

TESIS DE DOCTORADO

**SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA  
MITOCONDRIAL Y NUCLEAR EN NEURONAS.  
IMPLICACIONES EN LA ENFERMEDAD DE  
PARKINSON**

María Alicia Costa Besada

ESCUELA DE DOCTORADO INTERNACIONAL

PROGRAMA DE DOCTORADO EN NEUROCIENCIA Y PSICOLOGÍA CLÍNICA

SANTIAGO DE COMPOSTELA

2018





## DECLARACIÓN DEL AUTOR DE LA TESIS

**Sistema renina-angiotensina mitocondrial y nuclear en neuronas.  
Implicaciones en la enfermedad de Parkinson**

Dña María Alicia Costa Besada

*Presento mi tesis, siguiendo el procedimiento adecuado al Reglamento, y declaro que:*

- 1) *La tesis abarca los resultados de la elaboración de mi trabajo.*
- 2) *En su caso, en la tesis se hace referencia a las colaboraciones que tuvo este trabajo.*
- 3) *La tesis es la versión definitiva presentada para su defensa y coincide con la versión enviada en formato electrónico.*
- 4) *Confirmando que la tesis no incurre en ningún tipo de plagio de otros autores ni de trabajos presentados por mí para la obtención de otros títulos.*

*En Santiago de Compostela, 21 de febrero de 2018*

Fdo.



## AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR / TUTOR DE LA TESIS

**Sistema renina-angiotensina mitocondrial y nuclear en neuronas.  
Implicaciones en la enfermedad de Parkinson**

D. José Luis Labandeira García  
Dña. Rita Valenzuela Limiñana

INFORMA/N:

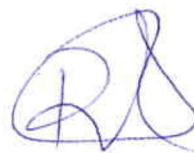
*Que la presente tesis, corresponde con el trabajo realizado por D/Dña. **María Alicia Costa Besada**, bajo mi dirección, y autorizo su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como director de ésta no incurre en las causas de abstención establecidas en Ley 40/2015.*

*En Santiago de Compostela, 26 de febrero de 2018*



Fdo.

J.L. Labandeira



Fdo.

RITA VALENZUELA



**Sistema Renina-Angiotensina mitocondrial y nuclear en neuronas.  
Implicaciones en la enfermedad de Parkinson**

Tesis doctoral presentada por  
**María Alicia Costa Besada**

Directores:  
**José Luis Labandeira García**  
Catedrático de Anatomía Humana

**Rita Valenzuela Limiñana**  
Investigadora Postdoctoral

Departamento de Ciencias Morfológicas  
Facultade de Medicina  
Universidade de Santiago de Compostela

Santiago de Compostela, 2018



## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar me gustaría agradecer al profesor **José Luis Labandeira** por darme la oportunidad de realizar la tesis en el grupo de investigación que dirige y sobre todo por estar siempre preocupado por todos nosotros, por que las cosas salgan bien y por la gran dedicación que tiene a su trabajo que repercute en todos nosotros. Muchas gracias.

También me gustaría agradecer a la profesora **M<sup>a</sup> Josefa Guerra** y al profesor **Juan Suárez** por vuestro cariño sobre todo en estos últimos meses que han sido tan duros para mí! y a los profesores **Ramón Soto** y **Estefanía Méndez** por acogerme en su laboratorio para realizar el TFM e iniciarme en este mundo de la investigación.

A **Rita**, por todas las horas de trabajo juntas, por todo lo que me has enseñado y me sigues enseñando, por no solo ser mi supervisora sino por llegar a ser una gran amiga con la que puedo contar y confiar, por abrirme las puertas de tu casa! Por el entusiasmo que le pones al trabajo! Por hacerme creer que puedo con todo! Muchas gracias por eso y más! me encanta trabajar contigo, creo que formamos un gran equipo, el "equipo mitocondria".

A todos mis compañeros de laboratorio, me encanta trabajar con todos vosotros y no elegiría otro grupo para hacer la tesis. Gracias por todo lo que me habéis enseñado y aportado y sobre todo por el apoyo en estos últimos meses...

A **Ana Muñoz**, por tu carácter tranquilo, tu buena voluntad, por todas las horas de prácticas juntas, me has enseñado mucho.

A **Ana I**, muchas gracias por tu optimismo, tienes un don para subir el ánimo! gracias por abrirme las puertas de tu casa y por siempre estar dispuesta a ayudarme en todo lo que he necesitado!

A **Andrea**, por todo tu cariño, por echarme una mano estos últimos meses con los cultivos!

**Bego**, por siempre estar de buen humor, por tu alegría, por todas las cosas que me has enseñado y todas las horas de trabajo juntas.

A **Carmen**, por todas las conversaciones a la hora de comer, por todas las horas de prácticas, he aprendido mucho de ti.

A **Cris**, muchas gracias por hacerme un poco más fácil el trabajo, por siempre ser tan agradable conmigo, por todas las veces que me llevaste a la estación de tren o a casa para que no me mojara! Eres un encanto!

**Iria**, por siempre querer que todo esté ordenado y limpio en el laboratorio! Por ser muy rigurosa en el trabajo y ayudarme siempre! muchas gracias por el detalle de las últimas Navidades!

**Jannette**, por toda la ayuda que me has brindado, sobre todo en estos últimos meses de papeleos! Por dejarme formar parte del UniStem Day! Gracias!

A **Juan**, por siempre tener una sonrisa y ser tan amable con todos! gracias por siempre estar dispuesto a "negociar" las horas de la campana!

**María**, por tu carácter divertido, por tu ayuda con el word y todas las conversaciones a la hora de comer! Por calmarme cuando me estreso! Gracias!

**Mary**, has sido una gran compi de mesa el tiempo que estuve en el labo 8! Por estar siempre dispuesta a ayudar!

**Pablo G.**, por tu sentido del humor, por ser tan buen compañero con todos! Por tu perfeccionismo que hace que las cosas siempre queden bien! Gracias!

**Pili**, por ser más que una compañera y convertirte en una amiga! Por todos los cafés, por todo el cariño! Gracias por todo lo que hemos compartido tanto dentro como fuera del Labo! Eres una persona auténtica! Gracias!

**Patri**, mi compi de residuos! Gracias por tus risas y tu confianza!

**Antón**, por ser una persona única! Gracias a ti fueron muy divertidos los meses que estuvimos en Bioquímica.

Nunca me hubiese imaginado este día sin mi **mamá**, sé que de algún modo estarás conmigo. Gracias por todo lo que has hecho por mí, por creer siempre en mí, por todos los consejos, por tu forma diferente y alocada de ver la vida. **Papá**, gracias por los valores que me has inculcado para ser la persona que soy ahora, por ser la mejor persona que conozco en este mundo! Gracias a los dos por haberme dado una vida tan bonita! A mi hermana **Ari**, por llevarnos tan bien, por cuidar de mí a pesar de ser la pequeña! a mis sobrinos **Brais y Aaron**, por sacarme siempre una sonrisa y sentirme tan querida!

A **Pablo**, por apoyarme siempre en todo, por hacerme la vida más fácil! Por comprender mi trabajo y las horas dedicadas! Gracias por hacerme sentir afortunada de tenerte a mi lado!

A las **últimas de Filipinas, Cris dulce, Cris hospi, Kenia, Lau y Ro**, por todos los desayunos, cenas y comidas, otra cosa no, pero por comer que no sea... Gracias por todos los ánimos, las risas, las confianzas sobre todo en los momentos más duros...

A mis colegas de **NeuroMáster! Ro, Pili, Sabrina, Alex, Nuri, Su, Marcos...** por todas las Neurofiestas, las Neurocañas, en fin todas las Neurocelebraciones... fueron dos años intensos pero geniales! Gracias

A **Nuri**, por todos los momentos compartidos! Por todas nuestras charlas, por tus detalles! Eres una persona increíble y me alegro mucho de haberte conocido!

A mis amigas **Noe y Marta** por siempre estar ahí a pesar del tiempo que podamos estar sin hablar! Gracias por ser grandes amigas!

A **Lu**, por todos los años que hemos compartido piso, sin ti estos años no hubiesen sido tan divertidos! Por tu forma positiva de ver la vida a pesar de todos los problemas! Por tantos detalles que me han hecho sentir especial! Por todas las sorpresas de cumple! Millones de gracias!

A **Sabela**, aunque estuvimos un tiempo sin vernos, estuviste presente en los peores momentos y eso es algo que valoro muchísimo en una persona! Muchas gracias por todo!

A todos mis amigos de la **Isla**, por siempre estar en los buenos y malos momentos! Por todos los chistes sobre mitocondrias! Gracias!

A mis primos **Carlos y Suso**, por hacer que en sus últimos meses no dejara de sonreír! Gracias!

# ÍNDICE

<b>ANEXO I</b> .....	I
Resumen.....	III
Artículos durante el periodo de tesis.....	V
Abreviaturas.....	VII
<b>1. CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN</b> .....	3
1.1 Enfermedad de Parkinson .....	3
1.1.1 Características patológicas de la enfermedad de Parkinson.....	3
1.1.2 Síntomas y diagnóstico de la enfermedad de Parkinson .....	4
1.1.3 Etiología y tratamiento de la enfermedad de Parkinson .....	5
1.1.4 Modelos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> de la enfermedad de Parkinson .....	10
1.2 Disfunción mitocondrial en la enfermedad de Parkinson.....	15
1.2.1 Mitocondrias .....	15
1.2.2 Mutaciones genéticas y toxinas que relacionan la disfunción mitocondrial y la enfermedad de Parkinson.....	16
1.2.3 Generación de especies oxigenadas y nitrogenadas reactivas mitocondriales en la enfermedad de Parkinson .....	17
1.3 Sistema renina-angiotensina.....	21
1.3.1 Generalidades y componentes del sistema renina-angiotensina .....	21
1.3.2 Nuevos componentes del sistema renina-angiotensina .....	22
1.3.3 Sistema renina-angiotensina tisular. Sistema renina-angiotensina cerebral.....	24
1.3.4 Sistema renina-angiotensina y enfermedad de Parkinson .....	25
<b>2. CAPÍTULO 2: JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS</b> .....	29
<b>3. CAPÍTULO 3: MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	33
3.1 Modelos.....	33
3.1.1 Modelos animales .....	33
3.1.2 Modelos celulares .....	34
3.1.3 Orgánulos aislados .....	36
3.2 Detección de proteínas .....	37
3.2.1 Marcajes fluorescentes .....	37
3.2.2 Inmunofluorescencia.....	38

3.2.3 Transfecciones transitorias de los receptores de angiotensina II marcados fluorescentemente .....	39
3.2.4 Adquisición de imágenes y estudios de colocalización .....	39
3.2.5 Western blot.....	39
3.2.6 Microscopía electrónica .....	40
3.2.7 Especificidad de anticuerpos .....	41
3.2.8 Actividades enzimáticas .....	41
3.3 Expresión de genes.....	42
3.3.1 Transcripción <i>in vitro</i> .....	42
3.3.2 Extracción de ARN y RT-PCR .....	43
3.3.3 PCR digital.....	43
3.4 Metabolismo mitocondrial .....	43
3.4.1 Respirometría de alta resolución .....	43
3.4.2 Análisis de metabolismo mitocondrial .....	44
3.5 Potencial de membrana mitocondrial.....	45
3.6 Detección de superóxido y óxido nítrico en mitocondrias y núcleos aislados.....	45
3.7 Detección de calcio intranuclear .....	46
3.8 Análisis estadístico.....	47
<b>4. CAPÍTULO 4: RECEPTORES DE ANGIOTENSINA MITOCONDRIALES EN LAS NEURONAS DOPAMINÉRGICAS. PAPEL EN LA PROTECCIÓN CELULAR Y LA VULNERABILIDAD A LA NEURODEGENERACIÓN RELACIONADA CON LA EDAD.....</b>	<b>53</b>
4.1 Introducción .....	53
4.2 Material y métodos: diseño experimental .....	54
4.3 Resultados .....	55
4.3.1 Presencia de receptores de angiotensina II y de angiotensina II marcados fluorescentemente en mitocondrias de neuronas dopaminérgicas .....	55
4.3.2 Presencia de receptores de angiotensina II y presencia de angiotensina II en mitocondrias aisladas de la sustancia negra .....	56
4.3.3 Efectos de los niveles de estrés oxidativo y del envejecimiento en la expresión de los receptores de angiotensina II mitocondriales.....	56
4.3.4 Efecto de los receptores de angiotensina II mitocondriales sobre la respiración mitocondrial .....	57
4.3.5 Efecto de los receptores de angiotensina II mitocondriales sobre el potencial transmembrana mitocondrial y la producción de óxido nítrico y superóxido. Papel de la enzima óxido nítrico sintasa mitocondrial y NADPH oxidasa 4 mitocondrial. ....	57

4.4 Discusión .....	58
<b>5. CAPÍTULO 5: EL SISTEMA DE ANGIOTENSINA INTRACELULAR AMORTIGUA LOS EFECTOS NOCIVOS DEL SISTEMA PARACRINO EXTRACELULAR .....</b>	<b>71</b>
5.1 Introducción .....	71
5.2 Material y métodos: diseño experimental.....	71
5.3 Resultados .....	72
5.3.1 Localización de los receptores de angiotensina II, AT1 y AT2, en el núcleo de neuronas dopaminérgicas. ....	72
5.3.2 Efectos de la angiotensina II en los componentes del sistema-renina angiotensina.....	73
5.3.3 Efecto de la angiotensina II sobre la transcripción de PGC-1 $\alpha$ , IGF-1 y SIRT1 en núcleos aislados.....	73
5.3.4 Efectos de la angiotensina II sobre los niveles de superóxido/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , calcio y óxido nítrico en núcleos aislados. ....	74
5.3.5 Efecto de la angiotensina II en los núcleos aislados de ratas envejecidas.....	75
5.4 Discusión .....	75
5.4.1 Efectos de la activación del eje angiotensina II/AT1 nuclear sobre los componentes del sistema renina-angiotensina nuclear. ....	76
5.4.2 Efectos de la activación del eje angiotensina II/AT1 nuclear sobre la transcripción de PGC-1 $\alpha$ .....	76
5.4.3 Efecto de la activación del eje angiotensina II/AT1 nuclear sobre la transcripción de IGF-1 y SIRT1.....	77
5.4.4 Efecto de la activación del eje angiotensina II/AT1 nuclear sobre los niveles de calcio y superóxido/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> nucleares.....	78
5.4.5 Papel del sistema renina-angiotensina nuclear en el envejecimiento.....	78
5.5 Conclusión .....	79
<b>6. CAPÍTULO 6: EJE ANGIOTENSINA 1-7/RECEPTOR MAS PARACRINO E INTRACRINO EN LA SUSTANCIA NEGRA DE ROEDORES, MONOS Y HUMANOS. ....</b>	<b>91</b>
6.1 Introducción .....	91
6.2 Material y métodos: diseño experimental.....	91
6.3 Resultados .....	92
6.3.1 El receptor Mas se expresa en neuronas dopaminérgicas, astrocitos y microglía de cultivos primarios mesencefálicos de rata. ....	92
6.3.2 El receptor Mas se expresa en neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra de humano, mono y rata. ....	93
6.3.3 El receptor Mas se expresa en células madre pluripotenciales inducidas humanas procedentes de pacientes con la enfermedad de Parkinson y controles sanos. ....	93

6.3.4 La expresión del receptor Mas y la expresión y actividad de la enzima ECA2 disminuye con el envejecimiento. ....	93
6.3.5 Efectos de la delección del receptor AT1 o AT2 sobre el eje angiotensina 1-7/receptor Mas. ....	94
6.3.6 La angiotensina 1-7 protege a las células dopaminérgicas del estrés oxidativo y de los cambios metabólicos inducidos por la angiotensina II.....	94
6.3.7 El receptor Mas está localizado en mitocondrias y núcleos de neuronas y células gliales. .	94
6.3.8 El eje angiotensina 1-7/receptor Mas modula los niveles de ROS/RNS en mitocondrias aisladas de la sustancia negra de rata. ....	95
6.3.9 El eje angiotensina 1-7/Mas modula los niveles nucleares de ROS/RNS en núcleos aislados de sustancia negra de rata .....	95
6.4 Discusión.....	96
6.4.1 Sistema dopaminérgico y sistema renina angiotensina: receptor Mas .....	96
6.4.2 Receptor Mas y envejecimiento .....	97
6.4.3 Interacciones del eje angiotensina 1-7/receptor Mas con los receptores AT1 y AT2 en ratones <i>knock-out</i> .....	97
6.4.4 Efecto del eje angiotensina 1-7/receptor Mas sobre el estrés oxidativo neuronal y los cambios metabólicos derivados de angiotensina II.....	98
6.4.5 Receptor Mas mitocondrial .....	98
6.4.6 Receptores Mas nucleares .....	99
6.5 Conclusión .....	100
<b>7. CAPÍTULO 7: CONCLUSIONES.....</b>	<b>115</b>
<b>8. CAPÍTULO 8: BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>119</b>
<b>Anexo II.....</b>	<b>139</b>
Declaración de conflictos de interés.....	141
Artículos derivados de la tesis.....	143

# Anexo I

---





## RESUMEN

Además del sistema renina-angiotensina (SRA) humoral "clásico", se ha identificado, en una variedad de tejidos, un segundo nivel en este sistema, el SRA local o tisular. A nivel de la sustancia negra se ha identificado un SRA local que se ha asociado con la enfermedad de Parkinson (EP). Un tercer tipo de SRA (intracelular/intracrino) ha sido propuesto en algunos tipos celulares. Por otra parte, la disfunción mitocondrial juega un papel fundamental en enfermedades neurodegenerativas, en concreto la EP. En la presente tesis doctoral se ha estudiado la presencia y función de los receptores de angiotensina II (Ang II), AT1 y AT2, tanto a nivel mitocondrial como nuclear en el sistema nervioso central (SNC), y su implicación en la disfunción mitocondrial y procesos intracelulares relacionados con el envejecimiento y la EP. Además de los principales tipos de receptores de Ang II, se han identificado nuevos componentes del sistema entre los que destaca la angiotensina 1-7 (Ang 1-7) y el receptor Mas, cuya función protectora se ha demostrado en varios tejidos. En esta tesis, se ha estudiado la presencia y posible papel protector del nuevo eje del SRA, Ang 1-7/receptor Mas en cerebro, particularmente en la sustancia negra, en distintos modelos animales y celulares (neuronales y gliales) incluyendo SN humana y neuronas dopaminérgicas diferenciadas de células madre pluripotenciales inducidas (iPSC) humanas. También se ha investigado el posible efecto del envejecimiento y las interacciones entre los receptores Mas, AT1 y AT2 usando ratones *knock-out* (KO). Finalmente, al igual que para los receptores de Ang II, se ha investigado la existencia y función de estos nuevos componentes a nivel mitocondrial y nuclear en el SNC.





## ARTÍCULOS DURANTE EL PERIODO DE TESIS

1. Labandeira-Garcia JL, **Costa-Besada MA**, Labandeira CM, Villar-Cheda B, Rodriguez-Perez AI. Insulin-Like Growth Factor-1 and Neuroinflammation. *Frontiers in Aging Neuroscience*. 2017; Doi: 10.3389/fnagi.2017.00365
2. **Costa-Besada MA**, Valenzuela R, Garrido-Gil P, Villar-Cheda B, Parga JA, Lanciego JL, Labandeira-Garcia JL. Paracrine and Intracrine Angiotensin 1-7/Mas Receptor Axis in the Substantia Nigra of Rodents, Monkeys, and Humans. *Molecular Neurobiology*. 2017; Doi: 10.1007/s12035-017-0805-y
3. Villar-Cheda B, **Costa-Besada MA**, Valenzuela R, Perez-Costas E, Melendez-Ferro M, Labandeira-Garcia JL. The intracellular angiotensin system buffers deleterious effects of the extracellular paracrine system. *Cell Death & Disease*. 2017; 8(9).e3044
4. Valenzuela R, **Costa-Besada MA**, Iglesias-Gonzalez J, Perez-Costas E, Villar-Cheda B, Garrido-Gil P, Melendez-Ferro M, Soto-Otero R, Lanciego JL, Henrion D, Franco R, Labandeira-Garcia JL. Mitochondrial angiotensin receptors in dopaminergic neurons. Role in cell protection and aging-related vulnerability to neurodegeneration. *Cell Death & Disease*. 2016; 7(10):e2427.
5. Labandeira-Garcia JL, Rodriguez-Perez AI, Valenzuela R, **Costa-Besada MA**, Guerra MJ. Menopause and Parkinson's disease. Interaction between estrogens and brain renin-angiotensin system in dopaminergic degeneration. *Frontiers in Neuroendocrinology*. 2016; 43:44-59.
6. Muñoz A, Corrêa CL, Villar-Cheda B, **Costa-Besada MA**, Labandeira-Garcia JL. Aging-related Increase in Rho Kinase Activity in the Nigral Region Is Counteracted by Physical Exercise. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2016; 71(10):1254-1257.

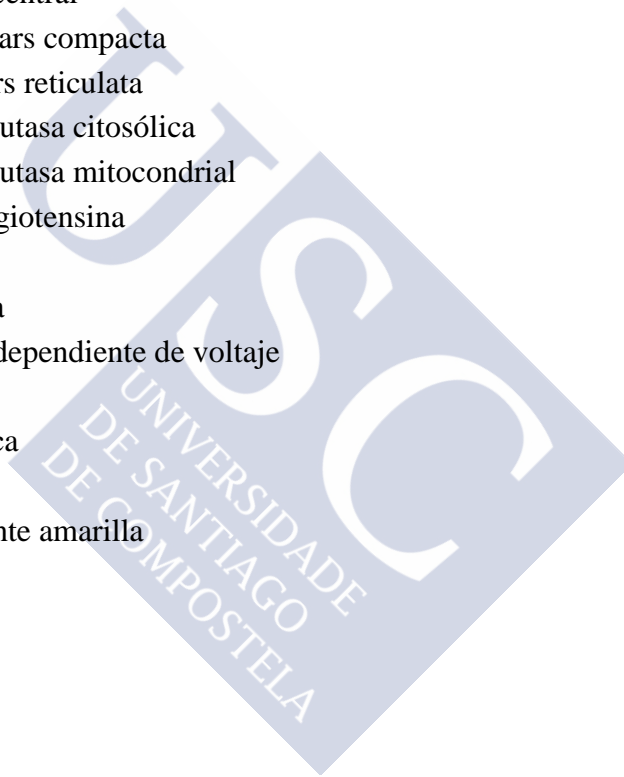


## ABREVIATURAS

- 2-APB: 2-aminoetil difenilborinato
- 6-OHDA: 6-hidroxidopamina
- ADNc: ADN complementario
- ADNmt: ADN mitocondrial
- AGT: Angiotensinógeno
- Ang 1-7: Angiotensina 1-7
- Ang A: Angiotensina A
- Ang I: Angiotensina I
- Ang II: Angiotensina II
- Ang IV: Angiotensina 3-8
- ANT: Transportador de nucleótidos de adenina
- ARNi: ARN de interferencia
- ARNm: ARN mensajero
- AT1: Receptor de angiotensina II de tipo 1
- AT2: Receptor de angiotensina II de tipo 2
- AT4: Receptor de angiotensina de tipo 4
- C21: Compuesto 21
- COMT: Catecol-O-metiltransferasa
- COX: Citocromo c oxidasa
- CTE: Cadena de transporte electrónica
- D1: Receptor de dopamina tipo 1
- D2: Receptor de dopamina tipo 2
- DAF: 4-amino-5-metilamino-2',7'-difluorofluoresceína diacetato
- DAG: Diacilglicerol
- DAN: 2,3-diaminonaftaleno
- DAT: Transportador de dopamina
- ddPCR: PCR digital
- DHE: Dihidroetidio
- DOPAC: Ácido dihidroxifenilacético
- DPI: Diphenyleneiodonium
- E: ETS, respiración máxima del sistema
- ECA: Enzima Convertidora de Angiotensina
- ECA 2: Enzima Convertidora de Angiotensina 2
- EGFP: Proteína fluorescente verde potenciada
- EP: Enfermedad de Parkinson
- FBS: Suero fetal bovino

- FCCP: Carbonil cianida-4-(trifluorometoxi) fenilhidrazona
- FRET: Transferencia de energía por resonancia de fluorescencia
- GAPDH: Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa
- GDNF: Factor neurotrófico derivado de la glía
- GFAP: Proteína ácida fibrilar glial
- Gpe: Globo pálido externo
- Gpi: Globo pálido interno
- HDAC2: Histona deacetilasa 2
- HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución
- HRP: Peroxidasa de rábano
- IGF-1: Factor de crecimiento insulínico tipo 1
- IP3: Inositol trifosfato
- iPSC: Células madre pluripotente inducidas
- IRAP: Aminopeptidasa regulada por insulina
- JAK: Quinasa Janus
- JC-1: 5,5', 6, 6'-tetrachoro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolyl-carbocyanine iodide
- KO: Knock out
- LCM: Microdissección por captura láser
- LDH: Lactato deshidrogenasa
- L-DOPA: Levodopa
- L-NAME: *N*<sup>ω</sup>-nitro-L-arginina metil ester nidrocloruro
- LRRK2: Quinasa 2 rica en repeticiones de leucina
- MAO-B: Monoamino oxidasa-B
- MasR: Receptor Mas
- mitoKATP: Canales de potasio mitocondriales dependientes de ATP
- MPP+: 1-metil-4-fenilpiridina
- MPTP: 1-metil-4-fenil.1,2,3,6-tetrahidropiridina
- MrgD: Subtipo del receptor Mas
- MTDR: MitoTracker deep red
- MV: Mesencéfalo ventral
- NAC: N-acetil-L-cisteína
- NEP: Neprisilina
- NO: Oxido nítrico
- NOS: Sintasa de óxido nítrico
- NOX: NADPH Oxidasas
- NST: Núcleo subtalámico
- OCR: Tasa de consumo de oxígeno
- P: OXPHOS, capacidad respiratoria de la mitocondria
- PET: Tomografía de emisión de positrones
- PGC-1 $\alpha$ : proteína 1 $\alpha$  coactivadora del receptor activado por el proliferador de peroxisomas

- PI3K: Fosfoinositol 3 quinasa
- PINK-1: Quinasa 1 p-ten inducida
- PKC: Proteína quinasa C
- PRR: Receptor de (pro) renina
- RNS: Especies nitrogenadas reactivas
- ROI: Región de interés
- ROS: Especies oxigenadas reactivas
- RT: Temperatura ambiente
- RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
- SIRT1: Sirtuína 1
- SN: Sustancia negra
- SNC: Sistema nervioso central
- SNpc: Sustancia negra pars compacta
- SNr: Sustancia negra pars reticulata
- SOD1: Superóxido dismutasa citosólica
- SOD2: Superóxido dismutasa mitocondrial
- SRA: Sistema renina-angiotensina
- ST: Estriado
- TH: Tiroxina hidroxilasa
- VDAC: Canal de anión dependiente de voltaje
- WB: Western blot
- WLL: Láser de luz blanca
- WT: Wild type
- YFP: Proteína fluorescente amarilla





# CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

---





# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 ENFERMEDAD DE PARKINSON

### 1.1.1 Características patológicas de la enfermedad de Parkinson

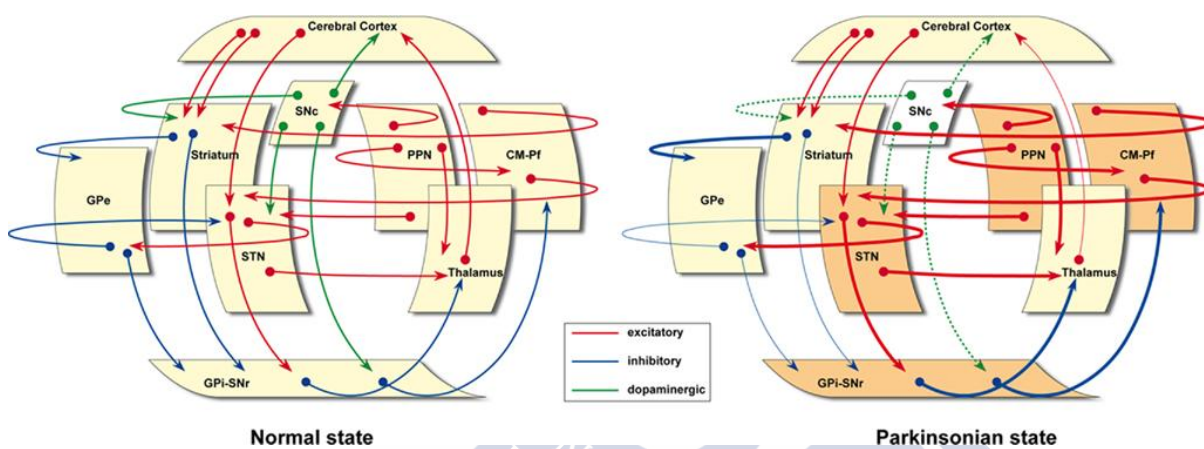
Las **características patológicas** de la enfermedad de Parkinson (EP) incluyen la degeneración de las conexiones neuronales entre la sustancia negra (SN) y el estriado (ST), las cuales son dos regiones cerebrales esenciales para la función motora normal, ya que forman parte del circuito motor de los ganglios basales; y la presencia de inclusiones proteicas citoplasmáticas que se conocen con el nombre de cuerpos de Lewy.

El ST recibe sus aferencias dopaminérgicas de las neuronas de la sustancia negra *pars compacta* (SNpc) a través de la vía nigroestriatal. Durante el desarrollo de la enfermedad, la degeneración de esta vía resulta en una deficiencia profunda de dopamina estriatal, debido a un proceso apoptótico, lo que causa una pérdida de la regulación del circuito motor de los ganglios basales. Se sabe que los primeros síntomas motores aparecen cuando se produce una disminución del 80% de la dopamina estriatal como consecuencia de la muerte de al menos el 50% de las neuronas de la SN; por lo que antes de que se supere este umbral deben de estar actuando mecanismos compensatorios por parte de las neuronas dopaminérgicas supervivientes y las neuronas postsinápticas estriatales para paliar la pérdida progresiva de estas neuronas (Blesa y col., 2017; Song y Haber, 2000).

Los ganglios basales son un conjunto de núcleos subcorticales que funcionalmente están compuestos por el ST (caudado y putamen), el globo pálido (interno y externo; GPi, GPe), el núcleo subtalámico (NST), la SN y el núcleo pedunculopontino. Estos núcleos están interconectados entre sí y además presentan conexiones con el tálamo y otros centros motores del tronco y corteza cerebral. Se han descrito dos vías que presentan efectos opuestos: la vía directa y la vía indirecta; el equilibrio de ambas vías permite la ejecución normal de los movimientos. En la vía directa, las proyecciones del ST, gabaérgicas, se dirigen a la SN *pars reticulata* y al GPi, presentando estas neuronas receptores de dopamina D1. En la vía indirecta, las proyecciones se dirigen al GPe y este a su vez las envía al NST, presentando estas neuronas receptores de dopamina D2. De esta manera la pérdida de dopamina en el ST, que se produce en la EP, lleva a una menor activación de la vía directa y a una menor inhibición de la indirecta, lo que conlleva una hiperactividad del globo pálido, seguido de una desinhibición del NST, produciéndose una ejecución anormal de los movimientos (Obeso y col., 2008; Obeso y Lanciego 2011) (**Figura 1.1**).

Otra característica patológica de esta enfermedad son los cuerpos de Lewy que se encuentran tanto en neuronas dopaminérgicas de la SN como en el *locus coeruleus*, núcleos

basales, hipotálamo, corteza cerebral, núcleos motores de los nervios craneales y componentes centrales y periféricos del sistema nervioso autónomo (Olanow y Tatton, 1999). Clásicamente se definieron como inclusiones eosinofílicas intracitoplasmáticas compuestas por un halo de fibrillas radiales y un núcleo menos definido. Se pensaba que los cuerpos de Lewy pueden ser una característica imprescindible de esta enfermedad, pero estudios recientes sugieren que algunas formas de la EP no presentan estos cuerpos (Dawson y Dawson, 2003). Los cuerpos de Lewy presentan una ultraestructura que se compone principalmente de  $\alpha$ -sinucleína y en segundo lugar de fibrillas del tipo amiloide de un tamaño que comprende desde 10 a 14 nm (Dawson y Dawson, 2003). Se desconoce si causan la degeneración de las células o por el contrario, son protectoras ya que acumulan proteínas que de otra forma podrían ser dañinas (Jellinger, 2009).



**Figura 1.1.** Esquema de los circuitos de los ganglios basales en estado normal y en la enfermedad de Parkinson. CM-Pf, complejo centromedial/parafascicular del tálamo; GPe, globo pálido externo; Gpi, globo pálido interno; SNc, ; PPN, núcleo pedunculopontino; SNr, sustancia negra pars reticulata; SNC, sustancia negra pars compacta; STN, núcleo subtalámico; (Permitido por Frontiers; Obeso y Lanciego, 2011)

### 1.1.2 Síntomas y diagnóstico de la enfermedad de Parkinson

La EP fue descrita por primera vez por James Parkinson en su tratado *An Essay on the shaking palsy* en 1817. Esta enfermedad es el desorden neurodegenerativo del movimiento más frecuente, afecta a más del 0,1% de la población mayor de 40 años y al 1% mayor de 55 años (Dawson y Dawson, 2003). Los pacientes con EP generalmente la manifiestan después de los 50 años de edad, aunque en algunos casos el inicio es precoz, con alteraciones motoras como temblor en reposo, micrografía, lentitud en los movimientos o rigidez. Uno de los primeros **síntomas** que presentan los pacientes con EP es el temblor en reposo unilateral en brazo o pierna. Sin embargo, otros síntomas tempranos son: la lentitud de los movimientos voluntarios, también llamado bradicinesia; la incapacidad para moverse o acinesia; la presencia de rigidez en las extremidades; el arrastre de los pies al andar o una postura encorvada (Mayeux, 2003). A pesar de considerarse estos los primeros síntomas, últimamente ha ganado una mayor aceptación el concepto de EP premotora, en la que síntomas como: disfunción olfatoria, anormalidades del sueño, denervación simpática cardíaca, estreñimiento, depresión y dolor, pueden anteceder al inicio de los signos motores clásicos en esta enfermedad (Obeso y col., 2010).

Normalmente, el inicio de la enfermedad es insidioso y de progresión lenta; afectando a una extremidad y extendiéndose posteriormente a las demás. El temblor aparece generalmente en reposo, aumenta en periodos de ansiedad y desaparece durante el sueño y las acciones motoras. El temblor postural, que ocurre cuando el paciente mantiene una postura de extensión muscular, como por ejemplo de extensión de las extremidades superiores, se debe distinguir del temblor esencial, que es lentamente progresivo y no se asocia a la acinesia y rigidez. La disminución de los movimientos y la lentitud al caminar puede ocurrir relativamente pronto en la enfermedad, mientras que el arrastre de los pies, los pasos cortos, la inestabilidad y las caídas se producen más tarde. La reducción del volumen y la monotonía del habla pueden ocurrir relativamente pronto, pero la sialorrea secundaria y la disfagia se desarrollan más tarde, al igual que los desmayos, la impotencia y los trastornos urinarios. La depresión puede preceder o coincidir con los síntomas motores (Litvan, 1998).

Se han propuesto varios criterios para el **diagnóstico** de la EP, que es eminentemente sintomatológico, donde la acinesia y la rigidez aparecen casi siempre, sin embargo, el temblor se desarrolla en aproximadamente un 75% de los pacientes (Litvan, 1998). En definitiva, los criterios mínimos de diagnóstico generalmente incluyen la presencia de bradicinesia y al menos uno de los siguientes síntomas: rigidez en los músculos del tronco y extremidades, temblor en reposo o postural e inestabilidad postural o trastorno de la marcha (Mayeux, 2003). Se pensaba que el diagnóstico de la EP era sencillo, pero diferentes estudios demostraron que entre un 25 y 40% de los pacientes estaban mal diagnosticados por un especialista (Rajput y col., 1991). El diagnóstico precoz y preciso es importante porque el pronóstico y el tratamiento de pacientes con la EP son marcadamente diferentes del de pacientes con trastornos parkinsonianos atípicos. A pesar de que el diagnóstico sea principalmente sintomatológico, la neuroimagen, la tomografía computacional y la imagen de resonancia magnética del cerebro pueden ayudar a excluir otras enfermedades como la enfermedad vascular y la hidrocefalia de presión normal (Litvan, 1998). Más recientemente, la tomografía de emisión de positrones (PET), una técnica de imagen que, mediante la administración de una sustancia marcada con un isótopo emisor de positrones de vida media corta, permite tener conocimiento de la densidad de neuronas dopaminérgicas en cerebro, y por lo tanto resulta de indudable ayuda en el diagnóstico de esta enfermedad (Stoessl, 2011).

### **1.1.3 Etiología y tratamiento de la enfermedad de Parkinson**

La EP es un trastorno complejo con muchas causas diferentes por lo que la **etiología** exacta de esta enfermedad no es del todo conocida, siendo muy probable que se trate de una combinación de factores ambientales y genéticos. A pesar de que se han hecho grandes logros en el campo de la genética sobre la enfermedad de Parkinson, la mayoría de los casos son idiopáticos, a los que subyacen causas medioambientales.

#### **- Factores genéticos**

Existe cierto interés en el papel que pueden desempeñar los factores genéticos en la etiología de la enfermedad de Parkinson ya que aproximadamente entre un 5 y 10% de los pacientes con Parkinson presentan una forma familiar de parkinsonismo. Además, diversos estudios señalan que estos factores genéticos son importantes en el inicio temprano de la enfermedad, pero no se observó que jueguen un papel principal en pacientes con Parkinson esporádico (Olanow y Tatton, 1999).

Se ha encontrado un grupo de genes relacionados directamente con la EP familiar. Tres de los genes implicados en esta enfermedad presentan una herencia recesiva y autosómica y están implicados en estrés oxidativo y mitocondrias, relacionado con vías de supervivencia, se trata de los genes *Parkin*, *DJ-1* y *PINK1* (Abeliovich y Beal, 2006). La proteína que codifica el gen *Parkin* participa en la ubiquitinación de proteínas; se han encontrado 20 mutaciones diferentes en este gen y están consideradas como la causa más común de Parkinson de tipo familiar. *DJ-1* es un regulador de la expresión de genes antioxidantes y se ha identificado mutaciones en este gen que producen Parkinson de inicio temprano, sin embargo, ocurre con poca incidencia (Klein y Westenberger, 2012). *PINK1* codifica una proteína con un motivo de unión a mitocondrias y un dominio serina/treonina quinasa; diferentes estudios afirman que se produce una acumulación de esta proteína en el espacio intermembrana de la mitocondria, y mutaciones en este gen están asociadas con la reducción de esta proteína en mitocondrias o la pérdida de actividad quinasa y por tanto pérdida de función, y esto se ha relacionado con la EP (Abeliovich y Beal, 2006).

Otros genes relacionados con la EP son *SNCA* y *LRRK2*, estos presentan un patrón de herencia autosómico dominante y están relacionados con inclusiones proteicas intracelulares (Abeliovich y Beal, 2006). El gen *SNCA* codifica para la proteína  $\alpha$ -sinucleína; se ha encontrado que este gen puede presentar duplicaciones y su sobreexpresión parece ser especialmente tóxica para las neuronas dopaminérgicas. Por otro lado, el gen *LRRK2* codifica para una proteína que contiene actividad enzimática Rab GTPasa y quinasa; se ha observado que en los portadores de mutaciones de este gen aumenta la probabilidad de padecer la enfermedad con la edad (Obeso y col., 2010).

#### **- Factores ambientales**

Estudios epidemiológicos han relacionado factores ambientales con un aumento del riesgo de incidencia de la EP, entre ellos destaca la exposición a sustancias químicas usadas en la agricultura (plaguicidas e insecticidas); de esta manera se encuentra una mayor incidencia en pacientes relacionados con la vida rural, la agricultura, beber agua de pozo... Además, se han asociado numerosas sustancias tóxicas con el desarrollo de la EP, por ejemplo, metales pesados como el hierro, solventes y monóxido de carbono, así como agentes infecciosos como virus y bacterias (Dick, 2006; Singh C. y col., 2007). Sin embargo, la exposición a plaguicidas ha recibido la mayor atención debido a las implicaciones del uso generalizado de estos agentes sobre la salud pública mundial. Diferentes estudios sugieren una consistente correlación entre la exposición a pesticidas, tales como rotenona y paraquat, y la EP. Con respecto a las implicaciones de riesgo para la salud humana, una serie de pesticidas han sido objeto de intenso estudio, en relación con sus potenciales acciones neurotóxicas, en el desarrollo de la “hipótesis del medio ambiente de la EP”. Esta hipótesis especula que los agentes químicos presentes en el medio ambiente son capaces de dañar selectivamente las neuronas dopaminérgicas, contribuyendo así a la EP. De hecho, el uso de plaguicidas para modelos animales de Parkinson basados en tóxicos se ha vuelto cada vez más popular y ha proporcionado información valiosa sobre el proceso neurodegenerativo (Bertabet et al., 2002).

Los mecanismos que contribuyen al proceso degenerativo de las neuronas dopaminérgicas de la SN se pueden dividir en dos categorías. Por un lado, mecanismos celulares autónomos (mecanismos que ocurren dentro de las neuronas que mueren) que incluyen estrés oxidativo, agregación proteica, defectos en las vías ubiquitina-proteosoma, autofagia y disfunción mitocondrial. Por otra parte, mecanismos celulares no autónomos

(mecanismos que se generan fuera de las células que degeneran), que incluyen difusión de la enfermedad a otras zonas del cerebro y neuroinflamación (Hirsch y col., 2013). A continuación, se resumen algunos de ellos (**Figura 1.2**).

El **estrés oxidativo** se define como el desequilibrio entre los niveles de especies oxigenadas reactivas (ROS, del inglés *Reactive Oxygen Species*) producidas y la habilidad de los sistemas biológicos de eliminarlos, creando un estado que contribuye al daño celular. Existen varias fuentes de ROS en el cerebro, la cadena de transporte electrónica (CTE) mitocondrial es la principal, otras fuentes son la enzima monoaminooxidasa (MAO), la enzima NADPH oxidasa (NOX) y otras flavoproteínas. Evidencias experimentales sugieren que las ROS contribuyen significativamente a la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la EP, siendo resultado del metabolismo de la dopamina, bajos niveles de glutatión y altos niveles de calcio y hierro en la SNc (Dias y col., 2013). De hecho, se ha encontrado en la SNc de pacientes con la EP un aumento en la peroxidación lipídica y oxidación de proteínas y de ADN y una actividad alterada de los sistemas antioxidantes (Dexter y Jenner, 2013).

**Alteraciones proteolíticas:** la presencia de múltiples proteínas en los cuerpos de Lewy, de forma más notable la  $\alpha$ -sinucleína, conduce a la idea de que el metabolismo de proteínas inservibles, mutadas o dañadas puede estar afectado en la EP; lo que genera agregación celular y muerte neuronal. El sistema ubiquitina-proteasoma es el que se encarga de degradar este tipo de proteínas y se ha observado una actividad reducida, así como una reducción en la expresión de este sistema en pacientes con la EP (Ebrahimi-Fakhari y col., 2012).

La **disfunción mitocondrial** afecta a numerosas vías celulares, conduce al daño de componentes intracelulares y a la muerte celular. En las mitocondrias de pacientes con la EP se han encontrado tanto alteraciones metabólicas y morfología como un desequilibrio en la fusión-fisión mitocondrial. Se ha demostrado que la inhibición del complejo I mitocondrial está presente en la EP, así como daños en proteínas claves del ciclo de Krebs ( $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa). Recientemente, se ha relacionado alteraciones en la función mitocondrial con mutaciones en genes que provocan la EP (*SNCA*, *parkin*, *PINK-1* y *DJ-1*) (Henchcliffe y Beal, 2008). Se profundizará en este apartado más adelante en la introducción.

Las características de la **neuroinflamación** incluyen microglía activada, astrocitos reactivos dentro del parénquima cerebral y la liberación de numerosos mediadores inflamatorios citoquinas, quimiocinas, prostaglandinas, proteínas de la cascada del complemento, entre otros. Se han encontrado evidencias que apoyan la base neuroinflamatoria de la EP, ya que se ha hallado que los cerebros *post mortem* de pacientes con la EP tenían microglía activada. Además, se ha demostrado que hay un aumento de mediadores proinflamatorios en el ST y la SN, incluidos TNF, IL $\beta$ , IL6, iNOS y COX2 (Vivekanantham y col., 2015).

A pesar de los grandes esfuerzos de los investigadores en buscar **tratamientos** que frenen la enfermedad, hasta el momento solo contamos con terapias que alivian algunos de los síntomas; esto es debido, en parte, a la falta de un diagnóstico precoz de la enfermedad. Los tratamientos disponibles actualmente incluyen la farmacoterapia, neurocirugía estereotáxica funcional (estimulación cerebral profunda) y terapia de apoyo como fisioterapia, terapia del lenguaje, entre otros.

## - Tratamiento farmacológico

La **levodopa o L-DOPA**, en combinación con un inhibidor de la descarboxilasa (carbidopa o benserazida), es el tratamiento más eficaz para los síntomas motores de la EP, ya que actúa como un precursor de la dopamina. Se administra de forma oral, por lo que se necesitan altas dosis para que se produzca el efecto deseado, lo que induce náuseas y vómitos al paciente. Además, los tratamientos a largo plazo con L-DOPA están relacionados con fluctuaciones motoras (efecto *on-off*) y discinesias, aunque parece que esto último tiene más que ver con la dosis acumulada de L-DOPA y no tanto el tiempo del tratamiento. Combinado con la L-DOPA también se puede administrar **inhibidores de la catecol-O-metiltransferasa (COMT)**, ya que reduce el metabolismo periférico de esta y prolonga su acción (Oertel y Schulz, 2016).

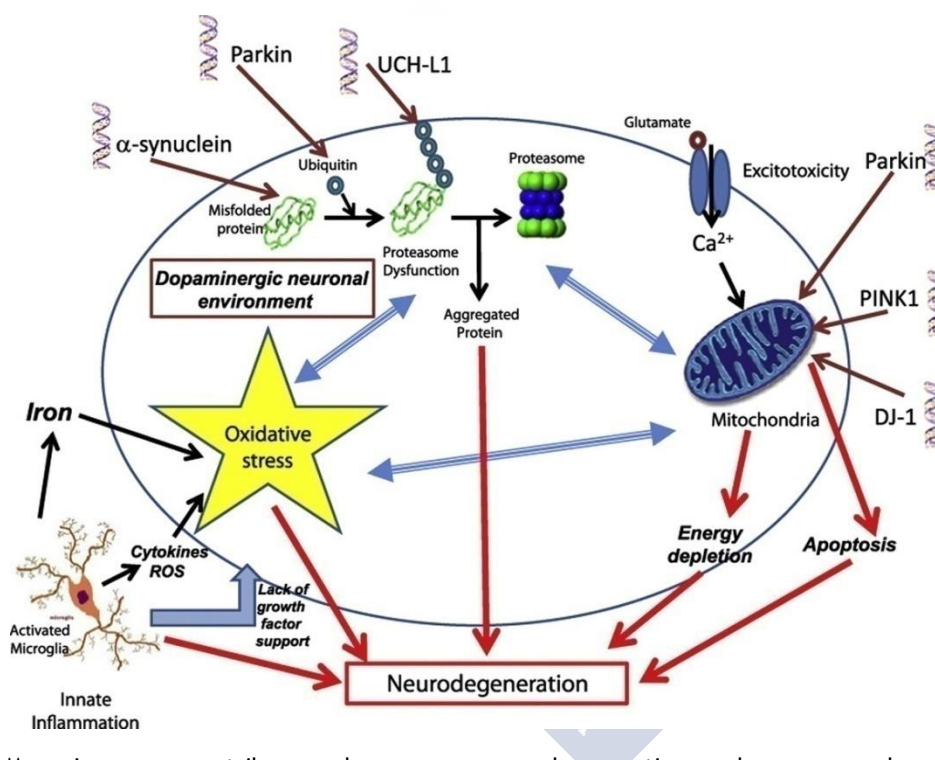


Figura 1.2. Mecanismos que contribuyen a los procesos neurodegenerativos en las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra en la enfermedad de Parkinson (Con permiso de Elsevier; Dexter y Jenner, 2013)

Otro de los tratamientos farmacológicos disponibles son los **agonistas dopaminérgicos** que tienen un efecto activador de los receptores dopaminérgicos estriatales de la familia D2; se recomienda su uso en pacientes recién diagnosticados como monoterapia para retrasar el uso de L-DOPA, o en conjunto con ésta para estadios intermedios y avanzados, aunque valorando sus efectos secundarios como demencia o daño cognitivo (Singh N. y col., 2007).

Se considera que los **inhibidores de la enzima monoamino oxidasa B (MAO-B)** son efectivos en monoterapia, ya que la dopamina es metabolizada por esta enzima, por lo tanto, la inhibición de ésta aumenta la dopamina disponible; sin embargo, se ha visto que son menos efectivos que la L-DOPA (Johnson, 2015).

## - Tratamiento quirúrgico

Antes de la comercialización de los tratamientos farmacológicos, el tratamiento quirúrgico era la única opción, que consistía en la ablación quirúrgica del globo pálido y el tálamo, lo que mejoraba los síntomas motores. Estas prácticas se abandonaron cuando se comenzó a comercializar la L-DOPA; sin embargo, como se mencionó anteriormente, los tratamientos farmacológicos a largo plazo se vuelven inadecuados y provocan efectos secundarios, por lo que surgió la necesidad de volver al tratamiento quirúrgico, pero esta vez con mejores resultados debido al mejor entendimiento de la fisiología de los ganglios basales y el desarrollo tecnológico. Desafortunadamente, solo un 5 o 10% de los pacientes son candidatos para estas intervenciones quirúrgicas (Garbayo y col., 2006).

Entre los métodos quirúrgicos destacan la **estimulación cerebral profunda**, en la que uno o más electrodos se implantan en el NST o en el GPi, usando las técnicas estereotáxicas, lo que produce la inhibición, con la estimulación de alta frecuencia, de estos núcleos hiperactivos mejorando de esta forma los síntomas motores (Larson, 2014).

## - Nuevas perspectivas terapéuticas

Debido a los inconvenientes que presentan los tratamientos disponibles hoy en día, tanto farmacológicos como quirúrgicos, en los últimos años, gran parte de la investigación se ha centrado en desarrollar nuevas terapias diseñadas para frenar o detener el desarrollo de la enfermedad. Un tratamiento puede lograr este resultado inhibiendo los eventos neurodegenerativos primarios ("neuroprotección") o aumentando los mecanismos compensatorios y regenerativos en el cerebro ("neurorestauración") (Francardo y col., 2017b).

Actualmente se han identificado muchas moléculas con potenciales propiedades neuroprotectoras/neuroreparadoras. Varios estudios en curso están investigando el efecto de moduladores mitocondriales, tales como la creatina y la coenzima Q10, así como el antagonista de los canales de calcio tipo L, isradipina. Además se están investigando gran cantidad de componentes que actúan disminuyendo el estrés oxidativo: polifenoles, quelantes del hierro como la deferiprona, la cafeína, la nicotina, la inosina, la melatonina o estrógenos, entre otros (Lopez-Real y col., 2015; Meissner y col., 2011; Oertel y Schulz, 2016; Rodriguez-Perez y col., 2010; Soto-Otero y col., 2002).

Una de las estrategias neuroprotectora más prometedora es el uso de **inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ECA)** como el captopril y de **inhibidores de los receptores de angiotensina II tipo 1 (AT1)** como el losartán o el candesartán. La interacción de estos receptores con la angiotensina II (Ang II) provoca la activación de la enzima NADPH oxidasa, que es la mayor fuente de ROS después de la mitocondria. Se sabe que la NADPH oxidasa está relacionada con procesos inflamatorios y estrés oxidativo involucrados en trastornos asociados al envejecimiento. Se han hecho varios estudios que evalúan el uso de antagonistas de AT1 con el menor riesgo de padecer EP. Sin embargo, aspectos como el bajo número de pacientes, el amplio rango de dosis usadas, la duración de los tratamientos y otros problemas metodológicos hacen necesario la realización de más estudios (Labandeira-Garcia y col., 2013).

Otra estrategia neuroprotectora/neuroreparadora prometedora es el tratamiento con **factores neurotróficos**. Los factores neurotróficos influyen en la supervivencia y proliferación celular, la función bioquímica y la plasticidad morfológica. Las influencias

tróficas son importantes durante el desarrollo y en el adulto, tanto en el individuo sano como durante las lesiones y los procesos degenerativos. El factor neurotrófico GDNF sería el más apropiado para el tratamiento de la EP, ya que es uno de los más potentes descrito hasta ahora y se ha observado que es capaz de proteger a las neuronas dopaminérgicas de la SN tanto de la axotomía como de la degeneración inducida por neurotoxinas dopaminérgicas (Alexi y col., 2000; Garbayo y col., 2006).

Por último, el hecho de que la principal característica neuropatológica de la EP es la degeneración de neuronas dopaminérgicas del sistema nigroestriatal, la convierte en una buena candidata para el uso de la **terapia celular**. La terapia celular más típica consiste en el reemplazo de las células dopaminérgicas que degeneran en la EP por implantes neuronales que suplen la función de estas células perdidas. Desde hace más de 30 años se han llevado a cabo de manera experimental trasplantes a pacientes con EP; utilizando para ello células de diferentes orígenes, unos con mejores resultados que otros. En los primeros trasplantes realizados, en los años 80, se utilizó tejido mesencefálico ventral de fetos. Pero debido a problemas tales como rechazos, infecciones y dilemas éticos, se ha estado buscando fuentes celulares alternativas para estos trasplantes, con menor o mayor acierto, entre las que destacan: células troncales embrionarias, células madre pluripotentes inducidas (iPSC, del inglés *Induced Pluripotent Stem Cells*), células epiteliales del pigmento retinal, entre otras (Barker y col., 2015). Otra estrategia es la utilización de células que producen factores tróficos para rescatar o neuroproteger al sistema dopaminérgico del paciente, como las células de cuerpo carotideo productoras de GDNF (Muñoz-Manchado y col., 2013).

#### **1.1.4 Modelos *in vivo* e *in vitro* de la enfermedad de Parkinson**

Los modelos animales y celulares son esenciales tanto para la investigación de los mecanismos moleculares de la neurodegeneración que ocurre en la EP como para el estudio de las complicaciones relacionadas con el tratamiento de la enfermedad. Actualmente, no se ha conseguido crear un modelo que replique completamente todas las características patológicas de la EP, sin embargo, existen una gran cantidad de modelos *in vivo* e *in vitro* que proporcionan una valiosa herramienta experimental para abordar hipótesis específicas (Francardo, 2017a).

##### **1.1.4.1 Modelos *in vivo* de la enfermedad de Parkinson**

Durante las últimas décadas, los modelos animales de la EP se han desarrollado en una variedad de formas. Típicamente se pueden dividir en aquellos que usan neurotoxinas ambientales o sintéticas y aquellos que usan la expresión *in vivo* de mutaciones relacionadas con la EP (genéticas) o que inducen la sobreexpresión de  $\alpha$ -sinucleína.

##### **- Modelos neurotóxicos**

Los modelos basados en la administración de neurotoxinas como la 6-hidroxi dopamina (6-OHDA) o el 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) son los más usados, sin embargo, existen otras toxinas, como el paraquat y la rotenona, que también se están usando, pero en menor medida, para modelar la EP. Una característica común de los modelos basados en toxinas es su habilidad para producir estrés oxidativo y causar la muerte de neuronas dopaminérgicas que refleja lo que ocurre en la EP (Blesa y col., 2012).

- 6-OHDA: es una neurotoxina catecolaminérgica que se usa, principalmente, para generar lesiones de manera específica en las neuronas dopaminérgicas nigroestriales de ratas (Ungerstedt, 1968), ya que utiliza el mismo sistema de transporte de catecolaminas como la dopamina y la norepinefrina. Debido a que la 6-OHDA no cruza la barrera hematoencefálica, esta no se puede usar de forma sistémica y tiene que ser inyectada directamente en la SNc, en el fascículo del prosencéfalo medial o en el ST (Blandini y col., 2008). No se conoce el mecanismo exacto que subyace su efecto tóxico, sin embargo, se sabe que el estrés oxidativo está implicado. Las ROS derivadas de su autooxidación son un mecanismo principal (Soto-Otero y col., 2000). Además, se ha demostrado que la disfunción mitocondrial también es una causa de la muerte neuronal dopaminérgica inducida por esta neurotoxina (Jiang y Dickson, 2018). Este modelo tiene la ventaja de que no solo produce una degeneración dopaminérgica sustancial, sino que también presenta otras características patológicas de la EP como la activación microglial (Rodríguez-Pallares y col., 2007) y el estrés oxidativo. Sin embargo, posee dos grandes limitaciones a la hora de reproducir la enfermedad, ya que produce un daño agudo, y no una neurodegeneración progresiva, y no presenta cuerpos de Lewy (Francardo, 2017a).

- MPTP: este modelo se desarrolló a raíz del descubrimiento, en 1983, de que esta neurotoxina, que fue administrada por error con heroína adulterada, produce EP irreversible (Langston y col., 1983). Se aplica de manera sistémica en ratones y primates, ya que las ratas son resistentes, y una vez cruza la barrera hematoencefálica se convierte, a través de los astrocitos por la MAO-B, en el ion activo 1-metil-4-fenilpiridinio ( $MPP^+$ ). El  $MPP^+$  tiene una gran afinidad por el transportador de dopamina por lo que es captado específicamente por las neuronas dopaminérgicas, donde inhibe el complejo I de la CTE mitocondrial, produciendo un aumento de la producción de ROS y una disminución de la producción de ATP. Los animales intoxicados con MPTP muestran no solo neurodegeneración dopaminérgica, sino también, muerte celular en otras áreas del cerebro como la corteza, el *locus coeruleus* y el hipocampo. Sin embargo, no presentan cuerpos de Lewy (Blesa y col., 2012; Francardo, 2017a).

- Rotenona: es un pesticida orgánico y un potente inhibidor del complejo I mitocondrial. Al ser un compuesto lipofílico cruza fácilmente la barrera hematoencefálica; a diferencia del MPTP, afecta a todas las neuronas, sin embargo, produce degeneración mayoritariamente de la vía dopaminérgica nigroestriatal, además de daño oxidativo estriatal y formación de inclusiones de ubiquitina y  $\alpha$ -sinucleína en las células de la SN similares a los cuerpos de Lewy de la EP. Como desventajas, este modelo presenta una alta tasa de mortalidad, variabilidad fenotípica y otras características no relacionadas con la EP (Betarbet y col., 2002).

### **- Modelos genéticos**

Las mutaciones genéticas en la EP son raras y representan solo el 10% de todos los casos de EP, por lo que estudio de las mutaciones genéticas de la enfermedad se basa en creencia de que las similitudes clínicas entre la forma hereditaria y la forma esporádica de la enfermedad comparten un mecanismo común, que puede conducir a la identificación de vías moleculares y bioquímicas involucradas en la patogénesis de la enfermedad (Blesa y col., 2012). Los modelos genéticos se basan en la manipulación de genes diana de la EP, que se realiza por expresión transgénica del mutante, la sobreexpresión de genes de tipo salvaje para genes autosómicos dominantes (p. ej. SNCA) o inactivando genes autosómicos recesivos (por

ejemplo, DJ1 y PINK1) (Dawson y col., 2010). Los principales genes utilizados para modelos de la EP son:

-  $\alpha$ -sinucleína: es el principal componente de los cuerpos de Lewy (Spillantini y col., 1997). Mutaciones genéticas de regiones codificantes, así como duplicaciones o triplicaciones del gen para la  $\alpha$ -sinucleína (*SNCA*), están ligadas a la EP autosómica dominante, lo que sugiere que no solo las mutaciones, sino también, unos niveles mayores a los normales de  $\alpha$ -sinucleína juegan un papel en la EP. Los modelos de roedores que expresan altos niveles de  $\alpha$ -sinucleína salvaje, mutante (A53T y A30P) o truncada muestran la expresión local de  $\alpha$ -sinucleína debido en parte al modo de administración y al promotor usado para la expresión. La mayoría de estos modelos manifiesta una variedad de patologías y déficits de conductas similares a las observadas en la EP como alteraciones motoras, pérdida de terminales dopaminérgicos en los ganglios basales, disminución en la liberación de dopamina, entre otros (Jiang y Dickson, 2018). Los modelos animales experimentales de sobreexpresión de  $\alpha$ -sinucleína, más recientemente introducidos, se están desarrollando a partir de un enfoque combinado que emplea distintos serotipos de vectores virales adeno-asociados, (AAV, del inglés *Adeno-Associated Viral Vector*), promotores específicos para poblaciones celulares y métodos de producción y purificación optimizados (Van der Perren y col., 2015). Estos modelos reproducen más fielmente el proceso de la EP al producir una degeneración dopaminérgica más progresivamente (1-3 meses) a partir de la agregación de  $\alpha$ -sinucleína.

- LRRK2: se asocia con defectos en la autofagia (Gomez-Suaga y col., 2012). Ha sido el objetivo en una serie de modelos de roedores para la EP. Además de los cambios en la actividad autofágica, se han observado algunas características de la EP, como la disfunción motora, la pérdida neuronal, la disminución de la dopamina y la degeneración axonal en diferentes modelos de LRRK2; sin embargo, ninguno presenta cuerpos de Lewy (Romonet y col., 2011).

- Parkin, DJ1 y PINK1: los modelos de ratones *knock-out* (KO) individuales para estos genes no muestran degeneración nigroestriatal ni inclusiones intracelulares, pero si un leve deterioro motor. Sin embargo, se ha observado que ratas KO para PINK1 y DJ1 muestran defectos motores progresivos acompañado de una pérdida del 50% de las neuronas de la SNc. Además, la desactivación de Parkin en ratones adultos causa la neurodegeneración de la SNc. En general, estos modelos genéticos son capaces de recapitular aspectos específicos de la EP; sin embargo, no reproducen por si solos la degeneración neuronal asociada a la EP (Blesa y col., 2012; Vingill y col., 2017).

#### **1.1.4.2 Modelos *in vitro* de la enfermedad de Parkinson**

A diferencia de los modelos *in vivo*, los modelos *in vitro* desarrollan la patología de forma más rápida, son menos costosos y en su mayoría no necesitan aprobación ética. Las manipulaciones genéticas y farmacológicas, así como las imágenes *time-lapse* son más fáciles y fiables, debido a que presentan un ambiente controlado. Estas propiedades permiten un mayor número de pruebas en mucho menos tiempo y facilita la investigación de los mecanismos patofisiológicos moleculares y celulares de la degeneración dopaminérgica en la EP. Incluso, un tipo celular concreto (por ejemplo, neuronas dopaminérgicas) puede ser estudiado en solitario, lo que es importante para determinar su contribución a la patogénesis de la EP. En los modelos celulares utilizados actualmente se representan dos tipos de cambios observados en cerebros de pacientes con EP: 1) la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la

SNC y 2) agregaciones proteicas que contienen  $\alpha$ -sinucleína (Falkenburger y col., 2016; Martins-Lopes y col., 2017).

- **Líneas celulares:** son derivadas de poblaciones de células procedentes de organismos multicelulares, muchas de ellas tienen un origen humano lo que les confiere un gran interés. Estas células pueden ser immortalizadas tanto naturalmente como artificialmente, lo que conduce a una pérdida de algunas vías de comprobación del ciclo celular y la senescencia celular normal. Este modelo es apropiado para evaluar compuestos neuroprotectores para el tratamiento de la EP. Se puede simular la patología de la EP utilizando toxinas o modificaciones genéticas, como las anteriormente descritas. Las líneas celulares más utilizadas para el estudio de la EP son: SH-SY5Y, LUHMES, N27 y MES 23.5 (Martins-Lopes y col., 2017). La línea celular de neuroblastoma humana **SH-SY5Y** expresa, aunque en bajos niveles, marcadores dopaminérgicos (TH, DAT, dopamina- $\beta$ -hidroxilasa, entre otros) lo que hace que sea muy usada en la investigación de la EP; sin embargo, no muestran características neuronales ya que están en los primeros estadios de diferenciación neuronal. La línea celular **LUHMES** es de origen humano, no expresa marcadores dopaminérgicos cuando se mantienen en estado proliferativo; sin embargo, se pueden diferenciar a neuronas dopaminérgicas con la adición al cultivo de antibióticos y neurotrofinas (Martins-Lopes y col., 2017). La línea celular dopaminérgica **N27** procede del mesencéfalo ventral (MV) de embriones de rata immortalizadas con el antígeno T SV40; estas células expresan TH y el transportador de dopamina, además son sensibles a la toxina 6-OHDA y al estrés oxidativo producido por  $H_2O_2$ , por lo que son un buen modelo para estudiar la EP (Gao y col., 2016). La línea celular **MES 23.5** procede de la fusión somática de células mesencefálicas de embriones de rata y la línea celular de neuroblastoma-glioma murino, N18TG2. Estas células expresan TH y sintetizan dopamina, pero no otras catecolaminas, que se ven aumentadas tras el tratamiento con análogos del AMPc. Al poseer características encontradas en células dopaminérgicas de la SN es un modelo adecuado para estudiar la EP (Crawford y col., 1992).

- **Cultivos primarios:** normalmente se obtienen de tejido cerebral de embriones murinos. El primer paso es extraer los cuernos uterinos de una madre gestante en una etapa embrionaria específica, E14 para las ratas y E13 para los ratones. El feto es decapitado, se extrae el cerebro y se secciona el MV. Las células dopaminérgicas se aíslan por digestión enzimática seguida de centrifugaciones diferenciales y se siembran en un medio específico. Comparado con las líneas celulares que son un modelo homogéneo, los cultivos primarios dopaminérgicos contienen distintos tipos celulares, tanto neuronas dopaminérgicas como células gliales. Estos modelos se usan a menudo en estudios de la supervivencia celular dopaminérgica, retracción neurítica y regeneración celular. La patología de la EP, en estos cultivos, se puede inducir tanto con toxinas, 6-OHDA y  $MPP^+$ , como usando animales transgénicos para obtener los cultivos o manipulaciones genéticas (Martins-Lopes y col., 2017).

- **Células iPSC:** hace una década Yamanaka y colaboradores descubrieron que las células somáticas adultas pueden ser reprogramadas para generar iPSC por la expresión forzada de varios factores de transcripción, conocidos como "factores de Yamanaka" (Takahashi y Yamanaka, 2006). Estas células tienen la capacidad de diferenciarse a casi cualquier tipo celular. Así, fibroblastos u otro tipo celular procedentes de humanos (tanto de controles sanos, como de pacientes) pueden ser reprogramadas y diferenciadas al tipo celular que se necesite para el estudio. De esta forma estas células se pueden diferenciar en neuronas, concretamente en neuronas dopaminérgicas, y ser usadas como modelo de la EP, con la ventaja de que son células de origen humano (Cobb y col., 2017).

- **Líneas celulares híbridas:** se crearon fusionando las plaquetas, que contienen ADN mitocondrial de un paciente con EP o de controles sanos con células de la línea celular SH-SY5Y o NT2 sin ADN mitocondrial (Swerdlow y col., 1996). Estas células presentan varios factores patogénicos de la EP, relacionados con las mitocondrias, tales como bioenergética y morfología mitocondrial anormal, estrés oxidativo, inclusiones proteicas, entre otros (Trimmer y Bennett, 2009). Por lo que son un buen modelo celular de origen humano para el estudio de la disfunción mitocondrial relacionado con la enfermedad.



## 1.2 DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL EN LA ENFERMEDAD DE PARKINSON

### 1.2.1 Mitocondrias

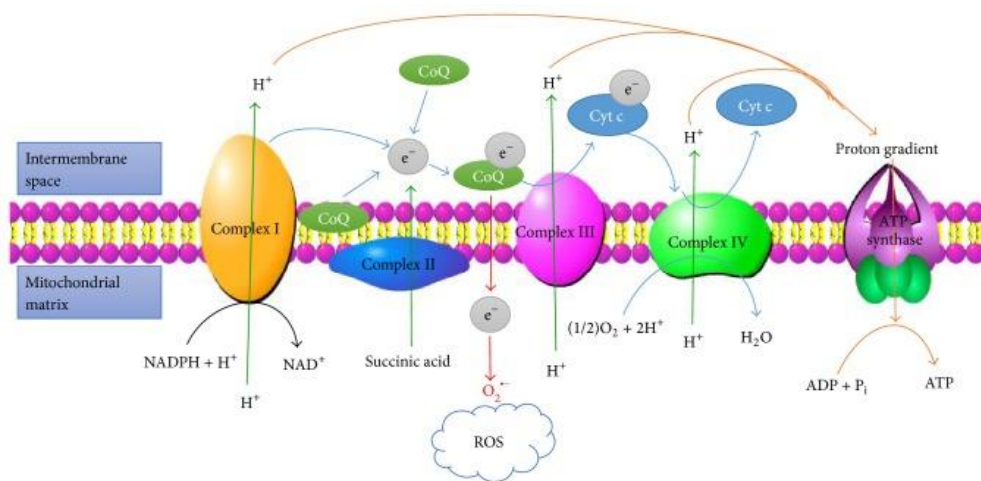
Las mitocondrias se encuentran en prácticamente todas las células eucariotas (excepto en los eritrocitos), en un número que va desde varios cientos a miles, según el tipo celular. Su función principal es generar la energía celular, en forma de ATP, mediante la acción combinada del ciclo de los ácidos tricarbónicos, la CTE y la fosforilación oxidativa, y se cree que evolutivamente derivan de la fusión de organismos procarióticos y eucarióticos. Otras de sus funciones son la regulación de la muerte celular a través de la apoptosis, la homeostasis del calcio, la biosíntesis de aminoácidos y esteroides, la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos y el control de la división y crecimiento celular (Schon y Przedborski, 2011).

Estructuralmente, las mitocondrias están compuesta por una doble bicapa lipídica que forma cuatro compartimentos: la membrana mitocondrial externa (MME), la membrana mitocondrial interna (MMI), el espacio intermembrana (EIM) y la matriz mitocondrial (región dentro de la MMI). La MMI está muy plegada y sobresale hacia la matriz por unas invaginaciones denominadas crestas, lo que aumenta enormemente la superficie de la MMI. Cada mitocondria contiene, en la matriz, múltiples copias de un pequeño genoma circular y de doble cadena que codifica para 37 genes mitocondriales (ADN mitocondrial (ADNmt). Además, contienen su propia maquinaria para sintetizar ARN y proteínas, sin embargo, no todas las proteínas mitocondriales están codificadas por este genoma, el ADNmt codifica para 13 proteínas y son todas componentes del sistema de fosforilación oxidativa. El resto de proteínas están codificadas por el ADN nuclear, las cuales se sintetizan en el citosol y son importadas a las mitocondrias. Otra de las características de las mitocondrias es que se heredan de forma uniparental de la línea materna (Perier y Vila, 2012).

Las mitocondrias son orgánulos muy dinámicos y están constantemente sometidas a ciclos de fusión y fisión, así como a movimientos a lo largo del citoesqueleto. El aumento del número de mitocondrias en una célula está mediado por la biogénesis; en este proceso se produce la síntesis y el importe de macromoléculas a las mitocondrias ya existentes y la replicación del ADNmt, y a continuación se produce la fisión de una mitocondria en dos mitocondrias hijas. Debido a que las mitocondrias acumulan daños durante la vida celular como consecuencia de sus funciones metabólicas, las células poseen múltiples mecanismos de control de calidad para hacer frente a estos daños, estos mecanismos incluyen la renovación de las mitocondrias dañadas a través de la degradación autofágica, lo que también se conoce como mitofagia (Celardo y col., 2014; Ni y col., 2015). Cabe destacar que el principal regulador de la biogénesis mitocondrial es el coactivador transcripcional PGC-1 $\alpha$ , que con la actuación conjunta de varios factores de transcripción (tales como NRF-1, NRF-2, PPAR- $\alpha$ , entre otros) controlan la interacción núcleo-mitocondria para poner en marcha la transcripción y transporte de todas las proteínas necesarias para la formación de nuevas mitocondrias. A su vez, la expresión de PGC-1 $\alpha$  está controlada por una serie de señales ambientales que incluyen, la temperatura, la privación de energía y la disponibilidad de nutrientes y factores de crecimiento (Scarpulla, 2008b)

La CTE, que se encuentra en la MMI, está compuesta por cinco complejos multiprotéicos que incluyen: complejo I o nicotinamida adenina dinucleótico (NADH) deshidrogenasa-ubiquinona oxidoreductasa (aproximadamente 46 subunidades), complejo II o succinato deshidrogenasa-ubiquinona oxidoreductasa (4 subunidades), complejo III o ubiquinina-

citocromo c oxidoreductasa (11 subunidades), citocromo c oxidasa o complejo IV (13 subunidades) y complejo V o ATP sintasa (aproximadamente 16 subunidades). La CTE también requiere, para su funcionamiento, dos pequeños transportadores de electrones: la ubiquinona/coenzima Q y el citocromo c (Perier y Vila, 2012). La función de esta cadena es generar energía para la célula en forma de ATP. El transporte de los electrones a través de la cadena, hasta que reaccionan con el  $O_2$  produciendo  $H_2O$ , causa el movimiento de protones (iones  $H^+$ ) desde la matriz hasta el espacio intermembrana, por los complejos I, III y IV, generando un gradiente de concentración de protones usado por la ATP sintasa para producir ATP (**Figura 1.3**). El ATP una vez producido por la mitocondria, es transportado al citoplasma por el transportador de nucleótidos de adenina (ANT) (Jafri y Kumar, 2014).



**Figura 1.3.** Representación de la cadena de transporte electrónica. Complex, complejo; intermembrane space, espacio intermembrana; mitochondrial matrix, matriz mitocondrial; ROS, especies oxigenadas reactivas (Permitido por APS Journals; Li y col., 2017)

### 1.2.2 Mutaciones genéticas y toxinas que relacionan la disfunción mitocondrial y la enfermedad de Parkinson

Como ya se explicó anteriormente, existen una serie de mutaciones genéticas y de neurotoxinas que están directamente relacionadas con la EP y que han permitido el desarrollo de una gran variedad de modelos experimentales. Curiosamente, se ha demostrado que muchas de las mutaciones relacionadas con la EP afectan a proteínas mitocondriales o proteínas vinculadas con la disfunción mitocondrial. Además, las neurotoxinas que provocan síndromes parecidos a la EP son potentes inhibidores de la cadena de transporte mitocondrial.

Uno de los genes más involucrados en la enfermedad es el gen *SNCA*, que codifica para la proteína  $\alpha$ -sinucleína. No se conoce exactamente como la  $\alpha$ -sinucleína mutante provoca la muerte neuronal dopaminérgica en la EP, pero existen muchas teorías. Recientemente, se ha asociado esta proteína con la disfunción mitocondrial, ya que la  $\alpha$ -sinucleína mutante se dirige a la mitocondria y se acumula en la MMI y puede causar daños en el complejo I y un aumento de ROS, que puede llevar a la muerte celular (Devi y col., 2008). Por otro lado, se encuentran *Parkin*, *PINK1* y *DJ-1* que son genes que codifican proteínas fuertemente relacionadas con

funciones mitocondriales y con la resistencia al estrés oxidativo, y han sido vinculadas con la EP. Se ha observado que ratones que carecen del gen *Parkin* presentan disminución en la expresión de subunidades del complejo I y IV que conlleva una reducción en la función de la CTE y estrés oxidativo aumentado (Palacino y col., 2004). PINK1 tiene un papel en la integridad mitocondrial regulando la maquinaria de fisión mitocondrial y en la renovación de mitocondrias dañadas. Se ha observado en la línea celular SH-SY5Y que la delección de este gen provoca estrés oxidativo mitocondrial, fragmentación mitocondrial y autofagia. DJ-1 está presente en mitocondrias y protege contra la muerte neuronal oxidativa y su pérdida provoca fragmentación mitocondrial, dinámica mitocondrial alterada, estrés oxidativo y autofagia. Además, las alteraciones en la proteína LRRK2, que se localiza en la MME, están relacionadas con una mayor vulnerabilidad al inhibidor del complejo I y toxina mitocondrial, rotenona, y también se ha observado que aumenta la protección contra la degeneración de las neuronas dopaminérgica conferida por la proteína Parkin (Keane y col., 2011).

La primera toxina que se relacionó con la inhibición del complejo I y la EP fue el MPTP, que una vez transformado a  $MPP^+$  se transporta pasivamente dentro de la mitocondria gracias al gradiente transmembrana mitocondrial, donde inhibe el complejo I mitocondrial provocando la muerte celular a través del déficit de energía, generación de ROS y radicales libres, y posiblemente por excitotoxicidad. Lo mismo ocurre con la rotenona que también inhibe el complejo I mitocondrial provocando la generación de ROS y déficit de energía; sin embargo, esto no ocurre con la toxina paraquat, que a pesar de tener una estructura similar al MPTP se comporta de una manera distinta; esta toxina es reducida por el complejo I o II mitocondriales causando una peroxidación lipídica acelerada y producción de superóxido que provocan estrés oxidativo y disfunción mitocondrial (Keane y col., 2011).

### **1.2.3 Generación de especies oxigenadas y nitrogenadas reactivas mitocondriales en la enfermedad de Parkinson**

En condiciones fisiológicas, durante la transferencia de electrones a lo largo de los complejos de la CTE, algunos electrones se escapan y se produce la reducción del oxígeno molecular por un único electrón, lo que da como resultado la formación de anión superóxido. Se estima que aproximadamente el 1% de todo el oxígeno consumido puede derivar en la formación de ROS, como por ejemplo el superóxido (Fariss y col., 2005). Esto es especialmente importante en el cerebro, ya que este consume sobre el 20% del  $O_2$  suministrado al cuerpo, representando únicamente el 2% del peso corporal, lo que supone un elevado metabolismo si se compara con los demás órganos. La producción excesiva de ROS en el cerebro puede proporcionar una explicación de la magnitud del papel que desempeñan estas moléculas reactivas en la EP (Dias y col., 2013).

El complejo I y, en menor medida, el complejo III se consideran los lugares principales de producción de ROS en la mitocondria; ya que de ellos se liberan electrones a la matriz mitocondrial que, como ya se mencionó antes, reaccionan con el  $O_2$  para formar superóxido. Sin embargo, las mitocondrias en particular, y las células en general, tienen un sistema de defensa que neutraliza estas moléculas, por lo que el superóxido se convierte en  $H_2O_2$  por la enzima superóxido dismutasa mitocondrial (SOD2) y este a su vez en  $H_2O$  y  $O_2$  por la enzima catalasa. Por otro lado, en ciertas condiciones el  $H_2O_2$  puede reaccionar con iones metálicos, como el  $Fe^{2+}$ , y formar el radical hidroxilo, altamente tóxico, en una reacción conocida como reacción de Fenton (Subramaniam y Chesselet, 2013).

El aumento de la fuga de electrones, producido en condiciones patológicas, debido al bloqueo del movimiento de los electrones a lo largo de la cadena, conlleva a su vez un aumento de ROS que puede desencadenar en estrés oxidativo (Keane y col., 2011). Uno de los efectos de la liberación excesiva de ROS puede ser la formación de más ROS, por un mecanismo en el que puede estar involucrada la apertura del poro MPT, que potenciaría el estrés oxidativo celular (Stowe y Camara, 2009). En definitiva, el aumento de ROS, que no es neutralizado por las células, puede dañar prácticamente todas las macromoléculas biológicas incluidos los lípidos, las proteínas y el ADN, pudiendo provocar la muerte de la célula (Keane y col., 2011).

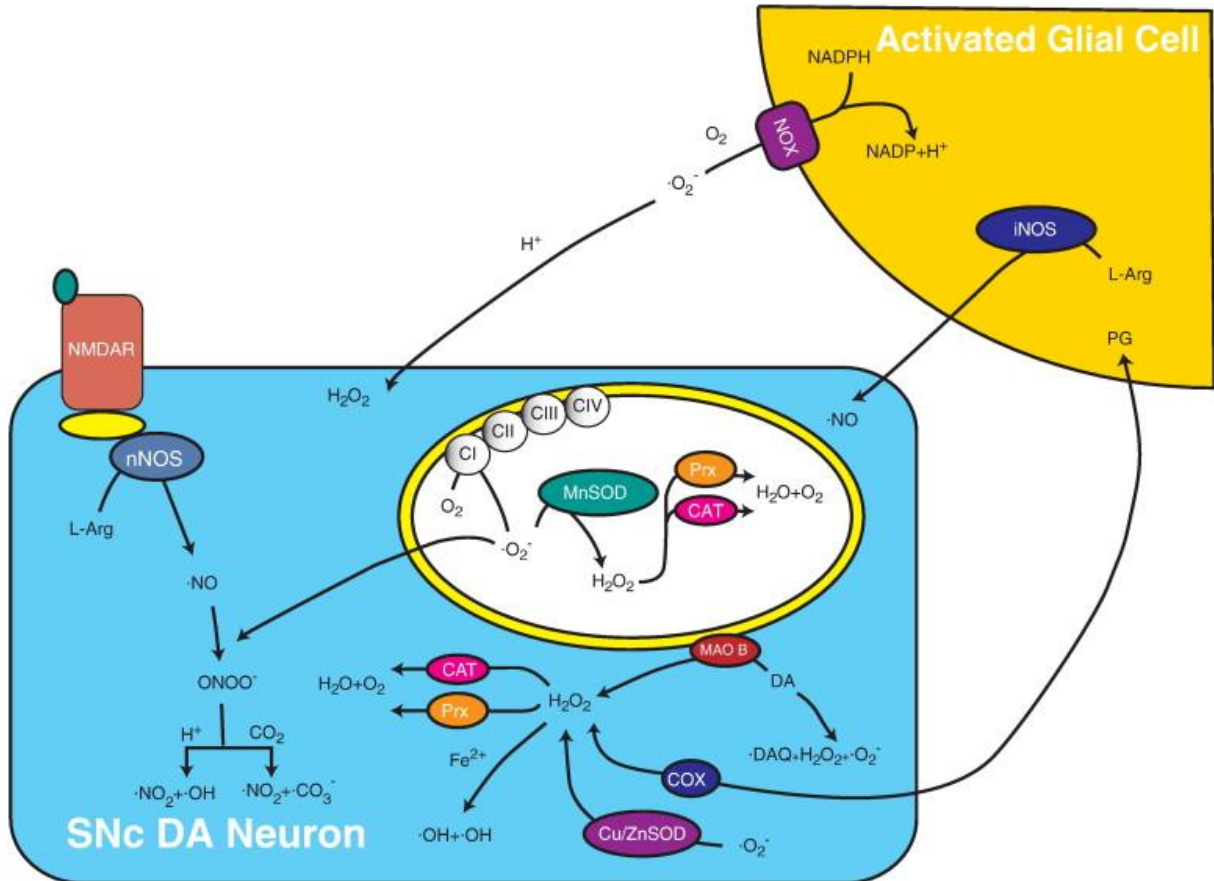
Defectos en la respiración mitocondrial, en particular a nivel de complejo I, se han asociado a la patogénesis de la EP. Varios estudios *post mortem* de pacientes con la EP han demostrado una disminución de la actividad del complejo I mitocondrial, no solo a nivel cerebral, sino también en plaquetas y músculo esquelético (Parker y col., 1989; Schapira y col., 1990). Además, líneas celulares creadas a partir de plaquetas de pacientes con la EP (cíbridos) también muestran una actividad reducida del complejo I mitocondrial (Swerdlow y col., 1996). Por otro lado, la mayoría de los pesticidas que están ligados epidemiológicamente al aumento en el riesgo de padecer la EP causan una disfunción del complejo I mitocondrial (Bertabet y col., 2000).

El estrés oxidativo suele definirse como el desequilibrio entre pro-oxidantes y antioxidantes en favor de los pro-oxidantes, el cual va acompañado de daño oxidativo (Jones, 2006). Existen pruebas sustanciales que sugieren que en todas las formas de la EP participa un desequilibrio redox que se atribuye a un exceso de producción de ROS o especies nitrogenadas reactivas (RNS, del inglés *Reactive Nitrogen Species*) que superan los mecanismos de defensa y protectores de las células (**Figura 1.4**). Sin embargo, no se ha establecido si el estrés oxidativo es un evento primario o una consecuencia de otros factores patogénicos; a pesar de esto, la producción excesiva de ROS o RNS es mediadora importante e incuestionable de la muerte celular en esta enfermedad (Berg y col., 2004).

Numerosos estudios *post mortem* de pacientes con la EP se observaron altos niveles de peroxidación lipídica, aumento de la oxidación de proteínas (Tsang y col., 2009), disminución de los niveles de glutatión reducido que se acompaña de un aumento de glutatión oxidado en la SN (Jomova y col., 2010). Asimismo, diferentes análisis de cerebros de pacientes con Parkinson revelan que no existen cambios en la actividad de la isoforma citosólica de la enzima SOD (SOD 1), mientras que se produce un aumento en la actividad de la isoforma mitocondrial (SOD 2), lo que determina que la SOD 2 es altamente inducible en respuesta a un exceso de ROS. A su vez, también se observó una disminución de la actividad de las enzimas catalasa y glutatión peroxidasa y en los niveles de ubiquinona (coenzima Q10) en cerebros de pacientes con la enfermedad (Zhou y col., 2008). Es interesante mencionar que algunas de estas señales de estrés oxidativo también se han encontrado en tejidos periféricos de individuos con la EP (Jomova y col., 2010).

Otra gran contribución al estrés oxidativo es el metabolismo del óxido nítrico (NO). El NO actúa en varias funciones celulares como una molécula de señalización para la vasodilatación y neurotransmisión. El NO se produce a partir del aminoácido L-arginina por la acción de la enzima NO sintasa (NOS). Durante la transducción de señales, el NO activa la guanilato ciclasa soluble para generar GMPc que actúa como segundo mensajero para inducir vasodilatación. Sin embargo, el NO a pesar de ser una importante molécula de señalización,

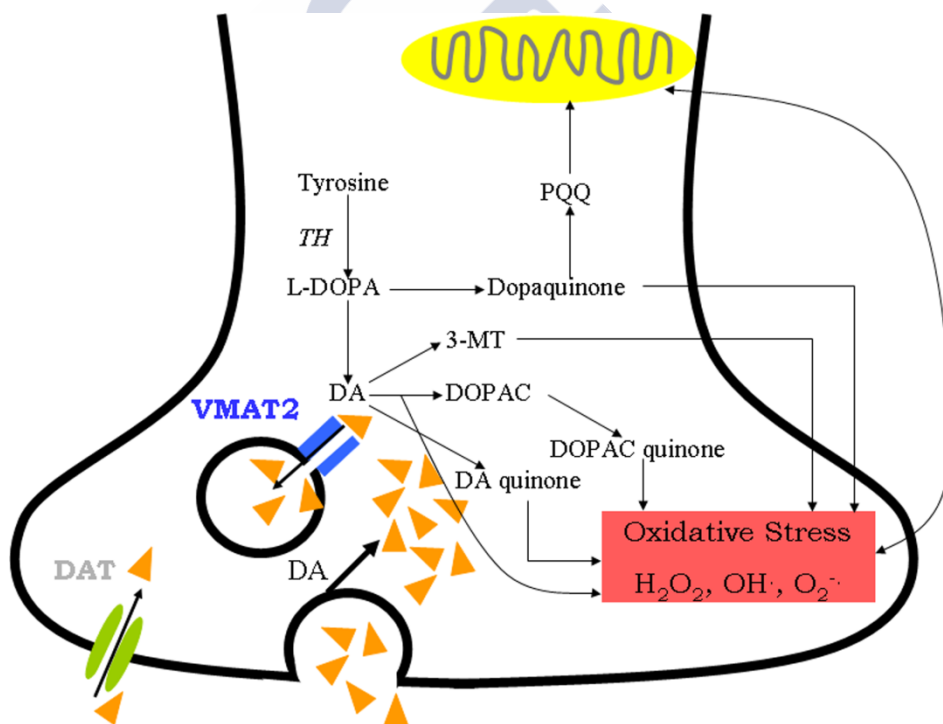
puede reaccionar con determinadas ROS, cuando se produce en exceso y la célula se encuentra en un estado pro-oxidativo, para formar RNS altamente tóxicas. Así, el NO puede reaccionar con el anión superóxido para formar peroxinitritos que pueden convertirse en otros productos intermedios altamente tóxicos como el dióxido de nitrógeno, el carbonato o los radicales hidroxilo. (Calabrese y col., 2007; Tsang y col., 2009).



**Figura 1.4. Generación de especies oxigenadas y nitrogenadas reactivas en neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra.** La pérdida de electrones de la cadena de transporte electrónica, especialmente de complejo I mitocondrial, conduce a una reducción parcial del oxígeno molecular para dar superóxido ( $\cdot\text{O}_2^-$ ) que es dismutado a peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) por la superóxido dismutasa (SOD).  $\text{H}_2\text{O}_2$  es luego convertido a  $\text{H}_2\text{O}$  y oxígeno por la catalasa (CAT) y peroxiredoxina (Prx). El  $\text{H}_2\text{O}_2$  en presencia de  $\text{Fe}^{2+}$  puede ser convertido a radical hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ) a través de la reacción de Fenton que es altamente reactivo. El catabolismo de la dopamina por la monoamina oxidasa (MAO) genera  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Además, la oxidación de la dopamina puede generar ROS. Bajo condiciones neuroinflamatorias, las células gliales se activan y generan ROS por la NADPH oxidasa (NOX) y NO por la óxido nítrico sintasa inducible (NOSi) y este puede difundir a las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra compacta (SNc) y contribuir al estrés oxidativo. (Con permiso de Elsevier; Tsang y col., 2009)

A pesar de que los cambios oxidativos ocurren también en otros tipos celulares del cerebro, las neuronas dopaminérgicas de la SN son más vulnerables a este daño, ya que son las que acaban degenerando. Existen evidencias de que la causa de esa alta vulnerabilidad de las neuronas dopaminérgicas de la SN es un alto nivel basal de estrés oxidativo. Como responsable principal de este alto nivel basal de estrés oxidativo estaría el metabolismo de la

dopamina, (**Figura 1.5**) a través de la MAO o de su autooxidación que producen ROS citosólicas y la consecuente formación de neuromelanina (Jenner, 2003). Asimismo, en la oxidación de la dopamina por la MAO, se generan  $H_2O_2$  y ácido dihidroxifenilacético (DOPAC). Por otro lado, durante la autooxidación de la dopamina se generan superóxido y quinonas reactivas que pueden modificar proteínas directamente (Miyazaki y Asanuma, 2008). Además, este  $H_2O_2$  puede convertirse en un radical altamente tóxico, el radical hidroxilo, a través de la reacción de Fenton en presencia de hierro, el cual se encuentra normalmente en altas concentraciones en las neuronas de la SN, secuestrado por la neuromelanina (Jenner, 2003). Otra característica que aumenta la vulnerabilidad de las neuronas dopaminérgicas de la SN es el mantenimiento de la homeostasis del  $Ca^{2+}$ , que se lleva a cabo a través de unos canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de ATP de tipo L (Cav1.3). Para transportar el  $Ca^{2+}$  a través de la membrana, estos canales permanecen más tiempo abiertos lo que provoca un aumento del consumo de ATP, que conlleva un aumento de la actividad de la CTE y por tanto, un aumento de la producción de ROS, lo que exagera la disfunción mitocondrial y hace que las neuronas dopaminérgicas sean más propensas a la muerte celular (Keane y col., 2011).



**Figura 1.5.** Metabolismo de la dopamina en el que se pueden generar especies oxigenadas reactivas, estrés oxidativo y disfunción mitocondrial. 3-MT, 3-Metoxitiramina; DA, dopamina; DAT, transportador de dopamina; DOPAC, ácido dihidroxifenilacético; L-DOPA, L-3,4 dihidroxifenilalanina; TH, tirosina hidroxilasa; VMAT3, transportador vesicular de monoaminas 2 (Permitido por PLOS; Qi et al., 2008)

## 1.3 SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA

### 1.3.1 Generalidades y componentes del sistema renina-angiotensina

El sistema renina-angiotensina (SRA) clásico constituye un sistema hormonal clave en la regulación fisiológica de la presión arterial y en el balance de fluidos. Estos efectos están coordinados a través de acciones integradas en el riñón, el sistema cardiovascular y el sistema nervioso central. La Ang II, la principal hormona biológicamente activa de este sistema, se produce por el corte secuencial de péptidos a partir de la molécula precursora, el angiotensinógeno. La renina es una enzima secretada a la circulación por las células yuxtglomerulares de la arteria aferente renal y es la encargada de cortar el angiotensinógeno producido principalmente en el hígado, en su extremo N-terminal, para formar el decapeptido inactivo, angiotensina I (Ang I) que a su vez es cortado por la enzima ECA para formar la Ang II. Finalmente, la Ang II se une a dos tipos principales de receptores, receptor de Ang II tipo 1 (AT1) y tipo 2 (AT2), con una afinidad similar para ejercer sus acciones biológicas (Sparks y col., 2014). (**Figura 1.6**).

**Receptores AT1:** la mayoría de las funciones cardiovasculares de la Ang II están mediadas a través de estos receptores. Los receptores AT1 pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteína G de siete pasos transmembrana y se expresa en varios tejidos como el cerebro, tejido vascular, corazón, riñón, entre otros. La activación de los receptores AT1 por la Ang II provoca vasoconstricción, reabsorción de  $\text{Na}^+$ , liberación de vasopresina y aldosterona, y activación simpática. La vía de señalización de la Ang II/AT1 más conocida es la activación de la fosfolipasa C que provoca la hidrólisis del fosfatidilinositol bifosfato formando inositol trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG). El IP3 provoca la liberación de calcio de los depósitos intracelulares y el DAG activa la proteína quinasa C (PKC). Sin embargo, este receptor también se ha ligado a otras vías de señalización como la quinasa Janus (JAK) y vías dependientes de la  $\beta$ -arrestina (Herichova y Szantoova, 2013). En ratas y ratones se han identificado dos subtipos de receptores AT1, los receptores AT1a y AT1b; ambos comparten el 95% de la secuencia aminoacídica, sin embargo, difieren en su distribución, localización cromosómica y regulación transcripcional (Sparks y col., 2014).

**Receptores AT2:** pertenecen también a la superfamilia de receptores de siete dominios transmembrana y presentan solo un 37% de homología con los receptores AT1. Estos receptores se expresan en gran cantidad durante el desarrollo fetal y disminuye después del nacimiento y queda restringida a las glándulas adrenales, riñón, útero, ovario, corazón y algunas regiones del cerebro; sin embargo, su expresión en el adulto puede ser inducible bajo condiciones patológicas como inflamación, isquemia, hipertensión y otras. A pesar de que las funciones de los receptores AT2 no son completamente conocidas, parece que contrarresta los efectos mediados por los receptores AT1 (Herichova y Szantoova, 2013). La señalización intracelular de los receptores AT2 está acoplada a  $G_{\alpha i2}$  y  $G_{\alpha i3}$  y su activación estimula la bradiquinina, NO y GMPc promoviendo la natriuresis y la bajada de la presión arterial (Sparks y col., 2014).

### 1.3.2 Nuevos componentes del sistema renina-angiotensina

En los últimos años, se han identificado varias enzimas, péptidos y receptores relacionados con el SRA que pone de manifiesto una gran complejidad del sistema. Entre estos nuevos componentes se encuentran el receptor de (pro)renina (PRR), la angiotensina 1-7 (Ang 1-7), el receptor Mas, la enzima convertidora de angiotensina 2 (ECA2), la angiotensina III (Ang III), la angiotensina IV (Ang IV), la angiotensina A (Ang A), la alamandina y su receptor, un subtipo del receptor Mas (MrgD, del inglés *Mas-Related G-coupled receptor D*).

Actualmente se reconoce que la renina existe en dos formas, la renina madura que puede romper activamente el angiotensinógeno, y la proenzima, prorenina que carece de actividad enzimática. En 2002, Nguyen y col. identificaron un receptor específico que une renina y prorenina llamado **PRR** que consiste en 350 aminoácidos y un solo dominio transmembrana. La unión de la prorenina/renina a este receptor tiene dos consecuencias el aumento de la actividad catalítica de la renina y la activación completa de la prorenina por un cambio conformacional, que deja expuesto su sitio catalítico. Además, la activación de este receptor desencadena una cascada de señales intracelulares, donde se encuentra involucradas MAP quinasas y ERK1/2 (Nguyen y col., 2002).

Hace algunos años se pensaba que la **Ang 1-7** era un producto biológicamente inactivo del catabolismo de la Ang II debido a la ausencia de efecto vasoconstrictor cuando era aplicada periféricamente y a la ausencia de respuesta dipsogénica o presora al administrarse de manera intraventricular. Sin embargo, en los años 80 se demostró que es tan potente como la Ang II en estimular la liberación de vasopresina (Ferrario y col., 1991).

Existen varios mecanismos o rutas por los que se puede formar la Ang 1-7 y en los que pueden intervenir diferentes y numerosas enzimas. Endopeptidasas específicas de tejidos como la neprililina (NEP) pueden actuar hidrolizando la Ang I y formar Ang 1-7. Otras enzimas como la **ACE2**, PCP y POP pueden generar Ang 1-7 a partir de la Ang II y se ha observado que la enzima ACE2 es hasta cien veces más eficiente en este proceso que PCP y POP. Otra fuente de Ang 1-7 puede ser la Ang 1-12, que contiene los doce primeros aminoácidos de la parte N-terminal de la secuencia del angiotensinógeno. La generación de Ang 1-12 se produce probablemente por una vía independiente de renina y aparentemente en condiciones de supresión o baja actividad de la renina. La Ang 1-12 puede ser hidrolizada por la acción de ACE y formar Ang II o por la acción de la NEP y formar Ang 1-7; esta última vía se ha demostrado únicamente en riñón (Gironacci, 2015; Santos y col., 2000)(**Figura 1.6**).

**Receptor Mas:** es un receptor de siete dominios transmembrana con características propias de los receptores acoplados a proteínas G, está ampliamente distribuido y actúa a través de múltiples señales para inducir vasorelajación, y efectos antiinflamatorios, antiproliferativos y antifibróticos (Savergnini y col., 2010). Se describió por primera vez en 1986 y se consideró un receptor huérfano hasta que en el año 2003 Santos y col. demostraron que la Ang 1-7 es su ligando endógeno (Santos y col., 2003) estableciéndose el eje ACE2/Ang 1-7/receptor Mas como un nuevo brazo del SRA. Las vías de señalización más importantes del receptor Mas son la que involucra a la fosfolipasa A para generar ácido araquidónico y la que activa la fosfoinositol 3 quinasa (PI3K) y AKT para activar la enzima NOS (Bader y col., 2014).

El eje Ang 1-7/receptor Mas es funcionalmente activo en muchos órganos incluido el corazón, vasos sanguíneos, riñón, tejido adiposo y cerebro y juega un papel importante en la

regulación cardiovascular, renal y neuronal e influye en el metabolismo de glucosa y lípidos. Los efectos de la Ang 1-7, a través del receptor Mas, son opuestos a los observados para la Ang II y contrarresta la mayoría de las acciones perjudiciales del eje Ang II/AT1 (Iwai y Horiuchi, 2009).

La Ang II también es susceptible a la degradación por la aminopeptidasa A formándose la **Ang III**, la cual se considera un análogo, aunque menos potente, de la Ang II ya que ejerce efectos similares a esta a través de los receptores AT1 y AT2. A partir de la Ang III y por la acción de la aminopeptidasa B o N se forma la **Ang IV** (Jones E. y col., 2008), que se ha sugerido que ejerce sus efectos a través de los receptores AT4 que son farmacológicamente distintos a los receptores AT1 y AT2; sin embargo, se ha identificado recientemente como sitio de unión para la Ang IV la aminopeptidasa regulada por insulina (IRAP) que induce la liberación de NO y promueve efectos antiinflamatorios y antifibróticos (Mascolo y col., 2017)

Finalmente, se ha descrito recientemente, por Jankowski y col. (Jankowski y col., 2007), otro nuevo componente, un octapéptido denominado **Ang A** que es muy similar a la Ang II, solo difieren en el extremo N-terminal. Este péptido tiene la misma afinidad por los receptores AT1 y AT2 que la Ang II, y puede ser hidrolizado por la enzima ACE2 para formar la alamandina (Villela y col., 2014). La **alamandina** es un heptapéptido muy relacionado con la Ang 1-7, con solo un aminoácido de diferencia (el primer aminoácido de la Ang 1-7 es el aspartato y el de la alamandina es la alanina; Qaradakhi y col., 2016). Otra ruta por la que puede formarse la alamandina es por la descarboxilación de la Ang 1-7 (**Figura 1.6**). La alamandina actúa a través del receptor **MrgD**, que pertenece a la gran familia de receptores acoplados a proteínas G, de siete pasos transmembrana y está relacionado con el receptor Mas. Tiene acciones protectoras parecidas a la Ang 1-7, debido quizás a sus similitudes estructurales (Etelvino y col., 2014).

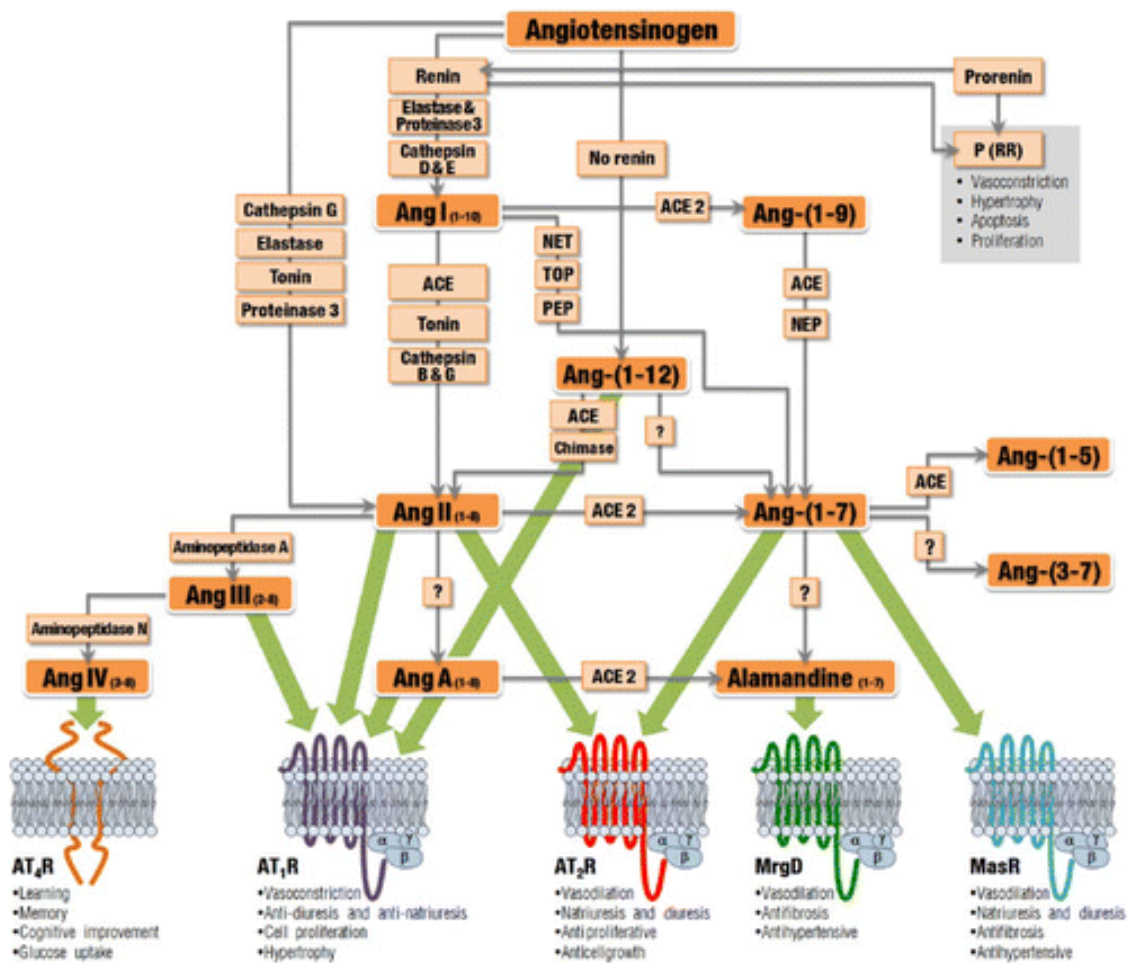


Figura 1.6. Esquema de los componentes del sistema renina-angiotensina (Permitido por SAGE publications; Gironacci, 2015).

### 1.3.3 Sistema renina-angiotensina tisular. Sistema renina-angiotensina cerebral

La complejidad del SRA ha aumentado recientemente con el descubrimiento de sub-sistemas en diferentes tejidos, los cuales actúan a nivel local independiente del sistema endocrino. El **SRA local o tisular** se define por la síntesis de Ang II dentro de los tejidos, a partir de angiotensinógeno y enzimas producidas localmente. El SRA local puede utilizar otras enzimas diferentes a la renina y ECA para la síntesis de Ang II. La Ang II sintetizada puede actuar sobre las células vecinas y estas acciones de la Ang II se llaman efectos autocrinos/paracrinos. La regulación del SRA tisular es independiente del SRA circulante, pero también puede interactuar con este último y se ha encontrado que ejerce efectos diferentes a los clásicos. Se han encontrado SRA locales en diversos tejidos como el riñón, corazón, cerebro, vasos sanguíneos, páncreas, glándula adrenal y tejido adiposo (Re, 2004; Unger y col., 1991).

Las primeras evidencias de la existencia de un **SRA cerebral** proceden de experimentos en los que administrando Ang II directamente en el sistema ventricular del sistema nervioso

central o en un núcleo cerebral particular, se provocaron profundos efectos cardiovasculares y dipsogénicos que sugirieron la existencia de un sistema de procesamiento de Ang II dentro de la barrera hematoencefálica. Posteriormente, se demostró que en el cerebro se sintetizan todos los componentes del SRA necesarios para la producción y acción de la Ang II ya que los componentes activos del sistema, particularmente la Ang II, no cruzan la barrera hematoencefálica (Davisson, 2003; Wright y Harding, 2013). Curiosamente, se ha observado que los niveles de Ang II en el cerebro son mucho mayores que los niveles circulantes y que su precursor, el angiotensinógeno, es sintetizado principalmente por los astrocitos, aunque también se produce a bajos niveles en neuronas (Labandeira-Garcia y col., 2014).

Las funciones del SRA cerebral fueron relacionadas con los efectos del SRA circulante incluyendo la regulación del equilibrio hídrico corporal y la sed, mantenimiento de la presión arterial, liberación de vasopresina, entre otras (Davisson, 2003; Wright y Harding, 2013). Sin embargo, este sistema ha sido implicado en funciones adicionales como la regulación del flujo sanguíneo cerebral, cerebroprotección, estrés, depresión y con un papel en la etiología de enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer y Parkinson (Labandeira-Garcia y col., 2014; Wright y Harding, 2013), siendo esta última el tema principal de esta tesis.

Varios estudios han demostrado la presencia de los principales componentes del SRA en los ganglios basales, concretamente en el sistema nigro-estriatal, que, como se mencionó anteriormente, es la zona del cerebro involucrada en la EP. Se ha probado la presencia de los principales receptores de Ang II, AT1 y AT2, así como de la enzima ECA, en neuronas y células gliales de la SN y ST de roedores, primates y humanos (Garrido-Gil y col., 2017, 2013). Además, se ha demostrado la existencia de las diferentes subunidades de membrana y citoplasmáticas del complejo NADPH oxidasa en neuronas dopaminérgicas, astrocitos y microglia mesencefálicos (Rodríguez-Pallares y col., 2007, 2008). Todo esto demuestra la existencia de un SRA local nigroestriatal.

Curiosamente, el marcaje de los receptores AT1 y AT2, así como de angiotensinógeno y de PRR, además de encontrarse en la membrana plasmática, también se observó a nivel intracelular, lo que sugiere la existencia de un tercer nivel del **SRA, intracelular o intracrino** en neuronas dopaminérgicas (Garrido-Gil y col., 2013), que es objeto de estudio en esta tesis. Se ha propuesto la existencia de un SRA intracelular en otros tipos celulares, que se caracterizaría por la síntesis y acciones de la Ang II dentro de la célula (Kumar y col., 2012). Se sabe que varios receptores transmembrana se acumulan en la membrana nuclear, además los cardiomiocitos poseen receptores de Ang II acoplados a las vías de señalización nuclear regulando de esta manera la transcripción (Eggena y col., 1996). La Ang II puede actuar intracelularmente por la unión a los receptores AT1 y posterior internalización, descrita ya en numerosos tipos celulares, o puede ser sintetizada dentro de la célula, como se ha descrito para células cardíacas (Baker y col., 2004) y que podría estar ocurriendo en neuronas dopaminérgicas como sugiere la localización intracelular del PRR (Garrido-Gil y col., 2013).

### **1.3.4 Sistema renina-angiotensina y enfermedad de Parkinson**

Numerosos estudios sugieren que la neuroinflamación y el estrés oxidativo juegan un papel fundamental en la progresión de la EP, y el SRA está involucrado muy directamente con la iniciación y la progresión de la inflamación y el daño oxidativo en varios tejidos.

Se ha demostrado que el aumento de la producción de Ang II local en condiciones anormales provoca estrés oxidativo e intensifica la inflamación mediante la activación del complejo enzimático NADPH oxidasa que, junto con la mitocondria, son los mayores productores de ROS de la célula. Además, se sabe que la NADPH oxidasa media varios aspectos clave del estrés oxidativo y procesos inflamatorios involucrados en enfermedades relacionadas con la edad como la hipertensión, diabetes y aterosclerosis (Labandeira-Garcia y col., 2013). La activación de los receptores AT1 por la Ang II también puede provocar la estimulación de la vía de señalización de NF-KB facilitando la síntesis de quimiocinas, citoquinas y moléculas de adhesión, muy importante en la migración de células inflamatorias a las regiones donde existe daño tisular (Okamura y col., 1999).

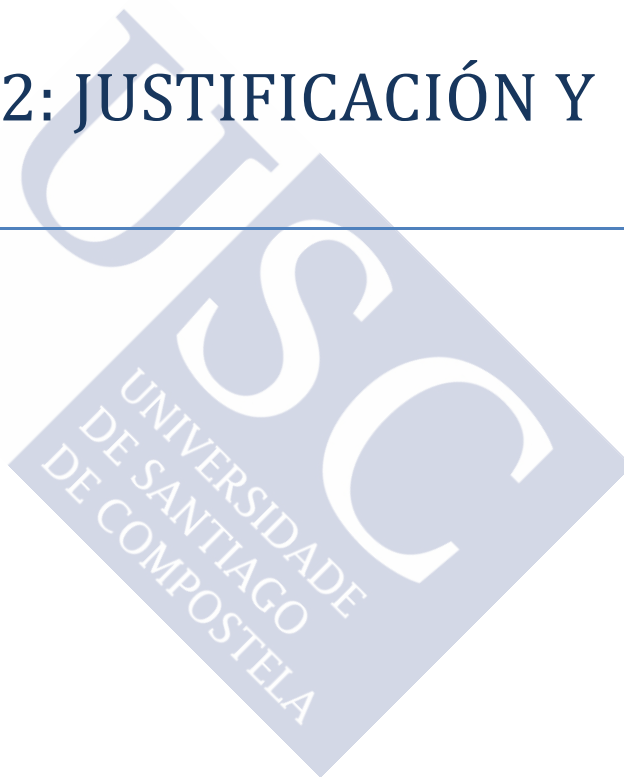
Numerosos estudios realizados en nuestro laboratorio muestran una relación entre el SRA y la dopamina en el sistema nigroestriatal. La reducción de dopamina produce un aumento en la expresión de AT1, AT2 y del complejo NADPH oxidasa que se reduce cuando los niveles de dopamina se restablecen. Por otro lado, el tratamiento crónico con antagonistas de AT1 provocan cambios compensatorios en el sistema dopaminérgico que normalizan los niveles de dopamina estriatales (Villar-Cheda y col., 2010). Se ha observado también una protección de estos inhibidores en la degeneración dopaminérgica en modelos animales de MPTP y 6-OHDA, ya que las ROS derivadas de la NADPH oxidasa disminuye tras la administración de estas neurotoxinas (Grammatopoulos y col., 2007; Joglar y col., 2009; Mertens y col., 2011). Previamente se había observado un aumento de la muerte de neuronas dopaminérgicas en ratas lesionadas con 6-OHDA tratadas con Ang II (Rodríguez-Pallares y col., 2008).

Existen otros estudios que corroboran la relación de la EP con el SRA. En el año 2002 se observó en Taiwan una asociación entre polimorfismos genéticos del gen ECA y la EP (Lin y col., 2002). Por otra parte, se encontró un incremento de la actividad de ECA en el líquido cefalorraquídeo de pacientes con EP (Konings y col., 1994). Además, pacientes con EP que fueron tratados con un inhibidor de ECA mostraron mejores respuestas motoras a la L-DOPA (Reardon y col., 2000). También se ha visto que los inhibidores de ECA ofrecen mayor protección contra la pérdida de neuronas dopaminérgicas en modelos animales de MPTP y 6-OHDA, ya que se produce una disminución de la síntesis de Ang II que conlleva una menor activación de los receptores AT1 (Lopez-Real y col., 2005; Muñoz y col., 2006), así como un aumento de los niveles de dopamina (Jenkins y col., 1997).

En definitiva, la activación local del SRA cerebral está involucrada en la potenciación del estrés oxidativo y neuroinflamación, que lleva a la progresión de la degeneración dopaminérgica y EP. Además, existe un aumento en la actividad del SRA en la SN de animales con alta vulnerabilidad a la degeneración de neuronas dopaminérgicas, como en ratas envejecidas, hembras menopáusicas o ratas sujetas a hipoperfusión cerebral crónica. Por lo tanto, el aumento de la actividad del SRA puede constituir un factor importante en el riesgo de desarrollar EP (Labandeira-Garcia y col., 2012).

# CAPÍTULO 2: JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

---





## 2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

A) La neuroinflamación y el estrés oxidativo son características fundamentales de la enfermedad de Parkinson (EP). Numerosos estudios, muchos de ellos realizados en nuestro laboratorio, demuestran que el sistema renina-angiotensina (SRA) está directamente relacionado con la iniciación y la progresión de la inflamación y el daño oxidativo que lleva a la progresión de la degeneración dopaminérgica y EP (revisado en Labandeira-Garcia y col., 2014, 2013).

La patogénesis de la EP ha sido asociada con defectos en la respiración mitocondrial, en particular a nivel de complejo I. Varios estudios *post mortem* de pacientes con la EP han demostrado una disminución de la actividad del complejo I mitocondrial Schapira y col., 1990. Por otro lado, la mayoría de los pesticidas que están ligados epidemiológicamente al aumento en el riesgo de padecer EP causan una disfunción del complejo I mitocondrial (Bertabet y col., 2000).

Varios estudios han demostrado la presencia de los principales componentes del SRA en los ganglios basales, concretamente en el sistema nigro-estriatal. Curiosamente, el marcaje de los receptores AT1 y AT2, así como de angiotensinógeno y del receptor de (pro)renina (PRR), además de encontrarse en la membrana plasmática, también se observó a nivel intracelular, lo que sugiere la existencia de un tercer nivel del SRA, intracelular o intracrina en neuronas dopaminérgicas (Garrido-Gil y col., 2013).

Hasta el momento se desconoce la existencia de un SRA intracelular a nivel mitocondrial y nuclear en neuronas; y si podría tener alguna implicación en la disfunción mitocondrial que ocurre en la EP o actuando a nivel nuclear influyendo en la transcripción de genes.

Para clarificar los aspectos anteriormente mencionados nos planteamos los objetivos 1-5.

B) Recientemente, se han postulado dos brazos diferentes del SRA: un brazo perjudicial (es decir, pro-oxidativo y pro-inflamatorio) constituido por el eje Ang II/AT1 y el eje (Pro)renina/PRR y un eje protector constituido por el eje Ang II/AT2 y el eje angiotensina 1-7 (Ang 1-7)/receptor MAS (Fraga-Silva y col., 2013; Labandeira-Garcia y col., 2017). Hace algunos años, describimos en nuestro laboratorio y por primera vez la presencia de PRR en neuronas dopaminérgicas de la SN y células microgliales de ratas, monos y humanos (Garrido-Gil y col., 2017b, 2013; Valenzuela y col., 2010). Sin embargo, no se sabe nada sobre el eje Ang1-7/receptor Mas en el sistema dopaminérgico y su posible papel neuroprotector. En especial no hay datos sobre su presencia y posible papel a nivel mitocondrial y nuclear. Para clarificar este tema nos planteamos los objetivos 6-9.

Por todo ello planteamos los siguientes **OBJETIVOS**:

1. Investigar la presencia de los principales receptores de angiotensina II, AT1 y AT2, en mitocondrias cerebrales, concretamente en mitocondrias de la sustancia negra, y sus efectos sobre la función mitocondrial.
2. Estudiar el efecto del envejecimiento y el estrés oxidativo en la expresión de los receptores de angiotensina II mitocondriales.
3. Examinar la posible localización y efectos de los receptores AT1 y AT2 en núcleos celulares en el sistema nervioso central, especialmente en la sustancia negra.
4. Estudiar el efecto de la activación de los receptores nucleares sobre la transcripción de otros componentes del sistema renina-angiotensina y de varias proteínas que regulan la función mitocondrial y el mecanismo implicado en este proceso.
5. Estudiar el efecto del envejecimiento en la activación de los receptores de angiotensina II nucleares.
6. Localizar el eje angiotensina 1-7/receptor Mas en la sustancia negra de distintos modelos animales y caracterización de los tipos celulares que lo expresan.
7. Estudiar el efecto del envejecimiento y de las alteraciones del sistema renina-angiotensina sobre el eje angiotensina 1-7/receptor Mas en la sustancia negra de modelos animales.
8. Estudiar el efecto de la angiotensina 1-7 en los cambios metabólicos y oxidativos inducidos por angiotensina II en neuronas dopaminérgicas.
9. Investigar la posible presencia del eje angiotensina 1-7/receptor Mas en mitocondrias y núcleos de la sustancia negra, y de distintos tipos de células cerebrales y su papel en la producción de especies oxigenadas reactivas y óxido nítrico mitocondrial y nuclear.

# CAPÍTULO 3: MATERIAL Y MÉTODOS

---





## 3. MATERIAL Y MÉTODOS

### 3.1 MODELOS

#### 3.1.1 Modelos animales

Para la realización de este estudio se emplearon diferentes modelos animales tales como:

- Ratas macho Sprague-Dawley jóvenes (8-10 semanas de edad) y envejecidas (18-20 meses de edad).
- Ratonos macho de la cepa FVB jóvenes de tipo salvaje y *knock-out* (KO) para el receptor AT2.
- Ratonos macho de la cepa C57BL/6 de tipo salvaje y KO para el receptor AT1a (la principal isoforma de AT1 en ratones, y el homólogo murino más cercano al AT1 humano; Jackson Laboratory, Ba Harbor, ME), y para el receptor AT2 jóvenes (8-10 semanas de edad) y envejecidos (18-20 meses de edad).
- Ratonos macho de la cepa C57BL/6 transgénicos jóvenes y viejos, en los que la SIRT1 está sobreexpresada moderadamente, bajo su propio promotor, siguiendo así el patrón fisiológico de expresión (Pfluger y col. 2008).
- Primates no humanos *Macaca fascicularis* machos adultos (4,5 años; peso corporal de 3,8 a 4,5 kg).
- Cortes histológicos de cerebro humano (hombres adultos; 33,75 ± 6,4 años).

Todos los animales usados en este estudio fueron machos, ya que previamente se demostró que los estrógenos regulan el SRA y contribuyen a la diferencia de género en la degeneración dopaminérgica que ha sido observada en modelos animales y en datos epidemiológicos (Rodríguez-Perez y col., 2011, 2012, 2010). El número de muestras de los diferentes animales usados en cada experimento (*n*) se detalla en el correspondiente pie de figura.

Los experimentos con roedores se llevaron a cabo en conformidad con la Directiva 2010/63/EU y la Directiva 86/609/CEE y el Real Decreto español RD 53/2013 y fueron aprobados por la comisión correspondiente de la Universidad de Santiago de Compostela. El centro de usuario autorizado en la que se realizó el trabajo fue la Facultad de Medicina de la Universidad de Santiago de Compostela con el número de registro REGA: ES150780263401. El número de autorización del proyecto de experimentación animal bajo el que se realizó la tesis es 15005/15/002. Los animales se estabularon a temperatura ambiente (RT, del inglés *Room Temperature*) constante (21-22 °C) y ciclos de luz/oscuridad de 12 horas. Todas las cirugías se realizaron bajo anestesia con

ketamina/xilacina. La manipulación de los roedores se llevó a cabo por el equipo técnico del grupo de investigación autorizado. La manipulación de los primates no humanos se llevó a cabo en colaboración con el departamento de Neurociencia del Centro de Investigación Médica Aplicada (CIMA) de la Universidad de Navarra, en conformidad con la Directiva 86/609/CEE del Consejo Europeo y con la Sociedad de Política de Neurociencias sobre el Uso de Animales en la Investigación de Neurociencia. El diseño experimental para los ensayos con monos fue aprobado por el Comité Ético para la Experimentación Animal de la Universidad de Navarra (ref: 019/2008) y por el Departamento de Salud del Gobierno de Navarra (ref: NAUNAV-04-08). Las muestras humanas *post mortem* se obtuvieron del Banco de Tejidos Neurológicos de Navarra (Hospital de Navarra, Pamplona, España). Los cerebros se diseccionaron en las autopsias de donantes que habían dado su consentimiento informado de acuerdo con el Programa de Donación de Cerebro del Gobierno de Navarra (Directiva de Gobierno 23/2001). Las muestras se obtuvieron de cuatro hombres adultos ( $33,75 \pm 6,4$  años) sin antecedentes ni indicios histológicos de ninguna enfermedad neurológica. Después de la autopsia, se obtuvieron secciones de cerebro, que incluían el mesencéfalo ventral (MV), se congelaron inmediatamente a  $-80$  °C y se almacenaron hasta su procesamiento. Los tiempos *post mortem* variaron de 2,5 a 6 horas.

### 3.1.2 Modelos celulares

#### Cultivos primarios mesencefálicos

Se diseccionó el tejido del MV de embriones de rata de 14 días de gestación (E14). El tejido se incubó en tripsina al 1% (Sigma, St. Louis, MO, USC) DNasa al 0,05% (Sigma) y DMEM (Invitrogen, Paisley, Escocia, UK) durante 20 minutos a 37 °C, luego se lavó en DNasa/DMEM y se disoció mecánicamente. La suspensión celular resultante se centrifugó a 50g durante 5 minutos, el sobrenadante se eliminó cuidadosamente, y el pellet se resuspendió en DNasa/DMEM al 0,05% del volumen final requerido. Las células se sembraron en placas de cultivo de 35-mm (Falcon; Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) recubiertas previamente con poli-L-lisina (100 µg/ml; Sigma) y laminina (4 µg/ml; Sigma), a una densidad de  $1,5 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup> y se mantuvieron bajo condiciones control (DMEM/HAMS F12/(1:1) con suero fetal bovino al 10% (FBS, del inglés *Fetal Bovine Serum*; Biochrom KG, Berlín, Alemania). Los cultivos celulares se mantuvieron en un incubador humidificado de CO<sub>2</sub> (5% de CO<sub>2</sub>; 37 °C) durante 8 días; el medio de cultivo se reemplazó por completo al segundo día por medio de cultivo fresco.

#### Cultivos de líneas celulares

**Las células dopaminérgicas MES 23.5** fueron cedidas amablemente por el Dr. Wei-Dong Le (Baylor College of Medicine, Houston, TX, USA). Se sembraron en DMEM/F12 que contenía medio de crecimiento con componentes Sato (insulina, transferrina, ácido pirúvico, putrescina, selenito sódico y progesterona) suplementado con 2% de FBS, 100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin. Las células MES 23.5 se sembraron en superficies previamente recubiertas con poli-L-lisina (Sigma; 10 mg/ml) (Crawford y col., 1992).

**Las células dopaminérgicas N27** (SCC048, Millipore, MA, USA) se sembraron en medio RPMI 1640 suplementado con 10% de FBS, 2 mM de L-glutamina, 100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin.

**Las células astrogliales C6** (92090409, Sigma) se sembraron en medio Ham's F12 con 10% de FBS, 2mM de L-glutamina (Sigma), 100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina.

**Las células microgliales N9** fueron proporcionadas amablemente por la Dra. Paola Ricciardi-Castagnoli (Singapore Immunology Network, Agency of Science, Technology and Research, Singapur) se sembraron en medio RPMI 1640 (Invitrogen) suplementado con 10% de FBS, 2 mM de L-glutamina, 100 unidades/ml de penicilina y 10 µg/ml de estreptomicina.

Los cultivos se mantuvieron a 37 °C en un incubador de CO<sub>2</sub> humidificado (5% de CO<sub>2</sub>, 95% de humedad). Las células se sembraron en placas de cultivo de 35-mm y/o placas de 8 pocillos para tratamientos y/o análisis.

### **Cultivos dopaminérgicos derivados de células madre pluripotentes inducidas humanas**

Las líneas de células madre pluripotentes inducidas (iPSC, del inglés *Induced Pluripotent Stem Cells*) humanas SP11#1 y SP08#1, derivadas y caracterizadas previamente (Sanchez-Danes y col., 2012), se obtuvieron del Banco Nacional de Líneas Celulares (BNLC). El número de autorización del proyecto para el uso de células pluripotenciales humanas bajo el que se realizó la tesis es 270 213 2. Las células madre pluripotentes indiferenciadas se expandieron en condiciones sin nutrientes como se describió previamente (Xu y col., 2001). Las células dopaminérgicas se obtuvieron por diferenciación progresiva de las células madre pluripotentes como se describió anteriormente (Zhang y col., 2014). Las colonias de iPSC se disociaron y se sembraron células individuales en placas recubiertas con Matrigel. Se usaron los siguientes compuestos, SB231542 (10 µM; Tocris, Bristol, UK) y LDN193189 (100 nM; Sigma), para inducir la diferenciación neuronal. FGF-8 (50 ng/ml; PeproTech, Londrés, UK), SHH (100 ng/ml; Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania) y purmorfamina (2 µM; Tocris) se usaron como factores de diferenciación a partir del día 1 y CHIR99021 (3 µM; Sigma) desde el día 3. La maduración comenzó el día 11 cambiando el medio a neurobasal con B27 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), ácido ascórbico (Sigma), dibutilil AMPc (Sigma), DAPT (Sigma), factor neurotrófico BDNF (PetroTech), GDNF (PetroTech) y TGFβ (PetroTech). Treinta días después de empezar la diferenciación, las células se pasaron a cubreobjetos recubiertos de poliornitina/fibronectina/laminina (Sigma) en placas de 12 pocillos donde las células completaron su maduración antes de la fijación y procesamiento para el marcaje inmunofluorescente.

### **Células dopaminérgicas de la sustancia negra de rata aisladas por microdissección por captura láser**

Se aislaron neuronas dopaminérgicas individuales procedentes de secciones de la sustancia negra (SN) de rata usando el método de microdissección por captura láser (LCM), previamente descrito (Garrido-Gil y col., 2017a), con pequeñas modificaciones. Las ratas se sacrificaron por decapitación, se extrajeron los cerebros y rápidamente se embebieron en O.C.T. Tissue-Tek (Sakura, Alphen aan den Rijn, Holanda), se congelaron en nitrógeno líquido y se guardaron a -80 °C. El cerebro se cortó en secciones coronales que contenían SN con un criotomo, se montaron en portaobjetos libres de RNasa y se guardaron a -80 °C en tubos Falcon estériles con gel de sílice. Luego, la serie de secciones que contenía SN se procesó para una inmunofluorescencia rápida con el anticuerpo contra tirosina hidroxilasa (TH; 1:100; Sigma) para marcar las neuronas dopaminérgicas. Se llevó a cabo LCM con un sistema PALM MicroBeam (Zeiss), y las neuronas dopaminérgicas se catapultaron a una tapa adhesiva. Estas células (1.000 neuronas dopaminérgicas por animal) se usaron para la

extracción de ARN usando el kit RNeasy Micro (Qiagen, Hilden, Alemania) siguiendo las instrucciones de los fabricantes.

### 3.1.3 Orgánulos aislados

#### Aislamiento de mitocondrias

Las mitocondrias se aislaron y purificaron, de cerebro entero y SN de rata y ratón, de acuerdo con el protocolo descrito por Sims y Anderson (Sims y Anderson, 2018), con algunas modificaciones. Este protocolo combina centrifugación diferencial y centrifugación en un gradiente de densidad de Percoll (Sigma) con el objetivo de aislar mitocondrias puras con escasa contaminación de sinaptosomas y mielina. Se extrajeron los cerebros o SN de rata o ratón y se lavaron con tampón de aislamiento frío (0,32 M de sacarosa, 1mM de EDTA y 10 mM de TRIS; pH 7,4). El tejido se cortó en pequeños trozos, se transfirió a un homogeneizador Dounce con solución de Percoll al 12%, y luego se homogenizó en hielo usando un mortero de vidrio holgado y otro más ajustado. El homogenado se añadió lentamente encima de un gradiente discontinuo de Percoll preparado previamente, que consistía en una capa de Percoll al 26% encima de otra capa de Percoll al 40% y se centrifugó (ultracentrífuga Beckman XL-90, Brea, CA, USA) usando un rotor de ángulo fijo a 30700g durante 5 minutos a 4 °C. La fracción enriquecida en mitocondrias, se aisló de la interfase entre las capas de Percoll del 26% y del 40% con una pipeta Pasteur de cristal. La fracción mitocondrial se lavó con un exceso de tampón de aislamiento y se centrifugó nuevamente a 16700g durante 10 minutos a 4 °C. Finalmente, se concentró mediante centrifugación a 7300g durante 10 minutos a 4 °C, donde se obtuvo un *pellet* de mitocondrias puras que se empleó para Western blot (WB) y ensayos funcionales.

#### Aislamiento de núcleos

Los núcleos intactos se aislaron y purificaron tanto de cerebro entero y SN de rata y ratón como de la línea celular de neuronas dopaminérgicas MES 23.5. Todos los procedimientos del aislamiento se llevaron a cabo en hielo o a 4 °C. Los cerebros, SN o células MES 23.5 se lavaron con tampón de aislamiento A (320 mM de sacarosa, 3 mM de MgCl<sub>2</sub> y 20 mM de TRIS, pH 7,4) frío. Los cerebros se cortaron y se homogenizaron en tampón A con un homogeneizador de cristal. El homogenado se centrifugó durante 15 minutos a 1000g a 4 °C. El sobrenadante se eliminó y el *pellet* se resuspendió en 4 ml de tampón B (2,2 M de sacarosa, 1 mM de MgCl<sub>2</sub> y 10 mM de TRIS, pH 7,4) que se centrifugó durante 60 minutos a 60.000g (ultracentrífuga Beckman XL-90) usando un rotor basculante a 4 °C. Después de la centrifugación, el *pellet*, que contenía los núcleos aislados, se resuspendió y se lavó por centrifugación con 2 ml de tampón A. Para confirmar la integridad de los núcleos frescos aislados, se visualizaron sin fijación en un microscopio de contraste de fases inmediatamente después del aislamiento. Los núcleos también se tiñeron, en un portaobjetos de cristal, con el marcador fluorescente nuclear Hoechst 33342 (10 µg/ml; Sigma) y se examinaron usando un microscopio invertido de fluorescencia (Nikon Eclipse TE300, Tokio, Japón). Para el análisis por WB, los núcleos aislados se procesaron usando el Kit de Extracción Nuclear (Active Motif, CA, USA) para eliminar el ADN y conservar solo las proteínas nucleares.

El contenido proteico de los núcleos y mitocondrias aislados se determinó con el Kit de Ensayo de proteína Pierce BCA (Thermo Scientific, Fremont, CA, USA). La pureza de los núcleos y mitocondrias aislados se confirmó por la ausencia de otros marcadores de compartimento celular: canal de anión dependiente de voltaje (VDAC) como marcador

mitocondrial, histona desacetilasa 2 (HDAC) como marcador nuclear,  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa como marcador de membrana plasmática, y  $\alpha$ -tubulina como marcador de citosol (Ver **Tabla 3**).

### **3.2 DETECCIÓN DE PROTEÍNAS**

#### **3.2.1 Marcajes fluorescentes**

##### **Marcaje mitocondrial y nuclear**

Con el objetivo de estudiar la presencia de los receptores AT1, AT2 y Mas a nivel mitocondrial y nuclear, cultivos primarios y de diferentes líneas celulares se incubaron con sondas fluorescentes para marcar mitocondrias y núcleos. Se utilizó MitoTracker Deep Red (MTDR; 20 nM; Molecular Probes, Eugene, OR, USA) para marcar las mitocondrias y Hoechst 33342 (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), colorante que se une al ADN, para marcar los núcleos. Después del marcaje con MTDR y antes del marcaje con Hoechst 33342, se fijaron las células con paraformaldehído al 4% en solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (pH 7,4) durante 20 minutos, para su posterior procesado por inmunofluorescencia.

##### **Trazador retrógrado**

Varios grupos experimentales de ratas Sprague-Dawley machos jóvenes y envejecidas se usaron para estudios de LCM. Las ratas recibieron tres inyecciones intraestriales con *retrobeads* rojos (0,5  $\mu\text{l}$ /inyección; Lumafluor Inc., Durham, NC, USA) bajo anestesia con ketamina/medetomidina. El trazador fue inyectado con una jeringa Hamilton de 10  $\mu\text{l}$  a una velocidad de 0,1  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Las coordenadas estereotáxicas para las inyecciones fueron: Bregma: +1, -0,1 o -1,2 mm; lateral:  $\pm 3$ ,  $\pm 3,7$  o  $\pm 4,5$  mm; ventral: 5 mm de la duramadre; barra dental: 0. Cuarenta y ocho horas después de la inyección, las ratas se sacrificaron y el cerebro se extrajo, se congeló con nitrógeno líquido y se guardó a -80 °C. El cerebro se cortó en secciones coronales seriadas (20  $\mu\text{m}$  de grosor) que incluía el MV con un criotomo y se montaron en portaobjetos de vidrio libre de RNasa y tratados con luz ultravioleta. Las secciones se congelaron inmediatamente a -80 °C, y se guardaron en tubos Falcon estériles con gel de sílice. La serie de secciones de SN se procesaron para inmunofluorescencia con un anticuerpo contra TH con el objetivo verificar la localización de los *retrobeads* rojos en las neuronas dopaminérgicas de la SN para luego diseccionarlas usando LCM. Antes de LCM, las secciones congeladas se equilibraron a temperaturas crecientes (-20 °C, 4 °C, RT), se fijaron en etanol (70, 96, 100%) y se secaron a RT.

##### **Angiotensina II conjugada con Alexa Fluor 488 o Rodamina**

Con el objetivo de investigar la presencia de la Ang II en mitocondrias, las células MES 23.5 se trataron con el marcador mitocondrial MTDR (20 nM, 15 minutos) y Ang II conjugada con Alexa Fluor 488 (Molecular Probes; 500 nM). Las células se fijaron en paraformaldehído al 4% en diferentes tiempos desde 30 minutos hasta 8 horas. Por otro lado, para investigar la presencia de la Ang II en los núcleos, las células se trataron con 0,5 nmol/ml de Ang II conjugada con rodamina (Phoenix Pharmaceuticals, Burlingame, CA, USA). Después de 3 horas de incubación con el péptido marcado, las células se fijaron con paraformaldehído al 4% y se tiñeron con Hoechst (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ).

### 3.2.2 Inmunofluorescencia

Se llevaron a cabo marcajes inmunofluorescentes dobles o triples en cultivos celulares fijados con paraformaldehído al 4% (cultivos primarios mesencefálicos, iPSCs y líneas celulares MES 23.5, C6, N27 y N9) y tejido cerebral (tejido de rata, mono y humano).

#### Inmunofluorescencia de tejido

Las ratas y monos fueron anestesiados y perfundidos con una solución de fijación que contenía paraformaldehído al 4% en tampón fosfato 0,125 M, pH 7,4. Una vez finalizada la perfusión, el cerebro fue extraído y guardado durante 48 horas en una solución crioprotectora. Los bloques de cerebro humano, que incluían el mesencéfalo, se fijaron por inmersión en tampón fosfato con paraformaldehído al 4% durante 24 horas y se crioprotegió durante 48 horas. El tejido se cortó en secciones coronales (40  $\mu$ m de grosor) con un microtomo deslizante y se recogieron en una solución crioprotectora. Las secciones a diferentes niveles rostrocaudales de la SN fueron procesadas para una inmunofluorescencia doble para TH y receptor Mas. Los gránulos de neuromelanina colocalizaron con TH en las secciones de SN humana y se utilizó como un marcador de confirmación de las neuronas dopaminérgicas. Las secciones flotantes de tejido que contienen SN se pre-incubaron en KPBS-1% BSA con un 5% de suero normal de mono (Sigma) y 0,03% de Triton X-100 durante 60 minutos a RT. La recuperación antigénica se requirió para las secciones humanas de SN, para ello las secciones se incubaron a 37 °C durante 30 minutos en una solución de citrato sódico 10 mM y pH 3,5. A continuación, las secciones se incubaron con el anticuerpo primario de conejo contra el receptor Mas (**Tabla 1**) durante toda la noche a 4 °C y contra TH (**Tabla 1**) diluidos en KPBS- 1% de BSA con 5% de suero normal de mono y 0,3 % de Triton X-100. La inmunoreacción se visualizó con los correspondientes anticuerpos secundarios (**Tabla 2**). Finalmente, las secciones se montaron en portaobjetos, recubiertos de gelatina, con la solución de montaje Immumount (Thermo-Shandon, Thermo Scientific).

#### Inmunofluorescencia de cultivos

Los cultivos celulares correspondientes a líneas celulares (MES 23.5, N27, C6 y N9), cultivos primarios mesencefálicos o iPSC fueron sembrados en placas de 35 mm con cubreobjeto de vidrio, fijadas con paraformaldehído al 4% durante 20 minutos para posteriormente proceder al marcaje inmunofluorescente.

Aquellos cultivos donde se pretendía observar la presencia de los receptores en las mitocondrias, se tiñeron con la sonda MTDR (20 nM) previo a la fijación, ya que esta sonda se acumula en mitocondrias activas. Los cultivos celulares se co-incubaron toda la noche a 4 °C con diferentes marcadores celulares y con los anticuerpos de los receptores a localizar (AT1, AT2 y receptor Mas; **Tabla 1**). Los diferentes tipos celulares fueron identificados con los correspondientes anticuerpos monoclonales de ratón (anti-TH como marcador dopaminérgico; anti-proteína ácida fibrilar glial (GFAP, como marcador de astrocitos; o anti-CD11b (complemento receptor-3, clon MRC OX42) como marcador de microglía; **Tabla 1**). Los anticuerpos primarios se diluyeron en DPBS conteniendo 1% de BSA y 2% de suero normal de burro. A continuación, se incubaron con los correspondientes anticuerpos secundarios durante 2 horas a RT (**Tabla 2**). Los núcleos de las células se marcaron con Hoechst 33342 (10  $\mu$ g/ml) durante 30 minutos a RT. Finalmente, los cubreobjetos se montaron sobre un portaobjetos con la solución de montaje Immumount (Thermo-Shandon, Thermo-Shandon).

### 3.2.3 Transfecciones transitorias de los receptores de angiotensina II marcados fluorescentemente

Las células se transfectaron transitoriamente con 1 µg de ADN complementario (ADNc) de AT1 (AT1/EGFP-N3) y 3 µg de ADNc de AT2 (AT2/YFP-N1) durante 24 horas usando como reactivo de transfección la Lipofectamina LTX (Invitrogen). Para estudiar los efectos de condiciones pro-oxidativas y antioxidantes, una parte de los cultivos de células transfectadas con el receptor AT2-YFP se trataron con bajas dosis de la neurotoxina dopaminérgica, metilfenilpiridinio (MPP<sup>+</sup>; 10 µM; Sigma) durante 24 horas, y otras células transfectadas con el receptor AT1-EGFP se trataron con el antioxidante N-acetil-L-cisteína (NAC; 0,5 mM; Sigma) durante 24 horas. El efecto de estos tratamientos sobre la expresión de los receptores AT1 y AT2 mitocondriales se observó por microscopía confocal y se confirmó por WB de mitocondrias aisladas de las células MES 23.5 usando los anticuerpos contra GFP/YFP, AT1, AT2 y VDAC/porina (Ver **Tabla 3**). Con el objetivo de minimizar la toxicidad de la sobreexpresión de AT1, las células transfectadas con AT1-EGFP requirieron el tratamiento simultáneo con el antagonista del receptor AT1, losartán (3 µM, Sigma), lo que resultó esencial para mantener la supervivencia celular. Veinticuatro horas después de la transfección, otros cultivos de células se trataron (60 minutos y 24 horas) con Ang II 100 nM (Sigma), se fijaron con paraformaldehído al 4%, se tiñeron con Hoechst (10 µg/ml) y se observaron usando un microscopio confocal. El efecto de la Ang II en la distribución de los receptores se confirmó por WB de núcleos aislados, para ello se usaron anticuerpos contra GFP/YFP y HDAC2 (Ver **Tabla 3**).

### 3.2.4 Adquisición de imágenes y estudios de colocalización

Tanto las secciones de tejido como los cultivos celulares, se visualizaron con el microscopio confocal láser SP5 (AOBS-SP5X; Leica Microsystems Heidelberg GmbH, Mannheim, Alemania) equipado con dos láseres, el ultravioleta y el láser de luz blanca (WLL, del inglés *White Light Laser*) para el estudio de colocalización de los marcadores fluorescentes. La emisión del láser ultravioleta a 405 nm se detectó en un rango espectral de 422-457 nm y se le atribuyó el color azul. La emisión del WLL a 488 nm se detectó en un rango espectral de 500-535 nm y se le atribuyó el color verde. Finalmente, se utilizó el rango espectral de 581-625 nm para detectar la emisión del WLL a 561 nm, que se le atribuyó el color rojo. Las células inmunoreactivas fueron escaneadas en una serie uniforme de planos a lo largo del eje Z separados por 0,7 µm usando un método secuencial de escáner, para evitar la superposición de los espectros de emisión de los fluoróforos. Las imágenes se captaron a una resolución de 1024x1024 píxeles. El análisis de colocalización se llevó a cabo en cada uno de los planos del eje Z. Los porcentajes de colocalización se calcularon a partir de una región de interés (ROI, del inglés *Region Of Interest*) de la célula con el software LAS AF (Leica Microsystems GmbH) sobre imágenes digitales.

### 3.2.5 Western blot

Tejidos procedentes del MV de rata y ratón se lisaron en tampón RIPA que contenía un cóctel de inhibidores de proteasas (1:200; Sigma) y PMSF (1:100; Sigma). Los lisados se centrifugaron y las proteínas se cuantificaron usando el método de BCA (*Pierce BCA protein*, Thermo Scientific). Cantidades iguales de lisados proteicos, mitocondrias y núcleos aislados que se separaron en un gel de Bis-Tris poli-acrilamida y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Las membranas se incubaron toda la noche con los anticuerpos primarios (ver

**Tabla 3).** Las membranas se reincubaron con anticuerpos contra GAPDH, VDAC y HDAC2 (Ver **Tabla 3**) que se usaron como control de carga de proteínas totales, mitocondriales y nucleares; respectivamente. Finalmente, las membranas se incubaron con los correspondientes anticuerpos secundarios conjugados con HRP (ver **Tabla 4**). Las bandas inmunoreactivas se detectaron con el kit Immun-Star HRP Chemiluminescent (170-5044; Bio-Rad, Hercules, CA, USA) y se visualizaron con un sistema de detección de quimioluminiscencia (Molecular Imager ChemiDoc XRS System; Bio-Rad). Los datos se expresaron como valores relativos al control (100%) para contrarrestar la posible variabilidad entre los ensayos y fueron normalizados con sus correspondientes proteínas control.

### 3.2.6 Microscopía electrónica

Se anestesiaron profundamente ratas macho adultas Sprague-Dawley con una mezcla de ketamina/xilacina y se perfundieron con salino (0,09 % NaCl) seguido de una solución de paraformaldehído al 4% y glutaraldehído al 0,1% en un tampón fosfato 0,1 M. Después de la perfusión, los cerebros se extrajeron rápidamente del cráneo, se sumergieron en la misma solución de fijación durante toda la noche a 4 °C y se enjuagaron cuidadosamente en tampón fosfato. Se obtuvieron secciones coronales flotantes de 40 µm con el vibratomo y se guardaron en tampón fosfato hasta su uso. Las secciones que contenían la SN se transfirieron a tampón citrato, pH 6,0 (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) a RT durante 5 minutos y luego a tampón citrato a 80 °C durante 30 minutos. Las secciones se enjuagaron consecutivamente en tampón citrato y salino tamponado con fosfato (PBS; pH 7,4) a RT antes del pre-tratamiento con bromohidruro de sodio al 1% en PBS durante 5 minutos. Las secciones se lavaron varias veces con PBS, luego se transfirieron a una solución de peróxido de hidrógeno al 5% en PBS durante 30 minutos y se lavaron varias veces en PBS. Las secciones se pre-incubaron en suero normal al 10% que contenía 0,01% de Triton X-100 en PBS durante 1 hora y luego se incubaron durante 72 horas a 4 °C con el anticuerpo primario correspondiente; anti-TH monoclonal de ratón (1:10.000; Sigma); anti-AT1 policlonal de cabra diluido 1:100; o anti-AT2 policlonal de conejo diluido 1:200 (sc-31181 y sc-9040, respectivamente; Santa Cruz Biotechnologies). Las secciones se enjuagaron completamente en PBS y se incubaron durante 1 hora con el anticuerpo secundario apropiado (cabra anti-conejo biotinizado o caballo anti-cabra, Vector Laboratories) diluido 1:400 en PBS que contenía 0,01% de Triton X-100, se lavaron en PBS y se incubaron con un kit del complejo avidina-biotina (1:100; Vector Laboratories) durante 1 hora a RT. Las secciones se lavaron múltiples veces en PBS, se revelaron usando un kit de 3,3'-diaminobenzidina peroxidasa (Vector Laboratories) y se enjuagaron adicionalmente en PBS.

Las secciones marcadas con AT1, AT2 o TH se lavaron en tampón fosfato, se transfirieron a una solución del 1% de tetróxido de osmio en tampón fosfato durante 1 hora a RT y se enjuagaron en tampón fosfato antes de la deshidratación gradual en 50-70% de etanol. Se transfirieron a una solución de contraste que contenía acetato de uranilo al 1% en etanol al 70% durante 1 hora a RT, se lavaron en etanol al 70% para eliminar el exceso de acetato de uranilo y se deshidrataron gradualmente en baños de 5 minutos de etanol del 70 al 100%. Las secciones se aclararon en óxido de propileno y se infiltraron gradualmente en resina Epon por inmersión secuencial en una mezcla 2:1 de óxido de propileno y resina Epon (30 minutos), mezcla 1:1 de óxido de propileno y resina Epon (1 hora), 1:2 mezcla de óxido de propileno y resina Epon (1 hora) y finalmente se transfirieron a resina Epon toda la noche a 4 °C. Las secciones del día siguiente se transfirieron a resina Epon recién preparada durante una hora a RT, que se dejó polimerizar por un mínimo de 72 horas a 60 °C. La SN se

identificó claramente usando un microscopio de campo claro y se rediseccionó con un ultramicrotomo. Se cortaron secciones semifinas (1  $\mu\text{m}$  de grosor) y ultrafinas (90 nm de grosor) usando un ultramicrotomo Leica EM UC6 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania). Las secciones ultrafinas se colocaron sobre rejillas de cobre y se observaron y fotografiaron usando un microscopio electrónico de transmisión (Hitachi, Tokio, Japón) equipado con una cámara digital Hamamatsu Orca (Hamamatsu, Hamamatsu, Japón). Estos experimentos se realizaron en colaboración con los departamentos de Nefrología y Cirugía Pediátrica de la Universidad de Alabama en Birmingham, Estados Unidos.

### **3.2.7 Especificidad de anticuerpos**

Debido a que varios anticuerpos comerciales contra los receptores acoplados a proteína G tienen problemas de especificidad, hemos seleccionado el anticuerpo contra el receptor Mas AAR-013 (Alomone) ya que su especificidad ha sido demostrada en estudios previos que mostraron la ausencia de inmunoreactividad en tejido de cerebro de ratones KO para el receptor Mas (Freund y col., 2012).

La especificidad de los anticuerpos de los principales receptores para Ang II usados para estudios por WB e inmunomarcaje se estableció en estudios previos: AT1 sc-31181 (Giles y col., 1999) y AT2 sc-9040 (Ruiz-Ortega y col., 2003; Obermüller y col., 2004). Además, la especificidad de los anticuerpos se confirmó en nuestro laboratorio por la preabsorción con el correspondiente antígeno peptídico correspondiente (Rodríguez-Perez y col., 2010). Más recientemente, analizamos por WB lisados de células HEK293 transfectadas con AT1 o AT2 recombinante que contienen fusionada una cola con el epítipo DDK (DYKDDDDK) en el extremo C-terminal (Origene, Rockville, MD, USA). La especificidad de los anticuerpos se confirmó por la presencia de una banda inmunoreactiva predominante en las células transfectadas de manera positiva y la ausencia de esta banda en los controles negativos, que consistían en lisados transfectados con los vectores vacíos (Valenzuela y col., 2016).

### **3.2.8 Actividades enzimáticas**

#### **Actividad de la enzima convertidora de angiotensina 2**

La actividad de la enzima convertidora de angiotensina 2 (ECA2) se midió usando el kit comercial de actividad ECA2 (AS-72086; AnaSpec, Fremont, CA, USA) siguiendo las especificaciones del fabricante. El kit se basa en la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET, del inglés *Fluorescence Resonance Energy Transfer*) del péptido Mca/Dnp (10  $\mu\text{M}$ ). En el FRET, la fluorescencia de Mca se oculta mediante Dnp, pero una escisión del sustrato por la enzima produce una separación en dos fragmentos, de manera que se recupera la fluorescencia de Mca, y puede monitorizarse a una excitación/emisión = 330/390 nm usando un lector de placas multipocillo Infinite M200 (TECAN).

#### **Actividad de la enzima lactato deshidrogenasa**

La enzima lactato deshidrogenasa (LDH) es una enzima citosólica, que en preparaciones mitocondriales se asocia predominantemente con contaminación de sinaptosomas; por lo que se utilizó para evaluar la pureza de la fracción mitocondrial. La actividad LDH se midió en 2,5  $\mu\text{g}$  de mitocondrias aisladas y homogenado total, siguiendo las instrucciones del fabricante (04744926001; Roche, Basilea, Suiza). La actividad de la enzima LDH de las

muestras se expresó en micromol/min/mg usando la enzima LDH (L-3916, Sigma) como estándar de referencia.

### **Actividad de la enzima citocromo oxidasa**

La actividad de la enzima citocromo oxidasa (COX) se utilizó para normalizar los datos obtenidos de la expresión de AT1 y AT2 llevados a cabo por WB en ratas envejecidas, proporcionando una estimación más exacta del contenido mitocondrial. La actividad COX se midió en mitocondrias aisladas usando un kit comercial siguiendo las especificaciones del fabricante (KC310100; Biochain, Newark, CA, USA). La actividad COX se midió en una placa de 96 pocillos, donde se detectó la disminución en absorbancia de ferrocitocromo c a 550 nm, ya que se oxida a ferricitocromo c por COX. Se analizaron 10 µg de proteína de mitocondrias aisladas con 0,1% de DTT añadiendo como sustrato ferrocitocromo c y leyendo la absorbancia a 550 nm inmediatamente durante 55 segundos. La actividad de COX (unidad/ml) de cada muestra se calculó utilizando el coeficiente molar de absorbancia 21,84 para el ferrocitocromo c y el ferricitocromo c a 550 nm.

### **Actividad NADPH oxidasa**

La actividad NADPH oxidasa en la línea celular N27 se midió por quimioluminiscencia emitida por lucigenina con un lector de placas multipocillo Infinite M200 (TECAN), como se describió previamente (Griendling y col., 2000; Hong y col., 2006). La lucigenina es un compuesto de dinitrato de acridilio que al reducirse e interactuar con los aniones superóxido emite luz que es cuantificada para medir la producción de superóxido. Las células se sembraron ( $25 \times 10^4$  células/placa) y se dejaron crecer durante 24 horas, se trataron con Ang II (100 nM) sola o combinada con Ang 1-7 (1 µM, Sigma) y/o el inhibidor del receptor Mas A779 (1 µM, Bachen) con el objetivo de analizar el efecto de estos tratamientos sobre la producción de superóxido por las células N27.

## **3.3 EXPRESIÓN DE GENES**

### **3.3.1 Transcripción *in vitro***

Se estudiaron los efectos de la Ang II y la Ang 1-7 sobre la transcripción del ARNm en núcleos aislados usando un sistema de transcripción *in vitro* de ARN estándar (Promega, Madison, WI, USA). Los núcleos recién aislados (100 µg) se incubaron primero con Ang II (100 nM) o Ang 1-7 (1 µM) durante 30 minutos a 37 °C. Para determinar el posible mecanismo involucrado en la transcripción de ARN en respuesta a la estimulación por Ang II o Ang 1-7, los núcleos se pre-trataron con Ang II o Ang 1-7 en presencia del antagonista del receptor AT1, losartán (3 µM, Sigma), el antioxidante NAC (0,5 mM, Sigma), el inhibidor de NOX4: difenilenoindonio (DPI; 5 µM, Sigma), el inhibidor del receptor de inositol 1,4,5-trifosfato (IP3): 2-aminoetil difenilborinato (2-APB; 50 µM, Sigma) o el inhibidor del receptor Mas: A779 (10 µM). Después, los núcleos se incubaron con el sistema de transcripción *in vitro* de ARN que consiste en ATP, GTP y UTP (500 µM); y RNasin 2 U/µl en tampón de transcripción (Promega) a 37 °C durante 1 hora. Después de la incubación, se extrajo el ARN, se transcribió de forma inversa a ADNc y finalmente, para evaluar la expresión de los diferentes genes estudiados se llevó a cabo una reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR, del inglés *Real Time Polymerase Chain Reaction*), como se describe a continuación.

### 3.3.2 Extracción de ARN y RT-PCR

El ARN total de SN de rata o ratón o de núcleos aislados de cerebro se extrajo con Trizol (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. A partir del ARN total (2,5 µg para SN o 1,8 µg para núcleos aislados) se obtuvo el ADNc mediante una retrotranscripción añadiendo a la reacción nucleótidos (dNTP), cebadores aleatorios y la enzima transcriptasa inversa MMLV (del inglés, *Moloney Murine Leukemia Virus reverse transcriptase*; 200 U; Invitrogen). La RT-PCR se utilizó para examinar los niveles relativos de AT1, AT2, angiotensinógeno (ANG), renina, receptor de (pro) renina (PRR), proteína 1α coactivadora del receptor activado por el proliferador de peroxisomas (PGC-1α, del inglés *Peroxisome proliferator-activated receptor γ Co-activator 1 α*), factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1, del inglés *Insulin-like Growth Factor-1*), sirtuína 1 (SIRT1), ECA2 y receptor Mas. Se utilizó un termociclador iCycler PCR en tiempo real (Bio-Rad) amplificando en paralelo a los genes de interés el gen de la β-actina o el gen de la GAPDH como control, según el estudio. Para analizar la expresión relativa de ARN mensajero (ARNm), se utilizó el método de valores de umbral de ciclo comparativo (método de ciclo umbral (Ct)) ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ). Los valores normalizados se obtuvieron restando el Ct de la β-actina a la Ct del gen de interés ( $\Delta Ct$ ). Se usa el parámetro  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  para reflejar la expresión relativa de los datos, ya que no es común utilizar  $\Delta Ct$  debido a su característica logarítmica. Los diferentes cebadores F (*Forward*) y R (*Reverse*) se diseñaron para cada gen usando el software Beacon Designer (Premier Biosoft, Palo Alto, CA, USA). Las secuencias de los cebadores utilizados se muestran en la **Tabla 5**.

### 3.3.3 PCR digital

Los experimentos de PCR digital (ddPCR, del inglés *Droplet Digital PCR*) se llevaron a cabo con un sistema QX200 ddPCR (Bio-Rad) y el kit ddPCR Eva Green Super Mix, según el protocolo del fabricante. El ADNc (1,5 µg por muestra) y la correspondiente pareja de cebadores (0,165 µM; Sigma) se añadieron al kit Eva Green Super Mix con un volumen final de 20 µl. Luego, se generaron gotas con la ayuda del generador de gotas, QX200, añadiendo 70 µl de aceite ddPCR. El producto de la emulsión (40 µl) se transfirió a una placa de 96 pocillos para la reacción de PCR. Finalmente, las muestras se leyeron usando el equipo de lectura Bio-Rad QX200. Los datos se analizaron con QuantaSoft y se expresaron como número de copias por microgramo de ARN (Hindson y col., 2011). Las secuencias de los cebadores usados se encuentran en la **Tabla 5**.

## 3.4 METABOLISMO MITOCONDRIAL

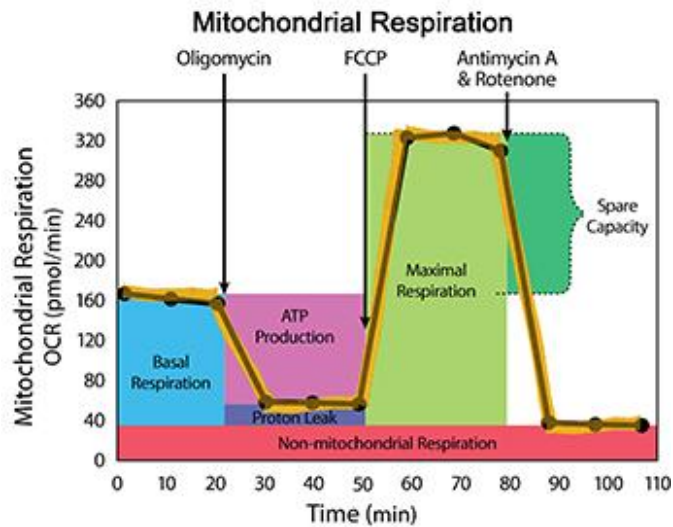
### 3.4.1 Respirimetría de alta resolución

La respiración de mitocondrias aisladas se midió a 37 °C usando un respirómetro de alta resolución: Oxygraph-2k (OROBOROS Instruments, Innsbruck, Austria). Alícuotas de 80-120 µg de mitocondrias aisladas se incubaron previamente con los antagonistas de AT1 o AT2 (3 µM de losartán o 2 µM de PD123,319 (Sigma), respectivamente) durante 3 minutos, y con 1 nM de Ang II durante 5 minutos. Para conocer el efecto del óxido nítrico (NO, del inglés *Nitric Oxide*) y NOX4, se añadieron a las mitocondrias el inhibidor de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS, del inglés *Nitric Oxide Synthase*), *N*<sup>ω</sup>-nitro-L-arginina metil ester hidrócloruro (L-NAME; 100 µM) o el inhibidor de NOX4, tioridazina (10 µM) con o sin el tratamiento correspondiente en tampón de respiración (125 mM KCl, 5mM HEPES, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 2mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y 0,5 mM EGTA; pH 7,4). Se llevó a cabo el protocolo SUIT (del

inglés *Substrate-Uncoupler-Inhibitor Titration*), como se describió previamente (Iglesias-Gonzalez y col., 2012). Los sustratos usados para abastecer el sistema de transporte de electrones (ETS, del inglés *Electron Transport System*) fueron 2 mM malato + 5 mM piruvato (MP) para evaluar la respiración por complejo I. La capacidad OXPHOS, lo que es similar al Estado 3, se midió en presencia de sustratos y ADP, a concentraciones saturantes de ADP (2,5 mM). La capacidad máxima de ETS (ETS<sub>max</sub>; es decir, respiración no acoplada) se evaluó usando carbonil cianida-4-(trifluorometoxi) fenilhidrazona (FCCP; 0,5-1,5 μM) como agente desacoplante. La integridad y función de nuestras preparaciones mitocondriales se confirmaron añadiendo citocromo c exógeno, que no potenció la respiración mitocondrial, indicando que no se produjo daño en la membrana mitocondrial externa durante el proceso de aislamiento. Las tasas respiratorias (flujo de O<sub>2</sub>) se calcularon como la derivada negativa del tiempo de la concentración de oxígeno. Se utilizó el software Matlab (OROBOROS Instruments) tanto para la adquisición como el análisis de los datos. Las tasas respiratorias se normalizaron con respecto a la cantidad de proteína mitocondrial para permitir la comparación entre grupos sin la influencia de las diferencias en la cantidad de proteína cargada en la cubeta.

### 3.4.2 Análisis de metabolismo mitocondrial

Se utilizó el analizador metabólico Seahorse Bioscience XF Extracellular Flux Analyzer (Seahorse Bioscience, North Billerica, MA, USA) para medir la función mitocondrial de las células N27. Las células se sembraron (10 x 10<sup>3</sup> células/pocillo) en placas de ocho pocillos, se dejaron crecer durante 24 horas y se incubaron con o sin Ang II (100 nM) y/o Ang 1-7 (1 μM) durante 24 horas, se hicieron lavados (2x) con medio basal XF DMEM suplementado con 2 mM de L-glutamina, 10 mM de glucosa y 1 mM de piruvato sódico, pH 7,4; y luego se incubaron con el mismo medio durante 1 hora a 37 °C en un incubador sin CO<sub>2</sub>. Se añadió secuencialmente a las células oligomicina (1 μM), FCCP (1 μM) y finalmente una mezcla de rotenona y antimicina A (0,5 μM) (*Cell Mito Stress Kit*); se calculó la tasa de consumo de oxígeno (OCR, del inglés *Oxygen Consumption Rate*) para los distintos parámetros usando el software Wave Desktop 2.3. La **respiración basal** se calculó como la última medida antes de la primera inyección menos la tasa de respiración no mitocondrial. La **respiración máxima** se calculó como la medida máxima después de la inyección de FCCP menos la respiración no mitocondrial. Finalmente, el **consumo de oxígeno no mitocondrial** fue la medida de la tasa mínima después de la inyección de rotenona/antimicina A (**Figura 3.1**).



**Figura 3.1.** Los parámetros fundamentales de la función mitocondrial: respiración basal, respiración máxima y consumo de oxígeno no mitocondrial

### 3.5 POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL

El potencial de membrana de las mitocondrias aisladas de cerebro de rata se midió usando la sonda fluorescente catiónica lipofílica sensible 5,5',6,6'-tetracloro-1,1'-tetraetilbencimidazolil-carbocianida yoduro (JC-1; Sigma) como se describió previamente (Sareen y col., 2006). Las mitocondrias aisladas se trataron con diferentes compuestos y sustratos respiratorios durante 10 minutos a 37 °C. Las mitocondrias se trataron con Ang II (1nM) y el antagonista de AT2, PD123,319 (2 µM) o el antagonista de AT1, losartán (3 µM) para investigar el efecto de los receptores AT1 y AT2 mitocondriales sobre el potencial de membrana mitocondrial. Las muestras se tiñeron con la sonda JC-1 (0,2 µg/ml; incubada previamente en hielo durante 20 minutos) y la fluorescencia roja de los agregados de la sonda se midió durante 15 minutos (longitud de onda de excitación/emisión = 490/590). Se empleó el ionóforo de potasio, valinomicina, como control para permeabilizar la membrana mitocondrial a los iones de K<sup>+</sup>, disipando de esta forma el potencial electroquímico mitocondrial y previniendo la agregación de JC-1.

### 3.6 DETECCIÓN DE SUPERÓXIDO Y ÓXIDO NÍTRICO EN MITOCONDRIAS Y NÚCLEOS AISLADOS

La producción de superóxido se midió usando quimioluminiscencia emitida por lucigenina como se describió previamente (Block y col., 2009; Gorin y col., 2003). Las muestras se incubaron con los correspondientes compuestos en 50 mM de tampón fosfato, pH 7,0 al que se incorporó 1 mM de EGTA y 150 mM de sacarosa. Se le añadieron después 5 µM de lucigenina y 100 µM de NADPH para iniciar la reacción. La producción de NO se midió con el kit NO fluorometric assay (Bio Vision, Milpitas, CA, USA). En este ensayo los nitratos se convierten en nitritos por la enzima nitrato reductasa, y la concentración total de nitritos se midió ya que los nitritos totales reaccionaron con la sonda DAN (2,3-diaminonaftaleno), lo que es proporcional a la producción total de NO. El efecto de NOX4 en la producción de superóxido inducido por Ang II/receptor AT1 mitocondrial se analizó usando el inhibidor de

NOX4: tioridazina (10  $\mu$ M) o DPI (5  $\mu$ M). Para el ensayo de producción de NO mitocondrial, el efecto de la enzima NOS se confirmó usando el inhibidor de NOS, L-NAME (100  $\mu$ M).

En núcleos aislados además de estas técnicas se usaron otras para medir tanto el superóxido como el óxido nítrico que se describen a continuación.

Se empleó el colorante fluorescente dihidroetidido (DHE; Sigma) para medir la producción de especies oxigenadas reactivas (ROS, del inglés *Reactive Oxygen Species*), inducido por Ang II, en núcleos aislados de las células MES 23.5 y de cerebro de rata y ratón. En la presencia de ROS el DHE se ioniza a etidio, el cual se une al ADN y tiñe los núcleos con fluorescencia roja. El marcador fluorescente DHE se añadió a una concentración final de 0,1 mM en una solución de trabajo recién preparada que contenía 1 mM de NADPH, 3 mM de  $MgCl_2$ , 20 mM de Tris y 320 mM de sacarosa pH 7,4. La fluorescencia se midió durante 1 hora a 37 °C (excitación/emisión= 535nm/610 nm).

La producción de NO nuclear se estimó usando la sonda fluorescente 4-amino-5-metilamino-2',7'-difluorofluoresceína diacetato (DAF, Sigma). Los núcleos aislados de cerebro de rata se pre-incubaron con 10  $\mu$ M de DAF en tampón que contenía 140 mM de NaCl, 14 mM de glucosa, 4,7 mM KCl, 2,5 mM de  $CaCl_2$ , 1,8 mM de  $MgSO_4$ , 1,8 de  $KH_2PO_4$  y 100  $\mu$ M de L-arginina, pH 7,4 durante 30 minutos a 37 °C. Los núcleos se lavaron para eliminar la sonda no unida y luego se incubaron con los correspondientes tratamientos. La fluorescencia de DAF se midió a las longitudes de onda de emisión 488 nm y de excitación 510 nm.

La luminiscencia y fluorescencia se midieron con un lector de placa multipocillo Infinite M200 (TECAN).

Se trataron las mitocondrias aisladas (30  $\mu$ g) o los núcleos aislados (15  $\mu$ g) durante 10-20 minutos a 37 °C con los siguientes compuestos según el ensayo:

- Ang II: 1 nM para mitocondrias, 100 nM para núcleos.
- Ang 1-7: 1  $\mu$ M.
- Inhibidor de AT1, losartán: 3  $\mu$ M.
- Inhibidor de AT2, PD123,319: 1  $\mu$ M.
- Inhibidor del receptor Mas, A779: 1  $\mu$ M.
- Inhibidor de NOX4, DPI: 5  $\mu$ M.
- Inhibidor de NOX4, tioridazina: 10  $\mu$ M.
- Inhibidor de NOS, L-NAME: 100  $\mu$ M.
- Antioxidante NAC: 0,5 mM

### 3.7 DETECCIÓN DE CALCIO INTRANUCLEAR

Se estimaron los niveles de calcio en los núcleos aislados usando el indicador ratiométrico de calcio Fura-2/AM (Molecular Probes). Después del aislamiento, los núcleos cerebrales se resuspendieron en 0,5 ml de tampón formado por 25 mM de HEPES, 100 mM

de KCl, 2mM de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y 4 mM de MgCl<sub>2</sub>. Se le añadió a la suspensión nuclear 5 µM de Fura-2/AM y se incubó durante 45 minutos a 37 °C. Los núcleos se lavaron dos veces por centrifugación a 2500g durante 5 minutos a RT para eliminar la sonda no incorporada y se resuspendió en tampón, previamente descrito, que además contenía 800 nM de CaCl<sub>2</sub>. Los niveles de calcio se estimaron, después del tratamiento con 100 nM Ang II o Ang II + losartán (3 µM), con un espectrofluorímetro (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA). La emisión de fluorescencia se detectó a 509 nm y se expresó como ratio de dos longitudes de onda de excitación (340/380). Las concentraciones de Ca<sup>2+</sup> se estimaron calibrando la señal fluorescente con la adición secuencial de Triton al 0,01%, 1mM de CaCl<sub>2</sub> y 4 mM de EGTA para obtener el ratio de la fluorescencia mínima. Los datos se normalizaron con los valores del grupo control (100%) para contrarrestar la posible variabilidad entre los ensayos.

### 3.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los datos se obtuvieron de al menos tres experimentos independientes y se expresaron como valores medios ± SEM (del inglés *Standard Error of the Mean*). La comparación de dos grupos se llevó a cabo mediante un t-test de Student y las comparaciones de múltiples grupos se realizaron mediante un test de one-way ANOVA seguido por un test posthoc Bonferroni o un test posthoc Holm-Sidak según el estudio. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando  $p < 0,05$ . Los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el programa SigmaPlot 11.0 (Systat Software, Inc., CA, USA).

**Tabla 1.** Anticuerpos primarios utilizados en inmunofluorescencia

Antígeno	Especie	Tipo	Dilución	Casa comercial
AT1	Cabra	Policlonal	1:50	Santa Cruz (Sc-31181)
AT2	Conejo	Policlonal	1:50	Santa Cruz (Sc-9040)
GFAP	Ratón	Monoclonal	1:500	Millipore (MAB360)
Neun	Ratón	Monoclonal	1:500	Millipore (MAB377)
OX42	Ratón	Monoclonal	1:50000	Serotec (MCA 275R)
RMas	Conejo	Monoclonal	1:100	Alomone (AAR-013)
TH	Ratón	Monoclonal	1:30000	Sigma (T2928)

**Tabla 2.** Anticuerpos secundarios utilizados en inmunofluorescencia

Antígeno	Especie	Fluoroforo	Dilución	Casa comercial
Cabra	Burro	Alexa Fluor 488	1:200	Molecular Probes
Cabra	Caballo	Biotinilado	1:50	Vector Labs
Conejo	Burro	Alexa Fluor 488	1:200	Molecular Probes
Conejo	Burro	Alexa Fluor 568	1:200	Molecular Probes
Conejo	Cerdo	Biotinilado	1:200	Dako
Ratón	Burro	Alexa Fluor 405	1:200	Abcam
Ratón	Burro	Alexa Fluor 488	1:200	Molecular Probes
Ratón	Burro	Alexa Fluor 568	1:200	Molecular Probes

**Tabla 3.** Anticuerpos primarios usados en WB

Antígeno	Especie	Tipo	Dilución	Casa comercial
AT1	Cabra	Policlonal	1:200	Santa Cruz (Sc-31181)
AT2	Conejo	Policlonal	1:200	Santa Cruz (Sc-9040)
ECA2	Conejo	Monoclonal	1:1000	Abcam (ab108252)
GAPDH	Conejo	Policlonal	1:50000	Sigma (G9545)
GFP/YFP	Conejo	Monoclonal	1:800	Life Technologies (G10362)
HDAC2	Ratón	Monoclonal	1:200	Santa Cruz (sc-56685)
Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> ATPasa	Ratón	Monoclonal	1:200	Santa Cruz (sc-21712)
NOX4	Conejo	Monoclonal	1:2500/1:800	Abcam (ab-133303)
RMas	Conejo	Policlonal	1:1000	Alomone (AAR-013)
Tubulina	Ratón	Monoclonal	1:50000	Sigma (T5168)
VDAC	Conejo	Policlonal	1:1000	Sigma (V2139)

**Tabla 4.** Anticuerpos secundarios usados en WB

Antígeno	Especie	Dilución	Casa comercial
Cabra	Burro	1:2500	Santa Cruz (sc-2020)
Conejo	Cabra	1: 2500	Santa Cruz (sc-)
Proteína A		1:5000	GE (NA9120V)
Ratón	Pollo	1: 2500	Santa Cruz (sc-2954)

**Tabla 5.** Cebadores utilizados en esta tesis

Genes y Especie	Cebador <i>Forward</i> (F)	Cebador <i>Reverse</i> (R)
ANG Rata	5´-GAGTGAGGCAAGAGGTGTA-3´	5´-TCCAACGATCCAAGGTAGAA-3´
AT1a Rata	5´-TTCAACCTCTACGCCAGTGTG-3´	5´-GCCAAGCCAGCCATCAGC-3´
AT2 Rata	5´-AACATCTGCTGA AGACCAATAG-3´	5´-AGAAGGTCAGAACATGGAAGG-3´
ECA2 Rata	5´-CTCCTTCTCAGCCTTGTTG-3´	5´-TCCGTAATGTTGGTGTGTTG-3´
GAPDH Rata	5´-GCAAGTTCAACGGCACAGTCAAG-3´	5´-ACATACTCAGCACCAGCATCACC-3´
IGF-1 Rata	5´-CTGGAGATGACTGTGCT-3´	5´-TACTTCCTTCTGAGTCTTGG-3´
PGC-1 $\alpha$ Rata	5´-CACGACTCCTCCTCATAA-3´	5´-TACCAGAACACTCACTGT-3´
PRR Rata	5´-TTCACAACCTCTATGACTCC-3´	5´-CCACAGTTACCACATCTTG-3´
RENIN Rata	5´-CTCTATGACTCCTCGGAAT-´3	5´-CCACAGTTACCACATCTTG-´3
RMas Rata	5´-CTTTGTGGAGAACGGGAT-3´	5´-GGAGATGTCAGCAATGGA-3´
SIRT 1 Rata	5´-CAGAACCACCAAAGCGGAAA-3´	5´-CACAGCAAGGCGAGCATAA-3´
TH Rata	5´-GGCTTCTCTGACCAGGTGTATCG-3´	5´-GCAATCTCTCCGCTGTGTATTCC-3´
ANG Ratón	5´-CTGCTGGCTGAGGACAAG-3´	5´-CGAGGAGGATGCTATTGAGAA-3´
AT2 Ratón	5´-TGTAATCAGCCTAGCCATTG-3´	5´-CTACTTGACTTCCTGTTCTCG-3´
ECA2 Ratón	5´-TATTACTTGAGCCAGGATTG-3´	5´-GACCACATACTTTCATACA-3´
GAPDH Ratón	5´-AACGACCCCTTCATTGAC-3´	5´-TCCACGACATACTCAGCAC-3´
IGF-1 Ratón	5´-TGTGACATTGCTCTAACATATA-3´	5´-GTTGGAAGGCTGCTGATT-3´
PGC-1 $\alpha$ Ratón	5´-GCCATTGTTAAGACCGAGAAT-3´	5´-TCTGCTGCTGTTCCCTGTT-3´
RMas Ratón	5´-AGGGTGACTGACTGAGTTTGG-3´	5´-GAAGGTAAGAGGACAGGAGC-3´
$\beta$ -Actin Rata y Ratón	5´-TCGTGCGTGACATTAAGAG-3´	5´-TGCCACAGGATTCCATACC-3´



**CAPÍTULO 4:  
RECEPTORES DE ANGIOTENSINA  
MITOCONDRIALES EN LAS NEURONAS  
DOPAMINÉRGICAS. PAPEL EN LA  
PROTECCIÓN CELULAR Y LA  
VULNERABILIDAD A LA  
NEURODEGENERACIÓN RELACIONADA  
CON LA EDAD.**

---



## **4. RECEPTORES DE ANGIOTENSINA MITOCONDRIALES EN LAS NEURONAS DOPAMINÉRGICAS. PAPEL EN LA PROTECCIÓN CELULAR Y LA VULNERABILIDAD A LA NEURODEGENERACIÓN RELACIONADA CON LA EDAD.**

### **4.1 INTRODUCCIÓN**

El sistema renina-angiotensina (SRA) fue descrito inicialmente como un sistema circulante humoral que se encargaba principalmente del control de la presión arterial, ejerciendo sus acciones a través del riñón. La acción de la angiotensina II (Ang II), el péptido efector más importante, está mediada principalmente por dos receptores celulares: receptor de Ang II tipo 1 y 2 (AT1 y AT2). Generalmente se considera que los receptores AT2 ejercen acciones directamente opuestas a aquellas mediadas por los receptores AT1, antagonizando así muchos de los efectos de este último (Chabrashvili y col., 2003). Además de este SRA humoral "clásico", se ha identificado un segundo SRA local o tisular en una gran variedad de tejidos, incluyendo el sistema nervioso central (Re, 2004). El papel del SRA en las funciones cerebrales fue asociado, inicialmente, con el efecto del SRA circulante en áreas involucradas en el control central de la presión arterial; sin embargo, actualmente se sabe que el SRA local del cerebro está implicado en diferentes funciones y trastornos cerebrales (Labandeira-Garcia y col., 2014; Wright y Harding, 2013). En los últimos años se ha demostrado la presencia de un SRA local en la sustancia negra pars compacta (SNpc) y en el estriado (ST) de roedores y primates, incluido en humanos (Garrido-Gil y col., 2013; Labandeira-Garcia y col., 2013; Rodríguez-Pallares y col., 2008). También se ha demostrado que la sobreactivación del SRA local, a través de los receptores AT1, exagera la neuroinflamación, el estrés oxidativo y la muerte celular dopaminérgica, todo esto se inhibe por el tratamiento con antagonista de los receptores de AT1 (Grammatopoulos y col., 2007; Rey y col., 2007).

Recientemente, se ha sugerido, en tejidos periféricos, un tercer nivel del SRA a nivel intracelular o intracrino (Lavoie y col., 2004; Re, 2003). Este sistema puede ser activado por la Ang II internalizada a través de los receptores AT1 o por Ang II sintetizada dentro de la célula (Baker y col., 2004). Estudios inmunohistoquímicos demuestran la localización intracelular de varios componentes del SRA en la SNc de mamíferos, incluyendo primates y humanos (Garrido-Gil y col., 2013; Valenzuela y col., 2010). En este estudio, hemos descubierto la presencia de los receptores AT1 y AT2 en mitocondrias cerebrales y hemos investigado su papel en el control de eventos mitocondriales. Es sabido que la disfunción mitocondrial juega un papel fundamental en varias enfermedades neurodegenerativas, particularmente en la degeneración de neuronas dopaminérgicas en la enfermedad de Parkinson (EP). Los experimentos fueron llevados a cabo en ratas, ratones deficientes (KO, del inglés *Knock-Out*) para AT1 y AT2, cultivos primarios de la región de la sustancia negra

(SN) y neuronas dopaminérgicas de la línea celular dopaminérgica MES 23.5. Llevamos a cabo estudios funcionales con mitocondrias aisladas para excluir cualquier posible efecto indirecto causado por los receptores AT1 y AT2 no mitocondriales y demostrar que los receptores de Ang II mitocondriales tienen un papel en los eventos mitocondriales clave.

#### 4.2 MATERIAL Y MÉTODOS: DISEÑO EXPERIMENTAL

Se emplearon secciones cerebrales de rata Sprague-Dawley macho adultas de la región de la SN y cultivos de la línea celular dopaminérgica MES 23.5 que se transfectaron con receptores AT1 y AT2 marcados con proteínas fluorescentes, y fueron tratadas con Ang II fluorescente con el objetivo de investigar la presencia de los receptores de Ang II en mitocondrias de neuronas dopaminérgicas. La localización de los principales receptores de Ang II y angiotensinógeno en neuronas dopaminérgicas aisladas de la SN de rata se confirmó usando microdissección por captura láser (LCM, del inglés *Laser Capture Microdissection*) y por la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR, del inglés *Real Time Polymerase Chain Reaction*). Además, se usaron mitocondrias puras aisladas de la región de la SN de rata para confirmar la expresión de los receptores de Ang II en dichas mitocondrias usando la técnica Western blot (WB).

Las mitocondrias aisladas a partir de la región de la SN en el mesencéfalo ventral (MV) de rata y del cerebro de ratones KO para los receptores AT1 y AT2 (ratones mutantes: Agrp1 con fondo genético C57BL/6 y Agrp2 con fondo genético FVB) se emplearon para investigar la habilidad de los receptores de Ang II para modular la respiración mitocondrial, el potencial de membrana mitocondrial y la producción mitocondrial de superóxido y óxido nítrico (NO, del inglés *Nitric Oxide*). Para este propósito, las mitocondrias se incubaron con diferentes compuestos para evaluar los efectos de la activación tanto de AT1 como de AT2 sobre la capacidad respiratoria y el mantenimiento del potencial de membrana. Las mitocondrias se trataron con Ang II (1 nM), previa incubación con el antagonista de AT2, PD123,319 (2 µM), o el antagonista de AT1, losartán (3 µM), y/o el inhibidor de la NADPH oxidasa 4 (NOX4), tioridazina (10 µM) o el inhibidor de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS, del inglés *Nitric Oxide Synthase*) *N*<sup>w</sup>-nitro-L-arginina metil ester hidrocloreuro (L-NAME, 100 µM). Las concentraciones de los compuestos mencionados anteriormente se determinaron experimentalmente como las más apropiadas para evaluar los efectos estudiados. El estrés oxidativo mitocondrial se estimó midiendo la producción de superóxido (es decir, la especie oxigenada reactiva, ROS (del inglés, *Reactive Oxygen Species*), más importante en la mitocondria) usando un ensayo sensible basado en luminiscencia. Finalmente, se determinó la expresión de los genes de interés mediante RT-PCR de las neuronas dopaminérgicas de la SN aisladas por LCM y la expresión proteica por WB de las mitocondrias aisladas de ratas machos Sprague-Dawley jóvenes y envejecidas (10 semanas y 20 meses respectivamente) para investigar los cambios relacionados con la edad en la expresión de los receptores de Ang II mitocondriales y de neuronas dopaminérgicas.

## 4.3 RESULTADOS

### 4.3.1 Presencia de receptores de angiotensina II y de angiotensina II marcados fluorescentemente en mitocondrias de neuronas dopaminérgicas

Estudios inmunohistoquímicos previos mostraron la localización de los receptores AT1 y AT2 en neuronas dopaminérgicas. En el presente estudio, esto se confirmó por LCM de neuronas dopaminérgicas de la SN de rata y posterior análisis por RT-PCR. Los análisis de RT-PCR revelan la expresión de niveles detectables ARN mensajero (ARNm) de tirosina hidroxilasa (TH), angiotensinógeno, AT1 y AT2 en neuronas dopaminérgicas aisladas de la SN (**Figura 4.1a**).

Además, también se demostró previamente por inmunofluorescencia triple y microscopía confocal y electrónica que las mitocondrias de las neuronas dopaminérgicas expresan los receptores AT1 y AT2. El marcaje de los receptores AT1 aparece intenso en la periferia celular, lo que sugiere que estos receptores están presentes en la superficie celular, aunque también dentro de las neuronas y a nivel citoplasmático y nuclear. La colocalización de AT1 con la sonda específica MTDR revela que muchas de las mitocondrias expresan receptores AT1, sin embargo, en algunas mitocondrias este marcaje se muestra poco claro o débil. Por el contrario, el inmunomarcaje para el receptor AT2 aparece especialmente intenso en el citoplasma, y débil en la superficie celular y en el núcleo. A nivel citoplasmático, el marcaje de AT2 colocaliza con MTDR y el patrón de distribución es similar al marcaje mitocondrial, lo cual sugiere una fuerte presencia de estos receptores en las mitocondrias de neuronas dopaminérgicas. Por microscopía electrónica se observó marcaje tanto de los receptores AT1 como de los receptores AT2, principalmente localizado en la membrana externa mitocondrial aunque también en las crestas mitocondriales (Valenzuela y col., 2016).

En la presente tesis, se localizaron los receptores AT1 y AT2 marcados con proteínas fluorescentes (proteína fluorescente verde potenciada, EGFP (del inglés, *Enhanced Green Fluorescent Protein*); proteína fluorescente amarilla, YFP (del inglés, *Yellow Fluorescent Protein*); respectivamente) tanto en la membrana plasmática como intracelularmente después de ser transfectados de manera transitoria en la línea celular dopaminérgica MES 23.5. Estos receptores fluorescentes colocalizaban con el marcador mitocondrial MTDR (**Figuras 4.1b-g**). En una segunda serie de experimentos, se trataron cultivos de la línea celular dopaminérgica MES 23.5 con Ang II conjugada con Alexa Fluor 488 con el fin de investigar la localización de la Ang II dentro de la mitocondria. La angiotensina fluorescente fue internalizada y colocalizó con las mitocondrias, lo cual fue evidente después de 30 minutos y continuó 8 horas después (**Figuras 4.1h-j**).

Curiosamente, la distribución de los AT2-YFP marcados se vio alterada al aumentar el estrés oxidativo intracelular (después de tratar las células con dosis muy bajas de metilfenilpiridinio, MPP<sup>+</sup>). Concretamente, el AT2-YFP apareció más abundante a nivel mitocondrial en las células tratadas comparado con las células sin tratar. Además, el tratamiento de las células con el antioxidante N-acetilcisteína (NAC) provocó un aumento de los receptores AT1-EGFP fluorescentes mitocondriales en comparación con las células control. Estos efectos se confirmaron por WB en muestras de mitocondrias aisladas (**Figura 4.2**).

### 4.3.2 Presencia de receptores de angiotensina II y presencia de angiotensina II en mitocondrias aisladas de la sustancia negra

Se aislaron las mitocondrias a partir de la región de la SN del MV de rata, separando orgánulos a través de un protocolo de ultracentrifugación en gradientes de Percoll preformados (Sims y Anderson, 2008). Se demostró la calidad de la muestra por la ausencia de marcadores específicos de diferentes compartimentos celulares, como la histona deacetilasa 2 (HDAC2) y la  $\alpha$ -tubulina, los cuales son marcadores para las fracciones nucleares y citosólicas, respectivamente. Se confirmó la fracción mitocondrial con el marcador del canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC). La actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH), enzima citosólica predominantemente asociada con contaminación de sinaptosomas, se midió en relación con la del homogenado total, y solo se observó una actividad residual, no significativa, en la fracción mitocondrial (**Figuras 4.2a-d**). Hemos observado la presencia de los principales tipos de receptores de angiotensina II (AT1 y AT2) en la fracción mitocondrial, con una clara diferencia en la abundancia de cada subtipo de receptor; mientras que AT1 aparece menos abundante en mitocondrias que en el homogenado total, la expresión de AT2 fue mayor que en el homogenado total (**Figuras 4.2a-c**). Además, hemos confirmado la presencia del péptido Ang II en mitocondrias aisladas usando muestras purificadas por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, del inglés *High Performance Liquid Chromatography*) ( $0,0381 \pm 0,00618$  ng/ml).

### 4.3.3 Efectos de los niveles de estrés oxidativo y del envejecimiento en la expresión de los receptores de angiotensina II mitocondriales

Después de transfectar de manera transitoria la línea celular MES 23.5, AT2-YFP aumentó su expresión a nivel mitocondrial tras el tratamiento de las células con bajas dosis de MPP<sup>+</sup>, inductor de estrés oxidativo; la densidad relativa de las bandas de proteína normalizada con VDAC fue de  $94,9 \pm 13,0$  para controles sin tratar y  $248,8 \pm 44,3$  para células tratadas con MPP<sup>+</sup> ( $P < 0,05$ ). Las células tratadas con el antioxidante NAC contienen mayor expresión a nivel mitocondrial de AT1-EGFP que las células dopaminérgicas sin tratar. (Control:  $103,1 \pm 5,0$ ; NAC:  $130,6 \pm 7,8$ ;  $P < 0,005$ ; **Figuras 4.2e y f**).

El análisis por RT-PCR de las neuronas dopaminérgicas aisladas usando LCM revela que el envejecimiento induce un aumento significativo (45%) en la expresión del ARNm del receptor AT1. Por el contrario, los niveles de ARNm del receptor AT2 en las neuronas dopaminérgicas disminuye significativamente (disminuye un 83%) en ratas envejecidas con respecto a ratas jóvenes (**Figuras 4.2g y h**). En mitocondrias aisladas, la expresión de los receptores AT1 mitocondriales detectados por WB aumenta en ratas viejas, mientras que la expresión de los receptores AT2 mitocondriales disminuye (**Figura 4.2i**). Además, usando el mismo procedimiento de aislamiento, se encontró una diferencia substancial en la concentración de proteína total entre las mitocondrias aisladas de ratas jóvenes y viejas; las mitocondrias aisladas de ratas viejas contenían casi la mitad de concentración proteica que aquellas aisladas de ratas jóvenes. Esto no es sorprendente ya que se sabe que el número y masa mitocondrial disminuye con la edad, lo cual altera la cuantificación de proteína entre ambos grupos de animales. Por lo tanto, para obtener una estimación más exacta del contenido mitocondrial, hemos usado la actividad de la enzima citocromo *c* oxidasa (COX) para normalizar los datos obtenidos de la expresión de los receptores AT1 y AT2 por WB (**Figura 4.2i**) (Picard y col., 2010).

#### **4.3.4 Efecto de los receptores de angiotensina II mitocondriales sobre la respiración mitocondrial**

Se llevaron a cabo estudios bioenergéticos usando mitocondrias aisladas de la región de la SN de rata, que fueron confirmados con mitocondrias aisladas de cerebro total. Se trataron las mitocondrias aisladas con Ang II en presencia de antagonistas de los receptores AT1 (losartán) o AT2 (PD123,319). Nuestros resultados mostraron que la activación de los receptores de angiotensina II mitocondriales produce efectos opuestos sobre la función respiratoria. La activación de los receptores AT1 mitocondriales con Ang II (es decir, AII + PD123,319) provocó un aumento tanto en la fosforilación oxidativa (P) como en la tasa de respiración máxima (E) (**Figuras 4.3a y b**). Este resultado concuerda con lo observado en ratones KO para los receptores AT1, los cuales muestran una disminución en la actividad respiratoria en comparación con los ratones de tipo salvaje (WT, del inglés *Wild Type*) (**Figuras 4.3c y d**). La activación de los receptores AT2 con Ang II (AII + losartán) produjo una disminución significativa en la respiración activa (OXPHOS o P) y en la tasa de respiración máxima (sistema de transporte electrónico máximo, ETS o E) asociada al complejo I (**Figuras 4.3e y f**). Esto es coherente con los resultados obtenidos en ratones KO para los receptores AT2, los cuales muestran una tasa de respiración mitocondrial más alta en comparación con los ratones WT. (**Figuras 4.3g y h**).

Es interesante señalar que el aumento de la capacidad respiratoria inducido por la activación de los receptores AT1 fue bloqueado por la pre-incubación de mitocondrias aisladas con el inhibidor de NOX4, tioridazina, lo cual revela el papel principal de NOX4 en la inducción de superóxido por la activación de los receptores AT1 (**Figuras 4.3a y b**). Por su parte, la disminución de la capacidad respiratoria inducida por la activación de los receptores AT2 fue inhibida por el pre-tratamiento de las mitocondrias aisladas con el inhibidor de la enzima NOS, L-NAME, que evidencia el papel del NO en este efecto (**Figuras 4.3e y f**).

#### **4.3.5 Efecto de los receptores de angiotensina II mitocondriales sobre el potencial transmembrana mitocondrial y la producción de óxido nítrico y superóxido. Papel de la enzima óxido nítrico sintasa mitocondrial y NADPH oxidasa 4 mitocondrial.**

Las mitocondrias cerebrales aisladas se incubaron con losartán, antagonista del receptor AT1, o con PD123,319, antagonista del receptor AT2, y posteriormente se incubaron con Ang II. La activación de los receptores AT1 o de los receptores AT2 mitocondriales no provocó ningún cambio significativo en el potencial de membrana mitocondrial, lo que indica que las propiedades bioenergéticas de las mitocondrias no se vieron afectadas (**Figura 4.4a**). Como control, se añadió a la muestra el ionóforo de potasio, valinomicina, a una concentración final de 0,5 µg/ml, el cual induce una pérdida de aproximadamente el 40% del potencial de membrana en comparación con las mitocondrias no tratadas.

En mitocondrias aisladas, la activación de los receptores AT2 (tratamiento con Ang II y losartán) provocó un aumento en los niveles de NO que fue inhibido con el pre-tratamiento del inhibidor de NOS, L-NAME (**Figura 4.4b**). Esto es coherente con los datos de respiración mitocondrial, donde se observó que la inhibición respiratoria dependiente de AT2 se evitó con el pre-tratamiento de las mitocondrias aisladas con L-NAME, confirmando la conexión entre los receptores AT2 y la producción de NO y la función respiratoria mitocondrial.

Se midió la producción de superóxido por quimioluminiscencia potenciada por lucigenina. En mitocondrias aisladas, la activación de los receptores AT1 por Ang II (tratamiento con Ang II y PD123,319) dio lugar a un aumento de los niveles de superóxido. La fuente principal de ROS en la célula son las proteínas NOX y la cadena de transporte electrónica (CTE) mitocondrial. NOX4 es la principal isoforma intracelular de la familia de proteínas NOX en varios tipos de células (Block y col., 2009; Gorin y col., 2003). Previamente, se demostró la presencia de NOX4 en mitocondrias aisladas de cerebro de rata usando un anticuerpo específico monoclonal de conejo, el cual muestra una única banda a 60 kDa que aumenta con la cantidad de muestra mitocondrial cargada en el gel de poliacrilamida (Valenzuela y col., 2016). Para aclarar el papel de NOX4 en la producción de superóxido, probamos el efecto del inhibidor de NOX4, tioridazina (Serrander y col., 2009). El tratamiento de mitocondrias aisladas con Ang II y el antagonista de AT2, PD123,319 (es decir, la activación de AT1) y el tratamiento simultáneo con tioridazina resultó en una inhibición de superóxido total de aproximadamente un 40% con respecto a los controles no tratados. El superóxido restante probablemente fue debido a una fuga de electrones mitocondriales de la CTE u otras fuentes (**Figura 4.4c**). Esto es coherente con los resultados obtenidos en los ensayos de respiración mitocondrial que mostraron que el pre-tratamiento de mitocondrias aisladas con el inhibidor de NOX4, tioridazina, bloqueaba el aumento inducido por AT1 en el consumo de oxígeno (**Figuras 4.3a y b**). El papel de NOX4 en la producción de superóxido inducida por Ang II se confirmó con un segundo inhibidor de NOX4 (difenilenoindio, DPI). Como se observó después del tratamiento con tioridazina (**Figura 4.4c**), el tratamiento simultáneo con DPI (Ang II + PD123,319 + DPI) dio lugar a la inhibición del superóxido total de aproximadamente un 40-50% comparado con los controles no tratados.

#### 4.4 DISCUSIÓN

Las mitocondrias juegan un papel fundamental en el envejecimiento y en las enfermedades neurodegenerativas relacionadas con el envejecimiento, incluida la EP (Swerdlow, 2009). La SN de pacientes con EP muestra alteraciones en la actividad NADH deshidrogenasa mitocondrial (complejo I), e inhibidores del complejo I como el 1-Metil-4-Fenil-1,2,3,6-Tetrahidropiridina (MPTP), rotenona y otros pesticidas causan cambios neurológicos similares a los que se observan en la EP (Federico y col., 2012; Schapira, 2008). Estudios inmunohistoquímicos previos de nuestro grupo de investigación sugieren la posible existencia de un SRA intracelular o intracrino en las neuronas dopaminérgicas de algunas especies de mamíferos, incluidos humanos (Garrido-Gil y col., 2013; Valenzuela y col., 2010). Recientemente observamos presencia de los principales receptores de Ang II (es decir AT1 y AT2) en mitocondrias de neuronas dopaminérgicas, utilizando inmunofluorescencia y microscopía electrónica (Valenzuela y col., 2016). En la presente tesis, demostramos la presencia de Ang II y de los receptores de angiotensina II marcados fluorescentemente en mitocondrias de la línea celular dopaminérgica MES 23.5. Estos resultados fueron confirmados en mitocondrias aisladas procedentes de la región de la SN de rata y de la línea celular de neuronas dopaminérgicas MES 23.5. Se observó una distribución diferente de ambos tipos de receptores de Ang II; mientras los receptores AT2 se encontraron principalmente en el citoplasma y colocalizaban con el marcaje mitocondrial, los receptores AT1 aparecían más superficialmente y con una distribución nuclear, aunque también se encontraron a nivel mitocondrial. Además, se observó una clara diferencia en la expresión de AT1 y AT2 en la fracción mitocondrial, siendo AT2 mucho más abundante que AT1.

Nuestros resultados muestran que la activación de los receptores AT1 y AT2 mitocondriales producen efectos opuestos en las tasas de respiración, lo cual es coherente con lo observado en los receptores AT1 y AT2 de la superficie celular. La activación de los receptores AT2 provocó una disminución moderada pero significativa en la respiración activa y máxima (OXPHOS y ETS). Este efecto se confirmó con mitocondrias aisladas de ratones KO para los receptores AT2. Se investigaron los posibles mecanismos involucrados en estos efectos y se encontró que la activación de los receptores AT2 producía un aumento de los niveles de NO mitocondriales, el cual fue bloqueado por la inhibición, con L-NAME, de la actividad de la enzima NOS mitocondrial. Esta enzima a su vez también bloquea la reducción en la actividad respiratoria producida por la activación de AT2, indicando que NO media este proceso y puede actuar como un modulador de la respiración. Inicialmente se consideraba que el NO ejercía acciones proapoptóticas; sin embargo, ahora se sabe que estos efectos solo ocurren a altas concentraciones de NO y que concentraciones fisiológicas de NO son antiapoptóticas (Brookes y col., 2002). A concentraciones fisiológicas, el NO compite con el oxígeno por el sitio activo de la COX (o complejo IV). La inhibición a corto plazo del complejo IV debido a bajos niveles, no letales de NO, produce una disminución de la respiración mitocondrial e inicia una acción protectora para mantener el potencial de membrana mitocondrial, lo que da como resultado la protección de la célula contra daños mayores y previene la apoptosis (Beltrán y col., 2000; Paxinou y col., 2001). De esta forma, la regulación de la respiración mitocondrial mediada por AT2 podría representar una línea de defensa primaria, no reconocida, contra el estrés oxidativo y el daño asociado al estrés. Se sabe que los niveles de estrés oxidativos son más altos en las neuronas dopaminérgicas, probablemente relacionados con el metabolismo de la dopamina, y el mecanismo de defensa mencionado anteriormente puede ser particularmente importante contra la degeneración dopaminérgica y la EP.

Por otra parte, la activación de los AT1 mitocondriales produce un aumento en el consumo de oxígeno, y un aumento en la generación de superóxido a través de la enzima NOX4 mitocondrial. Este efecto se confirmó en mitocondrias aisladas de ratones deficientes en receptores AT1, que mostraron una disminución en las tasas respiratorias, coincidiendo además con observaciones previas en los receptores AT1 de la superficie celular y la NADPH oxidasa de membrana. En estudios previos con modelos animales de EP, se observó que la Ang II, mediante los receptores AT1 superficiales, aumenta el estrés oxidativo a través de la activación de la NADPH oxidasa anclada a la membrana (Joglar y col., 2009; Rey y col., 2007; Rodríguez-Pallares y col., 2008). El sitio principal de generación de ROS en la mitocondria es la CTE, ya que la fuga de electrones del complejo I y III produce una reducción parcial del oxígeno formado superóxido. Además, la isoforma NOX4, un miembro de la familia NADPH oxidasa, se ha localizado en membranas intracelulares de cardiomiocitos y células renales (Ago y col., 2010; Block y col., 2009; Kuroda y col., 2005). Más recientemente, se demostró la expresión de NOX4 en mitocondrias aisladas de la región de la SN (Valenzuela y col., 2016), lo cual concuerda con resultados de estudios previos, que mostraron la implicación de NOX4 en la producción de superóxido mitocondrial usando ARN de interferencia (ARNi) en mitocondrias aisladas de células renales (Block y col., 2009).

Además del efecto de los receptores AT1 mencionado anteriormente, la activación de los receptores AT1 de la superficie celular y de la NADPH oxidasa anclada a la membrana puede afectar también a la función mitocondrial. Varios estudios han demostrado una interacción mediada por ROS entre el complejo NADPH oxidasa unido a la membrana y las mitocondrias, por lo que las ROS producidas por la NADPH oxidasa puede actuar como un

desencadenante para inducir la apertura de los canales de potasio sensibles a ATP (mito KATP), lo cual da lugar a la generación de ROS mitocondrial (Zhang y Gutterman y 2007). De acuerdo con esto, en un estudio previo en cultivos de neuronas dopaminérgicas, se demostró que la inhibición de los canales de potasio inhibe el aumento en la producción de superóxido inducido por Ang II (Rodríguez-Pallares y col., 2012).

Los receptores AT1 y AT2 mitocondriales juegan un papel importante en el mantenimiento de la integridad de este orgánulo tan esencial frente a insultos extra-mitocondriales, al menos en los primeros momentos, como se observó en los experimentos con mitocondrias aisladas. Un aumento en los niveles celulares de estrés oxidativo (es decir, tratamiento de células dopaminérgicas con dosis muy bajas de MPP<sup>+</sup>) dio lugar a un aumento en la expresión de receptores AT2 mitocondriales. Curiosamente, nuestros resultados también muestran que el envejecimiento modifica la expresión de los receptores de Ang II mitocondriales y la respuesta al aumento de los niveles de estrés oxidativo. Varios estudios han demostrado cambios pro-inflamatorios y pro-oxidativos en la SN y en diferentes tejidos de ratas viejas comparado con las jóvenes. Además, se ha visto que los cambios que se producen en el SRA relacionados con la edad están implicados en este estado pro-inflamatorio y pro-oxidativo y en la mayor vulnerabilidad de las neuronas dopaminérgicas con el envejecimiento (Villar-Cheda y col., 2014, 2012). Aunque se pueda esperar una regulación positiva de los receptores AT2 mitocondriales en respuesta a un estado oxidativo relacionado con el envejecimiento, este estudio muestra un aumento en la expresión de los receptores AT1 mitocondriales y una disminución en la expresión de los receptores AT2 mitocondriales en mitocondrias aisladas de ratas viejas en comparación con aquellas aisladas de ratas jóvenes. Esto puede contribuir a la mayor vulnerabilidad de estas células al inducir más estrés oxidativo mitocondrial y cambios en la eficiencia respiratoria, y jugar un papel importante en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas relacionados con la edad, como es el caso de la EP (Jellinger, 2009; Mandemakers y col., 2007).

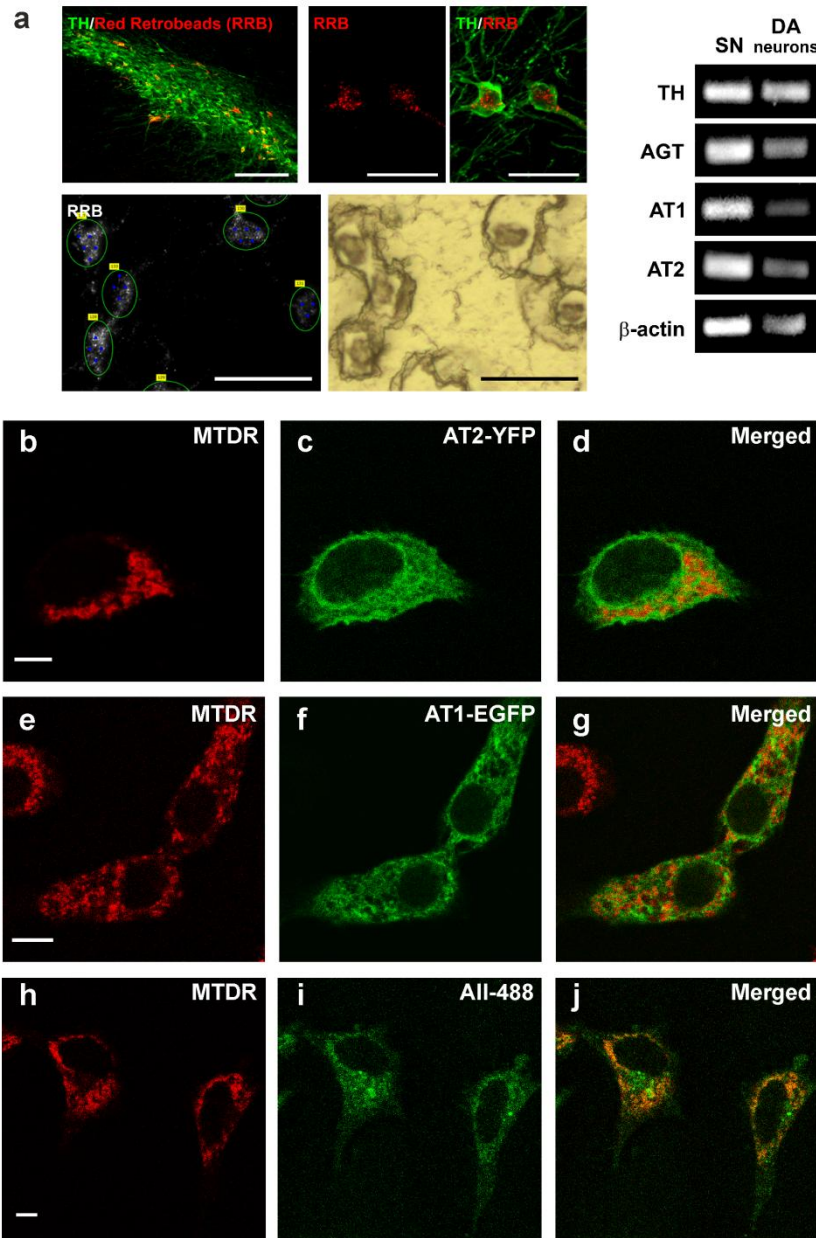
En resumen (**Figura 4.5**), concluimos que existen receptores AT1 y AT2 funcionales en las mitocondrias del cerebro en general, y particularmente de las neuronas dopaminérgicas. La activación de los receptores AT1 mitocondriales produce un aumento de superóxido, a través de la enzima NOX4 mitocondrial, y un incremento tanto de la respiración mitocondrial como de la respiración máxima mitocondrial. La activación de los receptores AT2 mitocondriales provoca una disminución, mediada por NO, de la respiración y la ETS<sub>max</sub> mitocondriales, modulando la fosforilación oxidativa sin alteraciones significativas en el potencial de membrana mitocondrial, lo cual indica que las propiedades bioenergéticas de las mitocondrias no están afectadas. Los receptores AT2 mitocondriales, que son claramente más abundantes que con los AT1 mitocondriales en ratas jóvenes, pueden contrarrestar o modular a nivel mitocondrial los efectos pro-oxidativos de la estimulación con Ang II de la membrana celular y de los receptores AT1 mitocondriales. La regulación de la respiración mitocondrial mediada por AT2 podría representar una primera línea de defensa, no reconocida, contra el estrés oxidativo, siendo particularmente importante en neuronas con niveles de estrés oxidativo elevados, como es el caso de las neuronas dopaminérgicas.

El aumento de la expresión de los receptores AT1 mitocondriales y la disminución de la expresión de los receptores AT2 mitocondriales en la SN de ratas envejecidas en comparación con ratas jóvenes podría jugar un papel importante en la disfunción mitocondrial asociada con el envejecimiento normal, que es el principal factor de riesgo para el desarrollo de la EP y otras enfermedades neurodegenerativas. Existen distintos tipos de medicamentos que actúan

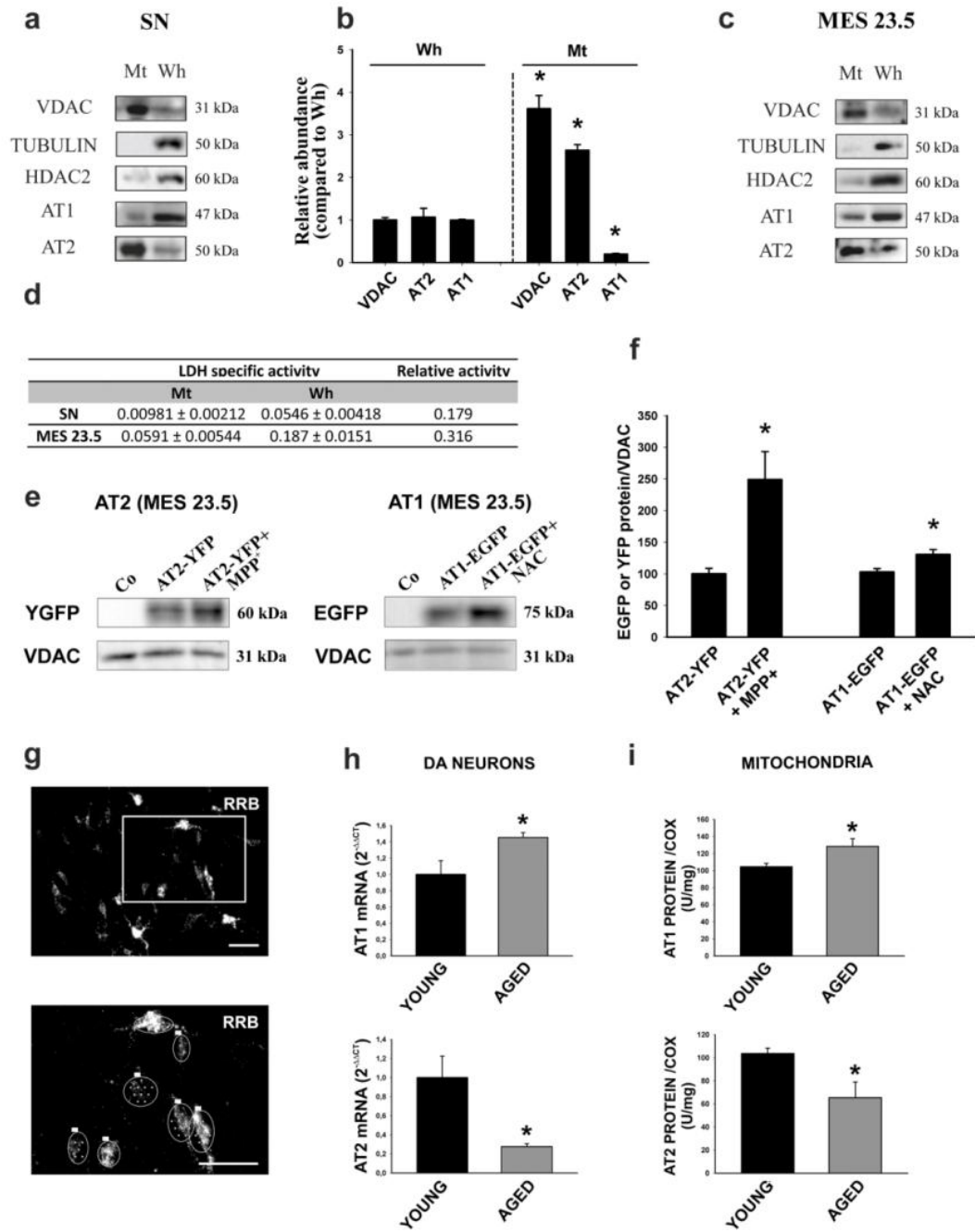
sobre el SRA local y que se usan actualmente en enfermedades vasculares y renales, los cuales se han sugerido como tratamientos potenciales para enfermedades neurodegenerativas, incluyendo EP, basándose en sus efectos sobre los receptores de Ang II de superficie. Sin embargo, los efectos funcionales de los receptores mitocondriales, particularmente los receptores AT2, deben ser tomados en cuenta para el diseño de nuevas estrategias terapéuticas, y especialmente en enfermedades asociadas con un exceso de estrés oxidativo, como es el caso de la EP, pero también en diabetes, obesidad, y la mayoría de las enfermedades cardiovasculares.





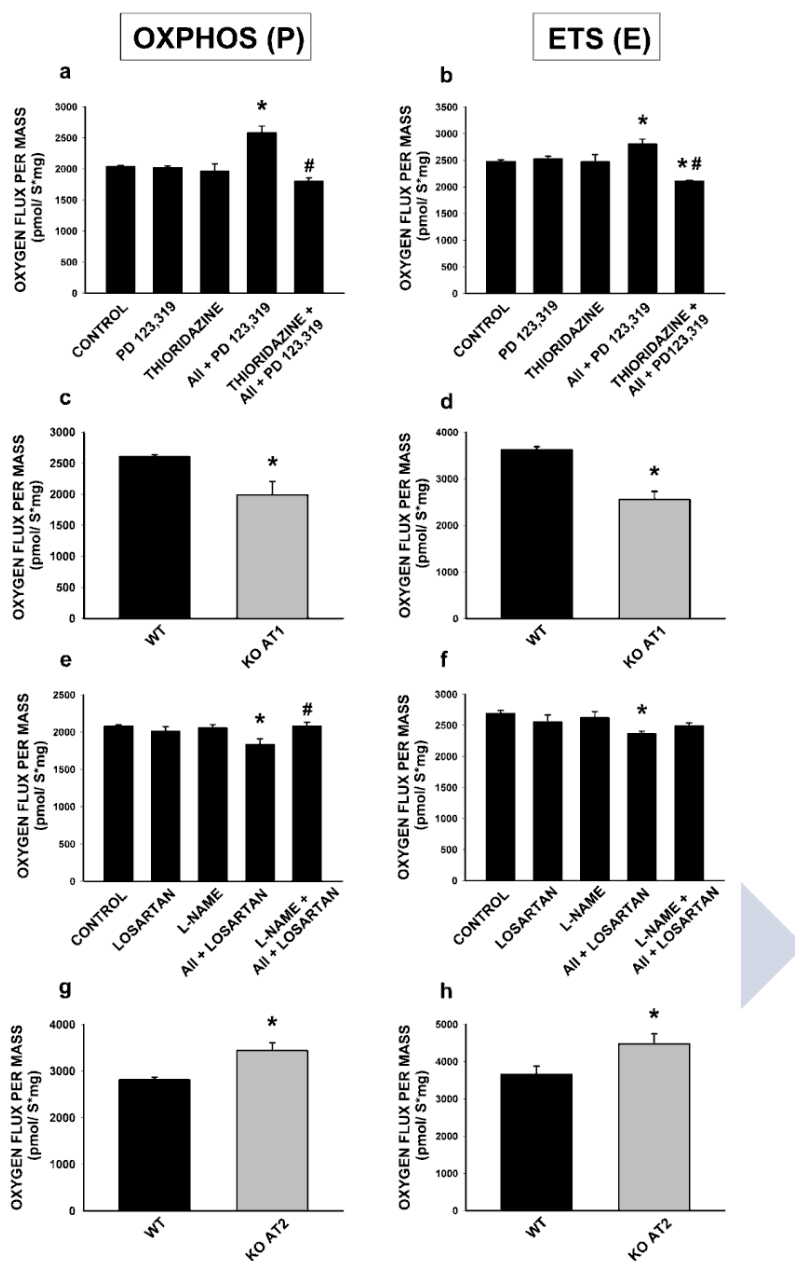


**Figura 4.1. Presencia de los receptores de angiotensina II marcados con fluorescencia y de angiotensina II fluorescente en mitocondrias de neuronas dopaminérgicas.** (a) La expresión de los principales componentes del SRA en neuronas dopaminérgicas se confirmó por RT-PCR y microdissección láser de neuronas dopaminérgicas marcadas retrógradamente por inyección intraestriatal de RRB. Las secciones de SN que muestran neuronas dopaminérgicas marcadas antes y después de la microdissección láser para RT-PCR. Se muestra también la expresión del ARNm de TH, AGT, AT1, AT2 y  $\beta$ -actina en neuronas dopaminérgicas microdisseccionadas por láser (derecha) y homogenados de SN usados como control positivo (izquierda). (b-j) Colocalización (d, g y j) del marcador mitocondrial fluorescente MitoTracker Deep Red (b, e y h) con AT2-YFP (c), AT1-EGFP (f) o All-488 (i). La All-488 fluorescente colocaliza con las mitocondrias tras 8 horas de tratamiento de los cultivos (h-j). Las células transfectadas con AT1-EGFP requirieron el tratamiento simultáneo con el antagonista del receptor AT1, losartán, con el objetivo de minimizar la toxicidad del superóxido inducido por AT1 y la muerte celular. All, angiotensina II, All-488, angiotensina II marcada con Alexa Fluor 488; AT2-YFP, receptor de angiotensina tipo 2 marcado con proteína fluorescente amarilla; AT1-EGFP, receptor de angiotensina tipo 1 marcado con proteína verde fluorescente potenciada; Merged, combinación de los dos colores; MTDR, Mitotracker Deep Red. Barra de escala: (a) 50 y 200  $\mu$ m (secciones de SN); (b-j) 5  $\mu$ m. (Permitido por Nature; Valenzuela y col., 2016)

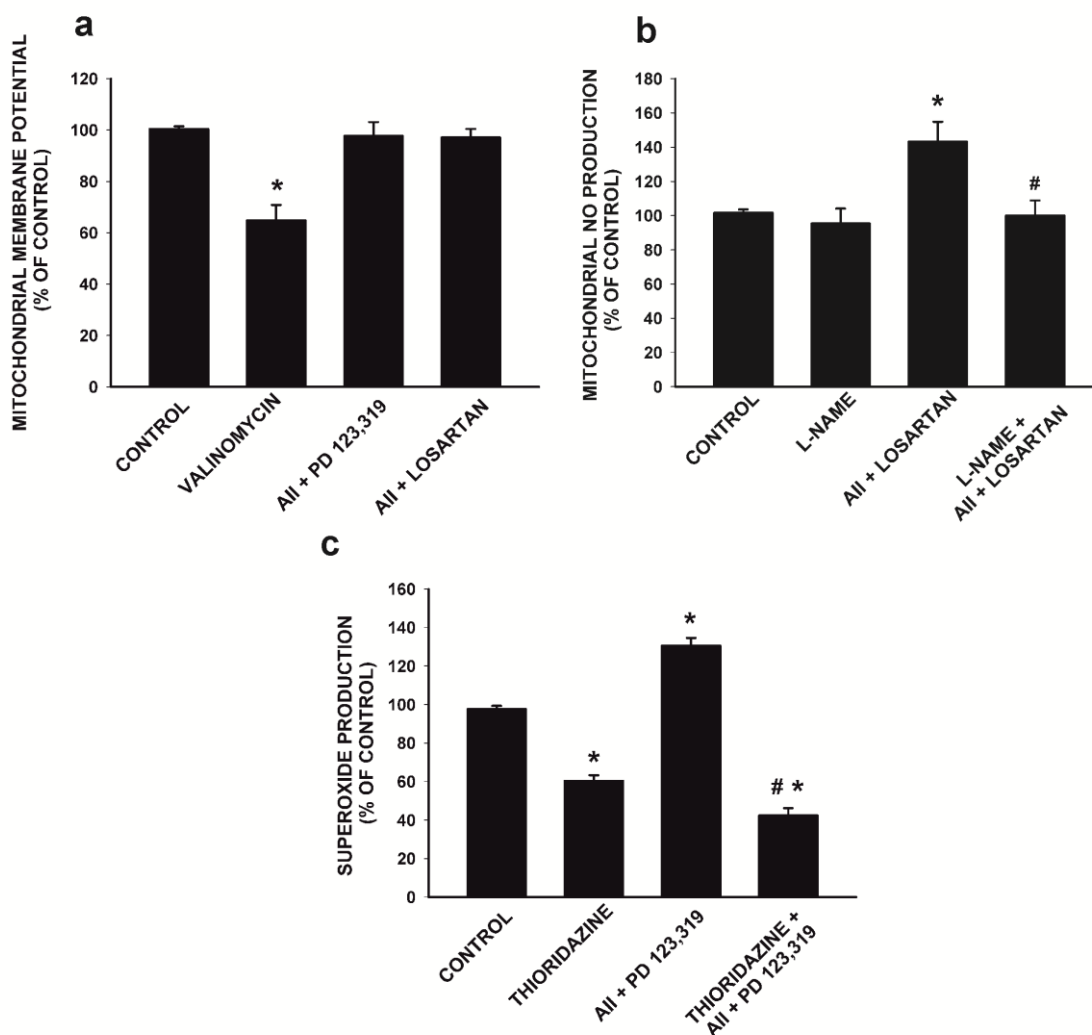


**Figura 4.2. Receptores AT1 y AT2 en mitocondrias aisladas de mesencéfalo ventral y en la línea celular de neuronas dopaminérgicas MES 23.5. Efecto del estrés oxidativo y del envejecimiento.** (a-c) Western blot (WB) del homogenado total (Wh;  $n=4$ ) y mitocondrias aisladas (IM) puras (Mt;  $n=4$ ) de la región de la SN (a) y de las células MES 23.5 (c) mostrando los diferentes marcadores de compartimentos que se usaron para evaluar la pureza de IM: VDAC como marcador mitocondrial, tubulina como marcador del citosol e HDAC2 como marcador nuclear. Se nota la mayor expresión (*Relative abundance*) de los receptores AT2 mitocondriales en comparación con los receptores AT1 mitocondriales (b). (d) Los niveles de la actividad específica (*Specific activity*) de LDH (micromol de sustrato/min/mg; marcador de contaminación de citosol y sinaptosomas) en IM puras de la región de la SN y MES 23.5 (Mt;  $n=6$ ) fueron despreciables en comparación con aquellos en el Wh. (e y f) WB de IM procedentes de células MES 23.5 transfectadas con AT2-YFP ( $n=4$ ) o AT1-EGFP ( $n=3$ ) que muestra la presencia de los receptores de angiotensina marcados con fluorescencia en IM en comparación con las células no transfectadas (Co, control); 24 horas del tratamiento de las células, bajas dosis de MPP<sup>+</sup> ( $n=4$ ) o NAC ( $n=3$ ) provocaron un aumento en la expresión de los receptores AT2 y AT1 mitocondriales, respectivamente (AT2-YFP+MPP<sup>+</sup>; AT1-EGFP+NAC). (g-i) En ratas jóvenes ( $n=3$ ) y ratas viejas ( $n=4$ ), se analizó la expresión de los receptores AT1 y AT2 por RT-PCR en las neuronas dopaminérgicas marcadas con RRB y aisladas por microdissección láser (g, h), y por WB de IM de la región de la SN de ratas jóvenes ( $n=5-8$ ) y viejas ( $n=5-6$ ) (i). El envejecimiento provocó un aumento significativo en la expresión de AT1 y una disminución significativa en la expresión de AT2 tanto en neuronas dopaminérgicas como en IM. Los resultados se normalizaron con los valores de animales jóvenes. Los datos se expresan como la media  $\pm$  el error estándar de la media (SEM). \* $P<0,05$  respecto a los correspondientes controles (prueba t de Student). AT2-YFP, receptor de angiotensina tipo 2 marcado con proteína fluorescente amarilla; AT1-EGFP, receptor de angiotensina tipo 1 marcado con proteína verde fluorescente potenciada; HDAC2, histona desacetilasa 2; IM, mitocondrias aisladas (*Isolated Mitochondria*); LDH, lactato deshidrogenasa; MPP<sup>+</sup>, metilfenilpiridinio; NAC, N-acetil-L-cisteína; RRB, retrobeads rojos; SN, sustancia negra; VDAC, canal de anión dependiente de voltaje; Wh, homogenado total (*Whole Homogenate*). Barra de escala: 50  $\mu$ m. (Permitido por Nature; Valenzuela y col., 2016)

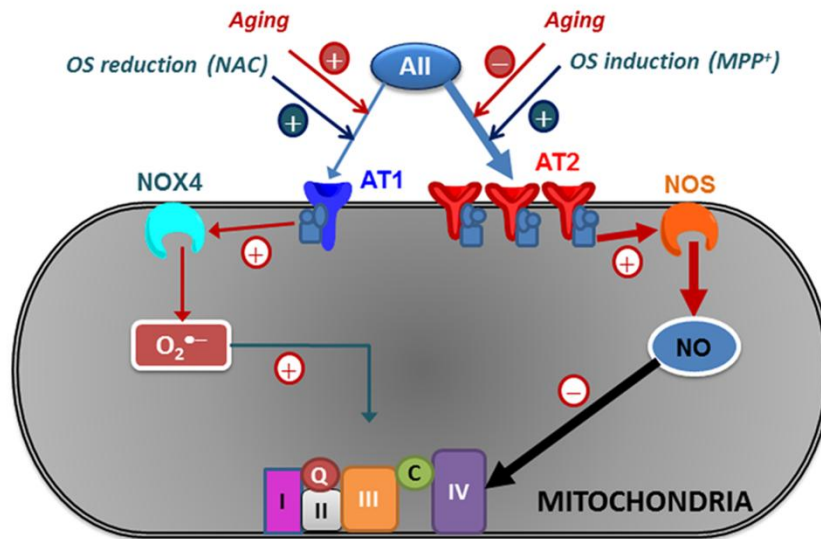




**Figura 4.3. Efecto de los receptores de angiotensina II mitocondriales sobre la respiración mitocondrial.** (a y b) La activación de los receptores mitocondriales AT1 con All (All + PD123,319) provocó un aumento tanto en la fosforilación oxidativa (OXPHOS, P) como en la tasa de respiración máxima (ETS, E), que se inhibió con el pre-tratamiento de las mitocondrias aisladas con el inhibidor de NOX4, tioridazina ( $n=3-8$ ). (c y d) Los ratones *knock-out* para los receptores AT1 (KO AT1;  $n=5$ ) mostraron una tasa de respiración más baja comparados con los ratones controles de tipo salvaje (WT). (e y f) La activación de los receptores mitocondriales AT2 por All (es decir, All + losartán) produjo una disminución significativa en la respiración activa (OXPHOS, P) y en la tasa de respiración máxima (ETS, E) asociados al complejo I, que se bloqueó con la pre-incubación de las mitocondrias aisladas con el inhibidor de la NOS, (L-NAME;  $n=5-8$ ). (g y h) Los ratones que carecen de receptores AT2 (KO AT2;  $n=5$ ) mostraron una actividad respiratoria aumentada en comparación con los ratones WT. Los datos se expresan como la media  $\pm$  el error estándar de la media (SEM). \* $P < 0,05$  comparado con control. # $P < 0,05$  comparado con el grupo tratado con All. Análisis de la varianza de un factor (ANOVA) y test Boferroni post hoc (a, b, e, f) y test t de Student (c, d, g, h). All, angiotensina II; L-NAME,  $N^{\omega}$ -nitro-L-arginina metil ester hidrocloreuro; *Oxygen flux per mass*, flujo de oxígeno por masa; WT, *Wild Type*. (Permitido por Nature; Valenzuela y col., 2016)



**Figura 4.4.** Efecto de los receptores de angiotensina II sobre el potencial de membrana mitocondrial, producción de óxido nítrico y superóxido. (a) En mitocondrias aisladas, la activación de los receptores AT1 y AT2 (All + PD123,319 y All + losartán, respectivamente) no provocó un cambio significativo en el mantenimiento del potencial de membrana mitocondrial (*mitochondrial membrane potential*); sin embargo, el ionóforo de potasio, valinomicina, provocó una pérdida de aproximadamente el 40% del potencial de membrana comparado con las mitocondrias no tratadas ( $n=5$ ). (b) La activación de los receptores AT2 (All + antagonista de AT1 losartán) provocó un aumento en los niveles de NO (*mitochondrial NO production*) que se inhibió con el pretratamiento con el inhibidor de NOS, L-NAME ( $n= 5-8$ ). (c) En mitocondrias aisladas, la activación de los receptores AT1 con All (All + PD123,319) resultó en un aumento de los niveles de superóxido (*superoxide production*). Sin embargo, el tratamiento simultáneo con el inhibidor de NOX4 tioridazina la producción de superóxido mitocondrial hasta un 40% de los controles sin tratar ( $n=4-8$ ). Los datos se expresan como la media  $\pm$  el error estándar de la media (SEM). \* $P<0,05$  comparado con control. # $P<0,05$  comparado con el grupo tratado con All. Análisis de la varianza de un factor (ANOVA) y test Boferroni post hoc. All, angiotensina II; L-NAME, L-arginina metil ester hidrocloreuro; NO, óxido nítrico; NOS, óxido nítrico sintasa; VDAC, canal de anión dependiente de voltaje. (Permitido por Nature; Valenzuela y col., 2016)



**Figura 4.5. Modelo del papel que juegan los receptores AT1 y AT2 en la modulación de la fosforilación oxidativa en mitocondrias cerebrales.** La activación de los receptores AT1 en las mitocondrias regula la producción de superóxido, a través de NOX4, y aumenta la respiración. Los receptores AT2 mitocondriales son mucho más abundantes e inducen, a través de NO, una disminución en la respiración mitocondrial, modulando la fosforilación oxidativa sin alteración significativa en el potencial de membrana mitocondrial, lo que indica que las propiedades bioenergéticas de las mitocondrias no están afectadas. La expresión de los receptores AT2 mitocondriales aumentó después del tratamiento de las células con inductores de estrés oxidativo (*OS induction*; bajas dosis de MPP<sup>+</sup>) y disminuyó con la edad (*aging*). La expresión de los receptores AT1 mitocondriales aumentó con la edad y después del tratamiento de las células con antioxidantes (*OS reduction*; como NAC). A nivel mitocondrial, los receptores AT2 pueden actuar como moduladores y contrarrestar bajos niveles de OS, lo que puede ser particularmente importante en células con niveles aumentados de OS como las neuronas dopaminérgicas. El envejecimiento provoca una alteración en la expresión de los receptores AT1 y AT2 mitocondriales que puede llevar a la disfunción mitocondrial, el principal factor de riesgo para la neurodegeneración. Mitocondria, mitocondria; MPP<sup>+</sup>, metilfenilpiridinio; NAC, *N*-acetil-L-cisteína; NO, óxido nítrico; NOS, óxido nítrico sintasa; O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, superóxido; OS, *Oxidative Stress*. (Permitido por Nature; Valenzuela y col., 2016)

**CAPÍTULO 5:  
EL SISTEMA DE ANGIOTENSINA  
INTRACELULAR AMORTIGUA LOS  
EFECTOS NOCIVOS DEL SISTEMA  
PARACRINO EXTRACELULAR**

---



## **5. EL SISTEMA DE ANGIOTENSINA INTRACELULAR AMORTIGUA LOS EFECTOS NOCIVOS DEL SISTEMA PARACRINO EXTRACELULAR**

### **5.1 INTRODUCCIÓN**

Como ya se mencionó en el capítulo anterior, se ha identificado recientemente un SRA local o tisular en el sistema nervioso central (Re, 2004); que está involucrado en diferentes funciones cerebrales, y que también aparece alterado en algunas enfermedades (Labandeira-Garcia y col., 2014; Wright y Harding, 2013). Además, hemos demostrado la presencia de un SRA local en la sustancia negra pars compacta (SNpc) y en el estriado (ST) de roedores y primates, incluyendo humanos (Garrido-Gil y col., 2013; Labandeira-Garcia y col., 2013; Rodriguez-Pallares y col., 2008); y su relación con el sistema dopaminérgico y la muerte neuronal dopaminérgica. Asimismo, estudios inmunohistoquímicos han demostrado la localización intracelular de varios componentes del SRA en diferentes tipos celulares (Garrido-Gil y col., 2013; Valenzuela y col., 2010; Zawada y col., 2015). Sin embargo, el papel del SRA intracelular, y particularmente de sus componentes nucleares, todavía se desconoce. En este estudio hemos investigado la presencia y el posible papel de los componentes principales del SRA en los núcleos de las células cerebrales. Más concretamente, hemos investigado el posible efecto de los receptores de angiotensina en la transcripción de otros componentes del SRA intracelular y de varias proteínas que actúan como reguladores fundamentales de la función mitocondrial. Nuestros experimentos fueron llevados a cabo en ratas, ratones *Knock-Out* (KO) y transgénicos, así como en la línea celular dopaminérgica MES 23.5. Una gran dificultad para estudiar el papel del SRA intracelular es separar las respuestas inducidas por la Ang II a través de los receptores intracelulares o nucleares de aquellas inducidas por la Ang II extracelular a través de la activación de los receptores de superficie celular. Para superar esta dificultad técnica, investigamos el efecto de la Ang II tanto en células como en núcleos aislados. Nuestros resultados muestran que los receptores de Ang II nucleares controlan eventos clave de la interacción entre núcleo y mitocondria, así como de la supervivencia neuronal.

### **5.2 MATERIAL Y MÉTODOS: DISEÑO EXPERIMENTAL**

En una primera serie de experimentos, se emplearon secciones cerebrales de la sustancia negra (SN) de rata adulta macho Sprague-Dawley y cultivos de la línea celular dopaminérgica MES 23.5 para investigar la presencia de los receptores de Ang II en los núcleos de células dopaminérgicas, usando inmunofluorescencia y microscopía electrónica. En una segunda serie de experimentos, se emplearon núcleos aislados de la región de la SN de rata para confirmar

la presencia de los receptores de Ang II usando la técnica de Western blot (WB). Además, se transfectaron células dopaminérgicas con los receptores AT1 y AT2 marcados fluorescentemente, o se trataron con Ang II fluorescente para investigar la colocalización con los marcadores nucleares, y para confirmar los resultados observados con inmunofluorescencia.

Para estudios funcionales, se emplearon núcleos aislados del cerebro de ratas Sprague-Dawley jóvenes (8-10 semanas de edad) y envejecidas (18-20 meses de edad), así como de ratones jóvenes (8-10 semanas de edad) y envejecidos (18-20 meses de edad), y de la línea celular de neuronas dopaminérgica MES 23.5. Se utilizaron los siguientes grupos de ratones: (1) ratones machos de tipo salvaje (WT, del inglés *Wild Type*) C57BL-6, ratones C57BL-6 jóvenes y viejos homocigotos KO para AT1a; (2) ratones C57BL-6 jóvenes y viejos homocigotos KO para los receptores AT2 (proporcionados por el Dr. Daniel Henrion); (3) ratones C57BL-6 transgénicos, jóvenes y viejos, en los que la SIRT1 está sobreexpresada moderadamente bajo su propio promotor, siguiendo así el patrón fisiológico de expresión (Pfluger y col., 2008), y sus correspondientes controles WT. Los núcleos se incubaron con Ang II (100 nM) y diferentes inhibidores para evaluar el efecto de la activación de los receptores AT1 y AT2 sobre la transcripción ARN mensajero (ARNm), los niveles de superóxido/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, de óxido nítrico (NO, del inglés *Nitric Oxide*) o de calcio nucleares. Los inhibidores usados incluyen: el antagonista de AT1, losartán (3 µM); el antagonista de AT2, PD123,319 (1 µM); el inhibidor de NOX, difenilendonio (DPI, 5 µM); el antioxidante N-acetil-cisteína (NAC; 0,5 mM); el inhibidor de la inositol 1,4,5trifosfato (IP3), 2-aminoetil difenilborinato (2-APB, 50 µM) y el inhibidor de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS), N-nitro-L-arginina metil ester (L-NAME, 100 µM).

## 5.3 RESULTADOS

### 5.3.1 Localización de los receptores de angiotensina II, AT1 y AT2, en el núcleo de neuronas dopaminérgicas.

Previamente se demostró, por estudios de inmunohistoquímica y microscopía confocal por láser, la presencia de los receptores AT1, AT2 y angiotensinógeno en los núcleos de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc y la línea celular dopaminérgica MES 23.5 (Garrido-Gil y col., 2013). En el presente estudio, observamos también colocalización del marcaje de los receptores AT1 y AT2 con el marcador nuclear Hoechst 33342 en la línea celular dopaminérgica MES 23.5 (**Figuras 5.1a y b**). Además, se obtuvieron muestras para microscopía electrónica a partir de los agrupamientos de células dopaminérgicas de la SNC de rata, donde se confirmó el marcaje para los receptores AT1 y AT2 en las membranas nucleares de las neuronas dopaminérgicas (**Figuras 5.1c y d**).

Por otra parte, se aislaron núcleos de la región de la SN del mesencéfalo ventral (MV) (**Figuras 5.1e y f**), y se demostró la calidad del aislamiento por la ausencia de marcadores de la fracción citosólica como la  $\alpha$ -tubulina, y marcadores de membrana como la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa. Además, se confirmó la presencia de la fracción nuclear con el marcador nuclear histona deacetilasa 2 (HDAC2; **Figura 5.1g**). Los dos tipos principales de receptores de la Ang II (es decir, AT1 y AT2) se observaron en la fracción nuclear. Se observó una clara diferencia en la abundancia de ambos tipos de receptores; el receptor AT2 aparecía menos abundante en la fracción nuclear que en el homogenado total celular, mientras que ocurría lo contrario con el receptor AT1 (**Figuras 5.1g y h**). También observamos la presencia de

NOX4, que es la principal fuente de especies oxigenadas reactivas (ROS, del inglés *Reactive Oxygen Species*) intracelular, en la fracción nuclear (**Figuras 5.1g y h**).

### **5.3.2 Efectos de la angiotensina II en los componentes del sistema-renina angiotensina.**

Veinticuatro horas después de la transfección transitoria de la línea celular MES 23.5, los receptores AT1 y AT2 marcados con proteínas fluorescentes (proteína verde fluorescente potenciada, EGFP (del inglés, *Enhanced Green Fluorescent Protein*); proteína amarilla fluorescente, YFP (del inglés, *Yellow Fluorescent Protein*); respectivamente) se localizaron tanto en la membrana citoplasmática como intracelularmente, y colocalizaban con el marcador nuclear Hoechst 33342 (**Figuras 5.2a-f**). En una segunda serie de experimentos, se trataron los cultivos de la línea dopaminérgica MES 23.5 con Ang II conjugada con rodamina, con el objetivo de investigar la localización de la Ang II dentro del núcleo. La Ang II marcada fluorescentemente se internalizó y colocalizó con el marcador nuclear Hoechst 33342, lo cual fue más evidente después de 30 minutos, y persistió 24 horas después del tratamiento (**Figuras 5.2g-i**).

Curiosamente, el tratamiento con Ang II (100 nM) de la línea celular dopaminérgica MES 23.5 aumentó la expresión de AT1-EGFP nuclear en estas células en comparación con los núcleos de las células control. Sin embargo, el mismo tratamiento no provocó un aumento significativo en los niveles de fluorescencia de AT2-YFP nuclear en comparación con las células control. Estos efectos fueron confirmados con la técnica de WB en muestras de núcleos aislados (**Figuras 5.2j-l**).

El análisis por la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR, del inglés *Real Time Polymerase Chain Reaction*) de núcleos aislados de cerebro demostró que el tratamiento con Ang II (100 nM) provocó un aumento significativo en la expresión de ARNm de angiotensinógeno y receptor AT2 (**Figuras 5.3a y b**), así como un aumento en la expresión de ARNm de renina y receptor de (pro)renina (PRR; **Figuras 5.3c y d**). Por el contrario, los niveles de ARNm del receptor AT1 no cambiaron significativamente (**Figura 5.3e**). El aumento en la expresión de ARNm, inducida por la Ang II, de los componentes del SRA, mencionados anteriormente, se inhibió por el tratamiento simultáneo con el antagonista de los receptores AT1, losartán, lo que indica que estos efectos están mediados por los receptores AT1 nucleares. Esto se confirmó con el tratamiento de los núcleos aislados de ratones KO para AT1 y AT2. La Ang II provocó los efectos mencionados anteriormente en los ratones KO AT2, pero no en los ratones KO AT1 (**Figuras 5.3f y g**). Los efectos de la Ang II sobre los núcleos aislados de cerebro se confirmaron en núcleos aislados de la línea celular dopaminérgica MES 23.5, en los cuales el tratamiento con Ang II solo aumentó la expresión de ARNm de los receptores AT2 y angiotensinógeno, pero no la expresión de ARNm de los receptores AT1 (**Figura 5.3h**).

### **5.3.3 Efecto de la angiotensina II sobre la transcripción de PGC-1 $\alpha$ , IGF-1 y SIRT1 en núcleos aislados.**

El tratamiento con Ang II (100 nM) de núcleos aislados provocó un aumento de aproximadamente un 60% en la expresión del ARNm de PGC-1 $\alpha$  y un aumento del doble en la expresión del ARNm de IGF-1. Estos incrementos fueron inhibidos por el tratamiento simultáneo con el inhibidor del receptor AT1, losartán, lo que sugiere que la Ang II actúa a

través de los receptores AT1 nucleares (**Figuras 5.4a y c**). Cuando se trataron con Ang II los núcleos aislados de ratones KO para AT1 y KO para AT2, este efecto se observó en los núcleos de ratones KO AT2, pero no en los núcleos de ratones KO AT1 (**Figuras 5.4b-d**).

Los núcleos aislados también se trataron con Ang II para evaluar su efecto en la expresión del ARNm de SIRT1. Sin embargo, el aumento del ARNm de SIRT1 inducido por la Ang II no fue significativo (**Figura 5.4e**). Para investigar más a fondo la interacción entre SIRT1 y el SRA nuclear, investigamos la expresión de los receptores AT1 y AT2 en núcleos aislados de ratones transgénicos que sobreexpresan SIRT1. Curiosamente, estos ratones mostraron una disminución de los niveles de los receptores AT1 nucleares, pero un aumento significativo de los niveles de los receptores AT2 nucleares (**Figura 5.4f**). Estos resultados, observados en núcleos aislados de la región de la SN del cerebro, se encontraron también en los núcleos de la línea celular dopaminérgica MES 23.5, donde el tratamiento con Ang II también provocó un aumento significativo en la expresión del ARNm de PGC-1 $\alpha$  y de IGF1, y un aumento no significativo en la expresión del ARNm de SIRT1 (**Figura 5.4g**).

#### **5.3.4 Efectos de la angiotensina II sobre los niveles de superóxido/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, calcio y óxido nítrico en núcleos aislados.**

El tratamiento con Ang II de núcleos aislados del cerebro provocó un aumento significativo de los niveles nucleares de superóxido/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que fue inhibido por el tratamiento simultáneo con el inhibidor del receptor AT1, losartán, pero no por el tratamiento simultáneo con el inhibidor del receptor AT2, PD123,319 (**Figura 5.5a**). El aumento de superóxido/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inducido por Ang II fue inhibido también por el tratamiento simultáneo con el antioxidante NAC o por el tratamiento simultáneo con el inhibidor de NOX4, DPI (**Figura 5.5b**). En conjunto, estos resultados sugieren que, a nivel nuclear, la Ang II activa el eje AT1/NOX4 para provocar la liberación de superóxido/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. El papel de los receptores AT1 y AT2 en la liberación de superóxido/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, inducida por la Ang II, se confirmó en núcleos aislados de ratones KO para AT1 y de ratones KO para AT2 (**Figura 5.5c**). Los niveles de superóxido/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fueron significativamente más bajos en núcleos de ratones KO para AT1 que en núcleos de ratones WT. El tratamiento con Ang II de núcleos de ratones KO para AT1 provocó una disminución significativa adicional en los niveles de superóxido/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. En conjunto, estos resultados demuestran un efecto opuesto de los receptores nucleares AT1 (un aumento marcado), y AT2 (una disminución leve) sobre los niveles nucleares de superóxido/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Los resultados hallados en núcleos aislados de cerebro se confirmaron en núcleos aislados de la línea celular dopaminérgica MES 23.5, en los que el tratamiento con Ang II también provocó un aumento significativo en los niveles nucleares de superóxido/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Este efecto fue bloqueado por el tratamiento simultáneo con el inhibidor del receptor AT1, losartán, o el inhibidor de NOX4, DPI, pero no por el tratamiento simultáneo con el antagonista de AT2, PD123,319 (**Figura 5.5d**).

El aumento del ARNm del receptor AT2 o de PGC-1 $\alpha$  (**Figuras 5.3 y 5.4**) no se modificó con el tratamiento simultáneo con el antioxidante NAC o con el inhibidor de NOX, DPI, al menos con las condiciones experimentales llevadas a cabo en este estudio. Esto sugiere que el aumento inducido por la Ang II en los niveles nucleares de superóxido/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no media los efectos sobre la transcripción mencionados anteriormente (**Figuras 5.5e y f**).

Por otra parte, el tratamiento con Ang II de núcleos aislados provocó a un aumento en los niveles de calcio nuclear, que se inhibieron mediante el tratamiento con losartán (inhibidor del receptor AT1), lo que indica que el efecto está mediado por los receptores AT1 (**Figura 5.6a**). Curiosamente, el tratamiento simultáneo, de los núcleos aislados, con el inhibidor del receptor IP3, 2-APB, inhibió el aumento, inducido por Ang II, del ARNm de AT2 y PGC-1 $\alpha$ , sugiriendo que estos efectos están mediados por Ca<sup>2+</sup> a través de los receptores IP3 nucleares (**Figuras 5.6b y c**).

Además, el tratamiento de núcleos aislados con Ang II y el inhibidor de AT1, losartán, provocó un aumento significativo de los niveles de NO, que fue inhibido por el tratamiento simultáneo con el antagonista de AT2, PD123,319 (**Figura 5.6d**). Esto indica que los receptores AT2 nucleares median la producción nuclear de NO inducida por la Ang II. El aumento en los niveles nucleares de NO, inducido por la Ang II, también fue inhibido por el tratamiento simultáneo con el inhibidor de la enzima NOS, L-NAME, lo que indica que la enzima NOS nuclear está involucrada en este proceso.

### 5.3.5 Efecto de la angiotensina II en los núcleos aislados de ratas envejecidas.

Los núcleos aislados del cerebro de ratas envejecidas mostraron una disminución significativa de los niveles de ambos receptores AT1 y AT2 (**Figura 5.7a**). Curiosamente, el tratamiento de estos receptores con 100 nM de Ang II no provocó un aumento significativo de la expresión del ARNm de IGF-1, PGC-1 $\alpha$  o AT2 (**Figura 5.7b**). Del mismo modo, el aumento de los niveles de superóxido/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inducidos por la Ang II no fue estadísticamente significativo en estos núcleos (**Figura 5.7c**). Al igual que se observó en núcleos de ratones KO AT1 jóvenes, los niveles de superóxido/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fueron significativamente más bajos en ratones KO AT1 envejecidos que en ratones WT envejecidos. El tratamiento con Ang II en los núcleos de ratones KO AT1 envejecidos no provocó un aumento significativo en los niveles superóxido/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, como se observó previamente en ratones KO AT1 jóvenes (**Figura 5.7d**).

## 5.4 DISCUSIÓN

En este estudio, hemos demostrado la presencia de los receptores AT1 y AT2, así como de la enzima NOX4, en núcleos aislados de células cerebrales. Los receptores AT1 se expresan más abundantemente en núcleos aislados que en el homogenado total celular, mientras que sucede lo opuesto para los receptores AT2. Curiosamente, hemos observado lo contrario en mitocondrias aisladas, donde los receptores AT2 son mucho más abundantes que los receptores AT1 (Valenzuela y col., 2016). El tratamiento con Ang II de la línea celular dopaminérgica provocó un aumento en la expresión de Ang II y de los receptores AT1 nucleares. Por el contrario, el tratamiento de núcleos aislados con Ang II provocó, a través de la activación de AT1, un aumento en la transcripción del ARNm de AT2, pero no del ARNm de AT1. Se ha observado la presencia de los receptores AT1 en varios tipos de células periféricas, sin embargo, la función de los receptores de angiotensina nucleares no está clara (Cook y Re, 2012; Re y Cook 2015). En células renales, se ha demostrado una rápida internalización del complejo Ang II-receptor AT1, a través de endocitosis mediada por receptor (Hunyady, 1999; Thekkumkara y Linas, 2002; Ullian y Linas, 1989). Los receptores AT2 carecen de una secuencia canónica de localización nuclear, al contrario que los receptores AT1, que si la poseen, y generalmente los receptores AT2 no se internalizan después de la activación por ligando en células vasculares o renales (Gwathmey y col., 2011;

Tadevosyan y col., 2010). Se ha sugerido que el SRA intracelular puede servir para amplificar eventos que son iniciados en la membrana plasmática, provocando una amplificación de señales en pasos sucesivos con reutilización y gasto mínimo (Carey, 2012; Cook y Re, 2012). Por el contrario, los resultados de este estudio sugieren que el SRA intracelular, y particularmente el nuclear, puede contrarrestar y modular los efectos nocivos de la activación del eje Ang II/AT1 de membrana (**Figura 5.8**). La Ang II extracelular (es decir, paracrina) provoca una activación del eje AT1/NOX2 de membrana, con la generación de superóxido/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y estrés oxidativo, pero también induce la internalización al núcleo del complejo Ang II-AT1. Hemos observado que la activación de los receptores AT1 nucleares por la Ang II intracelular desencadena una serie de mecanismos que protegen a las células contra el estrés oxidativo. Estos mecanismos incluyen, un aumento de los niveles de los receptores AT2 y de Ang II intracelular, así como de PGC-1 $\alpha$  e IGF-1. Curiosamente, este mecanismo protector está alterado en núcleos aislados de cerebros de animales envejecidos.

#### **5.4.1 Efectos de la activación del eje angiotensina II/AT1 nuclear sobre los componentes del sistema renina-angiotensina nuclear.**

La activación de los receptores AT1 por la Ang II provoca un aumento en la expresión de ARNm del receptor AT2. Esto puede conducir a un aumento de los receptores AT2 protectores que se dirigen a diferentes estructuras celulares como las mitocondrias y la membrana. Se ha observado, en diferentes estudios, un aumento compensatorio en el brazo opuesto o protector del SRA (es decir, Ang II/AT2) después del aumento de la actividad del eje de membrana Ang II/AT1/NOX2/Superóxido (Padia y Carey, 2013; Villar-Cheda y col., 2010; Wang y col., 2012). De acuerdo con esto, recientemente hemos demostrado que los receptores AT2 son particularmente abundantes en mitocondrias y que los receptores AT2 mitocondriales, a través de NO, regulan a la baja la respiración mitocondrial para contrarrestar el estrés oxidativo en neuronas (Valenzuela y col., 2016). En este estudio, hemos observado que la activación de los receptores AT2 aumenta los niveles nucleares de NO, y nuestras observaciones en ratones KO para AT1 y para AT2, sugieren que los receptores AT2 nucleares modulan los efectos de los receptores AT1 nucleares. Además del aumento de la expresión de ARNm de AT2, la activación de los receptores AT1 nucleares por Ang II provocó un aumento en la expresión del ARNm de angiotensinógeno, renina y receptores renina-prorenina, lo cual indica que un aumento en la síntesis de Ang II intracelular puede actuar adicionalmente sobre los receptores AT2 intracelulares para contrarrestar el daño oxidativo.

#### **5.4.2 Efectos de la activación del eje angiotensina II/AT1 nuclear sobre la transcripción de PGC-1 $\alpha$**

La activación de los receptores AT1 nucleares también provocó un aumento en la expresión del ARNm de PGC-1 $\alpha$ . Los miembros de la familia PGC-1 han surgido como reguladores transcripcionales principales de la función mitocondrial que mejoran o rescatan la disfunción mitocondrial (Finley y Haigis, 2009; Scarpulla, 2008a; St-Pierre y col., 2006; Tang, 2016). En las neuronas dopaminérgicas, PGC-1 $\alpha$  ha demostrado ser esencial para la supervivencia, posiblemente a través del mantenimiento de la función mitocondrial, ya que los ratones KO condicionales para PGC-1 $\alpha$  muestran una pérdida significativa de este tipo de neuronas (Ciron y col., 2015; Jiang y col., 2016), mientras que la sobreexpresión de PGC-1 $\alpha$  protege a las neuronas dopaminérgicas (Borniquel y col., 2006; Ciron y col., 2015; Jiang y

col., 2016; Mudò y col., 2012; Zheng y col., 2010). Estos resultados muestran que la activación de los receptores AT1 nucleares por la Ang II provoca un aumento en la expresión de PGC-1 $\alpha$  que puede contrarrestar el efecto pro-oxidativo de la activación de los receptores AT1 superficiales de membrana. Los receptores AT2 nucleares modulan este proceso contrarrestando los efectos de los receptores AT1 nucleares.

#### **5.4.3 Efecto de la activación del eje angiotensina II/AT1 nuclear sobre la transcripción de IGF-1 y SIRT1.**

También investigamos el efecto de la activación de los receptores AT1 nucleares sobre dos factores adicionales, IGF-1 y SIRT1, que se ha demostrado, en estudios realizados a nivel celular y de tejidos, que modulan la función mitocondrial y que interactúan con el SRA (Díaz-Ruiz y col., 2015; Rodríguez-Pérez y col., 2016). Se ha encontrado que el IGF-1 aumenta la supervivencia de neuronas dopaminérgicas (Kao, 2009; Offen y col., 2001; Quesada y col., 2007), y la activación de los receptores AT1 nucleares aumenta la expresión del ARNm de IGF-1. Se han relacionado los efectos citoprotectores de IGF-1 con la protección mitocondrial, que conduce a una reducción de la producción de radicales libres, daño oxidativo y apoptosis (Puche y col., 2008; Sádaba y col., 2016). Se ha sugerido que IGF-1 inhibe la muerte neuronal desencadenada por estresores oxidativos a través del aumento en la expresión de SIRT1 (Vinciguerra y col., 2009).

SIRT1 está presente en el núcleo y el citoplasma. Tiene la función de deacetilar varias proteínas involucradas en la supervivencia celular, metabolismo y respuesta al estrés, y estimula la resistencia al estrés oxidativo en varios tipos celulares (Tanno y col., 2010). Varios estudios han llegado a la conclusión de que SIRT1 ejerce su función sobre la función mitocondrial principalmente regulando la actividad de PGC-1 $\alpha$  (Finley y Haigis, 2009; Tang, 2016; Yuan y col., 2016). En un estudio reciente, observamos que la Ang II provocó un aumento en la expresión de SIRT1 en neuronas dopaminérgicas y microglía (Díaz-Ruiz y col., 2015). Sin embargo, en núcleos aislados, la activación de los receptores AT1 nucleares no provocó un aumento significativo de la expresión del ARNm de SIRT1. Esto sugiere que ciertos componentes localizados en el citoplasma están involucrados en el aumento de la expresión de SIRT1 inducida por la activación de Ang II/AT1 de membrana. El aumento de la expresión de IGF-1, mencionado anteriormente, puede ser un posible mecanismo, ya que se ha observado en cardiomiocitos que el IGF-1 provocó un aumento en la expresión de SIRT1 (Vinciguerra y col., 2009). Nuestras investigaciones en núcleos aislados de ratones transgénicos que sobreexpresan SIRT1, sugieren la implicación de los receptores de angiotensina nucleares en la regulación de los niveles de SIRT1. La sobreexpresión de SIRT1 provocó una disminución en la expresión de los receptores AT1 nucleares y un aumento en la expresión de los receptores AT2 nucleares, lo que sugiere una posible regulación de retroalimentación del mecanismo mencionado anteriormente. Esto es coherente con observaciones que muestran que la sobreexpresión de SIRT1 en células musculares regula a la baja PGC-1 $\alpha$  (Gurd y col., 2009). En resumen, la activación de los receptores AT1 nucleares por la Ang II puede desencadenar un mecanismo compensatorio aumentando tanto PGC-1 $\alpha$  como SIRT1 a través de IGF-1.

#### **5.4.4 Efecto de la activación del eje angiotensina II/AT1 nuclear sobre los niveles de calcio y superóxido/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nucleares**

Hemos observado que la activación de los receptores AT1 nucleares provoca un aumento de los niveles nucleares tanto de superóxido/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como de Ca<sup>2+</sup>, que se ha demostrado que activan vías de señalización que influyen en la expresión génica en diferentes tipos de células. La señalización nuclear de Ca<sup>2+</sup> es un importante regulador de la transcripción génica (Bezin y col., 2008) y los receptores IP3 están implicados en la señalización de Ca<sup>2+</sup> (Kusnier y col., 2006). Se ha demostrado que el calcio se une directamente a factores de transcripción como DREAM (Carrión y col., 1999), o activa las vías nucleares de CaM kinasa que regula la expresión génica (Chawla, 2002). En este estudio, la inhibición de los receptores IP3 nucleares bloqueó el aumento de la expresión del ARNm de PGC-1 $\alpha$  y AT2 inducido por la Ang II, lo que sugiere que la señalización del Ca<sup>2+</sup> está involucrada en estos cambios transcripcionales.

También se ha sugerido que NOX4 regula la expresión génica de una manera dependiente de la secuencia de ADN reguladora del elemento de reconocimiento Maf, que constituye parte de la respuesta antioxidante (Hoshino y col., 2000). Inesperadamente, el tratamiento simultáneo de núcleos aislados con Ang II y el antioxidante NAC o el inhibidor de NOX, DPI, no inhibió el aumento de la expresión de AT2 o PGC-1 $\alpha$ , al menos en las condiciones experimentales de este estudio. El superóxido/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> derivado de NOX puede estar involucrado en la transcripción de otros factores de respuesta antioxidante, posiblemente relacionados con adaptaciones horméticas al estrés oxidativo similares a aquellas descritas en la mitocondria (Yun y Finkel, 2014).

#### **5.4.5 Papel del sistema renina-angiotensina nuclear en el envejecimiento**

El envejecimiento es el mayor factor de riesgo para enfermedades neurodegenerativas, particularmente para la EP. En estudios previos, observamos que las ratas envejecidas muestran un aumento en la actividad del eje Ang II/AT1/NOX2 (Rodríguez-Perez y col., 2012; Villar-Cheda y col., 2014, 2012), lo que provoca unos niveles aumentados de estrés oxidativo y marcadores neuroinflamatorios en la región de la SN. Los animales envejecidos mostraron un importante aumento de los receptores AT1, así como una marcada disminución de la expresión de los receptores AT2 en homogenados de cerebro (particularmente homogenados de SN y ST). Sin embargo, las ratas envejecidas también mostraron una disminución de los niveles de IGF-1 y SIRT1 en la región de la SN (Díaz-Ruiz y col., 2015; Rodríguez-Perez y col., 2016). Estos resultados explican estas diferencias aparentemente paradójicas entre ratas jóvenes y viejas. Los núcleos de ratas viejas mostraron una disminución significativa en los niveles de ambos receptores nucleares, AT1 y AT2, y el tratamiento de los núcleos de ratas viejas con Ang II no provocó un aumento significativo en los niveles nucleares de superóxido/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, o en la expresión del ARNm de AT2, angiotensinógeno, IGF-1 o PGC-1 $\alpha$ . Esto sugiere que la respuesta compensatoria nuclear, descrita anteriormente, desencadenada por los receptores AT1 nucleares está alterada en células envejecidas, lo que conduce a la disminución en la expresión de AT2, IGF-1 y SIRT1 observada en animales envejecidos. En un estudio reciente, observamos que la expresión de los receptores AT2 está disminuida en mitocondrias de ratas viejas, lo que puede afectar a la protección mitocondrial contra el estrés oxidativo (Valenzuela y col., 2016). El deterioro de la función y biogénesis mitocondriales se ha postulado como un hito central del envejecimiento, que se ha relacionado con una disminución de la función PGC/mitocondria junto con una

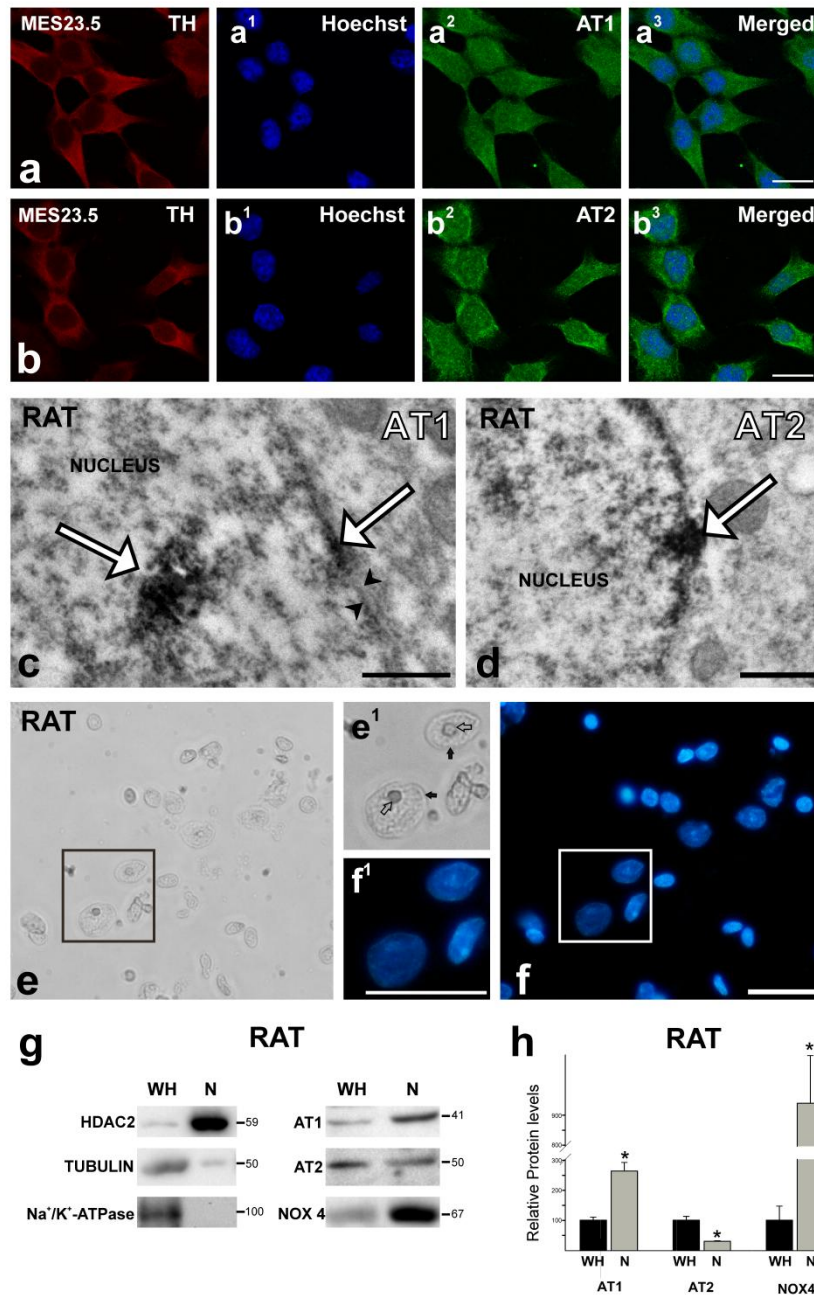
disminución en la expresión de mecanismos de defensa oxidativa regulados por PGC (Yuan y col., 2016).

## 5.5 CONCLUSIÓN

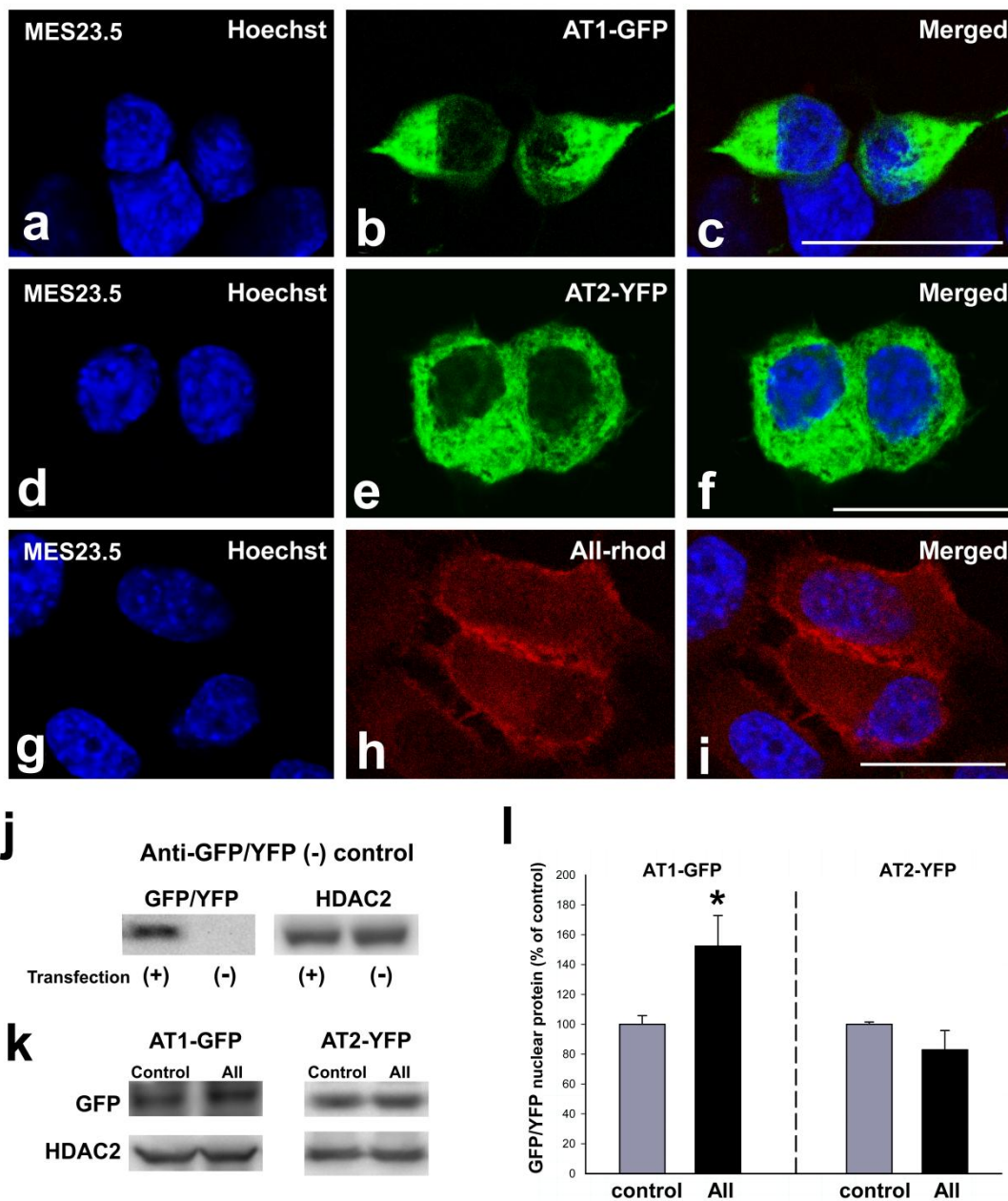
Este estudio, y los resultados de nuestra reciente investigación (Valenzuela y col., 2016), sugieren que el SRA intracelular puede amortiguar los efectos pro-oxidativos de la activación de los receptores AT1 de membrana por la Ang II extracelular (paracrina). La internalización del complejo Ang II-AT1 al núcleo y la activación de los receptores AT1 nucleares por Ang II intracelular desencadena una serie de mecanismos que pueden proteger a las células contra el estrés oxidativo. Curiosamente, este mecanismo de protección está alterado en núcleos del cerebro de animales envejecidos. Estudios previos en células no neuronales han sugerido que el SRA intracelular puede servir para amplificar eventos que son iniciados en la membrana plasmática. Sobre esta base, se supuso que la Ang II intracelular contribuye a la progresión de la enfermedad, y que los inhibidores del receptor AT1, que son eficaces contra los receptores extracelulares e intracelulares, o los recientes inhibidores de renina que actúan a niveles extra e intracelulares pueden ser más eficaces para combatir los efectos de la hiperactividad del SRA en diferentes tejidos. Curiosamente, se ha observado que algunos inhibidores de AT1, como el candesartán, actúan principalmente sobre receptores de superficie, y otros inhibidores de AT1, como el losartán, actúan tanto sobre receptores de superficie como intracelulares (Cook y col., 2001). Este estudio indica que, al menos en cerebro, los inhibidores del receptor AT1 que actúen solo sobre el SRA extracelular o paracrino pueden ofrecer mejor protección a las células.



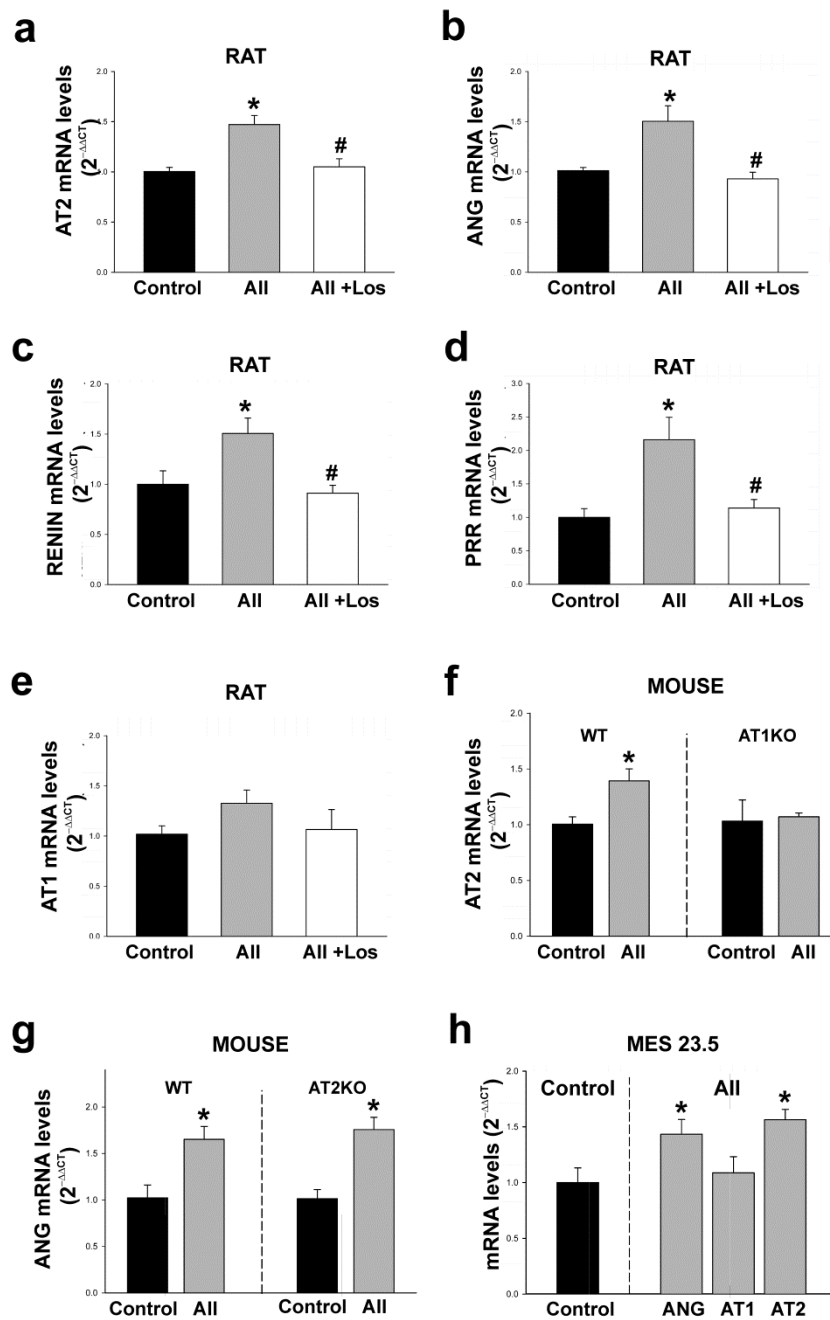




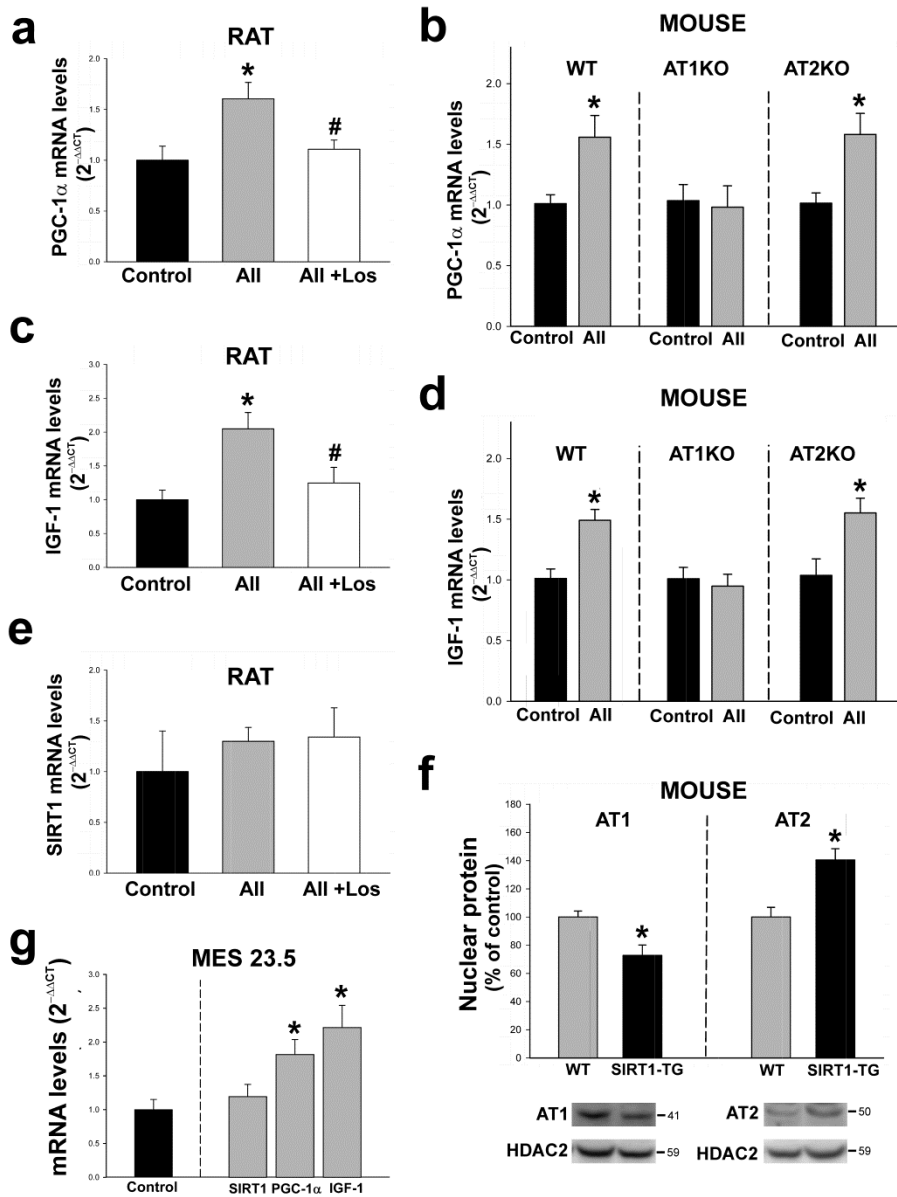
**Figura 5.1.** Los receptores AT1, AT2 y NOX4 en núcleos de las neuronas dopaminérgicas MES 23.5 y de la región de la sustancia negra de rata. (a y b) Las neuronas dopaminérgicas de la línea MES 23.5 mostrando triple inmunofluorescencia para el marcador dopaminérgico (TH), el marcador nuclear (Hoechst), y receptores AT1 (a) o AT2 (b). (c y d) Microscopía electrónica del marcaje de AT1 y AT2 (flechas blancas) en núcleos y membranas nucleares (entre las cabezas de flechas negras) de las neuronas dopaminérgicas de rata. (e y f) Núcleos aislados de la región de la SN de rata; la integridad de los núcleos se confirmó con microscopio de contraste de fases (e) y marcaje con Hoechst (f); las áreas de los cuadrados en e y f se magnificaron en e<sup>1</sup> y f<sup>1</sup>, respectivamente. (g) Western blot del homogenado total (WH) y núcleos aislados (N) de la región de la SN mostrando la expresión de los receptores AT1 y AT2, y de NOX4, así como los diferentes marcadores de compartimentos usados para evaluar la pureza de los núcleos aislados (HDAC2 como marcador nuclear; tubulina como marcador de citosol; y Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa como marcador de membrana plasmática). (g y h) Se observa la mayor expresión de AT1 y la menor expresión de AT2 en los núcleos en comparación con el WH. Los datos se expresan como la media ± el error estándar de la media (SEM). \*P<0,05 comparado con el WH. Test t de Student (n=3-4). HDAC2, histona descetilasa 2; Merged, combinación de los dos colores; SN, sustancia negra; WH, homogenado total (*Whole Homogenate*). Barras de escala: 150 μm (a y b), 0,5 μm (c y d) y 50 μm (e y f). (Permitido por Nature; Villar-Cheda y col., 2017)



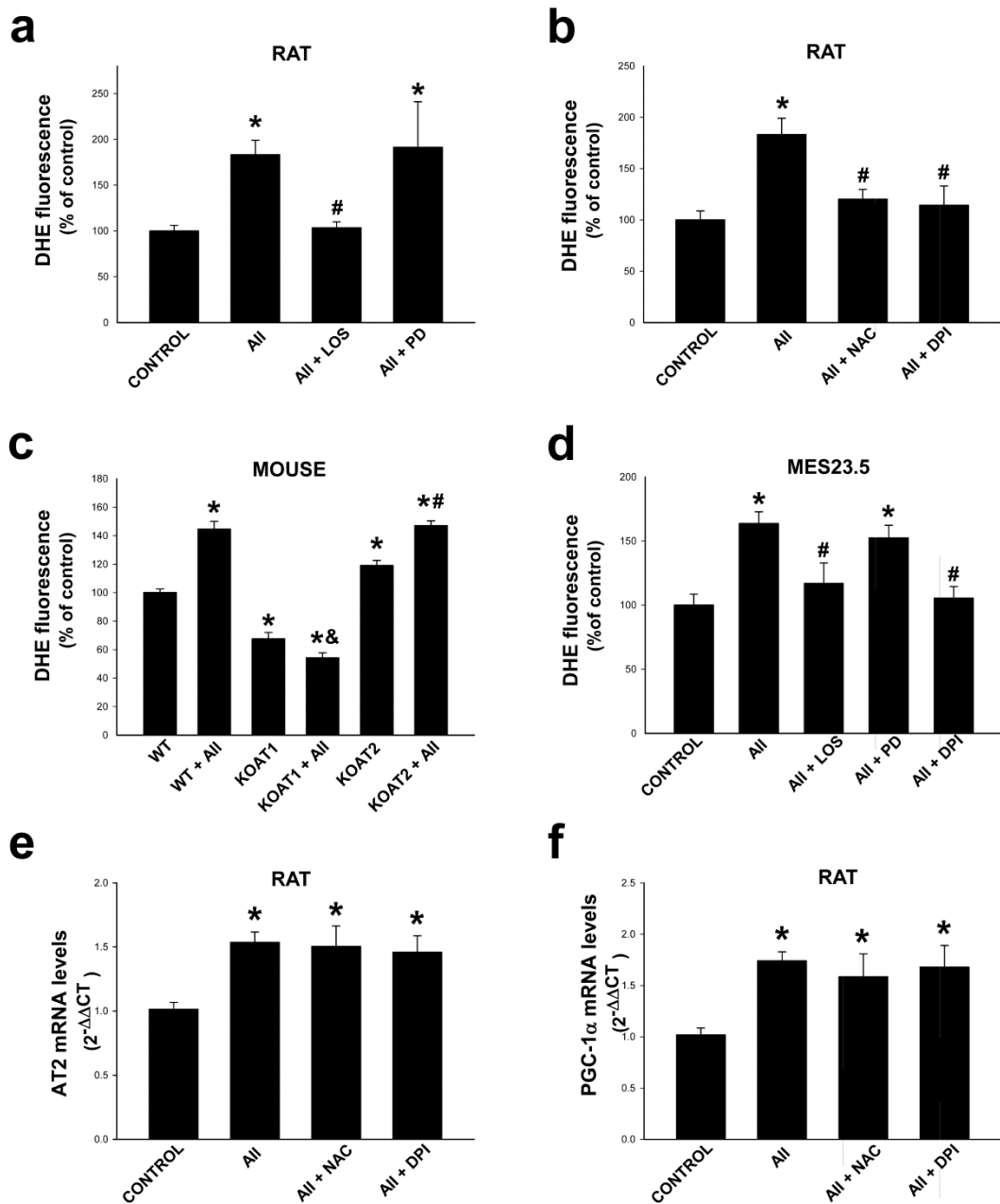
**Figura 5.2.** Presencia de los receptores de angiotensina II marcados con fluorescencia y angiotensina II fluorescente en núcleos. Colocalización (c, f e i) del marcador nuclear fluorescente Hoechst (a, d y g) con AT1-EGFP (b), AT2-YFP (e) o All-Rhod (h). Análisis por Western blot de proteínas marcadas con GFP-/YFP- en células MES 23.5 transfectada (+) y no transfectadas (-) mostrando la especificidad del anticuerpo común anti-GFP/YFP (j). Tratamiento con All de la línea celular de neuronas dopaminérgicas MES 23.5 aumentó la proteína del receptor AT1-EGFP nuclear pero no la proteína del receptor AT2-YFP nuclear en relación con los núcleos d células control (k y l). Los datos se expresan como la media  $\pm$  el error estándar de la media (SEM). \*P<0,05 comparado con control. Test t de Student ( $n=3-4$ ). All, angiotensina II; All-Rhod, angiotensina II marcada con rodamina fluorescente; AT1-EGFP, AT1 marcado con EGFP; AT2-YFP, AT2 marcado con YFP; Merged, combinación de los dos colores. Barra de escala: 20  $\mu$ m (a-i). (Permitido por Nature; Villar-Cheda y col., 2017)



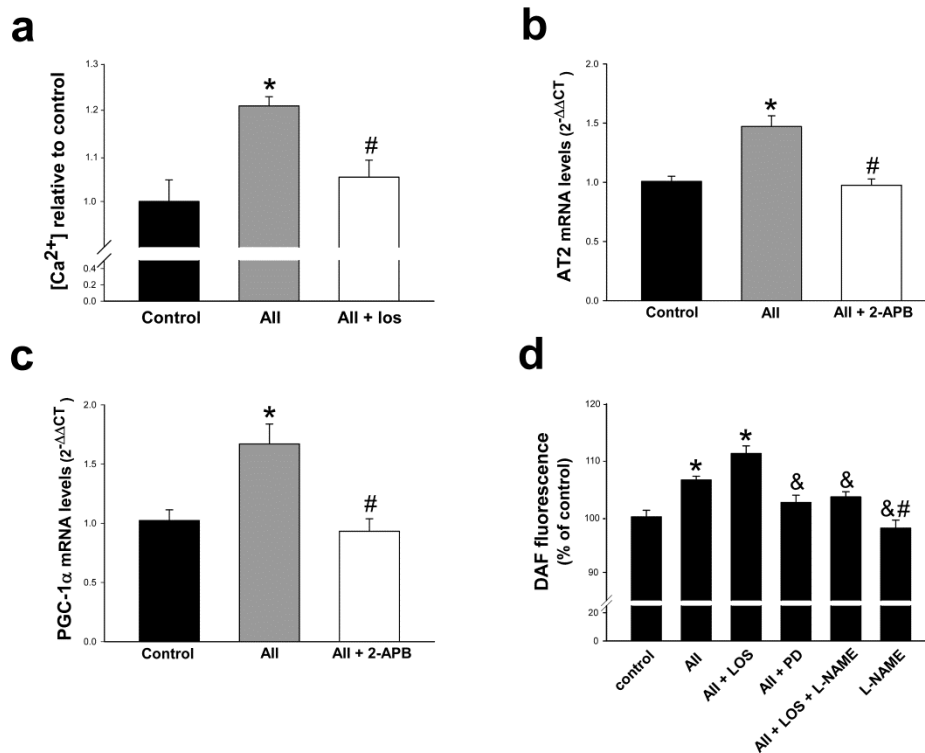
**Figura 5.3.** Efecto de la angiotensina II sobre la transcripción de diferentes componentes del sistema renina angiotensina. El tratamiento con All de núcleos aislados de cerebro de rata provocó un aumento en la expresión del ARNm (*mRNA levels*) de AT2 (a), ANG (b), renina (c) y PRR (d), que se inhibió por el tratamiento simultáneo con el antagonista del receptor AT1 losartán, lo que indica que estos efectos están mediados a través de los receptores AT1. Por el contrario, los niveles de ARNm del receptor AT1 no cambiaron significativamente después de la administración de All (e). El papel de los receptores AT1 se confirmó en núcleos aislados de ratones KO para AT1 y AT2 tratados con All (f y g). El efecto de All sobre los núcleos aislados de cerebro también se observó en núcleos de la línea de neuronas dopaminérgicas MES 23.5 (h). Los datos se expresan como la media  $\pm$  el error estándar de la media (SEM). \* $P < 0,05$  comparado con el grupo tratado con All. Análisis de la varianza de un factor (ANOVA) y test Holm-Sidak *post hoc* (a-e) y test de Student (f-h) ( $n=4-8$ ). All, angiotensina II; ANG, angiotensinógeno; KO, *knock-out*; Los, losartán; PRR, receptor de (pro) renina. (Permitido por Nature; Villar-Cheda y col., 2017)



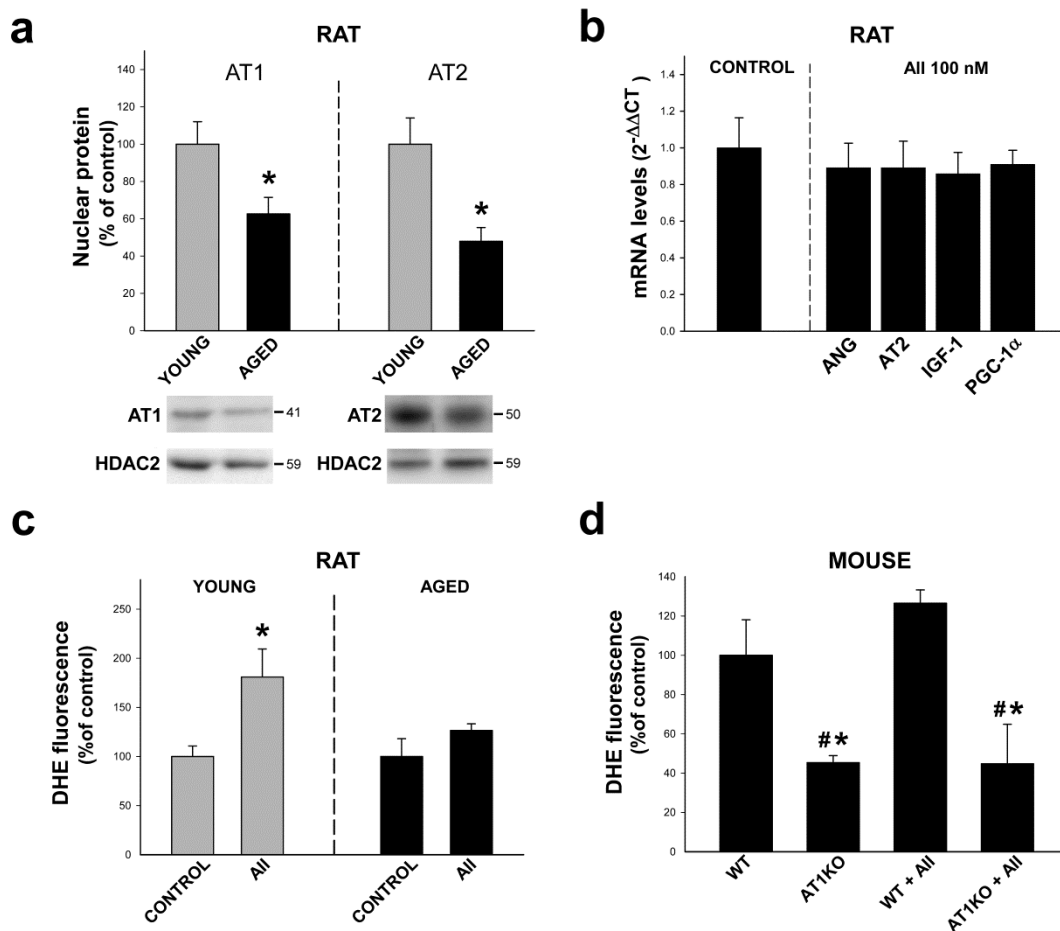
**Figura 5.4. Efecto de la angiotensina II sobre la transcripción de PGC-1α, IGF-1 y SIRT1.** El tratamiento de núcleos aislados con All provocó un aumento de la expresión del ARNm (*mRNA levels*) de PGC-1α (a) e IGF-1 (c), que se inhibió con el tratamiento simultáneo con el antagonista del receptor AT1 losartán, lo que indica que estos aumentos están mediados a través de los receptores AT1. Esto se confirmó por el tratamiento con All de núcleos aislados de cerebro de ratones KO para AT1 y AT2 (b y d). La expresión del ARNm de SIRT1 no cambió significativamente después del tratamiento con All de núcleos aislados (e). Sin embargo, núcleos aislados de ratones que sobreexpresan SIRT1 (SIRT1-TG) mostraron una disminución en la expresión (*nuclear protein*) de AT1 nuclear, y un aumento en los niveles de los receptores AT2 (f). Los efectos de All sobre los núcleos aislados de cerebro también se observaron en núcleos de la línea celular de neuronas dopaminérgica MES 23.5 (g). Los datos se expresan como la media ± el error estándar de la media (SEM). \*P<0,05 comparado con control o WT (f), #P<0,05 comparado con el grupo tratado con All. Análisis de la varianza de un factor (ANOVA) y test Holm-Sidak *post hoc* (a, c y e) y test de Student (b, d, f y g) (n=4-8). All, angiotensina II; KO, *knock-out*; Los, losartán; WT, tipo salvaje (*Wild Type*). (Permitido por Nature; Villar-Cheda y col., 2017)



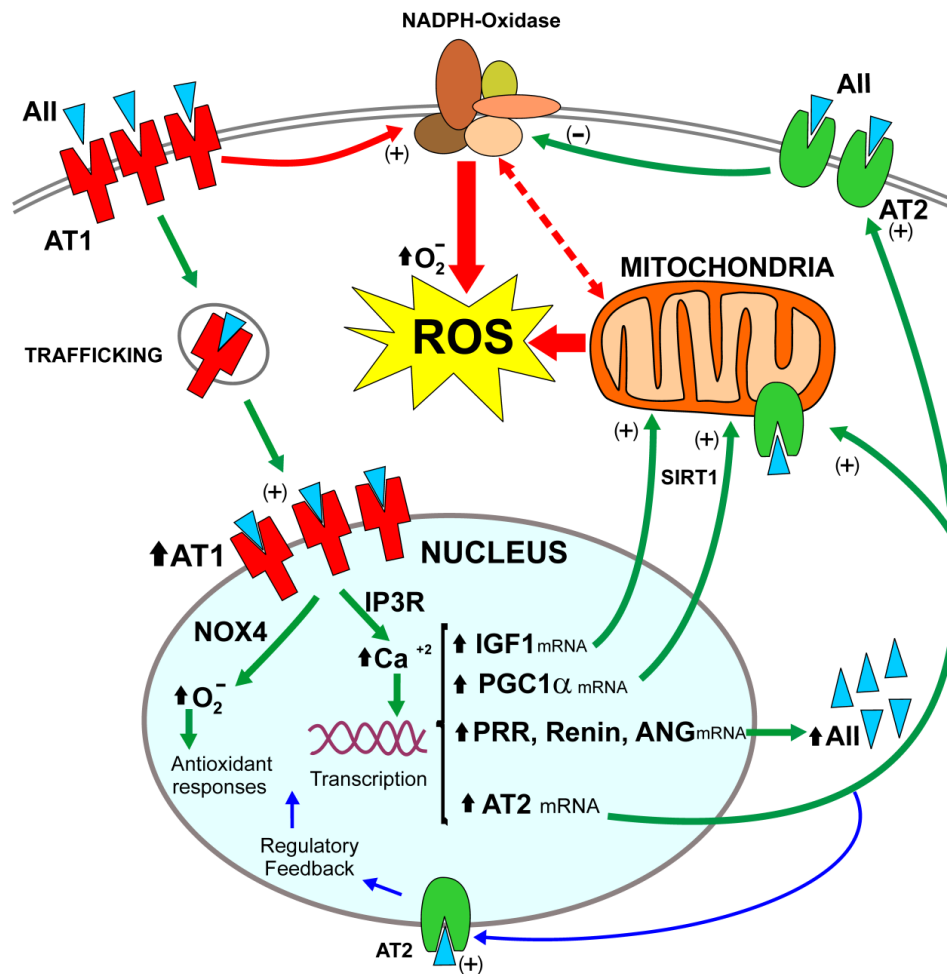
**Figura 5.5.** Efecto de la angiotensina II sobre la producción de superóxido/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nuclear y expresión del ARNm de AT2 y PGC-1 $\alpha$ . El tratamiento de núcleos aislados con All aumentó los niveles de superóxido/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (*DHE fluorescence*; a-d), y se inhibió con el tratamiento simultáneo con el antagonista del receptor AT1 losartán (a), el antioxidante NAC y el inhibidor de NOX, DPI (b), pero no con el antagonista del receptor AT2, PD123,319 (a). La participación de AT1 en estos efectos se confirmó con el tratamiento de núcleos procedentes de ratones KO AT1 y AT2 con All, lo que también reveló un efecto opuesto de los receptores AT1 (aumento) y AT2 nucleares (disminución) sobre los niveles de superóxido/ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nucleares (c). El efecto de la All sobre los núcleos cerebrales también se observó en núcleos procedentes de la línea celular de neuronas dopaminérgicas MES 23.5 (d). Sin embargo, los efectos de la All sobre la expresión de ARNm (*mRNA levels*) de AT2 (e) y PGC-1 $\alpha$  (f) no se inhibieron con el antioxidante NAC o con el inhibidor de NOX, DPI. Los datos se expresan como la media  $\pm$  el error estándar de la media (SEM). \* $P < 0,05$  comparado con control o WT (c), & $P < 0,05$  comparado con KO AT1, # $P < 0,05$  comparado con el grupo tratado con All (a, b y d) o KO AT2 (c). Análisis de la varianza de un factor (ANOVA) y test *post hoc* Holm-Sidak ( $n=4-10$ ). All, angiotensina II; KO, *knock-out*; Los, losartán; NAC, N-acetil cisteína; PD, PD123,319; WT, tipo salvaje (*Wild Type*). (Permitido por Nature; Villar-Cheda y col., 2017)



**Figura 5.6. Efecto de la angiotensina II sobre los niveles de calcio y óxido nítrico nucleares.** El tratamiento de los núcleos aislados de cerebro de rata con All provocó un aumento significativo de los niveles de calcio ( $[Ca^{2+}]$  relative to control) (a) y de NO (DAF fluorescence) nucleares (d), que fue inhibido por el tratamiento simultáneo con el antagonista del receptor AT1, losartán y el antagonista del receptor AT2, PD123,319, respectivamente. El tratamiento de los núcleos aislados con All también provocó un aumento de la expresión de ARNm (mRNA levels) de AT2 (b) y PGC-1 $\alpha$  (c) que fue inhibido por el tratamiento simultáneo con el bloqueante del receptor IP3R, 2-APB, lo que sugiere que la señalización de  $Ca^{2+}$  está involucrada en estos cambios transcripcionales. El aumento de los niveles de NO inducido por All fue bloqueado por el inhibidor de la enzima NOS, L-NAME (d). Los datos se expresan como la media  $\pm$  el error estándar de la media (SEM). \* $P < 0,05$  comparado con control, # $P < 0,05$  comparado con el grupo tratado con All, & $P < 0,05$  comparado con el grupo tratado con All + los. Análisis de la varianza de un factor (ANOVA) y test *post hoc* Holm-Sidak ( $n=4-8$ ). 2-APB, 2-aminoetil difenilborinato; All, angiotensina; IP3R, receptor de inositol 1,4,5 trifosfato; L-NAME,  $N^{\omega}$ -nitro-L-arginina metil ester hidrócloruro; LOS, losartán; NO, óxido nítrico (Nitric Oxide); NOS, óxido nítrico sintasa (Nitric Oxide Synthase). (Permitido por Nature; Villar-Cheda y col., 2017)



**Figura 5.7. Receptores AT1 y AT2 nucleares en ratas y ratones envejecidos.** Los núcleos aislados de cerebros de ratas viejas mostraron una disminución significativa en los niveles tanto del receptor AT1 como del receptor AT2 (a). El tratamiento de los núcleos con All no provocó un aumento significativo de la expresión de ARNm (*mRNA levels*) de AT2, ANG y PGC-1 $\alpha$  (b), o en los niveles de supeóxido/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nucleares (*DHE fluorescence*) (c). Los niveles nucleares de superóxido/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fueron significativamente más bajos en ratones KO AT1 viejos que en ratones WT viejos, y el tratamiento con All no provocó un aumento significativo en superóxido/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en núcleos procedentes de ratones KO AT1 viejos (b). Los datos se expresan como la media  $\pm$  el error estándar de la media (SEM). \* $P < 0,05$  comparado con el correspondiente control, # $P < 0,05$  comparado con WT viejos o WT viejos tratados con Ang II. Análisis de la varianza de un factor (ANOVA) y test *post hoc* Holm-Sidak (b y d) y test t de Student (a y c) ( $n = 3-8$ ). All, angiotensina II; ANG, angiotensinógeno; KO, *knock-out*; WT, tipo salvaje (*Wild Type*). (Permitido por Nature; Villar-Cheda y col., 2017)



**Figura 5.8. Modelo del papel de los receptores AT1 y AT2 en la regulación de los efectos pro-oxidativos de la activación de los receptores AT1 de membrana por la angiotensina II extracelular (es decir, paracrina).** La All extracelular provoca la activación del eje AT1/NOX2 de membrana, que conlleva la generación de superóxido/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y estrés oxidativo intracelular (flechas rojas), pero también provoca la internalización al núcleo del complejo All/receptor AT1 (flechas verdes). La activación de los receptores AT1 nucleares provoca un aumento en los niveles de NOX4/superóxido/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e IP3R/Ca<sup>2+</sup>, que se sabe que regulan la expresión génica, desencadenando un número de mecanismos que puede proteger las células contra el estrés oxidativo (flechas verdes). Estos mecanismos protectores incluyen los siguientes: (i) un aumento en la expresión del ARNm del receptor AT2, lo que lleva a un aumento en los niveles del receptor protector AT2 que se dirige a diferentes estructuras de la célula como la mitocondria y la membrana y provoca un aumento compensatorio del brazo protector del SRA (Ang II/AT2); (ii) un aumento del ARNm de ANG, renina y PRR, lo que lleva a un aumento en la síntesis de All intracelular que actúa sobre los receptores AT2 intracelulares; (iii) un aumento en la expresión del ARNm de PGC-1 $\alpha$  e IGF-1, que, interaccionando con la SIRT1, ha sido relacionado con la protección mitocondrial y la reducción de la producción de radicales libres y daño oxidativo. Los receptores AT2 nucleares modulan este proceso (flechas azules) y contrarrestan los efectos de los receptores AT1 nucleares aumentando los niveles nucleares de NO; estos datos fueron corroborados usando núcleos aislados de ratones deficientes para AT1 y para AT2. All, angiotensina II; ANG, angiotensinógeno; IGF-1, factor de crecimiento insulínico tipo 1 (*Insulin-like Growth Factor 1*); IP3R, receptor del inositol 1,4,5-trisfosfato; NO, óxido nítrico (*Nitric Oxide*); PGC-1 $\alpha$ , proteína 1 $\alpha$  coactivadora del receptor activado por el proliferador de peroxisomas (*Peroxisome proliferator-activated receptor Gamma Coactivator 1-Alpha*); PRR, receptor de (pro) renina; ROS, especies oxigenadas reactivas (*Reactive Oxygen Species*); SIRT1, sirtuina 1; SRA, sistema renina-angiotensina. (Permitido por Nature; Villar-Cheda y col., 2017)

**CAPÍTULO 6:  
EJE ANGIOTENSINA 1-7/RECEPTOR  
MAS PARACRINO E INTRACRINO EN LA  
SUSTANCIA NEGRA DE ROEDORES,  
MONOS Y HUMANOS.**

---



## **6. EJE ANGIOTENSINA 1-7/RECEPTOR MAS PARACRINO E INTRACRINO EN LA SUSTANCIA NEGRA DE ROEDORES, MONOS Y HUMANOS.**

### **6.1 INTRODUCCIÓN**

Además de los efectos clásicos provocados por los receptores de angiotensina II tipo 1 (AT1) y tipo 2 (AT2), otros componentes median las acciones del sistema renina-angiotensina (SRA), tales como el receptor de (pro)renina (PRR) y otros péptidos derivados de angiotensina, siendo la angiotensina 1-7 (Ang 1-7) particularmente interesante. La Ang 1-7 es un polipéptido que se forma a partir de la angiotensina I (Ang I) o Ang II mediante la enzima convertidora de angiotensina 2 (ECA2). El receptor Mas, receptor acoplado a proteína G de siete pasos transmembrana, es el principal receptor de la Ang 1-7 (Santos, 2014). Recientemente, se han postulado dos brazos diferentes del SRA: un brazo perjudicial (es decir, pro-oxidativo y pro-inflamatorio) constituido por el eje Ang II/AT1 y el eje (Pro)renina/PRR y un brazo protector constituido por el eje Ang II/AT2 y el eje Ang 1-7/receptor MAS (Fraga-Silva y col., 2013; Labandeira-Garcia y col., 2017). Hace algunos años, describimos en nuestro laboratorio por primera vez la presencia de PRR en neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra (SN) y células microgliales de ratas, monos y humanos (Garrido-Gil y col., 2017b; Garrido-Gil y col., 2013; Valenzuela y col., 2010). Sin embargo, no se sabe nada sobre el eje protector Ang1-7/receptor Mas en el sistema dopaminérgico. Por otra parte, recientemente hemos observado la existencia de un SRA intracrino funcional, en mitocondrias y núcleos del mesencéfalo ventral (MV) de ratas y en cultivos de neuronas dopaminérgicas (Valenzuela y col., 2016; Villar-Cheda y col., 2017). Sin embargo, queda por investigar la posible existencia y el papel funcional de un eje intracelular Ang1-7/receptor Mas. En este estudio, investigamos la presencia de los componentes principales del eje Ang1-7/receptor Mas en el sistema dopaminérgico de diferentes modelos tanto animales como celulares, incluyendo la SN de humanos y las células madre pluripotenciales inducidas de origen humano (iPSCs, del inglés *Induced Pluripotent Stem Cell*). También estudiamos el posible efecto del envejecimiento y las interacciones entre los receptores Mas, AT1 y AT2 usando ratones *knock-out* (KO). Finalmente, investigamos la presencia del eje Ang1-7/Mas, particularmente, a nivel mitocondrial y nuclear.

### **6.2 MATERIAL Y MÉTODOS: DISEÑO EXPERIMENTAL**

En una primera serie de experimentos, se usaron cultivos primarios de la región de la SN de rata, cultivos de neuronas dopaminérgicas derivadas de iPSCs humanas, cultivos de líneas celulares de neuronas dopaminérgicas, astrocitos y microglía, y secciones de cerebro de ratas

macho adultas, monos y humanos que contenían SN para demostrar la presencia del receptor de Ang 1-7, receptor Mas, usando inmunofluorescencia. Además, se confirmó la localización del receptor en neuronas dopaminérgicas aisladas de la SN de rata usando microdissección por captura láser (LCM, del inglés *Laser Capture Microdissection*) y por la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR, del inglés *Real Time Polymerase Chain Reaction*) o PRC digital en gotas (ddPCR, del inglés *Droplet Digital PCR*).

En una segunda serie de experimentos, se analizó la SN de ratas macho adultas jóvenes (2-3 meses de edad) y envejecidas (18-20 meses de edad) y de ratones C57BL-6 de tipo salvaje. Usamos las técnicas Western blot (WB), RT-PCR y ensayos de actividad enzimática para investigar el efecto del envejecimiento sobre el eje Ang 1-7/receptor Mas (expresión del receptor Mas, expresión y actividad de ECA2 y niveles de Ang 1-7). Además, se analizaron ratones C57BL-6 homocigotos deficientes para AT1a ( $N=10$ ); ratones C57BL-6 homocigotos deficientes de los receptores AT2 (proporcionados por el Dr. Daniel Henrion) por WB, RT-PCR y actividad enzimática para investigar el efecto de la deficiencia de los receptores de Ang II sobre el eje Ang 1-7/receptor Mas.

En una tercera serie de experimentos, se llevó a cabo la técnica de inmunofluorescencia de los cultivos de la línea celular dopaminérgica N27, astrocítica C6 y microglial N9, utilizando el anticuerpo del receptor Mas para investigar la colocalización con marcadores mitocondriales y nucleares. Además, se emplearon mitocondrias y núcleos aislados de la región de la SN de ratas para confirmar la expresión del receptor Mas a nivel mitocondrial y nuclear. Las mitocondrias y núcleos aislados se usaron para investigar la habilidad del eje Ang 1-7/receptor Mas para modular la producción de especies oxigenadas reactivas (ROS, del inglés *Reactive Oxygen Species*) y óxido nítrico (NO, del inglés *Nitric Oxide*) mitocondrial y nuclear.

## 6.3 RESULTADOS

### 6.3.1 El receptor Mas se expresa en neuronas dopaminérgicas, astrocitos y microglía de cultivos primarios mesencefálicos de rata.

Investigamos la presencia del receptor principal de Ang 1-7 en cultivos primarios mesencefálicos de rata utilizando marcadores para el receptor Mas y para diferentes tipos celulares. La inmunofluorescencia y la microscopía confocal demostraron una clara presencia de la inmunoreactividad del receptor Mas en las neuronas en general, y en las neuronas dopaminérgicas en particular, que fueron identificadas por el marcador neuronal NeuN (**Figuras 6.1a-d**) y el marcador de neuronas dopaminérgicas tirosina hidroxilasa (TH) (**Figuras 6.1e-h**), respectivamente. El marcaje del receptor Mas se mostró más intenso a nivel citoplasmático y de membrana plasmática que a nivel nuclear. Las células gliales también mostraron inmunoreactividad para el receptor Mas. Los astrocitos se identificaron mediante inmunoreactividad para la proteína ácida fibrilar glial (GFAP, del inglés *Glial Fibrillary Acidic Protein*) y mostraron marcaje para el receptor Mas; pero más débil que el observado en las neuronas; además, no todas las células positivas para GFAP fueron claramente inmunoreactivas para el receptor Mas (**Figuras 6.1i-l**). Las células microgliales positivas para OX42 mostraron una inmunoreactividad notable para el receptor Mas, la cual fue mayor a nivel de citoplasma y de membrana plasmática que a nivel nuclear (**Figuras 6.1m-p**).

### **6.3.2 El receptor Mas se expresa en neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra de humano, mono y rata.**

Se emplearon la inmunofluorescencia y la microscopía confocal para estudiar la presencia del receptor Mas en secciones de tejido de SN de humano, mono y rata. En la SN de humano, observamos un intenso marcaje para el receptor Mas en neuronas dopaminérgicas, las cuales fueron identificadas por su inmunoreactividad a la enzima TH (**Figura 6.2a**) y confirmada por la presencia de neuromelanina. Del mismo modo, las neuronas dopaminérgicas de la SN de mono mostraron una fuerte inmunoreactividad para el receptor Mas (**Figura 6.2b**). En la SN de rata, las neuronas dopaminérgica TH-positivas también mostraron inmunoreactividad para el receptor Mas. En la SN pars reticulata (SNpr) se observaron numerosas fibras intensamente marcadas para el receptor Mas, y aparentemente procedentes del ST (**Figura 6.2c**). Estos resultados muestran que el receptor Mas se expresa en la SN de roedores, monos y humanos.

Se confirmó la expresión del receptor Mas de neuronas dopaminérgicas procedentes de secciones de SN de rata usando LCM (**Figuras 6.2d,d'**), y se analizó la presencia del ARNm mensajero (ARNm) del receptor Mas mediante RT-PCR y ddPCR. En primer lugar, el análisis de RT-PCR de neuronas microdisecionadas mostró la presencia del ARNm del receptor Mas en la SN de rata; los homogenados de SN también se procesaron para PCR y se usaron como controles positivos, y los mixes de PCR sin muestra se utilizaron como control negativo (**Figura 6.2e**). Además, la ddPCR de las muestras de neuronas dopaminérgicas microdisecionadas mostró que estas neuronas contenían el ARNm del receptor Mas (13066-19833 copias/ $\mu$ g de ARN total), confirmando la inequívoca presencia del receptor Mas en las neuronas dopaminérgicas de la SN de rata (**Figura 6.2f**).

### **6.3.3 El receptor Mas se expresa en células madre pluripotenciales inducidas humanas procedentes de pacientes con la enfermedad de Parkinson y controles sanos.**

Diferenciamos las iPSCs humanas, derivadas de un paciente con EP esporádica (SP08#1) y de un control sano (SP11#1), en neuronas dopaminérgicas. Empleando inmunofluorescencia y microscopía confocal, observamos la expresión del receptor Mas en neuronas dopaminérgicas TH-positivas de iPSCs derivadas de controles sanos (**Figuras 6.2g-j**) y pacientes con la EP (**Figuras 6.2k-n**). El marcaje del receptor Mas fue intenso en ambos tipos celulares, y también en las neuronas TH-negativas, lo que sugiere que este receptor se expresa en estadios tempranos del proceso de diferenciación (es decir, células pluripotentes indiferenciadas).

### **6.3.4 La expresión del receptor Mas y la expresión y actividad de la enzima ECA2 disminuye con el envejecimiento.**

En este estudio, se comparó tejido procedente de la SN de ratas de 18 a 20 meses de edad y la SN de ratas de 2 a 3 meses de edad, para investigar el efecto de la edad sobre el eje Ang 1-7/receptor Mas. Observamos que las ratas envejecidas mostraron una disminución significativa en los niveles de proteína y ARNm del receptor Mas en la SN en comparación con ratas jóvenes (**Figuras 6.3a y d**). La expresión de ARNm y proteína de la enzima ECA2 también era menor en ratas viejas (**Figuras 6.3b y e**), así como su actividad enzimática (**Figura 6.3c**). Además, encontramos niveles significativamente menores de A1-7 en la SN de ratas viejas que en la SN de ratas jóvenes (**Figura 6.3f**). Los resultados indican una menor actividad del brazo protector Ang 1-7/Mas en la SN de ratas envejecidas.

### **6.3.5 Efectos de la delección del receptor AT1 o AT2 sobre el eje angiotensina 1-7/receptor Mas.**

Empleamos SN procedentes de ratones C57BL/6 macho adultos tanto de WT como KO para AT1 o para AT2 con el fin investigar el posible efecto sobre el eje Ang 1-7/receptor Mas. Observamos que la delección del receptor AT1 no provoca cambios significativos en la expresión del receptor Mas (**Figuras 6.4a y d**). Sin embargo, los ratones KO para AT1 mostraron una disminución en la expresión del ARNm y proteína de la enzima ECA2 y una disminución de la actividad de ECA2, así como una disminución en los niveles de Ang 1-7 (**Figuras 6.4b, c, e y f**). Los ratones KO para AT2 mostraron una disminución significativa en la expresión del ARNm y proteína del receptor Mas y de ECA2 (**Figuras 6.4g, h, j y k**) y una disminución significativa en la actividad de ECA2 (**Figura 6.4i**) en comparación con los ratones WT. De acuerdo con esto, la SN de los ratones KO para AT2 se observaron niveles más bajos de Ang 1-7 que la SN de ratones WT (**Figura 6.4l**).

### **6.3.6 La angiotensina 1-7 protege a las células dopaminérgicas del estrés oxidativo y de los cambios metabólicos inducidos por la angiotensina II.**

El tratamiento con Ang II de las células dopaminérgicas N27 provocó un aumento moderado pero significativo en los niveles de superóxido. El tratamiento simultáneo con Ang II y Ang 1-7 de las células dopaminérgicas durante 24 horas revirtió el aumento de superóxido observado con la Ang II sola. Este efecto no se produjo en presencia del inhibidor del receptor Mas, A779, o con la Ang 1-7 sola (**Figura 6.5a**).

El análisis de la tasa de consumo de oxígeno (OCR, del inglés *Oxygen Consumption Rate*) utilizando el instrumento Seahorse XFp mostró que el tratamiento de las células dopaminérgicas N27 con Ang II durante 24 horas provocó una disminución significativa en la tasa de respiración máxima (es decir, máxima de respiración que las células pueden alcanzar después del tratamiento con el agente desacoplante, Carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona, FCCP). La disminución de la respiración máxima inducida por Ang II no se observó en presencia de Ang 1-7 (**Figuras 6.5b y d**). La tasa de respiración basal (es decir, la demanda energética de la célula bajo condiciones basales) no se modificó de forma significativa después del tratamiento con Ang II y/o Ang 1-7, aunque se observó una tendencia similar a la mostrada para la respiración máxima (**Figuras 6.5b y c**).

### **6.3.7 El receptor Mas está localizado en mitocondrias y núcleos de neuronas y células gliales.**

Recientemente, observamos la presencia de los receptores AT1 y AT2 en mitocondrias y núcleos cerebrales (Valenzuela y col., 2016; Villar-Cheda y col., 2017). En este estudio, investigamos la posible presencia del receptor Mas a nivel mitocondrial y nuclear usando el marcador mitocondrial *MitoTracker Deep Red* (MTDR) y el marcador nuclear Hoechst 33342. En los diferentes tipos de células estudiadas (es decir, las líneas celulares: neuronas dopaminérgicas murinas N27, astrocitos C6 y microglia N9) (**Figuras 6.6a-d, g-j y m-p**), observamos una colocalización de la inmunoreactividad del receptor Mas con el marcaje mitocondrial MTDR, con una tasa de colocalización del 40-45% de las diferentes regiones de interés (ROIs, del inglés *Regions Of Interest*) seleccionadas (**Figuras 6.6e, k y q**). La presencia nuclear del receptor Mas se observó principalmente a nivel de la membrana nuclear con una tasa de colocalización del 10-15% de la ROI seleccionada (**Figuras 6.6f, l y r**).

### **6.3.8 El eje angiotensina 1-7/receptor Mas modula los niveles de ROS/RNS en mitocondrias aisladas de la sustancia negra de rata.**

Después de observar la colocalización del receptor Mas con marcadores mitocondriales en las neuronas dopaminérgicas y en las células gliales (**figura 6.6**), confirmamos la presencia del receptor Mas en mitocondrias puras aisladas de la región de la SN de rata. Encontramos una expresión relativamente baja de los receptores Mas en la fracción mitocondrial en comparación con el homogenado total de células. Sin embargo, la expresión de la enzima ECA2 fue mucho mayor en la fracción mitocondrial que en el homogenado total de células (**Figuras 6.7a y b**), lo que sugiere un papel importante de esta enzima en las mitocondrias. Además, observamos que la Ang 1-7 es mucho más abundante que el péptido Ang II en mitocondrias puras aisladas de la región de la SN de rata (**Figura 6.7c**), lo que sugiere un papel destacado para la Ang 1-7 en la fracción mitocondrial.

Para investigar el posible papel del eje Ang 1-7/Mas en la función mitocondrial, medimos la producción de ROS y especies nitrogenadas reactivas (RNS, del inglés *Reactive Nitrogen Species*), después del tratamiento con Ang1-7 y el antagonista del receptor Mas, A779, en mitocondrias aisladas. Observamos que el tratamiento con Ang 1-7 impide el aumento de superóxido inducido por la activación de los receptores AT1 mitocondriales (es decir, el tratamiento con Ang II y el antagonista de AT2, PD123,319) (**Figura 6.7d**). Recientemente, demostramos que los receptores AT1 mitocondriales inducen un aumento en la producción de superóxido a través de la activación de la isoforma intracelular de NADPH, NOX4, ya que este aumento no se produjo en presencia del inhibidor específico de NOX4, tioridazina (Valenzuela y col., 2016). En este estudio, observamos también que el aumento en la producción de superóxido mitocondrial, a través de Ang II/AT1/NOX4, está inhibido por la activación del eje mitocondrial Ang 1-7/receptor Mas (**Figura 6.7d**), apoyando una función beneficiosa del eje Ang 1-7/receptor Mas contra la producción de estrés oxidativo mitocondrial.

Con respecto a la producción mitocondrial de RNS, la activación del receptor Mas por su ligando natural, Ang1-7, provocó un aumento de los niveles mitocondriales de NO, el cual se inhibió por el pre-tratamiento con el antagonista del receptor Mas A779 o con el inhibidor de NOS, *N*-nitro-L-arginina metil ester (L-NAME; **Figura 6.7e**). Estos datos sugieren que la modulación de la producción de ROS y RNS contribuye a los efectos protectores de la Ang 1-7.

### **6.3.9 El eje angiotensina 1-7/Mas modula los niveles nucleares de ROS/RNS en núcleos aislados de sustancia negra de rata**

Utilizamos núcleos puros aislados de la región de la SN de rata para investigar la posible presencia y el papel funcional, a nivel nuclear, del eje Ang 1-7/receptor Mas. La pureza de las muestras se confirmó por la ausencia del marcador de citosol  $\alpha$ -tubulina y el marcador de membrana plasmática la bomba de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa. Empleando la técnica de WB, observamos la presencia, en núcleos aislados, del receptor Mas y de la enzima ECA2 (**Figura 6.8a y b**). Esto es coherente con nuestro reciente estudio que muestra la presencia de otros receptores importantes del SRA (AT1 y AT2) a nivel nuclear y su papel en la modulación del estrés oxidativo inducido por la Ang II (Villar-Cheda y col., 2017). A continuación, estudiamos los efectos de la activación nuclear de Ang 1-7/receptor Mas sobre los niveles nucleares de ROS y RNS. La activación de los receptores Mas nucleares por la Ang 1-7

inhibió el aumento de superóxido nuclear inducido por Ang II a través de los receptores AT1 nucleares (**Figura 6.8c**). Esta inhibición no se observó en presencia del inhibidor del receptor Mas, A779, lo que confirmó la acción del ligando natural del receptor Mas a nivel nuclear. En coherencia con nuestros trabajos anteriores, el aumento de superóxido inducido por la activación del eje Ang II/AT1 fue mediado por NOX4 nuclear. Como NOX4 es una enzima constitutiva, sus efectos se bloquearon por el tratamiento con el inhibidor de NOX4 tioridazina (**Figura 6.8c**). Además, el tratamiento con Ang 1-7 provocó un aumento significativo en los niveles de NO nucleares, lo que no se observó en presencia del antagonista del receptor Mas, A779, o el inhibidor de NOS, L-NAME (**Figura 6.8d**). Todos estos datos sugieren un papel importante del eje Ang 1-7/receptor Mas a nivel nuclear.

En nuestros resultados anteriores, observamos que el tratamiento de núcleos aislados con Ang II provoca, a través de los receptores AT1 nucleares, un aumento en la expresión del ARNm del receptor AT2 y precursores de Ang II intracrina, por lo que sugerimos que se trata de una respuesta protectora del SRA nuclear para contrarrestar el estrés oxidativo celular inducido por el eje Ang II/AT1 (Villar-Cheda y col., 2017). En el presente estudio, llevamos a cabo ensayos de transcripción in vitro en núcleos aislados que fueron tratados con Ang 1-7, y no observamos efectos sobre la expresión del ARNm del receptor AT1 ni del receptor Mas (**Figura 6.8e y f**). Sin embargo, la Ang 1-7, a través del receptor Mas, disminuyó significativamente la expresión del ARNm de los receptores AT2 (**Figura 6.8g**). Estos resultados sugieren una relación entre los receptores AT2 y los receptores Mas, particularmente a nivel intracelular, lo cual está resumido en la **Figura 6.9** (ver "Discusión").

## 6.4 DISCUSIÓN

### 6.4.1 Sistema dopaminérgico y sistema renina angiotensina: receptor Mas

El SRA clásico fue descrito hace más de un siglo, pero recientemente se han descubierto varios componentes nuevos del sistema. Entre ellos, el péptido derivado de la Ang II, la Ang 1-7 y su receptor, el receptor Mas, son particularmente interesantes. Después de demostrar que la Ang 1-7 estaba ligada al receptor Mas, el eje Ang 1-7/receptor Mas se estableció definitivamente como un nuevo eje del SRA (Santos y col., 2003). Se ha identificado un SRA local, paracino, en el cerebro y se ha asociado con varias enfermedades cerebrales como ansiedad y estrés (Peng y col., 2002), depresión (Saab y col., 2007), y otras. Durante la última década, tanto nuestro grupo de investigación como otros grupos han demostrado un papel importante del SRA cerebral en la progresión de la degeneración de las neuronas dopaminérgicas en modelos de EP. Observamos que la Ang II, a través de los receptores AT1 y la activación del complejo NADPH oxidasa, provoca estrés oxidativo y exacerba la neuroinflamación en diferentes modelos celulares y animales de EP, y contribuye a la progresión de la neurodegeneración. Se sabe que los receptores AT2 contrarrestan las acciones de los receptores AT1, ejerciendo un papel neuroprotector (Labandeira-Garcia y col., 2013, 2014, 2017).

Nuestros estudios previos mostraron la presencia de los principales componentes del SRA clásico en la región nigroestriatal de roedores, monos y humanos (Garrido-Gil y col., 2017b, 2013; Joglar y col., 2009; Rodríguez-Pallares y col., 2008). Sin embargo, el nuevo brazo protector del SRA, Ang 1-7/receptor Mas, no ha sido investigado en el sistema dopaminérgico. En este estudio, observamos el marcaje del receptor Mas en neuronas dopaminérgicas y células gliales de cultivos primarios de mesencéfalo de rata y en la SN de

rata. La inmunoreactividad del receptor Mas fue mayor en neuronas que en astrocitos y células microgliales. Además, confirmamos la presencia del receptor Mas en neuronas dopaminérgicas de la SN de monos y humanos. También observamos la presencia del receptor Mas en iPSCs humanas derivadas de controles sanos y pacientes con EP esporádica. La presencia del receptor Mas en neuronas dopaminérgicas de iPSCs puede ser la base de futuros estudios que investiguen posibles alteraciones en el eje Ang 1-7/receptor Mas en iPSCs de pacientes con EP. En este estudio, solo empleamos inmunofluorescencia, y no detectamos ninguna diferencia obvia entre las células de los pacientes y los controles. Se necesitan estudios más detallados y complejos para investigar posibles diferencias funcionales y estructurales. Sin embargo, esto va más allá del alcance del presente enfoque general que muestra la presencia de un eje Ang 1-7/receptor Mas en las neuronas dopaminérgicas. Los resultados obtenidos con métodos inmunológicos se confirmaron con diferentes aproximaciones metodológicas como la LCM y la PCR digital. También observamos que el eje Ang 1-7/receptor Mas está regulado a la baja en el envejecimiento, y que los resultados procedentes de ratones KO para AT1 y para AT2 revelaron interacciones entre los receptores AT1, AT2 y Mas. Curiosamente, hemos identificado un eje Ang 1-7/receptor Mas intracelular (es decir, mitocondrial y nuclear) que modula los niveles de superóxido mitocondriales y nucleares.

#### **6.4.2 Receptor Mas y envejecimiento**

El envejecimiento es el principal factor de riesgo de la mayoría de la enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer y la EP. El envejecimiento está asociado con un estado pro-inflamatorio y pro-oxidativo que afecta la vulnerabilidad de las neuronas dopaminérgicas (Choi y col., 2010; Csiszar y col., 2003; Ungvari y col., 2004). Hemos demostrado que la disregulación, relacionada con la edad, del SRA de la SN está involucrado en estos efectos, y que el aumento de los niveles de neuroinflamación, estrés oxidativo y vulnerabilidad de las neuronas dopaminérgicas, relacionado con la edad, se inhibieron por el tratamiento con el antagonista de AT1 candesartán (Villar-Cheda y col., 2012). En el presente estudio, observamos una disminución en la expresión del eje protector Ang 1-7/receptor Mas en SN de ratas envejecidas (es decir, una disminución en la expresión del receptor Mas y de la enzima ECA2, y de los niveles de Ang 1-7). Esto es coherente con los mencionados estudios previos en animales envejecidos que mostraron una disregulación del SRA en SN, particularmente un aumento en la expresión del receptor pro-oxidativo AT1 y una disminución del receptor protector AT2 (Villar-Cheda y col., 2014, 2012). Estos datos respaldan aún más una disminución en la actividad del eje protector del SRA relacionada con el envejecimiento (Ang II/AT2 y Ang 1-7/receptor Mas), y que un aumento de la actividad del eje pro-oxidativo y pro-inflamatorio (Ang II/AT1) está involucrado en la mayor vulnerabilidad de las neuronas dopaminérgicas que se presenta con la edad.

#### **6.4.3 Interacciones del eje angiotensina 1-7/receptor Mas con los receptores AT1 y AT2 en ratones *knock-out***

En la SN de ratones KO para AT2, observamos una disminución en la expresión del receptor Mas tanto a nivel proteico como a nivel de ARNm. Se ha demostrado que los receptores AT2 y los receptores Mas pueden formar heterodímeros, ya que tienen mecanismos de señalización similares y acciones protectoras (Leonhardt y col., 2017). Además, se ha

sugerido una dependencia funcional entre ambos receptores ya que la Ang 1-7 no induce ningún efecto en astrocitos de ratones KO AT2, y el Compuesto 21 (C21), agonista del receptor AT2, resulta inefectivo en astrocitos procedentes de ratones KO para el receptor Mas (Leonhardt y col., 2017; Villela y col., 2017). En la SN de ratones KO para AT1, no observamos un cambio significativo en la expresión del receptor Mas; sin embargo, la expresión de ECA2, los niveles de Ang 1-7 y la actividad de ECA2 disminuyeron significativamente, lo cual puede provocar una disminución de la actividad del eje Ang 1-7/receptor Mas en ausencia del eje pro-oxidativo y pro-inflamatorio Ang II/AT1. Curiosamente, se observó también una disminución de la expresión de los receptores de AT2 en la SN de ratones KO para AT1 (Villar-Cheda y col., 2010).

#### **6.4.4 Efecto del eje angiotensina 1-7/receptor Mas sobre el estrés oxidativo neuronal y los cambios metabólicos derivados de angiotensina II**

Se sabe que la Ang II es la principal fuente de estrés oxidativo derivada de la NADPH oxidasa a través de la activación del receptor AT1 de membrana (Rodríguez-Pallares y col., 2009, 2012). En este estudio, observamos que la Ang 1-7, a través del receptor Mas, inhibe el aumento de ROS celular producido por la Ang II en neuronas dopaminérgicas, lo que confirma el papel neuroprotector del eje Ang 1-7/receptor Mas en estas células. Además, el tratamiento con Ang II en células dopaminérgicas provocó alteraciones en algunos parámetros bioenergéticos (es decir, la Ang II disminuyó la tasa máxima de respiración que la célula puede alcanzar para responder a una demanda energética), pero esto no ocurre con el tratamiento con Ang 1-7. Esto es coherente con los resultados descritos anteriormente sobre la producción de ROS y con observaciones previas en células de neuroblastoma que muestran una disminución en el OCR en respuesta a diferentes agentes de producción de ROS (Dranka y col., 2011).

Curiosamente, se demostró que las ROS derivadas de la activación de la NADPH oxidasa neuronal inducidas por la Ang II son moderadas y normalmente no son suficientes para inducir una muerte dopaminérgica significativa. Esto puede explicarse por la activación simultánea de los mecanismos compensatorios intraneuronales (es decir, la activación de los ejes protectores AT2/Ang 1-7/receptor Mas) resumidos en la **figura 6.9**. Sin embargo, fuentes adicionales o sinérgicas de ROS como las neurotoxinas (Rodríguez-Pallares y col., 2009, 2012) o la activación de células microgliales (Joglar y col., 2009; Rodríguez-Pallares y col., 2008) pueden sobrepasar los mecanismos neuronales compensatorios y antioxidantes, y desencadenar la muerte celular.

#### **6.4.5 Receptor Mas mitocondrial**

Estudios previos llevados a cabo en nuestro laboratorio, demostraron la presencia de un SRA intracrino mitocondrial en la SN. Observamos Ang II y receptores AT1 y AT2 funcionales en mitocondrias aisladas de cerebro de rata, que modulan la función mitocondrial. Los receptores AT2 mitocondriales son mucho más abundantes que los receptores AT1, aumentan después del tratamiento de las células con inductores de estrés oxidativo y provocan, a través de NO, una disminución de la respiración mitocondrial (Valenzuela y col., 2016). Estos datos muestran la presencia de los receptores Mas en mitocondrias aisladas de la región de la SN. Sin embargo, la expresión de estos receptores en las mitocondrias es mucho

menor que la observada en el homogenado total celular. Curiosamente, la enzima que forma la Ang 1-7, ECA2, aparece mucho más abundante a nivel mitocondrial que en el homogenado total celular, lo que sugiere un papel adicional de esta enzima en la mitocondria. Tanto ECA (la enzima que forma Ang II) como ECA2 tienen varios sustratos que les otorgan múltiples funciones. Se demostró que el nuevo miembro del SRA, la alamandina, se forma por la acción de la enzima ECA2 sobre la angiotensina A y que actúa a través de un subtipo del receptor Mas (MrgD) (Lautner y col., 2013). Otra posibilidad es que la Ang 1-7, la cual es más abundante que la Ang II a nivel mitocondrial, actúe a través de otros receptores mitocondriales (es decir, además del receptor Mas). Curiosamente, se demostró que los receptores AT2 mitocondriales, que son los receptores de Ang II más abundantes en las mitocondrias, unen Ang 1-7 en el sistema cardiovascular (Bosnyak y col., 2011). Es más, el receptor MrgD, mencionado anteriormente, también se ha sugerido como un receptor adicional de la Ang 1-7 (Tetzner y col., 2016). En mitocondrias aisladas, observamos que la Ang 1-7, a través del receptor Mas, provoca un aumento en la producción de NO mitocondrial e inhibe el aumento de los niveles de superóxido producido por la activación de Ang II/AT1 (es decir, Ang 1-7 protege las mitocondrias de los efectos nocivos de la producción de ROS). Estos efectos protectores son similares a aquellos provocados por la activación de los receptores AT2 mitocondriales (Valenzuela y col., 2016). Un efecto protector similar a la activación del eje Ang 1-7/receptor Mas (es decir, reducción de ROS producido por el tratamiento con altos niveles de glucosa) se publicó recientemente en cardiomiocitos (Lei y col., 2017), y en células endoteliales microvasculares del cerebro humano, donde la Ang 1-7 suprimió la actividad proapoptótica inducida por la Ang II, la sobreproducción de ROS y la reducción de NO (Xiao y col., 2015).

En numerosos tipos celulares, se ha demostrado que los efectos pro-inflamatorios y pro-oxidativos del eje Ang II/AT1/NADPH oxidasa/superóxido están contrarrestados por los ejes protectores Ang II/AT2 y Ang 1-7/receptor Mas. En neuronas dopaminérgicas, observamos que este efecto inhibitorio puede ser ejercido en varios niveles (resumidos en la **figura 6.9**), y que el nivel mitocondrial aparece como el sitio principal de producción/modulación de ROS por parte del SRA. Varios estudios previos demostraron que una interacción, mediada por ROS, (es decir, una señalización cruzada) entre el complejo NADPH oxidasa anclado a la membrana y las mitocondrias, por lo que las ROS generadas por Ang II/AT1/NADPH oxidasa (NOX2) puede actuar como un desencadenante, induciendo la apertura de los canales de potasio sensibles a ATP (mitoKATP), lo que provoca un aumento en la generación de ROS mitocondrial (Rodríguez-Pallares y col., 2012; Villela y col., 2015; Zawada y col., 2011). En mitocondrias aisladas, la activación de los receptores AT1 mitocondriales produce superóxido derivado de NOX4 (Valenzuela y col., 2016). Se sabe que un aumento en las ROS mitocondriales provoca un daño del ADN mitocondrial y la oxidación de las proteínas mitocondriales, lo que lleva a una disfunción mitocondrial. Las ROS mitocondriales también alcanzan el citoplasma y contribuyen a la disfunción celular. En este estudio, observamos que, en las neuronas dopaminérgicas, la Ang 1-7 inhibió el aumento de los niveles de superóxido y los cambios en la respiración celular inducidos por la Ang II. En mitocondrias aisladas, observamos que las ROS derivadas de la Ang II fueron inhibidas en presencia de Ang 1-7 (**Figura 6.9**).

#### **6.4.6 Receptores Mas nucleares**

También observamos Ang 1-7 y receptores Mas en núcleos aislados de la SN de rata. La activación de los receptores Mas por su ligando natural, la Ang 1-7, provocó un aumento en la

producción de NO nuclear y contrarrestó el aumento del superóxido nuclear derivado de la Ang II. La activación de los receptores AT2 por la Ang II también provocó un aumento en la producción de NO y contrarrestó el aumento de superóxido nuclear (Villar-Cheda y col., 2017). Estudios previos demostraron que la Ang II extracelular (paracrina) provoca la activación del eje AT1/NOX2 de la membrana celular, lo que lleva a la generación intracelular de superóxido derivado de la NADPH oxidasa y estrés oxidativo, pero la Ang II también provoca la internalización al núcleo del complejo Ang II/receptor AT1 (**Figura 6.9**). Además, recientemente observamos que la activación de los receptores AT1 nucleares provoca un aumento de los niveles de NOX4/superóxido y de inositol 1,4,5-trifosfato (IP3)/Ca<sup>2+</sup> nucleares, lo cual se sabe que regula la expresión génica, desencadenando varios mecanismos que pueden proteger las células contra el estrés oxidativo (Villar-Cheda y col., 2017). Estos mecanismos protectores incluyen un aumento en la expresión del ARNm del receptor AT2 que se moviliza a varias estructuras celulares como la mitocondria y la membrana celular (es decir, la sobreactivación del eje Ang II/AT1 perjudicial conduce a un aumento compensatorio del brazo protector del SRA Ang II/AT2). Además, la activación de los receptores AT1 nucleares provoca un aumento en el ARNm del angiotensinógeno, renina y PRR, lo que lleva a un aumento en la síntesis de Ang II y Ang 1-7 intracelular para actuar sobre los receptores AT2 y Mas intracelulares (Villar-Cheda y col., 2017) (**Figura 6.9**). En este estudio, observamos que el tratamiento de núcleos aislados con Ang 1-7 no provoca cambios en la expresión del ARNm de los receptores Mas y AT1. Sin embargo, la activación de los receptores Mas por Ang 1-7 provoca una disminución de ROS nuclear y de la expresión del ARNm del receptor AT2. Los resultados sugieren que los receptores Mas y AT2 nucleares amortiguan la respuesta protectora (es decir, el fortalecimiento del brazo protector Ang II/AT2 desencadenado por la activación de los receptores AT1 nucleares). En conjunto, se sugiere que los receptores del SRA nucleares juegan un papel fundamental en el mantenimiento de un equilibrio adecuado entre los brazos protector y perjudicial del SRA celular (**Figura 6.9**). Los resultados actuales y anteriores (Villar-Cheda y col., 2017) también revelan que esta importante función se ve afectada en los animales envejecidos.

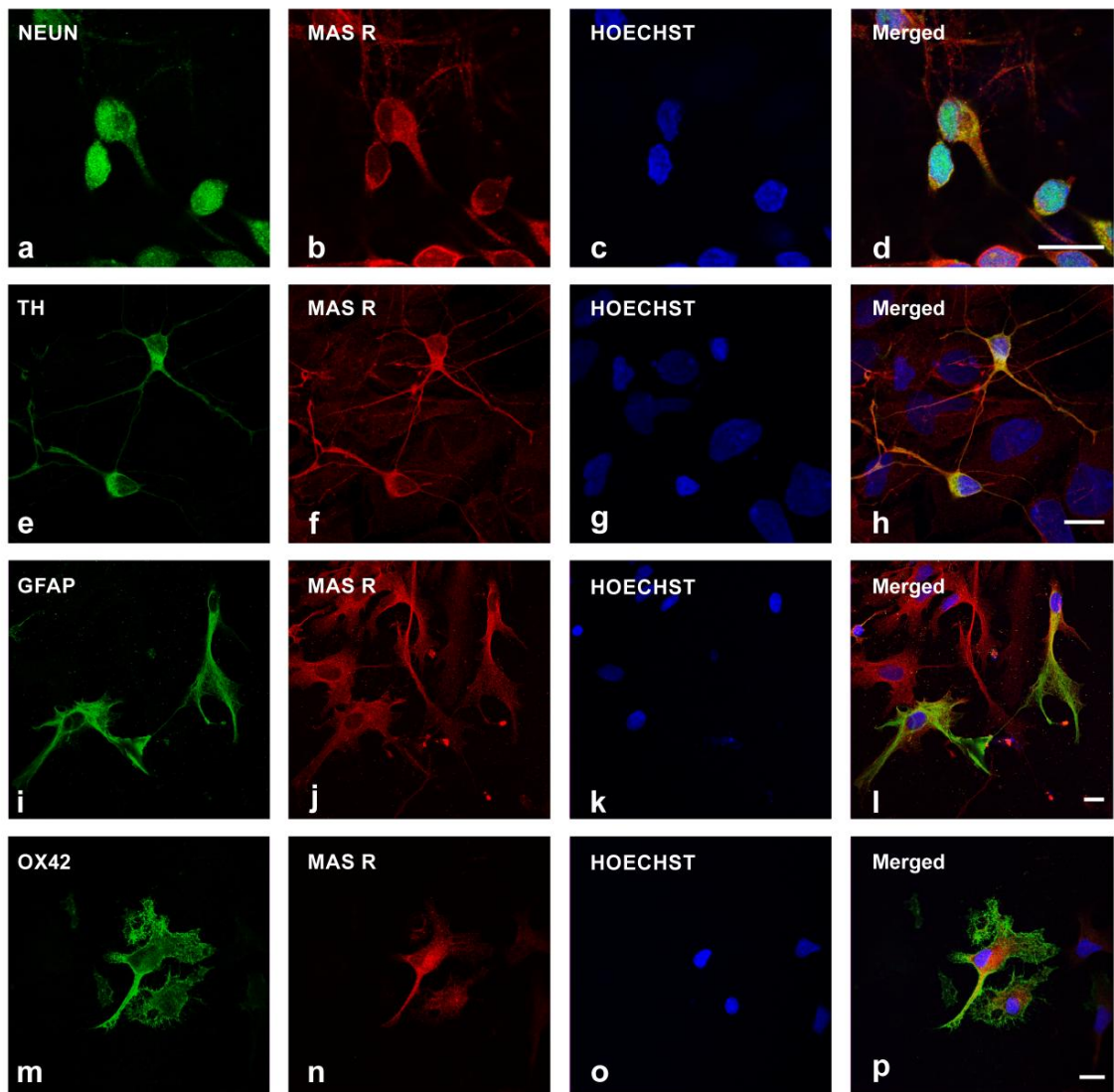
## 6.5 CONCLUSIÓN

Estos resultados muestran la presencia del brazo protector no clásico del SRA Ang 1-7/receptor Mas en la SN de modelos animales y tejido humano, y en cultivos celulares de neuronas dopaminérgicas y glía, incluyendo iPSCs de humanos controles sanos y pacientes con EP. El envejecimiento provoca una disminución en la actividad del brazo protector Ang 1-7/receptor Mas, lo que puede jugar un papel en el aumento de la vulnerabilidad dopaminérgica relacionada con la edad que da lugar a la neurodegeneración. Intracelularmente, la Ang 1-7 se expresa en gran cantidad a nivel mitocondrial y aumenta los niveles de NO mitocondriales a través del receptor Mas, lo que provoca una disminución de la producción de superóxido mitocondrial. A nivel nuclear, la Ang 1-7, a través del receptor Mas, aumenta los niveles de NO, disminuye los niveles de superóxido, y disminuye la transcripción del ARNm de AT2. Los receptores del SRA nucleares pueden regular el equilibrio adecuado entre los brazos protector y perjudicial del SRA celular. Estos datos apoyan los efectos beneficiosos del brazo protector Ang 1-7/receptor Mas en el sistema dopaminérgico. En resumen, observamos que el eje Ang 1-7/receptor Mas está presente en neuronas dopaminérgicas y contrarresta el efecto pro-oxidativo del eje Ang II/AT1, lo que previamente se ha demostrado que potencia la progresión de la neurodegeneración en modelos de la EP. Además, el eje Ang 1-7/receptor Mas está regulado a la baja en la SN

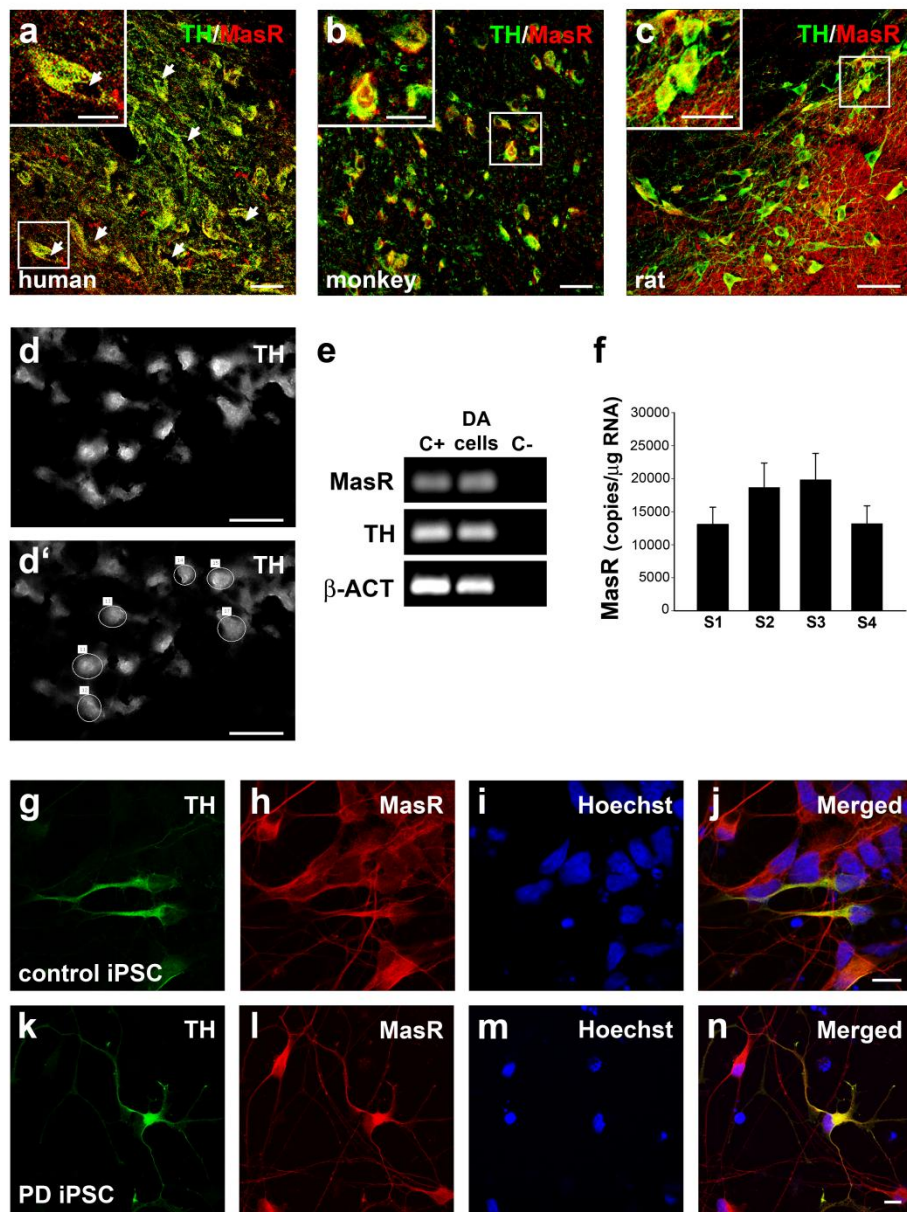
envejecida, y el envejecimiento es el factor de riesgo más importante para la EP. Por este motivo, sugerimos que el eje Ang 1-7/receptor Mas interviene para contrarrestar la degeneración dopaminérgica y la progresión de la EP, y debe tenerse en cuenta para el diseño de nuevas estrategias terapéuticas para la EP.



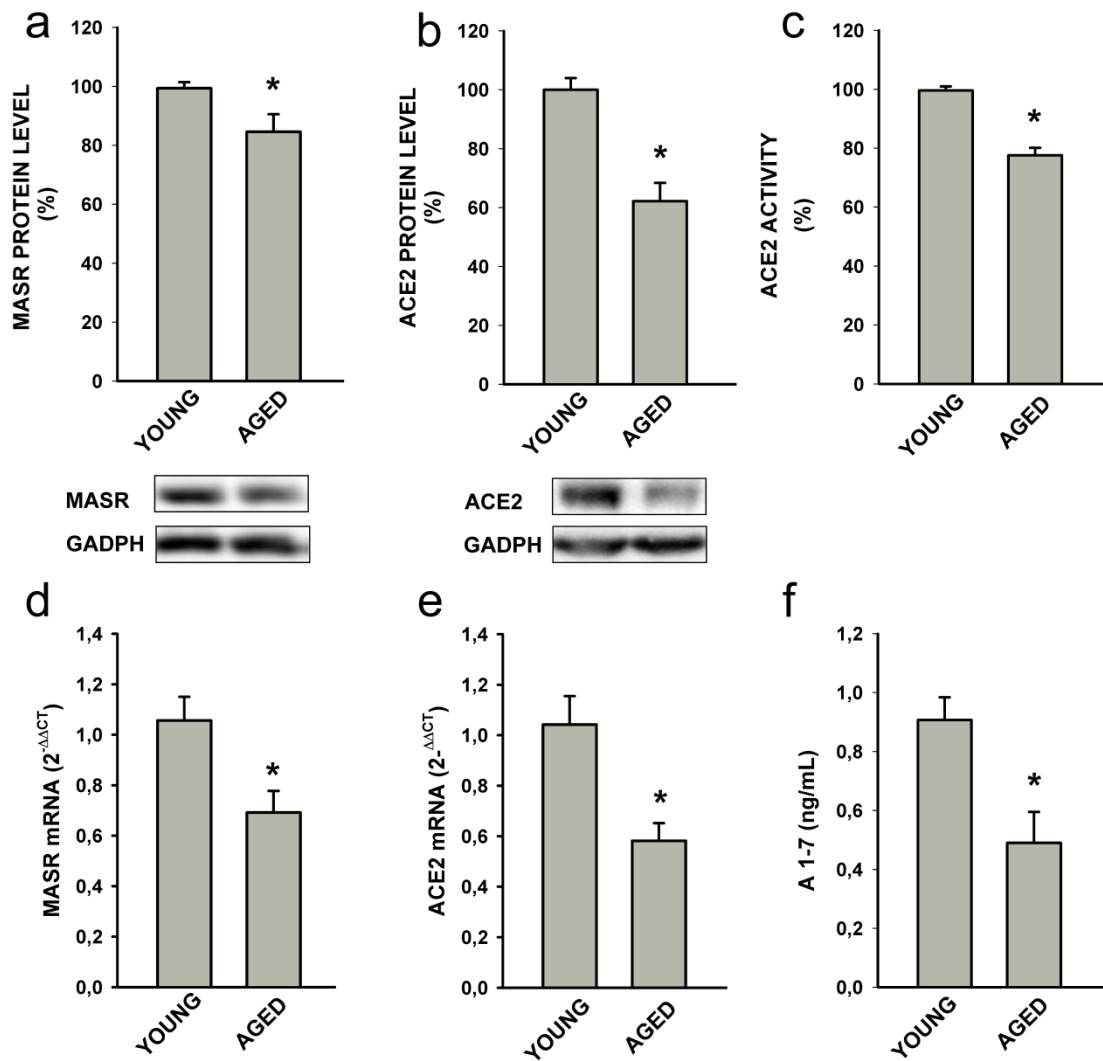




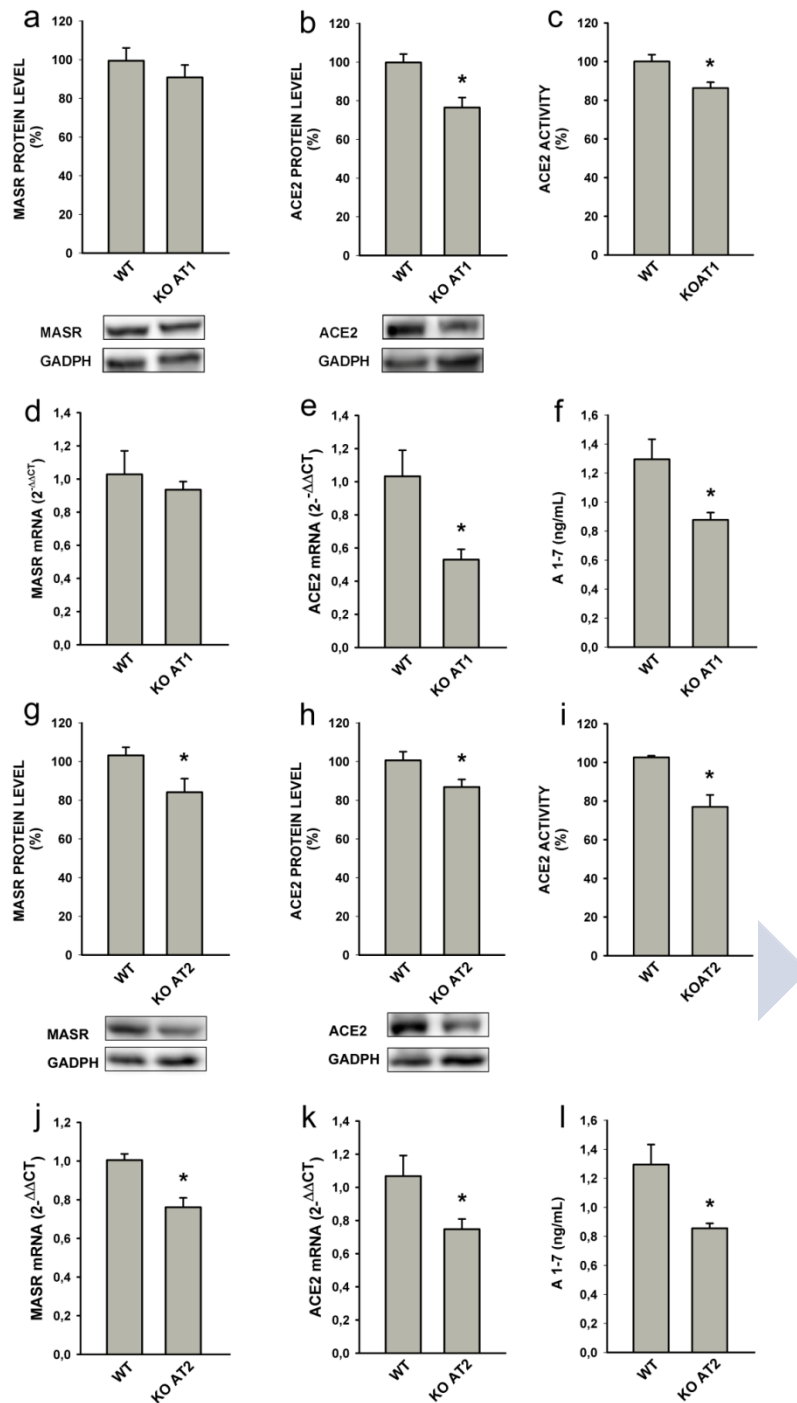
**Figura 6.1. Localización del receptor Mas en cultivos primarios de mesencéfalo ventral de rata.** Marcaje inmunofluorescente triple para el receptor Mas (rojo; b, f, j, n) mostrando su presencia en neuronas positivas para Neun (a-b; verde), neuronas dopaminérgicas positivas para TH (e-h; verde), astrocitos positivos para GFAP (i-l; verde), y microglía positiva para OX42 (m-p; verde). HOECHST, marcaje de los núcleos (azul). GFAP, proteína ácida fibrilar glial (*Glial Fibrillary Acidic Protein*); MasR, receptor Mas; Merged, combinación de los dos colores; TH, tirosina hidroxilasa. Barra de escala 10  $\mu$ m. (Con permiso de Springer Nature; Costa-Besada y col., 2017)



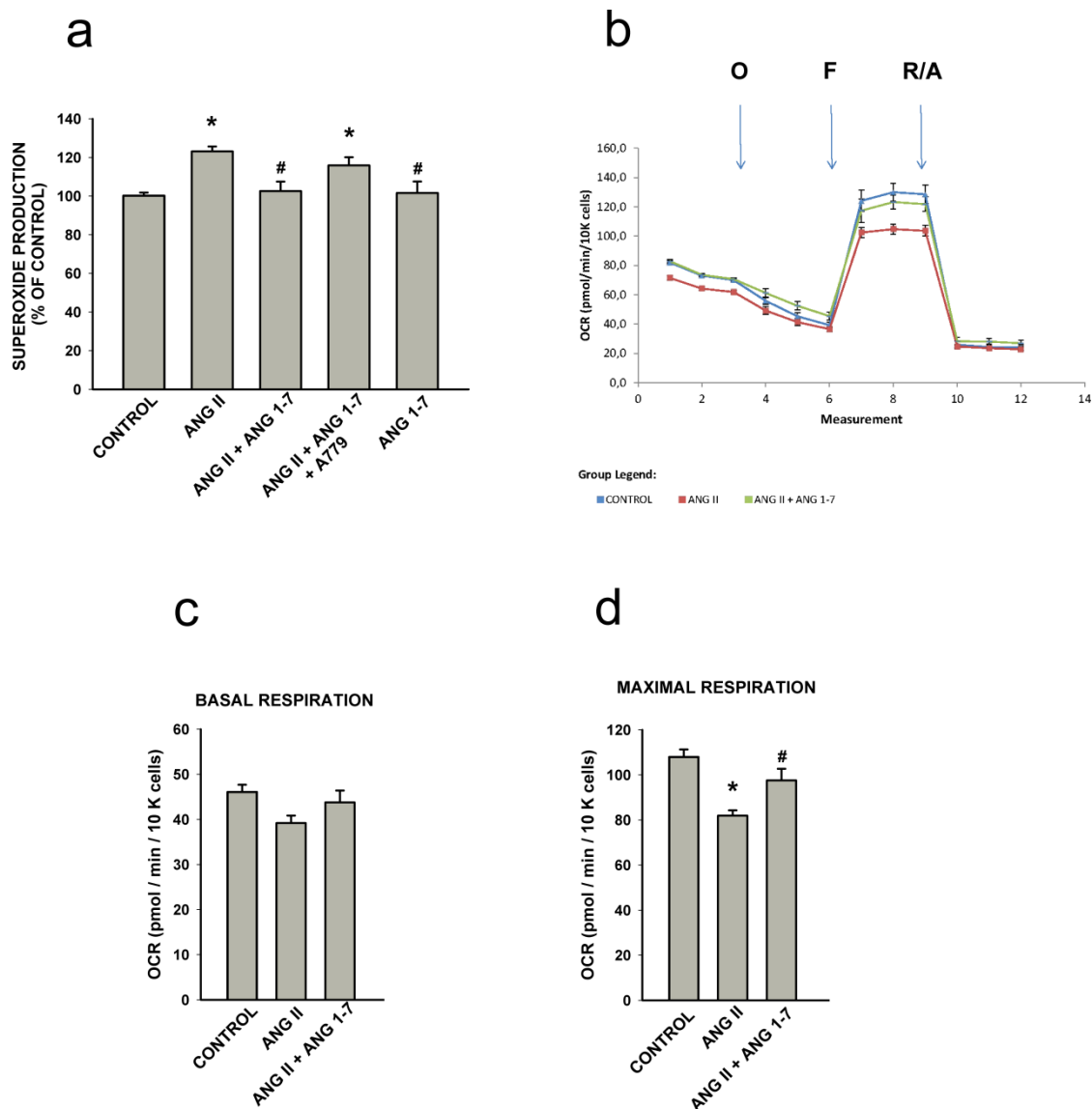
**Figura 6.2.** Localización del receptor Mas en neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra de humano, mono y rata, e iPSC humanas procedentes de controles sanos y pacientes con la enfermedad de Parkinson. El marcaje inmunofluorescente doble para el receptor Mas (MasR, rojo) y las neuronas dopaminérgicas (TH, verde) muestra colocalización (amarillo) en la sustancia negra (SN) en humano (*human*; a), mono (*monkey*; b), y rata (*rat*; c). También se muestran las imágenes en gran aumento de los recuadros (a-c). En las neuronas dopaminérgicas humanas, se señalan los depósitos de neuromelanina con flechas blancas (a). Se confirmó la expresión del receptor Mas en las neuronas dopaminérgicas de rata con microdissección láser y RT-PCR o ddPCR (d-f). Microfotografía de la sección de la SN mostrando las neuronas dopaminérgicas antes (d) y después (d') de la microdissección láser. Bandas representativas de la expresión del MasR y de la  $\beta$ -actina por RT-PCR en neuronas dopaminérgicas microdisseccionadas. Se utilizaron homogenados de SN como controles positivos y el mix de la PCR sin muestra como control negativo de la RT-PCR (e). Concentración del ARNm del MasR (copias/ $\mu$ g de ARN) medido por ddPCR en 4 muestras de neuronas dopaminérgicas microdisseccionadas (f). Marcaje inmunofluorescente triple de las neuronas dopaminérgicas (TH; g, k) diferenciadas de las iPSC humanas del control sano (g-j) y del paciente con la enfermedad de Parkinson (PD, *Parkinson's Disease*) esporádica (k-n) mostrando colocalización con el MasR (h, l) y el marcado nuclear Hoechst (i, m). ddPCR, PCR digital (*droplet digital PCR*); iPSC, células madre pluripotenciales inducidas (*induced pluripotent stem cells*); Merged, combinación de los dos colores. Barra de escala 50  $\mu$ m para la SN (a-d'), 25  $\mu$ m para las imágenes en gran aumento de los recuadros (a-c), y 5  $\mu$ m para las iPSC (g-n). (Con permiso de Springer Nature; Costa-Besada y col., 2017)



**Figura 6.3.** La expresión del receptor Mas y ECA2 y la actividad de ECA2 disminuye con la edad. La proteína ( $n=6$ ) (a, b) y el ARNm ( $n=4-6$ ) (d,e) del receptor Mas y de ACE2 es menor en la SN de ratas viejas que en ratas jóvenes. La actividad de ECA2 ( $n=5-6$ ) y la concentración de Ang 1-7 ( $n=4$ ) (f) también se encuentra reducida en la SN de ratas viejas comparado con ratas jóvenes. Los datos se expresan como media  $\pm$  error estándar de la media (SEM). \* $p < 0,05$  comparado con el control (test t de Student). ACE2 (ECA2), enzima convertidora de angiotensina 2; Ang 1-7 angiotensina 1-7; MasR, receptor Mas; SN, sustancia negra. (Con permiso de Springer Nature; Costa-Besada y col., 2017)



**Figura 6.4.** Expresión del receptor Mas y ECA2 en la sustancia negra de ratones deficientes para el receptor AT1 y AT2. La proteína ( $n=6$ ) (a) y la expresión del ARNm ( $n=4-5$ ) (b, e) del receptor Mas no mostraron diferencias significativas entre la SN de los ratones KO AT1 y los ratones de tipo salvaje (WT). Sin embargo, los niveles de la proteína ( $n=6$ ) y del ARNm ( $n=4-5$ ) de ECA2 (b, e), la actividad de ECA2 ( $n = 4-6$ ) (c) y el contenido de Ang 1-7 ( $n=4$ ) (f) fueron significativamente menores en la SN de los ratones KO para AT1 que en los ratones WT. La proteína ( $n=4-5$ ) (g, h) y la expresión de ARNm ( $n=5$ ) del receptor Mas y de la enzima ECA2, la actividad de ECA2 ( $n=4-5$ ) (i), y el contenido de Ang 1-7 ( $n=4-5$ ) (l) fueron significativamente menores en la SN de ratones KO para AT2 que en ratones WT. Los datos se expresan como la media  $\pm$  error estándar de la media (SEM). \* $p < 0,05$  comparado con el control (test t de Student). ACE2 (ECA2), enzima convertidora de angiotensina 2; Ang 1-7 angiotensina 1-7; KO, *knock-out*; SN, sustancia negra; WT, *wild type*. (Con permiso de Springer Nature; Costa-Besada y col., 2017)



**Figura 6.5.** El eje angiotensina 1-7/receptor Mas contrarresta el estrés oxidativo y los cambios metabólicos neuronales derivados de la angiotensina II. (a) El tratamiento simultáneo con Ang 1-7 y Ang II de las células dopaminérgicas N27 durante 24 horas invierte el aumento en superóxido observado con la Ang II sola; este efecto no se produjo en presencia del inhibidor del receptor Mas, A779, o con la Ang 1-7 sola. (b-d) Empleando el Seahorse XFp, instrumento para analizar la tasa de consumo de oxígeno (OCR), se detectó la respiración mitocondrial (niveles de OCR) en las células N27 tratadas con Ang II (línea roja), o Ang II + Ang 1-7 (línea verde), o en células sin tratar (control; azul). El OCR se estimó bajo condiciones basales o añadiendo consecutivamente oligomicina (O; 1  $\mu$ M), el desacoplante FCCP (F; 1  $\mu$ M) y los inhibidores rotenona + antimicina A (R/A; 0,5  $\mu$ M). Se muestran la tasa basal de respiración (antes de la inyección de oligomicina; c) y la capacidad respiratoria máxima (después de la inyección con FCCP; d). Los datos se expresan como la media  $\pm$  el error estándar de la media (SEM). \* $p < 0,05$  comparado con Ang II. Análisis de la varianza de un factor (ANOVA) y test Boferroni post hoc. Ang 1-7, angiotensina 1-7; Ang II angiotensina II; MasR receptor Mas. (Con permiso de Springer Nature; Costa-Besada y col., 2017)

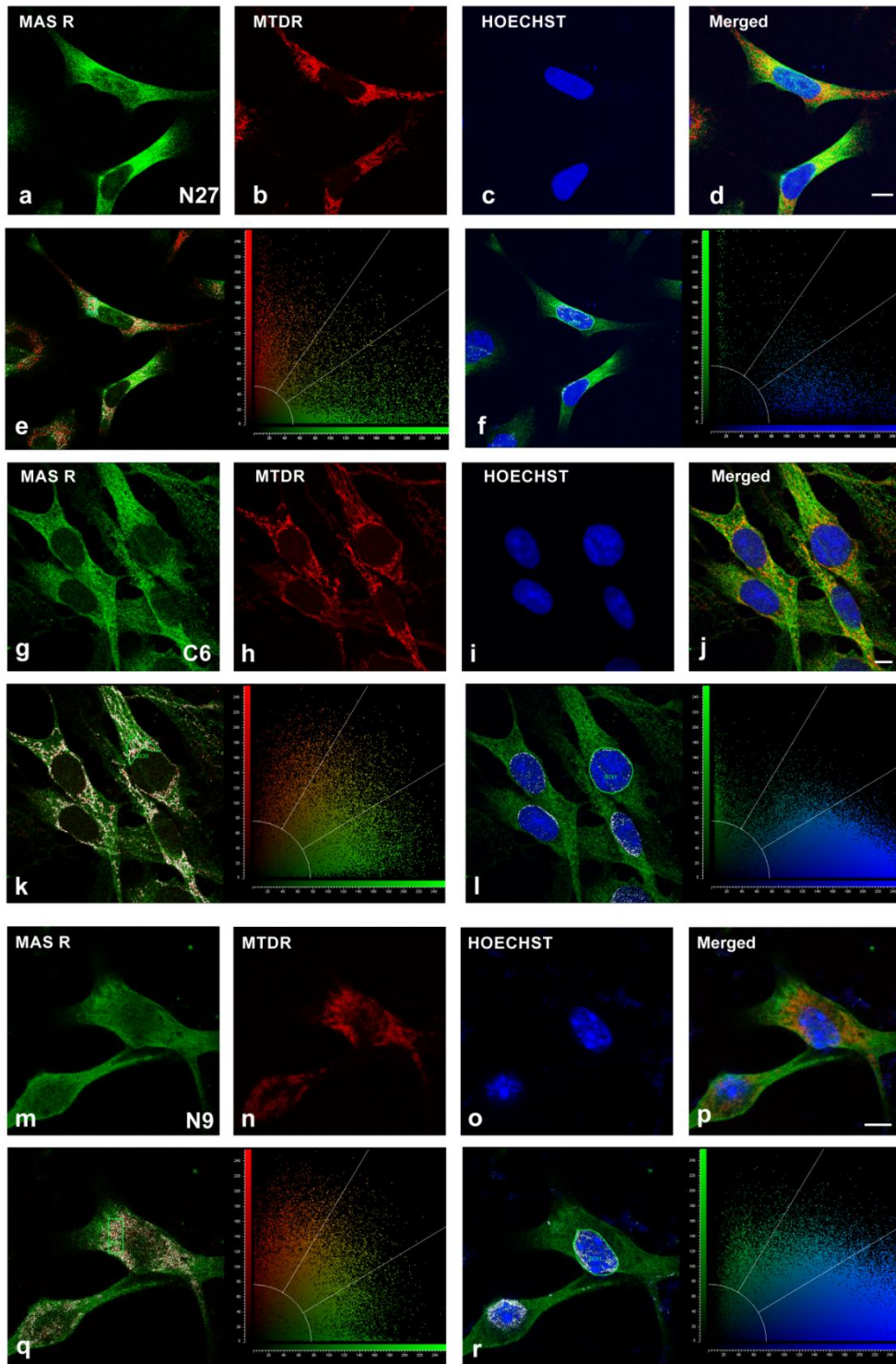
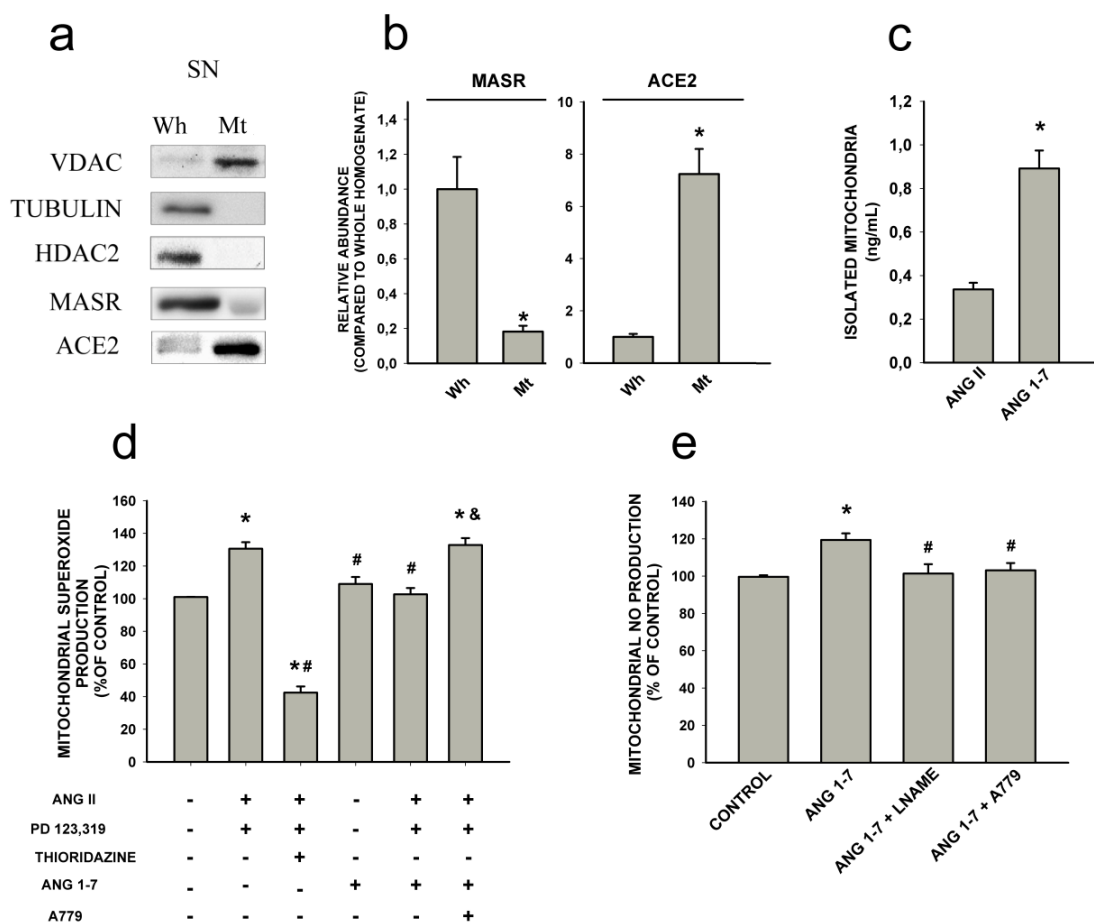
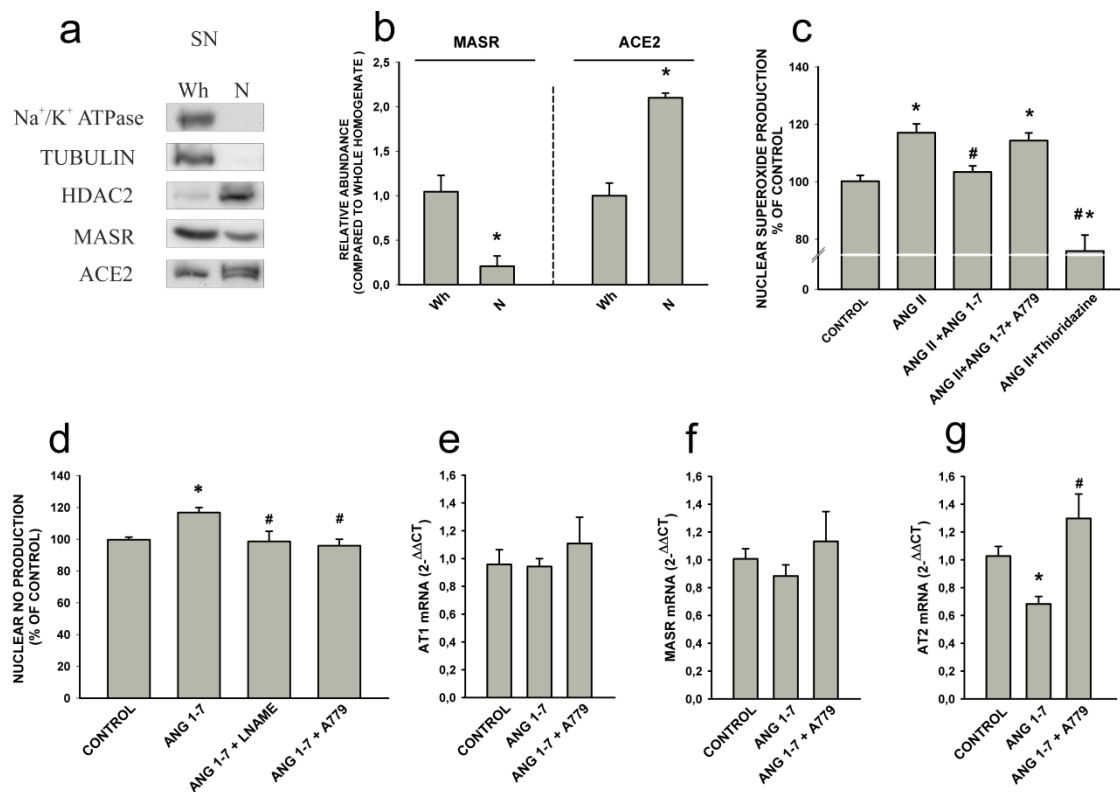


Figura 6.6. Localización intracelular del receptor Mas en las neuronas dopaminérgicas, astrocitos y microglía. Marcaje inmunofluorescente triple para el receptor Mas (verde a, g, m), mitocondria (MTDR, rojo, b, h, n) y núcleo (Hoechst, azul, c, i, o) en la línea celular dopaminérgica N27 (a-d), línea celular astrocítica (g-j), y la línea celular microglial (m-p) mostrando la presencia del receptor Mas a nivel mitocondrial y nuclear. Las imágenes muestran la colocalización y el gráfico de dispersión de la intensidad del rojo (MTDR) y del azul (Hoechst) frente a la del verde (MasR) en las células N27 (e,f), las C6 (k, l), y las N9 (q, r). Los porcentajes de colocalización se calcularon con el software LAS AF. MasR, receptor Mas; MTDR, MitoTracker Deep Red. Barra de escala: 5  $\mu$ m. (Con permiso de Springer Nature; Costa-Besada y col., 2017)



**Figura 6.7. Receptor Mas y ECA2 en mitocondrias aisladas de la región de la sustancia negra de rata.** Western blot (WB) del homogenado total (Wh,  $n=3$ ) y de mitocondrias aisladas puras (Mt;  $n=3$ ) de la región de la SN de rata, donde se usan diferentes marcadores para evaluar la pureza de las mitocondrias aisladas: VDAC como marcador mitocondrial, tubulina como marcador del citoplasma, o HDAC2 como marcador nuclear (a). La enzima ECA2 (ACE2) presenta una mayor expresión que el receptor Mas (MasR) en mitocondrias aisladas comparado con el homogenado total (b). Las mitocondrias aisladas de la región de la SN presentan mayores niveles de Ang 1-7 que de Ang II, medido con un ensayo inmunoenzimático ( $n=3-5$ ) (c). El tratamiento de las mitocondrias aisladas con Ang 1-7 inhibe el aumento de la producción de superóxido mitocondrial inducido por la activación de los receptores AT1 mitocondriales (Ang II + PD123,319). El superóxido se produce a través de NOX4, ya que el inhibidor de NOX4, la tioridazina, bloquea la producción de superóxido inducida por AT1. El efecto inhibitorio de la Ang 1-7 no se observó en presencia del antagonista del MasR, A779, lo que confirma que la Ang 1-7 actúa a través del MasR en mitocondrias aisladas ( $n=4$ ) (d). El tratamiento de las mitocondrias aisladas con Ang 1-7 aumenta la producción de NO, lo cual no fue observado cuando las mitocondrias se trataron previamente con el inhibidor de la enzima NOS, L-NAME o el inhibidor del MasR, A779 ( $n = 4-7$ ) (e). Los datos se expresan como la media  $\pm$  error estándar de la media (SEM). \* $p < 0,05$  comparado con el control; # $p < 0,05$  comparado con Ang II + PD123,319 (d) y con Ang 1-7 (e); y & $p < 0,05$  comparado con Ang II + PD123,319 + Ang 1-7 (d) (Análisis de la varianza de un factor (ANOVA) y test *post hoc* Bonferroni). Ang 1-7, angiotensina 1-7; Ang II, angiotensina II; ECA2, ACE2 (*Angiotensin-Coverting Enzyme*); HDAC2, histona deacetilasa 2; NO, óxido nítrico (*Nitric Oxide*); NOS, óxido nítrico sintasa (*Nitric Oxide Synthase*); L-NAME, *N*-nitro-L-arginina metil ester; SN, sustancia negra; VDAC, canal de aniones dependiente de voltaje (*Voltage-Dependent Anion Channel*); Wh, *Whole Homogenate*. (Con permiso de Springer Nature; Costa-Besada y col., 2017)



**Figura 6.8. Receptor Mas y ECA2 en núcleos aislados de la región de la sustancia negra de rata.** Western blot (WB) del homogenado total (Wh;  $n=3$ ) y de núcleos aislados puros (N;  $n=3$ ) de la región de la SN de rata, donde se usan diferentes marcadores para evaluar la pureza de los núcleos aislados: Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa como marcador de membrana plasmática, tubulina como marcador del citoplasma, o HDAC2 como marcador nuclear (a). Abundancia relativa del MasR y de la enzima ECA2 (ACE2) en núcleos aislados comparado con el Wh (b). El tratamiento de los núcleos aislados con Ang 1-7 inhibe el aumento de la producción de superóxido nuclear inducido por la activación de los receptores AT1 mitocondriales (Ang II + PD123,319). El superóxido se produce a través de NOX4, ya que el inhibidor de NOX4, la thioridazina, bloquea la producción de superóxido inducida por AT1. El efecto inhibitorio de la Ang 1-7 no se observó en presencia del antagonista del MasR, A779, lo que confirma que la Ang 1-7 actúa a través del MasR en núcleos aislados ( $n=5-6$ ) (c). El tratamiento de las núcleos aislados con Ang 1-7 aumenta la producción de NO nuclear, lo cual no fue observado cuando los núcleos se trataron previamente con el inhibidor de la enzima NOS, L-NAME o el inhibidor del MasR, A779 ( $n=6$ ) (d). Los niveles del ARNm del receptor AT1 (e) o del MasR (f) no cambiaron significativamente después del tratamiento de los núcleos aislados con Ang 1-7 solo o con y el inhibidor del MasR, A779 ( $n=5-12$ ). El tratamiento de los núcleos aislados con Ang 1-7 provocó una disminución en la expresión de ARNm del receptor AT2, que fue inhibida por el tratamiento simultáneo con el inhibidor del MasR ( $n=5-7$ ) (g). Los datos se expresan como la media  $\pm$  error estándar de la media (SEM). \* $p < 0,05$  comparado con el control; # $p < 0,05$  comparado con Ang II (c) y con Ang 1-7 (d, g) (Análisis de la varianza de un factor (ANOVA) y test *post hoc* Bonferroni). Ang 1-7, angiotensina 1-7; Ang II, angiotensina II; ECA2 (ACE2), *Angiotensin-Converting Enzyme*; HDAC2, histona deacetilasa 2; NO, óxido nítrico; NOS, óxido nítrico sintasa; L-NAME, *N*-nitro-L-arginina metil ester; SN, sustancia negra Wh, *Whole Homogenate*. (Con permiso de Springer Nature; Costa-Besada y col., 2017)

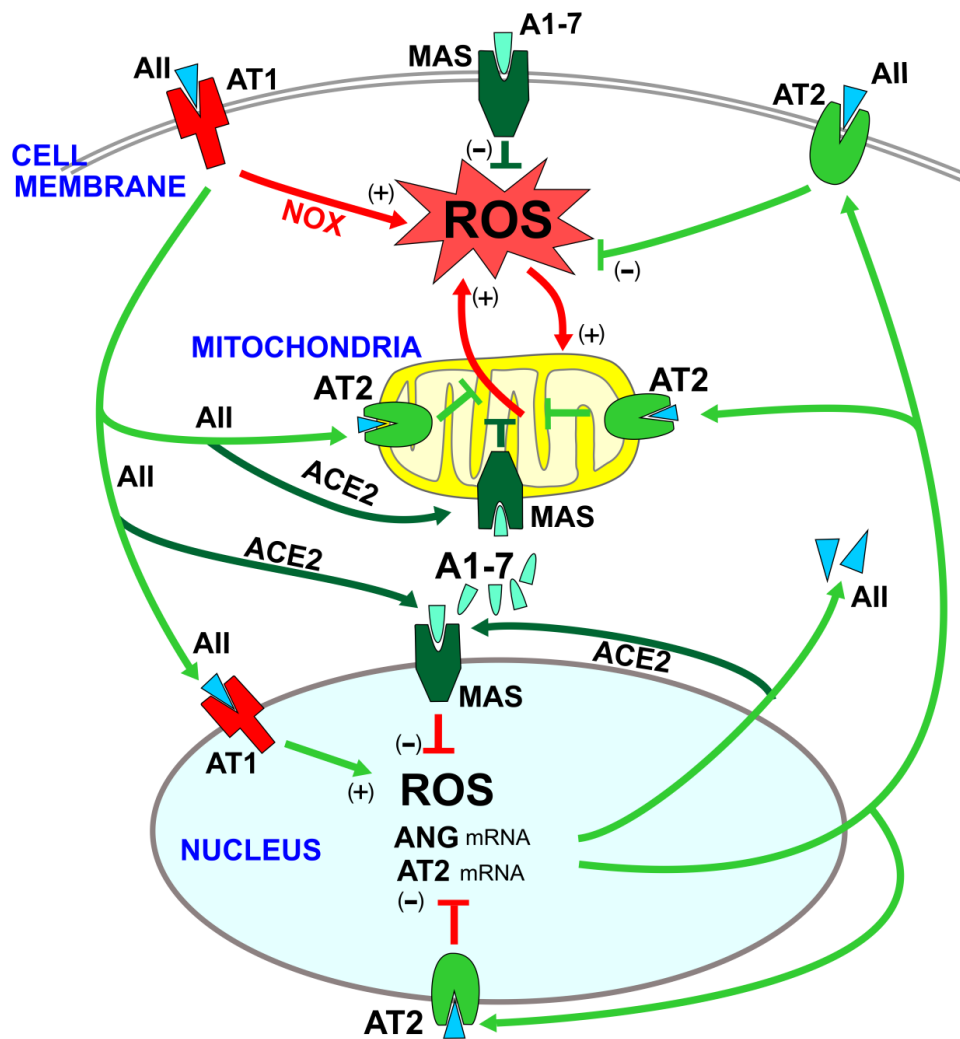


Figura 6.9. Modelo del papel que juega el receptor Mas (MasR) intracelular, interactuando con los receptores AT1 y AT2, en la modulación de los efectos pro-oxidativos de la activación de los receptores AT1 de membrana por la angiotensina II extracelular (es decir, paracrina). La AII extracelular provoca la activación del eje AT1/NOX2 de membrana, lo que lleva a la generación de superóxido y estrés oxidativo (flechas rojas) (Labandeira-García y col., 2014; Rodríguez-Pallares y col., 2012, 2008). La AII extracelular también provoca la internalización del complejo AII/receptor AT1 (flechas verdes; Villar-Cheda y col., 2017). La AII internalizada y producida intracelularmente se transforma por la enzima ECA2 en A1-7, que actúa sobre el MasR. La activación de los receptores AT1 nucleares provoca un aumento en los niveles de NOX4/superóxido nucleares, que se sabe que regula la expresión génica, y desencadena numerosos mecanismos que protegen a la célula del estrés oxidativo (flechas verdes; Villar-Cheda y col., 2017). Estos mecanismos protectores incluyen: (i) un aumento en la expresión del ARNm del receptor AT2, lo que provoca un aumento en los niveles de los receptores AT2 protectores que se distribuyen a diferentes estructuras celulares como las mitocondrias y la membrana celular, incluyendo un aumento compensatorio del brazo protector del SRA (AII/AT2); y (ii) un aumento del ARNm de ANG, renina y el PRR, lo que lleva a un aumento de la síntesis de AII intracelular que actúa sobre los receptores AT2 y MasR (a través de ECA2/A1-7) intracelulares. Los receptores MasR y AT2 nucleares (Villar-Cheda y col., 2017) modulan este proceso (a través de NOS; líneas rojas) contrarrestando los efectos de los receptores AT1 nucleares. AII, angiotensina II; A1-7, angiotensina 1-7; ANG, angiotensinógeno; AT1, receptor de angiotensina II tipo 1; AT2, receptor de angiotensina II tipo 2; ECA2 (ACE2), *Angiotensin-Converting Enzyme*; MAS, receptor Mas; PRR, receptor de (pro)renina; ROS (*Reactive oxygen Species*), especies reactivas del oxígeno; SRA, sistema renina-angiotensina. (Con permiso de Springer Nature; Costa-Besada y col., 2017)



# CAPÍTULO 7: CONCLUSIONES

---





## 7. CONCLUSIONES

1. Existen receptores de angiotensina II, AT1 y AT2, funcionales en las mitocondrias del cerebro en general, y en particular de neuronas dopaminérgicas. La activación de los receptores AT2 mitocondriales, que son más abundantes que los AT1, provoca, mediada por óxido nítrico, una disminución de la respiración mitocondrial. Esta disminución de la respiración no se acompaña de alteraciones significativas en el potencial de membrana mitocondrial, lo cual indica que las propiedades bioenergéticas de las mitocondrias no están afectadas. Por el contrario, la activación de los receptores AT1 mitocondriales produce un aumento de superóxido, a través de la enzima NOX4 mitocondrial, y un incremento de la respiración mitocondrial.
2. El envejecimiento y cambios en los niveles de estrés oxidativo modifican la expresión de los receptores de angiotensina II mitocondriales; la expresión de los receptores AT2 mitocondriales aumenta tras el incremento moderado y agudo de estrés oxidativo y disminuye con la edad. La expresión de los receptores AT1 mitocondriales aumenta con la edad y tras la exposición a antioxidantes. Estos cambios podrían jugar un papel importante en la disfunción mitocondrial asociada con el envejecimiento normal, que es el principal factor de riesgo para el desarrollo de la enfermedad de Parkinson.
3. Hemos demostrado la presencia de los receptores AT1 y AT2 en núcleos aislados de células cerebrales, particularmente de neuronas dopaminérgicas, siendo más abundante los receptores AT1 que los AT2 nucleares.
4. La internalización del complejo angiotensina II-AT1 al núcleo y la activación de los receptores AT1 nucleares por angiotensina II intracelular desencadena una serie de mecanismos que pueden proteger a las células contra el estrés oxidativo inducido por la angiotensina II extracelular. Estos mecanismos incluyen un aumento de los niveles de receptores AT2 y angiotensina II intracelular, así como de PGC-1 $\alpha$  e IGF-1, cambios transcripcionales que se producen a través de la señalización del calcio.
5. Este mecanismo de protección está alterado en núcleos del cerebro de animales envejecidos, que muestran menores niveles de ambos receptores de angiotensina II en el núcleo. En núcleos aislados de animales envejecidos, el tratamiento con angiotensina II no produce ninguno de los efectos observados en núcleos de animales jóvenes.
6. Hemos demostrado por primera vez la presencia del nuevo eje del sistema renina angiotensina, angiotensina 1-7/receptor Mas, en la sustancia negra de modelos animales y tejido humano, así como en cultivos celulares de neuronas dopaminérgicas y glía, incluyendo iPSCs de humanos controles sanos y pacientes con enfermedad de Parkinson.

7. El envejecimiento provoca una disminución en la actividad del eje protector angiotensina 1-7/receptor Mas, que puede estar implicado en el aumento de la vulnerabilidad dopaminérgica relacionada con la edad, que lleva a la neurodegeneración.

8. Estudios con ratones *knock-out* revelan que la falta de receptores AT2 provoca una disminución del eje angiotensina 1-7/receptor Mas apoyando la dependencia funcional descrita entre ambos receptores. Del mismo modo, la falta de receptores AT1 también produce una disminución de la síntesis de angiotensina 1-7 aunque no del receptor Mas.

9. La angiotensina 1-7, a través del receptor Mas, inhibe el aumento de especies oxigenadas reactivas celular y las alteraciones en varios parámetros bioenergéticos producidos por la angiotensina II en neuronas dopaminérgicas, lo que confirma su papel neuroprotector en estas células.

10. Intracelularmente, la angiotensina 1-7 se expresa en gran cantidad a nivel mitocondrial y aumenta los niveles de óxido nítrico mitocondriales a través del receptor Mas, lo que provoca una disminución de la producción de superóxido mitocondrial. A nivel nuclear, la angiotensina 1-7, a través del receptor Mas, aumenta los niveles de óxido nítrico, disminuye los niveles de superóxido, y disminuye la transcripción del ARNm de AT2. Estos resultados van en línea con los datos obtenidos con los receptores de angiotensina II mitocondriales y nucleares.



## CAPÍTULO 8: BIBLIOGRAFÍA

---





## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Abeliovich, A., & Flint Beal, M. (2006). Parkinsonism genes: Culprits and clues. *Journal of Neurochemistry*, 99(4), 1062-1072.
- Ago, T., Matsushima, S., Kuroda, J., Zablocki, D., Kitazono, T., & Sadoshima, J. (2010). The NADPH oxidase Nox4 and aging in the heart. *Aging*, 2(12), 1012-1016.
- Alexi, T., Borlongan, C. V., Faull, R. L., Williams, C. E., Clark, R. G., Gluckman, P. D., et al. (2000). Neuroprotective strategies for basal ganglia degeneration: Parkinson's and huntington's diseases. *Progress in Neurobiology*, 60(5), 409-470.
- Bader, M., Alenina, N., Andrade-Navarro, M. A., & Santos, R. A. (2014). MAS and its related G protein-coupled receptors, mrgprs. *Pharmacological Reviews*, 66(4), 1080-1105.
- Baker, K. M., Chernin, M. I., Schreiber, T., Sanghi, S., Haiderzaidi, S., Booz, G. W., et al. (2004). Evidence of a novel intracrine mechanism in angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. *Regulatory Peptides*, 120(1-3), 5-13.
- Beltran, B., Mathur, A., Duchen, M. R., Erusalimsky, J. D., & Moncada, S. (2000). The effect of nitric oxide on cell respiration: A key to understanding its role in cell survival or death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(26), 14602-14607.
- Berg, D., Youdim, M. B. H., & Riederer, P. (2004). Redox imbalance. *Cell and Tissue Research*, 318(1), 201-213.
- Betarbet, R., Sherer, T. B., MacKenzie, G., Garcia-Osuna, M., Panov, A. V., & Greenamyre, J. T. (2000). Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of parkinson's disease. *Nature Neuroscience*, 3(12), 1301-1306.
- Betarbet, R., Sherer, T. B., & Greenamyre, J. T. (2002). Animal models of parkinson's disease. *Bioessays*, 24(4), 308-318.
- Bezin, S., Charpentier, G., Lee, H. C., Baux, G., Fossier, P., & Cancela, J. M. (2008). Regulation of nuclear Ca<sup>2+</sup> signaling by translocation of the Ca<sup>2+</sup> messenger

- synthesizing enzyme ADP-ribosyl cyclase during neuronal depolarization. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(41), 27859-27870.
- Blandini, F., Armentero, M. T., & Martignoni, E. (2008). The 6-hydroxydopamine model: News from the past. *Parkinsonism & Related Disorders*, 14(S2), S124-S129.
- Blesa, J., Phani, S., Jackson-Lewis, V., & Przedborski, S. (2012). Classic and new animal models of parkinson's disease. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, 2012, 845618.
- Block, K., Gorin, Y., & Abboud, H. E. (2009). Subcellular localization of Nox4 and regulation in diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(34), 14385-14390.
- Borniquel, S., Valle, I., Cadenas, S., Lamas, S., & Monsalve, M. (2006). Nitric oxide regulates mitochondrial oxidative stress protection via the transcriptional coactivator PGC-1alpha. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 20(11), 1889-1891.
- Bosnyak, S., Jones, E. S., Christopoulos, A., Aguilar, M. I., Thomas, W. G., & Widdop, R. E. (2011). Relative affinity of angiotensin peptides and novel ligands at AT1 and AT2 receptors. *Clinical Science*, 121(7), 297-303.
- Brookes, P. S., Levonen, A. L., Shiva, S., Sarti, P., & Darley-Usmar, V. M. (2002). Mitochondria: Regulators of signal transduction by reactive oxygen and nitrogen species. *Free Radical Biology & Medicine*, 33(6), 755-764.
- Calabrese, V., Mancuso, C., Calvani, M., Rizzarelli, E., Butterfield, D. A., & Stella, A. M. (2007). Nitric oxide in the central nervous system: Neuroprotection versus neurotoxicity. *Nature Reviews.Neuroscience*, 8(10), 766-775.
- Carey, R. M. (2012). Functional intracellular renin-angiotensin systems: Potential for pathophysiology of disease. *American Journal of Physiology.Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 302(5), R479-R481.
- Carrion, A. M., Link, W. A., Ledo, F., Mellstrom, B., & Naranjo, J. R. (1999). DREAM is a Ca<sup>2+</sup>-regulated transcriptional repressor. *Nature*, 398(6722), 80-84.
- Celardo, I., Martins, L. M., & Gandhi, S. (2014). Unravelling mitochondrial pathways to parkinson's disease. *British Journal of Pharmacology*, 171(8), 1943-1957.
- Chabrashvili, T., Kitiyakara, C., Blau, J., Karber, A., Aslam, S., Welch, W. J., et al. (2003). Effects of ANG II type 1 and 2 receptors on oxidative stress, renal NADPH oxidase, and SOD expression. *American Journal of Physiology.Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 285(1), R117-R124.
- Chawla, S. (2002). Regulation of gene expression by Ca<sup>2+</sup> signals in neuronal cells. *European Journal of Pharmacology*, 447(2-3), 131-140.

- Choi, D. Y., Zhang, J., & Bing, G. (2010). Aging enhances the neuroinflammatory response and alpha-synuclein nitration in rats. *Neurobiology of Aging*, *31*(9), 1649-1653.
- Ciron, C., Zheng, L., Bobela, W., Knott, G. W., Leone, T. C., Kelly, D. P., et al. (2015). PGC-1alpha activity in nigral dopamine neurons determines vulnerability to alpha-synuclein. *Acta Neuropathologica Communications*, *3*, 16.
- Cobb, M. M., Ravisankar, A., Skibinski, G., & Finkbeiner, S. (2017). iPS cells in the study of PD molecular pathogenesis. *Cell and Tissue Research*, doi: 10.1007/s00441-017-2749-y
- Cook, J. L., & Re, R. N. (2012). Lessons from in vitro studies and a related intracellular angiotensin II transgenic mouse model. *American Journal of Physiology.Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, *302*(5), R482-93.
- Cook, J. L., Zhang, Z., & Re, R. N. (2001). In vitro evidence for an intracellular site of angiotensin action. *Circulation Research*, *89*(12), 1138-1146.
- Crawford, G. D., Jr, Le, W. D., Smith, R. G., Xie, W. J., Stefani, E., & Appel, S. H. (1992). A novel N18TG2 x mesencephalon cell hybrid expresses properties that suggest a dopaminergic cell line of substantia nigra origin. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *12*(9), 3392-3398.
- Csiszar, A., Ungvari, Z., Koller, A., Edwards, J. G., & Kaley, G. (2003). Aging-induced proinflammatory shift in cytokine expression profile in coronary arteries. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *17*(9), 1183-1185.
- Davisson, R. L. (2003). Physiological genomic analysis of the brain renin-angiotensin system. *American Journal of Physiology.Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, *285*(3), R498-R511.
- Dawson, T. M., & Dawson, V. L. (2003). Molecular pathways of neurodegeneration in parkinson's disease. *Science*, *302*(5646), 819-822.
- Devi, L., Raghavendran, V., Prabhu, B. M., Avadhani, N. G., & Anandatheerthavarada, H. K. (2008). Mitochondrial import and accumulation of alpha-synuclein impair complex I in human dopaminergic neuronal cultures and parkinson disease brain. *The Journal of Biological Chemistry*, *283*(14), 9089-9100.
- Dexter, D. T., & Jenner, P. (2013). Parkinson disease: From pathology to molecular disease mechanisms. *Free Radical Biology & Medicine*, *62*, 132-144.
- Dias, V., Junn, E., & Mouradian, M. M. (2013). The role of oxidative stress in parkinson's disease. *Journal of Parkinson's Disease*, *3*(4), 461-491.
- Diaz-Ruiz, C., Rodriguez-Perez, A. I., Beiroa, D., Rodriguez-Pallares, J., & Labandeira-Garcia, J. L. (2015). Reciprocal regulation between sirtuin-1 and angiotensin-II in the

- substantia nigra: Implications for aging and neurodegeneration. *Oncotarget*, 6(29), 26675-26689.
- Dick, F. D. (2006). Parkinson's disease and pesticide exposures. *British Medical Bulletin*, 79-80(1), 219-231.
- Dominguez-Meijide, A., Villar-Cheda, B., Garrido-Gil, P., Sierra-Paredes, G., Guerra, M. J., & Labandeira-Garcia, J. L. (2014). Effect of chronic treatment with angiotensin type 1 receptor antagonists on striatal dopamine levels in normal rats and in a rat model of parkinson's disease treated with L-DOPA. *Neuropharmacology*, 76, 156-168.
- Dranka, B. P., Benavides, G. A., Diers, A. R., Giordano, S., Zelickson, B. R., Reily, C., et al. (2011). Assessing bioenergetic function in response to oxidative stress by metabolic profiling. *Free Radical Biology & Medicine*, 51(9), 1621-1635.
- Ebrahimi-Fakhari, D., Wahlster, L., & McLean, P. J. (2012). Protein degradation pathways in parkinson's disease: Curse or blessing. *Acta Neuropathologica*, 124(2), 153-172.
- Eggena, P., Zhu, J. H., Sereevinyayut, S., Giordani, M., Clegg, K., Andersen, P. C., et al. (1996). Hepatic angiotensin II nuclear receptors and transcription of growth-related factors. *Journal of Hypertension*, 14(8), 961-968.
- Etelvino, G. M., Peluso, A. A., & Santos, R. A. (2014). New components of the renin-angiotensin system: Alamandine and the MAS-related G protein-coupled receptor D. *Current Hypertension Reports*, 16(6), 433-014-0433-0.
- Falkenburger, B. H., Saridaki, T., & Dinter, E. (2016). Cellular models for parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry*, 139(S1), 121-130.
- Fariss, M. W., Chan, C. B., Patel, M., Van Houten, B., & Orrenius, S. (2005). Role of mitochondria in toxic oxidative stress. *Molecular Interventions*, 5(2), 94-111.
- Federico, A., Cardaioli, E., Da Pozzo, P., Formichi, P., Gallus, G. N., & Radi, E. (2012). Mitochondria, oxidative stress and neurodegeneration. *Journal of the Neurological Sciences*, 322(1-2), 254-262.
- Ferrario, C. M., Brosnihan, K. B., Diz, D. I., Jaiswal, N., Khosla, M. C., Milsted, A., et al. (1991). Angiotensin-(1-7): A new hormone of the angiotensin system. *Hypertension*, 18(5 Suppl), III126-III133.
- Finley, L. W., & Haigis, M. C. (2009). The coordination of nuclear and mitochondrial communication during aging and calorie restriction. *Ageing Research Reviews*, 8(3), 173-188.
- Fraga-Silva, R. A., Ferreira, A. J., & Dos Santos, R. A. (2013). Opportunities for targeting the angiotensin-converting enzyme 2/angiotensin-(1-7)/mas receptor pathway in hypertension. *Current Hypertension Reports*, 15(1), 31-38.

- Francardo, V. (2017a). Modeling parkinson's disease and treatment complications in rodents: Potentials and pitfalls of the current options. *Behavioural Brain Research*, (17), S0166-S4328
- Francardo, V., Schmitz, Y., Sulzer, D., & Cenci, M. A. (2017b). Neuroprotection and neurorestoration as experimental therapeutics for parkinson's disease. *Experimental Neurology*, 298(Pt B), 137-147.
- Freund, M., Walther, T., & von Bohlen und Halbach, O. (2012). Immunohistochemical localization of the angiotensin-(1-7) receptor mas in the murine forebrain. *Cell and Tissue Research*, 348(1), 29-35.
- Ganten, D., Boucher, R., & Genest, J. (1971). Renin activity in brain tissue of puppies and adult dogs. *Brain Research*, 33(2), 557-559.
- Gao, L., Zhou, W., Symmes, B., & Freed, C. R. (2016). Re-cloning the N27 dopamine cell line to improve a cell culture model of parkinson's disease. *PloS One*, 11(8), e0160847.
- Garrido-Gil, P., Fernandez-Rodriguez, P., Rodriguez-Pallares, J., & Labandeira-Garcia, J. L. (2017a). Laser capture microdissection protocol for gene expression analysis in the brain. *Histochemistry and Cell Biology*, 148(3), 299-311.
- Garrido-Gil, P., Rodriguez-Perez, A. I., Fernandez-Rodriguez, P., Lanciego, J. L., & Labandeira-Garcia, J. L. (2017b). Expression of angiotensinogen and receptors for angiotensin and prorenin in the rat and monkey striatal neurons and glial cells. *Brain Structure & Function*, 222(6), 2559-2571.
- Garrido-Gil, P., Valenzuela, R., Villar-Cheda, B., Lanciego, J. L., & Labandeira-Garcia, J. L. (2013). Expression of angiotensinogen and receptors for angiotensin and prorenin in the monkey and human substantia nigra: An intracellular renin-angiotensin system in the nigra. *Brain Structure & Function*, 218(2), 373-388.
- Giles, M. E., Fernley, R. T., Nakamura, Y., Moeller, I., Aldred, G. P., Ferraro, T., et al. (1999). Characterization of a specific antibody to the rat angiotensin II AT1 receptor. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry : Official Journal of the Histochemistry Society*, 47(4), 507-516.
- Gironacci, M. M. (2015). Angiotensin-(1-7): Beyond its central effects on blood pressure. *Therapeutic Advances in Cardiovascular Disease*, 9(4), 209-216.
- Gomez-Suaga, P., Fdez, E., Blanca Ramirez, M., & Hilfiker, S. (2012). A link between autophagy and the pathophysiology of LRRK2 in parkinson's disease. *Parkinson's Disease*, 2012, 324521.
- Gorin, Y., Ricono, J. M., Kim, N. H., Bhandari, B., Choudhury, G. G., & Abboud, H. E. (2003). Nox4 mediates angiotensin II-induced activation of Akt/protein kinase B in mesangial cells. *American Journal of Physiology.Renal Physiology*, 285(2), F219-F229.

- Grammatopoulos, T. N., Jones, S. M., Ahmadi, F. A., Hoover, B. R., Snell, L. D., Skoch, J., et al. (2007). Angiotensin type 1 receptor antagonist losartan, reduces MPTP-induced degeneration of dopaminergic neurons in substantia nigra. *Molecular Neurodegeneration*, 2, 1.
- Griendling, K. K., Sorescu, D., & Ushio-Fukai, M. (2000). NAD(P)H oxidase: Role in cardiovascular biology and disease. *Circulation Research*, 86(5), 494-501.
- Gurd, B. J., Yoshida, Y., Lally, J., Holloway, G. P., & Bonen, A. (2009). The deacetylase enzyme SIRT1 is not associated with oxidative capacity in rat heart and skeletal muscle and its overexpression reduces mitochondrial biogenesis. *The Journal of Physiology*, 587(Pt 8), 1817-1828.
- Gwathmey, T. M., Shaltout, H. A., Rose, J. C., Diz, D. I., & Chappell, M. C. (2011). Glucocorticoid-induced fetal programming alters the functional complement of angiotensin receptor subtypes within the kidney. *Hypertension*, 57(3), 620-626.
- Henchcliffe, C., & Beal, M. F. (2008). Mitochondrial biology and oxidative stress in parkinson disease pathogenesis. *Nature Clinical Practice.Neurology*, 4(11), 600-609.
- Herichova, I., & Szantooova, K. (2013). Renin-angiotensin system: Upgrade of recent knowledge and perspectives. *Endocrine Regulations*, 47(1), 39-52.
- Hindson, B. J., Ness, K. D., Masquelier, D. A., Belgrader, P., Heredia, N. J., Makarewicz, A. J., et al. (2011). High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. *Analytical Chemistry*, 83(22), 8604-8610.
- Hirsch, E. C., Jenner, P., & Przedborski, S. (2013). Pathogenesis of parkinson's disease. *Movement Disorders : Official Journal of the Movement Disorder Society*, 28(1), 24-30.
- Hong, H., Zeng, J. S., Kreulen, D. L., Kaufman, D. I., & Chen, A. F. (2006). Atorvastatin protects against cerebral infarction via inhibition of NADPH oxidase-derived superoxide in ischemic stroke. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 291(5), H2210- H2215.
- Hoshino, H., Kobayashi, A., Yoshida, M., Kudo, N., Oyake, T., Motohashi, H., et al. (2000). Oxidative stress abolishes leptomycin B-sensitive nuclear export of transcription repressor Bach2 that counteracts activation of maf recognition element. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(20), 15370-15376.
- Hunyady, L. (1999). Molecular mechanisms of angiotensin II receptor internalization. *Journal of the American Society of Nephrology*, 10(1 Suppl. 11), S47-S56.
- Iglesias-Gonzalez, J., Sanchez-Iglesias, S., Mendez-Alvarez, E., Rose, S., Hikima, A., Jenner, P., et al. (2012). Differential toxicity of 6-hydroxydopamine in SH-SY5Y human neuroblastoma cells and rat brain mitochondria: Protective role of catalase and superoxide dismutase. *Neurochemical Research*, 37(10), 2150-2160.

- Iwai, M., & Horiuchi, M. (2009). Devil and angel in the renin-angiotensin system: ACE-angiotensin II-AT1 receptor axis vs. ACE2-angiotensin-(1-7)-mas receptor axis. *Hypertension Research : Official Journal of the Japanese Society of Hypertension*, 32(7), 533-536.
- Jafri, M. S., & Kumar, R. (2014). Modeling mitochondrial function and its role in disease. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 123, 103-125.
- Jankowski, V., Vanholder, R., van der Giet, M., Tolle, M., Karadogan, S., Gobom, J., et al. (2007). Mass-spectrometric identification of a novel angiotensin peptide in human plasma. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 27(2), 297-302.
- Jellinger, K. A. (2009). Recent advances in our understanding of neurodegeneration. *Journal of Neural Transmission*, 116(9), 1111-1162.
- Jenkins, T. A., Mendelsohn, F. A., & Chai, S. Y. (1997). Angiotensin-converting enzyme modulates dopamine turnover in the striatum. *Journal of Neurochemistry*, 68(3), 1304-1311.
- Jenner, P. (2003). Oxidative stress in parkinson's disease. *Annals of Neurology*, 53(S3), S26-S38.
- Jiang, H., Kang, S. U., Zhang, S., Karuppagounder, S., Xu, J., Lee, Y. K., et al. (2016). Adult conditional knockout of PGC-1alpha leads to loss of dopamine neurons. *ENEURO*, 3(4), ENEURO.0183-16.2016.
- Jiang, P., & Dickson, D. W. (2018). Parkinson's disease: Experimental models and reality. *Acta Neuropathologica*, 135(1), 13-32.
- Joglar, B., Rodriguez-Pallares, J., Rodriguez-Perez, A. I., Rey, P., Guerra, M. J., & Labandeira-Garcia, J. L. (2009). The inflammatory response in the MPTP model of parkinson's disease is mediated by brain angiotensin: Relevance to progression of the disease. *Journal of Neurochemistry*, 109(2), 656-669.
- Johnson, K. E. (2015). Approach to the patient with parkinson disease. *Primary Care*, 42(2), 205-215.
- Jomova, K., Vondrakova, D., Lawson, M., & Valko, M. (2010). Metals, oxidative stress and neurodegenerative disorders. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 345(1-2), 91-104.
- Jones, D. P. (2006). Redefining oxidative stress. *Antioxidants & Redox Signaling*, 8(9-10), 1865-1879.
- Jones, E. S., Vinh, A., McCarthy, C. A., Gaspari, T. A., & Widdop, R. E. (2008). AT2 receptors: Functional relevance in cardiovascular disease. *Pharmacology & Therapeutics*, 120(3), 292-316.

- Jones, G. T., Thompson, A. R., van Bockxmeer, F. M., Hafez, H., Cooper, J. A., Gollidge, J., et al. (2008). Angiotensin II type 1 receptor 1166C polymorphism is associated with abdominal aortic aneurysm in three independent cohorts. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 28(4), 764-770.
- Kao, S. Y. (2009). Rescue of alpha-synuclein cytotoxicity by insulin-like growth factors. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 385(3), 434-438.
- Keane, P. C., Kurzawa, M., Blain, P. G., & Morris, C. M. (2011). Mitochondrial dysfunction in parkinson's disease. *Parkinson's Disease*, 2011, 716871.
- Klein, C., & Westenberger, A. (2012). Genetics of parkinson's disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(1), a008888.
- Konings, C. H., Kuiper, M. A., Bergmans, P. L., Grijpma, A. M., van Kamp, G. J., & Wolters, E. C. (1994). Increased angiotensin-converting enzyme activity in cerebrospinal fluid of treated patients with parkinson's disease. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 231(1), 101-106.
- Kumar, R., Thomas, C. M., Yong, Q. C., Chen, W., & Baker, K. M. (2012). The intracrine renin-angiotensin system. *Clinical Science*, 123(5), 273-284.
- Kuroda, J., Nakagawa, K., Yamasaki, T., Nakamura, K., Takeya, R., Kuribayashi, F., et al. (2005). The superoxide-producing NAD(P)H oxidase Nox4 in the nucleus of human vascular endothelial cells. *Genes to Cells : Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms*, 10(12), 1139-1151.
- Kusnier, C., Cardenas, C., Hidalgo, J., & Jaimovich, E. (2006). Single-channel recording of inositol trisphosphate receptor in the isolated nucleus of a muscle cell line. *Biological Research*, 39(3), 541-553.
- Labandeira-Garcia, J. L., Garrido-Gil, P., Rodriguez-Pallares, J., Valenzuela, R., Borrajo, A., & Rodriguez-Perez, A. I. (2014). Brain renin-angiotensin system and dopaminergic cell vulnerability. *Frontiers in Neuroanatomy*, 8, 67.
- Labandeira-Garcia, J. L., Rodriguez-Pallares, J., Dominguez-Mejide, A., Valenzuela, R., Villar-Cheda, B., & Rodriguez-Perez, A. I. (2013). Dopamine-angiotensin interactions in the basal ganglia and their relevance for parkinson's disease. *Movement Disorders*, 28(10), 1337-1342.
- Labandeira-Garcia, J. L., Rodriguez-Perez, A. I., Garrido-Gil, P., Rodriguez-Pallares, J., Lanciego, J. L., & Guerra, M. J. (2017). Brain renin-angiotensin system and microglial polarization: Implications for aging and neurodegeneration. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 9, 129.
- Labandeira-Garcia, J. L., Rodriguez-Perez, A. I., Valenzuela, R., Costa-Besada, M. A., & Guerra, M. J. (2016). Menopause and parkinson's disease. interaction between estrogens

- and brain renin-angiotensin system in dopaminergic degeneration. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 43, 44-59.
- Langston, J. W., Ballard, P., Tetrud, J. W., & Irwin, I. (1983). Chronic parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science*, 219(4587), 979-980.
- Larson, P. S. (2014). Deep brain stimulation for movement disorders. *Neurotherapeutics*, 11(3), 465-474.
- Lassegue, B., & Clempus, R. E. (2003). Vascular NAD(P)H oxidases: Specific features, expression, and regulation. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 285(2), R277-R297.
- Lautner, R. Q., Villela, D. C., Fraga-Silva, R. A., Silva, N., Verano-Braga, T., Costa-Fraga, F., et al. (2013). Discovery and characterization of alamandine: A novel component of the renin-angiotensin system. *Circulation Research*, 112(8), 1104-1111.
- Lavoie, J. L., Cassell, M. D., Gross, K. W., & Sigmund, C. D. (2004). Localization of renin expressing cells in the brain, by use of a REN-eGFP transgenic model. *Physiological Genomics*, 16(2), 240-246.
- Lei, Y., Xu, Q., Zeng, B., Zhang, W., Zhen, Y., Zhai, Y., et al. (2017). Angiotensin-(1-7) protects cardiomyocytes against high glucose-induced injuries through inhibiting reactive oxygen species-activated leptin-p38 mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated protein kinase 1/2 pathways, but not the leptin-c-jun N-terminal kinase pathway in vitro. *Journal of Diabetes Investigation*, 8(4), 434-445.
- Leonhardt, J., Villela, D. C., Teichmann, A., Munter, L. M., Mayer, M. C., Mardahl, M., et al. (2017). Evidence for heterodimerization and functional interaction of the angiotensin type 2 receptor and the receptor MAS. *Hypertension*, 69(6), 1128-1135.
- Li, C., Miao, X., Li, F., Wang, S., Liu, Q., Wang, Y., et al. (2017). Oxidative stress-related mechanisms and antioxidant therapy in diabetic retinopathy. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, 9702820.
- Lin, J. J., Yueh, K. C., Chang, D. C., & Lin, S. Z. (2002). Association between genetic polymorphism of angiotensin-converting enzyme gene and parkinson's disease. *Journal of the Neurological Sciences*, 199(1-2), 25-29.
- Litvan, I. (1998). Parkinsonian features: When are they parkinson disease? *The Journal of the American Medical Association*, 280(19), 1654-1655.
- Lopes, F. M., Bristot, I. J., da Motta, L. L., Parsons, R. B., & Klamt, F. (2017). Mimicking parkinson's disease in a dish: Merits and pitfalls of the most commonly used dopaminergic in vitro models. *Neuromolecular Medicine*, 19(2-3), 241-255.
- Lopez-Real, A., Rey, P., Soto-Otero, R., Mendez-Alvarez, E., & Labandeira-Garcia, J. L. (2005). Angiotensin-converting enzyme inhibition reduces oxidative stress and protects

dopaminergic neurons in a 6-hydroxydopamine rat model of parkinsonism. *Journal of Neuroscience Research*, 81(6), 865-873.

- Mandemakers, W., Morais, V. A., & De Strooper, B. (2007). A cell biological perspective on mitochondrial dysfunction in parkinson disease and other neurodegenerative diseases. *Journal of Cell Science*, 120(Pt 10), 1707-1716.
- Martinez-Pinilla, E., Rodriguez-Perez, A. I., Navarro, G., Aguinaga, D., Moreno, E., Lanciego, J. L., et al. (2015). Dopamine D2 and angiotensin II type 1 receptors form functional heteromers in rat striatum. *Biochemical Pharmacology*, 96(2), 131-142.
- Mascolo, A., Sessa, M., Scavone, C., De Angelis, A., Vitale, C., Berrino, L., et al. (2017). New and old roles of the peripheral and brain renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS): Focus on cardiovascular and neurological diseases. *International Journal of Cardiology*, 227, 734-742.
- Mayeux, R. (2003). Epidemiology of neurodegeneration. *Annual Review of Neuroscience*, 26(1), 81-104.
- Meissner, W. G., Frasier, M., Gasser, T., Goetz, C. G., Lozano, A., Piccini, P., et al. (2011). Priorities in parkinson's disease research. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 10(5), 377-393.
- Mendelsohn, F. A., Jenkins, T. A., & Berkovic, S. F. (1993). Effects of angiotensin II on dopamine and serotonin turnover in the striatum of conscious rats. *Brain Research*, 613(2), 221-229.
- Mertens, B., Varcin, M., Michotte, Y., & Sarre, S. (2011). The neuroprotective action of candesartan is related to interference with the early stages of 6-hydroxydopamine-induced dopaminergic cell death. *The European Journal of Neuroscience*, 34(7), 1141-1148.
- Miyazaki, I., & Asanuma, M. (2008). Dopaminergic neuron-specific oxidative stress caused by dopamine itself. *Acta Medica Okayama*, 62(3), 141-150.
- Mudo, G., Makela, J., Di Liberto, V., Tselykh, T. V., Olivieri, M., Piepponen, P., et al. (2012). Transgenic expression and activation of PGC-1alpha protect dopaminergic neurons in the MPTP mouse model of parkinson's disease. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 69(7), 1153-1165.
- Muñoz, A., Rey, P., Guerra, M. J., Mendez-Alvarez, E., Soto-Otero, R., & Labandeira-Garcia, J. L. (2006). Reduction of dopaminergic degeneration and oxidative stress by inhibition of angiotensin converting enzyme in a MPTP model of parkinsonism. *Neuropharmacology*, 51(1), 112-120.
- Muñoz-Manchado, A. B., Villadiego, J., Suarez-Luna, N., Bermejo-Navas, A., Garrido-Gil, P., Labandeira-Garcia, J. L., et al. (2013). Neuroprotective and reparative effects of carotid body grafts in a chronic MPTP model of parkinson's disease. *Neurobiology of Aging*, 34(3), 902-915.

- Nguyen, G., Delarue, F., Burckle, C., Bouzahir, L., Giller, T., & Sraer, J. D. (2002). Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin. *The Journal of Clinical Investigation*, *109*(11), 1417-1427.
- Ni, H. M., Williams, J. A., & Ding, W. X. (2015). Mitochondrial dynamics and mitochondrial quality control. *Redox Biology*, *4*, 6-13.
- Obermuller, N., Gentili, M., Gauer, S., Gretz, N., Weigel, M., Geiger, H., et al. (2004). Immunohistochemical and mRNA localization of the angiotensin II receptor subtype 2 (AT2) in follicular granulosa cells of the rat ovary. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, *52*(4), 545-548.
- Obeso, J. A., Rodriguez-Oroz, M. C., Goetz, C. G., Marin, C., Kordower, J. H., Rodriguez, M., et al. (2010). Missing pieces in the parkinson's disease puzzle. *Nature Medicine*, *16*(6), 653-661.
- Obeso, J. A., & Lanciego, J. L. (2011). Past, present, and future of the pathophysiological model of the basal ganglia. *Frontiers in Neuroanatomy*, *5*, 39.
- Obeso, J. A., Marin, C., Rodriguez-Oroz, C., Blesa, J., Benitez-Temino, B., Mena-Segovia, J., et al. (2008). The basal ganglia in parkinson's disease: Current concepts and unexplained observations. *Annals of Neurology*, *64*(S2), S30-S46.
- Oertel, W., & Schulz, J. B. (2016). Current and experimental treatments of parkinson disease: A guide for neuroscientists. *Journal of Neurochemistry*, *139*(S1), 325-337.
- Offen, D., Shtatif, B., Hadad, D., Weizman, A., Melamed, E., & Gil-Ad, I. (2001). Protective effect of insulin-like-growth-factor-1 against dopamine-induced neurotoxicity in human and rodent neuronal cultures: Possible implications for parkinson's disease. *Neuroscience Letters*, *316*(3), 129-132.
- Okamura, A., Rakugi, H., Ohishi, M., Yanagitani, Y., Takiuchi, S., Moriguchi, K., et al. (1999). Upregulation of renin-angiotensin system during differentiation of monocytes to macrophages. *Journal of Hypertension*, *17*(4), 537-545.
- Olanow, C. W., & Tatton, W. G. (1999). Etiology and pathogenesis of parkinson's disease. *Annual Review of Neuroscience*, *22*(1), 123-144.
- Oro, C., Qian, H., & Thomas, W. G. (2007). Type 1 angiotensin receptor pharmacology: Signaling beyond G proteins. *Pharmacology & Therapeutics*, *113*(1), 210-226.
- Padia, S. H., & Carey, R. M. (2013). AT2 receptors: Beneficial counter-regulatory role in cardiovascular and renal function. *Pflugers Archiv*, *465*(1), 99-110.
- Palacino, J. J., Sagi, D., Goldberg, M. S., Krauss, S., Motz, C., Wacker, M., et al. (2004). Mitochondrial dysfunction and oxidative damage in parkin-deficient mice. *The Journal of Biological Chemistry*, *279*(18), 18614-18622.

- Parker, W. D., Jr, Boyson, S. J., & Parks, J. K. (1989). Abnormalities of the electron transport chain in idiopathic parkinson's disease. *Annals of Neurology*, 26(6), 719-723.
- Paxinou, E., Weisse, M., Chen, Q., Souza, J. M., Hertkorn, C., Selak, M., et al. (2001). Dynamic regulation of metabolism and respiration by endogenously produced nitric oxide protects against oxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(20), 11575-11580.
- Peng, J., Kimura, B., & Phillips, M. I. (2002). The predominant role of brain angiotensinogen and angiotensin in environmentally induced hypertension. *Regulatory Peptides*, 110(1), 25-32.
- Perier, C., & Vila, M. (2012). Mitochondrial biology and parkinson's disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(2), a009332.
- Pfluger, P. T., Herranz, D., Velasco-Miguel, S., Serrano, M., & Tschop, M. H. (2008). Sirt1 protects against high-fat diet-induced metabolic damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(28), 9793-9798.
- Picard, M., Ritchie, D., Wright, K. J., Romestaing, C., Thomas, M. M., Rowan, S. L., et al. (2010). Mitochondrial functional impairment with aging is exaggerated in isolated mitochondria compared to permeabilized myofibers. *Aging Cell*, 9(6), 1032-1046.
- Puche, J. E., Garcia-Fernandez, M., Muntane, J., Rioja, J., Gonzalez-Baron, S., & Castilla Cortazar, I. (2008). Low doses of insulin-like growth factor-I induce mitochondrial protection in aging rats. *Endocrinology*, 149(5), 2620-2627.
- Qaradakhi, T., Apostolopoulos, V., & Zulli, A. (2016). Angiotensin (1-7) and alamandine: Similarities and differences. *Pharmacological Research*, 111, 820-826.
- Qi, Z., Miller, G. W., & Voit, E. O. (2008). Computational systems analysis of dopamine metabolism. *Plos One*, 3(6), 1-10.
- Quesada, A., Romeo, H. E., & Micevych, P. (2007). Distribution and localization patterns of estrogen receptor-beta and insulin-like growth factor-1 receptors in neurons and glial cells of the female rat substantia nigra: Localization of ERbeta and IGF-1R in substantia nigra. *The Journal of Comparative Neurology*, 503(1), 198-208.
- Rajput, A., Rozdilsky, B., & Rajput, A. (1991). Accuracy of clinical diagnosis in parkinsonism: A prospective study. *The Canadian Journal of Neurological Sciences*, 18(3), 275-278.
- Ramonet, D., Daher, J. P., Lin, B. M., Stafa, K., Kim, J., Banerjee, R., et al. (2011). Dopaminergic neuronal loss, reduced neurite complexity and autophagic abnormalities in transgenic mice expressing G2019S mutant LRRK2. *PloS One*, 6(4), e18568.
- Re, R. N. (2003). Intracellular renin and the nature of intracrine enzymes. *Hypertension*, 42(2), 117-122.

- Re, R. N. (2004). Tissue renin angiotensin systems. *The Medical Clinics of North America*, 88(1), 19-38.
- Re, R. N., & Cook, J. L. (2015). Studies of intracellular angiotensin II. *Methods in Molecular Biology*, 1234, 1-8.
- Reardon, K. A., Mendelsohn, F. A., Chai, S. Y., & Horne, M. K. (2000). The angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitor, perindopril, modifies the clinical features of parkinson's disease. *Australian and New Zealand Journal of Medicine*, 30(1), 48-53.
- Rey, P., Lopez-Real, A., Sanchez-Iglesias, S., Munoz, A., Soto-Otero, R., & Labandeira-Garcia, J. L. (2007). Angiotensin type-1-receptor antagonists reduce 6-hydroxydopamine toxicity for dopaminergic neurons. *Neurobiology of Aging*, 28(4), 555-567.
- Rodriguez-Pallares, J., Parga, J. A., Joglar, B., Guerra, M. J., & Labandeira-Garcia, J. L. (2009). The mitochondrial ATP-sensitive potassium channel blocker 5-hydroxydecanoate inhibits toxicity of 6-hydroxydopamine on dopaminergic neurons. *Neurotoxicity Research*, 15(1), 82-95.
- Rodriguez-Pallares, J., Parga, J. A., Joglar, B., Guerra, M. J., & Labandeira-Garcia, J. L. (2012). Mitochondrial ATP-sensitive potassium channels enhance angiotensin-induced oxidative damage and dopaminergic neuron degeneration. relevance for aging-associated susceptibility to parkinson's disease. *Age*, 34(4), 863-880.
- Rodriguez-Pallares, J., Parga, J. A., Munoz, A., Rey, P., Guerra, M. J., & Labandeira-Garcia, J. L. (2007). Mechanism of 6-hydroxydopamine neurotoxicity: The role of NADPH oxidase and microglial activation in 6-hydroxydopamine-induced degeneration of dopaminergic neurons. *Journal of Neurochemistry*, 103(1), 145-156.
- Rodriguez-Pallares, J., Rey, P., Parga, J. A., Munoz, A., Guerra, M. J., & Labandeira-Garcia, J. L. (2008). Brain angiotensin enhances dopaminergic cell death via microglial activation and NADPH-derived ROS. *Neurobiology of Disease*, 31(1), 58-73.
- Rodriguez-Perez, A. I., Borrajo, A., Diaz-Ruiz, C., Garrido-Gil, P., & Labandeira-Garcia, J. L. (2016). Crosstalk between insulin-like growth factor-1 and angiotensin-II in dopaminergic neurons and glial cells: Role in neuroinflammation and aging. *Oncotarget*, 7(21), 30049-30067.
- Rodriguez-Perez, A. I., Valenzuela, R., Joglar, B., Garrido-Gil, P., Guerra, M. J., & Labandeira-Garcia, J. L. (2011). Renin angiotensin system and gender differences in dopaminergic degeneration. *Molecular Neurodegeneration*, 6, 58.
- Rodriguez-Perez, A. I., Valenzuela, R., Villar-Cheda, B., Guerra, M. J., & Labandeira-Garcia, J. L. (2012). Dopaminergic neuroprotection of hormonal replacement therapy in young and aged menopausal rats: Role of the brain angiotensin system. *Brain*, 135(Pt 1), 124-138.

- Rodriguez-Perez, A. I., Valenzuela, R., Villar-Cheda, B., Guerra, M. J., Lanciego, J. L., & Labandeira-Garcia, J. L. (2010). Estrogen and angiotensin interaction in the substantia nigra. relevance to postmenopausal parkinson's disease. *Experimental Neurology*, *224*(2), 517-526.
- Ruiz-Ortega, M., Esteban, V., Suzuki, Y., Ruperez, M., Mezzano, S., Ardiles, L., et al. (2003). Renal expression of angiotensin type 2 (AT2) receptors during kidney damage. *Kidney International*, *64*(S86), S21-S26.
- Saab, Y. B., Gard, P. R., Yeoman, M. S., Mfarrej, B., El-Moalem, H., & Ingram, M. J. (2007). Renin-angiotensin-system gene polymorphisms and depression. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, *31*(5), 1113-1118.
- Sadaba, M. C., Martin-Estal, I., Puche, J. E., & Castilla-Cortazar, I. (2016). Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) therapy: Mitochondrial dysfunction and diseases. *Biochimica Et Biophysica Acta*, *1862*(7), 1267-1278.
- Sanchez-Danes, A., Richaud-Patin, Y., Carballo-Carbajal, I., Jimenez-Delgado, S., Caig, C., Mora, S., et al. (2012). Disease-specific phenotypes in dopamine neurons from human iPS-based models of genetic and sporadic parkinson's disease. *EMBO Molecular Medicine*, *4*(5), 380-395.
- Santos, R. A. (2014). Angiotensin-(1-7). *Hypertension*, *63*(6), 1138-1147.
- Santos, R. A., Campagnole-Santos, M. J., & Andrade, S. P. (2000). Angiotensin-(1-7): An update. *Regulatory Peptides*, *91*(1-3), 45-62.
- Santos, R. A., Simoes e Silva, A. C., Maric, C., Silva, D. M., Machado, R. P., de Buhr, I., et al. (2003). Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor mas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(14), 8258-8263.
- Sareen, D., van Ginkel, P. R., Takach, J. C., Mohiuddin, A., Darjatmoko, S. R., Albert, D. M., et al. (2006). Mitochondria as the primary target of resveratrol-induced apoptosis in human retinoblastoma cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *47*(9), 3708-3716.
- Savergnini, S. Q., Beiman, M., Lautner, R. Q., de Paula-Carvalho, V., Allahdadi, K., Pessoa, D. C., et al. (2010). Vascular relaxation, antihypertensive effect, and cardioprotection of a novel peptide agonist of the MAS receptor. *Hypertension*, *56*(1), 112-120.
- Scarpulla, R. C. (2008a). Nuclear control of respiratory chain expression by nuclear respiratory factors and PGC-1-related coactivator. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1147*, 321-334.
- Scarpulla, R. C. (2008b). Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function. *Physiological Reviews*, *88*(2), 611-638.

- Schapira, A. H. (1999). Mitochondria in the aetiology and pathogenesis of parkinson's disease. *Parkinsonism & Related Disorders*, 5(4), 139-143.
- Schapira, A. H., Cooper, J. M., Dexter, D., Clark, J. B., Jenner, P., & Marsden, C. D. (1990). Mitochondrial complex I deficiency in parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry*, 54(3), 823-827.
- Schon, E. A., & Przedborski, S. (2011). Mitochondria: The next (neurode)generation. *Neuron*, 70(6), 1033-1053.
- Serrander, L., Cartier, L., Bedard, K., Banfi, B., Lardy, B., Plastre, O., et al. (2007). NOX4 activity is determined by mRNA levels and reveals a unique pattern of ROS generation. *The Biochemical Journal*, 406(1), 105-114.
- Simonnet, G., & Giorguieff-Chesselet, M. F. (1979). Stimulating effect of angiotensin II on the spontaneous release of newly synthesized [3H]dopamine in rat striatal slices. *Neuroscience Letters*, 15(2-3), 153-158.
- Sims, N. R., & Anderson, M. F. (2008). Isolation of mitochondria from rat brain using percoll density gradient centrifugation. *Nature Protocols*, 3(7), 1228-1239.
- Singh, C., Ahmad, I., & Kumar, A. (2007). Pesticides and metals induced parkinson's disease: Involvement of free radicals and oxidative stress. *Cellular and Molecular Biology*, 53(5), 19-28.
- Singh, N., Pillay, V., & Choonara, Y. E. (2007). Advances in the treatment of parkinson's disease. *Progress in Neurobiology*, 81(1), 29-44.
- Song, D. D., & Haber, S. N. (2000). Striatal responses to partial dopaminergic lesion: Evidence for compensatory sprouting. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 20(13), 5102-5114.
- Sonsalla, P. K., Coleman, C., Wong, L. Y., Harris, S. L., Richardson, J. R., Gadad, B. S., et al. (2013). The angiotensin converting enzyme inhibitor captopril protects nigrostriatal dopamine neurons in animal models of parkinsonism. *Experimental Neurology*, 250, 376-383.
- Soto-Otero, R., Mendez-Alvarez, E., Hermida-Ameijeiras, A., Lopez-Real, A. M., & Labandeira-Garcia, J. L. (2002). Effects of (-)-nicotine and (-)-cotinine on 6-hydroxydopamine-induced oxidative stress and neurotoxicity: Relevance for parkinson's disease. *Biochemical Pharmacology*, 64(1), 125-135.
- Soto-Otero, R., Mendez-Alvarez, E., Hermida-Ameijeiras, A., Munoz-Patino, A. M., & Labandeira-Garcia, J. L. (2000). Autoxidation and neurotoxicity of 6-hydroxydopamine in the presence of some antioxidants: Potential implication in relation to the pathogenesis of parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry*, 74(4), 1605-1612.

- Sparks, M. A., Crowley, S. D., Gurley, S. B., Mirotsoy, M., & Coffman, T. M. (2014). Classical renin-angiotensin system in kidney physiology. *Comprehensive Physiology*, 4(3), 1201-1228.
- Spillantini, M. G., Schmidt, M. L., Lee, V. M., Trojanowski, J. Q., Jakes, R., & Goedert, M. (1997). Alpha-synuclein in lewy bodies. *Nature*, 388(6645), 839-840.
- Stoessl, A. J. (2011). Neuroimaging in Parkinson's disease. *The American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 8, 72-81.
- Stowe, D. F., & Camara, A. K. (2009). Mitochondrial reactive oxygen species production in excitable cells: Modulators of mitochondrial and cell function. *Antioxidants & Redox Signaling*, 11(6), 1373-1414.
- St-Pierre, J., Drori, S., Uldry, M., Silvaggi, J. M., Rhee, J., Jager, S., et al. (2006). Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators. *Cell*, 127(2), 397-408.
- Swerdlow, R. H. (2009). The neurodegenerative mitochondriopathies. *Journal of Alzheimer's Disease*, 17(4), 737-751.
- Swerdlow, R. H., Parks, J. K., Miller, S. W., Tuttle, J. B., Trimmer, P. A., Sheehan, J. P., et al. (1996). Origin and functional consequences of the complex I defect in parkinson's disease. *Annals of Neurology*, 40(4), 663-671.
- Tadevosyan, A., Maguy, A., Villeneuve, L. R., Babin, J., Bonnefoy, A., Allen, B. G., et al. (2010). Nuclear-delimited angiotensin receptor-mediated signaling regulates cardiomyocyte gene expression. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(29), 22338-22349.
- Tang, B. L. (2016). Sirt1 and the mitochondria. *Molecules and Cells*, 39(2), 87-95.
- Tanno, M., Kuno, A., Yano, T., Miura, T., Hisahara, S., Ishikawa, S., et al. (2010). Induction of manganese superoxide dismutase by nuclear translocation and activation of SIRT1 promotes cell survival in chronic heart failure. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(11), 8375-8382.
- Tetzner, A., Gebolys, K., Meinert, C., Klein, S., Uhlich, A., Trebicka, J., et al. (2016). G-protein-coupled receptor MrgD is a receptor for angiotensin-(1-7) involving adenylyl cyclase, cAMP, and phosphokinase A. *Hypertension*, 68(1), 185-194.
- Thekkumkara, T., & Linas, S. L. (2002). Role of internalization in AT(1A) receptor function in proximal tubule epithelium. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 282(4), F623-F629.
- Trimmer, P. A., & Bennett, J. P., Jr. (2009). The cybrid model of sporadic parkinson's disease. *Experimental Neurology*, 218(2), 320-325.

- Tsang, A. H. K., & Chung, K. K. K. (2009). Oxidative and nitrosative stress in parkinson's disease. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1792(7), 643-650.
- Ullian, M. E., & Linas, S. L. (1989). Role of receptor cycling in the regulation of angiotensin II surface receptor number and angiotensin II uptake in rat vascular smooth muscle cells. *The Journal of Clinical Investigation*, 84(3), 840-846.
- Unger, T., Chung, O., Csikos, T., Culman, J., Gallinat, S., Gohlke, P., et al. (1996). Angiotensin receptors. *Journal of Hypertension. Supplement : Official Journal of the International Society of Hypertension*, 14(5), S95-S103.
- Unger, T., Gohlke, P., Paul, M., & Rettig, R. (1991). Tissue renin-angiotensin systems: Fact or fiction? *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 18(S2), S20-S25.
- Ungerstedt, U. (1968). 6-hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *European Journal of Pharmacology*, 5(1), 107-110.
- Ungvari, Z., Csiszar, A., & Kaley, G. (2004). Vascular inflammation in aging. *Herz*, 29(8), 733-740.
- Valenzuela, R., Barroso-Chinea, P., Villar-Cheda, B., Joglar, B., Munoz, A., Lanciego, J. L., et al. (2010). Location of prorenin receptors in primate substantia nigra: Effects on dopaminergic cell death. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 69(11), 1130-1142.
- Valenzuela, R., Costa-Besada, M. A., Iglesias-Gonzalez, J., Perez-Costas, E., Villar-Cheda, B., Garrido-Gil, P., et al. (2016). Mitochondrial angiotensin receptors in dopaminergic neurons. role in cell protection and aging-related vulnerability to neurodegeneration. *Cell Death & Disease*, 7(10), e2427.
- Van der Perren, A., Van den Haute, C., & Baekelandt, V. (2015). Viral vector-based models of parkinson's disease. *Current Topics in Behavioral Neurosciences*, 22, 271-301.
- Villar-Cheda, B., Costa-Besada, M. A., Valenzuela, R., Perez-Costas, E., Melendez-Ferro, M., & Labandeira-Garcia, J. L. (2017). The intracellular angiotensin system buffers deleterious effects of the extracellular paracrine system. *Cell Death & Disease*, 8(9), e3044.
- Villar-Cheda, B., Dominguez-Meijide, A., Valenzuela, R., Granado, N., Moratalla, R., & Labandeira-Garcia, J. L. (2014). Aging-related dysregulation of dopamine and angiotensin receptor interaction. *Neurobiology of Aging*, 35(7), 1726-1738.
- Villar-Cheda, B., Rodriguez-Pallares, J., Valenzuela, R., Munoz, A., Guerra, M. J., Baltatu, O. C., et al. (2010). Nigral and striatal regulation of angiotensin receptor expression by dopamine and angiotensin in rodents: Implications for progression of parkinson's disease. *The European Journal of Neuroscience*, 32(10), 1695-1706.

- Villar-Cheda, B., Valenzuela, R., Rodriguez-Perez, A. I., Guerra, M. J., & Labandeira-Garcia, J. L. (2012). Aging-related changes in the nigral angiotensin system enhances proinflammatory and pro-oxidative markers and 6-OHDA-induced dopaminergic degeneration. *Neurobiology of Aging*, 33(1), 204.e1-204.e11.
- Villela, D., Leonhardt, J., Patel, N., Joseph, J., Kirsch, S., Hallberg, A., et al. (2015). Angiotensin type 2 receptor (AT2R) and receptor mas: A complex liaison. *Clinical Science*, 128(4), 227-234.
- Villela, D. C., Passos-Silva, D. G., & Santos, R. A. (2014). Alamandine: A new member of the angiotensin family. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 23(2), 130-134.
- Vinciguerra, M., Santini, M. P., Claycomb, W. C., Ladurner, A. G., & Rosenthal, N. (2009). Local IGF-1 isoform protects cardiomyocytes from hypertrophic and oxidative stresses via SirT1 activity. *Aging*, 2(1), 43-62.
- Vingill, S., Connor-Robson, N., & Wade-Martins, R. (2017). Are rodent models of parkinson's disease behaving as they should? *Behavioural Brain Research*, doi: 10.1016/j.bbr.2017.10.021
- Vivekanantham, S., Shah, S., Dewji, R., Dewji, A., Khatri, C., & Ologunde, R. (2015). Neuroinflammation in parkinson's disease: Role in neurodegeneration and tissue repair. *The International Journal of Neuroscience*, 125(10), 717-725.
- Wang, G., Coleman, C. G., Glass, M. J., Zhou, P., Yu, Q., Park, L., et al. (2012). Angiotensin II type 2 receptor-coupled nitric oxide production modulates free radical availability and voltage-gated Ca<sup>2+</sup> currents in NTS neurons. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 302(9), R1076-R1083.
- Wang, Y. X., Poon, C. I., Poon, K. S., & Pang, C. C. (1993). Inhibitory actions of diphenylethylidonium on endothelium-dependent vasodilatations in vitro and in vivo. *British Journal of Pharmacology*, 110(3), 1232-1238.
- Wright, J. W., & Harding, J. W. (2013). The brain renin-angiotensin system: A diversity of functions and implications for CNS diseases. *Pflugers Archiv*, 465(1), 133-151.
- Xiao, X., Zhang, C., Ma, X., Miao, H., Wang, J., Liu, L., et al. (2015). Angiotensin-(1-7) counteracts angiotensin II-induced dysfunction in cerebral endothelial cells via modulating Nox2/ROS and PI3K/NO pathways. *Experimental Cell Research*, 336(1), 58-65.
- Xu, C., Inokuma, M. S., Denham, J., Golds, K., Kundu, P., Gold, J. D., et al. (2001). Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Nature Biotechnology*, 19(10), 971-974.
- Yamanaka, S., & Takahashi, K. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse fibroblast cultures. *Tanpakushitsu Kakusan Koso. Protein, Nucleic Acid, Enzyme*, 51(15), 2346-2351.

- Yuan, Y., Cruzat, V. F., Newsholme, P., Cheng, J., Chen, Y., & Lu, Y. (2016). Regulation of SIRT1 in aging: Roles in mitochondrial function and biogenesis. *Mechanisms of Ageing and Development*, 155, 10-21.
- Yun, J., & Finkel, T. (2014). Mitohormesis. *Cell Metabolism*, 19(5), 757-766.
- Zawada, W. M., Banninger, G. P., Thornton, J., Marriott, B., Cantu, D., Rachubinski, A. L., et al. (2011). Generation of reactive oxygen species in 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+) treated dopaminergic neurons occurs as an NADPH oxidase-dependent two-wave cascade. *Journal of Neuroinflammation*, 8, 129.
- Zawada, W. M., Mrak, R. E., Biedermann, J., Palmer, Q. D., Gentleman, S. M., Aboud, O., et al. (2015). Loss of angiotensin II receptor expression in dopamine neurons in parkinson's disease correlates with pathological progression and is accompanied by increases in Nox4- and 8-OH guanosine-related nucleic acid oxidation and caspase-3 activation. *Acta Neuropathologica Communications*, 3, 9.
- Zhang, D. X., & Gutterman, D. D. (2007). Mitochondrial reactive oxygen species-mediated signaling in endothelial cells. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 292(5), H2023-H2031.
- Zhang, P., Xia, N., & Reijo Pera, R. A. (2014). Directed dopaminergic neuron differentiation from human pluripotent stem cells. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, (91), 51737.
- Zheng, B., Liao, Z., Locascio, J. J., Lesniak, K. A., Roderick, S. S., Watt, M. L., et al. (2010). PGC-1alpha, a potential therapeutic target for early intervention in parkinson's disease. *Science Translational Medicine*, 2(52), 52ra73.
- Zhou, C., Huang, Y., & Przedborski, S. (2008). Oxidative stress in parkinson's disease: a mechanism of pathogenic and therapeutic significance. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1147(1), 93-104.



## Anexo II

---





## **DECLARACIÓN DE CONFLICTOS DE INTERÉS**

La autora declara que no existen conflictos de interés en la presente tesis.





## ARTÍCULOS DERIVADOS DE LA TESIS

1. **Costa-Besada MA**, Valenzuela R, Garrido-Gil P, Villar-Cheda B, Parga JA, Lanciego JL, Labandeira-Garcia JL. Paracrine and Intracrine Angiotensin 1-7/Mas Receptor Axis in the Substantia Nigra of Rodents, Monkeys, and Humans. *Molecular Neurobiology*. 2017; Doi: 10.1007/s12035-017-0805-y
2. Villar-Cheda B, **Costa-Besada MA**, Valenzuela R, Perez-Costas E, Melendez-Ferro M, Labandeira-Garcia JL. The intracellular angiotensin system buffers deleterious effects of the extracellular paracrine system. *Cell Death & Disease*. 2017; 8(9):e3044
3. Valenzuela R, **Costa-Besada MA**, Iglesias-Gonzalez J, Perez-Costas E, Villar-Cheda B, Garrido-Gil P, Melendez-Ferro M, Soto-Otero R, Lanciego JL, Henrion D, Franco R, Labandeira-Garcia JL. Mitochondrial angiotensin receptors in dopaminergic neurons. Role in cell protection and aging-related vulnerability to neurodegeneration. *Cell Death & Disease*. 2016; 7(10):e2427.





# Mitochondrial angiotensin receptors in dopaminergic neurons. Role in cell protection and aging-related vulnerability to neurodegeneration

Rita Valenzuela<sup>1,2,10</sup>, Maria A Costa-Besada<sup>1,2,10</sup>, Javier Iglesias-Gonzalez<sup>3</sup>, Emma Perez-Costas<sup>4</sup>, Begoña Villar-Cheda<sup>1,2</sup>, Pablo Garrido-Gil<sup>1,2</sup>, Miguel Melendez-Ferro<sup>5</sup>, Ramon Soto-Otero<sup>6,2</sup>, Jose L Lanciego<sup>7,2</sup>, Daniel Henrion<sup>8</sup>, Rafael Franco<sup>9,2</sup> and Jose L Labandeira-Garcia<sup>\*,1,2</sup>

The renin–angiotensin system (RAS) was initially considered as a circulating humoral system controlling blood pressure, being kidney the key control organ. In addition to the ‘classical’ humoral RAS, a second level in RAS, local or tissular RAS, has been identified in a variety of tissues, in which local RAS play a key role in degenerative and aging-related diseases. The local brain RAS plays a major role in brain function and neurodegeneration. It is normally assumed that the effects are mediated by the cell-surface-specific G-protein-coupled angiotensin type 1 and 2 receptors (AT1 and AT2). A combination of *in vivo* (*rats, wild-type mice and knockout mice*) and *in vitro* (primary mesencephalic cultures, dopaminergic neuron cell line cultures) experimental approaches (confocal microscopy, electron microscopy, laser capture microdissection, transfection of fluorescent-tagged receptors, treatments with fluorescent angiotensin, western blot, polymerase chain reaction, HPLC, mitochondrial respirometry and other functional assays) were used in the present study. We report the discovery of AT1 and AT2 receptors in brain mitochondria, particularly mitochondria of dopaminergic neurons. Activation of AT1 receptors in mitochondria regulates superoxide production, via Nox4, and increases respiration. Mitochondrial AT2 receptors are much more abundant and increase after treatment of cells with oxidative stress inducers, and produce, via nitric oxide, a decrease in mitochondrial respiration. Mitochondria from the nigral region of aged rats displayed altered expression of AT1 and AT2 receptors. AT2-mediated regulation of mitochondrial respiration represents an unrecognized primary line of defence against oxidative stress, which may be particularly important in neurons with increased levels of oxidative stress such as dopaminergic neurons. Altered expression of AT1 and AT2 receptors with aging may induce mitochondrial dysfunction, the main risk factor for neurodegeneration.

*Cell Death and Disease* (2016) 7, e2427; doi:10.1038/cddis.2016.327; published online 20 October 2016

The renin–angiotensin system (RAS) was initially considered as a circulating humoral system controlling blood pressure and kidney as a key control organ. The actions of angiotensin II (All), the most important effector peptide, are mediated by two main cell receptors: All type 1 and 2 (AT1 and AT2). It is generally considered that AT2 receptors exert actions directly opposed to those mediated by AT1 receptors, thus antagonizing many of the effects of the latter.<sup>1</sup> In addition to this ‘classical’ humoral RAS, a second RAS, local or tissue RAS, has been identified in a variety of tissues, including the central

nervous system.<sup>2</sup> The role of RAS on brain function was initially associated with the effects of circulating RAS in areas involved in central control of blood pressure; however, it is now known that the local brain RAS is involved in different brain functions and disorders.<sup>3,4</sup> We have previously demonstrated the presence of a local RAS in the substantia nigra pars compacta (SNc) and striatum of rodents and primates, including humans.<sup>5–7</sup> It has also been demonstrated that overactivation of local RAS, via AT1 receptors, exacerbates neuroinflammation, oxidative stress and dopaminergic cell

<sup>1</sup>Laboratory of Neuroanatomy and Experimental Neurology, Department of Morphological Sciences, CIMUS, University of Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain; <sup>2</sup>Networking Research Center on Neurodegenerative Diseases (CIBERNED), Madrid, Spain; <sup>3</sup>Healing Foundation Centre, The University of Manchester, Manchester, UK; <sup>4</sup>Department of Pediatrics-Pediatric Nephrology, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL, USA; <sup>5</sup>Department of Surgery-Pediatric, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL, USA; <sup>6</sup>Laboratory of Neurochemistry, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Medicine, University of Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain; <sup>7</sup>Neuroscience Department, Center for Applied Medical Research (CIMA, IdiSNA), University of Navarra, Pamplona, Spain; <sup>8</sup>MITOVASC Institute, INSERM U1083, CNRS UMR6214, University of Angers, Angers, France and <sup>9</sup>Laboratory of Molecular Neurobiology, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Biology, University of Barcelona, Barcelona, Spain

\*Corresponding author: JL Labandeira-Garcia, Department of Morphological Sciences, Laboratory of Neuroanatomy and Experimental Neurology, Faculty of Medicine, University of Santiago de Compostela, Santiago de Compostela 15782, Spain. Tel: +34 881 812 223; Fax: +34 881 812 378; E-mail: joseluis.labandeira@usc.es

<sup>10</sup>These authors contributed equally to this work.

**Abbreviations:** All, angiotensin II; AT1, angiotensin type 1 receptors; AT2, angiotensin type 2 receptors; BCA, bicinchoninic acid; COX, cytochrome c oxidase; DPI, diphenyleneiodonium; E, maximum respiratory rate; ETC, electron transport chain; ETS, electron transport system; HDAC2, histone deacetylase 2; LCM, laser captured microdissection; LDH, lactate dehydrogenase; mitoKATP, ATP-sensitive potassium channels; MTR, Mitotracker Deep Red; NAC, N-acetyl-cysteine; NO, nitric oxide; NOS, nitric oxide synthase; Nox4, NADPH oxidase 4; O<sub>2</sub><sup>-</sup>, superoxide; P, oxidative phosphorylation; PD, Parkinson's disease; RAS, renin–angiotensin system; ROS, reactive oxygen species; RT-PCR, reverse transcription polymerase chain reaction; SN, substantia nigra; SNc, substantia nigra pars compacta; TH, tyrosine hydroxylase; VDCC, voltage-dependent anion channel; VM, ventral mesencephalon; WB, western blot

Received 27.6.16; revised 14.9.16; accepted 16.9.16; Edited by A Verkhratsky

death, all of which are inhibited by treatment with AT1 receptor antagonists.<sup>8,9</sup>

More recently, a third-level of RAS (i.e. intracellular/intracrine) has been suggested in peripheral tissues.<sup>10,11</sup> The system may be activated by AII internalized using AT1 receptors or by intracellularly synthesized AII.<sup>12</sup> Immunohistochemical studies suggest an apparent intracellular localization of several RAS components in the SNc of mammals, including primates and humans.<sup>5,13</sup> Mitochondrial dysfunction plays a major role in several neurodegenerative disorders, particularly in the degeneration of dopaminergic neurons in Parkinson's disease (PD). In the present study, we have discovered AT1 and AT2 receptors in brain mitochondria and investigated their role in controlling mitochondrial events. The experiments were carried out in rats, in AT1 and AT2 receptor knockout mice, in primary cultures of the nigral region and in the dopaminergic neuron cell line MES 23.5. We carried out functional studies with isolated mitochondria to exclude any possible indirect effects caused by non-mitochondrial AT1 and AT2 receptors, and showed that angiotensin receptors control key mitochondrial events.

## Results

**Localization of angiotensin receptors in mitochondria of dopaminergic neurons in cell cultures and rat substantia nigra.** The localization of AT1 and AT2 receptors in dopaminergic neurons has been shown by immunohistochemistry in previous studies. In the present study, this was confirmed by laser captured microdissection (LCM) of dopaminergic neurons in the rat substantia nigra (SN) and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). RT-PCR analysis revealed expression of detectable mRNA levels of TH, angiotensinogen and AT1 and AT2 receptors in isolated nigral dopaminergic neurons (Figure 1a).

We used triple immunofluorescence and confocal microscopy to investigate whether mitochondria of dopaminergic neurons expressed AT1 and AT2 receptors. Series of confocal images were obtained every 0.7  $\mu\text{m}$  in the Z-axis level by a sequential scan method. Dopaminergic neurons were identified by their tyrosine hydroxylase (TH)-immunoreactivity, and mitochondria were labeled with the specific probe Mitotracker Deep Red (MTDR), which revealed the characteristic pattern of the mitochondrial network. The specificity of the antibodies (see Materials and Methods) was confirmed by western blot (WB) analysis of lysates from HEK293 cells transfected with recombinant AT1 or AT2 containing a C-terminal DDK epitope tag (DYKDDDDK) fused (Origene). A predominant immunoreactive band was observed in positive transfected lysates but not in negative controls, which consisted of empty vector transfected lysates (Figure 1b).

In primary cultures (Figure 1c) and the MES 23.5 cell line of dopaminergic (i.e. TH-positive) neurons (Figure 1d), dopaminergic neurons showed intense immunoreactivity to TH antibody. Labeling for AT1 receptors was intense at the periphery of the cells, suggesting the presence of receptors at the cell surface, and also within the neurons, at cytoplasmic and nuclear levels. Colocalization of AT1 with the specific probe MTDR revealed that many of the mitochondria expressed AT1

receptors, although some mitochondria showed weak or unclear AT1 immunolabeling. On the contrary, AT2 receptor labeling was particularly intense in the cytoplasm, while weaker labeling was observed at the cell surface and in the nucleus. At the cytoplasmic level, AT2 labeling colocalized with MTDR and the pattern of distribution was similar to that of mitochondrial labeling, which suggests a strong presence of this receptor in mitochondria of dopaminergic neurons.

Electron microscopy samples were obtained from the densely packed dopaminergic cell clusters of the rat substantia nigra compacta. Labeling for both AT1 and AT2 receptors was observed in the neuronal processes (Figure 1e) and in the cytoplasm of dopaminergic neurons (Figure 1f), associated with different organelles and cytoplasmic structures. More specifically, labeling was frequently observed in mitochondria, mainly located in the outer membrane (Figures 1e and f) although in some cases labeling was also observed in the cristae (Figure 1f, left). Labeling for both receptors was also observed in the rough endoplasmic reticulum, and in clusters of free ribosomes, which were often located in close vicinity to labeled mitochondria (Figures 1e and f).

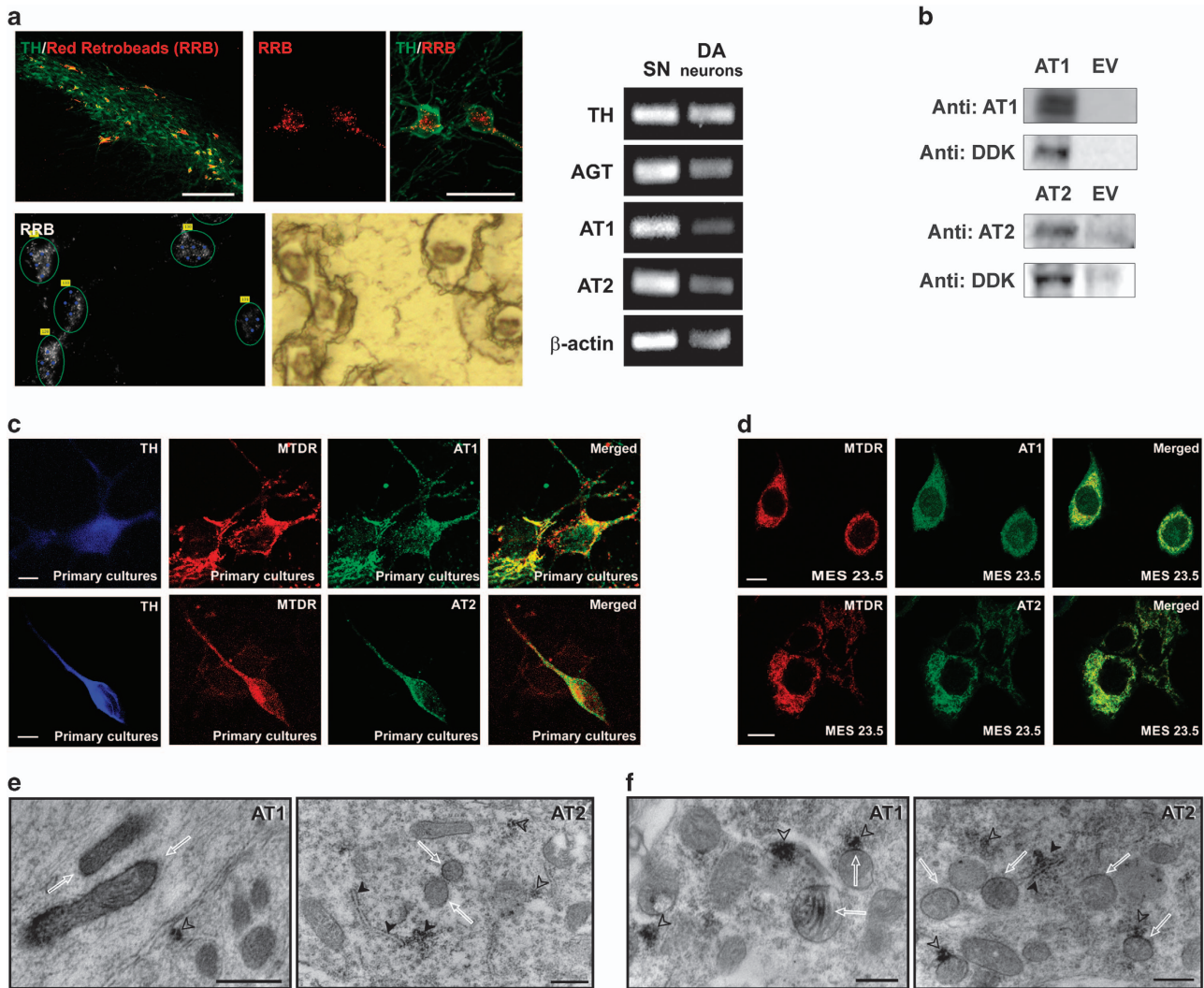
## Presence of fluorescent-tagged angiotensin receptors and fluorescent AII in mitochondria.

Twenty-four hours after transient transfection of the dopaminergic neuron cell line MES 23.5, AT1 and AT2 receptors labeled with fluorescent proteins (yellow fluorescent protein, YFP; enhanced green fluorescent protein, EGFP) were located both at the plasma membrane and intracellularly, and they colocalized with the mitochondrial marker MDTR (Figures 2a–f). In a second series of experiments, cultures of the dopaminergic neuron cell line MES 23.5 were treated with Alexa Fluor 488-conjugated AII to investigate the localization of AII within the mitochondria. The fluorescent AII was internalized and colocalized with mitochondria, which was evident after 30 min, and persisted for 8 h after treatment (Figures 2g–i).

Interestingly, enhanced intracellular oxidative stress (i.e. after treatment of cells with very low doses of MPP<sup>+</sup>) altered the distribution of AT2-YFP labeling. In particular, after labeling mitochondria with a mitotracker probe, AT2-YFP was more abundant at the mitochondrial level than in untreated cells. However, treatment of cells with the antioxidant *N*-acetylcysteine (NAC) induced increased mitochondrial AT1-EGFP fluorescence relative to control cells. These effects were confirmed by WB in samples from isolated mitochondria (see below).

## Presence of angiotensin receptors and AII in isolated mitochondria.

Mitochondria were isolated from the nigral region of rat in the ventral mesencephalon (VM) by separating organelles by ultracentrifugation in a preformed Percoll gradient.<sup>14</sup> The quality of the sample was demonstrated by the absence of different specific cell compartment markers, such as histone deacetylase 2 (HDAC2) and  $\alpha$ -tubulin, which are markers for the nuclear and the cytosol fractions, respectively. The mitochondrial fraction was confirmed with the mitochondrial marker voltage-dependent anion channel (VDAC). The activity of lactate dehydrogenase

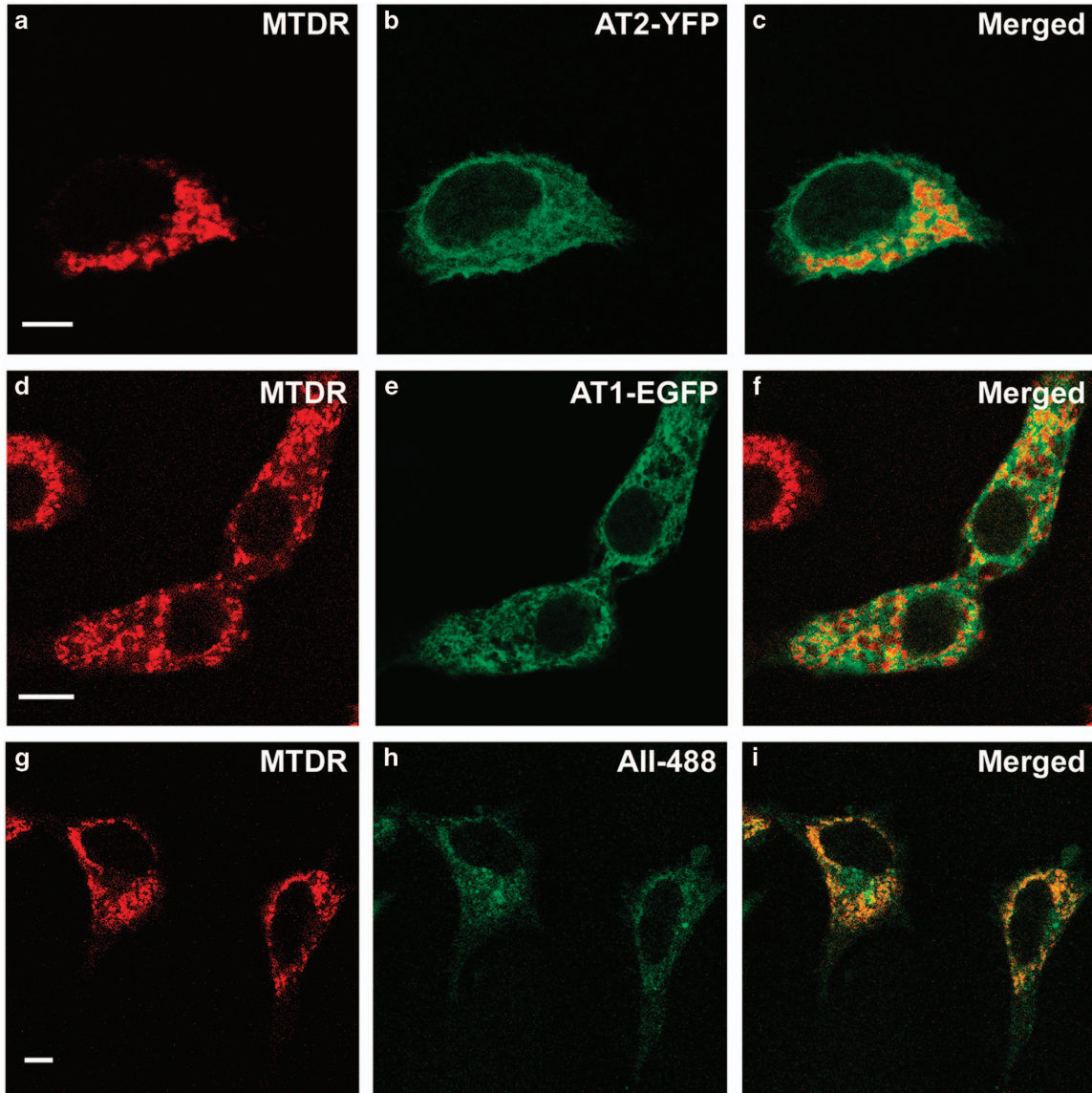


**Figure 1** Specificity of angiotensin receptor antibodies and localization of angiotensin receptors in mitochondria of dopaminergic neurons. (a) The expression of major RAS components in dopaminergic neurons was confirmed by RT-PCR and laser microdissection of dopaminergic neurons retrogradely labeled by intrastriatal injection of fluorescent red retrobeads (RRB). SN section showing labeled dopaminergic neurons before and after laser microdissection for RT-PCR. Expression of TH, AGT, AT1, AT2 and  $\beta$ -actin mRNA in laser-microdissected dopaminergic neurons (right) and homogenates of SN used as a positive control (left) are also shown. (b) Western blot densitometric bands corresponding to 10  $\mu$ g of AT1 or AT2 receptor overexpression lysate containing a C-terminal DDK epitope tag (DYKDDDDK) fused (left), and 10  $\mu$ g of empty vector transfected control cell lysate HEK293 (EV, right). A band of 45 kDa was detected with the AT1 antibody, while a band of 50 kDa was detected with the AT2 antibody. A monoclonal antibody against DDK detected the corresponding band in the protein lysates. Colocalization of mitochondria and AT1 and AT2 receptors in primary cultures of the nigral region (c) and neurons from the MES 23.5 dopaminergic cell line (d). Electron microscopy of AT1 and AT2 labeling in a neuronal process (e) and cytoplasm (f) of a dopaminergic neuron. Immunolabeling for AT1 was observed in the outer membrane and cristae (white arrows) of mitochondria. In addition, strong AT1 labeling was also seen in clusters of free ribosomes (empty arrowheads). Immunolabeling for AT2 was present in mitochondrial membranes (white arrows), in the rough endoplasmic reticulum (black arrowheads) and in small clusters of free ribosomes, some of which were in close proximity to labeled mitochondria (empty arrowheads). AGT, angiotensinogen; DA, dopaminergic; MTDR, MitoTracker Deep Red; SN, substantia nigra; TH, tyrosine hydroxylase. Scale bars: (a) 50 and 200  $\mu$ m (SN section); (c) 5  $\mu$ m; (d) 10  $\mu$ m; (e and f) 500 nm

(LDH), which is a cytosolic enzyme predominantly associated with contaminating synaptosomes, was measured relative to that of the whole homogenate, and only residual nonsignificant activity was observed in the mitochondrial fraction (Figures 3a–d). We observed the presence of the main angiotensin receptor types (i.e. AT1 and AT2) in the mitochondrial fraction. There was a clear difference in the abundance of each receptor subtype; while AT1 appeared less abundant in mitochondria than in total cell homogenate, AT2 expression was higher than in the total homogenate

(Figures 3a–c). Furthermore, we have confirmed the presence of All peptide in isolated mitochondria using HPLC purified samples ( $0.0381 \pm 0.00618$  pg/ml).

**Effects of oxidative stress levels and aging on the expression of mitochondrial angiotensin receptors.** After transient transfection of the dopaminergic neuron cell line MES 23.5, AT2-YFP was more abundant at the mitochondrial level after treatment of cells with inducers of oxidative stress such as very low doses of MPP<sup>+</sup>; relative



**Figure 2** Presence of fluorescence-tagged angiotensin receptors and fluorescent angiotensin II in mitochondria. Colocalization (c, f and i) of the fluorescent mitochondrial marker MTDR (a, d and g) with AT2-YFP (b), AT1-EGFP (e) or AII-488 (h). Fluorescent AII-488 colocalized with mitochondria 8 h after treatment of cultures (g–i). Cells transfected with AT1-EGFP required simultaneous treatment with the AT1 receptor antagonist losartan, in order to minimize AT1-induced superoxide toxicity and cell death. AT2-YFP, angiotensin receptor type 2 tagged to yellow fluorescent protein; AT1-EGFP, angiotensin receptor type 1 tagged to enhanced green fluorescent protein; AII-488, Alexa Fluor 488-fluorescent angiotensin II; MTDR, MitoTracker Deep Red. Scale bar: 5  $\mu$ m

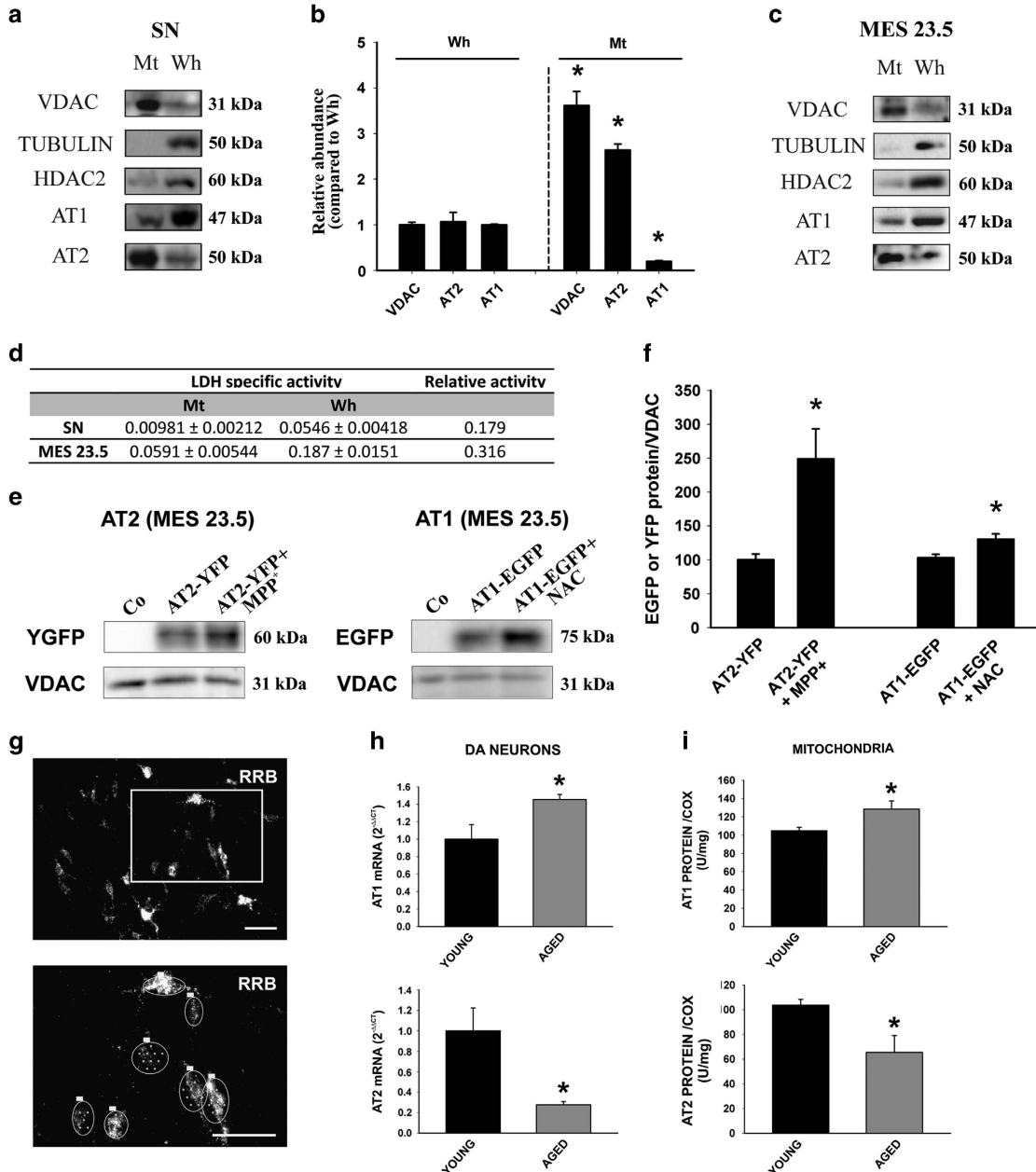
density of the protein bands normalized to VDAC were  $94.9 \pm 13.0$  for untreated controls and  $248.8 \pm 44.3$  for cells treated with MPP<sup>+</sup> ( $P < 0.05$ ). Treatment of cells with the antioxidant NAC led to higher mitochondrial levels of AT1-EGFP than in mitochondria from untreated dopaminergic cells (Control:  $103.1 \pm 5.0$ ; NAC:  $130.6 \pm 7.8$ ;  $P < 0.05$ ; Figures 3e and f).

RT-PCR analysis of dopaminergic neurons isolated from rat SN using LCM revealed that aging induces a significant increase (45%) in AT1 receptor mRNA expression. In contrast, the levels of AT2 receptor mRNA in dopaminergic neurons were significantly lower (83% decrease) in aged rats than in

young rats (Figures 3g and h). In isolated mitochondria, the expression of mitochondrial AT1 receptors detected by WB increased in aged rats, while expression of mitochondrial AT2 was lower in aged rats than in young rats (Figure 3i). Furthermore, using the same isolation procedure, there was a substantial difference in total protein concentration between mitochondria isolated from young and aged rats. Mitochondria isolated from aged rats contained almost half the amount of protein concentration than those from young rats. This is not surprising since the number and mass of mitochondria is known to decrease with age, which alters the quantification of protein between both groups of animals. Therefore, to obtain a

more accurate estimation of mitochondrial content, we used cytochrome *c* oxidase (COX) activity to normalize the data obtained from AT1 and AT2 receptor expression determined by WB (Figure 3i).<sup>15</sup>

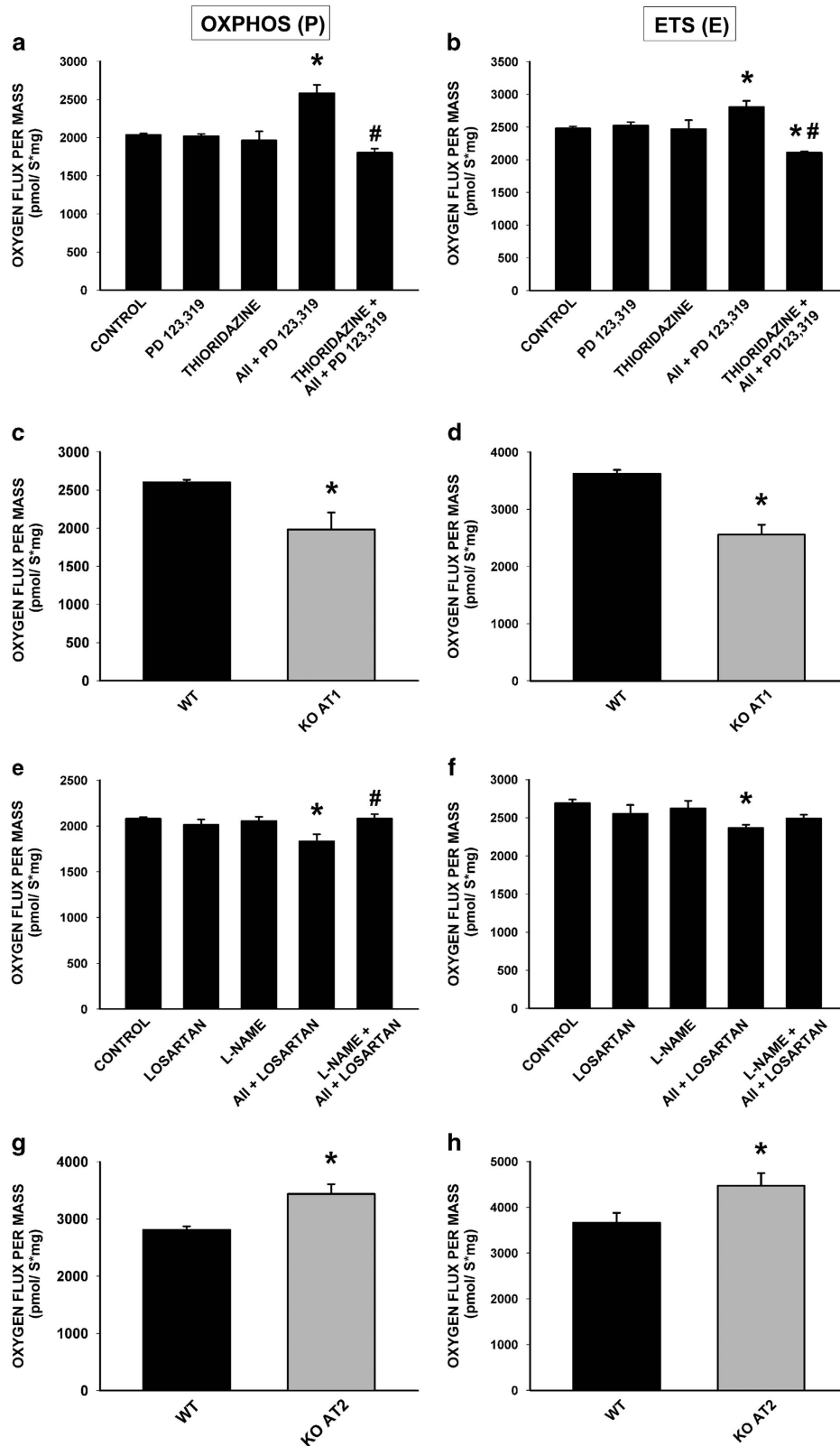
**Effect of mitochondrial angiotensin receptors on mitochondrial respiration.** Bioenergetic studies were carried out using mitochondria isolated from the nigral region of rat, and confirmed with mitochondria isolated from the whole brain.



**Figure 3** AT1 and AT2 receptors in isolated mitochondria (IM) from ventral mesencephalon and the dopaminergic neuron cell line MES 23.5. Effect of oxidative stress and aging. (a–c) Western blot (WB) of whole homogenate (Wh; *n* = 4) and pure IM (Mt; *n* = 4) from the nigral region (a) and MES 23.5 cells (c) showing different compartment markers used to assess the purity of the IM: voltage-dependent anion channel (VDAC) as a mitochondrial marker, tubulin as a cytosol marker and histone deacetylase 2 (HDAC2) as a nuclear marker. Note the higher expression of mitochondrial AT2 compared with AT1 receptors (b). (d) The levels of lactate dehydrogenase specific activity (LDH; micromol of substrate/min/mg; a marker for cytosolic and synaptosomal contamination) of the nigral region and MES 23.5 pure IM (Mt; *n* = 6) were negligible relative to those in Wh. (e and f) WB of IM from the MES 23.5 cells transfected with AT2-YFP (yellow fluorescent protein; *n* = 4) or AT1-EGFP (enhanced green fluorescent protein; *n* = 3) showing the presence of fluorescent-tagged angiotensin receptors in IM in comparison with non-transfected cells (Co, control); 24 h treatment of cells, low doses of MPP<sup>+</sup> (*n* = 4) or *N*-acetyl-L-cysteine (NAC; *n* = 3) induced increased expression of mitochondrial AT2 and AT1 receptors, respectively (AT2-YFP+MPP<sup>+</sup>; AT1-EGFP+NAC). (g–i) In young (*n* = 3) and aged (*n* = 4) rats, the expression of AT1 and AT2 receptors was analyzed by RT-PCR in nigral dopaminergic neurons labeled with red retrobeads (RRB) and isolated by laser microdissection (g–h), and by WB of IM from the nigral region of young (*n* = 5–8) and aged rats (*n* = 5–6) (i). Aging induced a significant increase in AT1 expression and a significant decrease in AT2 expression in both dopaminergic neurons and in IM. The results were normalized to the values of young animals. Data are means ± S.E.M. \**P* < 0.05 relative to the corresponding controls (Student's *t*-test). Scale bars: 50 μm

Isolated mitochondria were treated with AII in the presence of antagonists of either AT1 (losartan) or AT2 (PD123,319) receptors. Our results showed that activation of mitochondrial

angiotensin receptors produced opposite effects on respiratory function. Activation of mitochondrial AT1 receptors with AII (i.e. AII+ PD123,319) induced an increase in both



oxidative phosphorylation (P) and maximum respiratory rate (E) (Figures 4a and b). This was consistent with that observed in mice lacking AT1 receptors, which showed a decrease in respiratory activity compared with wild-type mice (Figures 4c and d). Activation of mitochondrial AT2 receptors by All (i.e. All+losartan) produced a significant decrease in activated respiration (OXPHOS or P) and maximum respiration rate (maximum electron transport system, ETS or E) associated with complex I (Figures 4e and f). This is consistent with the results in knockout mice for AT2 receptors, which showed higher mitochondrial respiration rates compared with wild-type littermate controls (Figures 4g and h).

Interestingly, the increase in respiratory capacity induced by activation of mitochondrial AT1 receptor was blocked by pre-incubation of isolated mitochondria with the NOX4 inhibitor thioridazine, which revealed the major role of NOX4 in the induction of superoxide by mitochondrial AT1 receptor activation (Figures 4a and b). The decrease in respiratory capacity induced by activation of mitochondrial AT2 receptors was inhibited by pre-treatment of isolated mitochondria with the nitric oxide synthase (NOS) inhibitor, *N*<sup>ω</sup>-nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME), which revealed the major role of nitric oxide (NO) in this effect (Figures 4e and f).

**Effect of mitochondrial angiotensin receptors on mitochondrial transmembrane potential, nitric oxide and superoxide production. Role of mitochondrial NOS and mitochondrial NADPH oxidase 4.** Isolated mitochondria were incubated with the AT1 receptor antagonist losartan or the AT2 receptor antagonist PD123,319, and then incubated with All. Mitochondria were energized through complex I by adding pyruvate and malate. Activation of AT1 or AT2 receptors did not induce any significant change in mitochondrial membrane potential, indicating that the bioenergetic properties of the mitochondria were not affected (Figure 5a). As control, the potassium ionophore valinomycin was added to the sample at a final concentration of 0.5 μg/ml, which led to loss of approximately 40% of transmembrane potential relative to non-treated mitochondria.

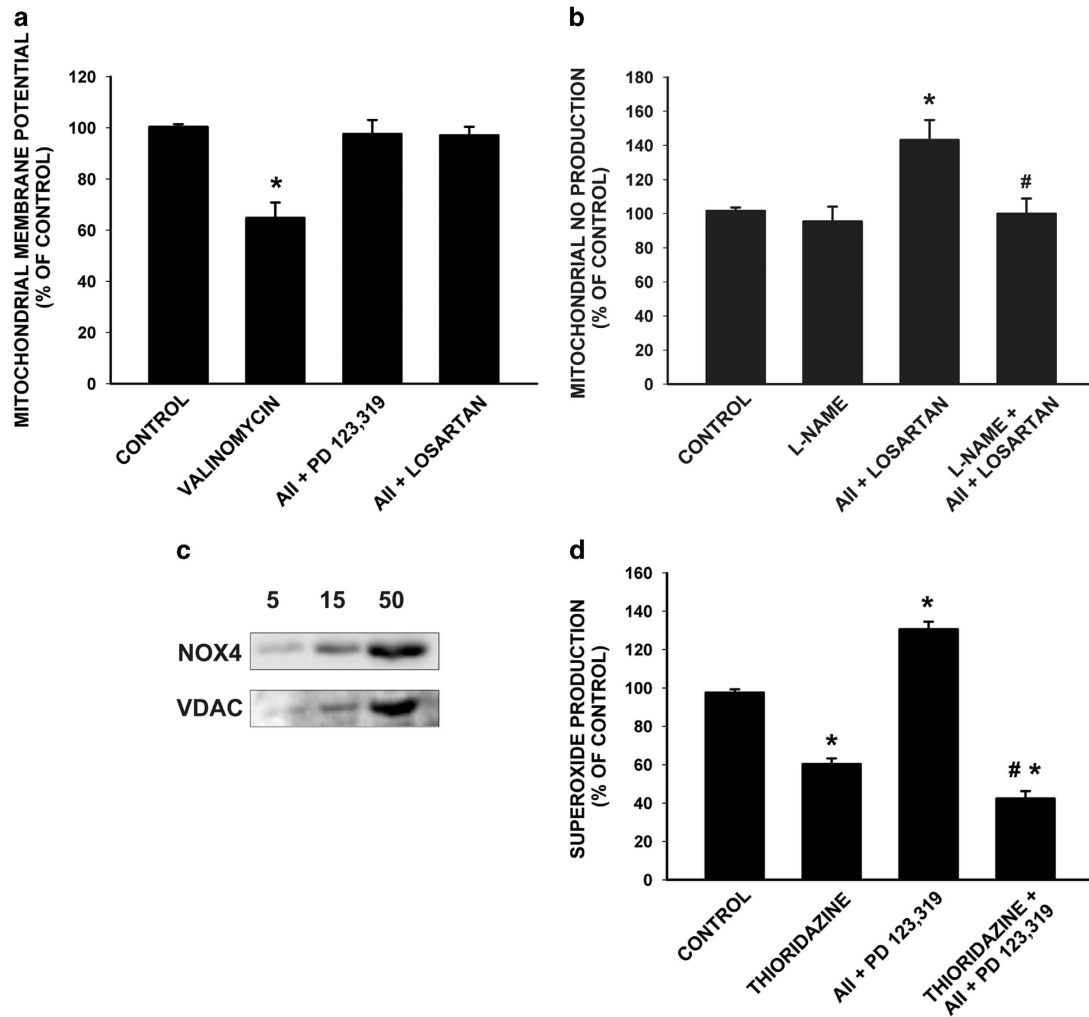
In isolated mitochondria, activation of AT2 receptors (i.e. treatment with All and the AT1 antagonist losartan) induced an increase in levels of NO that was inhibited by pre-treatment with the NOS inhibitor L-NAME (Figure 5b). This is consistent with the mitochondrial respiration data, which showed that AT2-dependent respiratory inhibition was prevented by treatment of isolated mitochondria with L-NAME, confirming the link between mitochondrial AT2 receptors and NO production, and the mitochondrial respiratory function.

Mitochondrial superoxide (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) production was measured by lucigenin-enhanced chemiluminescence. In isolated mitochondria, activation of AT1 receptors with All (i.e. treatment with All and the AT2 receptor antagonist PD123,319) resulted in increased levels of superoxide. The major sources of reactive oxygen species (ROS) in the cell are NADPH oxidase (Nox) proteins and the mitochondrial electron transport chain (ETC). Nox4 is the main intracellular form of the Nox protein family in several types of cells.<sup>16,17</sup> In the present study, the presence of Nox4 in rat brain isolated mitochondria was demonstrated using a specific rabbit monoclonal antibody, which showed a 60 kDa band that increased with the amount of mitochondrial sample loaded in the SDS gel (Figure 5c). To clarify the role of Nox4 on superoxide production, we tested the effect of the Nox4 inhibitor thioridazine.<sup>18</sup> Treatment of isolated mitochondria with All and the AT2 blocker PD123,319 (i.e. activation of AT1 receptors) and simultaneous treatment with thioridazine led to the inhibition of total superoxide to about a 40% of untreated controls. The remaining superoxide was probably due to mitochondrial electron leakage at the ETC or other sources (Figure 5d). This is consistent with the findings on respiratory function that showed that pre-treatment of isolated mitochondria with the Nox4 inhibitor thioridazine blocked the AT1-induced increase in oxygen consumption (Figures 4a and b). The role of Nox4 in All-induced superoxide production was confirmed with a second Nox4 inhibitor (diphenyleneiodonium, DPI). As observed after treatment with thioridazine (Figure 5d), simultaneous treatment with DPI (All +PD123,319+DPI) led to inhibition of total superoxide to about 40–50% of untreated controls (data not shown; see Materials and Methods, Superoxide production assay).

## Discussion

Mitochondria play a major role in aging and aging-related neurodegenerative disorders such as degeneration of dopaminergic neurons and PD.<sup>19</sup> The SN of PD patients shows alteration of mitochondrial NADPH dehydrogenase (complex I) activity, and complex I inhibitors such as MPTP, rotenone and other pesticides cause neurological changes similar to those observed in PD.<sup>20,21</sup> Previous immunohistochemical findings from our group suggest the possible existence of an intracellular or intracrine RAS in dopaminergic neurons of some mammalian species, including humans.<sup>5,13</sup> The present study demonstrates the presence of All and the main All receptors (i.e. AT1 and AT2) in the mitochondria of dopaminergic neurons by immunofluorescence and electron microscopy. This was also observed using fluorescent-tagged angiotensin receptors and fluorescent angiotensin. The

**Figure 4** Effect of mitochondrial angiotensin receptors on mitochondrial respiration. (a and b) Activation of mitochondrial AT1 receptors with All (i.e. All+ PD123,319) induces an increase in both oxidative phosphorylation (P) and maximum respiratory rate (E), which was inhibited by pre-treatment of isolated mitochondria with the NOX4 inhibitor thioridazine (*n* = 3–8). (c and d) Knockout mice for AT1 receptors (KO AT1; *n* = 5) show lower mitochondrial respiration rates compared with wild-type littermate controls (WT). (e and f) Activation of mitochondrial AT2 receptors by All (i.e. All+losartan) produces a significant decrease in activated respiration (OXPHOS, P) and maximum respiration rate (maximum electron transport system, ETS, E) associated with complex I, which was blocked by pre-incubation of isolated mitochondria with the nitric oxide synthase (NOS) inhibitor, *N*<sup>ω</sup>-nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME; *n* = 5–8). (g and h) Mice lacking AT2 receptors (KO AT2; *n* = 5) show an increased respiratory activity compared with wild-type mice (WT). Data are mean ± S.E.M. \**P* < 0.05 compared with control. #*P* < 0.05 compared with the group treated with All. One-way analysis of variance (ANOVA) and Bonferroni *post hoc* test (a, b, e, f) and Student's *t*-test (c, d, g, h)



**Figure 5** Effect of mitochondrial angiotensin receptors on mitochondrial transmembrane potential, nitric oxide and superoxide production. (a) In isolated mitochondria, activation of AT1 and AT2 receptors (All+ the AT2 blocker PD123,319, and All+ the AT1 blocker losartan, respectively) did not induce any significant change in mitochondrial membrane potential maintenance; however, the potassium ionophore valinomycin led to loss of approximately 40% of transmembrane potential relative to non-treated mitochondria ( $n = 5$ ). (b) Activation of AT2 receptors (All+ the AT1 blocker losartan) induced an increase in levels of NO that was inhibited by pre-treatment with the NOS inhibitor L-NAME ( $n = 5-8$ ). (c) The presence of Nox4 in isolated mitochondria was also shown by western blot assay with a rabbit monoclonal anti-Nox4 antibody, which detected a band of 60 kDa, and an antibody against the mitochondrial marker VDAC. The Nox4 signal increased with mitochondrial content (5, 10, 50  $\mu\text{g}$  of mitochondrial sample loaded in the acrylamide gel). (d) In isolated mitochondria, activation of AT1 receptors with All (All+the AT2 receptor antagonist PD123,319) resulted in increased levels of superoxide, and simultaneous treatment with the NOX4 inhibitor thioridazine led to the inhibition of total superoxide to about a 40% of untreated controls ( $n = 4-8$ ). Data are mean  $\pm$  S.E.M. \* $P < 0.05$  compared with control. # $P < 0.05$  compared with the group treated with All (one-way analysis of variance (ANOVA) and Bonferroni *post hoc* test). L-NAME, L-arginine methyl ester hydrochloride; NOS, nitric oxide synthase

results were confirmed in mitochondrial fractions isolated from the nigral region of rat and the dopaminergic neuron cell line MES 23.5. Our results show a differential distribution of both types of All receptors; while AT2 were mainly cytoplasmic and colocalized with mitochondrial labeling, AT1 had more superficial and nuclear distribution, although we also found AT1 receptors in mitochondria. Furthermore, there was a clear difference in the expression of AT1 and AT2 in the mitochondrial fraction, with AT2 being much more abundant than AT1.

The present findings show that mitochondrial AT1 and AT2 receptor activation produced opposite effects on respiratory rates, which is consistent with that observed in AT1 and AT2 cell surface receptors. Activation of AT2 receptors induced a moderate but significant decrease in active and maximal

respiration (OXPHOS and ETS). The effect was confirmed in mitochondria isolated from mice deficient in AT2 receptors, which showed an increase in respiratory rates. The possible mechanisms involved in these effects were then investigated. We found that mitochondrial AT2 receptor activation induced an increase in mitochondrial NO levels, which was blocked by inhibition of mitochondrial NOS activity by L-NAME, which also blocked the reduction in respiratory activity induced by AT2 activation, indicating that NO mediates this process and may act as a respiratory modulator. Initial observations considered NO as proapoptotic; however, it is now known that this occurs only at high concentrations of NO, and that physiological levels of NO are antiapoptotic.<sup>22</sup> At physiological concentrations, NO competes with oxygen by the active site of cytochrome

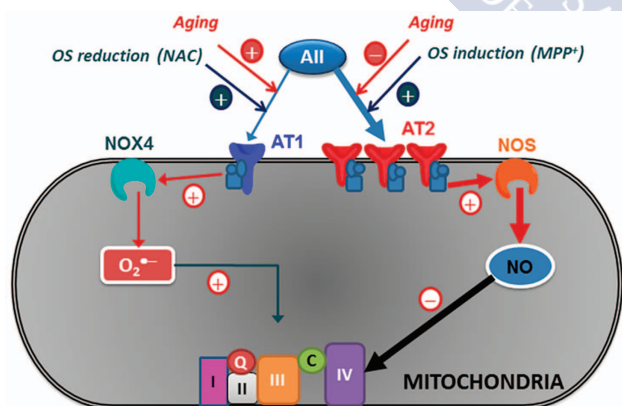
oxidase. Short-term inhibition of complex IV by low nonlethal levels of NO inhibits respiration and initiates a protective action to maintain the membrane potential, which results in protection of the cell against further damage and prevents apoptosis.<sup>23,24</sup> AT2-mediated regulation of mitochondrial respiration may represent an unrecognized primary line of defence against oxidative stress and stress-associated damage. It is known that levels of oxidative stress are increased in dopaminergic neurons, probably related to dopamine metabolism, and the above-mentioned defence mechanism may be particularly important against dopaminergic degeneration and PD.

Mitochondrial AT1 activation produced an increase in oxygen consumption, and increased generation of superoxide via mitochondrial Nox4. This effect was confirmed in mitochondria isolated from mice deficient in AT1 receptors, which showed a decrease in respiratory rates, and is also consistent with previous observations for cell surface AT1 receptors and membrane NADPH oxidase. Our previous studies in animal models of PD showed that AII, via cell surface AT1 receptors, increases oxidative stress through activation of membrane-bound NADPH oxidase.<sup>7,9,25</sup> Within the mitochondria, the primary site of ROS generation is the ETC, as leakage of electrons at complexes I and III leads to a partial reduction of oxygen to form  $O_2^-$ . In addition, the Nox4 isoform, a member of the NADPH oxidase family, has been localized in intracellular membranes of cardiomyocytes, and renal cells.<sup>16,26,27</sup> In the present study, we demonstrated expression of Nox4 in mitochondria isolated from the nigral region, which is consistent with the results of previous studies that showed

the involvement of Nox4 in mitochondrial  $O_2^-$  production using small interfering RNA (siRNA) in isolated mitochondria from renal cells.<sup>16</sup>

In addition to the effect of mitochondrial AT1 receptors mentioned above, the activation of cell surface AT1 receptors and membrane-bound NADPH oxidase may also affect mitochondrial function. A number of studies have shown a ROS-mediated interaction (i.e. cross-talk signaling) between the membrane-bound NADPH oxidase complex and mitochondria, so that ROS generated by NADPH oxidase may act as a trigger to induce the opening of ATP-sensitive potassium channels (mitoKATP), which leads to generation of mitochondrial ROS.<sup>28</sup> In cultures of dopaminergic neurons, we previously observed that inhibition of mitoKATP channels inhibits the AII-induced increase in  $O_2^-$  production.<sup>29</sup> Mitochondrial AT1 and AT2 receptors may play a major role in maintaining the integrity of this essential organelle against extra-mitochondrial insults, at least in the early moments, as observed in the present experiments with isolated mitochondria. Consistent with this, an increase in cell levels of oxidative stress (i.e. treatment of dopaminergic cells with very low doses of MPP<sup>+</sup>) led to an increase in the expression of mitochondrial AT2 receptors. Interestingly, the present findings also show that aging modifies mitochondrial AII receptor expression and the above-mentioned response to the increase in cell levels of oxidative stress. A number of previous studies have shown proinflammatory and pro-oxidative changes in the SN and different tissues of aged rats, and that age-related changes in RAS activity are involved in these changes and in the increased vulnerability of dopaminergic neurons with aging.<sup>30,31</sup> Although an upregulation of mitochondrial AT2 receptors in response to the aging-related oxidative state may be expected, the present study shows an increase in mitochondrial AT1 receptor expression and a decrease in mitochondrial AT2 receptor expression in mitochondria isolated from old rats relative to those isolated from young rats. This may contribute to the increased vulnerability of these cells by inducing more mitochondrial oxidative stress and changes in respiratory efficiency, and play an important role in the development of aged-related neurodegenerative disorders such as PD.<sup>32,33</sup>

In summary (Figure 6), we conclude that functional AT1 and AT2 receptors exist in brain mitochondria, and particularly in dopaminergic neurons. Activation of mitochondrial AT1 induced superoxide production, via mitochondrial NOX4, and increased both mitochondrial respiration and  $ETS_{max}$ . Mitochondrial AT2 activation caused an NO-mediated reduction of mitochondrial respiration and  $ETS_{max}$ , modulating oxidative phosphorylation without significant alteration in mitochondrial membrane potential, which indicates that the bioenergetic properties of the mitochondria are not affected. Mitochondrial AT2 receptors, which are clearly more abundant compared with mitochondrial AT1 in young rats, may counteract or modulate at the mitochondrial level the pro-oxidative effects of AII stimulation of the cell membrane and mitochondrial AT1 receptors. AT2-mediated regulation of mitochondrial respiration may represent an unrecognized primary line of defence against oxidative stress, which may be particularly important in neurons with increased levels of oxidative stress such as dopaminergic neurons.



**Figure 6** Model of the role that AT1 and AT2 receptors play in modulating oxidative phosphorylation in brain mitochondria. Activation of AT1 receptors in mitochondria regulates superoxide production, via Nox4, and increases respiration. Mitochondrial AT2 receptors are much more abundant and induce, via nitric oxide, a decrease in mitochondrial respiration, modulating oxidative phosphorylation without significant alteration in mitochondrial membrane potential, which indicates that the bioenergetic properties of the mitochondria are not affected. Mitochondrial AT2 receptor expression increased after treatment of cells with oxidative stress (OS) inducers (such as low doses of MPP<sup>+</sup>) and decreased with aging. Mitochondrial AT1 expression increased with aging and after treatment of cells with antioxidants (such as *N*-acetyl-cysteine, NAC). At mitochondrial level, AT2 receptors may act as respiratory modulators and counteract low levels of OS, which may be particularly important in cells with an increase in levels of OS such as dopaminergic neurons. Aging induces altered expression of mitochondrial AT1 and AT2 receptors that may induce mitochondrial dysfunction, the main risk factor for neurodegeneration

An increase in mitochondrial AT1 and a decrease in mitochondrial AT2 expression in the nigral region of aged rats relative to young rats may play a major role in the mitochondrial dysfunction associated with normal aging, which is the major risk factor for the development of PD and other neurodegenerative diseases. Different types of drugs acting on the local RAS are currently used in vascular and renal diseases, and have been suggested as potential treatments for neurodegenerative diseases, including PD, based on their effects on surface All receptors. However, the functional effects of mitochondrial receptors, particularly AT2 receptors, must be taken into account in the design of new therapeutic strategies, and especially in diseases associated with excessive oxidative stress such as PD, but also diabetes, obesity and most of the cardiovascular diseases.

## Materials and Methods

**Experimental design.** Brain sections from adult male Sprague-Dawley rat containing SN, primary cultures from the nigral region and cultures of the dopaminergic neuron cell line MES 23.5 were used to investigate the presence of All receptors in mitochondria from dopaminergic neurons by immunofluorescence and electron microscopy. All experiments were carried out in accordance with Directive 2010/63/EU and Directive 86/609/CEE and were approved by the corresponding committee at the University of Santiago de Compostela. Animals were housed at constant room temperature (RT) (21–22° C) and 12-h light/dark cycle. All surgery was performed under ketamine/xylazine anesthesia. The localization of angiotensinogen and angiotensin receptors in dopaminergic neurons isolated from rat SN was confirmed by LCM and RT-PCR. In addition, pure isolated mitochondria from the nigral region of rat were used to confirm the expression of All receptors in mitochondria using WB assay. Dopaminergic cells were also transfected with fluorescence-tagged AT1 and AT2 receptors, or treated with fluorescent All to investigate colocalization with mitochondrial markers.

Mitochondria isolated from the nigral region of rat in the VM and from AT1 and AT2 receptor knockout mice (Agtr1a C57BL/6 background and Agtr2 FVB background mutant mice) brain were used to investigate the ability of All receptors to modulate mitochondrial respiration, mitochondrial membrane potential and mitochondrial superoxide and nitric oxide (NO) production. For this purpose, mitochondria were incubated with different compounds to assess the effects of activation with either AT1 or AT2 on respiratory capacity and maintenance of membrane potential. Mitochondria were treated with All (1 nM) and pre-incubated with the AT2 antagonist PD123,319 (2 μM) or the AT1 antagonist losartan (3 μM), and/or the NADPH oxidase, NOX4, inhibitor thioridazine (10 μM) or the NOS inhibitor L-NAME (100 μM). The concentrations of the above-mentioned compounds were experimentally determined as the most appropriate for evaluating the studied effects. Mitochondrial oxidative stress was estimated measuring superoxide production (i.e. the most important reactive oxygen species, ROS, in mitochondria) using a sensitive luminescence-based assay. Finally, RT-PCR of nigral dopaminergic neurons isolated by LCM and WB assays of mitochondria isolated from young adult and aged male Sprague-Dawley rats (10 weeks and 20 months respectively) were used to investigate age-related changes in dopaminergic neuron and mitochondrial All receptor expression.

## Primary cultures from the nigral region and cultures of the MES 23.5 dopaminergic neurons.

Ventral mesencephalic tissue was dissected from rat embryos of 14 days of gestation (E14). The tissue was incubated in 0.1% trypsin (Sigma, St. Louis, MO, USA), 0.05% DNase (Sigma) and DMEM (Invitrogen, Paisley, Scotland, UK) for 20 min at 37 °C, and was then washed in DNase/DMEM and mechanically dissociated. The resulting cell suspension was centrifuged at 50 × g for 5 min, the supernatant was carefully removed and the pellet resuspended in 0.05% DNase/DMEM to the final volume required. The number of viable cells in the suspension was estimated with acridine orange/ethidium bromide. Cells were plated onto 35-mm culture dishes (Falcon; Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) previously coated with poly-L-lysine (100 μg/ml; Sigma) and laminin (4 μg/ml; Sigma). The cells were seeded at a density of 1.5 × 10<sup>5</sup> cells/cm<sup>2</sup> and maintained under control conditions (DMEM/HAMS F12(1 : 1) containing 10% fetal bovine serum (FBS; Biochrom KG, Berlin, Germany)). The cell cultures were maintained in a humidified CO<sub>2</sub> incubator (5% CO<sub>2</sub>; 37 °C) for 8 days *in vitro* (DIV; see below); the

entire culture medium was removed on day 2 and replaced with fresh culture medium.

Dopaminergic MES 23.5 cells, a gift from Dr. Wei-Dong Le (Baylor College of Medicine, Houston, TX, USA), were cultured in DMEM/F12 containing Sato's components growth medium supplemented with 2% FBS, 100 units/ml penicillin and 100 μg/ml streptomycin at 37 °C in a humidified CO<sub>2</sub> incubator (5% CO<sub>2</sub>, 95% air).<sup>34</sup> MES 23.5 cells were plated at a density of 0.5 × 10<sup>5</sup>/cm<sup>2</sup> onto 35-mm plastic dishes with glass coverslips previously coated with poly-L-lysine (Sigma; 10 mg/ml). To enhance differentiation, cells were stimulated by adding dibutyryl-cAMP (D0627, Sigma; 1 mM) to the supplemented growth medium.

**Triple fluorescent labeling of cultures.** Cultures grown on glass coverslips were incubated with the fluorescent probe Mitotracker Deep Red (MTDR; 20 nM; Molecular Probes, Waltham, MA, USA) for mitochondrial labeling. After mitochondrial labeling, cultures were fixed with 4% paraformaldehyde in Dulbecco's phosphate-buffered saline (pH 7.4) for 20 min, and were then processed for double immunofluorescence. Cultures were incubated at 4 °C with a mouse monoclonal anti-TH (Sigma; 1 : 30 000) antibody as dopaminergic marker and goat polyclonal anti-AT1 (sc-31181; 1 : 50; Santa Cruz Biotechnology) or rabbit polyclonal anti-AT2 receptor (sc-9040; 1 : 50; Santa Cruz Biotechnology) antibodies. The immunoreaction was visualized with the following fluorescent secondary antibodies: Alexa Fluor 405-conjugated donkey anti-mouse IgG (1 : 200; Abcam, Cambridge, England, UK) or biotinylated horse anti-goat IgG (BA9500, 1 : 50; Vector Labs, Burlingame, CA, USA) or biotinylated swine anti-rabbit IgG (1 : 200; Dako, Barcelona, Spain) plus Alexa Fluor 488-conjugated Streptavidin (1 : 2500; Molecular Probes). Colocalization of markers was confirmed by confocal laser microscopy (TCS-SP2; Leica, Heidelberg, Germany) performing sequential scan to avoid any potential overlap. In all experiments, the control cultures, in which the primary antibody was omitted, were immunonegative for these markers.

## Immuno electron microscopy for TH and AT1 and AT2 receptors.

Adult male Sprague-Dawley rats were deeply anesthetized with a mixture of ketamine/xylazine and perfused with saline (0.09% NaCl) followed by a solution of 4% paraformaldehyde and 0.1% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer pH 7.4 (PB). After perfusion, brains were quickly removed from the skull, immersed in the same fixative solution overnight at 4 °C and rinsed thoroughly in PB. Free-floating 40 μm coronal sections were obtained on a vibratome and stored in PB until use. Sections containing the SN were transferred to citrate buffer pH 6.0 (Vector Laboratories; H-3300) at RT for 5 min and then to citrate buffer at 80 °C for 30 min. Sections were rinsed consecutively in citrate buffer and phosphate-buffered saline (PBS) pH 7.4 at RT, prior to pre-treatment with 1% sodium borohydride in PBS for 15 min. The sections were then rinsed several times in PBS, and transferred to a solution of 5% hydrogen peroxide in PBS for 30 min, and rinsed several times in PBS. Sections were pre-incubated in 10% normal serum containing 0.01% triton X-100 in PBS for 1 h and then incubated for 72 h at 4 °C with the appropriate primary antibody: mouse monoclonal anti-TH (Sigma; 1 : 10 000), and AT1 goat polyclonal diluted 1 : 100 or AT2 rabbit polyclonal diluted 1 : 200, Santa Cruz Biotechnologies catalog number sc-31181 and sc-9040, respectively. Sections were rinsed thoroughly in PBS and incubated for 1 h with the appropriate secondary antibodies (biotinylated goat anti-rabbit or horse anti-goat; Vector Laboratories) diluted 1 : 400 in PBS containing 0.01% triton X-100, rinsed in PBS and incubated with an avidin-biotin-complex kit (Vector Laboratories; PK6100, diluted 1 : 100) for 1 h at RT. Sections were rinsed multiple times in PBS, developed using 3,3'-diaminobenzidine peroxidase kit (Vector SK4100) and rinsed in PBS.

Sections immunolabeled for AT1, AT2 or TH were rinsed in PBS, transferred to a solution of 1% osmium tetroxide in PB for 1 h at RT and rinsed in PB prior to gradual dehydration in 50–70% ethanol. The sections were then transferred to a contrast solution containing 1% uranyl acetate in 70% ethanol for 1 h at RT. Sections were then rinsed in 70% ethanol to remove excess uranyl acetate and gradually dehydrated in 5 min baths of 70–100% ethanol. Sections were cleared in propylene oxide and gradually infiltrated with Epon resin by sequential immersion in a 2 : 1 mixture of propylene oxide and Epon resin (30 min), 1 : 1 mixture of propylene oxide and Epon resin (1 h), 1 : 2 mixture of propylene oxide and epon (1 h) and finally transferring the sections to Epon resin overnight at 4 °C. The following day the sections were transferred to freshly prepared Epon resin for 1 h at RT, flat embedded and allowed to polymerize for a minimum of 72 h at 60 °C. After flat embedding was completed, the SN was clearly identified using a brightfield microscope and re-dissected for ultramicrotomy. Semithin (1-μm-thick) and ultrathin (90-nm-thick) sections were cut using a Leica EM UC6 ultramicrotome (Leica Microsystems; Wetzlar,

Germany). Ultrathin sections were placed on copper grids and observed and photographed using a Hitachi transmission electron microscopy (Hitachi, Tokyo, Japan) equipped with a Hamamatsu Orca digital camera (Hamamatsu, Hamamatsu, Japan).

**Specificity of antibodies.** The specificity of the antibodies used for WB and immunolabeling studies was established in previous studies: AT1 sc-31181<sup>35</sup> and AT2 sc-9040.<sup>36,37</sup> In addition, the specificity of the antibodies was confirmed in our laboratory by preadsorption with the corresponding synthetic peptide antigen.<sup>38</sup> In the present study, we also used WB analysis of lysates from HEK293 cells transfected with AT1 or AT2 tagged to fusion tail DDK (TA50011 from Origene, Rockville, MD, USA; DDK tag: DYKDDDDK). The specificity of the antibodies was confirmed by the presence of a predominant immunoreactive band in positively transfected lysates and the absence of this band in negative controls, which consisted of lysates transfected with empty vectors (Figure 1b).

**Retrograde tracing, LCM and RT-PCR.** Young adult (10-week-old,  $n=3$ ) and aged (18–20-month-old,  $n=4$ ) male Sprague-Dawley rats were used for LCM studies. Rats received three intrastriatal injections of red retrobeads (0.5  $\mu$ l/injection; Lumafuor Inc., Durham, NC, USA) under ketamine/medetomidine anesthesia. The tracer was injected using a 10  $\mu$ l Hamilton syringe at a rate of 0.1  $\mu$ l/min. The stereotaxic coordinates for the injections were: bregma: +1, –0.1 or –1.2 mm; lateral:  $\pm 3$ ,  $\pm 3.7$  or  $\pm 4.5$  mm; ventral: 5 mm from dura; tooth bar: 0. Forty-eight hours after injection, rats were killed, brains were removed, snap-frozen in liquid nitrogen and stored at –80 °C. Serial coronal sections (20- $\mu$ m-thick) including the VM were cut on a cryotome and mounted on RNase-free ultraviolet light-treated glass slides. Slides were immediately frozen at –80 °C, and stored in sterile Falcon tubes containing silica gel. A series of SN sections were processed for immunofluorescence with an antibody against TH in order to verify the localization of red retrobeads within nigral dopaminergic neurons. LCM was performed using a PALM laser microbeam system (Zeiss, Jena, Germany) with a fluorescence option. Before LCM, frozen sections were allowed to equilibrate to increasing temperatures (–20 °C, 4 °C, RT), fixed with ethanol (70, 96, 100, 100%) and dried at RT. Red retrobeads-labeled neurons were visualized ( $\times 40$  objective) within the SN, marked under fluorescence illumination and then cut and catapulted under brightfield microscopy. Neuronal cell pools were catapulted into an adhesive cap (Zeiss). For RNA extraction, trizol (Invitrogen) was added directly through the lid, the tube was shaken upside-down and then spun. Two thousand labeled dopaminergic neurons per animal were used for total RNA extraction according to the manufacturer's instructions. Homogenates of rat VM were used as a positive control.

Total RNA was reverse-transcribed to cDNA with nucleoside triphosphates containing deoxyribose, random primers and M-MLV reverse transcriptase (50U; Invitrogen). Real-time PCR was used to examine the relative levels of TH, angiotensinogen, AT1 and AT2 mRNA. A real-time iCycler PCR platform (Bio Rad, Hercules, CA, USA) and IQ SYBR Green Supermix kit (Bio Rad) were used.  $\beta$ -Actin was used as a housekeeping gene and the data were evaluated by the delta-delta Ct method ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ), where Ct is the cycle threshold. Finally, the PCR products were loaded on a 2% agarose gel with SYBR Safe stain (Invitrogen) and separated by electrophoresis. Primer sequences were as follows: for AT1, forward 5'-TTCAACCTCTACGCCAGTGTG-3', reverse 5'-GCCAAGCCAGCCATCAGC-3'; for AT2, forward 5'-AACATCTGCTGAAGACCAATAG-3', reverse 5'-AGAAGGTCAGAA CATGGAAGG-3'; for angiotensinogen, forward 5'-GAGTGAGCAAGAGGTGTA-3', reverse 5'-TCCAACGATCCAAGGTAGAA-3'; for TH, forward 5'-GGCTTCTCTGAC CAGGTGTATCG-3', reverse 5'-GCAATCTCTCCGCTGTGTATTCC-3'; and for  $\beta$ -actin, forward 5'-TCGTGCGTGACATTAAGAG-3', reverse 5'-TGCCACAGGATT CCATACC-3'.

**Transient transfection of All receptors and Alexa Fluor 488-conjugated All treatment of dopaminergic cell line MES 23.5.** The dopaminergic neuron cell line MES 23.5 was cultured in DMEM/F12 containing Sato's components growth medium supplemented with 2% FBS, 100 units/ml penicillin and 100  $\mu$ g/ml streptomycin at 37 °C in a humidified CO<sub>2</sub> incubator (5% CO<sub>2</sub>, 95% air). MES 23.5 cells were plated at a density of  $0.3 \times 10^5$ /cm<sup>2</sup> onto 35-mm plastic dishes with glass coverslips previously coated with poly-L-lysine (Sigma; 10 mg/ml). In the first series of experiments, cells were treated with MitoTracker Deep Red 633 (20 nM, 15 min) to label mitochondria, and transiently transfected with 1  $\mu$ g of AT1 cDNA (AT1/EGFP-N3) and 3  $\mu$ g of AT2 cDNA (AT2/YFP-N1) for 24 h using Lipofectamine LTX transfection reagent (Invitrogen). To study the effects of pro-oxidative and antioxidative conditions, some cultures of cells transfected with AT2-yellow fluorescent protein (YFP) receptor were treated with a low dose of the

dopaminergic neurotoxin MPP<sup>+</sup> iodide (10  $\mu$ M; Sigma) for 24 h ( $n=4$ ), and cells transfected with AT1-enhanced green fluorescent protein (EGFP) receptor were treated with the antioxidant *N*-acetyl-L-cysteine (0.5 mM; Sigma) for 24 h ( $n=3$ ). The effect of these treatments on expression of mitochondrial AT1 and AT2 receptors were observed by confocal microscopy and confirmed by WB of isolated mitochondria from MES 23.5 cells using antibodies against GFP (Life Technologies, Waltham, MA, USA; G10362; 1 : 800), AT1 and AT2 (Santa Cruz Biotechnology; sc-31181 and sc-9040) and VDAC/porin (Sigma; V2139; 1 : 1,000). The purity of isolated mitochondria from MES 23.5 cells was previously demonstrated by the absence of other cellular compartment markers (see below). In order to minimize the toxicity of AT1 receptor overexpression, cells transfected with AT1-EGFP required the simultaneous treatment with the AT1 receptor antagonist losartan (3  $\mu$ M), which was essential to maintain cell survival.

In a second series of experiments we investigated the presence of All in mitochondria. MES 23.5 cells were treated with the mitochondrial marker MitoTracker Deep Red 633 (20 nM, 15 min) and Alexa Fluor 488-conjugated All (500 nM; Molecular Probes). Cells were fixed in 4% paraformaldehyde for different lengths of time between 30 min and 8 h, and fluorescence images were acquired with a Leica SP5 confocal laser scanning microscope.

**Mitochondrial isolation.** Mitochondria from nigral region and whole brain of rat, and from AT1a and AT2 receptor knockout mice (Agtr1a and Agtr2 mutant mice) brain, were isolated and purified according to the protocol described by Sims and Anderson<sup>14</sup> with some modifications. This protocol combines differential centrifugation and discontinuous Percoll density gradient centrifugation to isolate pure mitochondria with scarce contamination by synaptosomes and myelin. Rat nigral region was removed and washed in cold isolation buffer (0.32 M sucrose, 1 mM and 10 mM TRIS; pH 7.4). The tissue was cut into small pieces, transferred to a Dounce homogenizer with 12% Percoll solution, and then homogenized on ice using a loose fitting and tight fitting glass pestles. The homogenate was slowly layered on a previously prepared discontinuous Percoll gradient consisting of 26% Percoll layered over 40% Percoll, and centrifuged using a fixed-angle rotor at 30 700  $\times g$  for 5 min at 4 °C. This produced three separate bands, and the enriched mitochondrial fraction, which appeared at the interface between the 26 and 40% Percoll layers, was carefully removed with a glass Pasteur pipette. The mitochondrial fraction was diluted by adding isolation buffer, and was again centrifuged at 16 700  $\times g$  for 10 min at 4 °C. This yielded a mitochondrial pellet, which was gently resuspended in the residual supernatant. Finally, the pellet was resuspended in isolation buffer and centrifuged at 7300  $\times g$  for 10 min at 4 °C, yielding a pellet of pure mitochondria that was used for WB and functional assays. For WB confirmation of the presence of transfected angiotensin receptors in mitochondria of the dopaminergic cell line MES 23.5, mitochondria were isolated with a Mitochondria Isolation kit (Mitosciences; ab110170) for cultured cells.

**Western blot of mitochondria from rat nigral region and MES 23.5 dopaminergic neurons.** Protein concentration in the isolated mitochondria from the nigral region ( $n=4$ ) and whole homogenate ( $n=4$ ) were quantified using the Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Fremont, CA, USA). Equal amounts of protein were separated on a 5–10% bis-tris polyacrylamide gel, and transferred to nitrocellulose membranes. Membranes were incubated overnight with primary antibodies against VDAC/porin (V2139, 1 : 1000) and  $\alpha$ -Tubulin (T5168, 1 : 50 000) from Sigma, HDAC2 (sc-56685, 1 : 200), AT1 (sc-31181, 1 : 200) and AT2 (sc-9040, 1 : 200) from Santa Cruz Biotechnology and rabbit monoclonal antibody to Nox4 (ab133303, 1 : 800) from Abcam. The following HRP-conjugated secondary antibodies were used: Protein A (1 : 5000) (NA9120V; GE Healthcare), chicken anti-mouse IgG-HRP (sc-2954, 1 : 2500) and donkey anti-goat IgG-HRP (sc-2020, 1 : 2500) from Santa Cruz Biotechnology. Immunoreactive bands were detected with an Immun-Star HRP Chemiluminescent Kit (170-5044; Bio Rad) and visualized with a chemiluminescence detection system (Molecular Imager ChemiDoc XRS System; Bio Rad). Specificity of the antibodies was confirmed as indicated above.

**Detection of All in purified isolated mitochondria by HPLC and specific All EIA.** For the separation of angiotensin peptides, mitochondria were isolated as described above and stored at –20 °C. The mitochondrial pellet was reconstituted in 100  $\mu$ l of Milli-Q water and heated at 96 °C for 15 min. The mitochondrial fraction was acidified with heptafluorobutyric acid (HFBA) to a final concentration of 0.1%, sonicated and centrifuged at 20 000  $\times g$  for 20 min at 4 °C. The supernatants were applied to a Sep Pak columns (Oasis HLB 1cc,

WAT094225) pre-conditioned with 1 ml of methanol and deionized water. The loaded Sep Pak columns were washed with 1 ml of 0.1% HFBA in deionized water. All and its fragments were eluted with 1 ml of methanol in 0.1% of HFBA, and the eluent dried in a vacuum concentrator (Savant ISS110). Dried samples ( $n=5$ ) were resuspended in 60  $\mu$ l of a solution of 17% acetonitrile in 4 mM TEAF with 30 mM formic acid and injected (20  $\mu$ l/injection) into the HPLC system. Peptides were separated at 35 °C and a flow rate of 1 ml/min with an acetonitrile gradient on a reverse phase C18 column (Waters Symmetry300C18; 150  $\times$  3.9 mm, 5  $\mu$ m particle size; Waters, Barcelona, Spain). For the acetonitrile gradient, solution A was made with 30 mM formic acid in 4 mM TEAF. Solution B consisted of 90% acetonitrile in 4 mM TEAF with 30 mM formic acid. The linear gradient used was from 11 to 50% of B in 20 min. Eluate from the column was monitored at a wavelength of 220 nm in an UV-Vis detector (SPD-20AV; Shimadzu, Columbia, MD, USA). All fractions were collected with a fraction collector (FRC-10A; Shimadzu), dried in a vacuum concentrator and stored at -80 °C until analysis of All content by EIA kit (A05880; SpiBio, Frankston, TX, USA) following the manufacturer's specifications.

**High-resolution respirometry.** Mitochondrial respiration was measured by high-resolution respirometry at 37 °C using an Oxygraph-2k respirometer (OROBOROS Instruments, Innsbruck, Austria). Aliquots of 80–120  $\mu$ g of isolated mitochondria were incubated with AT1 or AT2 receptor antagonists (3  $\mu$ M losartan or 2  $\mu$ M PD123,319, respectively;  $n=3-8$ ) for 3 min, and treated with 1 nM All for 5 min. To know the effects of NO and NOX4, the NOS inhibitor L-NAME or the NOX4 inhibitor thioridazine were added to mitochondria (see below) with or without corresponding treatment in respiration buffer (125 mM KCl, 5 mM HEPES, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> and 0.5 mM EGTA; pH 7.4) using a substrate-uncoupler-inhibitor titration protocol (SUIT), as previously described.<sup>39</sup> The substrates used to fuel the ETS were 2 mM malate+5 mM pyruvate (MP) for evaluating complex I respiration. The OXPHOS capacity, which is similar to State 3, was measured in the presence of substrates with saturating ADP (2.5 mM). The maximum ETS capacity (ETS<sub>max</sub>; i.e. non-coupled respiration) was evaluated using carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone (FCCP; 0.5–1.5  $\mu$ M) as the uncoupler. The integrity and function of our mitochondrial preparations were confirmed by addition of exogenous cytochrome *c*, which did not enhance mitochondrial respiration, indicating nonsignificant damage to the outer mitochondrial membrane during isolation procedures (data not shown). Respiration rates (O<sub>2</sub> flux) were calculated as the negative time derivative of oxygen concentration, and Matlab software (OROBOROS Instruments) was used for both data acquisition and analysis. Respiration rates were normalized to the amount of mitochondrial protein to allow comparison between groups without the influence of differences in the amount of mitochondria loaded into the chamber.

**Mitochondrial membrane potential.** Membrane potential of mitochondria isolated from rat brain was measured using the sensitive lipophilic cationic fluorescent probe 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolyl-carbocyanine iodide (JC-1; Sigma) as previously described.<sup>40</sup> Isolated mitochondria were treated with different compounds and respiratory substrates for 10 min at 37 °C. Mitochondria were treated with All (1 nM) and the AT2 antagonist PD123,319 (2  $\mu$ M) or the AT1 antagonist losartan (3  $\mu$ M) to investigate the effect of mitochondrial AT1 and AT2 receptors on mitochondrial membrane potential. Samples ( $n=5$ ) were then stained with JC-1 (0.2  $\mu$ g/ml; previously incubated on ice for 20 min) and the red fluorescence of dye agglomerates was measured for 15 min (excitation/emission wavelength=490/590 nm) in a fluorescence plate reader (Tecan; Infinite M200). Valinomycin (0.5  $\mu$ g/ml), a potassium ionophore, was used as a control to permeabilize the mitochondrial membrane for K<sup>+</sup> ions, dissipating the mitochondrial electrochemical potential and preventing JC-1 aggregation.

**Superoxide production and nitric oxide production assays.** Pure mitochondrial fractions obtained with Percoll gradients were directly assayed for superoxide (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) production using lucigenin-enhanced chemiluminescence as follows.<sup>16,17</sup> Lucigenin is an acridylum dinitrate compound that on reducing and interacting with superoxide anions emits light that is quantified to measure the production of O<sub>2</sub><sup>-</sup>. An aliquot of 30  $\mu$ g mitochondria ( $n=4-8$ ) was incubated for 10 min at 37 °C with 1 nM All and pre-incubated with the AT2 receptor antagonist PD123,319 (2  $\mu$ M) in 50 mM phosphate buffer, pH 7.0 containing 1 mM EGTA and 150 mM sucrose. Five micromolar lucigenin and 100  $\mu$ M NADPH were then added to start the reaction. Photon emission, in terms of relative chemiluminescence units (RLU), was measured every 20 s for 10 min using a luminometer plate reader

(Tecan; Infinite M200; Männedorf, Switzerland). There was no measurable activity in the absence of NADPH. The Nox4 inhibitor thioridazine (10  $\mu$ M) was used to determine the amount of O<sub>2</sub><sup>-</sup> produced by this mitochondrial member of the Nox/NADPH oxidase family. The role of Nox4 in All-induced superoxide production was confirmed with a second Nox4 inhibitor (diphenyleidonium, DPI). However, it has been suggested that DPI may also affect NOS.<sup>41,42</sup> Mitochondrial NOS is related to the mitochondrial AT2 receptor effects and inhibition with DPI may be not adequate for the present study, particularly for respirometry. Therefore, we only included the results observed with thioridazine.

Mitochondrial nitric oxide (NO) production was measured with an NO fluorometric assay kit (Biovision, Milpitas, CA, USA). Because of its short half-life, direct measurement of NO is difficult; thus the total concentrations of nitrate and nitrite have been used as useful indicators of NO production. An aliquot of 30  $\mu$ g of mitochondria ( $n=5-8$ ) was incubated for 10 min with 1 nM All and the AT1 antagonist losartan (3  $\mu$ M) to investigate the effect of mitochondrial AT2 receptors activation, and the effect of the NOS inhibitor L-NAME (100  $\mu$ M). Nitrate was then converted to nitrite by the nitrate reductase enzyme, and the total nitrite concentration was measured as nitrite reacted with the fluorescent probe DAN (2,3-diaminonaphthalene), which is proportional to the total nitric oxide production.

**LDH and COX activities.** LDH is a cytosolic enzyme predominantly associated with contaminating synaptosomes; thus, it was used to assess the purity of the mitochondrial fraction. LDH activity was measured in 2.5  $\mu$ g isolated mitochondria and whole homogenate protein ( $n=6$ ), according to the manufacturer's specifications (Roche 04744926001). The micromol/min/mg was calculated using LDH enzyme (Sigma, L-3916) as a reference standard.

The COX activity was used to normalize the data obtained from AT1 and AT2 receptor expression performed by WB in aged rats, as this provides the most accurate estimation of mitochondrial content. COX activity was measured in isolated mitochondria using a commercial kit according to the manufacturer's specifications (KC310100; Biochain, Newark, CA, USA). COX activity was measured in a 96-well plate by detecting the decrease in absorbance of ferrocytochrome *c* at 550 nm, as it is oxidized to ferricytochrome *c* by COX. Ten micrograms of isolated mitochondria protein with 0.1% of DTT were assayed adding ferrocytochrome *c* substrate and reading the absorption at 550 nm immediately for 55 s. The COX activity (unit/ml) of each sample was calculated using the molar absorbance coefficient 21.84 for ferrocytochrome *c* and ferricytochrome *c* at 550 nm

**Statistical analysis.** All data were obtained from at least three independent experiments and were expressed as mean values  $\pm$  S.E.M. Two-group comparisons were analyzed by a Student's *t*-test and multiple comparisons were analyzed by one-way ANOVA followed by a *post hoc* Bonferroni test. The normality of populations and homogeneity of variances were tested before each ANOVA. Differences were considered significant at  $P<0.05$ . Statistical analyses were carried out with SigmaStat 3.0 (Jandel Scientific, San Rafael, CA, USA).

## Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

**Acknowledgements.** We thank Dr. Wei-Dong Le for providing the MES 23.5 dopaminergic cell line. We thank Pilar Aldrey, Iria Novoa, Begoña Gonzalez and Jose Trillo for their technical assistance. Grant sponsors of this work are Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (BFU2012-37087), Spanish Ministry of Health (RD12/0019/0020 and CIBERNED), Galician Government (XUGA) and FEDER (Regional European Development Fund).

## Author contributions

RV and MAC-B performed isolations of mitochondria, western blot, enzymatic activity determinations and other biochemical experiments. RV, JI-G and RS-O performed mitochondrial respirometry experiments. EP-C and MM-F performed electron microscopy experiments. RV, MAC-B and JLL performed cell cultures, confocal microscopy and immunohistochemical studies. RF prepared expression vectors with AT1 and AT2 receptor cDNA, and RV and BV-C performed transfections. PG-G and MAC-B performed *in vivo* studies, stereotactic injections of tracers, laser captured microdissection and RT-PCR. DH collaborated in the AT2 knockout mice studies. JLL-

G and RV conceived and supervised the whole study and wrote the manuscript. All authors edited the manuscript.

1. Chabrashvili T, Kityakara C, Blau J, Karber A, Aslam S, Welch WJ *et al.* Effect of Ang II type 1 and 2 receptors on oxidative stress, renal NAD(P)H oxidase, and SOD expression. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003; **285**: R117–R124.
2. Re RN. Tissue renin-angiotensin systems. *Med Clin North Am* 2004; **88**: 19–38.
3. 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.
4. Wright JW, Harding JW. The brain renin-angiotensin system: a diversity of functions and implications for CNS diseases. *Prog Brain Res* 2003; **146**: 133–151.
5. Garrido-Gil P, Valenzuela R, Villar-Cheda B, Lanciego JL, Labandeira-García JL. Expression of angiotensinogen and receptors for angiotensin and prorenin in the monkey and human substantia nigra: an intracellular renin-angiotensin system in the nigra. *Brain Struct Funct* 2013; **218**: 373–388.
6. Labandeira-García JL, Rodríguez-Pallares J, Domínguez-Mejide A, Valenzuela R, Villar-Cheda B, Rodríguez-Perez AI. Dopamine-angiotensin interactions in the basal ganglia and their relevance for Parkinson's disease. *Mov Disord* 2013; **28**: 1337–1342.
7. Rodríguez-Pallares J, Rey P, Parga JA, Muñoz A, Guerra MJ, Labandeira-García JL. Brain angiotensin enhances dopaminergic cell death via microglial activation and NADPH-derived ROS. *Neurobiol Dis* 2008; **31**: 58–73.
8. Grammatopoulos TN, Jones SM, Ahmadi FA, Hoover BR, Snell LD, Skoch J *et al.* Angiotensin type 1 receptor antagonist losartan, reduces MPTP-induced degeneration of dopaminergic neurons in substantia nigra. *Mol Neurodegener* 2007; **2**: 1.
9. Rey P, Lopez-Real A, Sanchez-Iglesias S, Muñoz A, Soto-Otero R, Labandeira-García JL. Angiotensin type-1-receptor antagonists reduce 6-hydroxydopamine toxicity for dopaminergic neurons. *Neurobiol Aging* 2007; **28**: 555–567.
10. Lavoie JL, Cassell MD, Gross KW, Sigmund CD. Localization of renin expressing cells in the brain, by use of a REN-eGFP transgenic model. *Physiol Genomics* 2004; **16**: 240–246.
11. Re RN. Intracellular renin and the nature of intracrine enzymes. *Hypertension* 2003; **42**: 117–122.
12. Baker KM, Chernin MI, Schreiber T, Sanghi S, Haiderzaidi S, Booz GW *et al.* Evidence of a novel intracrine mechanism in angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. *Regul Pept* 2004; **120**: 5–13.
13. Valenzuela R, Barroso-Chinea P, Muñoz A, Joglar B, Villar-Cheda B, Lanciego JL *et al.* Location of prorenin receptors in primate substantia nigra: effects on dopaminergic cell death. *J Neuropathol Exp Neurol* 2010; **69**: 1130–1142.
14. Sims NR, Anderson MF. Isolation of mitochondria from rat brain using Percoll density gradient centrifugation. *Nat Protoc* 2008; **3**: 1228–1239.
15. Picard M, Ritchie D, Wright KJ, Romestaing C, Thomas MM, Rowan SL *et al.* Mitochondrial functional impairment with aging is exaggerated in isolated mitochondria compared to permeabilized myofibers. *Aging Cell* 2010; **9**: 1032–1046.
16. Block K, Gorin Y, Abboud HE. Subcellular localization of Nox4 and regulation in diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; **106**: 14385–14390.
17. Gorin Y, Ricono JM, Kim NH, Bhandari B, Choudhury GG, Abboud HE. Nox4 mediates angiotensin II-induced activation of Akt/protein kinase B in mesangial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003; **285**: F219–F229.
18. Serrander L, Cartier L, Bedard K, Banfi B, Lardy B, Plastre O *et al.* NOX4 activity is determined by mRNA levels and reveals a unique pattern of ROS generation. *Biochem J* 2007; **406**: 105–114.
19. Swerdlow RH. The neurodegenerative mitochondriopathies. *J Alzheimers Dis* 2009; **17**: 737–751.
20. Federico A, Cardaioli E, Da Pozzo P, Formichi P, Gallus GN, Radi E. Mitochondria, oxidative stress and neurodegeneration. *J Neurol Sci* 2012; **322**: 254–262.
21. Schapira AH. Mitochondria in the aetiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Lancet Neurol* 2008; **7**: 97–109.
22. Brookes PS, Levenon AL, Shiva S, Sarti P, Darley-Usmar VM. Mitochondria: regulators of signal transduction by reactive oxygen and nitrogen species. *Free Radic Biol Med* 2002; **33**: 755–764.
23. Beltrán B, Mathur A, Duchon MR, Erusalimsky JD, Moncada S. The effect of nitric oxide on cell respiration: a key to understanding its role in cell survival or death. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 14602–14607.
24. Paxinou E, Weisse M, Chen Q, Souza JM, Hertkorn C, Selak M *et al.* Dynamic regulation of metabolism and respiration by endogenously produced nitric oxide protects against oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; **98**: 11575–11580.
25. Joglar B, Rodríguez-Pallares J, Rodríguez-Perez AI, Rey P, Guerra MJ, Labandeira-García JL. The inflammatory response in the MPTP model of Parkinson's disease is mediated by brain angiotensin: relevance to progression of the disease. *J Neurochem* 2009; **109**: 656–669.
26. Ago T, Matsushima S, Kuroda J, Zablocki D, Kitazono T, Sadoshima J. The NADPH oxidase Nox4 and aging in the heart. *Aging* 2010; **2**: 1012–1016.
27. Kuroda J, Nakagawa K, Yamasaki T, Nakamura K, Takeya R, Kuribayashi F *et al.* The superoxide-producing NAD(P)H oxidase Nox4 in the nucleus of human vascular endothelial cells. *Genes Cells* 2005; **10**: 1139–1151.
28. Zhang DX, Gutterman DD. Mitochondrial reactive oxygen species-mediated signaling in endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; **292**: H2023–H2031.
29. Rodríguez-Pallares J, Parga JA, Joglar B, Guerra MJ, Labandeira-García JL. Mitochondrial ATP-sensitive potassium channels enhance angiotensin-induced oxidative damage and dopaminergic neuron degeneration. Relevance for aging-associated susceptibility to Parkinson's disease. *Age* 2012; **34**: 863–880.
30. Villar-Cheda B, Valenzuela R, Rodríguez-Perez AI, Guerra MJ, Labandeira-García JL. Aging-related changes in the nigral angiotensin system enhances proinflammatory and pro-oxidative markers and 6-OHDA-induced dopaminergic degeneration. *Neurobiol Aging* 2012; **33**: 204–211.
31. Villar-Cheda B, Domínguez-Mejide A, Valenzuela R, Granado N, Moratalla R, Labandeira-García JL. Aging-related dysregulation of dopamine and angiotensin receptor interaction. *Neurobiol Aging* 2014; **35**: 1726–1738.
32. Mandemakers W, Morais VA, De Strooper B. A cell biological perspective on mitochondrial dysfunction in Parkinson disease and other neurodegenerative diseases. *J Cell Sci* 2007; **120**: 1707–1716.
33. Jellinger KA. Recent advances in our understanding of neurodegeneration. *J Neural Transm* 2009; **116**: 1111–1162.
34. Crawford GD, Le WD, Smith RG, Xie WJ, Stefani E, Appel SH. A novel N18TG2 x mesencephalon cell hybrid expresses properties that suggest a dopaminergic cell line of substantia nigra origin. *J Neurosci* 1992; **12**: 3392–3398.
35. Giles ME, Fernley RT, Nakamura Y, Moeller I, Aldred GP, Ferraro T *et al.* Characterization of a specific antibody to the rat angiotensin II AT1 receptor. *J Histochem Cytochem* 1999; **47**: 507–516.
36. Ruiz-Ortega M, Esteban V, Suzuki Y, Ruperez M, Mezzano S, Ardiles L *et al.* Renal expression of angiotensin type 2 (AT2) receptors during kidney damage. *Kidney Int* 2003; **64**: S21–S26.
37. Obermüller N, Gentili M, Gauer S, Gretz N, Weigel M, Geiger H *et al.* Immunohistochemical and mRNA localization of the angiotensin II receptor subtype 2 (AT2) in follicular granulosa cells of the rat ovary. *J Histochem Cytochem* 2004; **52**: 545–548.
38. Rodríguez-Perez AI, Valenzuela R, Villar-Cheda B, Guerra MJ, Lanciego JL, Labandeira-García JL. Estrogen and angiotensin interaction in the substantia nigra. Relevance to postmenopausal Parkinson's disease. *Exp Neurol* 2010; **224**: 517–526.
39. Iglesias-Gonzalez J, Sanchez-Iglesias S, Mendez-Alvarez E, Rose S, Hikima A, Jenner P *et al.* Differential toxicity of 6-hydroxydopamine in SH-SY5Y human neuroblastoma cells and rat brain mitochondria: protective role of catalase and superoxide dismutase. *Neurochem Res* 2012; **37**: 2150–2160.
40. Sareen D, Ginkel PR, Takach J, Mohiuddin A, Darjatmoko SR, Albert DM *et al.* Mitochondria as the primary target of resveratrol-induced apoptosis in human retinoblastoma cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; **47**: 3708–3716.
41. Lassegue B, Clempus RE. Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003; **285**: R277–R297.
42. Wang YX, Poon CI, Poon KS, Pang CC. Inhibitory actions of diphenyleneiodonium on endothelium-dependent vasodilatations in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol* 1993; **110**: 1232–1238.



**Cell Death and Disease** is an open-access journal published by Nature Publishing Group. This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

© The Author(s) 2016

# The intracellular angiotensin system buffers deleterious effects of the extracellular paracrine system

Begoña Villar-Cheda<sup>1,2,5</sup>, María A Costa-Besada<sup>1,2,5</sup>, Rita Valenzuela<sup>1,2</sup>, Emma Perez-Costas<sup>3</sup>, Miguel Melendez-Ferro<sup>4</sup> and Jose L Labandeira-Garcia<sup>\*,1,2</sup>

The 'classical' renin–angiotensin system (RAS) is a circulating system that controls blood pressure. Local/paracrine RAS, identified in a variety of tissues, including the brain, is involved in different functions and diseases, and RAS blockers are commonly used in clinical practice. A third type of RAS (intracellular/intracrine RAS) has been observed in some types of cells, including neurons. However, its role is still unknown. The present results indicate that in brain cells the intracellular RAS counteracts the intracellular superoxide/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and oxidative stress induced by the extracellular/paracrine angiotensin II acting on plasma membrane receptors. Activation of nuclear receptors by intracellular or internalized angiotensin triggers a number of mechanisms that protect the cell, such as an increase in the levels of protective angiotensin type 2 receptors, intracellular angiotensin, PGC-1 $\alpha$  and IGF-1/SIRT1. Interestingly, this protective mechanism is altered in isolated nuclei from brains of aged animals. The present results indicate that at least in the brain, AT1 receptor blockers acting only on the extracellular or paracrine RAS may offer better protection of cells.

*Cell Death and Disease* (2017) 8, e3044; doi:10.1038/cddis.2017.439; published online 7 September 2017

The 'classical' renin–angiotensin system (RAS) is a circulating humoral system that controls blood pressure. The actions of angiotensin II (All), the most important effector peptide in RAS, are mediated by two main cell receptors: All type 1 and 2 (AT1 and AT2). AT1 receptors mediate major effects of the system, and it is generally considered that protective AT2 receptors antagonize the pro-oxidative effects of AT1 receptors.<sup>1</sup> More recently, local or tissue RAS has been identified in a variety of tissues, including the central nervous system.<sup>2</sup> It is now known that the local brain RAS is involved in different brain functions, and also appears to be altered in some disorders.<sup>3,4</sup> In previous studies, we have demonstrated the presence of a local RAS in the substantia nigra pars compacta (SNc) and striatum of rodents and primates, including humans.<sup>5–7</sup> This local RAS modulates dopamine release<sup>8,9</sup> possibly via mutual regulation between dopamine and angiotensin receptors.<sup>10–12</sup> However, dysregulation of these interactions exacerbates neuroinflammation, oxidative stress and dopaminergic neuron death.<sup>13,14</sup> In addition, immunohistochemical studies have revealed an apparent intracellular localization of several RAS components in different types of cells, including dopaminergic neurons and glial cells of mammals, including non-human primates and human.<sup>5,15,16</sup> However, the role of the intracellular RAS, and particularly the nuclear components of the RAS, is still unknown. In the present study we investigated the presence and possible role of major RAS components in brain cell nuclei. In particular, we investigated the possible effects of

nuclear angiotensin receptors in the transcription of other components of the intracellular RAS and of several proteins that act as major regulators of the mitochondrial function. Our experiments were carried out in rats, knockout (KO) and transgenic mice, as well as in the MES 23.5 dopaminergic neuron cell line. A major difficulty in elucidating the role of intracellular RAS is to separate the responses induced by intracellular All through intracellular or nuclear receptors from those induced by extracellular All through activation of cell surface receptors. To overcome this technical difficulty, we investigated the effect of All both in cells and in isolated nuclei. Our results show that nuclear angiotensin receptors control key events for nuclear–mitochondrial interaction and neuronal survival.

## Results

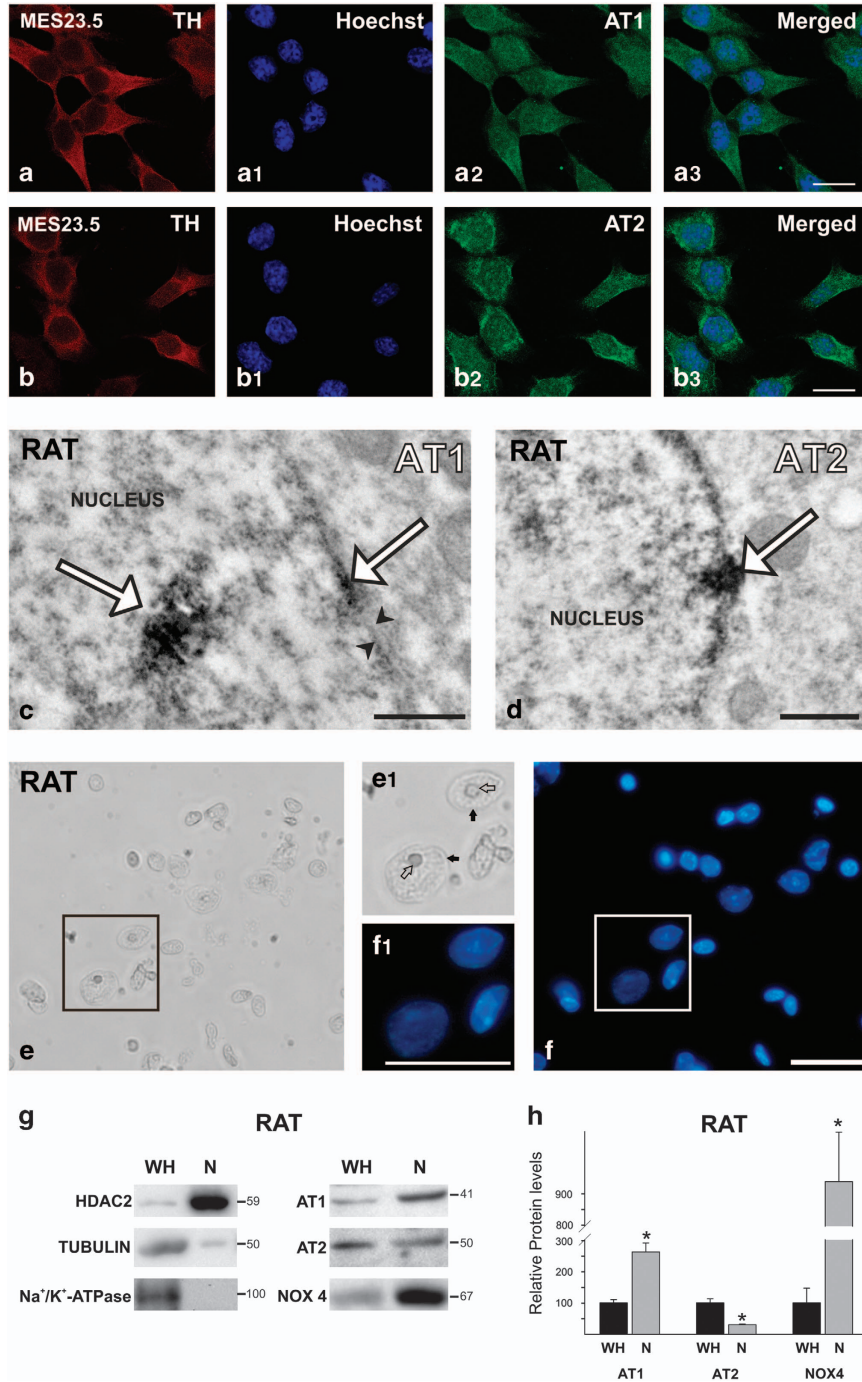
**Localization of AT1 and AT2 receptors in the nucleus of dopaminergic neurons.** Our previous immunohistochemical and laser confocal microscopy studies have revealed immunolabeling for AT1, AT2 receptors and angiotensinogen in the nuclei of SNc dopaminergic neurons and MES 23.5 dopaminergic neuron cell line.<sup>5</sup> In the MES 23.5 dopaminergic neuron cell line, labeling for AT1 and AT2 receptors also colocalized with the nuclear marker Hoechst 33342 (Figures 1a and b). Samples for electron microscopy were

<sup>1</sup>Laboratory of Neuroanatomy and Experimental Neurology, Department of Morphological Sciences, Faculty of Medicine, CIMUS, University of Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain; <sup>2</sup>Networking Research Center on Neurodegenerative Diseases (CIBERNED), Spain; <sup>3</sup>Division of Pediatric Nephrology, Department of Pediatrics, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL, USA and <sup>4</sup>Division of Pediatric Surgery, Department of Surgery, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL, USA

\*Corresponding author: JL Labandeira-Garcia, Laboratory of Neuroanatomy and Experimental Neurology, Department of Morphological Sciences, Faculty of Medicine, CIMUS, University of Santiago de Compostela, Santiago de Compostela 15782, Spain. Tel: +34 881812223; Fax: +34 881812378; E-mail: joseluis.labandeira@usc.es

<sup>5</sup>These authors contributed equally to this work.

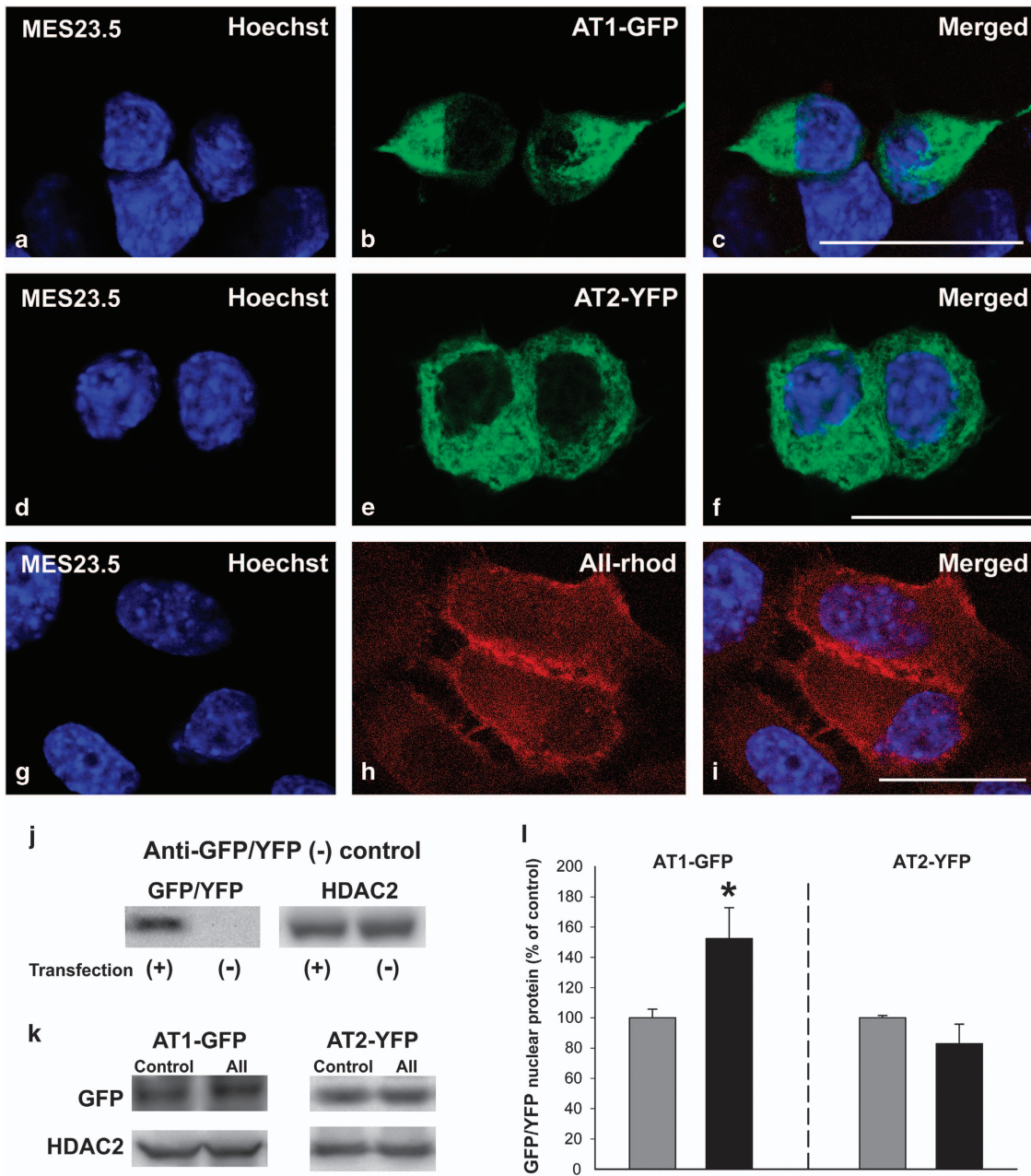
Received 15.3.17; revised 25.7.17; accepted 31.7.17; Edited by A Verkhratsky



**Figure 1** Nuclear AT1, AT2 receptors and NOX4 in nuclei from MES 23.5 dopaminergic neurons and rat nigral region. (a and b) MES 23.5 dopaminergic neurons showing triple immunolabeling for the dopaminergic marker (TH), the nuclear marker (Hoechst), and AT1 (a) or AT2 (b) receptors. (c and d) Electron microscopy of AT1 and AT2 labeling (white arrows) in nuclei and nuclear membranes (between black arrowheads) of rat dopaminergic neurons. (e and f) Nuclei isolated from the rat nigral region in the ventral mesencephalon; the integrity of nuclei was confirmed by microscopic examination with phase contrast (e) and Hoechst staining (f); areas boxed in (e and f) are magnified in (e1 and f1), respectively. (g) WB of whole homogenate (WH) and isolated nuclei (N) from the nigral region showing the expression of AT1 and AT2 receptors, Nox4, as well as different compartment markers used to assess the purity of the nuclei isolation (HDAC2 as a nuclear marker; tubulin as a cytosol marker; and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase as plasma membrane marker). Note the higher expression of AT1 and lower expression of AT2 in the nucleus compared to receptors in WH (g and h). Data are mean ± S.E.M. \**P* < 0.05 compared to WH. Student's *t*-test (*n* = 3–4). Scale bars: 150 μm (a and b), 0.5 μm (c and d) and 50 μm (e and f)

obtained from the densely packed dopaminergic cell clusters of the rat SNc, where immunoelectron microscopy confirmed the labeling for both AT1 and AT2 receptors in the nuclear membranes of dopaminergic neurons (Figures 1c and d).

Nuclei were isolated from the rat nigral region in the ventral mesencephalon (Figures 1e and f), and the quality of the isolation was demonstrated by the absence of markers of the cytosol fraction such as α-tubulin, and membrane markers



**Figure 2** Presence of fluorescence-tagged angiotensin receptors and fluorescent All in nuclei. Colocalization (c, f and i) of the fluorescent nuclear marker Hoechst (a, d and g) with AT1-EGFP (b), AT2-YFP (e) or All-Rhod (h). WB analysis of GFP-YFP-tagged protein in MES 23.5 transfected (+) and not transfected (–) cells showing the specificity of the common anti-GFP/YFP antibody (j). Treatment of MES 23.5 dopaminergic neuron cell line with All increased nuclear AT1-EGFP receptor protein but not nuclear AT2-YFP receptor protein relative to nuclei of control cells (k and l). Data are mean  $\pm$  S.E.M. \* $P < 0.05$  compared to control. Student's *t*-test ( $n = 3-4$ ). AT2-YFP, AT2 tagged to YFP; AT1-EGFP, AT1 tagged to EGFP; All-Rhod, rhodamine-fluorescent All. Scale bar: 20  $\mu$ m (a–i)

such as Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. In addition, the presence of the nuclear fraction was confirmed with the use of the nuclear marker histone deacetylase 2 (HDAC2; Figure 1g). The two main angiotensin receptor types (i.e., AT1 and AT2) were observed in the nuclear fraction. There was a clear difference in the abundance of each receptor subtype; the AT2 receptor appeared less abundant in nuclear than in total cell homogenates, while the opposite occurred for the AT1 receptor

(Figures 1g and h). We also observed the presence of Nox4, which is a major cell source of intracellular ROS in the nuclear fraction (Figures 1g and h).

**Effects of All on nuclear RAS components.** Twenty-four hours after transient transfection of the MES 23.5 dopaminergic neuron cell line, AT1 and AT2 receptors labeled with fluorescent proteins (enhanced green fluorescent protein,

EGFP; yellow fluorescent protein, YFP) were located both at the plasma membrane and intracellularly, and they colocalized with the nuclear marker Hoechst 33342 (Figures 2a–f). In a second series of experiments, cultures of the MES 23.5 dopaminergic neuron cell line were treated with rhodamine-conjugated All to investigate the localization of All within the nucleus. The fluorescent All was internalized and colocalized with the nuclear marker Hoechst 33342, which was evident after 30 min, and persisted for 24 h after treatment (Figures 2g–i).

Interestingly, treatment of the MES 23.5 dopaminergic neuron cell line with 100 nM All increased nuclear AT1-EGFP fluorescence in these cells relative to nuclei from control cells. However, the same treatment did not induce any significant increase in the levels of nuclear AT2-YFP fluorescence relative to control cells. These effects were confirmed by western blot (WB) in samples from isolated nuclei (Figures 2j–l).

RT-PCR analysis of brain-isolated nuclei revealed that treatment with 100 nM All induces a significant increase in angiotensinogen and AT2 receptor mRNA expression (Figures 3a and b), as well as an increase in the expression of mRNA for renin and prorenin/renin receptors (PRRs; Figures 3c and d). In contrast, the levels of AT1 receptor mRNA did not change significantly (Figure 3e). The increases in mRNA expression induced by All for the abovementioned RAS components were inhibited by simultaneous treatment with the AT1 receptor antagonist losartan, which indicates that these effects are mediated via nuclear AT1 receptors. This was confirmed by treatment of isolated nuclei from AT1 and AT2 KO mice. All induced the abovementioned effects in AT2 KO, but not in AT1 KO mice (Figures 3f and g). The effects of All on brain-isolated nuclei were confirmed in nuclei from the MES 23.5 dopaminergic neuron cell line, in which All treatment also increased mRNA expression for AT2 receptors and angiotensinogen, but not mRNA expression for AT1 receptors (Figure 3h).

**Effects of All on the transcription of PGC-1 $\alpha$ , IGF-1 and SIRT1 in isolated nuclei.** Treatment of isolated nuclei with 100 nM All led to an ~60% increase in mRNA expression for PGC-1 $\alpha$  and a twofold increase in mRNA expression for IGF-1. These increases were inhibited by the simultaneous treatment with the AT1 receptor blocker losartan, suggesting that All acts via nuclear AT1 receptors (Figures 4a and c). When nuclei isolated from KO AT1 and KO AT2 mice were treated with All the effect was observed in nuclei from KO AT2 mice, but was absent in nuclei from KO AT1 mice (Figures 4b–d).

Isolated nuclei were also treated with All to assess its effects on mRNA expression for SIRT1. However, the increase in SIRT1 mRNA induced by All was not significant (Figure 4e). To further investigate a possible interaction between SIRT1 and the nuclear RAS we investigated the expression of AT1 and AT2 receptors in nuclei isolated from transgenic mice overexpressing SIRT1. Interestingly, these mice showed a significant decrease in the levels of nuclear AT1 receptors, but a significant increase in the levels of nuclear AT2 receptors (Figure 4f). The results observed in nuclei isolated from the brain nigral region were also observed in nuclei isolated from

the MES 23.5 dopaminergic neuron cell line, where All treatment also produced an increased mRNA expression for PGC-1 $\alpha$  and IGF-1, but a nonsignificant increase in mRNA expression for SIRT1 (Figure 4g).

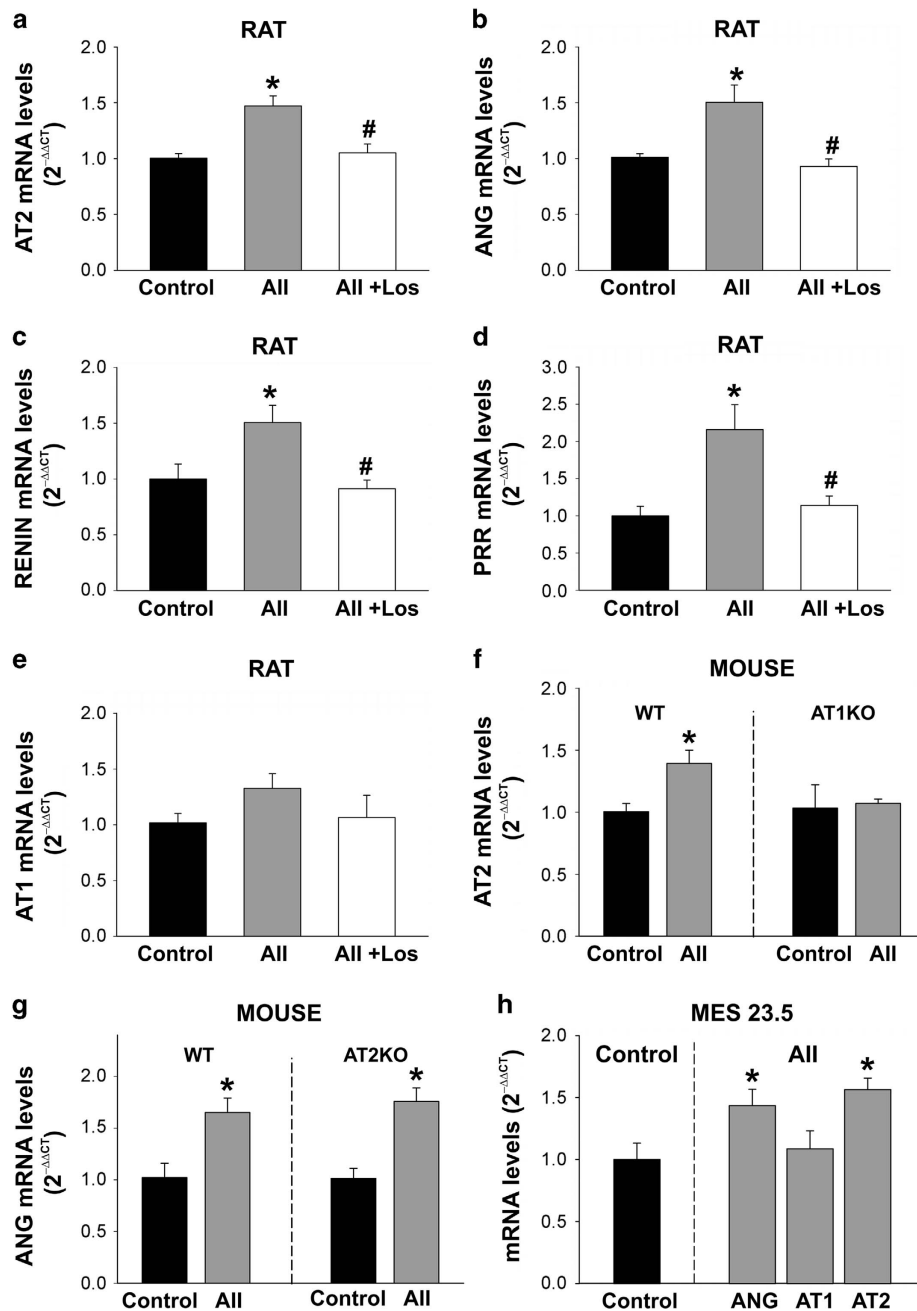
**Effects of All on superoxide/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, calcium and nitric oxide levels in isolated nuclei.** Treatment of brain-isolated nuclei with All induced a significant increase in the levels of nuclear superoxide/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, which was inhibited by simultaneous treatment with the AT1 receptor blocker losartan, but not by the simultaneous treatment with the AT2 receptor blocker PD123,319 (Figure 5a). The increase in superoxide/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced by All was also inhibited by the simultaneous treatment with the antioxidant *N*-acetyl-cysteine (NAC) or the simultaneous treatment with the Nox4 inhibitor (diphenyleneiodonium, DPI; Figure 5b). Altogether these results suggest that at the nuclear level, All activates the AT1/Nox4 axis to induce the release of superoxide/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The role of AT1 and AT2 receptors in All-induced nuclear superoxide/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> release was confirmed in isolated nuclei from AT1 and AT2 KO mice (Figure 5c). Levels of superoxide/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> were significantly lower in nuclei from KO AT1 mice than from wild-type (WT) mice. Nuclei from KO AT2 mice showed significantly higher levels of superoxide/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> than nuclei from WT mice. Treatment of nuclei from KO AT1 mice with All induced a significant additional decrease in the levels of nuclear superoxide/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (possibly as a result of the effect of All on nuclear AT2 receptors). Treatment of isolated nuclei from KO AT2 mice with All induced an additional increase in the levels of nuclear superoxide/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Altogether these results reveal an opposite effect of AT1 (marked increase), and AT2 (slight decrease) nuclear receptors on the levels of nuclear superoxide/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

The observations in brain nuclei were confirmed in nuclei isolated from the MES 23.5 dopaminergic neuron cell line, in which All treatment also induced a significant increase in the levels of nuclear superoxide/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. This effect was inhibited by the simultaneous treatment with the AT1 receptor blocker losartan or the Nox4 inhibitor DPI, but not by the simultaneous treatment with the AT2 receptor antagonist PD123,319 (Figure 5d).

The All-induced increase in AT2 receptor or PGC-1 $\alpha$  mRNAs (Figures 3 and 4) was not blocked by the simultaneous treatment with the antioxidant NAC or the Nox inhibitor DPI, at least in the present experimental conditions. This suggests that the All-induced increase in nuclear levels of superoxide/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> does not mediate the abovementioned effects on transcription (Figures 5e and f).

Treatment of isolated nuclei with All led to increased levels of nuclear calcium, which were inhibited by treatment with the AT1 receptor blocker losartan, indicating that the effect is mediated by AT1 receptors (Figure 6a). Interestingly, the simultaneous treatment of isolated nuclei with the IP3 receptor inhibitor 2-aminoethyl diphenylborinate (2-APB) inhibited the All-induced increase in AT2 and PGC-1 $\alpha$  mRNAs, suggesting that these effects are mediated by Ca<sup>2+</sup> via nuclear IP3-receptors (Figures 6b and c).

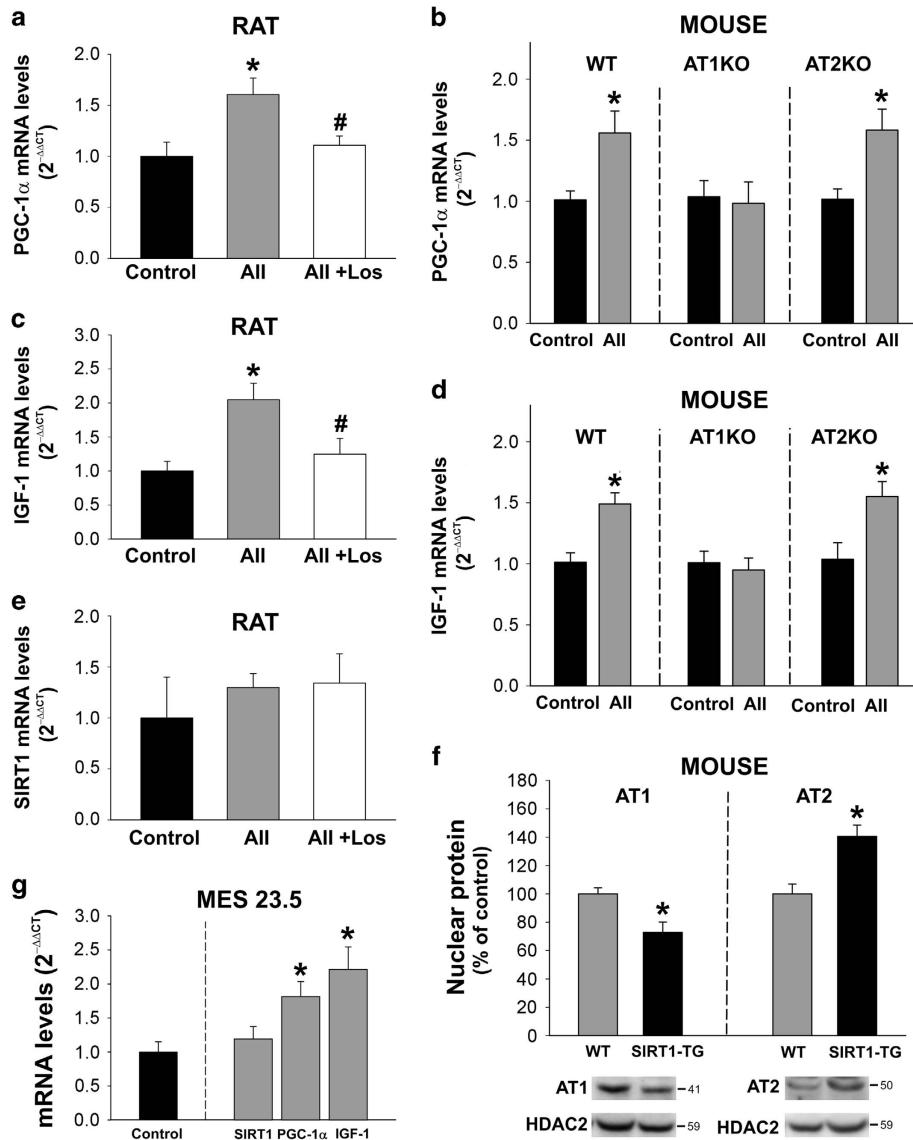
Treatment of isolated nuclei with All and the AT1 blocker losartan induced a significant increase in nitric oxide (NO) levels, which was inhibited by simultaneous treatment with the



**Figure 3** Effect of angiotensin (All) on transcription of different RAS components. Treatment of rat-isolated nuclei with All induced an increase in the expression of mRNA for AT2 (a), angiotensinogen (ANG; b), renin (c) and PRRs (d), which was inhibited by simultaneous treatment with the AT1 receptor antagonist losartan (los), indicating that these effects are mediated via nuclear AT1 receptors. In contrast, the levels of AT1 receptor mRNA did not change significantly after All administration (e). The role of AT1 receptors in these effects was confirmed in isolated nuclei from AT1 and AT2 KO mice treated with All (f and g). The effects of All on brain-isolated nuclei were also observed in nuclei from the MES 23.5 dopaminergic neuron cell line (h). Data are mean  $\pm$  S.E.M. \* $P < 0.05$  compared to control, # $P < 0.05$  compared to the group treated with All. One-way analysis of variance and Holm–Sidak *post hoc* test (a–e) and Student's *t*-test (f–h) ( $n = 4–8$ )

AT2 receptor antagonist PD123,319 (Figure 6d). This indicates that nuclear AT2 receptors mediate the All-induced production of nuclear NO. The All-induced increase in nuclear NO was also inhibited by simultaneous treatment with the NO synthase (NOS) inhibitor, *N*-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), which indicates that the nuclear NO synthase involved in this process.

**Effects of All on isolated nuclei from aged rats.** Nuclei isolated from brains of aged rats showed a significant decrease in the levels of both AT1 and AT2 receptors (Figure 7a). Interestingly, treatment of these nuclei with 100 nM All did not induce any significant increase in mRNA expression for IGF-1, PGC-1 $\alpha$  or AT2 receptors (Figure 7b). Similarly, the All-induced increase in the levels of superoxide/



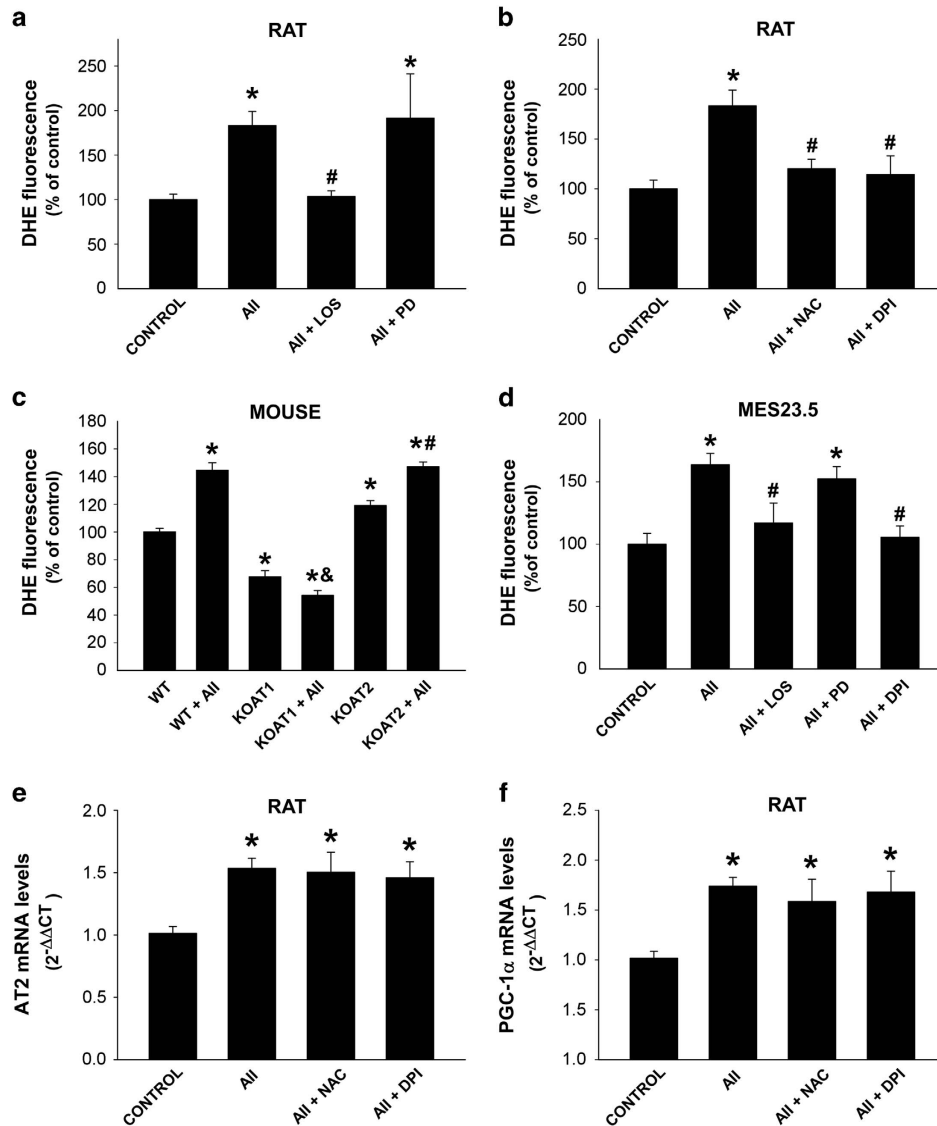
**Figure 4** Effect of angiotensin (All) on transcription of PGC-1 $\alpha$ , IGF-1 and SIRT1. Treatment of isolated nuclei with All induced an increase in the expression of mRNA for PGC-1 $\alpha$  (a) and IGF-1 (c), which was inhibited by the simultaneous treatment with the AT1 receptor antagonist losartan (los), indicating that these increases are mediated via nuclear AT1 receptors. This was confirmed by treatment of isolated nuclei from AT1 and AT2 KO mice with All (b and d). The expression of SIRT1 mRNA did not change significantly after treatment of isolated nuclei with All (e). However, nuclei isolated from mice overexpressing SIRT1 (SIRT1-TG) showed a decrease in the expression of nuclear AT1, and an increase in the levels of AT2 receptors (f). The effects of All on brain-isolated nuclei were also observed in nuclei from the MES 23.5 dopaminergic neuron cell line (g). Data are mean  $\pm$  S.E.M. \* $P$  < 0.05 compared to control or WT (f), # $P$  < 0.05 compared to the group treated with All. One-way analysis of variance and Holm-Sidak *post hoc* test (a, c and e), and Student's *t*-test (b, d, f and g) ( $n$  = 4–8)

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was not statistically significant in these nuclei (Figure 7c). As observed in nuclei from young KO AT1 mice (Figure 5c), the levels of nuclear superoxide/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> were significantly lower in aged KO AT1 mice than in WT aged mice. Treatment with All did not induce any significant increase in the levels of superoxide/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in nuclei from aged KO AT1 mice, as previously observed in young KO AT1 mice (Figure 7d).

## Discussion

We report here the presence of AT1 and AT2 receptors as well as Nox4 in isolated nuclei from brain cells. AT1 receptors were

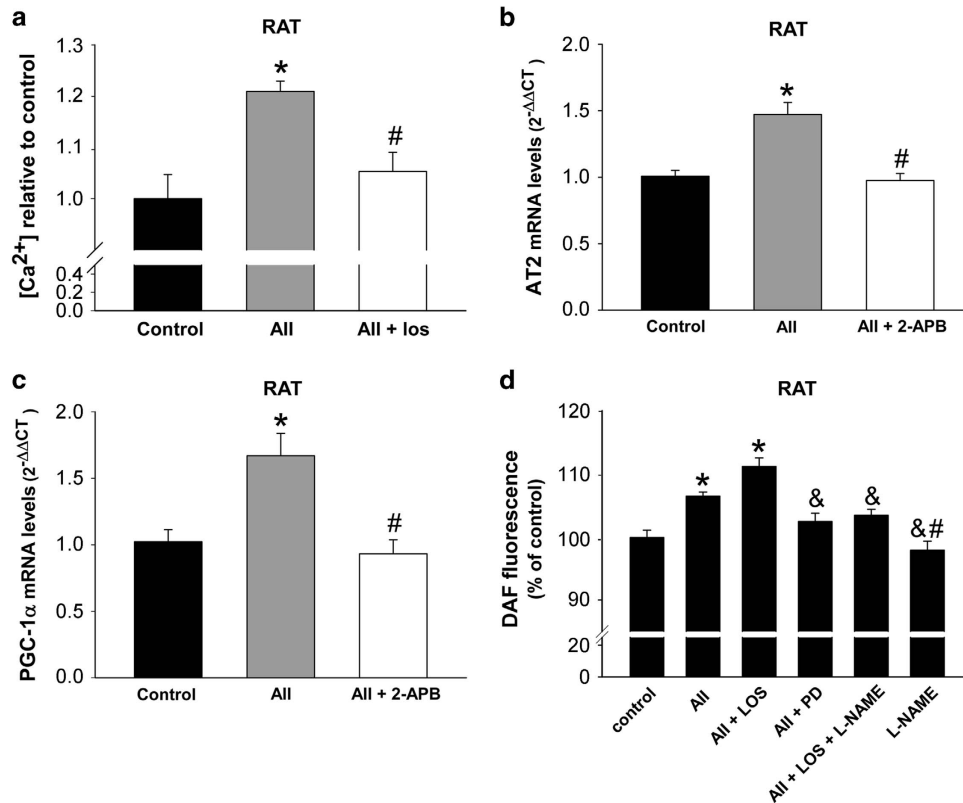
more abundantly expressed in isolated nuclei than in the total cell homogenate, while the opposite occurred for AT2 receptors. Interestingly, we recently observed the opposite in isolated mitochondria, where AT2 are much more abundant than AT1 receptors.<sup>17</sup> Treatment of the MES 23.5 dopaminergic neuron cell line with All induced an increase in the expression of nuclear All and AT1 receptors. In contrast, treatment of isolated nuclei with All induced, via AT1 activation, an increase in AT2 mRNA but not AT1 mRNA transcription. The presence of AT1 receptors in the nucleus has been observed in several types of peripheral cells, although the function of nuclear angiotensin receptors was



**Figure 5** Effect of angiotensin (All) on nuclear superoxide/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production, AT2 and PGC-1 $\alpha$  mRNA expression. Treatment of isolated nuclei with All increased the levels of nuclear superoxide/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (i.e., DHE fluorescence; **a–d**), which were inhibited by the simultaneous treatment with the AT1 receptor antagonist losartan (**a**; los), the antioxidant NAC and the Nox inhibitor DPI (**b**), but not by the AT2 receptor antagonist PD123,319 (PD) (**a**). Involvement of AT1 in these effects was confirmed by treatment of nuclei from AT1 and AT2 KO mice with All, which also revealed an opposite effect of nuclear AT1 (increase) and AT2 (decrease) receptors on the levels of nuclear superoxide/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (**c**). The effects of All on brain nuclei were also observed in nuclei from the MES 23.5 dopaminergic neuron cell line (**d**). However, the effects of All on AT2 (**e**) and PGC-1 $\alpha$  (**f**) mRNA expression were not inhibited by the antioxidant NAC or the Nox inhibitor DPI. Data are mean  $\pm$  S.E.M. \* $P$  < 0.05 compared to control or WT (**c**), & compared to KO AT1, # $P$  < 0.05 compared to group treated with All (**a**, **b** and **d**) or KO AT2 (**c**). One-way analysis of variance and Holm–Sidak *post hoc* test ( $n = 4–10$ )

not clarified.<sup>18,19</sup> In renal cells, a rapid internalization of the All–AT1 receptor complex, via receptor-mediated endocytosis, has been reported.<sup>20–22</sup> AT2 receptors lack a canonical nuclear localization sequence as AT1 receptors do, and generally they are not internalized following ligand activation in vascular or renal cells.<sup>23,24</sup> It has been suggested that the intracellular RAS may serve to amplify events that are initiated in the plasma membrane, leading to signal amplification in successive steps with reutilization and minimal waste.<sup>18,25</sup> Quite the opposite, the results of the present study suggest that the intracellular, and particularly the nuclear RAS, may counteract and modulate the deleterious effects of the

membrane All/AT1 activation (Figure 8). Extracellular (i.e., paracrine) All induces activation of the membrane AT1–Nox2 axis, with the generation of intracellular superoxide/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and oxidative stress, but also induces the internalization of the All–AT1 receptor complex to the nucleus. We observed that activation of nuclear AT1 receptors by intracellular All triggers a number of mechanisms that may protect cells against oxidative stress. These mechanisms include an increase in the levels of AT2 receptors and intracellular angiotensin, as well as of PGC-1 $\alpha$  and IGF-1. Interestingly, this protective mechanism is altered in isolated nuclei from brains of aged animals.

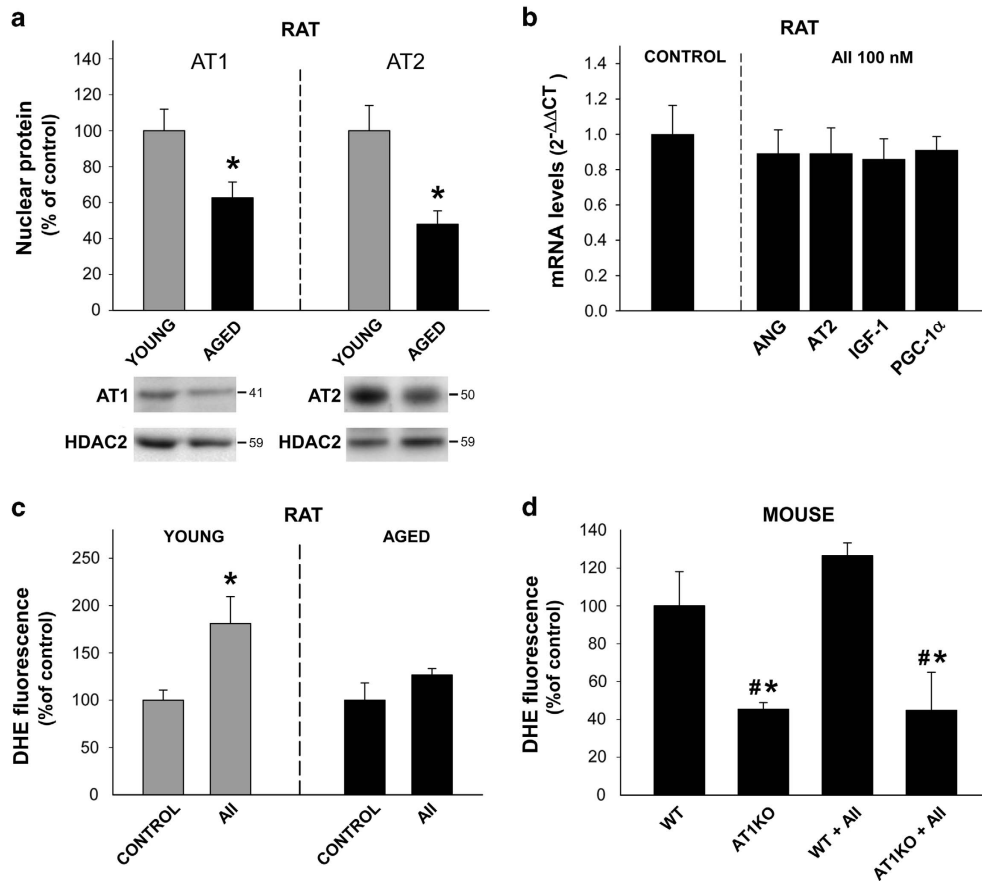


**Figure 6** Effect of angiotensin (All) on nuclear calcium and NO levels. Treatment of rat-isolated nuclei with All induced a significant increase in nuclear calcium (a), NO levels (d), which were inhibited by the simultaneous treatment with the AT1 receptor antagonist losartan (los) and the AT2 receptor antagonist PD123,319 (PD), respectively. Treatment of isolated nuclei with All also induced an increase in the expression of mRNA for AT2 (b) and PGC-1 $\alpha$  (c), which was inhibited by the simultaneous treatment with the IP3 receptor blocker 2-APB, suggesting that Ca<sup>2+</sup> signaling is involved in these transcriptional changes. The All-induced increase in nuclear levels of NO was inhibited by the NOS inhibitor L-NAME (d). Data are mean  $\pm$  S.E.M. \* $P < 0.05$  compared to control, # $P < 0.05$  compared to the group treated with All, & compared to the group treated with All+los. One-way analysis of variance and Holm-Sidak *post hoc* test ( $n = 4-8$ )

**Effects of nuclear All/AT1 activation on nuclear RAS components.** Activation of nuclear AT1 receptors by All induces an increase in the expression of AT2 receptor mRNA. This may lead to an increase in the levels of protective AT2 receptors that traffic to different cell structures such as mitochondria and membrane. A compensatory increase in the opposite or protective arm of the RAS (i.e., All/AT2) has been observed in different studies after increasing the activity of the membrane All/AT1/Nox2/superoxide axis.<sup>26-28</sup> Consistent with this, we have recently shown that AT2 receptors are particularly abundant in mitochondria and that mitochondrial AT2 receptors, via NO, downregulate mitochondrial respiration to counteract oxidative stress in neurons.<sup>17</sup> In the present study, we observed that nuclear AT2 receptor activation increases the levels of nuclear NO, and our observations in AT1 and AT2 KO mice suggest that nuclear AT2 receptors modulate the effects of nuclear AT1 receptors. In addition to an increase in AT2 mRNA expression, activation of AT1 nuclear receptors by All induced an increase in the expression of mRNA for angiotensinogen, renin and renin-prorenin receptors, which indicates that an increase in the synthesis of intracellular angiotensin may further act on intracellular AT2 receptors to counteract oxidative damage.

**Effects of nuclear All/AT1 activation on transcription of PGC-1 $\alpha$ .** Activation of nuclear AT1 receptors also induced an increase in mRNA expression for PGC-1 $\alpha$ . Members of the PGC-1 family have emerged as master transcriptional regulators of the mitochondrial function that improve or rescue mitochondrial dysfunction.<sup>29-32</sup> In dopaminergic neurons, PGC-1 $\alpha$  has been shown to be essential for survival, possibly through the maintenance of mitochondrial function, as conditional PGC-1 $\alpha$  KO mice show a significant loss of this type of neurons,<sup>33,34</sup> while overexpression of PGC-1 $\alpha$  protects dopaminergic neurons.<sup>33-37</sup> The present results show that activation of nuclear AT1 receptors by All induces an increase in the expression of PGC-1 $\alpha$  that may counteract the pro-oxidative effects of activation of the surface membrane AT1 receptor. Nuclear AT2 receptors modulate this process by counteracting the effects of nuclear AT1 receptors.

**Effects of nuclear All/AT1 activation on transcription of IGF-1 and SIRT1.** We also investigated the effect of activation of nuclear AT1 receptors on two additional factors (i.e., IGF-1 and SIRT1) that have been shown to modulate mitochondrial function and to interact with the RAS in studies performed at tissue and cellular levels.<sup>38,39</sup> IGF-1 has been found to increase survival of dopaminergic neurons,<sup>40-42</sup> and



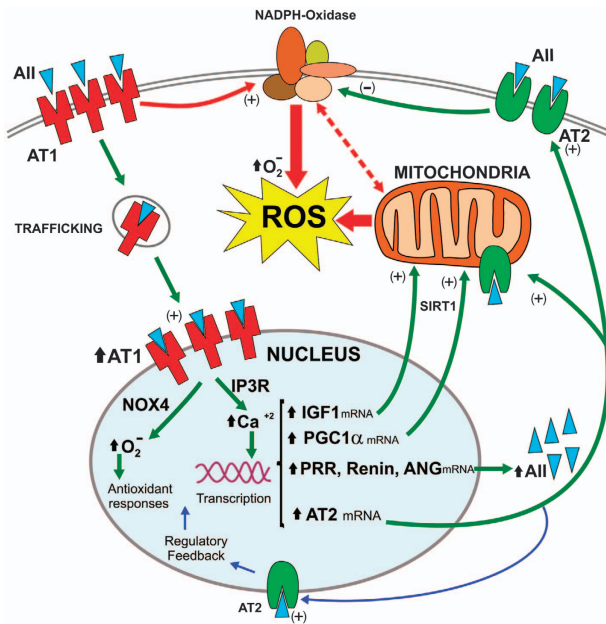
**Figure 7** Nuclear AT1 and AT2 receptors in aged rats and mice. Nuclei isolated from brains of aged rats showed a significant decrease in the levels of both AT1 and AT2 receptors (a). Treatment of nuclei with All did not induce any significant increase in AT2, angiotensinogen (ANG) and PGC-1 $\alpha$  mRNA expression (b), or in the levels of nuclear superoxide/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (c). Levels of nuclear superoxide/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> were significantly lower in aged KO AT1 mice than in WT aged mice, and treatment with All did not induce any significant increase in superoxide/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in nuclei from aged KO AT1 mice (d). Data are mean  $\pm$  S.E.M. \* $P < 0.05$  compared to the corresponding control, # $P < 0.05$  compared to aged WT or aged WT treated with All. One-way analysis of variance and Holm-Sidak *post hoc* test (b and d) and Student's *t*-test (a and c) ( $n = 3-8$ )

activation of nuclear AT1 receptors increases the expression of IGF-1 mRNA. The cytoprotective effects of IGF-1 have been related to mitochondrial protection, leading to a reduction of free radical production, oxidative damage and apoptosis.<sup>43,44</sup> IGF-1 has been suggested to inhibit cell death triggered by oxidative stressors via increasing expression of SIRT1.<sup>45</sup>

SIRT1 is present in the nucleus and cytoplasm. It deacetylates several proteins involved in cell survival, metabolism and stress response, and stimulates resistance to oxidative stress in several types of cells.<sup>46</sup> Several studies lead to the conclusion that SIRT1 exerts its control over mitochondrial function mainly by regulating PGC-1 $\alpha$  activity.<sup>30,31,47</sup> In a recent study, we observed that All induced an increase in SIRT1 expression in dopaminergic neurons and microglia.<sup>38</sup> However, the activation of AT1 nuclear receptors in isolated nuclei did not induce any significant increase in SIRT1 mRNA. This suggests that certain components located in the cytoplasm are involved in the increase in expression of SIRT1 induced by membrane All/AT1 activation. The above-mentioned increase in expression of IGF-1 may be a possible mechanism, as it has been observed that IGF-1 induced an

increase in SIRT1 expression in cardiomyocytes.<sup>45</sup> The involvement of nuclear angiotensin receptors in the regulation of SIRT1 levels is suggested by our observations in isolated nuclei from transgenic mice overexpressing SIRT1. Overexpression of SIRT1 led to a decrease in expression of nuclear AT1 receptors and an increase in expression of AT2 nuclear receptors, which suggests a possible feedback regulation of the abovementioned mechanism. This is also consistent with observations showing that overexpression of SIRT1 in muscle cells downregulates PGC-1 $\alpha$ .<sup>48</sup> In summary, activation of nuclear AT1 receptors by All may trigger a compensatory mechanism by increasing both PGC-1 $\alpha$  and SIRT1 via IGF-1.

**Effects of nuclear All/AT1 activation on nuclear calcium and superoxide/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levels.** We have observed that activation of nuclear AT1 receptors induces an increase in nuclear superoxide/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as well as in Ca<sup>2+</sup> levels, which have been shown to activate signaling pathways that influence gene expression in different types of cells. Nuclear Ca<sup>2+</sup> signaling is an important regulator of gene transcription,<sup>49</sup> and IP3 receptors are involved in Ca<sup>2+</sup> signaling.<sup>50</sup> Calcium has been shown to directly bind



**Figure 8** Model of the role that nuclear AT1 and AT2 receptors have in modulating the pro-oxidative effects of activation of membrane AT1 receptors by extracellular (i.e., paracrine) AII. Extracellular AII induces activation of the membrane AT1/Nox2 axis, with the generation of intracellular superoxide/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and oxidative stress (red arrows), but also induces the internalization of the AII–AT1 receptor complex to the nucleus (green arrows). Activation of nuclear AT1 receptors induces an increase in nuclear NOX4/superoxide/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and IP3/Ca<sup>2+</sup> levels, which are known to regulate gene expression, triggering a number of mechanisms that may protect cells against oxidative stress (green arrows). These protective mechanisms include the following: (i) an increase in the expression of AT2 receptor mRNA, which leads to an increase in the levels of protective AT2 receptors that traffic to different cell structures such as mitochondria and membrane and induces a compensatory increase in the RAS protective arm (i.e., AII/AT2); (ii) an increase in angiotensinogen, renin and PRR mRNA, which leads to an increase in the synthesis of intracellular AII to act on intracellular AT2 receptors; (iii) an increase in mRNA expression for PGC-1α and IGF-1, which, interacting with SIRT1, have been related to mitochondrial protection and reduction of free radical production and oxidative damage. Nuclear AT2 receptors modulate this process (blue arrows) and counteract the effects of nuclear AT1 receptors by increasing nuclear levels of NO, which was particularly shown using isolated nuclei from AT1 and AT2 KO mice. IGF-1, insulin-like growth factor 1; IP3R, inositol 1,4,5-trisphosphate receptor; PGC-1α, peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha; ROS, reactive oxygen species; SIRT1, sirtuin 1

transcription factors like DREAM,<sup>51</sup> or activate the nuclear CaM kinase pathways that regulate gene expression.<sup>52</sup> In the present study inhibition of nuclear IP3 receptors inhibited the AII-induced increase in AT2 and PGC-1α mRNAs, which suggests that Ca<sup>2+</sup> signaling is involved in these transcriptional changes.

It has also been suggested that Nox4 regulates gene expression in a manner dependent on regulatory DNA sequence Maf-recognition element, constituting part of the antioxidant response.<sup>53</sup> Unexpectedly, the simultaneous treatment of isolated nuclei with AII and the antioxidant NAC or the Nox inhibitor DPI did not inhibit the increase in expression of AT2 or PGC-1α, at least in the conditions used in the present experiments. Nox-derived superoxide/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> may be involved in the transcription of other factors of

the antioxidant response, possibly related to hormetic adaptations to oxidative stress similar to those described in mitochondria.<sup>54</sup>

**Role of nuclear RAS in aging.** Aging is the highest risk factor for neurodegenerative diseases, particularly PD. In previous studies we observed that aged rats show an increase in the activity of the AII/AT1/Nox2 axis,<sup>10,55,56</sup> which leads to increased levels of oxidative stress and neuroinflammatory markers in the nigral region. Aged animals showed an important increase in the expression of AT1 receptors, as well as a marked decrease in the expression of AT2 receptors in brain homogenates (particularly nigral and striatal homogenates). However, aged rats also showed a decrease in the levels of IGF-1 and SIRT1 in the nigral region.<sup>39,38</sup> The present findings explain these apparent paradoxical differences between young and aged rats. Nuclei from aged rats showed a significant decrease in the levels of both nuclear AT1 and AT2 receptors, and treatment of aged nuclei with AII did not induce any significant increase in the levels of nuclear superoxide/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, or in the expression of AT2, angiotensinogen, IGF-1 or PGC-1α mRNA. This suggests that the above-described nuclear compensatory response triggered by nuclear AT1 receptors is impaired in aged cells, which leads to the decrease in AT2, IGF-1 and SIRT1 expression observed in aged animals. In a recent study, we observed that the expression of AT2 receptors is decreased in mitochondria of aged rats, which may affect mitochondrial protection against oxidative stress.<sup>17</sup> Deterioration of mitochondrial function and biogenesis has been postulated as a central landmark of aging, which has been related to a decline in PGC/mitochondrial function together with a decreased expression of PGC-regulated oxidative defense mechanisms.<sup>47</sup>

## Conclusions

The present results, and the results of our recent study,<sup>17</sup> suggest that the intracellular RAS may buffer the pro-oxidative effects of activation of membrane AT1 receptors by extracellular (paracrine) AII. Internalization of the AII–AT1 complex to the nucleus, and activation of nuclear AT1 receptors by intracellular AII triggers a number of mechanisms that may protect cells against oxidative stress. Interestingly, this protective mechanism is altered in nuclei from brains of aged animals. Previous studies in non-neural cells have suggested that the intracellular RAS may serve to amplify events that are initiated in the plasma membrane. On this basis, it was assumed that intracellular AII contributes to disease progression, and that AT1 receptor blockers that are effective against extracellular and intracellular receptors, or the recent renin inhibitors that act at extra- and intracellular levels may be more effective to combat the effects of RAS overactivity on different tissues. Interestingly, it has been observed that some AT1 blockers such as candesartan act mostly on surface receptors, and other AT1 blockers such as losartan act both on surface and intracellular receptors.<sup>57</sup> The present results indicate that at least in the brain, AT1 receptor blockers acting only on the extracellular or paracrine RAS may offer better protection of cells.

## Materials and Methods

**Experimental design.** In a first series of experiments brain sections from the substantia nigra of adult male Sprague–Dawley rats, and cultures of the MES 23.5 dopaminergic cell line were used to investigate the presence of All receptors in the nuclei of dopaminergic cells, using immunofluorescence and electron microscopy. All experiments were carried out in accordance with the Directives 2010/63/EU and 86/609/CEE, and were approved by the corresponding ethics committee at the University of Santiago de Compostela. Animals were housed at constant room temperature (RT; 21–22 °C) and 12 h light/dark cycle. All surgeries were performed under ketamine/xylazine anesthesia. In a second series of experiments, isolated nuclei from rat nigral region were used to confirm the expression of All receptors using WB assay. In addition, dopaminergic cells were transfected with fluorescently tagged AT1 and AT2 receptors, or treated with fluorescent All to investigate the colocalization of fluorescence with nuclear markers, and to confirm the results observed with immunolabeling.

For functional studies, we used nuclei isolated from the brain of young (8–10 weeks old) and aged (18–20 months old) Sprague–Dawley rats, as well as young (8–10 weeks old) and aged (18–20 months old) mice, and the MES 23.5 dopaminergic neuron cell line (generously provided by Dr. Wei-Dong Le). The following groups of mice were used: (1) male WT C57BL-6 mice (Charles River, L'Arbresle, France), and young and aged homozygous C57BL-6 mice deficient for AT1a (the major mouse AT1 isoform, and the closest murine homolog to the single human AT1; Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA); and (2) young and aged homozygous C57BL-6 mice deficient for AT2 receptors (gift of Dr. Daniel Henrion). A third group of C57BL-6 mice comprised young and aged transgenic mice in which SIRT1 is moderately overexpressed under its own promoter, thereby following the physiological pattern of expression,<sup>58</sup> and the corresponding WT controls. Nuclei were incubated with All (100 nM, Sigma, St. Louis, MO, USA) and different blockers to assess the effect of activation of AT1 and AT2 nuclear receptors on mRNA transcription, nuclear superoxide/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levels, NO or calcium levels. The blockers used included the AT1 antagonist losartan (3 μM, Sigma), the AT2 antagonist PD123,319 (1 μM, Sigma), the Nox inhibitor DPI (5 μM Sigma), the antioxidant NAC (0.5 mM, Sigma) and the inhibitor of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor 2-APB (50 μM, Sigma).

**Immunofluorescent labeling.** Double immunofluorescence labeling was performed to identify the cells that expressed angiotensinogen/angiotensin, AT1R, AT2R and PRR in the rat SNc, as described in our previous studies.<sup>5,7</sup> Angiotensinogen/angiotensin, AT1R, AT2R and PRR antibodies were combined with antibodies against tyrosine hydroxylase (TH; as a marker of dopaminergic neurons), glial fibrillary acid protein (a marker of astrocytes) and OX42 (a marker of both resting and reactive microglia (not shown; see ref. 5 for details).

The MES 23.5 dopaminergic neuron cell line was cultured in DMEM/F12 containing Sato's component growth medium supplemented with 2% FBS, 100 U/ml penicillin and 100 μg/ml streptomycin, at 37 °C in a humidified CO<sub>2</sub> incubator (5% CO<sub>2</sub>, 95% air). MES 23.5 cells were plated at a density of 0.4 × 10<sup>6</sup> onto 35 mm plastic dishes with glass coverslips previously coated with poly-L-lysine (Sigma; 10 mg/ml), fixed in 4% paraformaldehyde in Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS; pH 7.4) for 20 min, and incubated overnight with the anti-AT1 (sc-31181; 1:50) or anti-AT2 (sc-9040; 1:200) polyclonal antibodies (both from Santa Cruz Biotechnologies, Dallas, TX, USA). After rinsing with DPBS, cells were incubated for 150 min with the Alexa-conjugated secondary antibody (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) and then stained with Hoechst (10 μg/ml; Sigma). Labeling was visualized using a confocal laser-scanning microscope (AOBS-SP5X; Leica Microsystems, Heidelberg GmbH, Mannheim, Germany). Confocal images were obtained by sequential scan using three different laser lines to avoid simultaneous excitation and possible overlap. Colocalization analysis was subsequently performed with the captured images to detect double-labeled cells. Analysis of the photographs at central cell levels revealed the location of labeling (peripheral ring suggesting membrane, cytoplasm or in the nucleus). In negative controls, in which the primary antibody was omitted, no immunostaining was observed.

**Immunoelectron microscopy.** Adult male Sprague–Dawley rats were deeply anesthetized with a mixture of ketamine/xylazine and perfused with saline (0.09% NaCl) followed by a solution of 4% paraformaldehyde and 0.1% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer (PB, pH 7.4). After perfusion, brains were quickly removed from the skull, immersed in the same fixative solution overnight at 4 °C and rinsed thoroughly in PB. Free-floating 40 μm coronal sections were obtained on a vibratome and stored in PB until use. Sections containing the

substantia nigra were transferred to citrate buffer, pH 6.0 (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) at RT for 5 min and then to citrate buffer at 80 °C for 30 min. Sections were rinsed consecutively in citrate buffer and phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.4) at RT before pre-treatment with 1% sodium borohydride in PBS for 15 min. Sections were rinsed several times in PBS, then transferred to a solution of 5% hydrogen peroxide in PBS for 30 min and rinsed several times in PBS. Sections were pre-incubated in 10% normal serum containing 0.01% Triton X-100 in PBS for 1 h and then incubated for 72 h at 4 °C with the appropriate primary antibody: mouse monoclonal anti-TH (Sigma; 1:10000); AT1 goat polyclonal diluted 1:100; or AT2 rabbit polyclonal diluted 1:200 (Santa Cruz Biotechnologies catalog number sc-31181 and sc-9040, respectively). Sections were rinsed thoroughly in PBS and incubated for 1 h with the appropriate secondary antibodies (biotinylated goat anti-rabbit or horse anti-goat, Vector Laboratories) diluted 1:400 in PBS containing 0.01% Triton X-100, rinsed in PBS and incubated with an avidin–biotin complex kit (1:100; Vector Laboratories) for 1 h at RT. Sections were rinsed multiple times in PBS, developed using a 3,3'-diaminobenzidine peroxidase kit (Vector Laboratories) and further rinsed in PBS.

Sections immunolabeled for AT1, AT2 or TH were rinsed in PB, transferred to a solution of 1% osmium tetroxide in PB for 1 h at RT and rinsed in PB before gradual dehydration in 50–70% ethanol. They were then transferred to a contrast solution containing 1% uranyl acetate in 70% ethanol for 1 h at RT, rinsed in 70% ethanol to remove excess uranyl acetate and gradually dehydrated in 5 min baths of 70–100% ethanol. Sections were cleared in propylene oxide and gradually infiltrated with Epon resin by sequential immersion in a 2 : 1 mixture of propylene oxide and Epon resin (30 min), 1:1 mixture of propylene oxide and Epon resin (1 h), 1:2 mixture of propylene oxide and epon (1 h) and finally transferring the sections to Epon resin overnight at 4 °C. The following day sections were transferred to freshly prepared Epon resin for 1 h at RT, flat embedded and allowed to polymerize for a minimum of 72 h at 60 °C. After flat embedding was completed, the substantia nigra was clearly identified using a bright-field microscope and re-dissected for ultramicrotomy. Semi-thin (1 μm thick) and ultrathin (90 nm thick) sections were cut using a Leica EM UC6 ultramicrotome (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). Ultrathin sections were placed on copper grids and observed and photographed using a Hitachi transmission electron microscopy (Hitachi, Tokyo, Japan) equipped with a Hamamatsu Orca digital camera (Hamamatsu, Hamamatsu, Japan).

**WB analysis.** Whole homogenates and nuclear protein extracts from the nigral region were processed for WB analysis. Equal amounts of protein were separated by 5–10% Bis-Tris polyacrylamide gel, and transferred to nitrocellulose membranes. Membranes were incubated overnight with primary antibodies against AT1 (1:200; sc-31181), AT2 (1:200; sc-9040), NOX4 (1:2500; Abcam, Cambridge, England, UK, ab133303), HDAC2 (1:200; sc-56685), α-tubulin (1:50 000; Sigma, T5168) or Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase (1:200; sc-21712). The corresponding HRP-conjugated secondary antibodies were used. Immunoreactivity was detected with an Immun-Star HRP Chemiluminescent Kit (Millipore, Madrid, Spain) and imaged using a chemiluminescence detection system (Molecular Imager ChemiDoc XRS System; Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

**Specificity of antibodies.** The specificity of the antibodies used for WB and immunolabeling studies has been established in previous studies: AT1 sc-31181,<sup>59</sup> AT2 sc-9040.<sup>60</sup> In addition, the specificity of the antibodies was confirmed in our laboratory by pre-adsorption with the corresponding synthetic peptide antigen. See ref. 61 for details. We also used WB analysis of lysates from HEK293 cells transfected with AT1 or AT2 tagged to fusion tail DDK (TA50011 from Origene, Rockville, MD, USA; DDK tag: DYKDDDDK). Using HEK293 cells the specificity of the antibodies was confirmed by the presence of a predominant immunoreactive band in lysates from positively transfected cells and also by the absence of this band in negative controls, which consisted of lysates of cells transfected with empty vectors. See ref. 17 for details.

**Transient transfection of All receptors and rhodamine-conjugated All treatment of MES 23.5 dopaminergic cell line.** To study the cellular distribution of All receptors, MES 23.5 cells were transiently transfected with 1 μg AT1 (AT1/EGFP-N3) or 3 μg AT2 (AT2/YFP-N1) complementary DNA (cDNA) for 24 h using Lipofectamine LTX transfection reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Twenty-four hours after transfection, cells were treated (60 min and 24 h) with 100 nM All, fixed in 4% paraformaldehyde, stained with Hoechst (10 μg/ml) and observed using a confocal laser-scanning microscope (Leica SP5). The effect of All in the nuclear distribution of receptors was confirmed by WB

analysis. For WB, MES 23.5 cells plated onto 350 mm plastic dishes were transiently transfected with either cDNA (24 h) and then treated with 100 nM All for 24 h. Nuclear proteins from control and treated cells ( $n=4$ ) were obtained using the Nuclear Extract Kit (Active Motif, Carlsbad, CA, USA) and processed for WB analysis using antibodies against GFP/YFP (1:800; Life Technologies, Waltham, MA, USA; G10362) and HDAC2 (sc-56685; 1:800). Non-transfected cells were used as a negative control for the GFP/YFP antibody.

For the study of the cellular distribution of All, MES 23.5 cells were grown on glass coverslips and treated with 0.5 nmol/ml rhodamine-conjugated All (Phoenix Pharmaceuticals, Burlingame, CA, USA). After 3 h cells were fixed in 4% paraformaldehyde, stained with Hoechst (10  $\mu$ g/ml) and observed by confocal microscopy.

**Isolation of fresh intact nuclei.** Fresh intact nuclei were isolated and purified from rat or mice brains and from the MES 23.5 cell line. Rats or mice were killed by decapitation, and brains were quickly removed. All isolation procedures were performed on ice or at 4 °C. Brains were rinsed with ice-cold isolation buffer A containing 320 mM sucrose, 3 mM MgCl<sub>2</sub> and 20 mM Tris, pH 7.4. Brain pieces or MES 23.5 cells were homogenized in buffer A using a glass homogenizer. Homogenates were centrifuged at 1000  $\times$  g for 15 min at 4 °C. Supernatants were removed and pellets were resuspended in 4 ml buffer B (2.2 M sucrose, 1 mM MgCl<sub>2</sub> and 10 mM Tris, pH 7.4) and differentially centrifuged at 60 000  $\times$  g for 60 min (Beckman XL-90 ultracentrifuge, Brea, CA, USA) using a swing out rotor at 4 °C. After centrifugation, the pellet containing the isolated nuclei was resuspended and washed by centrifugation in 2 ml buffer A. Protein content in isolated nuclei was determined using the Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Fremont, CA, USA). To confirm their integrity, fresh isolated nuclei were visualized without fixation on a phase-contrast microscope immediately after isolation. Nuclei were also stained on glass coverslips with the fluorescent nuclear marker Hoechst 33342 (10  $\mu$ g/ml, Sigma), and examined using an inverted fluorescence microscope (Nikon Eclipse TE300, Tokyo, Japan). For WB analysis, isolated nuclei were processed using the Nuclear Extract Kit to remove DNA and conserve only the nuclear proteins.

**Effects of All on *in vitro* transcription of mRNAs.** The effects of All on mRNA transcription in isolated nuclei were studied using a standard *in vitro* RNA transcription system (Promega, Madison, WI, USA). Freshly isolated nuclei (100  $\mu$ g) were first stimulated with 100 nM All for 30 min at 37 °C. To determine the possible mechanism involved in RNA transcription in response to All stimulation, nuclei were pre-treated with All in the presence of the AT1 receptor antagonist losartan (3  $\mu$ M), the antioxidant NAC (0.5 mM), the NOX inhibitor DPI (5  $\mu$ M) or the IP3 receptor blocker 2-APB (50  $\mu$ M). Pre-treated nuclei were then incubated with an *in vitro* RNA transcription system consisting of 500  $\mu$ M ATP, GTP and UTP; and 2 U/ml RNasin in transcription buffer (Promega) at 37 °C for 1 h. After incubation, RNA was extracted using Trizol (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. The concentration of RNA was estimated using a Nanoquant plate and an Infinite M200 multiwell plate reader (Tecan, Infinite M200, Salzburg, Austria). Total RNA (1  $\mu$ g) was reverse-transcribed to cDNA with deoxynucleotide triphosphate, random primers and Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (200 U; Invitrogen). Real-time PCR was performed to evaluate the relative levels of mRNA for several genes. Experiments were performed using a real-time iCycler PCR platform (Bio-Rad). GAPDH and  $\beta$ -actin were used as housekeeping genes and were amplified in parallel with the genes of interest. Data were evaluated by the delta-delta Ct method ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ), where Ct is the cycle threshold. The expression of each gene was obtained as relative to the housekeeping transcripts. Forward (F) and reverse (R) primers were designed for each gene using C software (PREMIER Biosoft, Palo Alto, CA, USA) (Supplementary Table S1).

**Measurement of intranuclear ROS, calcium and NO levels.** To study the role of All receptors in nuclear ROS generation, isolated nuclei from MES 23.5 cells and rat or mice brains were assayed for ROS production using the fluorescent dye dihydroethidium (DHE; Sigma). In the presence of ROS DHE is oxidized to ethidium, which binds to DNA and stains nuclei with bright red fluorescence. Isolated nuclei (15  $\mu$ g) were treated with 100 nM All alone or combined with the receptor antagonists losartan (3  $\mu$ M) or PD123319 (1  $\mu$ M), the antioxidant NAC (0.5 mM) or the NOX inhibitor DPI (5  $\mu$ M). The fluorescent dye DHE was added to the nuclei at a final concentration of 0.1 mM in a fresh working solution containing 1 mM NADPH, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM Tris and 320 mM sucrose, pH 7.40. Fluorescence was measured for 1 h at 37 °C (excitation/emission

wavelength = 535 nm/610 nm) using a fluorescent plate reader (Tecan, Infinite M200).

Calcium levels were estimated in isolated nuclei using the ratiometric calcium indicator Fura-2/AM (Molecular Probes). After isolation, brain nuclei were resuspended in 0.5 ml buffer containing 25 mM HEPES, 100 mM KCl, 2 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> and 4 mM MgCl<sub>2</sub>. Fura-2/AM (5  $\mu$ M) was added to the nuclear suspension and incubated for 45 min at 37 °C. Nuclei were washed twice by centrifugation at 2500  $\times$  g for 5 min at RT to remove non-incorporated Fura-2/AM and resuspended in buffer containing 800 nM CaCl<sub>2</sub>. Calcium levels were estimated after treatment with 100 nM All or All+losartan (3  $\mu$ M) in a spectrofluorimeter (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA). Fluorescence emission was detected at 509 nm and was expressed as the ratio of the two excitation wavelengths (340/380). Ca<sup>2+</sup> concentrations were estimated by calibrating the fluorescent signal by sequential addition of 0.01% Triton and 1 mM CaCl<sub>2</sub> and 4 mM EGTA to obtain the minimum fluorescence ratio. Data were normalized to the values of the control group (100%) to counteract possible variability among assays.

Nuclear NO production was estimated using the fluorescent dye 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein diacetate (DAF, Sigma). Isolated nuclei from rat brain were pre-incubated with 10  $\mu$ M DAF in buffer containing 140 mM NaCl, 14 mM glucose, 4.7 mM KCl, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.8 mM MgSO<sub>4</sub>, 1.8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> and 100  $\mu$ M L-arginine, pH 7.4 for 30 min at 37 °C. Nuclei were washed to remove any unbound dye and then incubated with 100 nM All in the presence of losartan (3  $\mu$ M), PD123,319 (1  $\mu$ M), the NOS inhibitor L-NAME (50  $\mu$ M, Sigma) or buffer alone. DAF fluorescence was measured using an Infinite M200 multiwell plate reader (Tecan) at 488 and 510 nm wavelengths (excitation and emission, respectively). NO values were expressed as percentage of the corresponding controls.

**Statistical analysis.** All data were obtained from at least three independent experiments and were expressed as mean values  $\pm$  S.E.M. Two-group comparisons were analyzed using Student's *t*-test while multiple comparisons were analyzed using one-way ANOVA followed by *post hoc* Holm-Sidak test. Normality of populations and homogeneity of variances were tested before each ANOVA. Differences were considered significant at  $P < 0.05$ . Statistical analyses were carried out with SigmaStat 3.0 (Jandel Scientific; San Rafael, CA, USA).

### Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

**Acknowledgements.** We thank Dr. Wei-Dong Le for providing the MES 23.5 dopaminergic cell line, Dr. Manuel Serrano and Dr. Ruben Nogueiras for providing the transgenic mice overexpressing SIRT1, and Dr. Daniel Henrior for providing the AT2 KO mice. We thank Pilar Aldrey, Iria Novoa and Cristina Gianzo for their technical assistance. This study was funded by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (BFU2015-70523), Spanish Ministry of Health (RD12/0019/0020, RD16/0011/0016 and CIBERNED), Galician Government (XUGA, GRC2014/002 ED431G/05 and CIMUS accreditation 2016-2019) and FEDER (Regional European Development Fund).

### Author contributions

BV-C and MAC-B performed isolations of nuclei, WB, transfections, enzymatic activity determinations and other biochemical experiments. EP-C and MM-F performed electron microscopy experiments. RV and MAC-B performed cell cultures, confocal microscopy and immunohistochemical studies. JLL-G and BV-C conceived and supervised the whole study and wrote the manuscript. All authors edited the manuscript.

### Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

- Chabrashvili T, Kitiyakara C, Blau J, Karber A, Aslam S, Welch WJ et al. Effect of Ang II type 1 and 2 receptors on oxidative stress, renal NAD(P)H oxidase, and SOD expression. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003; **285**: R117-R124.
- Re RN. Tissue renin angiotensin systems. *Med Clin North Am* 2004; **88**: 19-38.
- Wright JW, Harding JW. The brain renin-angiotensin system: a diversity of functions and implications for CNS diseases. *Pflugers Arch* 2013; **465**: 133-151.

4. Labandeira-García JL, Garrido-Gil P, Rodríguez-Pallares J, Valenzuela R, Borrajo A, Rodríguez-Pérez AI. Brain renin-angiotensin system and dopaminergic cell vulnerability. *Front Neuroanat* 2014; **8**: 67.
5. Garrido-Gil P, Valenzuela R, Villar-Cheda B, Lanciego JL, Labandeira-García JL. Expression of angiotensinogen and receptors for angiotensin and prorenin in the monkey and human substantia nigra: an intracellular renin angiotensin system in the nigra. *Brain Struct Funct* 2013; **218**: 373–388.
6. Labandeira-García JL, Rodríguez-Pallares J, Dominguez-Mejide A, Valenzuela R, Villar-Cheda B, Rodríguez-Pérez AI. Dopamine-angiotensin interactions in the basal ganglia and their relevance for Parkinson's disease. *Mov Disord* 2013; **28**: 1337–1342.
7. Rodríguez-Pallares J, Rey P, Parga JA, Muñoz A, Guerra MJ, Labandeira-García JL. Brain angiotensin enhances dopaminergic cell death via microglial activation and NADPH-derived ROS. *Neurobiol Dis* 2008; **31**: 58–73.
8. Simonnet G, Giuguieff-Chesselet MF. Stimulating effect of angiotensin II on the spontaneous release of newly synthesized [3H] dopamine in rat striatal slices. *Neurosci Lett* 1979; **15**: 153–158.
9. Mendelsohn FA, Jenkins TA, Berkovic SF. Effects of angiotensin II on dopamine and serotonin turnover in the striatum of conscious rats. *Brain Res* 1993; **613**: 221–229.
10. Villar-Cheda B, Dominguez-Mejide A, Valenzuela R, Granado N, Moratalla R, Labandeira-García JL. Aging-related dysregulation of dopamine and angiotensin receptor interaction. *Neurobiol Aging* 2014; **35**: 1726–1738.
11. Dominguez-Mejide A, Villar-Cheda B, Garrido-Gil P, Sierra-Paredes G, Guerra MJ, Labandeira-García JL. Effect of chronic treatment with angiotensin type 1 receptor antagonists on striatal dopamine levels in normal rats and in a rat model of Parkinson's disease treated with L-DOPA. *Neuropharmacology* 2014; **76**: 156–168.
12. Martínez-Pinilla E, Rodríguez-Pérez AI, Navarro G, Aguinaga D, Moreno E, Lanciego JL et al. Dopamine D2 and angiotensin II type 1 receptors form functional heteromers in rat striatum. *Biochem Pharmacol* 2015; **96**: 131–142.
13. Grammatopoulos TN, Jones SM, Ahmadi FA, Hoover BR, Snell LD, Skoch J et al. Angiotensin type 1 receptor antagonist losartan, reduces MPTP-induced degeneration of dopaminergic neurons in substantia nigra. *Mol Neurodegener* 2007; **2**: 1.
14. Rey P, Lopez-Real A, Sanchez-Iglesias S, Muñoz A, Soto-Otero R, Labandeira-García JL. Angiotensin type-1-receptor antagonists reduce 6-hydroxydopamine toxicity for dopaminergic neurons. *Neurobiol Aging* 2007; **28**: 555–567.
15. Valenzuela R, Barroso-Chinea P, Muñoz A, Joglar B, Villar-Cheda B, Lanciego JL et al. Location of prorenin receptors in primate substantia nigra: effects on dopaminergic cell death. *J Neuropathol Exp Neurol* 2010; **69**: 1130–1142.
16. Zawada WM, Mrak RE, Biedermann J, Palmer QD, Gentleman SM, Aboud O et al. Loss of angiotensin II receptor expression in dopamine neurons in Parkinson's disease correlates with pathological progression and is accompanied by increases in Nox4- and 8-OH guanosine-related nucleic acid oxidation and caspase-3 activation. *Acta Neuropathol Commun* 2015; **3**: 9.
17. Valenzuela R, Costa-Besada MA, Iglesias-Gonzalez J, Perez-Costas E, Villar-Cheda B, Garrido-Gil P et al. Mitochondrial angiotensin receptors in dopaminergic neurons. Role in cell protection and aging-related vulnerability to neurodegeneration. *Cell Death Dis* 2016; **7**: e2427.
18. Cook JL, Re RN. Lessons from in vitro studies and a related intracellular angiotensin II transgenic mouse model. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2012; **302**: R482–R493.
19. Re RN, Cook JL. Studies of Intracellular Angiotensin II. *Methods Mol Biol* 2015; **1234**: 1–8.
20. Thekkumkara T, Linas SL. Role of internalization in AT(1A) receptor function in proximal tubule epithelium. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002; **282**: F623–F629.
21. Ullian ME, Linas SL. Role of receptor cycling in the regulation of angiotensin II surface receptor number and angiotensin II uptake in rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1989; **84**: 840–846.
22. Hunyady L. Molecular mechanisms of angiotensin II receptor internalization. *J Am Soc Nephrol* 1999; **10**: S47–S56.
23. Tadevosyan A, Maguy A, Villeneuve LR, Babin J, Bonnefoy A, Allen BG et al. Nuclear-delimited angiotensin receptor-mediated signaling regulates cardiomyocyte gene expression. *J Biol Chem* 2010; **285**: 22338–22349.
24. Gwathmey TM, Shaltout HA, Rose JC, Diz DI, Chappell MC. Glucocorticoid-induced fetal programming alters the functional complement of angiotensin receptor subtypes within the kidney. *Hypertension* 2011; **57**: 620–626.
25. Carey RM. Functional intracellular renin-angiotensin systems: potential for pathophysiology of disease. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2012; **302**: R479–R481.
26. Villar-Cheda B, Rodríguez-Pallares J, Valenzuela R, Muñoz A, Guerra MJ, Baltatu OC 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**: 1695–1706.
27. Padiá SH, Carey RM. AT2 receptors: beneficial counter-regulatory role in cardiovascular and renal function. *Pflugers Arch* 2013; **465**: 99–110.
28. Wang G, Coleman CG, Glass MJ, Zhou P, Yu Q, Park L et al. Angiotensin II type 2 receptor-coupled nitric oxide production modulates free radical availability and voltage-gated Ca<sup>2+</sup> currents in NTS neurons. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2012; **302**: R1076–R1083.
29. Scarpulla RC. Nuclear control of respiratory chain expression by nuclear respiratory factors and PGC-1-related coactivator. *Ann N Y Acad Sci* 2008; **1147**: 321–334.
30. Finley LW, Haigis MC. The coordination of nuclear and mitochondrial communication during aging and calorie restriction. *Ageing Res Rev* 2009; **8**: 173–188.
31. Tang BL. Sirt1 and the Mitochondria. *Mol Cells* 2016; **39**: 87–95.
32. St-Pierre J, Drori S, Uldry M, Silvaggi JM, Rhee J, Jäger S et al. Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators. *Cell* 2006; **127**: 397–408.
33. Ciron C, Zheng L, Bobela W, Knott GW, Leone TC, Kelly DP et al. PGC-1 $\alpha$  activity in nigral dopamine neurons determines vulnerability to  $\alpha$ -synuclein. *Acta Neuropathol Commun* 2015; **3**.
34. Jiang H, Kang SU, Zhang S, Karuppagounder S, Xu J, Lee YK et al. Adult conditional knockout of PGC-1 $\alpha$  leads to loss of dopamine neurons. *eNeuro* 2016; **3**: ENEURO.0183–162016.
35. Zheng B, Liao Z, Locascio JJ, Lesniak KA, Roderick SS, Watt ML et al. PGC-1 $\alpha$ , a potential therapeutic target for early intervention in Parkinson's disease. *Sci Transl Med* 2010; **2**: 52ra73.
36. Mudò G, Mäkelä J, Di Liberto V, Tselikh TV, Olivieri M, Piepponen P et al. Transgenic expression and activation of PGC-1 $\alpha$  protect dopaminergic neurons in the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Cell Mol Life Sci* 2012; **69**: 1153–1165.
37. Borniquel S, Valle I, Cadenas S, Lamas S, Monsalve M. Nitric oxide regulates mitochondrial oxidative stress protection via the transcriptional coactivator PGC-1 $\alpha$ . *FASEB J* 2006; **20**: 1889–1891.
38. Diaz-Ruiz C, Rodríguez-Pérez AI, Beiroa D, Rodríguez-Pallares J, Labandeira-García JL. Reciprocal regulation between sirtuin-1 and angiotensin-II in the substantia nigra: implications for aging and neurodegeneration. *Oncotarget* 2015; **6**: 26675–26689.
39. Rodríguez-Pérez AI, Borrajo A, Diaz-Ruiz C, Garrido-Gil P, Labandeira-García JL. Crosstalk between insulin-like growth factor-1 and angiotensin-II in dopaminergic neurons and glial cells: role in neuroinflammation and aging. *Oncotarget* 2016; **7**: 30049–30067.
40. Quesada A, Romeo HE, Micevych P. Distribution and localization patterns of estrogen receptor-beta and insulin-like growth factor-1 receptors in neurons and glial cells of the female rat substantia nigra: localization of ERbeta and IGF-1R in substantia nigra. *J Comp Neurol* 2007; **503**: 198–208.
41. Offen D, Shtaf B, Hadad D, Weizman A, Melamed E, Gil-Ad I. Protective effect of insulin-like growth-factor-1 against dopamine-induced neurotoxicity in human and rodent neuronal cultures: possible implications for Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 2001; **316**: 129–132.
42. Kao SY. Rescue of alpha-synuclein cytotoxicity by insulin-like growth factors. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; **385**: 434–438.
43. Sádaba MC, Martín-Estal I, Puche JE, Castilla-Cortázar I. Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) therapy: Mitochondrial dysfunction and diseases. *Biochim Biophys Acta* 2016; **1862**: 1267–1278.
44. Puche JE, García-Fernández M, Muntané J, Rioja J, González-Barón S, Castilla-Cortázar I. Low doses of insulin-like growth factor-I induce mitochondrial protection in aging rats. *Endocrinology* 2008; **149**: 2620–2627.
45. Vinciguerra M, Santini MP, Claycomb WC, Ladurner AG, Rosenthal N. Local IGF-1 isoform protects cardiomyocytes from hypertrophic and oxidative stresses via Sirt1 activity. *Aging (Albany NY)* 2009; **2**: 43–62.
46. Tanno M, Kuno A, Yano T, Miura T, Hisahara S, Ishikawa S et al. Induction of manganese superoxide dismutase by nuclear translocation and activation of SIRT1 promotes cell survival in chronic heart failure. *J Biol Chem* 2010; **285**: 8375–8382.
47. Yuan Y, Cruzat VF, Newsholme P, Cheng J, Chen Y, Lu Y. Regulation of SIRT1 in aging: Roles in mitochondrial function and biogenesis. *Mech Ageing Dev* 2016; **155**: 10–21.
48. Gurd BJ, Yoshida Y, Lally J, Holloway GP, Bonen A. The deacetylase enzyme SIRT1 is not associated with oxidative capacity in rat heart and skeletal muscle and its overexpression reduces mitochondrial biogenesis. *J Physiol* 2009; **587**: 1817–1828.
49. Bezin S, Charpentier G, Lee HC, Baux G, Fossier P, Cancela JM. Regulation of nuclear Ca<sup>2+</sup> signaling by translocation of the Ca<sup>2+</sup> messenger synthesizing enzyme ADP-ribosyl cyclase during neuronal depolarization. *J Biol Chem* 2008; **283**: 27859–27870.
50. Kusnier C, Cárdenas C, Hidalgo J, Jaimovich E. Single-channel recording of inositol trisphosphate receptor in the isolated nucleus of a muscle cell line. *Biol Res* 2006; **39**: 541–553.
51. Carrión AM, Link WA, Ledo F, Mellström B, Naranjo JR. DREAM is a Ca<sup>2+</sup>-regulated transcriptional repressor. *Nature* 1999; **398**: 80–84.
52. Chawla S. Regulation of gene expression by Ca<sup>2+</sup> signals in neuronal cells. *Eur J Pharmacol* 2002; **447**: 131–140.
53. Hoshino H, Kobayashi A, Yoshida M, Kudo N, Oyake T, Motohashi H et al. Oxidative stress abolishes leptomycin B-sensitive nuclear export of transcription repressor Bach2 that counteracts activation of Maf recognition element. *J Biol Chem* 2000; **275**: 15370–15376.
54. Yun J, Finkel T. Mitohormesis. *Cell Metab* 2014; **19**: 757–766.
55. Villar-Cheda B, Valenzuela R, Rodríguez-Pérez AI, Guerra MJ, Labandeira-García JL. Aging-related changes in the nigral angiotensin system enhances proinflammatory and oxidative markers and 6-OHDA-induced dopaminergic degeneration. *Neurobiol Aging* 2012; **33**: 204e1–204e11.
56. Rodríguez-Pérez AI, Valenzuela R, Villar-Cheda B, Guerra MJ, Labandeira-García JL. Different dopaminergic neuroprotection of hormonal replacement therapy in young and aged menopausal rats. Role of the brain angiotensin system. *Brain* 2012; **135**: 124–138.

57. Cook JL, Zhang Z, Re RN. In vitro evidence for an intracellular site of angiotensin action. *Circ Res* 2001; **89**: 1138–1146.
58. Pfluger PT, Herranz D, Velasco-Miguel S, Serrano M, Tschöp MH. Sirt1 protects against high-fat diet-induced metabolic damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; **105**: 9793–9798.
59. Giles ME, Fernley RT, Nakamura Y, Moeller I, Aldred GP, Ferraro T *et al*. Characterization of a specific antibody to the rat angiotensin II AT1 receptor. *J Histochem Cytochem* 1999; **47**: 507–516.
60. Obermüller N, Gentili M, Gauer S, Gretz N, Weigel M, Geiger H *et al*. Immunohistochemical and mRNA localization of the angiotensin II receptor subtype 2 (AT2); in follicular granulosa cells of the rat ovary. *J Histochem Cytochem* 2004; **52**: 545–548.
61. Rodríguez-Perez AI, Valenzuela R, Villar-Cheda B, Guerra MJ, Lanciego JL, Labandeira-Garcia JL. Estrogen and angiotensin interaction in the substantia nigra. Relevance to postmenopausal Parkinson's disease. *Exp Neurol* 2010; **224**: 517–526.



*Cell Death and Disease* is an open-access journal published by *Nature Publishing Group*. This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

© The Author(s) 2017

Supplementary Information accompanies this paper on *Cell Death and Disease* website (<http://www.nature.com/cddis>)



# Paracrine and Intracrine Angiotensin 1-7/Mas Receptor Axis in the Substantia Nigra of Rodents, Monkeys, and Humans

Maria A. Costa-Besada<sup>1,2</sup> · Rita Valenzuela<sup>1,2</sup> · Pablo Garrido-Gil<sup>1,2</sup> · Begoña Villar-Cheda<sup>1,2</sup> · Juan A. Parga<sup>1,2</sup> · Jose L. Lanciego<sup>2,3</sup> · Jose L. Labandeira-Garcia<sup>1,2</sup>

Received: 12 August 2017 / Accepted: 17 October 2017  
© Springer Science+Business Media, LLC 2017

**Abstract** In addition to the classical hormonal (tissue-to-tissue) renin-angiotensin system (RAS), there are a paracrine (cell-to-cell) and an intracrine (intracellular/nuclear) RAS. A local paracrine brain RAS has been associated with several brain disorders, including Parkinson's disease (PD). Classically, angiotensin II (Ang II) is the main RAS effector peptide and acts through two major receptors: Ang II type 1 and 2 (AT1 and AT2) receptors. It has been shown that enhanced activation of the Ang II/AT1 axis exacerbates dopaminergic cell death. Several new components of the RAS have more recently been discovered. However, the role of new Ang 1-7/Mas receptor RAS component was not investigated in the brain and particularly in the dopaminergic system. In the present study, we observed Mas receptor labeling in dopaminergic neurons and glial cells in rat mesencephalic primary cultures; substantia nigra of rats, monkeys, and humans; and human induced pluripotent stem (iPS) cells derived from healthy controls and sporadic PD patients. The present data support a neuroprotective role of the Ang 1-7/Mas receptor axis in the dopaminergic system. We observed that this axis is downregulated with aging, which may contribute to the aging-related vulnerability to neurodegeneration. We have also identified an

intracellular Ang 1-7/Mas axis that modulates mitochondrial and nuclear levels of superoxide. The present data suggest that nuclear RAS receptors regulate the adequate balance between the detrimental and the protective arms of the cell RAS. The results further support that the brain RAS should be taken into account for the design of new therapeutic strategies for PD.

**Keywords** Aging · Dopaminergic · Neuroprotection · Nuclear receptors · Parkinson's disease · Renin-angiotensin system

## Introduction

It is now known that in addition to the classical hormonal (tissue-to-tissue) renin-angiotensin system (RAS), there are a paracrine (cell-to-cell) and an intracrine (intracellular/nuclear) RAS. Over the last two decades, all components of the classic RAS have been identified in the brain. Initially, the brain RAS was associated with brain areas involved in the central control of blood pressure. More recently, several studies have shown local RAS in many brain regions and their involvement in several brain disorders, including neurodegenerative diseases such as Parkinson's disease (PD). We have revealed the presence of a local RAS in the substantia nigra (SN) and striatum of rodents and primates, including humans [1–3]. Classically, angiotensin II (Ang II) is the main RAS effector peptide and acts through two major receptors: Ang II type 1 and 2 (AT1 and AT2) receptors [4–6]. Ang II is formed by the action of renin and angiotensin converting enzyme (ACE) on the precursor glycoprotein angiotensinogen. In several animal models of parkinsonism, we have investigated the possible role of the brain RAS in dopaminergic degeneration, and we have demonstrated that enhanced activation of the Ang II/AT1 axis exacerbates dopaminergic cell death [7, 8]. Other studies

Maria A. Costa-Besada and Rita Valenzuela contributed equally to this work.

✉ Jose L. Labandeira-Garcia  
joseluis.labandeira@usc.es

<sup>1</sup> Laboratory of Neuroanatomy and Experimental Neurology, Dept. of Morphological Sciences, CIMUS, Faculty of Medicine, University of Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, Spain

<sup>2</sup> Networking Research Center on Neurodegenerative Diseases (CIBERNED), Madrid, Spain

<sup>3</sup> Neurosciences Division, CIMA, University of Navarra, Pamplona, Spain

also support the involvement of brain RAS in dopaminergic degeneration [9–11]. Furthermore, AT2 receptors have been shown to exert effects opposed to those mediated by Ang II via AT1 receptors [9, 12].

In addition to the above mentioned classical effects via AT1 and AT2 receptors, other components mediate the actions of the RAS, such as (pro)renin receptors (PRR) and other angiotensin-derived peptides, being Ang 1-7 particularly interesting. Ang 1-7 is a heptapeptide which is formed from angiotensin I (Ang I) or Ang II by angiotensin converting enzyme 2 (ACE2). The seven-transmembrane G protein-couple receptor Mas is the main receptor for Ang 1-7 [13]. Recently, two different RAS arms have been postulated: a detrimental (i.e., pro-oxidative, pro-inflammatory) arm constituted by the Ang II/AT1 axis and the (Pro)renin/PRR axis and a protective axis constituted by the Ang II/AT2 axis and the Ang 1-7/Mas receptor axis [14, 15]. A few years ago, we described for the first time PRR in nigral dopaminergic neurons and microglial cells in rats, monkeys and humans [1, 2, 16]. However, nothing is known about the protective axis Ang 1-7/Mas receptor in the dopaminergic system. Moreover, we have recently observed the existence of a functional intracrine RAS, in mitochondria and nuclei from rat ventral mesencephalon and dopaminergic cell cultures [17, 18]. However, the possible existence and functional role of an intracellular Ang 1-7/Mas axis remains to be investigated. In the present study, we investigated the presence of major components of the Ang 1-7/Mas receptor axis in the dopaminergic system of different animal and cellular models, including human SN and human-induced pluripotent stem cells (iPSCs). We also studied the possible effects of aging and the interactions between Mas and AT1 and AT2 receptors using knockout (KO) mice. Finally, we investigated the presence and functional effects of an intracellular Ang 1-7/Mas axis, particularly at the mitochondrial and nuclear level.

## Materials and Methods

### Experimental Design

In a first series of experiments, primary cultures from the rat nigral region, cultures of dopaminergic neurons derived from human iPSCs, dopaminergic neuron, astrocytic and microglial cell lines, and brain sections from adult male rats, monkeys, and humans containing SN were used to demonstrate the presence of the angiotensin 1-7 (Ang 1-7) receptor Mas using immunofluorescence. In addition, the localization of Mas receptors in dopaminergic neurons isolated from rat SN was confirmed by laser capture microdissection (LCM) and RT-PCR or droplet digital PCR (ddPCR). Experiments using human-derived cells were approved by the corresponding committees of the Spanish Advisory Committee for Human

Tissue and Cell Donation and Use and of the University of Santiago de Compostela and authorized by the local government. The human postmortem samples were obtained from the Neurological Brain Bank of Navarra (Hospital of Navarra, Pamplona, Spain). Brains were dissected at autopsy from donors who had given informed consent in accordance with the Brain Donation Program of the Government of Navarra (Government directive 23/2001). The samples were obtained from four adult men ( $33.75 \pm 6.4$  years old) with no history or histological findings supporting any neurological disease. Following autopsy, brain slices including ventral mesencephalon were obtained, immediately frozen at  $-80$  °C, and stored until processing. Postmortem times varied from 2.5 to 6 h. Nonhuman primate tissue was obtained from three adult male cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) (4.5–5 years old; body weight ranging from 3.8 to 4.5 kg). Animal handling was conducted in accordance with European Council Directive 86/609/EEC and with the Society for Neuroscience Policy on the Use of Animals in Neuroscience Research. The experimental design for monkey experiments was approved by the Ethical Committee for Animal Testing of the University of Navarra (ref: 019/2008) as well as by the Department of Health of the Government of Navarra (ref: NA-UNAV-04-08). Rodent experiments were carried out in accordance with the Directive 2010/63/EU and Directive 86/609/CEE and the Spanish RD/53/2013 and were approved by the corresponding committee at the University of Santiago de Compostela. Animals were housed at constant room temperature (RT) ( $21$ – $22$  °C) and 12-h light/dark cycle. All surgery was performed under ketamine/xylazine anesthesia.

In a second series of experiments, SN from young adult (2–3 month old,  $N = 10$ ) and aged (18–20 month old,  $N = 10$ ) male rats and wild-type (WT) C57BL-6 mice (Charles River, L'Arbresle, France,  $N = 18$ ) were analyzed. All animals used in the present study were males, as it was previously demonstrated that estrogen regulates RAS and contributes to gender differences in dopaminergic degeneration observed in animal models or epidemiological data of PD [19–21]. The number of samples from different animals used in each experiment ( $n$ ) is detailed at corresponding figure legends. We used Western blot (WB), RT-PCR, and enzymatic activity to investigate the effect of aging on the Ang 1-7/Mas receptor axis (Mas receptor expression, ACE2 expression and activity, and Ang 1-7 levels). In addition, homozygous C57BL-6 mice deficient for AT1a (the major mouse AT1 isoform and the closest murine homolog to the single human AT1; Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA,  $N = 10$ ) and homozygous C57BL-6 mice deficient for AT2 receptors (gift of Dr. Daniel Henrion,  $N = 10$ ) were analyzed by WB, RT-PCR, and enzymatic activity to investigate the effect of Ang II receptor deficiency on the Ang 1-7/Mas receptor axis.

In a third series of experiments, cultures of the dopaminergic N27 (SCC048, Millipore, MA, USA), astrocytic C6

(92090409, Sigma, MO, USA), and microglial N9 (provided by Dr. Paola Ricciardi-Castagnoli, Singapore Immunology Network, Agency for Science, Technology and Research, Singapore) cell lines were immunolabeled with Mas receptor antibody to investigate co-localization with mitochondrial and nuclear markers. In addition, pure isolated mitochondria and nuclei from the nigral region of rat were used to confirm the expression of Ang 1-7 and Mas receptors in mitochondria and nuclei. Mitochondria and nuclei isolated from rat brain were used to investigate the ability of Ang 1-7/Mas receptor axis to modulate mitochondrial and nuclear reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide (NO) production. For this purpose, mitochondria or nuclei were incubated with different compounds to assess the effects of Mas receptor activation on ROS and NO production.

### Mesencephalic Primary Cultures and Cell Line Cultures

Ventral mesencephalic tissue was dissected from rat embryos of 14 days of gestation (E14). The tissue was incubated in 0.1% trypsin (Sigma, St. Louis, MO, USA), 0.05% DNase (Sigma) and DMEM (Invitrogen, Paisley, Scotland, UK) for 20 min at 37 °C, and was then washed in DNase/DMEM and mechanically dissociated. The resulting cell suspension was centrifuged at 50×g for 5 min, the supernatant was carefully removed, and the pellet resuspended in 0.05% DNase/DMEM to the final volume required. The number of viable cells in the suspension was estimated with acridine orange/ethidium bromide. Cells were plated onto 35-mm culture dishes (Falcon; Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) previously coated with poly-L-lysine (100 µg/ml; Sigma) and laminin (4 µg/ml; Sigma). The cells were seeded at a density of  $1.5 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup> and maintained under control conditions (DMEM/HAMS F12/(1:1) containing 10% fetal bovine serum (FBS; Biochrom KG, Berlin, Germany). The cell cultures were maintained in a humidified CO<sub>2</sub> incubator (5% CO<sub>2</sub>; 37 °C) for 8 days in vitro (DIV); the entire culture medium was removed on day 2 and replaced with a fresh culture medium.

The C6 astroglial cells (Sigma) were cultured in Ham's F12 medium with 10% FBS, 2 mM L-glutamine (Sigma), 100 U/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin. The N9 microglial cells were cultured in a Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI 1640; Invitrogen) supplemented with 10% FBS, 2 mM L-glutamine (Sigma), 100 U/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin. The N27 dopaminergic neuron cell line was cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FBS, 2 mM L-glutamine (Sigma), 100 U/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin. Cultures were maintained at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> in a humidified incubator. Cells were then plated onto 35-mm culture dishes and/or eight-well plates for treatment and/or analysis.

### Human Pluripotent Stem Cell-Derived Dopaminergic Cultures

Human iPSC lines SP11#1 and SP08#1, previously derived and characterized [22], were obtained from the Spanish National Bank of Cell Lines (Banco Nacional de Lineas Celulares (BNLC)). Undifferentiated pluripotent stem cells were expanded in feeder-free conditions as previously described [23]. Dopaminergic cells were obtained by stepwise differentiation of the pluripotent stem cells as described previously [24]. Briefly, iPSC colonies were dissociated and single cells plated in Matrigel-coated plates. SB431542 (10 µM; Tocris) and LDN193189 (100 nM; Sigma) were used for inducing neural differentiation. FGF-8 (50 ng/ml; PeproTech), SHH (100 ng/ml; Miltenyi Biotec), and purmorphamine (2 µM; Tocris) were used as patterning factors starting on day 1 and CHIR99021 (3 µM; Sigma) from day 3. Maturation started on day 11 by changing the medium to neurobasal with B27 (Thermo Fisher Scientific), ascorbic acid (Sigma), dibutyl cAMP (Sigma), DAPT (Sigma), neurotrophic factors BDNF (PeproTech), GDNF (PeproTech), and TGFβ (PeproTech). Thirteen days after the beginning of differentiation, the cells were passaged onto polyornithine/fibronectin/laminin (Sigma) coated glass coverslips in 12-well plates where the cells completed their maturation before fixing and processing for immunofluorescent labeling.

### Double Immunofluorescent Labeling

Double immunofluorescent labeling was performed in fixed cellular cultures (primary mesencephalic cultures, iPSCs and C6, and N27 and N9 cell lines) and brain tissue (rat, monkey, and human tissue) to identify which type of cells expressed Mas receptor. Rats and monkeys were anesthetized and perfused transcardially with a fixative solution containing 4% paraformaldehyde in 0.125 M PB, pH 7.4. Once perfusion was completed, the skull was opened, and the brain was removed and stored for 48 h in a cryoprotectant solution. Human brain blocks including the mesencephalon were fixed by immersion in phosphate-buffered 4% paraformaldehyde for 24 h and cryoprotected for 48 h. Coronal tissue sections (40-µm thick) were then cut with a sliding microtome and collected in cryoprotectant solution. Sections at different rostrocaudal levels of the SN were processed for double immunofluorescence for tyrosine hydroxylase (TH) and Mas receptor. Neuromelanin granules co-localized with TH in human SN sections and were also used as confirmatory markers of dopaminergic neurons. Free-floating tissue sections containing SN were pre-incubated in KPBS-1% BSA with 5% normal donkey serum (Sigma) and 0.03% Triton X-100 for 60 min at RT. Antigen retrieval was required for human SN sections. Tissue sections were then incubated overnight at 4 °C in primary antibodies raised against Mas receptor

(1:100; AAR-013, Alomone) and TH (1:5000; mouse monoclonal; T2928, Sigma) diluted in KPBS-1% BSA with 5% normal donkey serum and 0.3% Triton X-100. As several commercial antibodies against G-protein-coupled receptors have problems of specificity, we selected the Mas receptor antibody AAR-013 (Alomone) because its specificity has been demonstrated in previous studies that showed the absence of immunoreactivity in brain tissue from Mas receptor KO mice [25]. The immunoreaction was visualized with the following fluorescent secondary antibodies: Alexa Fluor 568-conjugated donkey anti-rabbit IgG (1:200; Molecular Probes) and Alexa Fluor 488-conjugated donkey anti-mouse IgG (1:200; Molecular Probes). Finally, tissue sections were mounted on gelatin-coated slides and coverslipped with Immumount (Thermo-Shandon).

Cultures grown on glass coverslips were co-incubated overnight at 4 °C with different cell markers and a rabbit polyclonal Mas receptor antibody (AAR-013, Alomone, 1:100). Different cell types were identified with the corresponding mouse monoclonal antibodies: anti-NeuN (Millipore, 1:500) as neuronal marker, anti-TH (Sigma; 1:5000) as dopaminergic marker, anti-gial fibrillary acidic protein (GFAP, Millipore, 1:500) as astrocyte marker, or anti-CD11b (complement receptor-3, clone MRC OX42, Serotec; 1:50) as microglial marker. Primary antibodies were diluted in DPBS containing 1% BSA and 2% normal donkey serum. Subsequently, the following fluorescent secondary antibodies were incubated for 2 h at RT: Alexa Fluor 568-conjugated donkey anti-rabbit IgG (1:200; Molecular Probes) or Alexa Fluor 488-conjugated donkey anti-mouse IgG (1:200; Molecular Probes). Cell nuclei were marked with the DNA-binding dye Hoechst 33342 (10 µg/ml, Sigma) for 30 min at RT. Finally, mounting was performed with Immumount (Thermo-Shandon).

Both in sections and in cultures, co-localization of markers was confirmed by confocal laser microscopy (AOBS-SP5X; Leica Microsystems Heidelberg GmbH, Mannheim, Germany) performing sequential scan to avoid any potential overlap. Co-localization percentage rates were calculated for the cell region of interest (ROI) with the LAS AF software (Leica Microsystems GmbH).

### Mitochondrial and Nuclear Labeling

In order to study the presence of Mas receptor at mitochondrial and nuclear level, different cell line cultures were grown on glass coverslips and incubated with the fluorescent probes for mitochondria or nuclei. MitoTracker Deep Red (MTDR; 20 nM; Molecular Probes) was used for mitochondrial labeling and the DNA-binding dye Hoechst 33342 for nuclear labeling. After labeling, the cells were fixed and immunoreacted for the rabbit polyclonal Mas receptor antibody (AAR-013, Alomone, 1:100).

### Laser Capture Microdissection

Individual dopaminergic neurons were isolated from rat SN sections using a LCM method, as previously described [26] with slight modifications. Briefly, rats were sacrificed by decapitation, brains were removed, immediately embedded in O.C.T. (Tissue-Tek), frozen in liquid nitrogen, and stored at -80 °C. Serial coronal sections (20-µm thick) containing the SN were cut on a cryotome, mounted on RNase-free glass slides, and stored at -80 °C in sterile Falcon tubes containing silica gel until further processing. Then, series of SN sections were processed for a rapid immunofluorescence method with an antibody against TH (Sigma; 1:100) as a dopaminergic marker. LCM was performed using a PALM MicroBeam system (Zeiss), and isolated dopaminergic neurons were catapulted into an adhesive cap. Neuronal cell pools (1000 dopaminergic neurons per animal;  $n = 4$ ) were used for total RNA extraction using the RNeasy Micro Kit (Qiagen) in accordance with the manufacturer's instructions.

### Detection of Ang 1-7 in Rat and Mouse Ventral Mesencephalon and Isolated Mitochondria

The Sep-Pak columns (Oasis HLB 1cc, WAT094225) were used for the separation of angiotensin peptides. SN from rat and mice ventral mesencephalon were homogenized with the use of a polytron homogenizer. Simultaneously, rat SN isolated mitochondria were diluted with Milli-Q water. Samples were heated at 96 °C for 15 min and acidified with heptafluorobutyric acid (HFBA) to a final concentration of 0.1%, sonicated and centrifuged at 20000×g for 20 min at 4 °C. The supernatants were applied to a pre-conditioned column with 1 ml of methanol and deionized water, and then, the columns were washed with 1 ml of 0.1% HFBA in deionized water. Angiotensin peptides were eluted with 1 ml of methanol in 0.1% of HFBA and dried in a vacuum concentrator (Savant ISS110). Dried samples ( $n = 5$ ) were resuspended in Milli-Q water, and Ang 1-7 content was analyzed by a competitive Ang 1-7 EIA kit (LSBio, LS-F10589) following the manufacturer's specifications.

### Western Blot Analysis

Tissue from rat and mouse ventral midbrain was lysed in RIPA buffer containing protease inhibitor cocktail (Sigma) and PMSF (Sigma). Lysates were centrifuged and proteins were quantified using the Pierce BCA Protein Assay kit (Thermo Scientific). Equal amount of protein lysates, isolated mitochondria, and nuclei was separated on a 10% Bis-Tris polyacrylamide gel and transferred to nitrocellulose membranes. Membranes were incubated overnight with primary antibodies against the Mas receptor (AAR-013; 1:1000) from Alomone (see previous section for specificity) and angiotensin

converting enzyme 2 (ACE2; ab108252; 1:1000) from Abcam. Blots were reprobbed with anti-GAPDH (G9545; 1:50,000, Sigma) as a loading control. The membranes were incubated with the following HRP-conjugated secondary antibodies: goat anti-rabbit (1:2500) and goat anti-mouse (1:2500) from Santa Cruz Biotechnology. Immunoreactive bands were detected with an Immun-Star HRP Chemiluminescent Kit (170-5044; Bio-Rad) and visualized with a chemiluminescence detection system (Molecular Imager ChemiDoc XRS System; Bio-Rad). The data were then expressed relative to the value obtained for the control (100%) to counteract possible variability among batches. Finally, the results were expressed as means  $\pm$  SEM.

### RNA Extraction and Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction

Total RNA from rat or mouse SN or brain isolated nuclei were extracted with TRIzol (Invitrogen, Paisley, UK) according to the manufacturer's instructions. Total RNA (2.5  $\mu$ g for SN or 1.8  $\mu$ g for isolated nuclei) was reverse transcribed to complementary DNA (cDNA) with nucleoside triphosphate containing deoxyribose, random primers, and Moloney murine leukemia virus transcriptase (200 U; Invitrogen). Real-time PCR was used to examine the relative levels of ACE2, Mas, AT1, and AT2 receptors. A real-time iCycler PCR platform (Bio-Rad) was used to perform the experiments.  $\beta$ -Actin was used as housekeeping gene in all cases and was amplified in parallel with the genes of interest. We used the comparative cycle threshold values (cycle threshold (Ct)) method ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) to examine the relative messenger RNA (mRNA) expression. A normalized value is obtained by subtracting the Ct of  $\beta$ -actin from the Ct of interest ( $\Delta Ct$ ). As it is uncommon to use  $\Delta Ct$  as a relative expression data due to this logarithmic characteristic, the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  parameter was used to express the relative expression data. Finally, the results were expressed as mean values  $\pm$  SEM. Primer sequences used are shown in Table 1.

### Droplet Digital PCR

ddPCR experiments were performed with a QX200 ddPCR system (Bio-Rad) and ddPCR Eva Green Super Mix kit (Bio-Rad), according to the manufacturer's protocol. Briefly, cDNA (1.5  $\mu$ l per sample) and the corresponding primer pairs (0.165  $\mu$ M; Sigma) were added to the Eva Green Super Mix at a final volume of 20  $\mu$ l. Then, droplets were generated with the aid of a QX200 droplet generator by adding 70  $\mu$ l of the ddPCR oil. The emulsion product (40  $\mu$ l) was subsequently transferred to a 96-well plate for PCR reaction. Finally, the samples were read using a Bio-Rad QX200 droplet reader. Data were analyzed with a QuantaSoft software and expressed as number of copies per micrograms of RNA [27]. Forward

(F) and reverse (R) primers were designed for each gene by using the Beacon Designer software (Premier Biosoft). Primer sequences used are shown in Table 1.

### Angiotensin Converting Enzyme 2 (ACE2) Activity Assay

ACE2 activity was measured using a commercial ACE2 activity assay kit (AnaSpec, AS-72086) following the manufacturer's specifications. The kit is based on the Mca/Dnp fluorescence resonance energy transfer (FRET) peptide (10  $\mu$ M). In the FRET peptide, the fluorescence of Mca is quenched by Dnp but a cleavage of the substrate produces a separation into two fragments by the enzyme, so that the fluorescence of Mca is recovered, and can be monitored at excitation/emission = 330/390 nm using an Infinite M200 multiwell plate reader (TECAN).

### NADPH Oxidase Activity

NADPH oxidase activity in N27 cell line cultures was measured by lucigenin-enhanced chemiluminescence with an Infinite M200 multiwell plate reader (TECAN), as previously described [28, 29]. Lucigenin is an acridylum dinitrate compound that on reducing and interacting with superoxide anions emits light that is quantified to measure the production of superoxide. Cells were seeded ( $25 \times 10^4$  cells/plate) and grown during 24 h. Cells were treated with Ang II (100 nM) alone or in combination with Ang 1-7 (1  $\mu$ M) and/or Mas receptor inhibitor A779 (1  $\mu$ M) in order to analyze the effects of these treatments on the superoxide production by N27 cells.

### Seahorse Analysis

To measure the mitochondrial function in N27 cells, a Seahorse Bioscience XF Extracellular Flux Analyzer was used (Seahorse Bioscience, North Billerica, MA). Cells ( $10 \times 10^3$  cells/well) were seeded in eight-well plates and grown for 24 h and were incubated with or without Ang II (100 nM) and Ang 1-7 (1  $\mu$ M) during 24 h, washed (2 $\times$ ) with assay medium (XF base medium DMEM supplemented with 2 mM glutamine, 10 mM glucose, and 1 mM sodium pyruvate, pH 7.4), and then incubated in assay medium for 1 h at 37  $^{\circ}$ C in a non-CO<sub>2</sub> incubator. Cell Mito Stress Kit was performed where oligomycin (1  $\mu$ M), FCCP (1  $\mu$ M), rotenone, and antimycin A (0.5  $\mu$ M) were added sequentially, and oxygen consumption rate (OCR) was calculated at different parameters values by the Wave Desktop 2.3. Basal respiration was calculated as the last rate measurement before the first injection minus the non-mitochondrial respiration rate. Maximal respiration was calculated as the maximum rate measurement after the FCCP injection minus non-mitochondrial respiration. Finally, non-mitochondrial oxygen consumption

**Table 1** Primers used in this study

Species and genes	Forward (F) primer	Reverse (R) primer
Rat ACE2	5'-CTCCTTCTCAGCCTTGTTG-3'	5'-TCCGTAATGTTGGTGTGT-3'
Rat AT2	5'-AACATCTGCTGA AGACCAATAG-3'	5'-AGAAGGTCAGAACATGGAAGG-3'
Rat MasR	5'-CTTTGTGGAGAACGGGAT-3'	5'-GGAGATGTCAGCAATGGA-3'
Rat TH	5'-GGCTTCTCTGACCAGGTGTATCG-3'	5'-GCAATCTCTCCGCTGTGTATTCC-3'
Mouse ACE2	5'-TATTACTTGAGCCAGGATTG-3'	5'-GACCACATACTTTCATACA-3'
Mouse MasR	5'-AGGGTGACTGACTGAGTTTGG-3'	5'-GAAGGTAAGAGGACAGGAGC-3'
Rat and mouse $\beta$ -actin	5'-TCGTGCGTGACATTAAGAG-3'	5'-TGCCACAGGATCCATACC-3'

was the minimum rate measurement after the rotenone/antimycin A injection.

### Mitochondrial and Nucleus Isolation

Rat brain mitochondria were isolated and purified according to the protocol described by Sims and Anderson [30] with some modifications. This protocol combines differential centrifugation and discontinuous Percoll density gradient centrifugation to isolate pure mitochondria with scarce contamination by synaptosomes and myelin. Rat brain samples were removed and washed in a cold isolation buffer (0.32 M sucrose, 1 mM and 10 mM TRIS; pH 7.4). The tissue was cut into small pieces, transferred to a Dounce homogenizer with 12% Percoll solution, and then homogenized on ice using a loose fitting and tight fitting glass pestles. The homogenate was slowly layered on a previously prepared discontinuous Percoll gradient consisting of 26% Percoll layered over 40% Percoll and centrifuged using a fixed-angle rotor at 30700 $\times$ g for 5 min at 4 °C. This produced three separate bands, and the enriched mitochondrial fraction, which appeared at the interface between the 26 and the 40% Percoll layers, was carefully removed with a glass Pasteur pipette. The mitochondrial fraction was diluted by adding isolation buffer and was again centrifuged at 16700 $\times$ g for 10 min at 4 °C. This yielded a mitochondrial pellet, which was gently resuspended in the residual supernatant. Finally, the pellet was resuspended in isolation buffer and centrifuged at 7300 $\times$ g for 10 min at 4 °C, yielding a pellet of pure mitochondria that was used for WB and functional assays.

Fresh intact rat brain nuclei were isolated and purified from rats killed by decapitation. All isolation procedures were performed on ice or at 4 °C. Brains were rinsed with ice-cold isolation buffer A containing 320 mM sucrose, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, and 20 mM Tris, pH 7.4. Brain pieces were homogenized in buffer A using a glass homogenizer. The homogenates were centrifuged for 15 min at 1000 $\times$ g at 4 °C. The supernatants were removed, and the pellets were resuspended in 4 ml of buffer B (2.2 M sucrose, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, and 10 mM Tris, pH 7.4) and differentially centrifuged for 60 min at 60,000 $\times$ g (Beckman XL-90 ultracentrifuge, Brea, CA, USA)

using a swing out rotor at 4 °C. After centrifugation, the pellet containing the isolated nuclei was resuspended and washed by centrifugation in 2 ml of buffer A. Protein content in isolated nuclei was determined with the Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Fremont, CA, USA). To confirm the integrity of the fresh isolated nuclei, the nuclei were visualized without fixation on a phase-contrast microscope immediately after isolation. Nuclei were also stained on glass coverslips with the fluorescent nuclear marker Hoechst 33342 (10  $\mu$ g/ml; Sigma) and examined using an inverted fluorescence microscope (Nikon Eclipse TE300, Tokyo, Japan). For WB analysis, isolated nuclei were processed using the Nuclear Extract Kit (Active Motif, CA, USA) to eliminate the DNA and conserve only the nuclear proteins. The purity of isolated nuclei and mitochondria was confirmed by the absence of other cellular compartment markers: voltage-dependent anion channel (VDAC; V2139, 1:1000; Sigma) as a mitochondrial marker, histone deacetylase 2 (HDAC2; sc-56,685, 1:200; Santa Cruz Biotechnologies) as a nuclear marker, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase (sc-21,712; 1:200; Santa Cruz Biotechnologies) as plasma membrane marker, and  $\alpha$ -tubulin (T5168, 1:50,000; Sigma) as a cytosol marker.

### Superoxide and Nitric Oxide Production in Isolated Mitochondria and Nuclei

Superoxide production was measured using lucigenin-enhanced chemiluminescence as previously described [31, 32]. Samples were incubated with the compounds in 50 mM phosphate buffer, pH 7.0 containing 1 mM EGTA and 150 mM sucrose. Five micromolar lucigenin and 100  $\mu$ M NADPH were then added to start the reaction. Luminiscence was measured in an Infinite M200 multiwell plate reader (TECAN). NO production was measured with a NO fluorometric assay kit (BioVision, Milpitas, CA, USA). This assay converts the nitrate into nitrite by the nitrate reductase enzyme, and the total nitrite concentration was measured as nitrite reacted with the fluorescent probe DAN (2,3-diaminonaphthalene), which is proportional to the total nitric oxide production. Fluorescence was measured in an Infinite M200 multiwell plate reader (TECAN).

Pure isolated mitochondria (30  $\mu\text{g}$ ) were treated 10–20 min at 37 °C with Ang 1-7 (1  $\mu\text{M}$ ) alone or combined with the MasR inhibitor A779 (1  $\mu\text{M}$ ). For the superoxide production assay, isolated mitochondria were previously treated with Ang II (1 nM) and the AT2 receptor antagonist PD123,319 (2  $\mu\text{M}$ ). The effect of Nox4 in the Ang II/AT1 mitochondrial-induced  $\text{O}_2^-$  production was assessed using the Nox4 inhibitor thioridazine (10  $\mu\text{M}$ ). For the mitochondrial nitric oxide production assay, the effect of the nitric oxide synthase (NOS) was confirmed using the NOS inhibitor L-NAME (100  $\mu\text{M}$ ).

Pure isolated nuclei (15  $\mu\text{g}$ ) were treated 20 min at 37 °C with Ang 1-7 (1  $\mu\text{M}$ ) alone or combined with the MasR inhibitor A779 (1  $\mu\text{M}$ ). For the superoxide production assay, isolated nuclei were previously treated with Ang II (100 nM) and the effect of Nox4 was assessed using the Nox4 inhibitor thioridazine (10  $\mu\text{M}$ ). For nuclear nitric oxide production assay, the effect of NOS was confirmed using the NOS inhibitor L-NAME (100  $\mu\text{M}$ ).

### Effects of Ang 1-7 Treatment on the Transcription of AT1, AT2, and MasR mRNA in Isolated Nuclei

A standard in vitro RNA transcription system (Promega, Madison, WI, USA) was used to study the effects of Ang 1-7 on mRNA transcription in isolated nuclei. Freshly isolated nuclei (100  $\mu\text{g}$ ) were pretreated with Ang 1-7 (1  $\mu\text{M}$ ) alone or combined with the Mas receptor antagonist A779 (10  $\mu\text{M}$ ) for 30 min at 37 °C. Pre-treated nuclei were then incubated with an in vitro RNA transcription system consisting of 500  $\mu\text{M}$  of ATP, GTP, and UTP; and 2 U/ $\mu\text{l}$  RNasin in transcription buffer (Promega) at 37 °C for 1 h. After treatments, RNA was extracted using TRIzol (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. RNA (1.8  $\mu\text{g}$ ) was reverse transcribed to cDNA with deoxynucleotide triphosphate (dNTP), random primers, and Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (MMLV; 200 U; Invitrogen). In order to evaluate the expression of AT1, AT2, and MasR genes, RT-PCR was performed as described previously.

### Statistical Analysis

All data were obtained from at least three independent experiments and were expressed as mean values  $\pm$  SEM. Two-group comparisons were carried out by Student's *t* test and multiple comparisons by one-way ANOVA followed by the Bonferroni test. The normality of populations and homogeneity of variances were tested before each ANOVA. Differences were considered statistically significant at  $p < 0.05$ . Statistical analyses were carried out with the SigmaPlot 11.0 (Systat Software, Inc., CA, USA).

## Results

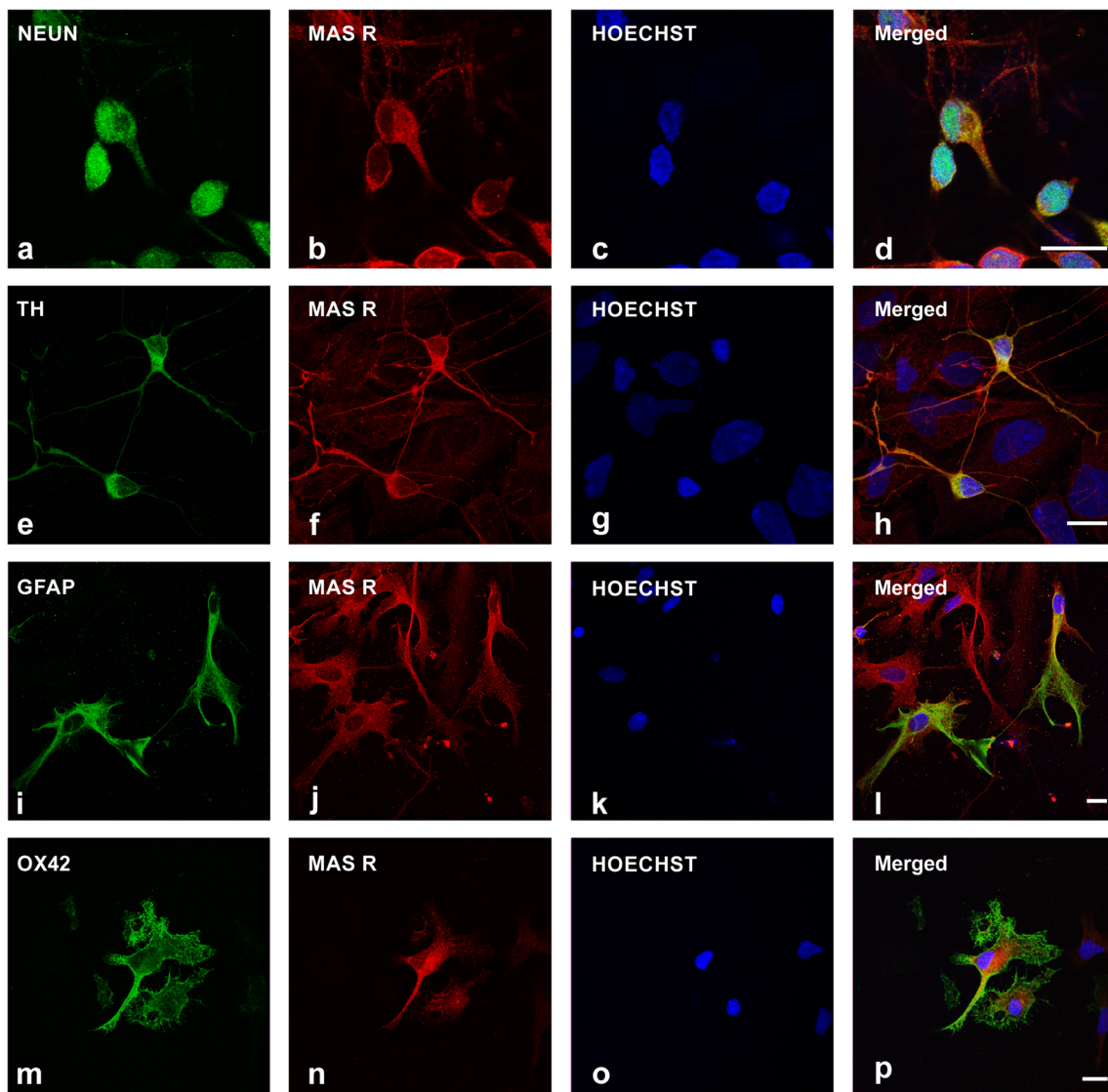
### Mas Receptors Are Expressed in Dopaminergic Neurons, Astrocytes, and Microglia of Rat Mesencephalic Primary Cultures

We investigated the presence of the main receptor for Ang 1-7 in rat mesencephalic primary cultures using markers for Mas receptor and different cell types. Immunofluorescence and confocal microscopy revealed a clear presence of Mas receptor immunoreactivity in neurons in general, and dopaminergic neurons in particular, which were identified by the neuronal marker NeuN (Fig. 1a–d) and the dopaminergic neuron marker tyrosine hydroxylase (TH) (Fig. 1e–h), respectively. Labeling for Mas receptor was more intense at the cytoplasm and plasma membrane than at nuclear level. Glial cells also showed immunoreactivity for Mas receptors. Astrocytes were identified by GFAP-immunoreactivity and showed a Mas receptor labeling; however, the labeling was weaker than that observed in neurons, and not all the GFAP-positive cells were clearly immunoreactive (Fig. 1i–l). OX42-positive microglial cells showed a notable Mas receptor immunoreactivity, which was higher at the cytoplasm and plasma membrane than at the nuclear level (Fig. 1m–p).

### Mas Receptors Are Expressed in Dopaminergic Neurons from Human, Monkey, and Rat Substantia Nigra

Immunofluorescence and confocal microscopy were used to study the presence of Mas receptors in tissue sections from human, monkey, and rat SN. In the human SN, we observed an intense labeling for Mas receptor in dopaminergic neurons, which were identified by TH immunoreactivity (Fig. 2a) and confirmed by the presence of neuromelanin. Similarly, dopaminergic neurons from monkey SN showed strong Mas receptor immunoreactivity (Fig. 2b). In the rat SN, TH-positive dopaminergic neurons also showed Mas receptor immunoreactivity. Numerous fibers intensely labeled for Mas receptors, and apparently coming from the striatum, were observed in the SN pars reticulata (Fig. 2c). The present results show that Mas receptors are expressed in the SN of rodents, monkeys, and humans.

The expression of Mas receptor was confirmed using laser captured microdissection of dopaminergic neurons from rat SN sections (Fig. 2d, d'), and the presence of the Mas receptor mRNA was analyzed by RT-PCR and ddPCR. First, the RT-PCR analysis of microdissected neurons showed the presence of the Mas receptor mRNA in the rat SN; nigral tissue homogenates were also processed for PCR and used as positive controls, and the PCR mixes were used as negative control (Fig. 2e). In addition, ddPCR of samples containing microdissected dopaminergic neurons showed that these neurons contained the Mas receptor mRNA (13,066–19,833



**Fig. 1** Localization of Mas receptors in rat mesencephalic primary cultures. Triple immunofluorescence labeling for Mas receptors (MasR; red; **b, f, j, n**) showing its presence in NeuN-positive neurons (**a–d**; green), TH-positive dopaminergic neurons (**e–h**; green), GFAP-positive

astrocytes (**i–l**; green), and OX42-positive microglia (**m–p**; green). GFAP glial fibrillary acidic protein, HOECHST nuclei (blue), TH tyrosine hydroxylase. Scale bars 10  $\mu$ m

copies/ $\mu$ g of total RNA), confirming an unequivocal presence of the Mas receptor in dopaminergic neurons from rat SN (Fig. 2f).

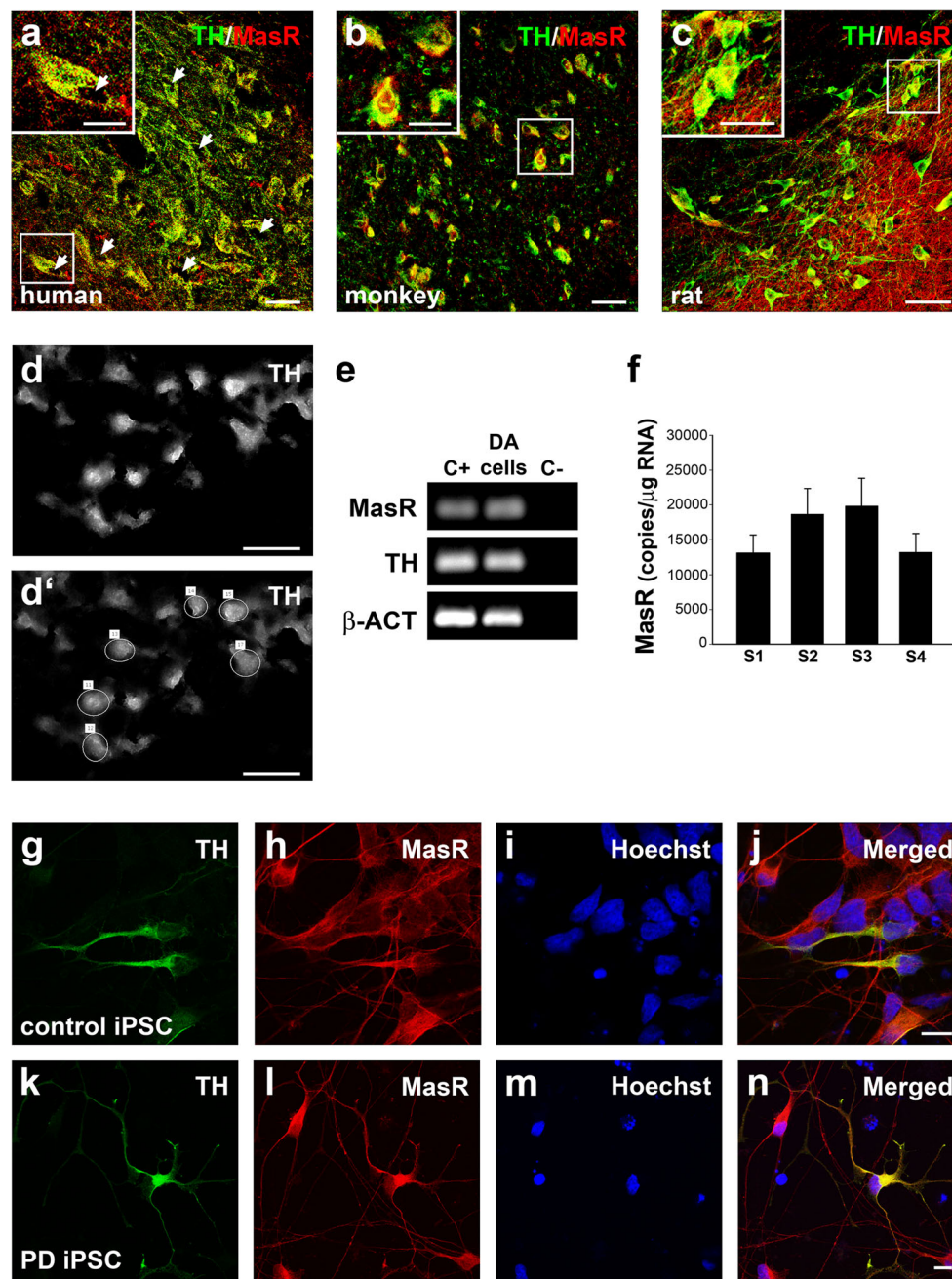
### Mas Receptors Are Expressed in Human iPSCs from PD Patients and Healthy Controls

We differentiated human iPSCs derived from a sporadic PD patient (SP08#1) and from a healthy control (SP11#1) into dopaminergic neurons. Using immunofluorescence and confocal microscopy, we observed a Mas receptor expression in TH-positive dopaminergic neurons derived from a healthy control (Fig. 2g–j) and PD patient (Fig. 2k–n) iPSCs. Mas receptor labeling was intense in both types of cells, and also

in non-TH positive neurons, suggesting that this receptor is expressed in early steps of the differentiation process (i.e., undifferentiated pluripotent cells).

### Mas Receptors and ACE2 Expression and Activity Decrease with Aging

In the present study, SN from 18 to 20-month-old rats and SN from 2 to 3-month-old rats were compared to investigate the effect of aging on the Ang 1-7/Mas receptor axis. We observed that aged rats showed a significant decrease in levels of nigral Mas receptor protein and mRNA relative to young rats (Fig. 3a, d). ACE2 protein and mRNA expression were also decreased in aged rats (Fig. 3b, e).



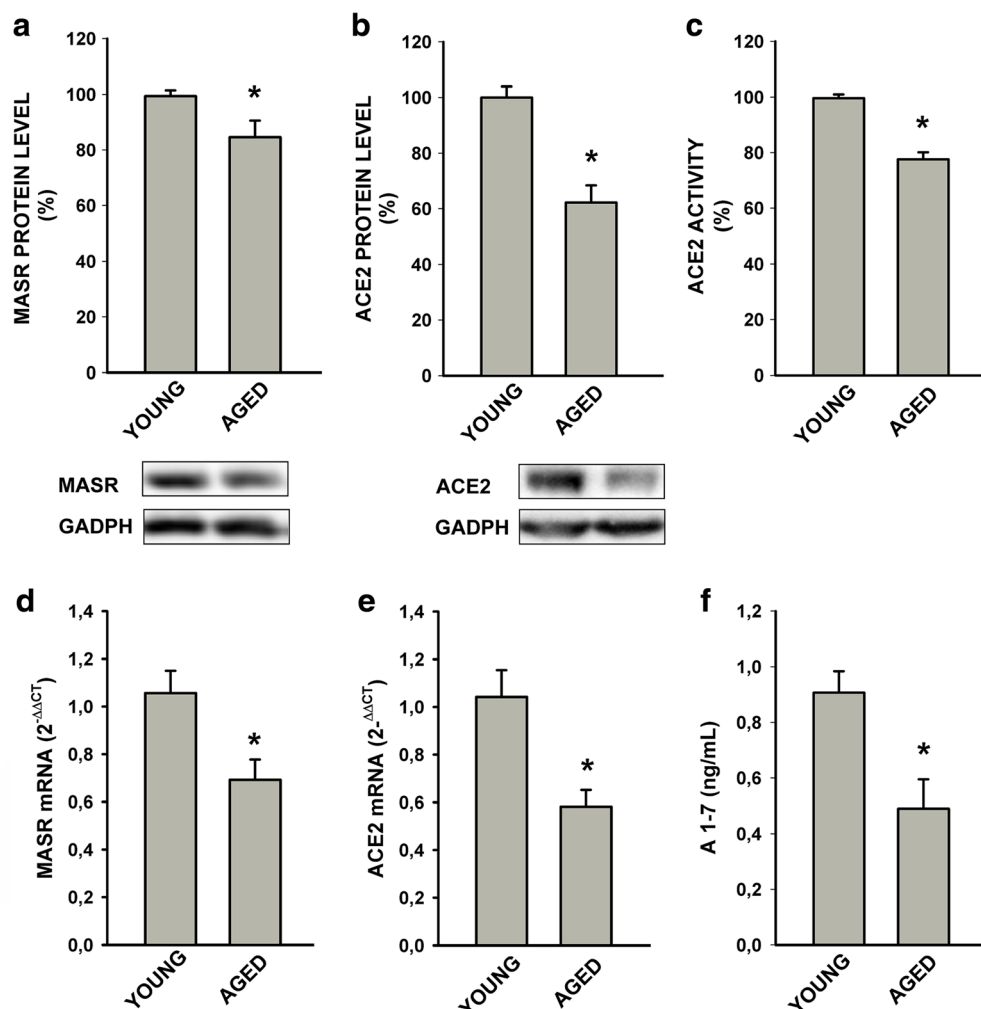
**Fig. 2** Localization of Mas receptors in dopaminergic neurons from human, monkey and rat substantia nigra, and human iPSCs from a healthy control and a PD patient. Double immunofluorescence labeling for Mas receptors (MasR, red) and dopaminergic neurons (TH, green) showing co-localization (yellow) in human (a), monkey (b), and rat (c) substantia nigra (SN). High magnification images of the boxed areas are also shown (a–c). In human dopaminergic neurons, neuromelanin deposits are pointed with white arrows (a). Expression of MasR in rat dopaminergic neurons was confirmed by laser microdissection and RT-PCR or ddPCR (d–f). Photomicrographs of a SN section showing dopaminergic neurons before (d) and after (d') laser microdissection. Representative bands of MasR and  $\beta$ -actin expression by RT-PCR in laser-microdissected

dopaminergic neurons. Homogenates of SN were used as a positive control, and PCR mix without a sample was used as negative control for RT-PCR (e). Concentration of MasR mRNA (copies/ $\mu$ g of RNA) measured by ddPCR in four samples of laser-microdissected dopaminergic neurons (f). Triple immunofluorescence labeling of dopaminergic neurons (TH; g, k) differentiated from iPSCs from a human healthy control (g–j) and a sporadic PD patient (k–n) showing co-localization with MasR (h, l) and the nuclear marker Hoechst (i, m). TH tyrosine hydroxylase, ddPCR droplet digital PCR, iPSC induced pluripotent stem cells. Scale bars 50  $\mu$ m for SN (a–d'), 25  $\mu$ m for high magnification boxed images (a–c), and 5  $\mu$ m for iPSC (g–n)

In addition, we observed a significant decrease in the ACE2 enzyme activity (Fig. 3c), and Ang 1-7 levels were also significantly lower in SN from aged rats than in SN

from young rats (Fig. 3f). The results indicate a lower activity of the Ang 1-7/Mas protective arm in the SN of aged rats.

**Fig. 3** Mas receptor and ACE2 expression and activity decrease with aging. Mas receptor (MasR) and ACE2 protein ( $n = 6$ ) (a, b) and mRNA ( $n = 4-6$ ) (d, e) expression were significantly reduced in SN from aged rats compared to young rats. ACE2 activity ( $n = 5-6$ ) (c) and Ang 1-7 content ( $n = 4$ ) (f) were significantly lower in SN from aged rats compared to young rats. Data are mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). \* $p < 0.05$  compared to control (Student's *t* test). SN substantia nigra, ACE2 angiotensin converting enzyme 2, Ang 1-7 angiotensin 1-7



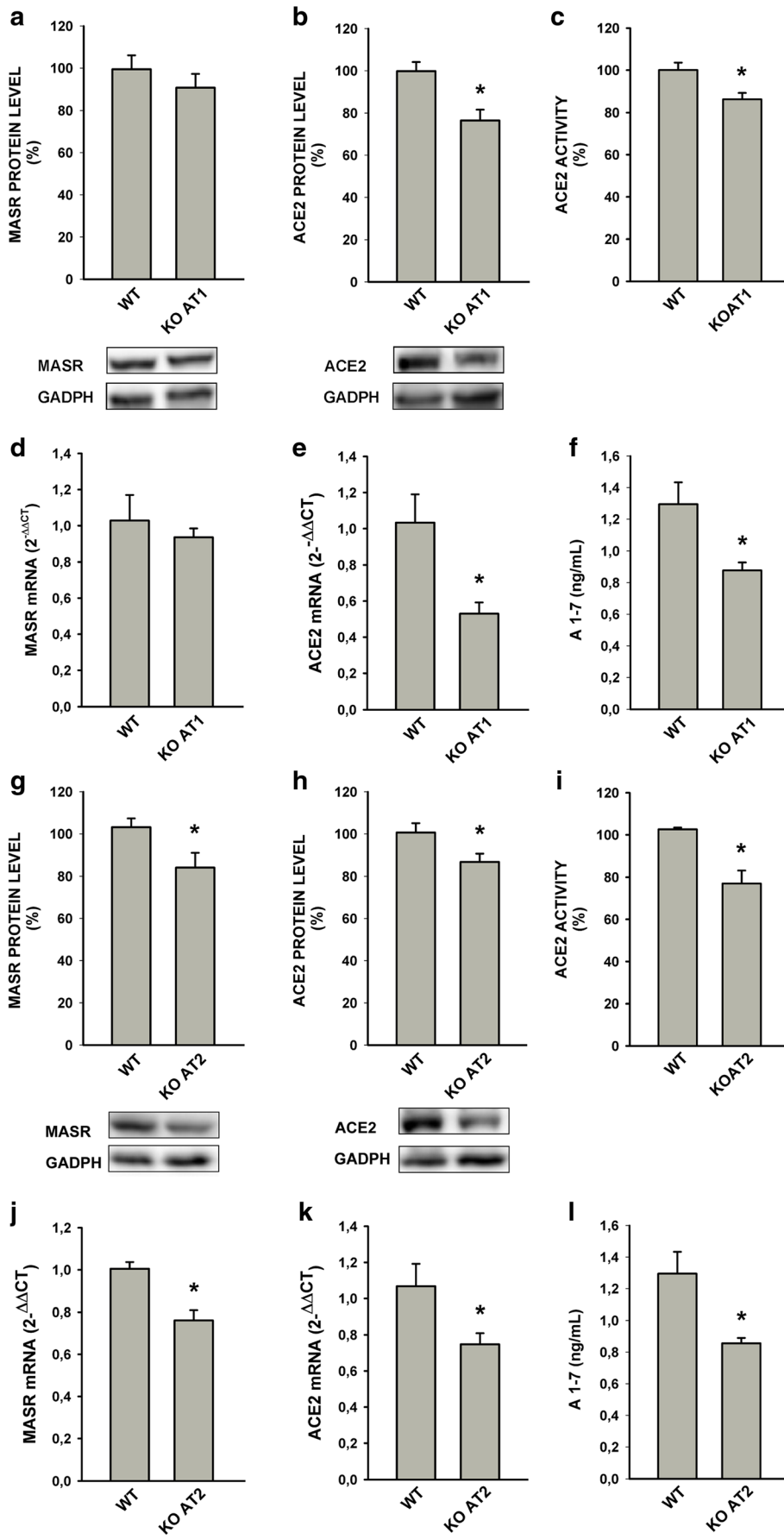
#### Effects of AT1 or AT2 Receptor Deletion on the Ang 1-7/Mas Receptor Axis

We used SN from male adult wild-type C57BL/6 mice and from AT1 or AT2 KO mice to investigate possible effects on the Ang 1-7/Mas receptor axis. We observed that AT1 receptor deletion does not induce significant changes in the Mas receptor expression (Fig. 4a, d). However, AT1 KO mice showed a decrease in ACE2 mRNA and protein expression and a decrease in ACE2 activity, as well as a decrease in Ang 1-7 levels (Fig. 4b, c, e, f). AT2 KO mice showed a significant decrease in the expression of Mas receptor and ACE2 protein and mRNA (Fig. 4g, h, j, k) and a significant decrease in the ACE2 activity (Fig. 4i) relative to WT mice. Consistent with this, SN from KOAT2 mice showed lower levels of Ang 1-7 than SN from WT mice (Fig. 4l).

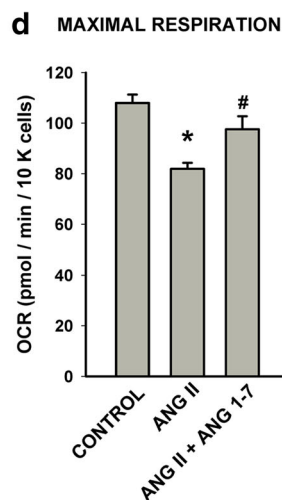
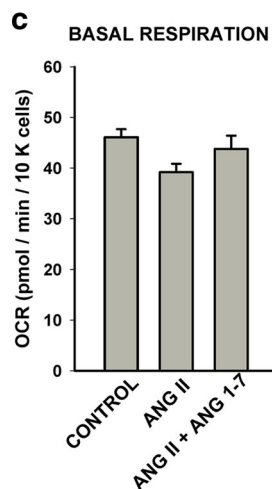
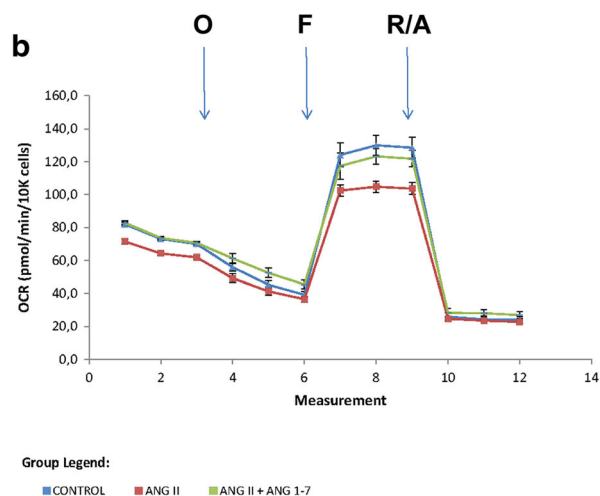
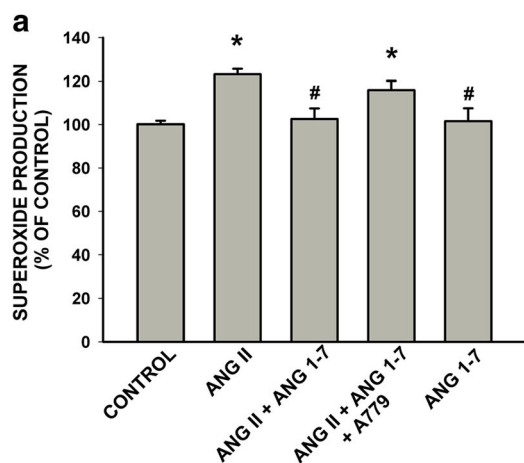
#### Ang 1-7 Protects Dopaminergic Cells from Ang II-Induced Oxidative Stress and Metabolic Changes

The treatment of N27 dopaminergic cells with Ang II alone induced a moderate but significant increase in levels of superoxide. Co-treatment of N27 dopaminergic cells with Ang II and Ang 1-7 for 24 h reversed the increase in superoxide observed with Ang II alone. This effect was not produced in the presence of Mas receptor inhibitor, A779, or with Ang 1-7 alone (Fig. 5a).

The analysis of oxygen consumption rate (OCR) with a Seahorse XFP instrument showed that 24 h treatment of dopaminergic N27 cells with Ang II induced a significant decrease in maximal respiration rate (i.e., the maximum rate of respiration that the cell can achieve after treatment with the uncoupler FCCP). The Ang II-induced decrease in maximal respiration was not observed in the presence of Ang 1-7



◀ **Fig. 4** Mas receptors and ACE2 expression in SN from AT1 and AT2 receptor-deficient mice. Mas receptor protein ( $n = 6$ ) (a) and mRNA ( $n = 4-5$ ) (d) expression did not show significant differences between SN from KOAT1 mice and wild-type mice (WT). However, levels of ACE2 protein ( $n = 6$ ) and mRNA ( $n = 4-5$ ) (b, e), ACE2 activity ( $n = 4-6$ ) (c), and the Ang 1-7 content ( $n = 4$ ) (f) were significantly decreased in SN from KOAT1 mice relative to WT mice. Mas receptor and ACE2 protein (g, h) ( $n = 10-11$ ) and mRNA ( $n = 5$ ) (j, k) expression, ACE2 activity ( $n = 4-5$ ) (i), and Ang 1-7 content ( $n = 4-5$ ) (l) were significantly reduced in SN from KOAT2 mice relative to WT mice. Data are mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). \* $p < 0.05$  compared to control (Student's  $t$  test). SN substantia nigra, ACE2 angiotensin converting enzyme 2, Ang 1-7 angiotensin 1-7



**Fig. 5** Angiotensin 1-7/MasR counterregulates AII-derived neuronal oxidative stress and metabolic changes. (a) Co-treatment of N27 dopaminergic cells with Ang 1-7 and Ang II for 24 h reversed the increase in superoxide observed with Ang II alone; this effect was not produced in presence of MasR inhibitor, A779, or with Ang 1-7 alone. (b–d) Using a Seahorse XFp instrument analysis of oxygen consumption rate (OCR), the mitochondrial respiration (OCR levels) was detected in N27 cells treated with Ang II (red line), or Ang II + Ang 1-7 (green line), or in untreated cells (control; blue). OCR was estimated under basal

(Fig. 5b, d). The basal respiration rate (i.e., the energetic demand of the cell under baseline conditions) was not significantly modified after treatment with Ang II and/or Ang 1-7, although a tendency similar to that observed for maximal respiration was observed (Fig. 5b, c).

### Mas Receptors Are Located in Mitochondria and Nuclei of Neurons and Glial Cells

Recently, we observed AT1 and AT2 receptors in brain mitochondria and nuclei [17, 18]. In the present study, we investigated the possible presence of Mas receptors at mitochondrial

conditions or following the addition of oligomycin (O; 1  $\mu$ M), the uncoupler FCCP (F; 1  $\mu$ M) or the inhibitors rotenone + antimycin A (R/A; 0.5  $\mu$ M) ( $n = 3-6$ ). The rates of basal respiration (previous to oligomycin injection; c) and maximal respiratory capacity (after the FCCP injection; d) are shown. Data are mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). \* $p < 0.05$  compared to the control, # $p < 0.05$  compared to Ang II. One-way analysis of variance [ANOVA] and Bonferroni post hoc test. Ang 1-7 angiotensin 1-7, Ang II angiotensin II, MasR Mas receptor

and nuclear levels using the mitochondrial marker MTDR and the nuclear marker Hoechst 33342. In the different cell types studied (i.e., N27 murine dopaminergic neuron, C6 astrocytic, and N9 microglial cell lines) (Fig. 6a–d, g–j, m–p), we observed a co-localization of the Mas receptor immunoreactivity with the mitochondrial marker MTDR with a 40–45% co-localization rate for the different ROIs selected (Fig. 6e, k, q). The nuclear presence of MasR was mainly observed at the nuclear membrane level with a co-localization rate of 10–15% for the ROI selected (Fig. 6f, l, r).

### Ang 1-7/Mas Modulates Mitochondrial ROS/RNS Levels in Isolated Mitochondria from Rat SN

After observing a co-localization of Mas receptors and mitochondrial markers in dopaminergic neurons and glial cells (Fig. 6), we further confirmed the presence of Mas receptors in mitochondria using pure isolated mitochondria from rat nigral region. We found relatively low expression of Mas receptors in the mitochondrial fraction in comparison with the whole cell homogenate. However, the ACE2 expression was much higher in mitochondrial fraction than in the whole cell homogenate (Fig. 7a, b), suggesting a major role of this enzyme in mitochondria. Furthermore, we observed that Ang 1-7 is more abundant than Ang II peptide in pure isolated mitochondria from rat nigral region (Fig. 7c), suggesting an important role for Ang 1-7 in the mitochondrial function.

To investigate the possible role of Ang 1-7/Mas axis in the mitochondrial function, we measured ROS and RNS production after treatment of isolated mitochondria with Ang 1-7 and the Mas receptor antagonist A779. We observed that the Ang 1-7 treatment inhibited the increase in superoxide induced by activation of mitochondrial AT1 receptors (i.e., treatment with Ang II and the AT2 receptor antagonist PD123,319) (Fig. 7d). Recently, we have shown that mitochondrial AT1 receptors induce an increase in superoxide production via activation of the intracellular NADPH isoform NOX4, because this increase was not produced in the presence of the specific NOX4 inhibitor thioridazine [17]. In the present study, we observed that the increase in mitochondrial superoxide production, via Ang II/AT1/NOX4, is inhibited by activation of the mitochondrial Ang 1-7/Mas receptor axis (Fig. 7d), supporting a beneficial function of Ang 1-7/Mas receptor axis against mitochondrial oxidative stress production.

Regarding mitochondrial reactive nitrogen species (NRS) production, the activation of Mas receptors with its natural ligand Ang 1-7 led to an increase in mitochondrial levels of NO, which was inhibited by pretreatment with the Mas receptor antagonist A779 or the NOS inhibitor L-NAME (Fig. 7e). The present data suggest that the modulation of mitochondrial ROS and RNS production contributes to the protective effects of Ang 1-7.

### Ang 1-7/Mas Modulates Nuclear ROS/RNS Levels in Isolated Nuclei from Rat SN

We used pure isolated nuclei from rat nigral region to investigate the possible presence and functional role of Ang 1-7/Mas receptors at the nuclear level. The purity of the sample was confirmed by the absence of the cytosol marker  $\alpha$ -tubulin and the plasma membrane marker  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase pump. Using WB, we observed the presence of the Mas receptor and the enzyme ACE2 in isolated nuclei (Fig. 8a, b). This is consistent with our recent study showing the presence of other major RAS receptors (AT1 and AT2) at the nuclear level and their role in modulation of Ang II-induced cell oxidative stress [18]. We then studied the effects of nuclear Ang 1-7/Mas receptor activation on nuclear ROS and RNS levels. Activation of nuclear Mas receptors by Ang 1-7 inhibited the increase in nuclear superoxide induced by Ang II via nuclear AT1 receptors (Fig. 8c). This inhibition was not observed in the presence of the Mas receptor inhibitor A779, which confirmed the action of the natural ligand of Mas receptors at nuclear level. Consistent with our previous work, the increase in superoxide induced by Ang II/AT1 activation was mediated by nuclear Nox4. Nox4 is a constitutive enzyme, and its effects were blocked by treatment with the Nox4 inhibitor thioridazine (Fig. 8c). In addition, Ang 1-7 treatment induced a significant increase in nuclear NO levels, which was not observed in the presence of the Mas receptor antagonist A779 or the NOS inhibitor L-NAME (Fig. 8d). All these data suggest a major role of the Ang 1-7/Mas receptor axis at the nuclear level.

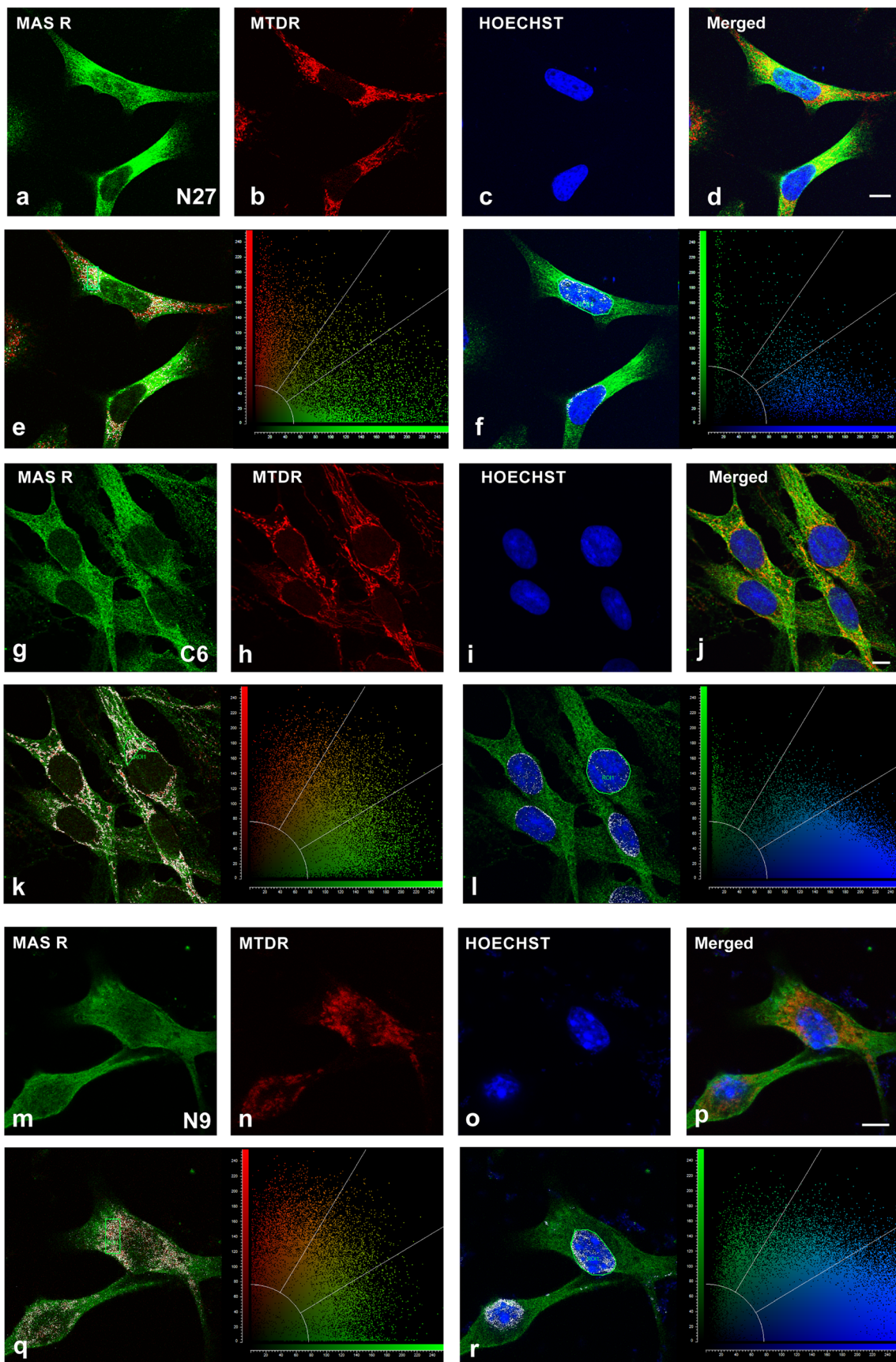
In a previous work, we have observed that the treatment of isolated nuclei with Ang II induces, via nuclear AT1 receptors, an increase in the expression of mRNA for AT2 receptors and precursors of intracrine Ang II, which we suggested to be a protective response of the nuclear RAS to counteract Ang II/AT1-induced cellular oxidative stress [18]. In the present study, we performed in vitro transcription assays in isolated nuclei treated with Ang 1-7, and we observed no effects on the mRNA expression for AT1 and Mas receptors (Fig. 8e, f). However, Ang 1-7, via Mas receptors, significantly decreased the expression of mRNA for AT2 receptors (Fig. 8g).

The results suggest a link between AT2 and Mas receptors, particularly at the intracellular level, which are summarized in Fig. 9 (see “Discussion”).

## Discussion

### Dopaminergic System and RAS Mas Receptors

The classical renin-angiotensin system (RAS) was described more than a century ago, but several new components of the system were more recently discovered. The angiotensin-derived peptide Ang 1-7 and its receptor Mas are particularly

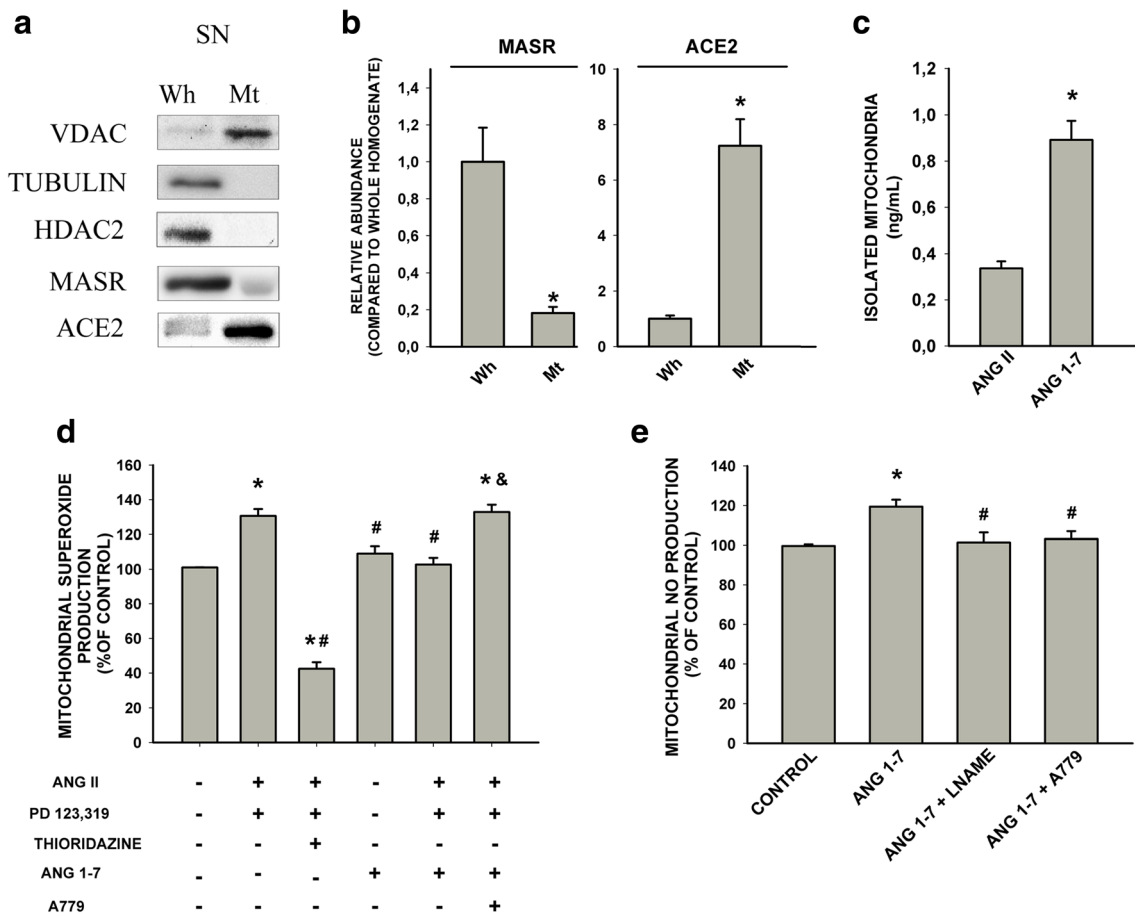


**Fig. 6** Intracellular localization of Mas receptors in dopaminergic neurons, astrocytes, and microglia. Triple immunofluorescence labeling for MasR (green, **a, g, m**), mitochondria (MTDR, red, **b, h, n**) and nuclei (Hoechst, blue, **c, i, o**) in the N27 dopaminergic cell line (**a–d**), C6 astrocytic cell line (**g–j**), and N9 microglial cell line (**m–p**) showing the presence of MasR at mitochondrial and nuclear levels. Images showing co-localization and scatter plots of the red (MTDR) or the blue (Hoechst) versus green (MasR) intensities in N27 (**e, f**), C6 (**k, l**), and N9 (**q, r**) cell lines. Percentages of co-localization were calculated by the LAS AF software. MTDR MitoTracker Deep Red. Scale bars: 5  $\mu$ m

interesting. After demonstrating that Ang 1-7 was a ligand of Mas receptor, the Ang 1-7/Mas receptor axis was definitively established as a new arm of the RAS [34]. A local paracrine

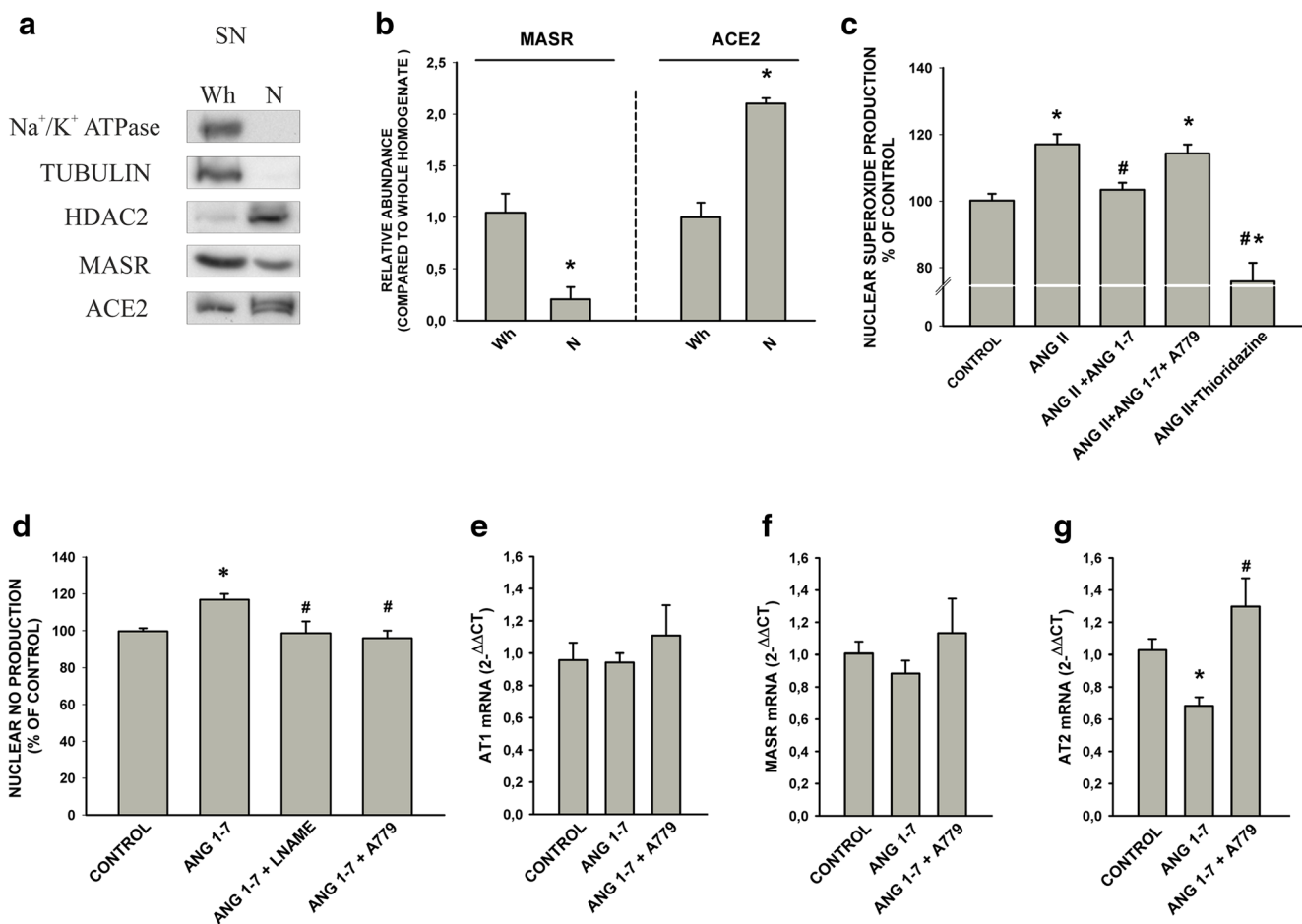
brain RAS has been identified and associated with several brain disorders such as anxiety and stress [35], depressive illness [36], and others. Over the last decade, we and others have shown a major role of the brain RAS in the progression of dopaminergic neuron degeneration in PD models. We observed that Ang II, via AT1 receptors and activation of the NADPH oxidase complex, induces oxidative stress and exacerbates neuroinflammation in different cellular and animal PD models and contributes to the progression of neurodegeneration. AT2 receptors are known to counteract the actions of AT1 receptors, exerting a neuroprotective role [7, 8, 37].

Our previous studies showed the presence of major components of the classical RAS in the nigrostriatal



**Fig. 7** MasR and ACE2 protein in isolated mitochondria (Mit) from the rat nigral region. Western blots (WB) of whole homogenate (Wh;  $n = 3$ ) and pure isolated mitochondria (Mt;  $n = 3$ ) from the rat nigral region showing different markers used to assess the purity of the isolated mitochondria: voltage-dependent anion channel (VDAC) as a mitochondrial marker, tubulin as a cytosol marker, and histone deacetylase 2 (HDAC2) as a nuclear marker (**a**). ACE2 enzyme presents a higher expression than MasR in isolated mitochondria relative to whole cell homogenate (**b**). Isolated mitochondria from the nigral region have higher levels of Ang 1-7 than Ang II as measured by specific EIA ( $n = 3-5$ ) (**c**). Treatment of isolated mitochondria with Ang 1-7 inhibits the increase in mitochondrial superoxide production induced by the activation of mitochondrial AT1 receptors (Ang II + the AT2 receptor antagonist PD123,319). Superoxide is produced via Nox4, as

the Nox4 inhibitor thioridazine blocked the AT1-induced superoxide production. The inhibitory effect of Ang 1-7 was not observed in the presence of the MasR antagonist A779, which confirmed that Ang 1-7 acts through MasR in isolated mitochondria ( $n = 4$ ) (**d**). Treatment of isolated mitochondria with Ang 1-7 increased mitochondrial nitric oxide (NO) production, which was not observed when isolated mitochondria were pre-treated with the NOS inhibitors L-NAME or the MasR inhibitor A779 ( $n = 4-7$ ) (**e**). Data are mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). \* $p < 0.05$  compared to the control; # $p < 0.05$  compared to Ang II + PD 123,319 (**d**) and to Ang 1-7 (**e**); and & $p < 0.05$  compared to Ang II + PD 123,319 + Ang 1-7 (**d**) (one-way analysis of variance [ANOVA] and Bonferroni post hoc test). Ang 1-7 angiotensin 1-7, Ang II angiotensin II, NOS nitric oxide synthase, L-NAME L-arginine methyl ester hydrochloride

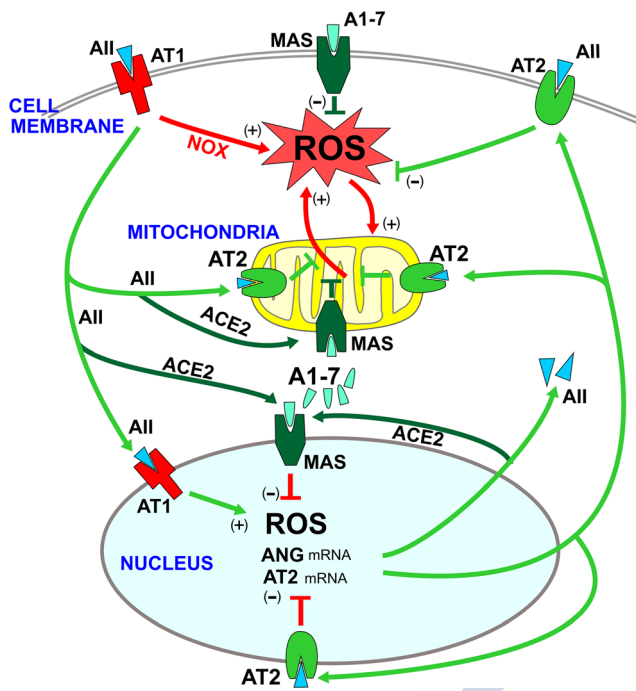


**Fig. 8** MasR and ACE2 protein in isolated nuclei from the rat nigral region. **(a)** Western blots (WB) of whole homogenate (Wh;  $n = 3$ ) and pure isolated nuclei (N;  $n = 3$ ) from the rat nigral region showing different markers used to assess the purity of the isolated nuclei:  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase as a plasma membrane marker, tubulin as a cytosol marker, and histone deacetylase 2 (HDAC2) as a nuclear marker. **(b)** Relative abundance of MasR and ACE2 in isolated nuclei compared to whole homogenate. **(c)** Treatment of isolated nuclei with Ang 1-7 inhibits the increase in nuclear superoxide production induced by activation of nuclear AT1 receptors (Ang II + the AT2 receptor antagonist PD123,319). Superoxide is produced via Nox4, as Nox4 inhibitor thioridazine blocked the AT1-induced superoxide production. The inhibitory effect of Ang 1-7 was not observed in the presence of the MasR antagonist A779, which confirmed that Ang 1-7 acts through MasR in isolated nuclei ( $n = 5-6$ ). **(d)** Treatment of isolated nuclei with Ang 1-7 increased the nuclear nitric

oxide (NO) production, which was not observed when isolated nuclei were pretreated with the NOS inhibitors L-NAME or the MasR inhibitor A779 ( $n = 6$ ). Levels of AT1 receptor mRNA **(e)** or MasR mRNA **(f)** did not change significantly after treatment of isolated nuclei with Ang 1-7 or Ang 1-7 and the MasR inhibitor A779 ( $n = 5-12$ ). **(g)** Treatment of isolated nuclei with Ang 1-7 induced a decrease in the expression of mRNA for AT2, which was inhibited by simultaneous treatment with the MasR receptor inhibitor A779, indicating that these effects are mediated via nuclear MasR receptors ( $n = 5-7$ ). Data are mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). \* $p < 0.05$  compared to control; # $p < 0.05$  compared to Ang II **(c)** and to Ang 1-7 **(d, g)** (one-way analysis of variance [ANOVA] and Bonferroni post hoc test). Ang 1-7 angiotensin 1-7, Ang II angiotensin II, NOS nitric oxide synthase, L-NAME L-arginine methyl ester hydrochloride

region of rodents, monkeys, and humans [1-3, 38]. However, the new Ang 1-7/Mas receptor RAS arm was not investigated in the dopaminergic system. In the present study, we observed Mas receptor labeling in dopaminergic neurons and glial cells in rat mesencephalic primary cultures and rat substantia nigra (SN). The Mas receptor immunoreactivity was higher in neurons than in astrocytes and microglial cells. Furthermore, we confirmed the presence of Mas receptors in dopaminergic neurons from monkey and human SN. We also observed the presence of Mas receptors in human iPSCs derived from healthy

controls and sporadic PD patients. The results confirm those observed in the human nigra. More importantly, the presence of MasR in dopaminergic neurons obtained from iPSCs may be basis for future functional studies investigating possible alterations in the Ang 1-7/MasR axis in iPSCs from PD patients. In the present study, we just used immunohistochemistry, and we did not detect any obvious difference between cells from patients and controls. More detailed and complex studies are necessary to investigate possible functional or structural differences. However, this is beyond the scope of the present general



**Fig. 9** Model of the role that the intracellular MasR plays, interacting with AT1 and AT2 receptors, in modulating the pro-oxidative effects of the activation of membrane AT1 receptors by extracellular (i.e., paracrine) angiotensin II (AII). Extracellular AII induces activation of the membrane the AT1-Nox2 axis, leading to the generation of intracellular superoxide and oxidative stress (red arrows) [3, 8, 33]. Extracellular AII also induces the internalization of the AII-AT1 receptor complex to the nucleus (green arrows; 18). Internalized and intracellularly produced AII is transformed by ACE2 into A1-7, which acts on MasR. Activation of nuclear AT1 receptors induces an increase in nuclear NOX4/superoxide levels, which are known to regulate gene expression, and triggers a number of mechanisms that protect cells against oxidative stress (green arrows; 18). These protective mechanisms include (i) an increase in the expression of AT2 receptor mRNA, which leads to an increase in the levels of protective AT2 receptors that traffic to different cell structures such as mitochondria and cell membrane, inducing a compensatory increase in the RAS protective arm (i.e., AII/AT2); and (ii) an increase in angiotensinogen, renin, and prorenin/renin receptor mRNA, which leads to an increase in the synthesis of intracellular AII to act on intracellular AT2 receptors and MasR (via ACE2/A1-7). Nuclear MasR and AT2 [18] receptors modulate this process (via NOS; red lines) by counteracting the effects of nuclear AT1 receptors. AII angiotensin II, A1-7 angiotensin 1-7, AT1 angiotensin type 1 receptors, AT2 angiotensin type 2 receptors, MAS Mas receptors, ROS reactive oxygen species

approach showing the presence of an Ang 1-7/MasR axis in dopaminergic neurons. The results obtained with immunological methods were confirmed with different methodological approaches such as laser capture microdissection and digital PCR. We have also observed that the Ang 1-7/Mas axis is downregulated with aging, and the results from AT1 and AT2 KO mice revealed interactions between AT1, AT2, and Mas receptors. Interestingly, we have identified an intracellular (i.e., mitochondrial and nuclear) Ang 1-7/Mas axis that modulates mitochondrial and nuclear levels of superoxide.

## Mas Receptors and Aging

Aging is the main risk factor for major neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease and PD. Aging is associated with a pro-inflammatory and pro-oxidative state that affects the vulnerability of dopaminergic neurons [39–41]. We have shown that aging-related dysregulation of nigral RAS is involved in these effects and that aging-related increase in levels of neuroinflammation, oxidative stress, and dopaminergic cell vulnerability were inhibited by treatment with the AT1 antagonist candesartan. In the present study, we observed a decrease in the protective Ang1-7/Mas axis expression in the SN of aged rats (i.e., a decrease in Mas receptor and ACE2 expression and Ang 1-7 levels). This is consistent with previous studies in aged animals that showed a dysregulation of nigral RAS, particularly an increase in the pro-oxidative AT1 receptor expression and a decrease in the protective AT2 receptor expression [42, 43]. The present data further support that an aging-related decrease in the activity of the RAS protective axis (Ang II/AT2 and Ang 1-7/Mas receptor) and an increase in the activity of the pro-oxidative pro-inflammatory axis (Ang II/AT1) are involved in the higher vulnerability of dopaminergic neurons with aging.

## Interactions of the Ang 1-7/Mas Axis with AT1 and AT2 Receptors in KO Mice

In the SN of AT2 KO mice, we observed a decrease in the expression of the Mas receptor protein and mRNA. It has been shown that AT2 and Mas receptors may form heterodimers, as they have similar signaling mechanisms and protective actions [44]. Furthermore, a functional dependence between both receptors has been suggested because Ang 1-7 did not induce any effect in astrocytes from AT2 KO mice, and the AT2 receptor agonist Compound 21 (C21) was ineffective in astrocytes from Mas receptor KO mice [44, 45]. In the SN of AT1 KO mice, we did not observe a significant change in the Mas receptor expression. However, ACE2 and Ang 1-7 levels and ACE2 activity were significantly decreased, which may lead to a decrease in the activity of the Ang 1-7/Mas axis in the absence of the Ang II/AT1 pro-oxidative pro-inflammatory axis. Interestingly, a decrease in the AT2 receptor expression was also observed in the nigra AT1 KO mice [46].

## Effects of the Angiotensin 1-7/Mas Receptor Axis on AII-Derived Neuronal Oxidative Stress and Neuronal Metabolic Changes

It is known that Ang II is a main source of NADPH oxidase-derived oxidative stress through the membrane AT1 receptor activation [33, 47]. In the present study, we have observed that Ang 1-7, via Mas receptors, inhibits the increase in cellular ROS produced by Ang II in dopaminergic neurons,

confirming a neuroprotective role of the Ang 1-7/Mas R axis in these cells. Moreover, treatment of dopaminergic cells with Ang II produced alterations in some bioenergetic parameters (i.e., Ang II decreased the maximum rate of respiration that the cell can achieve to respond to an energetic demand), but not in the presence of the Ang 1-7 treatment. This is consistent with the previously described results on ROS production and with previous observations in neuroblastoma cells showing a decrease in OCR in response to different ROS production agents [48].

Interestingly, it has been shown that ROS derived from the Ang II-induced activation of neuronal NADPH oxidase are moderate and normally not sufficient to induce significant dopaminergic neuron death. This may be explained by the simultaneous triggering of intraneuronal compensatory mechanisms (i.e., activation of the protective AT2/Ang 1-7/Mas receptor axis) described as follows (Fig. 9). However, additional or synergistic ROS sources such as neurotoxins [33, 47] or activation of microglial cells [3, 38] may overwhelm the neuronal compensatory and antioxidant mechanisms leading to dopaminergic cell death.

### Mitochondrial Mas Receptors

Our previous results revealed the presence of an intracrine mitochondrial RAS in the substantia nigra. We observed Ang II and functional AT1 and AT2 receptors in isolated mitochondria from rat brain, which modulate the mitochondrial function. Mitochondrial AT2 receptors are much more abundant than AT1, increase after treatment of cells with oxidative stress inducers, and induce, via nitric oxide, a decrease in mitochondrial respiration [17]. The present data show the presence of Mas receptors in isolated mitochondria from the rat nigral region. However, the expression of this receptor in mitochondria was lower than that observed in the whole cell homogenate. Interestingly, the Ang 1-7-forming enzyme ACE2 was much more abundant at the mitochondrial level than in the whole cell homogenate, suggesting an additional role for this enzyme in the mitochondria. Both ACE (the Ang II forming enzyme) and ACE2 have several substrates that give them multiplicity of functions. The new RAS member alamandine has been shown to be formed by ACE2 from angiotensin A and to act through a Mas-related gene receptor (MrgD) [49]. Another possibility is that Ang 1-7, which is more abundant than Ang II at the mitochondrial level, acts via other mitochondrial receptors (i.e., in addition to Mas receptors). Interestingly, mitochondrial AT2 receptors, which are the most abundant Ang II receptors in mitochondria, have been shown to bind Ang 1-7 in the cardiovascular system [50]. Furthermore, the abovementioned MrgD receptor has also been suggested to be an additional Ang 1-7 receptor [51]. In isolated mitochondria, we have observed that Ang 1-7, via the Mas receptor, induces an increase in mitochondrial nitric

oxide production and inhibits the increase in levels of superoxide produced by activation of Ang II/AT1 (i.e., Ang 1-7 protects mitochondria from detrimental effects of the ROS production). These protective effects are similar to those induced by the activation of mitochondrial AT2 receptors [17]. A similar protective effect of Ang 1-7/Mas receptor activation (i.e., reduction of ROS produced by high glucose treatment) was recently reported in cardiomyocytes [52], and in human brain microvascular endothelial cells, where Ang-(1-7) suppressed the Ang II-induced pro-apoptotic activity, ROS overproduction, and NO reduction [53].

In a number of cell types, it has been shown that the pro-inflammatory pro-oxidative effects of the Ang II/AT1/NADPH oxidase/superoxide axis are counteracted by the Ang II/AT2 and the Ang 1-7/MasR protective axis. In dopaminergic neurons, we have observed that this inhibitory effect may be exerted at several levels (summarized in Fig. 9), and the mitochondrial level appears as a major site for RAS-related ROS production/modulation. Several previous studies have shown a ROS-mediated interaction (i.e., cross-talk signaling) between the membrane-bound NADPH oxidase complex and the mitochondria, so that ROS generated by the AngII/AT1/NADPH oxidase (Nox2) may act as a trigger to induce the opening of ATP-sensitive potassium channels (mitoKATP), which leads to an increase in the generation of mitochondrial ROS [10, 45]. In isolated mitochondria, the activation of AT1 mitochondrial receptors produces Nox4-derived superoxide [17]. It is known that increased mitochondrial ROS results in mitochondrial DNA damage and oxidation of mitochondrial proteins, leading to mitochondrial dysfunction. Mitochondrial-derived ROS also reach the cytoplasm and contribute to cellular dysfunction. In the present study, we have observed that in dopaminergic neurons, Ang 1-7 inhibited the increase in levels of superoxide and changes in cell respiration induced by Ang II. In isolated mitochondria, we observed that Ang II-derived ROS were inhibited in the presence of Ang 1-7. In a previous study [17], we showed that the activation of mitochondrial AT2 receptors leads to inhibition of mitochondrial superoxide, as observed for Ang 1-7 Mas receptors in the present study (see Fig. 9).

### Nuclear Mas Receptors

We also observed Ang 1-7 and Mas receptors in rat nigral isolated nuclei. The activation of Mas receptors by their natural ligand Ang 1-7 produced an increase in the nuclear NO production and counteracted the increase in Ang II-derived nuclear superoxide. The activation of nuclear AT2 receptors by Ang II also induced an increase in nuclear NO production and counteracted the increase in nuclear superoxide [18]. Previous studies have shown that extracellular (paracrine) Ang II induces the activation of the cell membrane AT1/Nox2 axis, leading to the generation of intracellular NADPH

oxidase-derived superoxide and oxidative stress, but Ang II also induces the internalization of the Ang II-AT1 receptor complex to the nucleus (Fig. 9). We have recently observed that the activation of nuclear AT1 receptors induces an increase in nuclear NOX4/superoxide and IP3/Ca<sup>2+</sup> levels, which are known to regulate the gene expression, triggering several mechanisms that may protect cells against oxidative stress [18]. These protective mechanisms include an increase in the expression of AT2 receptor mRNA, which leads to an increase in the levels of protective AT2 receptors that traffic to different cell structures such as mitochondria and cell membrane (i.e., overactivation of the detrimental Ang II/AT1 axis leads to a compensatory increase in the RAS Ang II/AT2 protective arm). In addition, the activation of nuclear AT1 receptors induces an increase in angiotensinogen, renin, and prorenin/renin receptor mRNA, which leads to an increase in the synthesis of intracellular AII and Ang 1-7 to act on intracellular AT2 and Mas receptors [18] (Fig. 9). In the present study, we have observed that the treatment of isolated nuclei with Ang 1-7 does not induce changes in the Mas and AT1 receptor mRNA expression. However, the activation of nuclear Mas receptors by Ang 1-7 induces a decrease in nuclear ROS and in the expression of AT2 receptor mRNA. The results suggest that nuclear Mas and AT2 receptors buffer the protective response (i.e., the enhancement of the Ang II/AT2 protective arm triggered by the activation of nuclear AT1 receptors). Altogether suggests that the nuclear RAS receptors play a pivotal role in maintaining an adequate balance between the cell detrimental and the protective RAS arms (Fig. 9). The present and previous results [18] also reveal that this important function is impaired in aged animals.

## Conclusion

The present data show the presence of the non-classical Ang 1-7/Mas receptor protective arm in the substantia nigra in animal models and human tissue, and in cultured dopaminergic neurons and glial cells, including iPSCs from healthy human controls and PD patients. Aging induced a decrease in the activity of the Ang 1-7/Mas protective axis, which may play a role in an aging-related increase in dopaminergic vulnerability to neurodegeneration. Intracellularly, Ang 1-7 is highly expressed at the mitochondrial level and increases mitochondrial levels of nitric oxide via the Mas receptor, leading to a decrease in mitochondrial superoxide production. At the nuclear level, Ang 1-7, via Mas receptors, increases levels of nitric oxide, decreases nuclear superoxide levels, and decreases AT2 mRNA transcription. Nuclear RAS receptors may regulate the adequate balance between the detrimental and the protective arms of the cell RAS. The present data support the beneficial effects of the Ang 1-7/Mas receptor protective arm in the dopaminergic system. In summary, we

have observed that the Ang 1-7/Mas receptor axis is present in dopaminergic neurons and counteracts the pro-oxidative effects of the Ang II/AT1 axis, which has been previously shown to enhance progression of neurodegeneration in PD models. Furthermore, the Ang 1-7/Mas receptor axis is down-regulated in the aged nigra, and aging is the major risk factor for PD. On this basis, we suggest that the Ang 1-7/MasR axis is involved in counteracting dopaminergic degeneration and progression of PD, and it should be taken into account for the design of new therapeutic strategies for PD.

**Acknowledgements** We thank Pilar Aldrey, Iria Novoa, and Cristina Gianzo for their technical assistance; and Dr. Daniel Henrion for providing the AT2 KO mice.

**Author Contributions** R.V and M.A. C-B performed most experiments. B. V-C performed the studies with isolated nuclei. P. G-G performed tissue immunolabeling, laser microdissection, and ddPCR experiments. J.A. P performed experiments with human iPSCs. J.L. L performed monkey experiments and provided the human tissue. R.V and J.L. L-G conceived and supervised the whole study and wrote the manuscript. All authors edited the manuscript. Funding Information Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (BFU2015-70523). Spanish Ministry of Health (RD12/0019/0020, RD16/0011/0016 and CIBERNED). Galician Government (XUGA, Conselleria de Educacion; GRC2014/002; CIMUS accreditation 2016-2019, ED431G/05). FEDER (Regional European Development Fund).

## Compliance with Ethical Standards

**Conflict of Interest** The authors declare that they have no conflicts of interest.

**Research Involving Human Participants and/or Animals** Experiments using human-derived cells were approved by the corresponding committees of the Spanish Advisory Committee for Human Tissue and Cell Donation and Use and of the University of Santiago de Compostela and authorized by the local government. The human postmortem samples used in the present study were obtained from the Neurological Brain Bank of Navarra (Hospital of Navarra, Pamplona, Spain). Brains were dissected at autopsy from donors who had given informed consent in accordance with the Brain Donation Program of the Government of Navarra (Government directive 23/2001). Monkey handling was conducted in accordance with the European Council Directive 86/609/EEC and with the Society for Neuroscience Policy on the Use of Animals in Neuroscience Research. The experimental design was approved by the Ethical Committee for Animal Testing of the University of Navarra (ref: 019/2008) as well as by the Department of Health of the Government of Navarra (ref: NA-UNAV-04-08). Rodent experiments were carried out in accordance with Directive 2010/63/EU and Directive 86/609/CEE and the Spanish RD/53/2013 and were approved by the corresponding committee at the University of Santiago de Compostela.

## References

- Garrido-Gil P, Valenzuela R, Villar-Cheda B, Lanciego JL, Labandeira-Garcia JL (2013) Expression of angiotensinogen and receptors for angiotensin and prorenin in the monkey and human substantia nigra: an intracellular renin-angiotensin system in the

- nigra. *Brain Struct Funct* 218:373–388. <https://doi.org/10.1007/s00429-012-0402-9>
2. Garrido-Gil P, Rodriguez-Perez AI, Fernandez-Rodriguez P, Lanciego JL, Labandeira-Garcia JL (2017) Expression of angiotensinogen and receptors for angiotensin and prorenin in the rat and monkey striatal neurons and glial cells. *Brain Struct Funct* 222:2559–2571. <https://doi.org/10.1007/s00429-016-1357-z>
  3. Rodriguez-Pallares J, Rey P, Parga JA, Munoz A, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL (2008) Brain angiotensin enhances dopaminergic cell death via microglial activation and NADPH-derived ROS. *Neurobiol Dis* 31:58–73. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2008.03.003>
  4. Unger T, Chung O, Csikos T, Culman J, Gallinat S, Gohlke P et al (1996) Angiotensin receptors. *J Hypertens Suppl* 14:S95–103
  5. Oro C, Qian H, Thomas WG (2007) Type 1 angiotensin receptor pharmacology: signaling beyond G proteins. *Pharmacol Ther* 113: 210–226. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2006.10.001>
  6. Jones GT, Thompson AR, van Bockxmeer FM, Hafez H, Cooper JA, Golledge J et al (2008) Angiotensin II type 1 receptor 1166C polymorphism is associated with abdominal aortic aneurysm in three independent cohorts. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28: 764–770. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.107.155564>
  7. Labandeira-Garcia JL, Rodriguez-Pallares J, Dominguez-Meijide A, Valenzuela R, Villar-Cheda B, Rodriguez-Perez AI (2013) Dopamine-angiotensin interactions in the basal ganglia and their relevance for Parkinson's disease. *Mov Disord* 28:1337–1342. <https://doi.org/10.1002/mds.25614>
  8. Labandeira-Garcia JL, Garrido-Gil P, Rodriguez-Pallares J, Valenzuela R, Borrajo A, Rodriguez-Perez AI (2014) Brain renin-angiotensin system and dopaminergic cell vulnerability. *Front Neuroanat* 8:67. <https://doi.org/10.3389/fnana.2014.00067>
  9. Grammatopoulos TN, Jones SM, Ahmadi FA, Hoover BR, Snell LD, Skoch J et al (2007) Angiotensin type 1 receptor antagonist losartan, reduces MPTP-induced degeneration of dopaminergic neurons in substantia nigra. *Mol Neurodegener* 2:1. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-2-1>
  10. Zawada WM, Banninger GP, Thomson J, Marriott B, Cantu D, Rachubinski AL et al (2011) Generation of reactive oxygen species in 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+) treated dopaminergic neurons occurs as an NADPH oxidase-dependent two-wave cascade. *J Neuroinflammation* 8:129. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-8-129>
  11. Sonsalla PK, Coleman C, Wong LY, Harris SL, Richardson JR, Gadad BS et al (2013) The angiotensin converting enzyme inhibitor captopril protects nigrostriatal dopamine neurons in animal models of parkinsonism. *Exp Neurol* 250:376–383. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2013.10.014>
  12. Chabrashvili T, Kitiyakara C, Blau J, Karber A, Aslam S, Welch WJ, Wilcox CS (2003) Effects of ANG II type 1 and 2 receptors on oxidative stress, renal NADPH oxidase, and SOD expression. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 285:R117–R124. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00476.2002>
  13. Santos RA (2014) Angiotensin-(1-7). *Hypertension* 63:1138–1147. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.01274>
  14. Fraga-Silva RA, Ferreira AJ, Dos Santos RA (2013) Opportunities for targeting the angiotensin-converting enzyme 2/angiotensin-(1-7)mas receptor pathway in hypertension. *Curr Hypertens Rep* 15: 31–38. <https://doi.org/10.1007/s11906-012-0324-1>
  15. Labandeira-Garcia JL, Rodriguez-Perez AI, Garrido-Gil P, Rodriguez-Pallares J, Lanciego JL, Guerra MJ (2017) Brain renin-angiotensin system and microglial polarization: implications for aging and neurodegeneration. *Front Aging Neurosci* 9:129. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2017.00129>
  16. Valenzuela R, Barroso-Chinea P, Villar-Cheda B, Joglar B, Munoz A, Lanciego JL, Labandeira-Garcia JL (2010) Location of prorenin receptors in primate substantia nigra: effects on dopaminergic cell death. *J Neuropathol Exp Neurol* 69:1130–1142. <https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e3181fa0308>
  17. Valenzuela R, Costa-Besada MA, Iglesias-Gonzalez J, Perez-Costas E, Villar-Cheda B, Garrido-Gil P et al (2016) Mitochondrial angiotensin receptors in dopaminergic neurons. Role in cell protection and aging-related vulnerability to neurodegeneration. *Cell Death Dis* 7:e2427. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.327>
  18. Villar-Cheda B, Costa-Besada MA, Valenzuela R, Perez-Costas E, Melendez-Ferro M, Labandeira-Garcia JL (2017) The intracellular angiotensin system buffers deleterious effects of the extracellular paracrine system. *Cell Death Dis* 8:e3044. <https://doi.org/10.1038/cddis.2017.439>
  19. Rodriguez-Perez AI, Valenzuela R, Villar-Cheda B, Guerra MJ, Lanciego JL, Labandeira-Garcia JL (2010) Estrogen and angiotensin interaction in the substantia nigra. Relevance to postmenopausal Parkinson's disease. *Exp Neurol* 224:517–526. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2010.05.015>
  20. Rodriguez-Perez AI, Valenzuela R, Joglar B, Garrido-Gil P, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL (2011) Renin angiotensin system and gender differences in dopaminergic degeneration. *Mol Neurodegener* 6:58. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-6-58>
  21. Rodriguez-Perez AI, Valenzuela R, Villar-Cheda B, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL (2012) Dopaminergic neuroprotection of hormonal replacement therapy in young and aged menopausal rats: role of the brain angiotensin system. *Brain* 135:124–138. <https://doi.org/10.1093/brain/awr320>
  22. Sanchez-Danes A, Richaud-Patin Y, Carballo-Carbajal I, Jimenez-Delgado S, Caig C, Mora S et al (2012) Disease-specific phenotypes in dopamine neurons from human iPS-based models of genetic and sporadic Parkinson's disease. *EMBO Mol Med* 4:380–395. <https://doi.org/10.1002/emmm.201200215>
  23. Xu C, Inokuma MS, Denham J, Golds K, Kundu P, Gold JD, Carpenter MK (2001) Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 19:971–974. <https://doi.org/10.1038/nbt1001-971>
  24. Zhang P, Xia N, Reijo Pera RA (2014) Directed dopaminergic neuron differentiation from human pluripotent stem cells. *J Vis Exp*:51737. <https://doi.org/10.3791/51737>
  25. Freund M, Walther T, von Bohlen und Halbach O (2012) Immunohistochemical localization of the angiotensin-(1–7) receptor Mas in the murine forebrain. *Cell Tissue Res* 348:29–35. <https://doi.org/10.1007/s00441-012-1354-3>
  26. Garrido-Gil P, Fernandez-Rodriguez P, Rodriguez-Pallares J, Labandeira-Garcia JL (2017) Laser capture microdissection protocol for gene expression analysis in the brain. *Histochem Cell Biol*. <https://doi.org/10.1007/s00418-017-1585-1>
  27. Hindson BJ, Ness KD, Masquelier DA, Belgrader P, Heredia NJ, Makarewicz AJ et al (2011) High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. *Anal Chem* 83:8604–8610. <https://doi.org/10.1021/ac202028g>
  28. Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M (2000) NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* 86:494–501
  29. Hong H, Zeng JS, Kreulen DL, Kaufman DI, Chen AF (2006) Atorvastatin protects against cerebral infarction via inhibition of NADPH oxidase-derived superoxide in ischemic stroke. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291:H2210–H2215. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01270.2005>
  30. Sims NR, Anderson MF (2008) Isolation of mitochondria from rat brain using Percoll density gradient centrifugation. *Nat Protoc* 3: 1228–1239. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.105>
  31. Block K, Gorin Y, Abboud HE (2009) Subcellular localization of Nox4 and regulation in diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 14385–14390. <https://doi.org/10.1073/pnas.0906805106>

32. Gorin Y, Ricono JM, Kim NH, Bhandari B, Choudhury GG, Abboud HE (2003) Nox4 mediates angiotensin II-induced activation of Akt/protein kinase B in mesangial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 285:F219–F229. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00414.2002>
33. Rodriguez-Pallares J, Parga JA, Joglar B, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL (2012) Mitochondrial ATP-sensitive potassium channels enhance angiotensin-induced oxidative damage and dopaminergic neuron degeneration. Relevance for aging-associated susceptibility to Parkinson's disease. *Age (Dordr)* 34:863–880. <https://doi.org/10.1007/s11357-011-9284-7>
34. Santos RA, Simoes e Silva AC, Maric C, Silva DM, Machado RP, de Buhr I et al (2003) Angiotensin-(1–7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:8258–8263. <https://doi.org/10.1073/pnas.1432869100>
35. Peng J, Kimura B, Phillips MI (2002) The predominant role of brain angiotensinogen and angiotensin in environmentally induced hypertension. *Regul Pept* 110:25–32
36. Saab YB, Gard PR, Yeoman MS, Mfarrej B, El-Moalem H, Ingram MJ (2007) Renin-angiotensin-system gene polymorphisms and depression. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry* 31:1113–1118. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2007.04.002>
37. Labandeira-Garcia JL, Rodriguez-Perez AI, Valenzuela R, Costa-Besada MA, Guerra MJ (2016) Menopause and Parkinson's disease. Interaction between estrogens and brain renin-angiotensin system in dopaminergic degeneration. *Front Neuroendocrinol* 43:44–59. <https://doi.org/10.1016/j.yfine.2016.09.003>
38. Joglar B, Rodriguez-Pallares J, Rodriguez-Perez AI, Rey P, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL (2009) The inflammatory response in the MPTP model of Parkinson's disease is mediated by brain angiotensin: relevance to progression of the disease. *J Neurochem* 109:656–669. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.05999.x>
39. Csiszar A, Ungvari Z, Koller A, Edwards JG, Kaley G (2003) Aging-induced proinflammatory shift in cytokine expression profile in coronary arteries. *FASEB J* 17:1183–1185. <https://doi.org/10.1096/fj.02-1049fje>
40. Ungvari Z, Csiszar A, Kaley G (2004) Vascular inflammation in aging. *Herz* 29:733–740. <https://doi.org/10.1007/s00059-004-2625-x>
41. Choi DY, Zhang J, Bing G (2010) Aging enhances the neuroinflammatory response and alpha-synuclein nitration in rats. *Neurobiol Aging* 31:1649–1653. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2008.09.010>
42. Villar-Cheda B, Valenzuela R, Rodriguez-Perez AI, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL (2012) Aging-related changes in the nigral angiotensin system enhances proinflammatory and pro-oxidative markers and 6-OHDA-induced dopaminergic degeneration. *Neurobiol Aging* 33(204):e201–e211. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2010.08.006>
43. Villar-Cheda B, Dominguez-Meijide A, Valenzuela R, Granado N, Moratalla R, Labandeira-Garcia JL (2014) Aging-related dysregulation of dopamine and angiotensin receptor interaction. *Neurobiol Aging* 35:1726–1738. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.01.017>
44. Leonhardt J, Vilella DC, Teichmann A, Munter LM, Mayer MC, Mardahl M et al (2017) Evidence for heterodimerization and functional interaction of the angiotensin type 2 receptor and the receptor MAS. *Hypertension* 69:1128–1135. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.08814>
45. Vilella D, Leonhardt J, Patel N, Joseph J, Kirsch S, Hallberg A et al (2015) Angiotensin type 2 receptor (AT2R) and receptor Mas: a complex liaison. *Clin Sci (Lond)* 128:227–234. <https://doi.org/10.1042/CS20130515>
46. Villar-Cheda B, Rodriguez-Pallares J, Valenzuela R, Munoz A, Guerra MJ, Baltatu OC, Labandeira-Garcia JL (2010) Nigral and striatal regulation of angiotensin receptor expression by dopamine and angiotensin in rodents: implications for progression of Parkinson's disease. *Eur J Neurosci* 32:1695–1706. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2010.07448.x>
47. Rodriguez-Pallares J, Parga JA, Joglar B, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL (2009) The mitochondrial ATP-sensitive potassium channel blocker 5-hydroxydecanoate inhibits toxicity of 6-hydroxydopamine on dopaminergic neurons. *Neurotox Res* 15:82–95. <https://doi.org/10.1007/s12640-009-9010-8>
48. Dranka BP, Benavides GA, Diers AR, Giordano S, Zelickson BR, Reily C et al (2011) Assessing bioenergetic function in response to oxidative stress by metabolic profiling. *Free Radic Biol Med* 51:1621–1635. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.08.005>
49. Lautner RQ, Vilella DC, Fraga-Silva RA, Silva N, Verano-Braga T, Costa-Fraga F et al (2013) Discovery and characterization of alamandine: a novel component of the renin-angiotensin system. *Circ Res* 112:1104–1111. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.113.301077>
50. Bosnyak S, Jones ES, Christopoulos A, Aguilar MI, Thomas WG, Widdop RE (2011) Relative affinity of angiotensin peptides and novel ligands at AT1 and AT2 receptors. *Clin Sci (Lond)* 121:297–303. <https://doi.org/10.1042/CS20110036>
51. Tetzner A, Gebolys K, Meinert C, Klein S, Uhlich A, Trebicka J et al (2016) G-protein-coupled receptor MrgD is a receptor for angiotensin-(1-7) involving adenylyl cyclase, cAMP, and phosphokinase A. *Hypertension* 68:185–194. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.07572>
52. Lei Y, Xu Q, Zeng B, Zhang W, Zhen Y, Zhai Y et al (2017) Angiotensin-(1–7) protects cardiomyocytes against high glucose-induced injuries through inhibiting reactive oxygen species-activated leptin-p38 mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated protein kinase 1/2 pathways, but not the leptin-c-Jun N-terminal kinase pathway in vitro. *J Diabetes Investig* 8:434–445. <https://doi.org/10.1111/jdi.12603>
53. Xiao X, Zhang C, Ma X, Miao H, Wang J, Liu L et al (2015) Angiotensin-(1–7) counteracts angiotensin II-induced dysfunction in cerebral endothelial cells via modulating Nox2/ROS and PI3K/NO pathways. *Exp Cell Res* 336:58–65. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2015.06.010>