquematizan en la figura 31) <sup>139</sup>. En el presente trabajo, al evaluar la microarquitectura vascular utilizando el mismo protocolo de exposición a ANF pero luego de 21 días de abstinencia, no observamos cambios en ninguno de los parámetros anteriormente descritos en la CxPF-PL. En su conjunto estos resultados sugieren que la exposición a ANF, vía R-AT<sub>1</sub>, induce un escenario angiogénico transiente en la CxPF-PL, el cual es evidente luego de 7 días de abstinencia pero que gradualmente se normaliza en ausencia del psicoestimulante hasta alcanzar parámetros similares a los controles luego de 21 días de abstinencia. Por otro lado, luego de 7 días de abstinencia a ANF hemos observado un incremento de tortuosidad de los microvasos de la CxPF-IL dependiente de los R-AT<sub>1</sub>, pero sin cambios en la

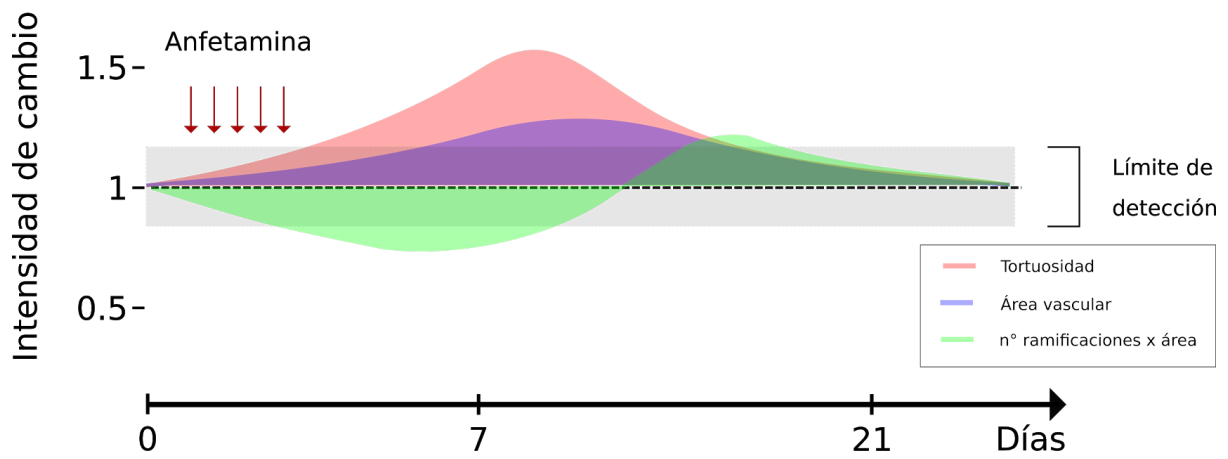
densidad vascular y la cantidad de puntos de ramificación <sup>139</sup>. Luego de 21 días de abstinencia, estos cambios en la tortuosidad en la CxPF-IL desaparecen, pero en los animales expuestos a ANF se observa un incremento en la cantidad de los puntos de ramificación que depende de los R-AT<sub>1</sub>. Dado que a diferencia de la CxPL-PL no se observaron cambios en la densidad vascular a lo largo de 21 días de abstinencia en la CxPF-IL y que se considera que el incremento en la tortuosidad corresponde a un estadio temprano en la neovascularización <sup>265</sup>, en conjunto los resultados expuestos podrían indicar un efecto angiogénico transiente inducido por ANF, a través de los R-AT<sub>1</sub>, en ambas subdivisiones de la CPF pero con curvas de tiempo y magnitudes diferenciales (los cambios descritos se esquematizan en la figura 31). Teniendo en cuenta que los mediadores inflamatorios promueven la angiogénesis en forma directa e indirecta <sup>266</sup>, la mayor gliosis inducida por ANF en la CxPF-PL podría llegar a explicar la mayor magnitud del efecto angiogénico observado en esta área cerebral. Por otro lado, la mayor superficie vascular puede incrementar la liberación de mediadores proinflamatorios, el transporte de células y el aporte de nutrientes necesarios para la generación de los eventos que llevan a la generación de gliosis y neuroinflamación <sup>266</sup>, por lo que la mayor gliosis en CxPF-PL podría resultar de un mayor efecto angiogénico en esta región. En resumen, existe una codependencia entre estos dos fenómenos que tiende a la autoperpetuación de ambos.

**A**



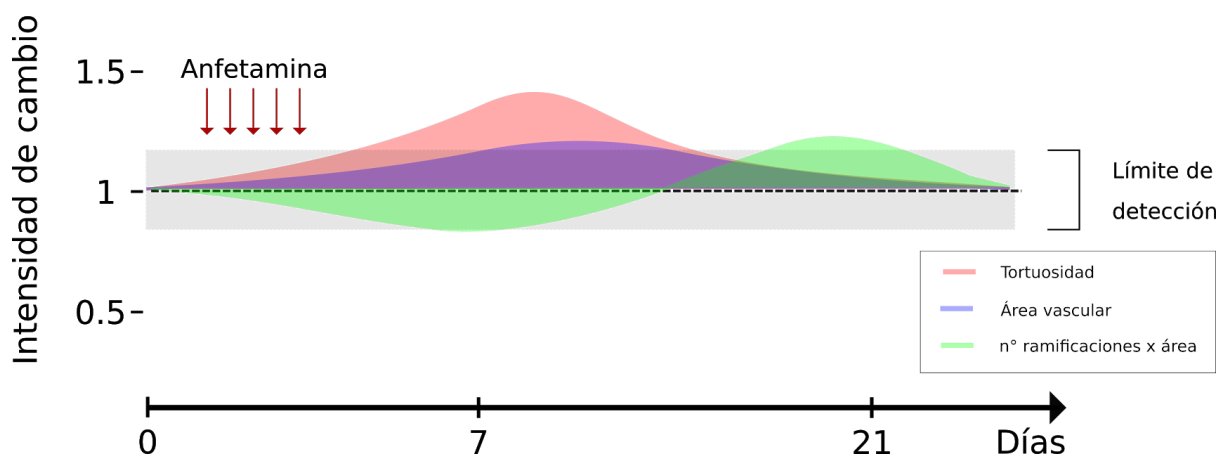
**B**

### CxPF-PL



**C**

### CxPF-IL



**Figura 35. Esquema hipotético de los cambios angioplásticos inducidos por ANF.** La figura esquematiza los cambios en la microarquitectura vascular inducidos por la exposición a ANF que ocurren en la CxPF a lo largo de 21 días de abstinencia. ANF induce un aumento de tortuosidad luego de 7 días de la última exposición, lo que genera vasos de mayor longitud y menos ramificados, lo que aumenta el área vascular; a los 21 días de abstinencia los parámetros vuelven a valores normales. Esquema gráfico (a). Esquema de cambios vs tiempo en CxPF-PL (b). Esquema gráfico (a). Esquema de cambios vs tiempo en CxPF-IL (c).

La angiogénesis microvascular es principalmente regulada a partir de los niveles de oxígeno tisular. En este sentido, se han reportado resultados similares a los arriba descritos cuando se expone a los roedores a condiciones hipóxicas, lo que induce angiogénesis de los microvasos cerebrales que luego retornan a condiciones basales cuando los animales retornan a un ambiente normóxico <sup>267</sup>. En este sentido, utilizando un protocolo de exposición a ANF similar al del presente trabajo en ratas Wistar (2 mg/kg i.p. x 4 días), Chu et al. reportaron un incremento de la expresión de HIF-1 (el principal mediador de la señalización angiogénica) en hipotálamo <sup>268</sup>. A su vez, luego de una administración aguda de metanfetamina, Kousik et al. observaron un incremento de la expresión de HIF-1 en CPu, el cual se asoció con una hipoperfusión regional debido a una disminución del diámetro microvascular <sup>269</sup>. A partir de estas evidencias, es razonable hipotetizar que la angiogénesis transiente en la CxPF sea producto de la estimulación de señales angiogénicas inducidas por ANF incluso en condiciones normóxicas. En línea con este razonamiento, la extensiva inducción de estrés oxidativo inducido por ANF, vía R-AT<sub>1</sub>, observada en el presente trabajo podría contribuir al efecto angiogénico observado, debido a que los ROS son inductores de la regulación positiva de HIF-1. Se ha reportado que los ROS estabilizan HIF-1 vía inactivación de proil-hidroxilasas y aumentan su transcripción y transactivación <sup>270,271</sup>.

#### **4 El antagonismo de los R-AT<sub>1</sub> induce capilarización en la corteza prefrontal**

En el presente trabajo hemos observado una reducción del diámetro vascular inducido por el antagonismo de R-AT<sub>1</sub> en la CxPF-PL, 90 minutos después de la última administración de CAND. Teniendo en cuenta que este hallazgo se realizó en presencia de CAND, este fenómeno podría indicar una vasoconstricción paradójica inducida por el antagonismo de R-AT<sub>1</sub> (estas drogas se utilizan en la clínica como hipotensores gracias a su acción vasodilatadora) o bien a la formación de nuevos capilares a expensas de una reorganización de vasos medios preexistentes (el área vascular permaneció constante, pero se redujo la cantidad de vasos medios). En este sentido, resultados previos de nuestro laboratorio no publicados muestran que luego de 12 días de la última administración de CAND existe una reducción del diámetro microvascular, por lo que creemos razonable hipotetizar que el antagonismo de R-AT<sub>1</sub> induce capilarización y no vasoconstricción. A su vez, en el presente trabajo no se observaron diferencias en el diámetro microvascular de CxPF-PL luego de 21 días de la última administración, por lo que la inducción de capilarización sería un efecto transiente que se mantiene al menos hasta 12 días después de la última administración de CAND. En línea con esta hipótesis, Foulquier et al. reportaron que la administración de CAND en un esquema similar al utilizado en este trabajo pero a una mayor dosis (10 mg/kg por 10 días) induce una reducción del diámetro vascular de arteriolas piales <sup>272</sup>. Interesantemente, dichos autores reportan que CAND pero no telmisartán reduce el diámetro arteriolar, por lo que este efecto no sería común a todos los antagonistas de R-AT<sub>1</sub> <sup>272</sup>.



En cuanto a los posibles mecanismos angioplásticos asociados a la capilarización inducida por CAND, la reducción de la cantidad de vasos medios sin cambios en el área vascular podría ser un posible indicio de una reorganización vascular por intususcepción. En este sentido, la angiogénesis intususceptiva genera un pilar intravascular dividiendo el vaso en dos nuevas ramas y por lo tanto reduciendo su diámetro sin cambiar el área vascular final.

Si bien las implicancias fisiológicas asociadas a la capilarización inducida por CAND en la CxPF-PL son inciertas, este hallazgo podría estar relacionado con una mayor capacidad del transporte de oxígeno mejorando la resiliencia de esta área cerebral a las demandas cambiantes de oxígeno de forma similar a como sucede en otros tejidos como el muscular <sup>273,274</sup>. En este escenario, un mejor manejo de las demandas de oxígeno podría proteger al tejido de eventuales eventos hipóxicos que son a su vez fuentes importantes de estrés oxidativo <sup>275</sup>. En este sentido, Ito et al. reportaron que CAND induce una mayor protección frente a la isquemia cerebral que otras drogas antihipertensivas como captopril y nicardipina por medio de la mejora del flujo sanguíneo cerebral y la generación de cambios angioplásticos en la arteria cerebral media <sup>276</sup>.

# 6

## Conclusiones

A partir de los resultados obtenidos, podemos concluir que los R-AT<sub>1</sub> de angiotensina II participan en el desarrollo y mantenimiento de la sensibilización conductual y neuroquímica a anfetamina. Entre las múltiples vías posibles por las cuales estos receptores pueden ejercer los efectos anteriormente expuestos, en este trabajo evaluamos la modulación de la cinética de recaptación de dopamina, observando que candesartan induce un incremento de la velocidad de recaptación, lo que podría reducir el tiempo de dopamina en la hendidura sináptica y por lo tanto reducir la magnitud de la estimulación dopaminérgica inducida por anfetamina. A su vez, hemos observado que dichos receptores participan activamente en el desarrollo y mantenimiento del deterioro de la memoria de trabajo inducida por anfetamina, así como en la astrogliosis y microgliosis en un área cerebral clave para este proceso cognitivo como es la corteza prefrontal prelámbica. El presente trabajo junto con resultados previos de nuestro laboratorio nos permiten concluir que anfetamina, vía R-AT<sub>1</sub>, induce angiogénesis transiente tanto en la subdivisión prelámbica como infralámbica de la corteza prefrontal, alteración que podría ser parte de los fenómenos que desencadenan la gliosis prefrontal o bien consecuencia de la misma.

Teniendo en cuenta los resultados del presente trabajo y de resultados previos de nuestro laboratorio podemos afirmar que el antagonismo de los R-AT<sub>1</sub>, por medio de candesartan, induce capilarización transiente en la corteza prefrontal prelámbica. Dicho fenómeno se mantendría al menos 12 días después de la retirada de candesartan, regresando a magnitudes basales luego de 21 días en ausencia del antagonista.

En base a la alostasis del sistema dopaminérgico inducido por la exposición a anfetamina y su similitud con parte del desequilibrio observado en enfermedades neuropsiquiátricas como la ESQ, la modulación de estas alteraciones a partir del antagonismo de los R-AT<sub>1</sub> presenta la potencialidad de generar nuevos blancos terapéuticos a partir del reposicionamiento de medicamentos actualmente presentes en el mercado, los cuales se asocian con una muy baja incidencia de reacciones adversas e hipotensión en individuos normotensos.

# 7

## Bibliografía

1. World Health Organization. The WHO World Health Report 2001: New understanding - New hope. *World Health Rep 2001*. 2001;(1).
2. Barbato A. *Nations for Mental Health: A New Who Action Programme on Mental Health for Underserved Populations.*; 1996. doi:10.1016/s0924-9338(99)80120-5
3. Bull SA, Hunkeler EM, Lee JY, et al. Discontinuing or switching selective serotonin-reuptake inhibitors. *Ann Pharmacother*. 2002;36(4):578–584. doi:10.1345/aph.1A254
4. Paz H. R. Modelos fisiopatológicos de la esquizofrenia; de dopamina a glutamato, de glutamato a GABA. *Rev Chil Neuro-Psiquiatr*. 2005;43(4):314-328. doi:10.4067/S0717-92272005000400006
5. Millan MJ, Fone K, Steckler T, Horan WP. Negative symptoms of schizophrenia: Clinical characteristics, pathophysiological substrates, experimental models and prospects for improved treatment. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2014;24(5):645–692. doi:10.1016/j.euroneuro.2014.03.008
6. GBD 2017 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators SL, Abate D, Abate KH, et al. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet Lond Engl*. 2018;392(10159):1789–1858. doi:10.1016/S0140-6736(18)32279-7
7. Lang UE, Puls I, Muller DJ, Strutz-Seebohm N, Gallinat J. Molecular mechanisms of schizophrenia. *Cell Physiol Biochem Int J Exp Cell Physiol Biochem Pharmacol*. 2007;20(6):687-702. doi:10.1159/000110430
8. Sullivan PF, Kendler KS, Neale MC. Schizophrenia as a complex trait: evidence from a meta-analysis of twin studies. *Arch Gen Psychiatry*. 2003;60(12):1187-1192. doi:10.1001/archpsyc.60.12.1187
9. Rapoport J, Giedd J, Gogtay N. Neurodevelopmental model of schizophrenia: update 2012. *Mol Psychiatry*. 2012;17(12):1228-1238. doi:10.1038/mp.2012.23
10. Seimon LD, Zecevic N. Schizophrenia: a tale of two critical periods for prefrontal cortical development. *Transl Psychiatry*. 2015;5(8):e623-e623. doi:10.1038/tp.2015.115
11. Khandaker GM, Zimbron J, Lewis G, Jones PB. Prenatal maternal infection, neurodevelopment and adult schizophrenia: a systematic review of population-based studies. *Psychol Med*. 2013;43(2):239-257. doi:10.1017/S0033291712000736
12. Menninger KA. Influenza and schizophrenia. An analysis of post-influenzal “dementia precox,” as of 1918, and five years later further studies of the psychiatric aspects of influenza. 1926. *Am J Psychiatry*. 1994;151(6 Suppl):182-187. doi:10.1176/ajp.151.6.182
13. Pedersen MG, Stevens H, Pedersen CB, Nørgaard-Pedersen B, Mortensen PB. Toxoplasma infection and later development of schizophrenia in mothers. *Am J Psychiatry*. 2011;168(8):814-821. doi:10.1176/appi.ajp.2011.10091351
14. Mortensen PB, Nørgaard-Pedersen B, Waltoft BL, et al. Toxoplasma gondii as a risk factor for early-onset schizophrenia: analysis of filter paper blood samples obtained at birth. *Biol Psychiatry*. 2007;61(5):688-693. doi:10.1016/j.biopsych.2006.05.024
15. Dean K, Murray RM. Environmental risk factors for psychosis. *Dialogues Clin Neurosci*. 2005;7(1):69-80. Accessed November 15, 2020. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3181718/>
16. Khashan AS, Abel KM, McNamee R, et al. Higher risk of offspring schizophrenia following antenatal maternal exposure to severe adverse life events. *Arch Gen Psychiatry*. 2008;65(2):146-152. doi:10.1001/archgenpsychiatry.2007.20

17. Mathers DC, Ghodse AH. Cannabis and psychotic illness. *Br J Psychiatry J Ment Sci.* 1992;161:648-653. doi:10.1192/bjp.161.5.648
18. Hall W, Degenhardt L. Is there a specific 'cannabis psychosis'? In: Castle D, Murray R, eds. *Marijuana and Madness: Psychiatry and Neurobiology.* Cambridge University Press; 2004:89-100. doi:10.1017/CBO9780511543630.008
19. Andréasson S, Allebeck P, Engström A, Rydberg U. Cannabis and schizophrenia. A longitudinal study of Swedish conscripts. *Lancet Lond Engl.* 1987;2(8574):1483-1486. doi:10.1016/s0140-6736(87)92620-1
20. Zammit S, Allebeck P, Andreasson S, Lundberg I, Lewis G. Self reported cannabis use as a risk factor for schizophrenia in Swedish conscripts of 1969: historical cohort study. *BMJ.* 2002;325(7374):1199. doi:10.1136/bmj.325.7374.1199
21. Seeman P, Kapur S. Schizophrenia: More dopamine, more D2 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(14):7673-7675. Accessed November 18, 2020. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC33999/>
22. Flórez J, Armijo JA, Mediavilla Á. *Farmacología Humana.* El Sevier Masson; 2014.
23. Abi-Dargham A, Rodenhiser J, Printz D, et al. Increased baseline occupancy of D2 receptors by dopamine in schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(14):8104-8109. Accessed November 18, 2020. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC16677/>
24. Breier A, Su TP, Saunders R, et al. Schizophrenia is associated with elevated amphetamine-induced synaptic dopamine concentrations: evidence from a novel positron emission tomography method. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(6):2569-2574. doi:10.1073/pnas.94.6.2569
25. Lieberman JA, Kane JM, Alvir J. Provocative tests with psychostimulant drugs in schizophrenia. *Psychopharmacology (Berl).* Published online 1987. doi:10.1007/BF00216006
26. Slifstein M, van de Giessen E, Van Snellenberg J, et al. Deficits in prefrontal cortical and extrastriatal dopamine release in schizophrenia: a positron emission tomographic functional magnetic resonance imaging study. *JAMA Psychiatry.* 2015;72(4):316-324. doi:10.1001/jamapsychiatry.2014.2414
27. Davis KL, Kahn RS, Ko G, Davidson M. Dopamine in schizophrenia: a review and reconceptualization. *Am J Psychiatry.* 1991;148(11):1474-1486. doi:10.1176/ajp.148.11.1474
28. Fernández PL, Moreno A. *Velazquez Farmacología básica y clínica / Velazquez Basic and Clinical Pharmacology.* Editorial Medica Panamericana Sa de; 2008.
29. Corvin A, Morris DW. Genome-wide association studies: findings at the major histocompatibility complex locus in psychosis. *Biol Psychiatry.* 2014;75(4):276-283. doi:10.1016/j.biopsych.2013.09.018
30. International Schizophrenia Consortium, Purcell SM, Wray NR, et al. Common polygenic variation contributes to risk of schizophrenia and bipolar disorder. *Nature.* 2009;460(7256):748-752. doi:10.1038/nature08185
31. Shi J, Levinson DF, Duan J, et al. Common variants on chromosome 6p22.1 are associated with schizophrenia. *Nature.* 2009;460(7256):753-757. doi:10.1038/nature08192
32. Stefansson H, Ophoff RA, Steinberg S, et al. Common variants conferring risk of schizophrenia. *Nature.* 2009;460(7256):744-747. doi:10.1038/nature08186
33. Potvin S, Stip E, Septhry AA, Gendron A, Bah R, Kouassi E. Inflammatory cytokine alterations in schizophrenia: a systematic quantitative review. *Biol Psychiatry.* 2008;63(8):801-808. doi:10.1016/j.biopsych.2007.09.024
34. Miller BJ, Culpepper N, Rapaport MH. C-reactive protein levels in schizophrenia: a review and meta-analysis. *Clin Schizophr Relat Psychoses.* 2014;7(4):223-230. doi:10.3371/CSRP.MICU.020813
35. Wildenauer DB, Körschenhausen D, Hoehl W, Ackenheil M, Kehl M, Lottspeich F. Analysis of cerebrospinal fluid from patients with psychiatric and neurological disorders by two-dimensional electrophoresis: identification of disease-associated polypeptides as fibrin fragments. *Electrophoresis.* 1991;12(7-8):487-492. doi:10.1002/elps.1150120706
36. Körschenhausen DA, Hampel HJ, Ackenheil M, Penning R, Müller N. Fibrin degradation products in post mortem brain tissue of schizophrenics: a possible marker for underlying inflammatory processes. *Schizophr Res.* 1996;19(2-3):103-109. doi:10.1016/0920-9964(95)00073-9
37. Müller N, Weidinger E, Leitner B, Schwarz MJ. The role of inflammation in schizophrenia. *Front Neurosci.* 2015;9. doi:10.3389/fnins.2015.00372
38. Cannon TD. How schizophrenia develops: cognitive and brain mechanisms underlying onset of psychosis. *Trends Cogn Sci.* 2015;19(12):744-756. doi:10.1016/j.tics.2015.09.009
39. Jarskog LF, Xiao H, Wilkie MB, Lauder JM, Gilmore JH. Cytokine regulation of embryonic rat dopamine and serotonin neuronal survival in vitro. *Int J Dev Neurosci Off J Int Soc Dev Neurosci.* 1997;15(6):711-716. doi:10.1016/s0736-5748(97)00029-4
40. Müller N, Schwarz MJ. Neuroimmune-endocrine crosstalk in schizophrenia and mood disorders. *Expert*

- Rev Neurother.* 2006;6(7):1017-1038. doi:10.1586/14737175.6.7.1017
41. Miller BJ, Buckley P, Seabolt W, Mellor A, Kirkpatrick B. Meta-analysis of cytokine alterations in schizophrenia: clinical status and antipsychotic effects. *Biol Psychiatry.* 2011;70(7):663-671. doi:10.1016/j.biopsych.2011.04.013
  42. Müller N, Riedel M, Schwarz MJ, Engel RR. Clinical effects of COX-2 inhibitors on cognition in schizophrenia. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.* 2005;255(2):149-151. doi:10.1007/s00406-004-0548-4
  43. Müller N, Krause D, Dehning S, et al. Celecoxib treatment in an early stage of schizophrenia: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled trial of celecoxib augmentation of amisulpride treatment. *Schizophr Res.* 2010;121(1-3):118-124. doi:10.1016/j.schres.2010.04.015
  44. Laan W, Grobbee DE, Selten J-P, Heijnen CJ, Kahn RS, Burger H. Adjuvant aspirin therapy reduces symptoms of schizophrenia spectrum disorders: results from a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Clin Psychiatry.* 2010;71(5):520-527. doi:10.4088/JCP.09m05117yel
  45. Sommer IE, de Witte L, Begemann M, Kahn RS. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs in schizophrenia: ready for practice or a good start? A meta-analysis. *J Clin Psychiatry.* 2012;73(4):414-419. doi:10.4088/JCP.10r06823
  46. Nitta M, Kishimoto T, Müller N, et al. Adjunctive use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs for schizophrenia: a meta-analytic investigation of randomized controlled trials. *Schizophr Bull.* 2013;39(6):1230-1241. doi:10.1093/schbul/sbt070
  47. Tourjman V, Kouassi É, Koué M-È, et al. Antipsychotics' effects on blood levels of cytokines in schizophrenia: a meta-analysis. *Schizophr Res.* 2013;151(1-3):43-47. doi:10.1016/j.schres.2013.10.011
  48. van Kesteren CFMG, Gremmels H, de Witte LD, et al. Immune involvement in the pathogenesis of schizophrenia: a meta-analysis on postmortem brain studies. *Transl Psychiatry.* 2017;7(3):e1075. doi:10.1038/tp.2017.4
  49. Marques TR, Ashok AH, Pillinger T, et al. Neuroinflammation in schizophrenia: meta-analysis of in vivo microglial imaging studies. *Psychol Med.* 2019;49(13):2186-2196. doi:10.1017/S0033291718003057
  50. Bergon A, Belzeaux R, Comte M, et al. CX3CR1 is dysregulated in blood and brain from schizophrenia patients. *Schizophr Res.* 2015;168(1):434-443. doi:10.1016/j.schres.2015.08.010
  51. Bruton CJ, Crow TJ, Frith CD, Johnstone EC, Owens DG, Roberts GW. Schizophrenia and the brain: a prospective clinico-neuropathological study. *Psychol Med.* 1990;20(2):285-304. doi:10.1017/s0033291700017608
  52. Rajkowska G, Miguel-Hidalgo JJ, Makkos Z, Meltzer H, Overholser J, Stockmeier C. Layer-specific reductions in GFAP-reactive astroglia in the dorsolateral prefrontal cortex in schizophrenia. *Schizophr Res.* 2002;57(2-3):127-138. doi:10.1016/s0920-9964(02)00339-0
  53. Arnold SE, Franz BR, Trojanowski JQ, Moberg PJ, Gur RE. Glial fibrillary acidic protein-immunoreactive astrocytosis in elderly patients with schizophrenia and dementia. *Acta Neuropathol (Berl).* 1996;91(3):269-277. doi:10.1007/s004010050425
  54. Catts VS, Wong J, Fillman SG, Fung SJ, Shannon Weickert C. Increased expression of astrocyte markers in schizophrenia: Association with neuroinflammation. *Aust N Z J Psychiatry.* 2014;48(8):722-734. doi:10.1177/0004867414531078
  55. Garey L. When cortical development goes wrong: schizophrenia as a neurodevelopmental disease of microcircuits. *J Anat.* 2010;217(4):324-333. doi:10.1111/j.1469-7580.2010.01231.x
  56. Fatemi SH, Laurence JA, Araghi-Niknam M, et al. Glial fibrillary acidic protein is reduced in cerebellum of subjects with major depression, but not schizophrenia. *Schizophr Res.* 2004;69(2-3):317-323. doi:10.1016/j.schres.2003.08.014
  57. Casanova MF. Astrocytosis and schizophrenia. *Schizophr Res.* 1991;5(3):186-187. doi:10.1016/0920-9964(91)90062-v
  58. Najjar S, Pearlman DM. Neuroinflammation and white matter pathology in schizophrenia: systematic review. *Schizophr Res.* 2015;161(1):102-112. doi:10.1016/j.schres.2014.04.041
  59. Hercher C, Chopra V, Beasley CL. Evidence for morphological alterations in prefrontal white matter glia in schizophrenia and bipolar disorder. *J Psychiatry Neurosci JPN.* 2014;39(6):376-385. doi:10.1503/jpn.130277
  60. Williams MR, Hampton T, Pearce RKB, et al. Astrocyte decrease in the subgenual cingulate and callosal genu in schizophrenia. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.* 2013;263(1):41-52. doi:10.1007/s00406-012-0328-5
  61. Steffek AE, McCullumsmith RE, Haroutunian V, Meador-Woodruff JH. Cortical expression of glial fibrillary acidic protein and glutamine synthetase is decreased in schizophrenia. *Schizophr Res.* 2008;103(1-3):71-82. doi:10.1016/j.schres.2008.04.032

62. Webster MJ, O'Grady J, Kleinman JE, Weickert CS. Glial fibrillary acidic protein mRNA levels in the cingulate cortex of individuals with depression, bipolar disorder and schizophrenia. *Neuroscience*. 2005;133(2):453-461. doi:10.1016/j.neuroscience.2005.02.037
63. Aleksovska K, Leoncini E, Bonassi S, Cesario A, Boccia S, Frustaci A. Systematic review and meta-analysis of circulating S100B blood levels in schizophrenia. *PloS One*. 2014;9(9):e106342. doi:10.1371/journal.pone.0106342
64. Schroeter ML, Abdul-Khaliq H, Krebs M, Diefenbacher A, Blasig IE. Neuron-specific enolase is unaltered whereas S100B is elevated in serum of patients with schizophrenia--original research and meta-analysis. *Psychiatry Res*. 2009;167(1-2):66-72. doi:10.1016/j.psychres.2008.01.002
65. Toker L, Mancarci BO, Tripathy S, Pavlidis P. Transcriptomic Evidence for Alterations in Astrocytes and Parvalbumin Interneurons in Subjects With Bipolar Disorder and Schizophrenia. *Biol Psychiatry*. 2018;84(11):787-796. doi:10.1016/j.biopsych.2018.07.010
66. Plitman E, Iwata Y, Caravaggio F, et al. Kynurenic Acid in Schizophrenia: A Systematic Review and Meta-analysis. *Schizophr Bull*. 2017;43(4):764-777. doi:10.1093/schbul/sbw221
67. Kiernan JA, Barr ML. *El sistema nervioso humano: un punto de vista anatómico*. McGraw-Hill; 2006.
68. Erinjeri JP, Woolsey TA. Spatial integration of vascular changes with neural activity in mouse cortex. *J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab*. 2002;22(3):353-360. doi:10.1097/00004647-200203000-00013
69. Cox SB, Woolsey TA, Rovainen CM. Localized dynamic changes in cortical blood flow with whisker stimulation corresponds to matched vascular and neuronal architecture of rat barrels. *J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab*. 1993;13(6):899-913. doi:10.1038/jcbfm.1993.113
70. Pries AR, Secomb TW. Making microvascular networks work: angiogenesis, remodeling, and pruning. *Physiol Bethesda Md*. 2014;29(6):446-455. doi:10.1152/physiol.00012.2014
71. Secomb TW, Pries AR. Microvascular Plasticity: Angiogenesis in Health and Disease--Preface. *Microcirc N Y N* 1994. 2016;23(2):93-94. doi:10.1111/micc.12262
72. Shepro D. *Microvascular Research: Biology and Pathology, Two-Volume Set*. Elsevier; 2005.
73. Lopes R, Soares R, Coelho R, Figueiredo-Braga M. Angiogenesis in the pathophysiology of schizophrenia - a comprehensive review and a conceptual hypothesis. *Life Sci*. 2015;128:79-93. doi:10.1016/j.lfs.2015.02.010
74. Katsel P, Roussos P, Pletnikov M, Haroutunian V. Microvascular anomaly conditions in psychiatric disease. Schizophrenia – angiogenesis connection. *Neurosci Biobehav Rev*. 2017;77:327-339. doi:10.1016/j.neubiorev.2017.04.003
75. Pinkham A, Loughhead J, Ruparel K, et al. Resting quantitative cerebral blood flow in schizophrenia measured by pulsed arterial spin labeling perfusion MRI. *Psychiatry Res*. 2011;194(1):64-72. doi:10.1016/j.psychresns.2011.06.013
76. Schobel SA, Chaudhury NH, Khan UA, et al. Imaging patients with psychosis and a mouse model establishes a spreading pattern of hippocampal dysfunction and implicates glutamate as a driver. *Neuron*. 2013;78(1):81-93. doi:10.1016/j.neuron.2013.02.011
77. Uranova NA, Zimina IS, Vikhрева OV, Krukov NO, Rachmanova VI, Orlovskaya DD. Ultrastructural damage of capillaries in the neocortex in schizophrenia. *World J Biol Psychiatry Off J World Fed Soc Biol Psychiatry*. 2010;11(3):567-578. doi:10.3109/15622970903414188
78. Kreczmanski P, Schmidt-Kastner R, Heinsen H, Steinbusch HWM, Hof PR, Schmitz C. Stereological studies of capillary length density in the frontal cortex of schizophrenics. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2005;109(5):510-518. doi:10.1007/s00401-005-1003-y
79. Kreczmanski P, Heinsen H, Mantua V, et al. Microvessel length density, total length, and length per neuron in five subcortical regions in schizophrenia. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2009;117(4):409-421. doi:10.1007/s00401-009-0482-7
80. Meltzer HY. Treatment-resistant schizophrenia--the role of clozapine. *Curr Med Res Opin*. 1997;14(1):1-20. doi:10.1185/03007999709113338
81. Mosolov SN, Potapov AV, Ushakov UV. Remission in schizophrenia: results of cross-sectional with 6-month follow-up period and 1-year observational therapeutic studies in an outpatient population. *Ann Gen Psychiatry*. 2012;11(1):1. doi:10.1186/1744-859X-11-1
82. Steeds H, Carhart-Harris RL, Stone JM. Drug models of schizophrenia. *Ther Adv Psychopharmacol*. 2015;5(1):43-58. doi:10.1177/2045125314557797
83. Lally J, MacCabe JH. Antipsychotic medication in schizophrenia: A review. *Br Med Bull*. 2015;114(1). doi:10.1093/bmb/ldv017
84. Belzung C, Lemoine M. Criteria of validity for animal models of psychiatric disorders: focus on anxiety disorders and depression. *Biol Mood Anxiety Disord*. 2011;1(1):9. doi:10.1186/2045-5380-1-9
85. Willner P. The validity of animal models of depression. *Psychopharmacology (Berl)*. 1984;83(1):1-16.

- doi:10.1007/BF00427414
86. Winship IR, Dursun SM, Baker GB, et al. An Overview of Animal Models Related to Schizophrenia. *Can J Psychiatry Rev Can Psychiatr*. 2019;64(1):5-17. doi:10.1177/0706743718773728
  87. Bäckström P, Etelälahti TJ, Hyytiä P. Attenuation of reinforcing and psychomotor stimulant effects of amphetamine by aripiprazole. *Addict Biol*. 2011;16(1):55-63. doi:10.1111/j.1369-1600.2010.00223.x
  88. Meng ZH, Feldpaush DL, Merchant KM. Clozapine and haloperidol block the induction of behavioral sensitization to amphetamine and associated genomic responses in rats. *Brain Res Mol Brain Res*. 1998;61(1-2):39-50. doi:10.1016/s0169-328x(98)00196-x
  89. Mavrikaki M, Nomikos GG, Panagis G. Efficacy of the atypical antipsychotic aripiprazole in d-amphetamine-based preclinical models of mania. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2010;13(4):541-548. doi:10.1017/S1461145709991143
  90. Kuribara H. Inhibition of methamphetamine sensitization by post-methamphetamine treatment with SCH 23390 or haloperidol. *Psychopharmacology (Berl)*. 1995;119(1):34-38. doi:10.1007/BF02246051
  91. Herrera AS, Casanova JP, Gatica RI, Escobar F, Fuentealba JA. Clozapine pre-treatment has a protracted hypolocomotor effect on the induction and expression of amphetamine sensitization. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2013;47:1-6. doi:10.1016/j.pnpbp.2013.07.023
  92. Carvalho M, Carmo H, Costa VM, et al. *Toxicity of Amphetamines: An Update*. Vol 86. Springer; 2012. doi:10.1007/s00204-012-0815-5
  93. Heal DJ, Smith SL, Gosden J, Nutt DJ. Amphetamine, past and present--a pharmacological and clinical perspective. *J Psychopharmacol Oxf Engl*. 2013;27(6):479-496. doi:10.1177/0269881113482532
  94. Kahlig KM, Galli A. Regulation of dopamine transporter function and plasma membrane expression by dopamine, amphetamine, and cocaine. *Eur J Pharmacol*. 2003;479(1-3):153-158. doi:10.1016/j.ejphar.2003.08.065
  95. Annamalai B, Mannangatti P, Arapulisamy O, Ramamoorthy S, Jayanthi LD. Involvement of threonine 258 and serine 259 motif in amphetamine-induced norepinephrine transporter endocytosis. *J Neurochem*. 2010;115(1):23-35. doi:10.1111/j.1471-4159.2010.06898.x
  96. Banks KE, Gratton A. Possible involvement of medial prefrontal cortex in amphetamine-induced sensitization of mesolimbic dopamine function. *Eur J Pharmacol*. 1995;282(1):157-167. doi:10.1016/0014-2999(95)00306-6
  97. Cador M, Bjijou Y, Cailhol S, Stinus L. d-Amphetamine-induced behavioral sensitization: implication of a glutamatergic medial prefrontal cortex-ventral tegmental area innervation. *Neuroscience*. 1999;94(3):705-721. doi:10.1016/S0306-4522(99)00361-9
  98. Wolf ME, Dahlin SL, Hu X-T, Xue C-J, White K. Effects of lesions of prefrontal cortex, amygdala, or fornix on behavioral sensitization to amphetamine: Comparison with N-methyl-d-aspartate antagonists. *Neuroscience*. 1995;69(2):417-439. doi:10.1016/0306-4522(95)00248-H
  99. Pierce RC, Kalivas PW. A circuitry model of the expression of behavioral sensitization to amphetamine-like psychostimulants. *Brain Res Brain Res Rev*. 1997;25(2):192-216. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9403138>
  100. Sharp T, Zetterström T, Ljungberg T, Ungerstedt U. A direct comparison of amphetamine-induced behaviours and regional brain dopamine release in the rat using intracerebral dialysis. *Brain Res*. 1987;401(2):322-330. doi:10.1016/0006-8993(87)91416-8
  101. Vanderschuren LJM, Kalivas PW. Alterations in dopaminergic and glutamatergic transmission in the induction and expression of behavioral sensitization: a critical review of preclinical studies. *Psychopharmacology (Berl)*. 2000;151(2):99-120. doi:10.1007/s002130000493
  102. Leyton M, Vezina P. Striatal ups and downs: Their roles in vulnerability to addictions in humans. *Neurosci Biobehav Rev*. 2013;37(9, Part A):1999-2014. doi:10.1016/j.neubiorev.2013.01.018
  103. Shuto T, Nishi A. Treatment of the Psychostimulant-Sensitized Animal Model of Schizophrenia. *CNS Neurosci Ther*. Published online 2011. doi:10.1111/j.1755-5949.2010.00218.x
  104. Beyaert MGR, Daya RP, Dyck BA, Johnson RL, Mishra RK. PAOPA, a potent dopamine D2 receptor allosteric modulator, prevents and reverses behavioral and biochemical abnormalities in an amphetamine-sensitized preclinical animal model of schizophrenia. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2013;23(3):253-62. doi:10.1016/j.euroneuro.2012.04.010
  105. Featherstone RE, Kapur S, Fletcher PJ. The amphetamine-induced sensitized state as a model of schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2007;31(8):1556-1571. doi:10.1016/j.pnpbp.2007.08.025
  106. Pathak G, Ibrahim BA, McCarthy SA, Baker K, Kelly MP. Amphetamine sensitization in mice is sufficient to produce both manic- and depressive-related behaviors as well as changes in the functional connectivity of corticolimbic structures. *Neuropharmacology*. 2015;95:434-447. doi:10.1016/j.neuropharm.2015.04.026

107. Rincón-Cortés M, Gagnon KG, Dollish HK, Grace AA. Diazepam reverses increased anxiety-like behavior, social behavior deficit, and dopamine dysregulation following withdrawal from acute amphetamine. *Neuropsychopharmacology*. 2018;43(12):2418–2425. doi:10.1038/s41386-018-0123-8
108. Karler R, Calder LI, Chaudhry IA, Turkanis SA. Blockade of “reverse tolerance” to cocaine and amphetamine by MK-801. *Life Sci*. 1989;45(7):599-606. doi:10.1016/0024-3205(89)90045-3
109. Stewart J, Vezina P. Microinjections of Sch-23390 into the ventral tegmental area and substantia nigra pars reticulata attenuate the development of sensitization to the locomotor activating effects of systematic amphetamine. *Brain Res*. 1989;495(2):401-406. doi:10.1016/0006-8993(89)90236-9
110. Ujike H, Onoue T, Akiyama K, Hamamura T, Otsuki S. Effects of selective D-1 and D-2 dopamine antagonists on development of methamphetamine-induced behavioral sensitization. *Psychopharmacology (Berl)*. 1989;98(1):89-92. doi:10.1007/BF00442011
111. Vezina P, Stewart J. The effect of dopamine receptor blockade on the development of sensitization to the locomotor activating effects of amphetamine and morphine. *Brain Res*. 1989;499(1):108-120. doi:10.1016/0006-8993(89)91140-2
112. Wolf ME, Khansa MR. Repeated administration of MK-801 produces sensitization to its own locomotor stimulant effects but blocks sensitization to amphetamine. *Brain Res*. 1991;562(1):164-168. doi:10.1016/0006-8993(91)91202-C
113. Futamura T, Akiyama S, Sugino H, Forbes A, McQuade RD, Kikuchi T. Aripiprazole attenuates established behavioral sensitization induced by methamphetamine. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2010;34(6):1115–1119. doi:10.1016/j.pnpbp.2010.06.006
114. Arnsten AFT. Stimulants: Therapeutic actions in ADHD. *Neuropsychopharmacol Off Publ Am Coll Neuropsychopharmacol*. 2006;31(11):2376-2383. doi:10.1038/sj.npp.1301164
115. Castner SA, Vosler PS, Goldman-Rakic PS. Amphetamine sensitization impairs cognition and reduces dopamine turnover in primate prefrontal cortex. *Biol Psychiatry*. 2005;57(7):743–751. doi:10.1016/J.BIOPSYCH.2004.12.019
116. Basterfield C, Hester R, Bowden SC. A meta-analysis of the relationship between abstinence and neuropsychological functioning in methamphetamine use disorder. *Neuropsychology*. 2019;33(5):739–753. doi:10.1037/neu0000552
117. Mizoguchi H, Yamada K. *Methamphetamine Use Causes Cognitive Impairment and Altered Decision-Making*. Vol 124. Elsevier Ltd; 2019. doi:10.1016/j.neuint.2018.12.019
118. Potvin S, Pelletier J, Grot S, Hébert C, Barr A, Lecomte T. *Cognitive Deficits in Individuals with Methamphetamine Use Disorder: A Meta-Analysis*. Vol 80. Elsevier Ltd; 2018. doi:10.1016/j.addbeh.2018.01.021
119. Sabrini S, Wang GY, Lin JC, Ian JK, Curley LE. Methamphetamine use and cognitive function: A systematic review of neuroimaging research. *Drug Alcohol Depend*. 2019;194:75–87. doi:10.1016/J.DRUGALCDEP.2018.08.041
120. Riga D, Matos MR, Glas A, Smit AB, Spijker S, Van den Oever MC. Optogenetic dissection of medial prefrontal cortex circuitry. *Front Syst Neurosci*. 2014;8:230. doi:10.3389/fnsys.2014.00230
121. Krügel U, Köles L, Illés P. Integration of neuronal and glial signalling by pyramidal cells of the rat prefrontal cortex; control of cognitive functions and addictive behaviour by purinergic mechanisms. *Neuropsychopharmacol Hung Magy Pszichofarmakologiai Egyesulet Lapja Off J Hung Assoc Psychopharmacol*. 2013;15(4):206-213.
122. Vanderschuren LJ, Schmidt ED, De Vries TJ, Van Moorsel CA, Tilders FJ, Schoffelemeier AN. A single exposure to amphetamine is sufficient to induce long-term behavioral, neuroendocrine, and neurochemical sensitization in rats. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 1999;19(21):9579–86. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10531460>
123. Lalonde R. The neurobiological basis of spontaneous alternation. *Neurosci Biobehav Rev*. 2002;26(1):91-104. doi:10.1016/s0149-7634(01)00041-0
124. Lapish CC, Balaguer-Ballester E, Seamans JK, Phillips AG, Durstewitz D. Amphetamine Exerts Dose-Dependent Changes in Prefrontal Cortex Attractor Dynamics during Working Memory. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 2015;35(28):10172-10187. doi:10.1523/JNEUROSCI.2421-14.2015
125. Occhieppo VB, Marchese NA, Rodriguez ID, Basmadjian OM, Baiardi G, Bregonzio C. Neurovascular unit alteration in somatosensory cortex and enhancement of thermal nociception induced by amphetamine involves central AT1 receptor activation. *Eur J Neurosci*. Published online 2017. doi:10.1111/ejn.13594
126. Paz MC, Marchese NA, Stroppa MM, et al. Involvement of the brain renin-angiotensin system (RAS) in the neuroadaptive responses induced by amphetamine in a two-injection protocol. *Behav Brain Res*. 2014;272:314–323. doi:10.1016/j.bbr.2014.07.021
127. Paz MC, Marchese NA, Cancela LM, Bregonzio C. Angiotensin II AT<sub>1</sub> receptors are involved in



- neuronal activation induced by amphetamine in a two-injection protocol. *BioMed Res Int*. 2013;2013:534817. doi:10.1155/2013/534817
128. Schrantee A, Tremoleda JL, Wylezinska-Arridge M, et al. Repeated dexamphetamine treatment alters the dopaminergic system and increases the pHMRI response to methylphenidate. *PLoS One*. 2017;12(2):e0172776. doi:10.1371/journal.pone.0172776
  129. Kalivas PW. Cocaine and amphetamine-like psychostimulants: neurocircuitry and glutamate neuroplasticity. *Dialogues Clin Neurosci*. 2007;9(4):389-397.
  130. Moratalla R, Khairnar A, Simola N, et al. Amphetamine-related drugs neurotoxicity in humans and in experimental animals: Main mechanisms. *Prog Neurobiol*. 2017;155:149-170. doi:10.1016/j.pneurobio.2015.09.011
  131. Tung C-S, Chang S-T, Huang C-L, Huang N-K. The neurotoxic mechanisms of amphetamine: Step by step for striatal dopamine depletion. *Neurosci Lett*. 2017;639:185-191. doi:10.1016/j.neulet.2017.01.002
  132. Brown JM, Yamamoto BK. Effects of amphetamines on mitochondrial function: Role of free radicals and oxidative stress. *Pharmacol Ther*. 2003;99(1):45-53. doi:10.1016/S0163-7258(03)00052-4
  133. Kettenmann H, Hanisch U-K, Noda M, Verkhratsky A. Physiology of microglia. *Physiol Rev*. 2011;91(2):461-553. doi:10.1152/physrev.00011.2010
  134. Shaerzadeh F, Streit WJ, Heysicattalab S, Khoshbouei H. Methamphetamine neurotoxicity, microglia, and neuroinflammation. *J Neuroinflammation*. 2018;15(1):341. doi:10.1186/s12974-018-1385-0
  135. LaVoie MJ, Card JP, Hastings TG. Microglial activation precedes dopamine terminal pathology in methamphetamine-induced neurotoxicity. *Exp Neurol*. 2004;187(1):47-57. doi:10.1016/j.expneurol.2004.01.010
  136. Loftis JM, Janowsky A. Neuroimmune Basis of Methamphetamine Toxicity. *Int Rev Neurobiol*. 2014;118:165-197. doi:10.1016/B978-0-12-801284-0.00007-5
  137. Pekny M, Nilsson M. Astrocyte activation and reactive gliosis. *Glia*. 2005;50(4):427-434. doi:10.1002/glia.20207
  138. Thomas M, George NI, Patterson TA, Bowyer JF. Amphetamine and environmentally induced hyperthermia differentially alter the expression of genes regulating vascular tone and angiogenesis in the meninges and associated vasculature. *Synapse N Y N*. 2009;63(10):881-894. doi:10.1002/syn.20661
  139. Marchese NA, Occhieppo VB, Basmadjian OM, Casarsa BS, Baiardi G, Bregonzio C. Angiotensin II modulates amphetamine-induced glial and brain vascular responses, and attention deficit via angiotensin type 1 receptor: Evidence from brain regional sensitivity to amphetamine. *Eur J Neurosci*. 2020;51(4):1026-1041. doi:10.1111/ejn.14605
  140. Tigerstedt R, Bergman PQ. Niere und Kreislauf. *Skand Arch Für Physiol*. 1898;8(1):223-271. doi:https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.1898.tb00272.x
  141. Braun-Menendez E, Fasciolo JC, Leloir LF, Muñoz JM. The substance causing renal hypertension. *J Physiol*. 1940;98(3):283-298. Accessed November 27, 2020. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1394029/>
  142. Cherne PN, Young P. Historia del sistema renina angiotensina: grandes hombres, un gran descubrimiento. *Rev Médica Chile*. 2014;142(9):1210-1216. doi:10.4067/S0034-98872014000900017
  143. Peach MJ. Renin-angiotensin system: biochemistry and mechanisms of action. *Physiol Rev*. 1977;57(2):313-370. doi:10.1152/physrev.1977.57.2.313
  144. Moeller I, Allen AM, Chai SY, Zhuo J, Mendelsohn FA. Bioactive angiotensin peptides. *J Hum Hypertens*. 1998;12(5):289-293. doi:10.1038/sj.jhh.1000640
  145. Wright JW, Harding JW. Brain renin-angiotensin--a new look at an old system. *Prog Neurobiol*. 2011;95(1):49-67. doi:10.1016/j.pneurobio.2011.07.001
  146. von Bohlen und Halbach O, Albrecht D. The CNS renin-angiotensin system. *Cell Tissue Res*. 2006;326(2):599-616. doi:10.1007/s00441-006-0190-8
  147. von Bohlen und Halbach O. The renin-angiotensin system in the mammalian central nervous system. *Curr Protein Pept Sci*. 2005;6(4):355-371. doi:10.2174/1389203054546361
  148. Imboden H, Harding JW, Hilgenfeldt U, Celio MR, Felix D. Localization of angiotensinogen in multiple cell types of rat brain. *Brain Res*. 1987;410(1):74-77. doi:10.1016/S0006-8993(87)80022-7
  149. Intebi AD, Flaxman MS, Ganong WF, Deschepper CF. Angiotensinogen production by rat astroglial cells in vitro and in vivo. *Neuroscience*. 1990;34(3):545-554. doi:10.1016/0306-4522(90)90163-x
  150. McKinley MJ, Albiston AL, Allen AM, et al. The brain renin-angiotensin system: location and physiological roles. *Int J Biochem Cell Biol*. 2003;35(6):901-918. doi:10.1016/s1357-2725(02)00306-0
  151. Karamyan VT, Speth RC. Enzymatic pathways of the brain renin-angiotensin system: unsolved problems and continuing challenges. *Regul Pept*. 2007;143(1-3):15-27. doi:10.1016/j.regpep.2007.03.006
  152. Zhou J, Pavel J, Macova M, et al. AT1 receptor blockade regulates the local angiotensin II system in

- cerebral microvessels from spontaneously hypertensive rats. *Stroke*. 2006;37(5):1271-1276. doi:10.1161/01.STR.0000217404.64352.d7
153. Jensen LL, Harding JW, Wright JW. Role of paraventricular nucleus in control of blood pressure and drinking in rats. *Am J Physiol*. 1992;262(6 Pt 2):F1068-1075. doi:10.1152/ajprenal.1992.262.6.F1068
  154. Epstein AN, Fitzsimons JT, Rolls BJ. Drinking induced by injection of angiotensin into the brain of the rat. *J Physiol*. 1970;210(2):457-474. doi:10.1113/jphysiol.1970.sp009220
  155. Mouw D, Bonjour JP, Malvin RL, Vander A. Central action of angiotensin in stimulating ADH release. *Am J Physiol*. 1971;220(1):239-242. doi:10.1152/ajplegacy.1971.220.1.239
  156. Lin MT. Effects of angiotensin II on metabolic, respiratory and vasomotor activities as well as body temperatures in the rabbit. *J Neural Transm*. 1980;49(3):197-204. doi:10.1007/BF01245225
  157. Bali A, Jaggi AS. Angiotensin as stress mediator: role of its receptor and interrelationships among other stress mediators and receptors. *Pharmacol Res*. 2013;76:49-57. doi:10.1016/j.phrs.2013.07.004
  158. Maul B, Krause W, Pankow K, et al. Central angiotensin II controls alcohol consumption via its AT1 receptor. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 2005;19(11):1474-1481. doi:10.1096/fj.05-3742com
  159. Raghavendra V, Chopra K, Kulkarni SK. Comparative studies on the memory-enhancing actions of captopril and losartan in mice using inhibitory shock avoidance paradigm. *Neuropeptides*. 2001;35(1):65-69. doi:10.1054/npep.2000.0845
  160. Garrido-Gil P, Rodriguez-Perez AI, Fernandez-Rodriguez P, Lanciego JL, Labandeira-Garcia JL. Expression of angiotensinogen and receptors for angiotensin and prorenin in the rat and monkey striatal neurons and glial cells. *Brain Struct Funct*. 2017;222(6):2559-2571. doi:10.1007/s00429-016-1357-z
  161. Li JJ, Lu J, Kaur C, Sivakumar V, Wu CY, Ling EA. Expression of angiotensin II and its receptors in the normal and hypoxic amoeboid microglial cells and murine BV-2 cells. *Neuroscience*. 2009;158(4):1488-1499. doi:10.1016/j.neuroscience.2008.11.046
  162. Miyoshi M, Miyano K, Moriyama N, Taniguchi M, Watanabe T. Angiotensin type 1 receptor antagonist inhibits lipopolysaccharide-induced stimulation of rat microglial cells by suppressing nuclear factor kappaB and activator protein-1 activation. *Eur J Neurosci*. 2008;27(2):343-351. doi:10.1111/j.1460-9568.2007.06014.x
  163. Wu C-Y, Zha H, Xia Q-Q, et al. Expression of angiotensin II and its receptors in activated microglia in experimentally induced cerebral ischemia in the adult rats. *Mol Cell Biochem*. 2013;382(1-2):47-58. doi:10.1007/s11010-013-1717-4
  164. de Kloet AD, Liu M, Rodríguez V, Krause EG, Sumners C. Role of neurons and glia in the CNS actions of the renin-angiotensin system in cardiovascular control. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2015;309(5):R444-458. doi:10.1152/ajpregu.00078.2015
  165. Hein L, Barsh GS, Pratt RE, Dzau VJ, Kobilka BK. Behavioural and cardiovascular effects of disrupting the angiotensin II type-2 receptor in mice. *Nature*. 1995;377(6551):744-747. doi:10.1038/377744a0
  166. Shanmugam S, Sandberg K. Ontogeny of angiotensin II receptors. *Cell Biol Int*. 1996;20(3):169-176. doi:10.1006/cbir.1996.0021
  167. Karnik SS, Unal H, Kemp JR, et al. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. XCIX. Angiotensin Receptors: Interpreters of Pathophysiological Angiotensinergic Stimuli. *Pharmacol Rev*. 2015;67(4):754-819. doi:10.1124/pr.114.010454
  168. Lucius R, Gallinat S, Rosenstiel P, Herdegen T, Sievers J, Unger T. The angiotensin II type 2 (AT2) receptor promotes axonal regeneration in the optic nerve of adult rats. *J Exp Med*. 1998;188(4):661-670. doi:10.1084/jem.188.4.661
  169. Csikós T, Chung O, Unger T. Receptors and their classification: focus on angiotensin II and the AT2 receptor. *J Hum Hypertens*. 1998;12(5):311-318. doi:10.1038/sj.jhh.1000639
  170. Singh KD, Karnik SS. Angiotensin Receptors: Structure, Function, Signaling and Clinical Applications. *J Cell Signal*. 2016;1(2). doi:10.4172/jcs.1000111
  171. Fox AJ, Lalloo UG, Belvisi MG, Bernareggi M, Chung KF, Barnes PJ. Bradykinin-evoked sensitization of airway sensory nerves: a mechanism for ACE-inhibitor cough. *Nat Med*. 1996;2(7):814-817. doi:10.1038/nm0796-814
  172. McConnaughey MM, McConnaughey JS, Ingenito AJ. Practical considerations of the pharmacology of angiotensin receptor blockers. *J Clin Pharmacol*. 1999;39(6):547-559. doi:10.1177/00912709922008155
  173. Vauquelin G, Fierens FL, Verheijen I, Vanderheyden PM. Distinctions between non-peptide angiotensin II AT1-receptor antagonists. *J Renin-Angiotensin-Aldosterone Syst JRAAS*. 2001;2(1\_suppl):S24-S31. doi:10.1177/14703203010020010401
  174. Shen P-C, He L-Q, Yang X-J, Cao H-X. Renal protection of losartan 50 mg in normotensive Chinese patients with nondiabetic chronic kidney disease. *J Invest Med Off Publ Am Fed Clin Res*. 2012;60(7):1041-1047. doi:10.2310/JIM.0b013e31826741d2

175. Mimran A, Ribstein J. Angiotensin receptor blockers: pharmacology and clinical significance. *J Am Soc Nephrol JASN*. 1999;10 Suppl 12:S273-277.
176. Bangalore S, Fakheri R, Toklu B, Ogedegbe G, Weintraub H, Messerli FH. Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors or Angiotensin Receptor Blockers in Patients Without Heart Failure? Insights From 254,301 Patients From Randomized Trials. *Mayo Clin Proc*. 2016;91(1):51-60. doi:10.1016/j.mayocp.2015.10.019
177. Rodriguez-Pallares J, Quiroz CR, Parga JA, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL. Angiotensin II increases differentiation of dopaminergic neurons from mesencephalic precursors via angiotensin type 2 receptors. *Eur J Neurosci*. 2004;20(6):1489-1498. doi:https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2004.03621.x
178. Allen AM, MacGregor DP, McKinley MJ, Mendelsohn FA. Angiotensin II receptors in the human brain. *Regul Pept*. 1999;79(1):1-7. doi:10.1016/s0167-0115(98)00138-4
179. Brown DC, Steward LJ, Ge J, Barnes NM. Ability of angiotensin II to modulate striatal dopamine release via the AT1 receptor in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol*. 1996;118(2):414-420. doi:10.1111/j.1476-5381.1996.tb15418.x
180. Hoebel BG, Rada P, Mark GP, Hernandez L. The power of integrative peptides to reinforce behavior by releasing dopamine. *Ann N Y Acad Sci*. 1994;739:36-41. doi:10.1111/j.1749-6632.1994.tb19805.x
181. Zhuo J, Moeller I, Jenkins T, et al. Mapping tissue angiotensin-converting enzyme and angiotensin AT1, AT2 and AT4 receptors. *J Hypertens*. 1998;16(12 Pt 2):2027-2037. doi:10.1097/00004872-199816121-00026
182. Martínez-Pinilla E, Rodríguez-Pérez AI, Navarro G, et al. Dopamine D2 and angiotensin II type 1 receptors form functional heteromers in rat striatum. *Biochem Pharmacol*. 2015;96(2):131-142. doi:10.1016/j.bcp.2015.05.006
183. Villar-Cheda B, Rodríguez-Pallares J, Valenzuela R, et al. Nigral and striatal regulation of angiotensin receptor expression by dopamine and angiotensin in rodents: implications for progression of Parkinson's disease. *Eur J Neurosci*. 2010;32(10):1695-1706. doi:10.1111/j.1460-9568.2010.07448.x
184. Paz MC, Assis MA, Cabrera RJ, Cancela LM, Bregonzio C. The AT<sub>1</sub> angiotensin II receptor blockade attenuates the development of amphetamine-induced behavioral sensitization in a two-injection protocol. *Synap N Y N*. 2011;65(6):505-12. doi:10.1002/syn.20868
185. Delaney J, Chiarello R, Villar D, Kandalam U, Castejon AM, Clark MA. Regulation of c-fos, c-jun and c-myc gene expression by angiotensin II in primary cultured rat astrocytes: role of ERK1/2 MAP kinases. *Neurochem Res*. 2008;33(3):545-550. doi:10.1007/s11064-007-9474-y
186. Holownia A, Braszko JJ. The effect of angiotensin II and IV on ERK1/2 and CREB signalling in cultured rat astroglial cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2007;376(3):157-163. doi:10.1007/s00210-007-0192-4
187. Bhat SA, Goel R, Shukla R, Hanif K. Angiotensin Receptor Blockade Modulates NFκB and STAT3 Signaling and Inhibits Glial Activation and Neuroinflammation Better than Angiotensin-Converting Enzyme Inhibition. *Mol Neurobiol*. 2016;53(10):6950-6967. doi:10.1007/s12035-015-9584-5
188. Labandeira-Garcia JL, Rodríguez-Pérez AI, Garrido-Gil P, Rodríguez-Pallares J, Lanciego JL, Guerra MJ. *Brain Renin-Angiotensin System and Microglial Polarization: Implications for Aging and Neurodegeneration*. Vol 9. Frontiers Media S.A.; 2017. doi:10.3389/fnagi.2017.00129
189. Wright JW, Harding JW. Important role for angiotensin III and IV in the brain renin-angiotensin system. *Brain Res Brain Res Rev*. 1997;25(1):96-124. doi:10.1016/s0165-0173(97)00019-2
190. Esteban V, Ruperez M, Sánchez-López E, et al. Angiotensin IV activates the nuclear transcription factor-kappaB and related proinflammatory genes in vascular smooth muscle cells. *Circ Res*. 2005;96(9):965-973. doi:10.1161/01.RES.0000166326.91395.74
191. Xu P, Sriramula S, Lazartigues E. ACE2/ANG-(1-7)/Mas pathway in the brain: the axis of good. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2011;300(4):R804-817. doi:10.1152/ajpregu.00222.2010
192. Patel SN, Fatima N, Ali R, Hussain T. Emerging Role of Angiotensin AT2 Receptor in Anti-Inflammation: An Update. *Curr Pharm Des*. 2020;26(4):492-500. doi:10.2174/1381612826666200115092015
193. Greene AS, Amaral SL. Microvascular angiogenesis and the renin-angiotensin system. *Curr Hypertens Rep*. 2002;4(1):56-62. doi:10.1007/s11906-002-0054-x
194. Pernomian L, Pernomian L, Baraldi Araújo Restini C. Counter-regulatory effects played by the ACE - Ang II - AT1 and ACE2 - Ang-(1-7) - Mas axes on the reactive oxygen species-mediated control of vascular function: perspectives to pharmacological approaches in controlling vascular complications. *VASA Z Gefasskrankheiten*. 2014;43(6):404-414. doi:10.1024/0301-1526/a000387
195. Heffelfinger SC. The renin angiotensin system in the regulation of angiogenesis. *Curr Pharm Des*. 2007;13(12):1215-1229. doi:10.2174/138161207780618858
196. Willis LM, El-Remessy AB, Somanath PR, Deremer DL, Fagan SC. Angiotensin receptor blockers and

- angiogenesis: clinical and experimental evidence. *Clin Sci Lond Engl* 1979. 2011;120(8):307-319. doi:10.1042/cs20100389
197. Marchese NA, De LaVillarmois EA, Basmadjian OM, Perez MF, Baiardi G, Bregonzio C. Brain Angiotensin II AT1 receptors are involved in the acute and long-term amphetamine-induced neurocognitive alterations. *Psychopharmacology (Berl)*. 2016;233(5):795–807. doi:10.1007/s00213-015-4153-1
  198. Fanous S, Lacagnina MJ, Nikulina EM, Hammer RP. Sensitized activation of Fos and brain-derived neurotrophic factor in the medial prefrontal cortex and ventral tegmental area accompanies behavioral sensitization to amphetamine. *Neuropharmacology*. 2011;61(4):558-564. doi:10.1016/j.neuropharm.2011.04.026
  199. Lee B-R, Joo K-I, Choi ES, Jahng J, Kim H, Kim E. Evans blue dye-enhanced imaging of the brain microvessels using spectral focusing coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy. Deli MA, ed. *PLOS ONE*. 2017;12(10):e0185519. doi:10.1371/journal.pone.0185519
  200. Wang H-L, Kuo EY, Lai TW. Vascular delivery of intraperitoneal Evans blue dye into the blood–brain barrier-intact and disrupted rat brains. *NeuroReport*. 2018;29(11):924–931. doi:10.1097/WNR.0000000000001052
  201. Cavaglia M, Dombrowski SM, Drazba J, Vasanji A, Bokesch PM, Janigro D. Regional variation in brain capillary density and vascular response to ischemia. *Brain Res*. 2001;910(1-2):81–93. doi:10.1016/S0006-8993(01)02637-3
  202. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods*. 2012;9(7):676-682. doi:10.1038/nmeth.2019
  203. Elfarnawany MH. Signal Processing Methods for Quantitative Power Doppler Microvascular Angiography. *Electron Thesis Diss Repos*. 2015;(August). <https://ir.lib.uwo.ca/etd/3106>
  204. Beauquis J, Homo-Delarche F, Giroix MH, et al. Hippocampal neurovascular and hypothalamic-pituitary-adrenal axis alterations in spontaneously type 2 diabetic GK rats. *Exp Neurol*. 2010;222(1):125–134. doi:10.1016/j.expneurol.2009.12.022
  205. Tata DAA, Anderson BJJ. A new method for the investigation of capillary structure. *J Neurosci Methods*. 2002;113(2):199–206. doi:10.1016/S0165-0270(01)00494-0
  206. Xiong B, Li A, Lou Y, et al. Precise cerebral vascular atlas in stereotaxic coordinates of whole mouse brain. *Front Neuroanat*. 2017;11. doi:10.3389/fnana.2017.00128
  207. Rubianes MD, Strumia MC. Polyethylenimine Functionalized with Dopamine: Characterization and Electrocatalytic Properties. *Electroanalysis*. 2010;22(11):1200-1206. doi:10.1002/elan.200900552
  208. Rodríguez MC, Rubianes MD, Rivas GA. Highly selective determination of dopamine in the presence of ascorbic acid and serotonin at glassy carbon electrodes modified with carbon nanotubes dispersed in polyethylenimine. *J Nanosci Nanotechnol*. 2008;8(11):6003-6009. doi:10.1166/jnn.2008.466
  209. Wayment H, Meiergerd SM, Schenk JO. Relationships Between the Catechol Substrate Binding Site and Amphetamine, Cocaine, and Mazindol Binding Sites in a Kinetic Model of the Striatal Transporter of Dopamine In Vitro. *J Neurochem*. 1998;70(5):1941-1949. doi:10.1046/j.1471-4159.1998.70051941.x
  210. Avci B, Akar A, Bilgici B, Tunçel ÖK. Oxidative stress induced by 1.8 GHz radio frequency electromagnetic radiation and effects of garlic extract in rats. *Int J Radiat Biol*. 2012;88(11):799-805. doi:10.3109/09553002.2012.711504
  211. Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillère-Blandin C, et al. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int*. 1996;49(5):1304-1313. doi:10.1038/ki.1996.186
  212. David HN, Dhilly M, Degoulet M, et al. Argon blocks the expression of locomotor sensitization to amphetamine through antagonism at the vesicular monoamine transporter-2 and mu-opioid receptor in the nucleus accumbens. *Transl Psychiatry*. 2015;5(7):e594-e594. doi:10.1038/tp.2015.27
  213. Chiang Y-C, Chen P-C, Chen J-C. D(3) dopamine receptors are down-regulated in amphetamine sensitized rats and their putative antagonists modulate the locomotor sensitization to amphetamine. *Brain Res*. 2003;972(1-2):159-167. doi:10.1016/s0006-8993(03)02522-8
  214. Crispim Junior CF, Pederiva CN, Bose RC, Garcia VA, Lino-de-Oliveira C, Marino-Neto J. ETHOWATCHER: validation of a tool for behavioral and video-tracking analysis in laboratory animals. *Comput Biol Med*. 2012;42(2):257-264. doi:10.1016/j.combiomed.2011.12.002
  215. Koros E, Rosenbrock H, Birk G, Weiss C, Sams-Dodd F. The Selective mGlu5 Receptor Antagonist MTEP, Similar to NMDA Receptor Antagonists, Induces Social Isolation in Rats. *Neuropsychopharmacology*. 2007;32(3):562-576. doi:10.1038/sj.npp.1301133
  216. Dyck B, Guest K, Sookram C, Basu D, Johnson R, Mishra RK. PAOPA, a potent analogue of Pro-Leu-glycinamide and allosteric modulator of the dopamine D2 receptor, prevents NMDA receptor antagonist (MK-801)-induced deficits in social interaction in the rat: Implications for the treatment of negative symptoms in schizophrenia. *Schizophr Res*. 2011;125(1):88-92. doi:10.1016/j.schres.2010.09.025

217. Sams-Dodd F. (+) MK-801 and Phencyclidine Induced Neurotoxicity do Not Cause Enduring Behaviours Resembling the Positive and Negative Symptoms of Schizophrenia in the Rat. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2004;95(5):241-246. doi:10.1111/j.1742-7843.2004.pto950507.x
218. Ahmad-Molaei L, Hassanian-Moghaddam H, Farnaghi F, Tomaz C, Haghparast A. Delay-Dependent Impairments in Memory and Motor Functions After Acute Methadone Overdose in Rats. *Front Pharmacol*. 2018;9. doi:10.3389/fphar.2018.01023
219. Famitafreshi H, Karimian M. Assessment of Improvement in Oxidative Stress Indices with Resocialization in Memory Retrieval in Y-Maze in Male Rats: *J Exp Neurosci*. Published online December 26, 2018. doi:10.1177/1179069518820323
220. Islam R, Matsuzaki K, Sumiyoshi E, et al. Theobromine Improves Working Memory by Activating the CaMKII/CREB/BDNF Pathway in Rats. *Nutrients*. 2019;11(4):888. doi:10.3390/nu11040888
221. Arias-Cavieres A, Adasme T, Sánchez G, Muñoz P, Hidalgo C. Aging Impairs Hippocampal-Dependent Recognition Memory and LTP and Prevents the Associated RyR Up-regulation. *Front Aging Neurosci*. 2017;9. doi:10.3389/fnagi.2017.00111
222. Baker KB, Kim JJ. Effects of Stress and Hippocampal NMDA Receptor Antagonism on Recognition Memory in Rats. *Learn Mem*. 2002;9(2):58-65. doi:10.1101/lm.46102
223. Gold JM, Robinson B, Leonard CJ, et al. Selective Attention, Working Memory, and Executive Function as Potential Independent Sources of Cognitive Dysfunction in Schizophrenia. *Schizophr Bull*. 2018;44(6):1227-1234. doi:10.1093/schbul/sbx155
224. O'Daly OG, Joyce D, Stephan KE, Murray RM, Shergill SS. Functional magnetic resonance imaging investigation of the amphetamine sensitization model of schizophrenia in healthy male volunteers. *Arch Gen Psychiatry*. 2011;68(6):545-554. doi:10.1001/archgenpsychiatry.2011.3
225. Weidenauer A, Bauer M, Sauerzopf U, et al. Making Sense of: Sensitization in Schizophrenia. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2017;20(1):1-10. doi:10.1093/ijnp/pyw081
226. Przegalinski E, Siwanowicz J, Nowak E, Papla I, Filip M. Role of 5-HT(1B) receptors in the sensitization to amphetamine in mice. *Eur J Pharmacol*. 2001;422(1-3):91-9. doi:10.1016/S0014-2999(01)01079-2
227. Davidson C, Lazarus C, Xiong X, Lee TH, Ellinwood EH. 5-HT2 receptor antagonists given in the acute withdrawal from daily cocaine injections can reverse established sensitization. *Eur J Pharmacol*. 2002;453(2-3):255-263. doi:10.1016/S0014-2999(02)02390-7
228. Davidson C, Lee C, Lee TH, Xiong Z, Ellinwood EH. Ondansetron Given in the Acute Withdrawal from a Repeated Cocaine Sensitization Dosing Regimen Reverses the Expression of Sensitization and Inhibits Self-administration. *Neuropsychopharmacology*. 2002;27(4):542-553. doi:10.1016/S0893-133X(02)00336-6
229. Kaneko Y, Kashiwa A, Ito T, Ishii S, Umino A, Nishikawa T. Selective Serotonin Reuptake Inhibitors, Fluoxetine and Paroxetine, Attenuate the Expression of the Established Behavioral Sensitization Induced by Methamphetamine. *Neuropsychopharmacology*. 2006;32(3):658-664. doi:10.1038/sj.npp.1301111
230. Ago Y, Nakamura S, Baba A, Matsuda T. *Neuropsychotoxicity of Abused Drugs: Effects of Serotonin Receptor Ligands on Methamphetamine-and Cocaine-Induced Behavioral Sensitization in Mice*. Vol 106. *J Pharmacol Sci*; 2008. doi:10.1254/jphs.FM0070121
231. Seyedhosseini Tamijani SM, Beirami E, Ahmadiani A, Dargahi L. Effect of three different regimens of repeated methamphetamine on rats' cognitive performance. *Cogn Process*. 2018;19(1):107-115. doi:10.1007/s10339-017-0839-0
232. Ray A, Chitre NM, Daphney CM, Blough BE, Canal CE, Murnane KS. Effects of the second-generation "bath salt" cathinone alpha-pyrrolidinopropiophenone ( $\alpha$ -PPP) on behavior and monoamine neurochemistry in male mice. *Psychopharmacology (Berl)*. 2019;236(3):1107-1117. doi:10.1007/s00213-018-5044-z
233. Ashok BS, Ajith TA, Sivanesan S. Hypoxia-inducible factors as neuroprotective agent in Alzheimer's disease. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2017;44(3):327-334. doi:10.1111/1440-1681.12717
234. Che Y, Cui Y-H, Tan H, Andreatza AC, Young LT, Wang J-F. Abstinence from repeated amphetamine treatment induces depressive-like behaviors and oxidative damage in rat brain. *Psychopharmacology (Berl)*. 2013;227(4):605-614. doi:10.1007/s00213-013-2993-0
235. Cryan JF, Hoyer D, Markou A. Withdrawal from chronic amphetamine induces Depressive-Like behavioral effects in rodents. *Biol Psychiatry*. 2003;54(1):49-58. doi:10.1016/S0006-3223(02)01730-4
236. Leventhal AM, Kahler CW, Ray LA, et al. Anhedonia and Amotivation in Psychiatric Outpatients with Fully Remitted Stimulant Use Disorder. *Am J Addict*. 2008;17(3):218-223. doi:10.1080/10550490802019774
237. Paulson PE, Robinson TE. Regional differences in the effects of amphetamine withdrawal on dopamine dynamics in the striatum: Analysis of circadian patterns using automated on-line microdialysis.

- Neuropsychopharmacology*. 1996;14(5):325–37. doi:10.1016/0893-133X(95)00141-Y
238. Paulson PE, Camp DM, Robinson TE. Time course of transient behavioral depression and persistent behavioral sensitization in relation to regional brain monoamine concentrations during amphetamine withdrawal in rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 1991;103(4):480–492. doi:10.1007/BF02244248
239. Vuong SM, Oliver HA, Scholl JL, Oliver KM, Forster GL. Increased anxiety-like behavior of rats during amphetamine withdrawal is reversed by CRF2 receptor antagonism. *Behav Brain Res*. 2010;208(1):278–281. doi:10.1016/J.BBR.2009.11.036
240. Robinson TE, Camp DM. Long-lasting effects of escalating doses of d-amphetamine on brain monoamines, amphetamine-induced stereotyped behavior and spontaneous nocturnal locomotion. *Pharmacol Biochem Behav*. 1987;26(4):821–7. doi:10.1016/0091-3057(87)90616-2
241. Jiang L, Zhu R, Bu Q, et al. Brain Renin–Angiotensin System Blockade Attenuates Methamphetamine-Induced Hyperlocomotion and Neurotoxicity. *Neurotherapeutics*. 2018;15(2):500–510. doi:10.1007/s13311-018-0613-8
242. de Souza Gomes JA, de Souza GC, Berk M, et al. Antimanic-like activity of candesartan in mice: Possible involvement of antioxidant, anti-inflammatory and neurotrophic mechanisms. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2015;25(11). doi:10.1016/j.euroneuro.2015.08.005
243. Casarsa BS, Marinzalda MÁ, Marchese NA, et al. A previous history of repeated amphetamine exposure modifies brain angiotensin II AT1 receptor functionality. *Neuroscience*. 2015;307:1-13. doi:10.1016/j.neuroscience.2015.08.027
244. Foster JD, Adkins SD, Lever JR, Vaughan RA. Phorbol ester induced trafficking-independent regulation and enhanced phosphorylation of the dopamine transporter associated with membrane rafts and cholesterol. *J Neurochem*. 2008;105(5):1683–1699. doi:10.1111/j.1471-4159.2008.05262.x
245. Moritz AE, Rastedt DE, Stanislawski DJ, et al. Reciprocal Phosphorylation and Palmitoylation Control Dopamine Transporter Kinetics. *J Biol Chem*. 2015;290(48):29095–105. doi:10.1074/jbc.M115.667055
246. Unger T. Differences among angiotensin II type 1 receptor blockers: characteristics of candesartan cilexetil. *Blood Pressure Supplement*. 2000;1:14–8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11059630>
247. Ago Y, Nakamura S, Kajita N, et al. Ritanserin reverses repeated methamphetamine-induced behavioral and neurochemical sensitization in mice. *Synapse*. 2007;61(9):757–763. doi:10.1002/syn.20421
248. Davidson C, Gopalan R, Ahn C, et al. Reduction in methamphetamine induced sensitization and reinstatement after combined pergolide plus ondansetron treatment during withdrawal. *Eur J Pharmacol*. 2007;565(1-3):113–118. doi:10.1016/j.ejphar.2007.02.056
249. Jenkins TA. Effect of angiotensin-related antihypertensives on brain neurotransmitter levels in rats. *Neurosci Lett*. 2008;444(2):186–9. doi:10.1016/j.neulet.2008.08.021
250. Medelsohn FAO, Jenkins TA, Berkovic SF. Effects of angiotensin II on dopamine and serotonin turnover in the striatum of conscious rats. *Brain Res*. 1993;613(2):221–229. doi:10.1016/0006-8993(93)90902-Y
251. Arnsten AFT. Catecholamine modulation of prefrontal cortical cognitive function. *Trends Cogn Sci*. 1998;2(11):436–447. doi:10.1016/S1364-6613(98)01240-6
252. Castner SA, Williams GV. From vice to virtue: Insights from sensitization in the nonhuman primate. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2007;31(8):1572–1592. doi:10.1016/J.PNPBP.2007.08.026
253. Kim Y-T, Lee S-W, Kwon D-H, Seo J-H, Ahn B-C, Lee J. Dose-dependent frontal hypometabolism on FDG-PET in methamphetamine abusers. *J Psychiatr Res*. 2009;43(14):1166–1170. doi:10.1016/J.JPSYCHIRES.2009.03.011
254. Ornstein T, Iddon J, Baldacchino A, et al. Profiles of Cognitive Dysfunction in Chronic Amphetamine and Heroin Abusers. *Neuropsychopharmacology*. 2000;23(2):113–126. doi:10.1016/S0893-133X(00)00097-X
255. Strickland T, Mena I, Villanueva-Meyer J, et al. Cerebral perfusion and neuropsychological consequences of chronic cocaine use. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*. 1993;5(4):419–427. doi:https://doi.org/10.1176/jnp.5.4.419
256. Williams GV, Castner SA. Under the curve: Critical issues for elucidating D1 receptor function in working memory. *Neuroscience*. 2006;139(1):263–276. doi:10.1016/J.NEUROSCIENCE.2005.09.028
257. Lee K-W, Kim H-C, Lee S-Y, Jang C-G. 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*. 2011;178:101–107. doi:10.1016/J.NEUROSCIENCE.2011.01.025
258. Lu P, Mamiya T, Lu L, et al. Silibinin attenuates cognitive deficits and decreases of dopamine and serotonin induced by repeated methamphetamine treatment. *Behav Brain Res*. 2010;207(2):387–393. doi:10.1016/J.BBR.2009.10.024

259. Murphy BL, Arnsten AF, Goldman-Rakic PS, Roth RH. Increased dopamine turnover in the prefrontal cortex impairs spatial working memory performance in rats and monkeys. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(3):1325–9. doi:10.1073/pnas.93.3.1325
260. Williams GV, Goldman-Rakic PS. Modulation of memory fields by dopamine D1 receptors in prefrontal cortex. *Nature*. 1995;376(6541):572–575. doi:10.1038/376572a0
261. Babior BM. NADPH oxidase. *Curr Opin Immunol*. 2004;16(1):42–47. doi:10.1016/J.COI.2003.12.001
262. Valenzuela R, Costa-Besada MA, Iglesias-Gonzalez J, et al. Mitochondrial angiotensin receptors in dopaminergic neurons. Role in cell protection and aging-related vulnerability to neurodegeneration. *Cell Death Dis*. 2016;7(10):e2427–e2427. doi:10.1038/cddis.2016.327
263. Labandeira-García JL, Garrido-Gil P, Rodríguez-Pallares J, Valenzuela R, Borrajo A, Rodríguez-Perez AI. Brain renin-angiotensin system and dopaminergic cell vulnerability. *Front Neuroanat*. 2014;8:67. doi:10.3389/fnana.2014.00067
264. Bull C, Syed WA, Minter SC, Bowers MS. Differential response of glial fibrillary acidic protein-positive astrocytes in the rat prefrontal cortex following ethanol self-administration. *Alcohol Clin Exp Res*. 2015;39(4):650–658. doi:10.1111/acer.12683
265. Scott A, Powner MB, Fruttiger M. Quantification of vascular tortuosity as an early outcome measure in oxygen induced retinopathy (OIR). *Exp Eye Res*. 2014;120:55-60. doi:10.1016/j.exer.2013.12.020
266. Jackson JR, Seed MP, Kircher CH, Willoughby DA, Winkler JD. The codependence of angiogenesis and chronic inflammation. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 1997;11(6):457-465.
267. LaManna JC. Angioplasticity and Cerebrovascular Remodeling. In: Wolf M, Bucher HU, Rudin M, et al., eds. *Oxygen Transport to Tissue XXXIII*. Advances in Experimental Medicine and Biology. Springer; 2012:13-17. doi:10.1007/978-1-4614-1566-4\_2
268. Chu S-C, Chen P-N, Yu C-H, Hsieh Y-S, Kuo D-Y. Role of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  in regulating oxidative stress and hypothalamic neuropeptides-mediated appetite control. *Brain Res*. 2019;1721:146329. doi:10.1016/j.brainres.2019.146329
269. Kousik SM, Napier TC, Ross RD, Sumner DR, Carvey PM. Dopamine Receptors and the Persistent Neurovascular Dysregulation Induced by Methamphetamine Self-Administration in Rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 2014;351(2):432-439. doi:10.1124/jpet.114.217802
270. Belaidi E, Morand J, Gras E, Pépin J-L, Godin-Ribuot D. Targeting the ROS-HIF-1-endothelin axis as a therapeutic approach for the treatment of obstructive sleep apnea-related cardiovascular complications. *Pharmacol Ther*. 2016;168:1-11. doi:10.1016/j.pharmthera.2016.07.010
271. Kirtonia A, Sethi G, Garg M. The multifaceted role of reactive oxygen species in tumorigenesis. *Cell Mol Life Sci*. 2020;77(22):4459-4483. doi:10.1007/s00018-020-03536-5
272. Foulquier S, Dupuis F, Perrin-Sarrado C, et al. Differential Effects of Short-Term Treatment with Two AT1 Receptor Blockers on Diameter of Pial Arterioles in SHR. *PLoS ONE*. 2012;7(9). doi:10.1371/journal.pone.0042469
273. Snijders T, Nederveen JP, Joannisse S, et al. Muscle fibre capillarization is a critical factor in muscle fibre hypertrophy during resistance exercise training in older men. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2017;8(2):267-276. doi:https://doi.org/10.1002/jcsm.12137
274. Moro T, Brightwell CR, Phalen DE, et al. Low skeletal muscle capillarization limits muscle adaptation to resistance exercise training in older adults. *Exp Gerontol*. 2019;127:110723. doi:10.1016/j.exger.2019.110723
275. Thomas LW, Ashcroft M. Exploring the molecular interface between hypoxia-inducible factor signalling and mitochondria. *Cell Mol Life Sci*. 2019;76(9):1759-1777. doi:10.1007/s00018-019-03039-y
276. Ito T, Yamakawa H, Bregonzio C, Terrón JA, Falcón-Neri A, Saavedra JM. Protection against ischemia and improvement of cerebral blood flow in genetically hypertensive rats by chronic pretreatment with an angiotensin II AT1 antagonist. *Stroke*. 2002;33(9):2297-2303. doi:10.1161/01.str.0000027274.03779.f3