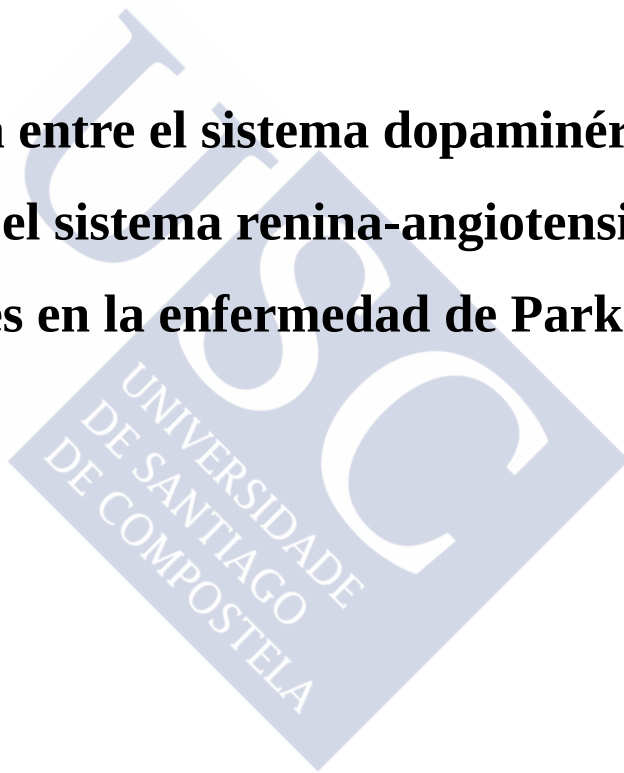


Universidade de Santiago de Compostela

Facultade de Medicina • CIMUS

Departamento de Ciencias Morfolóxicas

**Interacción entre el sistema dopaminérgico
nigroestriatal y el sistema renina-angiotensina local:
Implicaciones en la enfermedad de Parkinson.**



Tesis Doctoral

Antonio Domínguez Meijide

2015



Interacción entre el sistema dopaminérgico
nigroestriatal y el sistema renina-angiotensina local:
Implicaciones en la enfermedad de Parkinson.

Tesis doctoral presentada por:
Antonio Domínguez Meijide

Directores:
José Luis Labandeira García
Catedrático de Anatomía Humana

Ana Isabel Rodríguez Pérez
Profesora Contratada Interina

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

Santiago de Compostela, 2015



AGRADECIMIENTOS

Al profesor José Luis Labandeira, por acogerme en su laboratorio y darme la posibilidad de realizar esta tesis doctoral, además de por todo el esfuerzo y trabajo que realiza día tras día.

A la profesora M^a Josefa Guerra, por su apoyo y toda su ayuda.

A Ana Isabel por su paciencia y ayuda.

A Begoña Villar, Ana Muñoz, Pablo, Jannette y Carmen por toda su ayuda, consejos y confianza.

A Rita, Ana Borrajo, Jose, Iria, Pili, Alicia, Begoña González, Juan, Clynton y Martu por todo su esfuerzo, ayuda y trabajo.

A la profesora Angela Cenci Nilsson y a toda la gente de su laboratorio, especialmente a Zisis.

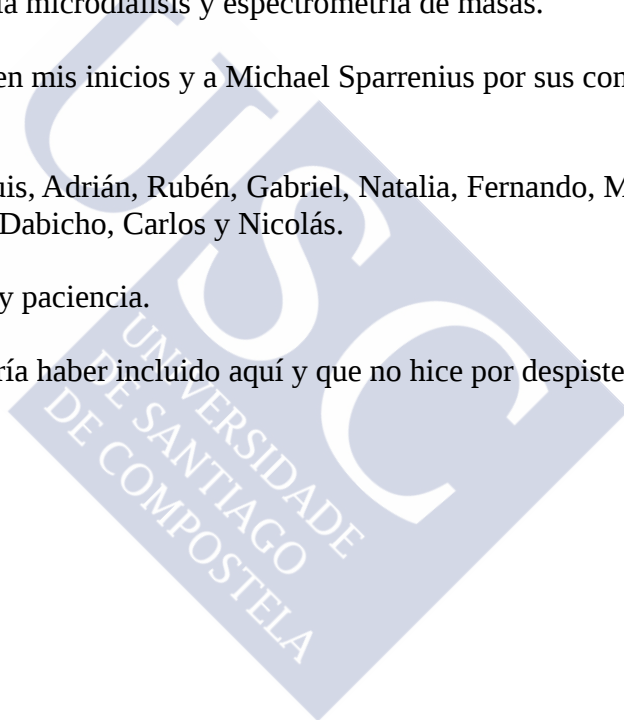
A Marta Concheiro, Germán Sierra y Ana de Castro por su ayuda, colaboración y formación en todo lo referente a la cromatografía, la microdiálisis y espectrometría de masas.

A Belén y Pablo por ayudarme en mis inicios y a Michael Sparrenius por sus consejos en el manejo de animales.

A Luis, Noel, José Luis, José Luis, Adrián, Rubén, Gabriel, Natalia, Fernando, Mauro, Dani, Chisco, Alfonso, Víctor, Pablo, Dabicho, Carlos y Nicolás.

A toda mi familia por su apoyo y paciencia.

A todos aquellos a los que debería haber incluido aquí y que no hice por despiste, olvido u omisión, por favor perdonadme.







TESIS
DOCTORAL

**INTERACCIÓN ENTRE EL
SISTEMA DOPAMINÉRGICO
NIGROESTRIATAL Y EL SISTEMA
RENINA-ANGIOTENSINA LOCAL:
IMPLICACIONES EN LA
ENFERMEDAD DE PARKINSON.**

Asdo. 

Antonio Domínguez Meijide

PROGRAMA DE DOUTORADO
EN NEUROCIENCIA

SANTIAGO DE
COMPOSTELA 2015



D. José Luis Labandeira García, Catedrático de Anatomía de la Facultad de Medicina de la Universidad de Santiago de Compostela y **Dña. Ana Isabel Rodríguez Pérez**, Profesora Contratada Interina de la misma Universidad,

HACEN CONSTAR QUE:

D. Antonio Domínguez Meijide ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo de su Tesis Doctoral *Interacción entre el sistema dopaminérgico nigroestriatal y el sistema renina-angiotensina local: Implicaciones en la enfermedad de Parkinson*, y que dicho trabajo reúne todas las condiciones necesarias para ser presentado para su valoración por la comisión correspondiente.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, lo firmamos en Santiago de Compostela, a 6 de Julio de 2015.



José Luis Labandeira García
Catedrático de Anatomía Humana
Dpto. de Ciencias Morfológicas



Ana Isabel Rodríguez Pérez
Profesora Contratada Interina
Dpto. de Ciencias Morfológicas



Interacción entre el sistema dopaminérgico nigroestriatal y el sistema renina-angiotensina local: Implicaciones en la enfermedad de Parkinson

Resumo

O sistema renina-angiotensina (SRA) foi considerado tradicionalmente como un sistema circulante, aínda que actualmente se sabe que existen SRA locais ou tisulares. A nivel da substancia negra (SN) demostrouse a existencia dun SRA local que está implicado no desenvolvemento da enfermidade de Parkinson (EP) e na alteración da homeostase do ferro nas neuronas dopaminérxicas. Ademais, demostrouse que o incremento da actividade do SRA a nivel nigral ten un papel determinante no aumento da vulnerabilidade neuronal dopaminérxica observándose a este nivel unha interacción compensatoria entre os receptores de dopamina e os de angiotensina II (AII). Na presente tese doutoral estudáronse algúns dos máis importantes factores que producen un incremento no SRA tales como a depleción dopaminérxica, a hipoperfusión cerebral crónica e a depleción estroxénica. Ademais estudouse a activación da vía RhoA/ROCK como mecanismo involucrado na dexeneración dopaminérxica inducida por unha hiperactivación do SRA. Os nosos resultados suxiren que o emprego de inhibidores do SRA podería constituír unha estratexia neuroprotectora na abordaxe terapéutica da EP.

Palabras chave:

Sistema renina-angiotensina, sistema dopaminérxico, enfermidade de Parkinson, dopamina, rho quinasa

Resumen

El sistema renina-angiotensina (SRA) ha sido considerado tradicionalmente como un sistema circulante, aunque actualmente se sabe que existen SRA locales o tisulares. A nivel de la sustancia negra (SN) se ha demostrado la existencia de un SRA local que está implicado en el desarrollo de la enfermedad de Parkinson (EP) y en la alteración de la homeostasis del hierro en las neuronas dopaminérgicas. Además, se ha demostrado que el incremento de la actividad del SRA a nivel nigral tiene un papel determinante en el aumento de la vulnerabilidad neuronal dopaminérgica observándose a este nivel una interacción compensatoria entre los receptores de dopamina y los de angiotensina II (AII). En la presente tesis doctoral se han estudiado algunos de los más importantes factores que producen un incremento en el SRA tales como la depleción dopaminérgica, la hipoperfusión cerebral crónica y la depleción estrogénica. Además se ha estudiado la activación de la vía RhoA/ROCK como mecanismo involucrado en la degeneración dopaminérgica inducida por una hiperactivación de SRA. Nuestros resultados sugieren que el empleo de inhibidores del SRA podría constituir una estrategia neuroprotectora en el abordaje terapéutico de la EP.

Palabras clave:

Sistema renina-angiotensina, sistema dopaminérgico, enfermedad de Parkinson, dopamina, rho quinasa

Summary

The renin-angiotensin system (RAS) was classically considered as a circulating system, but nowadays it is known that in addition there are local or tissular RAS. It has been demonstrated the existence of a local RAS in the substantia nigra (SN) which is involved in the development of Parkinson's disease (PD) and in the alteration of iron homeostasis in dopaminergic neurons. Furthermore, it has been demonstrated that the increase in the RAS system at a nigral level has a major role in the increase of dopaminergic neuronal vulnerability, and there is a compensatory interaction between dopamine and angiotensin II (AII) receptors. In the present thesis important factors that produce an increase in the RAS activity such as dopaminergic depletion, chronic brain hypoperfusion and estrogen depletion have been studied. Also, the activation of the RhoA/ROCK pathway as a mechanism involved in RAS hyperactivation-induced dopaminergic cell death has been studied. Our results suggest that the use of RAS inhibitors may be a neuroprotective strategy as a therapeutical approach of PD.

Keywords

Renin-angiotensin system, dopaminergic system, Parkinson's disease, dopamine, rho kinase



ANEXO	XV
Publicaciones incluidas en la tesis	XVII
Participación en otras publicaciones durante el periodo de doctorado	XVIII
Abreviaturas	XIX
1-INTRODUCCIÓN	1
1.1-Enfermedad de Parkinson	3
1.1.1-Características generales de la enfermedad de Parkinson.....	3
1.1.2-Modelos experimentales de la enfermedad de Parkinson.....	12
1.1.3-Tratamiento de la enfermedad de Parkinson.....	16
1.2-Sistema dopaminérgico	21
1.2.1-Dopamina y metabolitos.....	21
1.2.2-Clasificación de los receptores de dopamina.....	23
1.2.3-Distribución de los receptores de dopamina en el cerebro.....	25
1.3-Sistema renina-angiotensina	28
1.3.1-Sistemas renina-angiotensina locales.....	30
1.3.2-Angiotensinógeno y angiotensina.....	32
1.3.3-Distribución de los receptores de angiotensina en el cerebro.....	34
1.3.4-Modulación farmacológica del sistema renina-angiotensina.....	35
1.4-Rho kinasa	38
1.4.1-RhoA y ROCK.....	38
1.4.2-Rho kinasa en la enfermedad de Parkinson.....	40
1.4.3-ROCK y estrógenos.....	41
1.5-Homeostasis del hierro y enfermedad de Parkinson	42
2-JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	43
3-MATERIALES Y MÉTODOS	49
3.1-Lesión y tratamiento de los animales	51
3.1.1-Lesión con 6-hidroxidopamina.....	51
3.1.2-Lesión con MPTP.....	52
3.1.3-Cirugía de hipoperfusión cerebral crónica.....	52
3.1.4-Ovariectomía.....	52
3.1.5-Inhibición del sistema renina-angiotensina.....	53
3.1.6-Tratamiento con L-DOPA.....	53
3.1.7-Tratamiento con 17- β -estradiol.....	53
3.2-Tests de comportamiento de los animales	55
3.2.1-Comportamiento rotacional.....	55
3.2.2-Test del cilindro.....	55
3.2.3-Test del rotarod.....	56

3.3-Obtención y tratamiento de los distintos tipos celulares.....	57
3.3.1-Cultivos primarios mesencefálicos.....	57
3.3.2-Línea dopaminérgica MES23.5.....	58
3.3.3-Línea microglial N9.....	58
3.4-Determinación de niveles de ARN mensajero, proteínas, neurotransmisores y metabolitos.....	59
3.4.1-Microdiálisis.....	59
3.4.2-HPLC.....	60
3.4.2.1-Separación de dopamina y metabolitos.....	60
3.4.2.2-Separación de angiotensinas.....	60
3.4.2.3-Determinación de niveles de 17- β -estradiol.....	61
3.4.2.4-Purificación y cuantificación de angiotensinógeno.....	61
3.4.3-Estimación de niveles de MPP ⁺ e identificación de angiotensina por espectrometría de masas.....	62
3.4.3.1-Estimación de niveles de MPP ⁺	62
3.4.3.2-Determinación de angiotensina II.....	63
3.4.4-Western blot.....	63
3.4.5-PCR cuantitativa.....	64
3.4.6-Estimación de la actividad Rho quinasa.....	64
3.4.7-Determinación del hierro lábil en cultivos mediante la extinción de la señal de phen green-sk.....	64
3.5-Inmunohistoquímica y tinción.....	66
3.5.1-Inmunohistoquímica simple.....	66
3.5.2-Inmunohistoquímica doble.....	66
3.5.3-Histoquímica de lectina.....	67
3.5.4-Tinción de Perls.....	67
3.6-Materiales y reactivos químicos empleados.....	69
4-RESULTADOS.....	73
4.1-Efecto de la desregulación del sistema dopaminérgico sobre el sistema renina-angiotensina.....	75
4.2-Efecto de la modulación del sistema renina-angiotensina sobre el sistema dopaminérgico.....	91
4.2.1-Efectos de la inhibición del sistema renina-angiotensina sobre el sistema dopaminérgico.....	91
4.2.2-Efectos de la activación del sistema renina-angiotensina, inducida por la hipoperfusión cerebral crónica, sobre el sistema dopaminérgico.....	107
4.2.3-Efectos de la activación del sistema renina-angiotensina microglial, vía AT1/ROCK, en la degeneración dopaminérgica.....	125
4.2.3.1-Efectos de la activación del sistema renina-angiotensina microglial, vía AT1/ROCK, en la degeneración dopaminérgica. Papel de la angiotensina en la activación de la ruta RhoA/ROCK.....	125
4.2.3.2-Efectos de la activación del sistema renina-angiotensina microglial,	

vía AT1/ROCK, en la degeneración dopaminérgica. Interacciones con los estrógenos.....	139
4.2.4-Efectos de la activación del sistema renina-angiotensina sobre la homeostasis del hierro en la sustancia negra.....	153
5-DISCUSIÓN.....	169
5.1-Efecto de la desregulación del sistema dopaminérgico sobre el sistema renina-angiotensina.....	171
5.2-Efecto de la modulación del sistema renina-angiotensina sobre el sistema dopaminérgico.....	176
5.2.1-Efectos de la inhibición del sistema renina-angiotensina sobre el sistema dopaminérgico.....	176
5.2.2-Efectos de la activación del sistema renina-angiotensina, inducida por la hipoperfusión cerebral crónica, sobre el sistema dopaminérgico.....	180
5.2.3-Efectos de la activación del sistema renina-angiotensina microglial, vía AT1/ROCK, en la degeneración dopaminérgica.....	183
5.2.3.1-Efectos de la activación del sistema renina-angiotensina microglial, vía AT1/ROCK, en la degeneración dopaminérgica. Papel de la angiotensina en la activación de la ruta RhoA/ROCK.....	183
5.2.3.2-Efectos de la activación del sistema renina-angiotensina microglial, vía AT1/ROCK, en la degeneración dopaminérgica. Interacciones con los estrógenos.....	188
5.2.4-Efectos de la activación del sistema renina-angiotensina sobre la homeostasis del hierro en la sustancia negra.....	191
6-CONCLUSIONES.....	195
7-BIBLIOGRAFÍA.....	199





ANEXO



PUBLICACIONES INCLUIDAS EN LA TESIS

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(7):1726-1738.

Domínguez-Meijide A, Villar-Cheda B, Garrido-Gil P, Sierra-Paredes G, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL (2014) *Effect of chronic treatment with angiotensin type 1 receptor antagonists on striatal dopamine levels in normal rats and in a rat model of Parkinson's disease treated with L-Dopa*. Neuropharmacology, 76(Pt A):156-168.

Rodríguez-Perez AI, **Dominguez-Meijide A**, Lanciego JL, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL (2012) *Dopaminergic degeneration is enhanced by chronic brain hypoperfusion and inhibited by angiotensin receptor blockage*. Age, 35:1675-1690.

Villar-Cheda B, **Dominguez-Meijide A**, Joglar B, Rodríguez-Perez AI, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL (2012) *Involvement of microglial RhoA/Rho-Kinase pathway activation in the dopaminergic neuron death. Role of angiotensin via angiotensin type 1 receptors*. Neurobiol Dis, 47(2):268-279.

Rodríguez-Perez AI, **Dominguez-Meijide A**, Lanciego JL, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL (2013) *Inhibition of Rho kinase mediates the neuroprotective effects of estrogen in the MPTP model of Parkinson's disease*. Neurobiol Dis, 58:209-219.

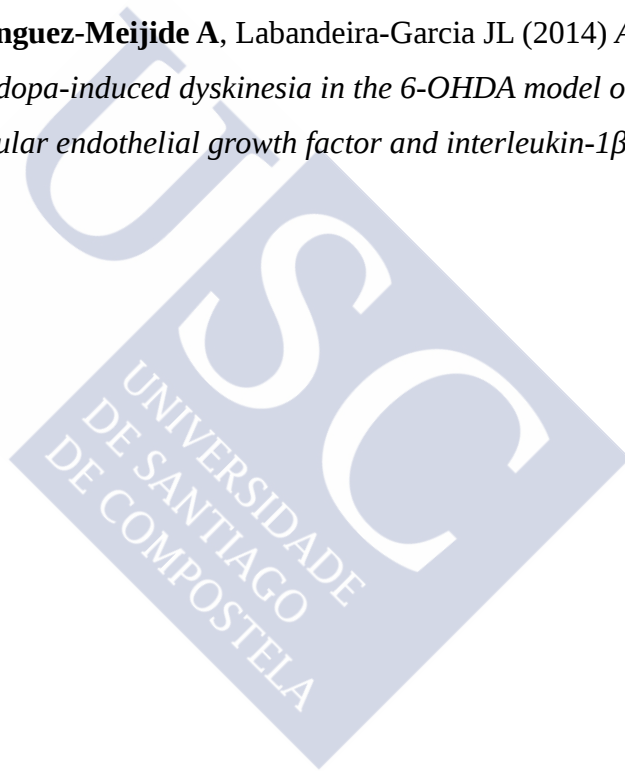
Garrido-Gil P, Rodríguez-Pallares J, **Dominguez-Meijide A**, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL (2013) *Brain angiotensin regulates iron homeostasis in dopaminergic neurons and microglial cells*. Exp Neurol, 250:384-396.

PARTICIPACIÓN EN OTRAS PUBLICACIONES DURANTE EL PERIODO DE DOCTORADO

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(10):1337-1342.

Labandeira-Garcia JL, Rodriguez-Perez AI, Villar-Cheda B, Borrajo A, **Dominguez-Meijide A**, Guerra MJ (2014) *Rho Kinase and Dopaminergic Degeneration: A Promising Therapeutic Target for Parkinson's Disease*. *Neuroscientist* [Epub ahead of print]

Muñoz A, Garrido-Gil P, **Dominguez-Meijide A**, Labandeira-Garcia JL (2014) *Angiotensin type 1 receptor blockage reduces l-dopa-induced dyskinesia in the 6-OHDA model of Parkinson's disease. Involvement of vascular endothelial growth factor and interleukin-1 β* . *Exp Neurol*, 261:720-732.



Abreviaturas empleadas en esta tesis

6-OHDA	6-Hidroxidopamina
AII	Angiotensina II
AIII	Angiotensina III
AIV	Angiotensina IV
AV	Angiotensina V
A(1-7)	Angiotensina (1-7)
AADC	Aminoácido aromático decarboxilasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AMPT	Alfa-Metil-P-Tirosina
ARA	Antagonista del receptor de angiotensina
ARN	Ácido ribonucleico
AT1	Receptor de angiotensina tipo 1
AT2	Receptor de angiotensina tipo 2
ATP	Adenosín trifosfato
cAMP	Adenosín monofosfato cíclico
CM	Núcleo centromediano
CNTF	Factor neurotrófico ciliar
COMT	Catecol orto-metiltransferasa
DAB	Diaminobencidina
DARPP-32	Fosfoproteína neuronal regulada por dopamina y por cAMP
DAT	Transportador de dopamina
DBS	Estimulación cerebral profunda
DJ-1	Proteín deglicasa 1
DMT-1	Transportador de metales divalentes

DOPAC	Ácido 3,4-Dihidroxifenilacético
DOPAL	3,4-Dihidroxifenilacetaldehido
ECA	Enzima convertora de angiotensina
ERO	Especie reactiva del oxígeno
ESI	Ionización por electrospray
EP	Enfermedad de Parkinson
GABA	Ácido Gamma-Aminobutírico
GDNF	Factor neurotrófico derivado de glía
GDP	Guanosín difosfato
GEF	Factores intercambiadores de nucleótidos de guanina
Gpe	Globo pálido externo
Gpi	Globo pálido interno
GSI	Isolectina de <i>Griffonia simplicifolia</i>
GTP	Guanosín trifosfato
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
HVA	Ácido Homovanílico
iECA	Inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina
L-DOPA	L-3,4-Dihidroxifenilalanina
LRRK2	Quinasa 2 rica en repeticiones de leucina
MAK	Quinasa activada por mitógeno
MAO	Monoaminoxidasa
MPP ⁺	Metilfenilpiridinio
MPTP	1-Metil-4-Fenil-1,2,3,6-Tetrahidropiridina
MSN	Neuronas espinosas medias

XX

NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotido fosfato
NMDA	N-Metil-D-Aspartato
NPP	Núcleo pedúnculo pontino
NST	Núcleo subtalámico
PINK-1	Quinasa putativa inducida por PTEN
PTEN	Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-Fosfatasa
PV	Parkinsonismo vascular
Rho	Proteína homóloga de Ras
ROCK	Rho quinasa
SIR	Detección de ión sencillo
SN	Sustancia negra
SNc	Sustancia negra de pares compactos
SNC	Sistema nervioso central
SNr	Sustancia negra reticulada
SRA	Sistema renina angiotensina
SRA	Sistema renina-angiotensina
ST	Estriado
TEAF	Tampón formiato de trietilamonio
TH	Tirosina hidroxilasa
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta visible
VA	Núcleo ventral anterior
VL	Núcleo ventral lateral
VMAT2	Transportador de monoaminas vesicular 2
VPS35	Homólogo 35 del distribuidor de proteínas vacuolares





INTRODUCCIÓN



1.1-ENFERMEDAD DE PARKINSON

1.1.1-Características generales de la enfermedad de Parkinson

La enfermedad de Parkinson (EP) es un desorden neurodegenerativo, descrito por primera vez por James Parkinson en 1817, en el que se produce una pérdida de neuronas dopaminérgicas en los ganglios de la base. Esto da lugar fundamentalmente a temblor, bradiquinesia, rigidez e inestabilidad postural.

Es una enfermedad de etiología incierta caracterizada por la degeneración de las neuronas dopaminérgicas de la *substantia nigra* o sustancia negra (SN), especialmente por las de la *substantia nigra pars compacta* (SNc) y por la presencia de los denominados cuerpos de Lewy. Éstos son agregados proteicos citoplasmáticos compuestos principalmente por α -sinucleína (Spillantini, 1999; Recasens et al., 2014) y que se localizan en el *locus coeruleus*, el hipotálamo, la SNc y la corteza cerebral (Gibb y Lees, 1988).

Los síntomas de la enfermedad no se suelen manifestar hasta que se produce una disminución de los niveles estriatales de dopamina de un 70-80%, lo que puede ser consecuencia de una pérdida de, al menos un 50% de las neuronas dopaminérgicas de la SNc. La manifestación de los síntomas en estadios tan avanzados de la enfermedad se debe al posible desarrollo de mecanismos compensatorios por parte de las neuronas dopaminérgicas supervivientes y por parte de las células postsinápticas del estriado (ST) que pueden mitigar la pérdida progresiva de la inervación dopaminérgica (Song y Haber, 2000; Zigmond et al., 1990). Además, debido a la afectación de otras poblaciones celulares y circuitos nerviosos, se producen otra serie de síntomas, normalmente no identificados como propios de la EP, tales como trastornos del sueño, depresión, ansiedad, apatía, anosmia, estreñimiento, demencia...

Pese a que, en una mayoría de casos, la EP presenta una etiología desconocida, debida a una conjunción de factores tanto ambientales como genéticos, en una décima parte de los casos son factores genéticos los únicos implicados. Hasta el momento se han reconocido hasta 13 *loci* cuyo producto génico se ha relacionado con la aparición de la EP. De entre estos se ha destacado la importancia de los que codifican para los genes de α -sinucleína, parkina, PinK1, DJ-1 y LRRK2 (Thomas y Beal, 2007).

- Ganglios basales:

Los ganglios basales o ganglios de la base son un conjunto de núcleos subcorticales que intervienen en el control del movimiento, debiéndose un importante número de patologías motoras a alteraciones en éstos. Entre ellas destaca la EP. Estos núcleos están compuestos por el ST, compuesto a su vez por el núcleo caudado y el putamen, por el globo pálido (a nivel telencefálico), por el núcleo subtalámico (a nivel diencefálico) y por la sustancia negra y el núcleo pedúnculo-pontino a nivel mesencefálico. Dentro de éstos, es el ST la principal estructura aferente y presenta dos tipos de neuronas:

-Neuronas de proyección. Caracterizadas por tener dendritas ramificadas y espinosas y ser gabaérgicas. Suponen más del 90% de las neuronas estriatales (Albin et al., 1989; DeLong, 1990; Alexander et al., 1986).

-Interneuronas. Caracterizadas por la ausencia o escasez de espinas en sus dendritas.

Así como en primates el ST se encuentra separado del putamen por las fibras de la cápsula interna, en roedores como la rata y el ratón el ST y el putamen no se encuentran separados, de tal manera que el ST es atravesado por las fibras de la cápsula interna.

El ST envía eferencias a distintos núcleos. Se consideran dos vías, la vía directa y la vía indirecta (Figura 1).

En la vía directa, las proyecciones del estriado se dirigen a la SN, en concreto a la *pars reticulata* y al globo pálido interno (GPi). Las neuronas que emiten estas proyecciones presentan receptores de dopamina D1.

En la vía indirecta, las proyecciones se dirigen al globo pálido externo (GPe). Éste, a su vez envía proyecciones al núcleo subtalámico (NST). Las neuronas que emiten estas proyecciones presentan receptores de dopamina D2.

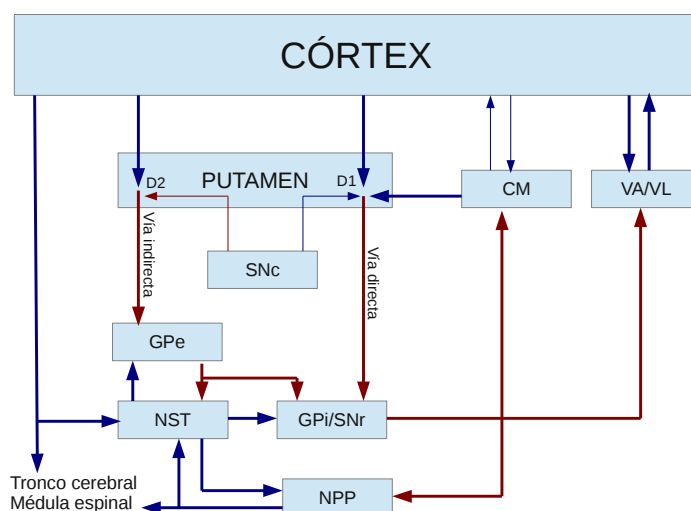


Figura 1: Esquema de los circuitos de los ganglios basales. CM: Núcleo centromediano. Gpi: Globo pálido interno. Gpe: Globo pálido externo. NPP: Núcleo pedúnculo pontino. NST: Núcleo subtalámico. SNc: Sustancia negra de pares compactos. SNr: Sustancia negra *pars reticulata*. VA: Núcleo ventral anterior. VL: Núcleo ventral lateral. Adaptado de Smith et al., 2012.

Las vías directa e indirecta presentan efectos opuestos y la actividad de los ganglios de la base es controlada por su balance. Por lo tanto, desequilibrios en la actividad de estas vías da lugar a trastornos hiperkinéticos o hipocinéticos. Así, la pérdida de dopamina que se produce en la EP causa una desinhibición de las neuronas que contienen GABA y encefalina en el origen de la vía indirecta produciéndose como consecuencia una hiperactividad del globo pálido, seguido de una desinhibición del NST (Obeso et al., 2000). Esto se muestra en la figura 2.

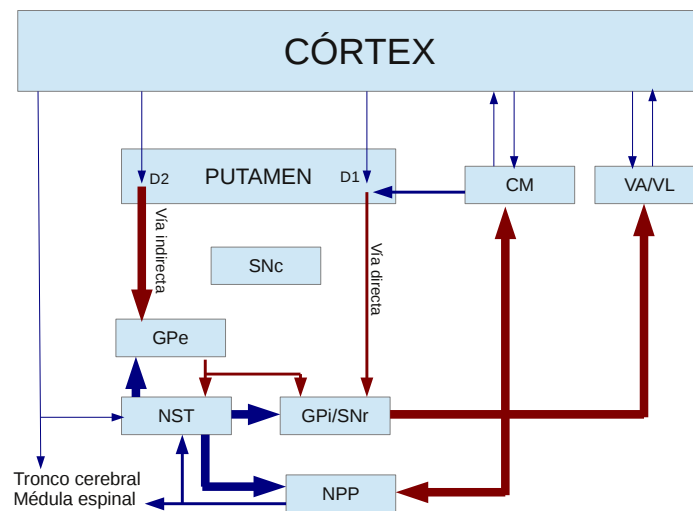


Figura 2: Esquema de los circuitos de los ganglios basales en la EP. CM: Núcleo centromediano. Gpi: Globo pálido interno. Gpe: Globo pálido externo. NPP: Núcleo pedúnculo pontino. NST: Núcleo subtalámico. SNC: Sustancia negra *pars compacta*. SNr: Sustancia negra *pars reticulata*. VA: Núcleo ventral anterior. VL: Núcleo ventral lateral. Adaptado de Smith et al., 2012.

- Etiología de la enfermedad de Parkinson:

La etiología de la EP es, hoy en día, aún desconocida, aunque se asocia tanto a factores genéticos como ambientales. La mayor parte de los casos son idiopáticos y de aparición tardía. Únicamente un 10% es atribuible a factores genéticos. Se ha demostrado que están relacionados con la expresión de un fenotipo parkinsoniano genes que codifican para la α -sinucleína, la ubiquitina carboxil-hidroxilasa-1, la ubiquitina E3 ligasa, la DJ-1, la LRRK2, PinK-1 y VPS35 (Quian et al., 2010; Kumar et al., 2012).

La EP idiopática puede deberse tanto a la predisposición genética como a diferentes factores ambientales. Se considera poco probable que una única causa desencadene la enfermedad. Entre los factores ambientales cabe destacar la exposición a pesticidas y metales pesados (Quian et al., 2010).

No obstante, a día de hoy, la etiología de la EP idiopática, todavía no ha sido dilucidada. Se ha demostrado que en la degeneración de las neuronas dopaminérgicas están implicados mecanismos de disfunción mitocondrial, estrés oxidativo, inflamación, alteraciones del sistema ubiquitin-proteosoma (Labandeira-García et al., 2011), la excitotoxicidad y la carencia de factores neurotróficos.

-Estrés oxidativo:

Durante el metabolismo celular normal se producen reacciones redox que generan radicales libres, entre los que se encuentran algunas especies de oxígeno reactivo (EROs) tales como el ion superóxido. En condiciones fisiológicas normales, la formación de estos radicales libres se ve contrarrestada por la presencia de una serie de mecanismos antioxidantes. Sin embargo, en el caso de la EP este equilibrio se ve alterado y el exceso de radicales libre produce degeneración y muerte celular. Así, se ha demostrado la existencia de peroxidación lipídica y nitración proteica, junto con una clara disminución de moléculas antioxidantes como el glutatión en pacientes con EP. La pérdida preferencial de neuronas de la SN, en comparación con otras neuronas catecolaminérgicas, se asocia también a la presencia de neuromelanina, producto de la autooxidación de la dopamina. En este proceso de autooxidación también se generan EROs. Además, la presencia de cantidades elevadas de hierro en la SN, que contribuye a la producción de radicales libres mediante la reacción de Fenton, lo que a su vez puede potenciar la degeneración selectiva de dichas neuronas. En esta reacción, el peróxido de hidrógeno generado durante el metabolismo normal se transforma en el radical hidroxilo altamente reactivo (figura 3), que puede producir daño celular, peroxidación lipídica y eventualmente apoptosis (Perfeito et al., 2013). Se ha sugerido que la proteína DJ-1 puede actuar como molécula antioxidante ya que ratones que no expresan esta proteína son más sensibles al estrés oxidativo (Guzman et al., 2010).

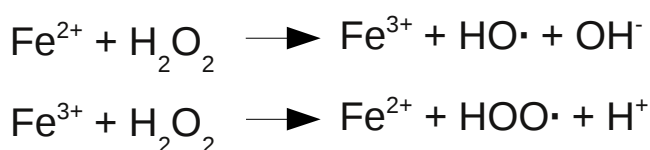


Figura 3: Reacción de Fenton.

-Disfunciones mitocondriales:

Se ha demostrado la existencia de disfunciones mitocondriales en la EP y se ha comprobado que varios genes relacionados con dicha enfermedad regulan la función mitocondrial (Navarro y Boveris, 2009). La cadena respiratoria mitocondrial es la principal fuente de EROs de la célula, siendo los complejos I y III fuente de superóxidos. La inhibición del complejo I incrementa la

cantidad de superóxido producido y el estrés oxidativo causado por este incremento, combinado con la disminución del ATP, podría ser una de las causas de los efectos tóxicos de la rotenona, modelo experimental de la EP, tanto *in vivo* como *in vitro* (Li et al., 2003; Sherer et al., 2003). El mecanismo de acción del MPTP, otro modelo experimental empleado en el estudio de la EP, se basa en la inhibición del complejo I de la cadena mitocondrial (Schapira et al., 1989). Además, modelos de líneas celulares de híbridos citoplasmáticos con deficiencias en el complejo I también manifiestan un mayor estrés oxidativo en comparación con controles (Esteves et al., 2009). Es importante considerar que algunas de las EROs producidas en la mitocondria presentan dificultades para atravesar la membrana interna de la mitocondria, lo que produce un efecto nocivo sobre numerosas moléculas como proteínas encargadas del metabolismo energético y sobre lípidos de membrana que sufren peroxidación. Como consecuencia del daño en los lípidos se produce a su vez la liberación del citocromo C a través de la membrana, que inicia la vía mitocondrial de la apoptosis. Se ha visto que la pérdida de la función del gen PINK1 provoca daños en las mitocondrias (comprobadas mediante el empleo de animales *knock out*) y que mutaciones en dicho gen provocan una forma recesiva de la EP (Gu et al., 2010; Xie et al., 2010; Keane et al., 2011).

-Excitotoxicidad:

La excitotoxicidad es un proceso patológico en el que una excesiva producción de neurotransmisores produce una estimulación excesiva de los correspondientes receptores neuronales, lo que finalmente puede desembocar en muerte neuronal. En el caso de la EP se cree que se produce un incremento del glutamato. Las neuronas de la SNc contienen un gran número de receptores glutamatérgicos y reciben proyecciones glutamatérgicas de la corteza y del NST (Gardoni y Bellone, 2015). La estimulación glutamatérgica del proceso excitotóxico produce la despolarización de la membrana, que provoca un incremento de la concentración intracelular de calcio y una alteración del metabolismo energético de la célula, lo que, a su vez, incrementa el estrés oxidativo y activa la apoptosis (Ambrosi et al., 2014; Mattson, 2007). Además de activar la apoptosis, la excitotoxicidad puede dar lugar a necrosis. En estos casos se ha visto que se produce una estimulación muy intensa del receptor de N-metil-D-aspartato (NMDA), receptor que se une al glutamato cuya activación provoca la apertura de un canal iónico no selectivo, mientras que en el caso de la apoptosis se puede producir una estimulación moderada o crónica del receptor de NMDA (Blandini, 2010).

-Inflamación:

La inflamación es un proceso fisiológico de respuesta frente a un estímulo dañino. Es un proceso multifuncional destinado a proporcionar mecanismos de defensa frente a diferentes tipos de agresiones y que pretende eliminar agentes nocivos e inhibir sus efectos perjudiciales. En el cerebro, son las células de la microglía las responsables de la respuesta inflamatoria. Estas células experimentan como respuesta ante cualquier agente nocivo del sistema nervioso una serie de cambios morfológicos y funcionales, junto con la secreción de citoquinas proinflamatorias y la activación de la sintasa de óxido nítrico, la NADPH oxidasa y la ciclooxigenasa, que provocan daños en otras células y, cuando la reacción microglial es exagerada, la progresión de la enfermedad neurodegenerativa de un modo autoamplificado (Liu, 2006; Liu et al., 2003). La glía que ha experimentado esta serie de cambios se conoce como glía activada. Diversos estudios han revelado la presencia de microglía activada en varias regiones del cerebro de pacientes en estadios tempranos de la EP (Ouchi et al., 2005; Gerhard et al., 2006). También se ha visto un incremento en la activación microglial en análisis *post-mortem* de pacientes (Ghosh et al., 2007) y se ha demostrado que estos incrementos en la activación microglial van acompañados de un incremento en la expresión de citoquinas proinflamatorias.

-Carencia de factores neurotróficos:

Las neuronas y los astrocitos pueden sintetizar moléculas neurotróficas como el factor neurotrófico ciliar (CNTF del inglés *ciliary neurotrophic factor*) o el factor neurotrófico derivado de líneas celulares gliales (GDNF, del inglés *Glial cell-derived neurotrophic factor*). Estas moléculas son proteínas señalizadoras involucradas en la regulación génica del desarrollo, mantenimiento y supervivencia neuronal a través de receptores específicos cuya expresión se incrementa en procesos neurodegenerativos. Así, una reducción en el incremento de su expresión supondría la alteración de un importante mecanismo de defensa lo que podría contribuir a la degeneración celular (Olanow y Tatton, 1999). Estudios en el líquido cefalorraquídeo y en regiones de la vía nigroestriatal de pacientes con EP muestran que los niveles de algunos factores neurotróficos están alterados en comparación con individuos de la misma edad no afectados (Mogi et al., 1999; Nagatsu et al., 2000; Nagatsu y Sawada, 2007). Es por ello que se ha propuesto el empleo de factores neurotróficos

exógenos como agentes neuroprotectores para ralentizar la progresión de la enfermedad (Sullivan y Toulouse, 2011; Diogenes y Outeiro, 2010).

-Alteraciones del sistema proteolítico:

El incorrecto procesado, un exceso de agregación y la formación de depósitos de proteínas son fenómenos presentes en la EP. La acumulación de proteínas dañadas o modificadas debido a un procesado defectuoso afectan al correcto funcionamiento de las neuronas pudiendo desencadenar su muerte. Las neuronas presentan una serie de mecanismos para mantener una correcta homeostasis proteica como son las chaperonas moleculares, el sistema ubiquitin-proteosomal y la cascada autofágico-lisosomal (Ebrahimi-Fakhari et al., 2012). Las chaperonas son proteínas que participan en el correcto ensamblaje de otras estructuras macromoleculares. Se cree que intervienen en las alteraciones del plegado de la α -sinucleína con lo que podrían favorecer la formación de agregados como los cuerpos de Lewy (Ebrahimi-Fakhari et al., 2013). El proteosoma es un complejo proteico con actividad proteasa dirigida a proteínas señalizadas con ubiquitina. La parkina cataliza la ubiquitinación de las proteínas dañadas al unirles la ubiquitina. Mutaciones en los genes que codifican para estas proteínas se han asociado con la aparición de EP familiar (Shimura et al., 2000). La cascada autofágico-lisosomal consiste en una serie de eventos que lleva finalmente a la degradación de las organelas o las proteínas intracelulares en lisosomas (Wong y Cuervo, 2010). Se ha observado una acumulación de vacuolas autofágicas en la SN de pacientes con EP, Esto podría ser atribuido a fallos en el sistema ubiquitin-proteosomal o a un recambio anómalo de vacuolas autofágicas. Estudios recientes confirmaron la asociación de moléculas autofágicas o lisosomas con la agregación de la α -sinucleína en la EP (Crews et al., 2010; Dehay et al., 2010; Chu et al., 2009).

-Sintomatología y neuropatología de la enfermedad de parkinson:

Los síntomas característicos de la EP se deben a la pérdida de la regulación motora y son principalmente temblor, bradicinesia, rigidez articular e inestabilidad postural. En los casos más extremos pueden llegar a darse periodos de acinesia en los que los pacientes apenas son capaces de ejecutar movimiento alguno. Debido a que otras poblaciones neuronales se ven afectadas pueden presentarse además depresión, ansiedad y trastornos del sueño. Los pacientes también pueden manifestar otros síntomas menos específicos serían la anosmia y el estreñimiento. Muchos

pacientes, además, presentan también disfunciones cognitivas, apareciendo demencia en los casos más severos.

Aunque las formas esporádica y familiar de la EP difieren en varios aspectos clínicos y patológicos, ambas presentan anormalidades bioquímicas similares a nivel cerebral. La principal característica neuropatológica de la EP es la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la SNc. Sin embargo, la neuropatología no se restringe exclusivamente a este núcleo, sino que se han observado cambios degenerativos en otros núcleos ya tengan poblaciones dopaminérgicas o no (Przedborski, 2005).

Además de la degeneración neuronal, hay otro fenómeno histopatológico que es la aparición de los cuerpos de Lewy, descritos por primera vez por Lewy en 1912. Éstos son agregados proteicos eosinofílicos intracelulares que se encuentran en las neuronas de la SNc, el *locus coeruleus*, el hipotálamo o la corteza cerebral (Jellinger, 1987; Kopin, 1993). Están compuestos por proteínas tales como la α -sinucleína, la parkina, la ubiquitina y neurofilamentos (Dickson et al., 2009; Wolters, 2009). Cabe mencionar que existen casos de individuos, que aun presentando toda la sintomatología típica de la EP, no muestran presencia de cuerpos de Lewy en los exámenes *post-mortem*. La función de los cuerpos de Lewy no está clara, ya que tanto podrían proteger a la célula acumulando proteínas potencialmente dañinas como podrían causar la degeneración de ésta (Jellinger, 2009).

1.1.2-Modelos experimentales de la enfermedad de Parkinson

La existencia de modelos experimentales es un requisito *sine qua non* para la investigación de la EP. Idealmente, estos modelos deberían reproducir las características de la enfermedad en humanos para con ello permitir investigar tanto la etiología de la enfermedad como la eficacia de nuevas estrategias neuroprotectoras o terapéuticas (von Bohlen und Halbach, 2005; Duty y Jenner, 2011).

- Modelos *in vivo*:

Los primeros modelos desarrollados empleaban fármacos que producían la depleción de la dopamina como la α -metil-p-tirosina (AMPT) o la reserpina, que inhibe el transporte vesicular de monoaminas. La sobredosis de reserpina produce unos síntomas motores similares a los de la EP (Heikkila et al., 1989). Este modelo presenta el inconveniente de no ser selectivo, presentando efectos noradrenérgicos y serotoninérgicos. Tampoco produce neurodegeneración y los animales empleados presentan respuesta a la administración de amfetamina. El AMPT presenta inconvenientes semejantes.

- 6-Hidroxidopamina (6-OHDA): Es uno de los modelos más utilizados. La 6-OHDA fue aislada por primera vez en los años cincuenta y empleada para lesionar las vías dopaminérgicas nigroestriatales ya en los años sesenta (Ungerstedt, 1968). Existen varias especies susceptibles a la 6-OHDA, entre ellas ratones, gatos, perros y monos, pero donde más se emplea es en ratas. Su similitud estructural con la dopamina hace que sea captada por el transportador de dopamina de las neuronas dopaminérgicas. Una vez dentro de la célula, la 6-OHDA se acumula en el citosol, donde sufre un proceso de autooxidación que da lugar a la formación de elevadas cantidades de radicales libres (Blandini et al., 2008). Además, la 6-OHDA tampoco es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica, con lo que se debe inyectar *in situ*. Se cree también que una activación mitocondrial temprana y EROs derivadas de la activación del complejo NADPH-oxidasa juegan un papel importante en la neurodegeneración dopaminérgica inducida por la 6-OHDA (Rodríguez-Pallares et al., 2007; Soto-Otero et al., 2000).

Debido a que su acción es sobre neuronas catecolaminérgicas en general, se suele emplear junto con un inhibidor de la recaptación de noradrenalina, la desipramina, para proteger a las neuronas

noradrenérgicas (Perese et al., 1989).

Es un modelo imperfecto ya que no manifiesta todos los síntomas, pero sin embargo resulta muy útil para testar terapias sintomáticas, estrategias neuroprotectoras y trasplantes celulares.

-1-Metil-4-Fenil-1,2,3,6-Tetrahidropiridina (MPTP): El MPTP fue sintetizado por primera vez en 1982 y actualmente es uno de los modelos más utilizados. Su capacidad para inducir síndrome parkinsoniano fue descubierta a principios de los ochenta, en un grupo de heroinómanos que se inyectaron esta sustancia de forma accidental, y terminaron mostrando síntomas idénticos a los que presenta la EP. (Burns et al., 1985; Langston, 1985). Posteriormente, y en base a las observaciones de las intoxicaciones descritas, se desarrolló el modelo animal. Se ha demostrado que induce síndrome parkinsoniano en primates (Jenner, 2003), perros, gatos y en determinadas cepas murinas (Hamre et al., 1999), siendo las ratas y algunas cepas de ratones resistentes a sus efectos. Estructuralmente es muy semejante a otros agentes utilizados para conseguir modelos experimentales de la EP, como el paraquat y la rotenona.

El MPTP es altamente lipofílico, por lo que atraviesa con facilidad la barrera hematoencefálica y, por ello, puede administrarse por vía sistémica. Una vez en el cerebro, el MPTP entra en los astrocitos y es metabolizado a 1-metil-4-fenilpiridinio (MPP⁺), su metabolito activo, por acción de la enzima monoamino oxidasa B (MAO-B). El MPP⁺ puede entrar en las neuronas mediante el transportador de dopamina (DAT, del inglés *dopamine active transporter*) y puede almacenarse en vesículas al ser captado por el transportador de monoaminas vesicular (VMAT2, del inglés *vesicular monoamine transporter 2*) (Javitch et al., 1985). Una vez dentro de las neuronas, su toxicidad puede deberse a tres causas.

Puede entrar en el interior de la mitocondria donde interfiere con el complejo I de la cadena transportadora de electrones (Ramsay y Singer, 1986). El MPP⁺ entra en la mitocondria por difusión a través de la membrana interna mitocondrial, gracias a un gradiente de membrana. Una vez dentro de la mitocondria, inhibe la respiración celular al bloquear al complejo I mitocondrial (Nicklas et al., 1985; Suzuki et al., 1990), lo que lleva a una disminución del ATP. Otros estudios han demostrado que el MPP⁺ también puede actuar inhibiendo los complejo III y IV de la cadena transportadora de electrones (Mizuno et al., 1988). La pérdida de energía a través de cada una de estas vías tiene varias consecuencias, entre las que se incluyen la formación de radicales hidroxilo y de radicales libres. Además, el óxido nítrico producido y liberado por las células gliales puede penetrar en las neuronas por difusión simple a través de la membrana. Llegados a este punto, los

radicales libres y el óxido nítrico pueden reaccionar entre sí para dar lugar a peroxinitrito, molécula oxidante muy reactiva (Ischiropoulos y al-Mehdi, 1995; Przedborski et al., 2000; Przedborski y Vila, 2003).

Puede interactuar con enzimas citosólicos, sobre todo si presentan carga negativa (Klaidman et al., 1993).

Puede acumularse en vesículas, expulsando a la dopamina al espacio intercelular, donde ésta puede metabolizarse generando diferentes compuestos incluyendo metabolitos tóxicos, como el 3,4-dihidroxifenilacetaldehído (DOPAL), además de poder ser atacada por radicales superóxido e hidroxilo (Burke et al., 2008; Panneton et al., 2010).

Su administración sistémica en primates da lugar a manifestaciones análogas a las de pacientes con un parkinsonismo bilateral (Langston et al., 1984), mientras que los ratones manifiestan alteraciones diferentes.

-Paraquat: El paraquat es un herbicida ampliamente utilizado en agricultura semejante estructuralmente al MPP⁺. Se cree que sus efectos se deben a la capacidad que posee de generar estrés oxidativo y a la inhibición del complejo I mitocondrial (Allain et al., 2008).

-Rotenona: La rotenona, a diferencia del paraquat tiene actividad insecticida. Es el miembro más potente de la familia de neurotoxinas de los rotenoides que se encuentran en plantas tropicales. La rotenona es altamente lipofílica y cruza la barrera hematoencefálica con facilidad. La exposición crónica a dosis bajas de rotenona produce una inhibición de la cadena de transporte electrónico. Se ha visto que su administración por vía oral presenta baja toxicidad, por lo que se suele administrar por vía parenteral (Inden et al., 2007; Inden et al., 2011). Presenta el inconveniente de no ser selectiva de neuronas dopaminérgicas, afectando a otras poblaciones neuronales.

Tanto la rotenona como el paraquat presentan la ventaja de replicar características de la EP como la agregación de α -sinucleína y la formación de estructuras similares a los cuerpos de Lewy (Höglinger et al., 2003).

- Modelos genéticos: Los primeros modelos genéticos empleados en el estudio de la EP surgieron como consecuencia del descubrimiento que relacionaba a la α -sinucleína con la etiología de la EP. Eran ratones que contenían mutaciones de esta proteína o que sobreexpresaban la α -sinucleína

salvaje. En la actualidad, hay tres tipos de modelos genéticos. Uno de ellos consiste en la delección de genes importantes para el desarrollo o la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas o su fenotipo. Otro modelo se basa en la expresión o delección de genes relacionados con el desarrollo de la forma familiar de la EP. El último modelo se basa en el empleo de vectores virales para posibilitar el control de la expresión de genes o mutaciones conocidas relacionadas con la EP (Meredith et al., 2008).

Los animales experimentales más empleados son ratones (*Mus musculus*) y moscas (*Drosophila melanogaster*), aunque también se emplean ratas (*Rattus norvegicus*) y primates. Las moscas son excelentes modelos genéticos para el estudio de la EP, pero presentan como inconvenientes el hecho de que su sistema nervioso es mucho más simple que el humano y un rango limitado de comportamientos locomotores (Maries et al., 2003). En el caso de los ratones, destacan los modelos transgénicos de α -sinucleína, LRRK2 y parkina (Blesa et al., 2012). Éstos presentan las mismas mutaciones que dan lugar al desarrollo de la EP familiar. Otros animales empleados presentan mutaciones asociadas a procesos inflamatorios o a otras alteraciones relacionadas con el desarrollo de la EP, como es el caso de la cepa murina B6.129P2-*Agtr1tm1Unc/J* que no expresa el receptor AT1. El principal inconveniente de los modelos genéticos es el elevado coste económico que suponen.

-Modelos *in vitro*:

Los modelos *in vitro* permiten estudiar aspectos específicos del proceso neurodegenerativo y caracterizar los procesos bioquímicos y moleculares. Diversos modelos celulares permiten reproducir alteraciones moleculares debidas a mutaciones en proteínas relacionadas con la EP, mientras que otros modelos reproducen los efectos celulares de toxinas como el MPP+, la rotenona y la 6-OHDA. Además, las líneas celulares son útiles para la realización de estudios de *screening* preliminares de posibles compuestos terapéuticos y presentan la ventaja, con respecto a los modelos animales, de tener origen humano. Los modelos celulares deben representar el sistema *in vivo* objeto de estudio lo más exactamente posible (Zeng et al., 2006). Presentan el inconveniente de ser modelos muy simples que no pueden reproducir la funcionalidad de una red neuronal dopaminérgica completa (Alberio et al., 2012).

1.1.3-Tratamiento de la enfermedad de Parkinson

En un principio, la EP se trata de manera farmacológica, pero, a medida que la enfermedad progresa el tratamiento farmacológico es incapaz de revertir los síntomas, por lo que es necesario realizar intervenciones quirúrgicas, entre las que cabe destacar la estimulación profunda y los implantes de células dopaminérgicas.

- Tratamiento farmacológico:

El tratamiento farmacológico de la EP alivia los síntomas motores debidos a un déficit de dopamina en el ST de los individuos afectados. Se basa en la restitución de los niveles de dopamina o en el empleo de agonistas.

El tratamiento de rutina desde finales de los años sesenta ha sido la L-Dihidroxiortofenilalanina (L-DOPA) (Cotzias et al., 1967). La L-DOPA es el precursor inmediato de la dopamina que, a diferencia de esta última es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica. La L-DOPA se transforma en dopamina por mediación de la enzima aminoácido aromático descarboxilasa (AADC). Debido a que la AADC se encuentra en numerosos tejidos periféricos, la L-DOPA se combina con inhibidores de la descarboxilación como la carbidopa y la benserazida que inhiben a la AADC periférica pero no atraviesan la barrera hematoencefálica. De esta forma se incrementa la biodisponibilidad de la L-DOPA en el sistema nervioso central (SNC) a la vez que se reduce su metabolismo periférico (Papavasiliou et al., 1972; Rao et al., 2006).

La terapia con L-DOPA es efectiva durante los primeros años de tratamiento, pero al cabo de 4-6 años presenta fluctuaciones en su actividad (fenómenos *on-off*), en donde se alternan etapas en las que la L-DOPA actúa produciendo discinesias (movimientos involuntarios anormales) con otras en donde la L-DOPA no es efectiva (Obeso et al., 1989).

Una forma de evitar estos problemas es el empleo de agonistas dopaminérgicos como el ropinirol, el pramipexol o la cabergolina (Rascol et al., 2000; Rinne et al., 1998; Shoulson, 2002), inhibidores de la monoamino oxidasa B (MAO-B) como la seleginila (conocida por su nombre comercial deprenyl), inhibidores de la catecol-O-metiltransferasa (COMT) como la tolcapona y entacapona y antagonistas de NMDA y del glutamato (Hauser y Zesiewicz, 2007; Singh et al., 2007).

- Tratamiento quirúrgico:

En las etapas tardías de la enfermedad, cuando las complicaciones derivadas del uso de la L-DOPA son inhabilitantes se emplean técnicas quirúrgicas en el abordaje de la EP.

La primera estrategia neuroquirúrgica que se realizó fue la talamotomía, con la que se conseguía reducir el temblor contralateral (Singh et al., 2007). Este tratamiento fue sustituido por la palidotomía, con la que se obtenía una mejora del temblor contralateral y sobre todo, de las discinesias.

En la actualidad, el principal tratamiento quirúrgico frente a la EP es la estimulación cerebral profunda (DBS, del inglés *deep brain stimulation*) en la que se implanta estereotáxicamente un electrodo en el núcleo elegido para su estimulación eléctrica (Benabid, 2003). La estimulación a alta frecuencia del NST y del GPi, que se encuentran hiperactivos en la enfermedad de Parkinson, produce su inhibición y como consecuencia un claro beneficio motor (Vitek, 2008). Solo del 5 al 10% de los pacientes con EP son candidatos a la DBS, entre otras cosas, debido a las posibles complicaciones inherentes a la técnica y a la diferente respuesta de los pacientes atribuida a variaciones interindividuales y del grado de afectación. Debido a esto se está trabajando en el desarrollo de sistemas basados en implantes de nanotubos de carbono o nanochips (Andrews, 2010).

- Terapia celular:

La terapia celular típica o sustitutiva se basa en el empleo de células para volver a establecer la función perdida por los circuitos neuronales dañados, mediante la sustitución de las neuronas productoras de dopamina que han degenerado durante la patogénesis de la enfermedad por otras nuevas. Esto es de especial relevancia en la EP, en la cual los síntomas se manifiestan cuando ya ha habido una alta degeneración neuronal. Así, la terapia celular se presenta como una estrategia prometedora ya que potencialmente se podría conseguir una importante restauración de la capacidad funcional (Hedlund y Perlmann, 2009).

En la mayor parte de los estudios, las células provienen de tejido mesencefálico ventral de fetos (Subramanian, 2001; Levy et al., 2004), pero esto presenta una serie de inconvenientes, además del dilema ético que plantea su uso. Así, por ejemplo, es necesario emplear una gran cantidad de fetos procedentes de abortos para obtener una cantidad de tejido suficiente como para lograr una mejora significativa de los síntomas. Es por ello que en los últimos años se han buscado fuentes

alternativas al uso de tejido fetal, como por ejemplo el empleo de xenotransplantes (Fink et al., 2000), el uso de células madre o el empleo de células pluripotenciales inducidas (IPSC, del inglés *induced pluripotential stem cells*) (Arenas, 2010; Kim, 2011; Meyer et al., 2010).

-Terapia génica:

Los avances en medicina molecular han permitido el empleo de nuevas estrategias en el tratamiento de la EP. Una de las principales ventajas de esta técnica es que otorga un mayor control biofarmacéutico ya que permite la manipulación de la liberación del producto génico en localizaciones concretas, en las cantidades necesarias y de forma regulada mediante el uso de vectores víricos (adenovirus o lentivirus) o no víricos (lisosomas)(Singh et al., 2007).

En la actualidad hay varios enfoques diferentes al tratamiento de la EP mediante el uso de terapia génica (Hodaie et al., 2007). Uno de ellos busca proveer al ST de los enzimas necesarios para la síntesis de dopamina, como la tirosina hidroxilasa (TH) o la AADC, con lo que se incrementarían los niveles de dopamina. Un segundo enfoque busca la neuroprotección mediante la expresión del factor neurotrófico GDNF en la SN y en el ST (Bjorklund y Kordower, 2010; Feng y Maguire-Zeiss, 2010). Finalmente, un último enfoque sería la manipulación de la función del circuito de los ganglios basales, silenciando la hiperactivación del NST, con lo que se busca convertir las neuronas excitatorias a un fenotipo inhibitorio.

-Terapia neuroprotectora:

Con el fin de retrasar, ralentizar o incluso detener la aparición y la progresión de la EP se estudian diferentes estrategias neuroprotectoras que tienen como diana los mecanismos patogénicos descritos anteriormente.

Una estrategia neuroprotectora se basa en la disminución del estrés oxidativo generado en las neuronas dopaminérgicas (Singh et al.,2007). Para ello se emplean diferentes sustancias antioxidantes como, por ejemplo, las vitaminas A, C y E. El selenio, por su relación con el metabolismo del glutatión también presenta actividad neuroprotectora. Otras sustancias capaces de reducir el estrés oxidativo son los inhibidores de la MAO-B como la rasagilina y la selegilina, además incrementan los niveles de dopamina. También se ha visto que sustancias como la N-acetilcisteína, los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) como el captopril,

quelantes del hierro, melatonina, cafeína o estrógenos presentan actividad neuroprotectora debido a su capacidad de reducir el estrés oxidativo (Lopez-Real et al., 2005; Muñoz et al., 2004; Rodriguez-Perez et al., 2010; Soto-Otero et al., 2002).

Otra estrategia neuroprotectora se basa en la modulación de la función mitocondrial con compuestos como la creatina, molécula que permite la formación de ATP en la célula y que es capaz de almacenar energía química (Bonuccelli y Del Dotto, 2006) y la ubiquinona, componente de la cadena respiratoria mitocondrial, también implicada en la generación de ATP y que presenta propiedades antioxidantes.

También se han probado inhibidores de la liberación del glutamato como el riluzol, antagonistas de receptores NMDA y bloqueantes de los canales del calcio como tratamiento para reducir la excitotoxicidad presente en pacientes de EP (Pivovarova y Andrews, 2010; Bonuccelli y Del Dotto, 2006; Rodriguez et al., 1998).

Una cuarta estrategia consistiría en compensar la carencia de factores neurotróficos mediante el uso de neuropéptidos como el GDNF (Diógenes y Outeiro, 2010; Evans y Barker, 2008; Yasuhara et al., 2007). Otros fármacos ejercen su capacidad neuroprotectora favoreciendo la expresión de factores neurotróficos por parte de células presentes en el propio sistema nervioso (Sanchez et al., 2002). El ejercicio físico también favorece la supervivencia al inducir la expresión y aumentar la disponibilidad de diversos factores neurotróficos dentro y fuera del SN (Villar-Cheda et al., 2009).

Debido al papel que la inflamación tiene en la patogénesis de la EP, el uso de agentes que reduzcan la reacción microglial o moléculas antiinflamatorias como antiinflamatorios no esteroídicos (ibuprofeno, naproxeno) ha mostrado tener efectos beneficiosos (Gao et al., 2011; Bonuccelli y Del Dotto, 2006; Wilms et al., 2007; Richardson y Hossain, 2013).

Para evitar daños por el incorrecto procesado de las proteínas se ha propuesto el uso de inhibidores de la función del proteosoma (Yamamoto et al., 2007). Por otro lado se sabe que el hierro, además de su papel en la generación de EROs, acelera la agregación de la α -sinucleína de modo que agentes quelantes de este metal disminuirían la formación de agregados proteicos (Singh et al., 2007).

Finalmente, otra estrategia neuroprotectora es el bloqueo del sistema renina angiotensina local cerebral. En el cerebro, la interacción de la angiotensina II (AII) con sus receptores tipo 1 (AT1) activa el complejo NADPH-oxidasa, que es la principal fuente intracelular de EROs tras la mitocondria. Se sabe que las oxidasas NADPH-dependientes median aspectos clave relacionados con procesos inflamatorios y estrés involucrados en trastornos asociados al envejecimiento, tales

como la hipertensión, la diabetes y la aterosclerosis. De hecho, el empleo de antagonistas del receptor AT1 de AII (ARA) y de inhibidores de la enzima convertora de angiotensina (iECAs) inhiben la respuesta inflamatoria en el SNC (Benicky et al., 2009; Joglar et al., 2009; Muñoz et al., 2006).



1.2-SISTEMA DOPAMINÉRGICO

1.2.1-Dopamina y metabolitos

La dopamina es un neurotransmisor del grupo de las catecolaminas implicado en procesos cognitivos y emotivos y, sobre todo en el control de los movimientos. Su déficit es la principal característica bioquímica de la EP. Estructuralmente, las catecolaminas se caracterizan por presentar un grupo catecol, es decir un anillo fenólico con dos grupos hidroxilo en orto uno respecto al otro, además de una cadena lateral derivada de la etilamina situada en meta y para respecto de cada uno de los hidroxilos.

La dopamina es metabolizada principalmente por la enzima MAO-B, que puede encontrarse tanto intra como extracelularmente. La MAO-B cataliza la transformación del grupo amino de la dopamina en un aldehído dando lugar a la molécula del DOPAL. El DOPAL, altamente tóxico, es metabolizado por la aldehído deshidrogenasa, dando lugar al ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) (Li et al., 2001).

Otra enzima que está presente en la degradación de la dopamina es la catecol-O-metil-transferasa (COMT). Ésta cataliza la reacción de formación de ácido homovanílico (HVA) a partir del DOPAC. Esta ruta metabólica de la dopamina aparece reflejada en la figura 4.

El DOPAC también puede oxidarse por acción del peróxido de hidrógeno dando lugar a sustancias que pueden destruir a las vesículas de almacenaje de dopamina en la SN. También se ha visto que el DOPAC podría ejercer un efecto pernicioso al ejercer como modulador de la toxicidad debida al óxido nítrico (Nunes et al., 2008).

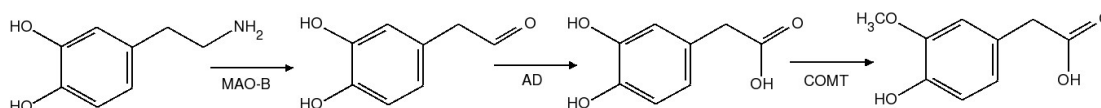


Figura 4: Metabolismo de la dopamina.

Por mediación de la dopamina- β -hidroxilasa, la dopamina también puede dar lugar a noradrenalina, otro neurotransmisor del grupo de las catecolaminas en aquellas células donde este enzima esté presente.

La dopamina ejerce su función en los circuitos neuronales mediante la modulación de la neurotransmisión mediada tanto por el glutamato como por el ácido γ -aminobutírico (GABA). Una vez liberada de las terminales presinápticas, activa una serie de receptores pertenecientes al grupo de los receptores acoplados a proteínas G.



1.2.2-Clasificación de los receptores de dopamina

La dopamina liberada actúa sobre una serie de receptores pertenecientes al grupo de receptores acoplados a proteínas G. Estos receptores generalmente se clasifican en dos grupos. El primero de estos grupos es el que contiene a los denominados receptores tipo D1, que abarca, a su vez, a los receptores D1 y D5, mientras que el segundo grupo es el de los receptores tipo D2, que contiene a los receptores D2, D3 y D4. Esta clasificación se basa en una serie de observaciones realizadas durante los años 70 (Goldberg et al., 1978) en las que se comprobó que la dopamina puede modular la función de la adenilil ciclasa. Así, los receptores pertenecientes al grupo D1 se encuentran acoplados a la adenilil ciclasa mientras que los pertenecientes al grupo D2 no están acoplados a esta enzima (Kebabian y Calne, 1979). La existencia de los diferentes subgrupos se demostró posteriormente mediante técnicas de clonaje genético (Sokoloff et al., 1990; Sugamori et al., 1994; Sunahara et al., 1991; Tiberi et al., 1991). También posteriormente, se comprobó que existían dos isoformas de receptores D2, denominadas D2L (long) y D2S (short), en función de si presentaban o no, una secuencia de 29 aminoácidos en el tercer *loop* intracelular. Además, los diferentes receptores de cada uno de los grupos presentan un alto nivel de homología en sus dominios transmembrana, por ejemplo, entre los D1 y D5 llega a un 80% (Cadet et al., 2010) y entre los D3 y D2 es de un 75% siendo capaces, además, de formar heterodímeros entre sí y con los D1 (Fiorentini et al., 2010; Maggio y Millan, 2010; Maggio et al., 2009).

Aunque los perfiles farmacológicos de los grupos de receptores tipo D1 y tipo D2 son sustancialmente diferentes, dentro de cada uno de estos grupos, los diferentes receptores presentan afinidades de unión a ligandos semejantes, siendo diferencias a destacar, una mayor afinidad por la dopamina de los receptores D5 en comparación con los D1 (Missale et al., 1998; Tiberi et al., 1991; Sunahara et al., 1991) y una mayor diferencia en el perfil de unión a ligandos de D4 frente a D2 y/o D3 que entre D2 y D3 (Rondou et al., 2010).

A nivel genético, la principal diferencia entre los grupos de receptores tipo D1 y tipo D2 es la existencia o ausencia de intrones en sus regiones codificantes. Así los receptores tipo D1 carecen de ellos, característica compartida con la mayoría de receptores acoplados a proteínas G, mientras que sí hay una presencia de intrones en los genes que codifican para los receptores tipo D2 (Gingrich y Caron, 1993).

Funcionalmente, hay varias evidencias que indican que la actividad motora está controlada fundamentalmente por los receptores D1, D2 y D3 (Missale et al., 1998; Sibley, 1999). Estos receptores también están involucrados en procesos de recompensa y refuerzo. Debido a ello el estudio de los receptores de dopamina es un campo de especial interés en la investigación de las drogas de abuso. También se ha visto que los receptores D2, sobre todo en su isoforma D2S regulan la liberación de dopamina, mediante un proceso de retroalimentación negativa (Usiello et al., 2000; De Mei et al., 2009). Por otra parte, las funciones de los receptores D5 y D4 están menos estudiadas, aunque se cree que podrían estar involucrados en algunos aspectos específicos de los procesos cognitivos (Medin et al., 2013).



1.2.3-Distribución de los receptores de dopamina en el cerebro

A nivel general, los receptores de dopamina se expresan, además de en el SNC, en los vasos sanguíneos, las glándulas adrenales, la médula adrenal, los riñones, los ganglios simpáticos y en el corazón, donde realizan diferentes funciones relacionadas con el control de la tensión vascular, liberación de aldosterona, renina y prolactina y el control de funciones renales y gastrointestinales (Aperia, 2000; Carlsson, 2001; Witkovsky, 2004; Li et al., 2006; Iversen e Iversen, 2007; Villar et al., 2009). En el cerebro, la distribución de los receptores difiere dependiendo del tipo de receptor del que se trate. En líneas generales los receptores tipo D1 se encuentran en mayores proporciones que los tipo D2 excepto en los ganglios basales, donde se expresan cantidades similares de cada uno de ellos (Hall et al., 1994).

-Receptores tipo D1:

Los receptores D1 son los receptores de dopamina que presentan una mayor distribución, encontrándose en mayores densidades en el caudoputamen, el *nucleus accumbens*, la SNr y el bulbo olfatorio. Tal y como se menciona en el apartado 1.1.1 las interneuronas de la vía directa expresan este tipo de receptores. Densidades menores se encuentran en el acueducto, el tercer y el cuarto ventrículo, en núcleo entopeduncular y el núcleo intersticial de la estría terminal. En el ST, los receptores D1 colocalizan con DARPP-32 en las neuronas espinosas (Langley et al., 1997). En el núcleo entopeduncular y en la SNr se localizan preferentemente en neuronas GABAérgicas (Gerfen et al., 1990; Le Moine et al., 1991). Hay una gran densidad de este tipo de receptores en las espinas dendríticas (Hersch et al., 1995). Suelen encontrarse postsinápticamente en las neuronas espinosas medianas (MSN, del inglés *medium spiny neurons*). También se encuentran en las capas granular interna y plexiforme del bulbo olfatorio y en los núcleos intercalado y basolateral de la amígdala (Levey et al., 1993).

En lo que se refiere a los D5, estos se expresan en baja intensidad en múltiples regiones cerebrales, incluyendo las neuronas piramidales del córtex prefrontal, el córtex premotor, el córtex cingulado, el córtex entorrinal, la SN, el hipotálamo, el hipocampo, el giro dentado y el tubérculo olfatorio (Missale et al., 1998; Khan et al., 2000; Muly et al., 2010).

A nivel celular, estos receptores tienen una distribución fundamentalmente postsináptica aunque tienen cierta expresión a nivel presináptico. En las neuronas piramidales, los receptores D1 tienen una mayor expresión en las espinas dendríticas y los D5 en los tallos dendríticos (Bergson et al., 1995).

-Receptores tipo D2:

A diferencia de los anteriores, los receptores tipo D2 se expresan tanto a nivel postsináptico como presináptico, actuando estos últimos como autorreceptores y regulando la liberación de dopamina de sus terminales.

Los receptores D2 son los receptores más habituales dentro de los receptores tipo D2. Se encuentran, sobre todo, a nivel del tubérculo olfatorio, en el núcleo accumbens y en el ST. También se expresan en la SN, el área tegmental ventral, el hipotálamo, el hipocampo, las áreas corticales y la amígdala (Beaulieu et al., 2011; Missale et al., 1998; Seeman et al., 2006; Seeman, 2006; Khan et al., 1998). Estos receptores se expresan en las MSN que proyectan al GPe, en las neuronas de la vía indirecta. Hay un grupo de MSN que expresan tanto receptores D1 como D2, su porcentaje se estima entre un 5-15% en el ST dorsal (Beaulieu et al., 2011; Valjent et al., 2009). A nivel celular, los receptores D2 se encuentran, en el caso de las MSN estriatales, en mayores cantidades en las espinas y cabezas dendríticas que en los somas. En la SNc se encuentran alrededor del núcleo y en dendritas.

Los receptores D3 presentan un patrón de distribución más limitado que los D2. Los niveles más altos de expresión de estos receptores se dan en las áreas límbicas, como el tubérculo olfatorio, la corteza del núcleo accumbens y las islas de Calleja (Sokoloff et al., 1992; Beaulieu et al., 2011; Missale et al., 1998). También se encuentra, aunque en concentraciones menores en el ST, la SNc, el área tegmental ventral, el hipocampo, el área septal y en varias zonas de la corteza. En el ST, se encuentran en el putamen ventral, el caudado ventral y el GP, encontrándose solo receptores D2 en las zonas dorsales (Seeman et al., 2006). A nivel celular, los receptores D3 se expresan tanto como autorreceptores como receptores postsinápticos (Nakajima et al., 2013; Diaz et al., 2000). Se puede encontrar en los árboles dendríticos de las células de Purkinje (Diaz et al., 2000; Diaz et al., 1995). Se ha visto que estos receptores suelen hallarse, además de en las dendritas, en la zona perinuclear y en axones cortos, encontrándose en mucha menor medida en los axones de las neuronas de

proyección (Diaz et al., 1995).

Los receptores D4 son los que presentan una menor distribución de entre todos los receptores de dopamina. Se ha visto que se expresan en el cortex frontal, la amígdala, el hipocampo, el hipotálamo, el GP, la SNr y en el tálamo (Beaulieu et al., 2011; Missale et al., 1998; Rondou et al., 2010). En el córtex y en el hipocampo se encuentran tanto en células piramidales como no piramidales (Defagot et al., 1997). A nivel celular, los receptores D4, a diferencia de los otros receptores tipo D2 presentan una distribución fundamentalmente postsináptica en las espinas y los conos dendríticos. Se cree que estos receptores podrían proyectar de vuelta a la SN, pudiendo ejercer cierto control en la transmisión dopaminérgica (Rondou et al., 2010).



1.3-SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA

El sistema renina angiotensina (SRA) es un sistema hormonal, que a rasgos generales regula la presión sanguínea y la homeostasis del sodio y del agua en el organismo. Es uno de los sistemas hormonales más antiguos filogenéticamente y fue descrito por primera vez por Tigerstedt y Bergman en 1898. Está formado por una familia de péptidos bioactivos con distintas actividades biológicas, entre los cuales destaca la AII. Ésta es generada por la acción secuencial de dos enzimas (la renina y la ECA) sobre la glicoproteína precursora. Esta glicoproteína precursora es el angiotensinógeno. La hidrólisis del angiotensinógeno por la renina en el N-terminal da lugar a un decapeptido inactivo biológicamente que es la angiotensina I (AI). La AI sufre una nueva hidrólisis por parte de la ECA, esta vez en el extremo C-terminal, dando como resultado un octapéptido que es la (AII). Sobre la AII actúan diversas angiotensinasas que la escinden en fragmentos que pueden, o no, tener actividad biológica. Ejemplos de estos fragmentos serían la angiotensina 1-7, la angiotensina III (2-8) y la angiotensina IV (3-8) (Figura 5).

En la actualidad se sabe que además del SRA sistémico o clásico existen SRA locales en diferentes tejidos entre los que se incluyen el corazón, el riñón, el páncreas, el aparato reproductor, el sistema linfático, el tejido adiposo y el cerebro (Benigni et al., 2010). Estos sistemas pueden operar de manera independiente, como es el caso de las glándulas adrenales y el cerebro, o interaccionando con el SRA general o periférico, como es el caso de corazón y riñón. Recientemente, se ha visto que en el interior de algunas células se encuentran todos los componentes del SRA, con lo que se sospecha de la existencia de un SRA intracelular o intracrino (Kumar et al., 2007; Kumar et al., 2012; Re y Cook, 2006). La actividad de la AII está mediada por dos tipos de receptores celulares, los receptores de AII tipo 1 (AT1), los cuales, en roedores presentan las isoformas AT1a y AT1b (Premer et al., 2013), y por los receptores tipo 2 (AT2) (Jones et al., 2008; Unger et al., 1996).

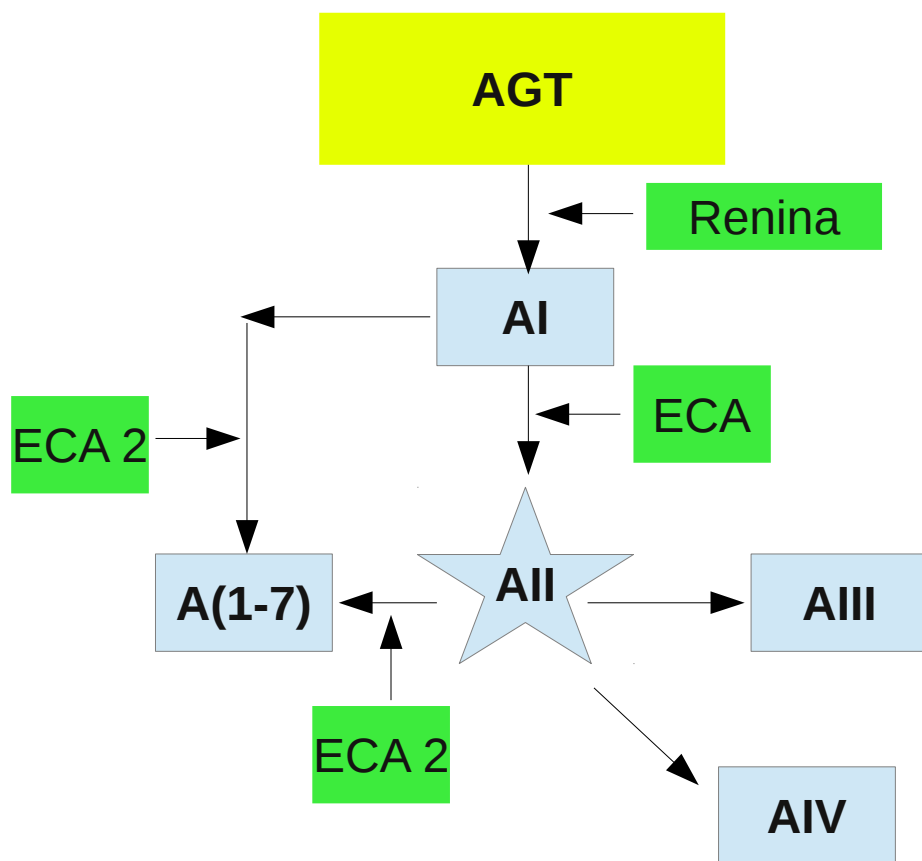


Figura 5: Representación esquemática del SRA.



1.3.1-Sistemas renina-angiotensina locales

Como se ha mencionado anteriormente, se sabe que hay diferentes SRA locales que actúan en diversos tejidos. En cada uno de los tejidos en los que se encuentran, los SRA locales ejercen diferentes funciones y pueden operar de manera independiente. El estudio de estos SRA locales ha puesto de manifiesto la existencia de efectos de la AII completamente diferentes a los del sistema clásico.

-Riñón:

En el riñón, la AII se forma a partir del angiotensinógeno circulante y de la AI, así como también a partir de angiotensinógeno sintetizado en las células tubulares proximales (Bader, 2010; Darby et al., 1995; Ingelfinger et al., 1990). Además, el riñón es el órgano donde se producen las mayores cantidades de renina, que es la enzima limitante en la cascada del SRA (Bader y Ganten, 2000). Ésta es secretada principalmente por las células yuxtaglomerulares al intersticio renal y a la circulación sistémica. Funcionalmente, la activación por parte de la AII de los receptores AT1 locales provoca una serie de efectos que llevan a un incremento de la presión sanguínea (Bader, 2010; Navar et al., 2000; Wolf et al., 2003). En general, los efectos de la estimulación de los receptores AT2 son los opuestos a los mediados por los receptores AT1 (Siragy, 2010).

Se ha comprobado que hay una serie de interacciones entre el SRA y el sistema dopaminérgico a nivel renal independientes de las interacciones que se puedan producir en otros tejidos (Carey 2001). Así, la AII regula la metabolización renal de la dopamina mientras que la activación de los receptores D1 provoca cambios en la expresión de los receptores AT2 en diferentes partes del riñón, regulando la reabsorción de sodio (Choi et al., 2009; Padia et al., 2012). También se ha visto que la activación de los receptores D4 disminuye la expresión de receptores AT1 en las células tubulares proximales y que los receptores D3 interactúan con los AT2 en la regulación de la diuresis y la natriuresis (Chen et al., 2015; Yang et al., 2015).

- Pared vascular:

Se ha detectado la presencia de ARN mensajero de angiotensinógeno en la pared vascular,

junto con la producción de AII. La renina, por otra parte, es la circulante (Müller et al., 1995; Bader, 2010). Además, se ha comprobado que en las células endoteliales, la ECA genera AII que interacciona con los receptores AT1 para inducir la contracción del tejido muscular liso. Dichos receptores se encuentran en las células musculares lisas. Los receptores AT2 se encuentran en las células endoteliales.

Funcionalmente, la activación de los AT1 en la pared vascular produce vasoconstricción. Además, se incrementa la producción de EROs en el músculo liso vascular. El efecto de la activación de los AT2 es exactamente el opuesto (Bader, 2010; Danyel et al., 2013; De Mello y Frohlich, 2014).

- Corazón:

En el corazón, la AII puede ser generada, además de por la ECA, por quimasas derivadas de mastocitos. La renina es captada del plasma y retenida en el tejido, pero también puede ser producida por los mastocitos. La ECA se produce en los fibroblastos cardíacos y en las células endoteliales coronarias (Katwa et al., 1995). Los receptores AT1 se expresan en miocitos, fibroblastos y en las terminales nerviosas simpáticas (Bader, 2010). Se ha comprobado en tejido de rata que los receptores AT2 se localizan en los vasos coronales y en el miocardio (Wang et al., 1998). A nivel funcional, la estimulación de los receptores AT1 provocaría hipertrofia cardíaca y fibrosis, mientras que la estimulación de los receptores AT2 tendría efectos opuestos (Bader, 2010). Las interacciones que se producen entre el sistema dopaminérgico y el SRA en el corazón suelen relacionarse con la regulación de la presión sanguínea mediante la alteración del ritmo cardíaco, en donde los receptores del tipo D1 tienen efectos hipotensores (Perez-Olea, 1981; Asghar et al., 2011).

A nivel general, se puede decir que los efectos de los receptores AT2 son los opuestos de los efectos de los AT1, siendo estos últimos los que presentan, tanto a nivel general, como en cada uno de los tejidos mencionados, los efectos tradicionalmente asociados con la estimulación del SRA. También se puede decir que las interacciones entre los sistemas dopaminérgico y SRA renales y cardíacos se relacionan con la regulación de la presión sanguínea y de la diuresis.

1.3.2-Angiotensinógeno y angiotensina

-Angiotensina II:

Como ya se ha mencionado, la AII es un octapéptido producido por la acción de la ECA sobre la AI, que pierde sus dos residuos C-terminales. A nivel sistémico, la AI es producida a su vez a partir del angiotensinógeno circulante. A nivel sistémico la AII manifiesta su función clásica de regulación de la presión sanguínea (von Bohlen y Halbach, 2006). En lo referente a los sistemas locales, la AII ejerce diferentes funciones en ellos, entre las que se incluyen efectos proliferativos, proinflamatorios y profibróticos. Además de estos efectos, y de aquellos mencionados en el apartado 1.3.1, la AII puede activar vías de señalización intracelulares que desembocan en daño tisular. Nuestro grupo, y otros, en los últimos años ha demostrado como la AII es uno de los principales inductores de inflamación y estrés oxidativo en el cerebro, demostrando que la AII mediante los receptores AT1 activa al complejo NADPH microglial y exagera la respuesta inflamatoria glial (Joglar et al., 2009; Rey et al., 2007; Rodríguez-Pallares et al., 2008) relacionando de esta manera el SRA cerebral con diferentes procesos neurodegenerativos (Ruster y Wolf, 2006; Mertens, 2010; Labandeira-García et al., 2011).

-Angiotensinógeno:

El angiotensinógeno es una glicoproteína que, a través de sucesivos cortes por diferentes rutas da lugar a diferentes péptidos pequeños, siendo el más importante de ellos la AII. El gen del angiotensinógeno está muy conservado en los vertebrados (Takei et al., 2004). En humanos es gen presenta una copia única, que se encuentra a 20 Mb del final del brazo largo del cromosoma 1 (1q42.2). Es una secuencia de más de 10000 pares de bases, que contiene 5 exones y 4 intrones. La proteína madura sintetizada presenta 452 aminoácidos, siendo los 10 primeros aminoácidos de la proteína los que conforman el péptido AI. El angiotensinógeno, debido a que puede sufrir glicosilación variable, presenta cierta heterogenicidad. Así, en humanos presenta cuatro posibles sitios donde sufrir la glicosilación: la Asn14, la Asn137, la Asn 271 y la Asn295 (Wu et al., 2011; Gimenez-Roqueplo et al., 1998). La formación de un puente disulfuro entre la Cys18 y la Cys138 en el angiotensinógeno humano provoca un plegamiento que permite el acceso de la renina al sitio de corte. También se ha visto que la reacción angiotensinógeno-renina es muy específica. El

residuo de angiotensinógeno resultado del corte por la renina puede poseer propiedades biológicas (Wu et al., 2011; Célérier et al., 2002).

- Angiotensinas III, IV y (1-7):

Tradicionalmente, se creía que la única angiotensina con actividad biológica era la AII. Actualmente, se sabe que otras angiotensinas, que surgen a partir de la eliminación de residuos aminoacídicos de la AII, presentan actividad biológica. Estas angiotensinas son la AIII, la AIV y la A(1-7).

La AIII es un heptapéptido producido por la eliminación del residuo N-terminal de Asp de la AII debido a la acción de la aspartil aminopeptidasa A y la glutamil aminopeptidasa A (Reaux et al., 2001). Se cree que la AIII ejerce efectos similares a los de la AII, al actuar sobre los mismos receptores (Yugandhar y Clark, 2013).

La AIV es un hexapéptido producido por la eliminación del residuo N-terminal de Arg de la AIII. Presenta una escasa unión a los receptores AT1 y AT2, uniéndose preferentemente al receptor AT4 (Vanderheyden, 2009; Wright et al., 1995).

La A(1-7) es un heptapéptido producido a través de una ruta enzimática diferente a la que da lugar a AII, AIII y AIV. Este péptido se forma, bien por acción de un homólogo de la ECA denominado ECA2 sobre la AII, bien por la pérdida de los dos residuos C-terminal de la angiotensina (1-9). La angiotensina (1-9) es producto de la acción de la ECA2 sobre la AI (Santos et al., 1988; Donoghue et al., 2000; Tipnis et al., 2000; Ocaranza et al., 2006). Se cree que, por unión a su receptor, denominado Mas, puede dar lugar a efectos opuestos a los producidos por la unión de la AII a los receptores AT1. Por ello, se cree que la A(1-7) actúa como un posible mecanismo de contrarregulación de los efectos perniciosos de la AII (Santos et al., 2013; Ferreira y Santos, 2005).

1.3.3-Distribución de los receptores de angiotensina en el cerebro

La distribución de los receptores de angiotensina en el cerebro es diferente para cada uno de los tipos de receptores si bien los AT1 son más frecuentes y se expresan en todos los órganos diana de la angiotensina. En el caso de roedores el receptor que tiene una mayor expresión es el AT1a.

-AT1:

El receptor AT1 se expresa en áreas del cerebro involucradas en la presión sanguínea y en la homeostasis de fluidos, como los núcleos paraventriculares y supraópticos, el órgano subfornical, el área postrema y los plexos coroideos (Bunnemann et al., 1992; Allen et al., 2000; Jöhren et al., 1995; Lenkei et al., 1997). Su mayor concentración se da en las zonas circunventriculares, donde la barrera hematoencefálica es menor debido a la presencia de capilares fenestrados. Otras áreas donde se encuentran los receptores AT1 son el cortex piriforme y entorrinal, el hipocampo, la amígdala, el caudoputámen, el área medial septal, el tálamo anterior, el hipotálamo, el mesencéfalo, incluyendo la SN, y la oliva (von Bohlen und Halbach y Albrecht, 2006; Garrido-Gil et al., 2013). A nivel celular se localizan tanto presinápticamente como postsinápticamente. La activación de los receptores presinápticos facilita la liberación de transmisores (Dupont y Brouwers, 2010; Tagawa y Dampney, 1999).

-AT2:

La distribución de los receptores AT2 en el SNC presenta variaciones de una especie a otra (Aldred et al., 1993; MacGregor et al., 1995; Lenkei et al., 1996). En ratas se expresa predominantemente en ciertas partes del sistema límbico, en los núcleos talámicos, en el NST, en el complejo olivar inferior, el núcleo motor hipogloso y en numerosos núcleos del tronco cerebral y del cerebelo (Lenkei et al., 1997). En el cerebro humano, la mayor concentración de receptores AT2 se encuentra en la capa molecular del cerebelo, aunque también se expresan en grandes cantidades en el mesencéfalo, sobre todo en la SNC y, en menor medida, en el área tegmental ventral (Allen et al., 1999; MacGregor et al., 1995; Garrido-Gil et al., 2013). Se cree que a nivel celular se pueda expresar tanto en los terminales nerviosos eferentes del núcleo rojo que van al complejo olivar como en los terminales aferentes de otras regiones (Premer et al., 2013).

1.3.4-Modulación farmacológica del sistema renina-angiotensina

Los dos tipos principales de fármacos que tienen como diana terapéutica al SRA son los iECAs y los antagonistas del receptor AT1 (ARAs). En los últimos años, han aparecido otro tipo de fármacos que actúan sobre el SRA como son los inhibidores de renina, prorenina y de la aminopeptidasa A (Friedrich y Schmieder, 2013; Ichihara et al., 2010; Guang et al., 2012; Marc y Llorens-Cortes, 2011) y también se ha propuesto el receptor AT4 como posible diana terapéutica para el tratamiento de desórdenes cognitivos, tales como la enfermedad de Alzheimer (Hallberg, 2009; O'Caomh et al., 2014). En general, a nivel sistémico todos estos fármacos están siendo estudiados o, en el caso de los iECAs y los ARAs son empleados como antihipertensivos y se propuesto su empleo en el tratamiento de insuficiencia cardíaca y de fallo renal (Robles et al., 2014; Viazzi et al., 2013; Mentz et al., 2013).

En líneas generales, la inhibición del SRA cerebral produce un efecto de bajada de la presión sanguínea, regula la liberación de arginina-vasopresina y otras hormonas pituitarias, regula la sed, la natriuresis y el control cardiovascular (Unger et al., 1988; Saavedra, 1992; Fitzsimons, 1998). Además, debido a que existe una mayor actividad del SRA en la SN de animales con alta vulnerabilidad de las neuronas dopaminérgicas a la degeneración, la inhibición del SRA a nivel cerebral podría emplearse como una estrategia neuroprotectora en grupos poblacionales que presenten altas probabilidades de desarrollo de la EP o como coadyuvante en los tratamientos de la EP para disminuir la progresión de ésta (Labandeira-Garcia et al., 2012; Labandeira-Garcia et al., 2013).

- Inhibidores de la ECA:

Los efectos de los iECAs se deben al bloqueo de la conversión de la AI en AII, con la consecuente disminución de la activación de los receptores AT1 y AT2. Al disminuir la activación de los receptores AT1, se consigue una bajada de la presión sanguínea (Li et al., 2014).

Un efecto secundario de estos fármacos es que bloquean la degradación enzimática de la bradiquinina. Se cree que este bloqueo puede tener efectos positivos, aunque también se asocia con el efecto indeseado más común derivado de su empleo, que es el desarrollo de tos irritativa (Joseph y Kaplan, 2005; Semple, 1995). Otro efecto indeseado es que disminuyen la activación de los receptores AT2 y los efectos positivos que de ella se derivan. También se ha sugerido que la ECA

puede hidrolizar otros péptidos como la encefalina, la sustancia P, la dinorfina y la neurotensina (Skidgel et al., 1984; Skidgel et al., 1987).

Se ha comprobado que, a nivel cerebral, el bloqueo de la ECA del SRA local mediante el empleo del captopril disminuye la degeneración dopaminérgica y el estrés oxidativo en modelos murinos de parkinsonismo (Muñoz et al., 2006; Sonsalla et al., 2013), lo que también los hace candidatos para su posible empleo como neuroprotectores en la EP.

- Inhibidores de los receptores de AT1:

Los ARAs ejercen sus efectos por un bloqueo de los receptores AT1, conduciendo finalmente a una bajada de la presión sanguínea (Robles et al., 2014; Catanzaro y Frishman; 2010). Debido a que no bloquean los receptores AT2, estos fármacos evitan uno de los inconvenientes asociados con los iECAs. Además no alteran los niveles de bradiquinina, con los que no producen tos irritativa.

A nivel del SRA cerebral, se ha comprobado que el bloqueo de los receptores AT1 con ARAs produce efectos beneficiosos en una serie de procesos cerebrales en los que el estrés oxidativo y la neuroinflamación son determinantes en el inicio y la progresión de la enfermedad, tales como la enfermedad de Alzheimer (Mogi y Horiuchi, 2009; Hajjar y Rogers, 2013), isquemia y lesión traumática cerebral (Lou et al., 2004; Villapol et al., 2012), esclerosis múltiple (Platten et al., 2009; Stegbauer et al., 2009) y EP, donde se ha visto, además que el empleo de ARAs tiene un efecto neuroprotector en ratas cuya vulnerabilidad dopaminérgica se encuentra incrementada (Labandeira-Garcia et al., 2012; Rodríguez-Pallares et al., 2008; Rodríguez-Perez et al., 2012; Rodríguez-Perez et al., 2013; Villar-Cheda et al., 2012). Hay datos que indican que los ARAs ejercen efectos a nivel cerebral al administrarse de manera sistémica (Gohlke et al., 2002; Gohlke et al., 2001; Nishimura et al., 2000; Song et al., 1999; Polidori et al., 1996) lo que indica que poseen capacidad para atravesar la barrera hematoencefálica, siendo además las dosis a las que se manifiesta el efecto central menores que aquellas a las que se manifiestan los efectos hipotensores a nivel sistémico (Gohlke et al., 2002; Hamai et al., 2006).

- Inhibidores de renina:

Actualmente, el único fármaco de este grupo comercializado es el aliskiren. Éste inhibe el primer paso en la cascada del SRA, la conversión del angiotensinógeno a AI, con la consecuente

reducción en los niveles de los demás péptidos del sistema. El aliskiren se emplea en el tratamiento de la hipertensión y se ha visto que presenta pocos efectos adversos (Staesen et al., 2006; Ferro et al., 2006). Sin embargo, presenta el inconveniente de incrementar las concentraciones plasmáticas de renina en mayor proporción de lo que lo hacen otros fármacos moduladores del SRA, lo que puede dar lugar a efectos rebote más intensos (Aulakh et al., 2007; Sealey y Laragh, 2007).

Además de los grupos de fármacos indicados, que son los más empleados en la modulación del SRA, existen otras posibilidades, como serían el empleo de agonistas de AT₂, el empleo de antagonistas del receptor Mas de la A₁-7 y el empleo de agonistas de AT₄ (Steckelings et al., 2011; Santos et al., 2005; Hallberg, 2009).

Como se ha mencionado, la modulación del SRA disminuye los efectos perniciosos asociados con la neuroinflamación y el estrés oxidativo, pudiendo emplearse como estrategia neuroprotectora en enfermedades neurodegenerativas como la EP. Debido a que en esta enfermedad se ven afectadas las neuronas dopaminérgicas, se vuelve importante comprobar los efectos que pueda tener la modulación del SRA local del cerebro sobre el sistema dopaminérgico nigroestriatal y también los efectos que la modulación del sistema dopaminérgico pueda ejercer sobre el SRA en el cerebro.

1.4-RHO QUINASA

1.4.1-RhoA y ROCK

La proteína Rho pertenece a la familia de las GTPasas pequeñas, que también incluye a las Rac y la Cdc42. Participan en la regulación de la dinámica del citoesqueleto de actina, mediante la modulación de sus moléculas efectoras, como por ejemplo la Rho quinasa (ROCK). Además de la modulación del citoesqueleto, se cree que regulan funciones como la transcripción génica y el metabolismo lipídico. Están activas cuando se encuentran asociadas al guanósín trifosfato (GTP) e inactivas cuando se asocian con el guanósín difosfato (GDP). Cuando están activas se unen a sus efectores que a su vez regulan un gran número de funciones biológicas (Schofield y Bernard, 2013). Son controladas por distintas clases de proteínas reguladoras (Boguski y McCormick, 1993) y su activación está, en líneas generales mediada por la acción de factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (GEF). Estos factores catalizan el intercambio de GDP a GTP, lo que provoca un cambio conformacional en la GTPasa, activándola y permitiendo el acoplamiento a sus efectores. El paso al estado inactivo ligado a GDP desde el estado activo ligado a GTP es llevado a cabo por las proteínas activadoras de las GTPasas (GAP) (Nakamura, 2013). RhoA, un miembro de esta familia, inicia una serie de procesos mediados por ROCK (Katoh et al., 1998; Zhang et al., 2005). ROCK es una serina/treoninquinasa con una masa molecular de 160 kDa (Clerk y Sugden, 2000), de la cual se han descrito dos isoformas diferentes: ROCK I (o ROCK β) y ROCK II (o ROCK α) (Nakagawa et al., 1996). De ellas, ROCK II se expresa preferentemente en el cerebro, mientras que ROCK I lo hace en tejidos como corazón, pulmón y músculo esquelético (Mueller et al., 2005). Tanto ROCK I como ROCK II presentan al menos veinte sustratos diferentes a los que pueden fosforilar en sus residuos de serina o treonina. La mayoría de estos sustratos son proteínas celulares asociadas con la regulación del citoesqueleto de actina (Amano et al., 2010). ROCK también actúa como reguladora de los eventos morfológicos que ocurren durante la fase de ejecución de la apoptosis, incluyendo la contractilidad celular, la formación de invaginaciones en la membrana y la fragmentación de las células apoptóticas (Amin et al., 2013; Shi y Wei, 2007), y diferentes sustratos de ROCK se encuentran involucrados en la regulación de la supervivencia y la muerte celular, entre los cuales se incluyen la PTEN, el Akt, el Bcl-2 y el GSK-3 β . La actividad ROCK se regula mediante el plegamiento del dominio C-terminal de la proteína sobre su dominio quinasa formando un bucle autoinhibitorio que mantiene a ROCK en su estado inactivo. El paso a

un estado activo se produce al tener lugar la unión de la RhoA activada al dominio de unión a Rho de ROCK (Mueller et al., 2005; Schofield y Bernard, 2013) tal y como se muestra en la figura 6.

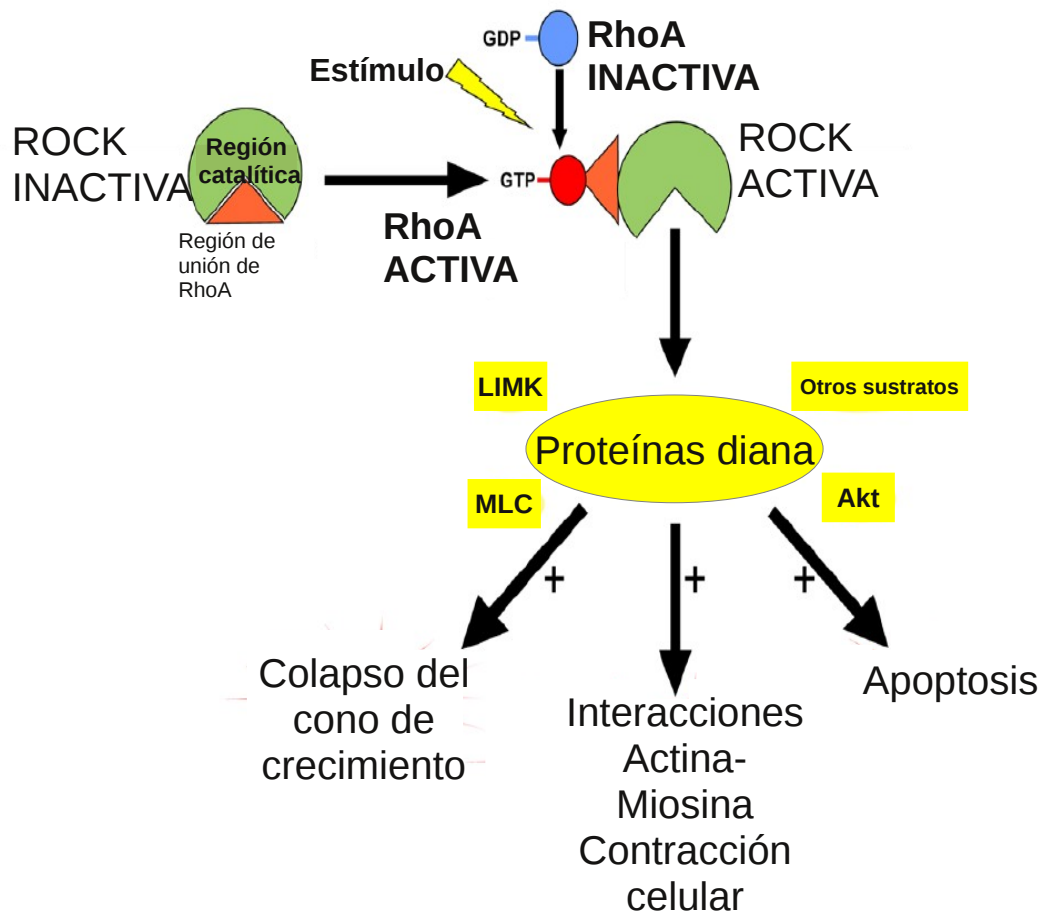


Figura 6. Esquema de los efectos mediados por la ruta ROCK/RhoA. La RhoA activada se une a la región de unión de Rho de la ROCK en respuesta a diferentes estímulos, llevando a la activación de la ROCK. La ROCK activada actúa en diferentes proteínas diana de manera directa o indirecta, como la kinasa LIM(en la imagen LIMK), la cadena ligera de la miosina (en la imagen MLC), la fosfatasa de la cadena ligera de la miosina, la proteína mediadora de la respuesta de colapsina 2, la fosfatasa y tensin homóloga y Akt, y lleva a la reparación del citoesqueleto de actina y a la regulación de eventos apoptóticos. Adaptado de Labandeira-García et al., 2014.

1.4.2- Rho quinasa en la enfermedad de Parkinson

La vía RhoA/ROCK participa en procesos fisiológicos que modulan la proliferación, migración y supervivencia celular. Se ha observado una activación anormal de esta vía en diversos trastornos del sistema nervioso central. Se ha comprobado que lesiones cerebrales y medulares activan ROCK, que se ha revelado como uno de los principales mediadores de la respuesta neuroinflamatoria (Mueller et al, 2005; Sheikh et al, 2009). Sin embargo, todavía no ha sido estudiado si esta vía está implicada en la respuesta inflamatoria observada en los modelos animales de parkinsonismo y también en la EP.

Además, la inhibición de ROCK promueve el desarrollo de las neuritas y tiene funciones estabilizadoras de los axones. La inhibición de los receptores AT1 como la estimulación de los receptores AT2, también promueven el desarrollo y la regeneración axonal (Gallo y Letourneau, 2004; Laflamme et al., 1996; Lucius et al., 1998; Meffert et al, 1996; Reinecke et al., 2003), además de la diferenciación neuronal (Rodríguez-Pallares et al., 2004). Por tanto, es posible la existencia de un mecanismo de interacción entre el SRA y la vía RhoA/ROCK en la promoción del desarrollo axonal. Por otro lado, se ha descrito que el fosfolípido lisofosfatidilcolina puede inducir, a través de la activación de ROCK, una respuesta proinflamatoria en la que participan la activación microglial y la astrocitaria (Sheikh et al., 2009), lo cual podría contribuir a procesos neuroinflamatorios y neurodegenerativos que tienen lugar en la patogénesis de enfermedades neurodegenerativas como la EP.

Se ha sugerido que ROCK participa en la inflamación aterosclerótica y en las lesiones coronarias inducidas por AII (Hiroki et al, 2004; Iida et al., 2008). Sin embargo, no se sabe si la activación de la vía Rho-ROCK desempeña un papel importante en los efectos de degeneración dopaminérgica potenciados por la AII.

1.4.3- ROCK y estrógenos

Los estrógenos presentan un efecto neuroprotector en la EP. De hecho, estudios epidemiológicos han demostrado que la incidencia y la prevalencia de la EP es mayor en hombres que en mujeres premenopáusicas de edad similar. El mecanismo por el cual los estrógenos protegen a las neuronas dopaminérgicas no está del todo claro. Se cree que puede haber una modulación de la respuesta neuroinflamatoria glial por parte de los estrógenos (Morale et al., 2006; Suzuki et al., 2007; Tripanichkul et al., 2006; Vegeto et al., 2008), aunque también se cree que los estrógenos pueden tener efectos antiapoptóticos y tróficos directos (Brendel et al., 2013; Campos et al., 2012; Das et al., 2011; Lopez-Martin et al., 1999). Se ha comprobado que el SRA media los efectos beneficiosos de los estrógenos en diversos tejidos (Nickenig et al., 1998; Dean et al., 2004; Chen et al., 2008). En nuestro grupo, hemos comprobado como el tratamiento con estrógenos en ratas sometidas a menopausia quirúrgicas produce una disminución de la actividad del SRA y del complejo NADPH oxidasa en la SN, observando, también que los estrógenos inhiben la respuesta neuroinflamatoria y la muerte celular en animales tratados con neurotoxinas como la 6-OHDA (Rodríguez-Perez et al., 2012).

1.5-HIERRO Y ENFERMEDAD DE PARKINSON

El hierro es fundamental en el cerebro en procesos como la transmisión y la mielinización y es de especial relevancia su función como cofactor para la enzima tirosina hidroxilasa (TH). Se ha comprobado que en cierto número de desórdenes neurodegenerativos, entre los que se encuentra la EP, se producen alteraciones en los niveles de hierro en el cerebro (Sian-Hülsmann et al., 2011). Es por esto que el mantenimiento de la homeostasis de este metal tiene una especial relevancia a nivel del SNC.

En condiciones fisiológicas normales, existen a nivel celular, un conjunto de proteínas que se encargan de la captación, almacenamiento y liberación del hierro, regulando, por lo tanto su homeostasis. Las proteínas implicadas en estos procesos difieren en los distintos tipos celulares. Así, en neuronas, el hierro es captado por un complejo de transferrina (Tf) y su receptor (TfR). Mientras que en las células gliales, el hierro es captado por sistemas de unión no-transferrínicos, como la recaptación de ferritina con hierro (Leitner y Connor, 2012; Torodich et al., 2009). El TfR se une a la Tf que porta Fe^{3+} , este complejo de Tf es internalizado y llevado al compartimento endosomal donde el Fe^{3+} se reduce a Fe^{2+} . El Fe^{2+} es transportado desde la membrana endosomal al citosol por el transportador 1 de metales divalentes (DMT1). Posteriormente, el Fe^{2+} es liberado desde el citosol al espacio extraneuronal por ferroportina 1 (Fp1).

Cuando se encuentra libre en la célula, el hierro es tóxico (Sian-Hülsmann et al., 2011). Así, una recaptación elevada de hierro, una disminución de su exportación y alteraciones en su almacenaje por la ferritina o por otras proteínas a las que se pueda unir pueden dar lugar a concentraciones elevadas de Fe^{2+} libre. El Fe^{2+} libre puede interactuar con el peróxido de hidrógeno (reacción de Fenton) originando la formación de EROs y de especies reactivas de nitrógeno, y por tanto generando estrés oxidativo a nivel intracelular.

Así, la disfunción de la homeostasis del hierro participa en la EP y en otras enfermedades neurodegenerativas y es posible que los efectos perniciosos asociados a la AII en el cerebro, de alguna manera actúen en la homeostasis del hierro.



JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS



OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de la presente tesis doctoral es abordar el estudio de la relación existente entre el sistema renina angiotensina cerebral y el sistema dopaminérgico nigroestriatal, para conseguir con ello un conocimiento más profundo de la función de estos sistemas y de los mecanismos implicados en la degeneración dopaminérgica potenciada por AII.

OBJETIVOS 1 Y 2

Numerosos estudios muestran como el sistema dopaminérgico se ve alterado durante el envejecimiento normal (Collier et al., 2007; Cruz-Muros et al., 2009; Darbin, 2012). También se ha demostrado la existencia de interacciones a nivel periférico entre el sistema dopaminérgico y el SRA (Chugh et al., 2012; Chugh et al., 2013; Zhang et al., 2012). Nuestro grupo demostró que la sobreactivación del SRA en el sistema nigro-estriatal de ratas macho envejecidas se asociaba a niveles elevados de neuroinflamación, marcadores de estrés oxidativo y una mayor vulnerabilidad dopaminérgica a las neurotoxinas. Estos efectos se inhibían con el tratamiento con el antagonista de los receptores de AT1, candesartán (Villar-Cheda et al., 2012).

Sin embargo, se desconoce si la desregulación de la función dopaminérgica, debida a la edad, es responsable de esa sobreactivación del SRA. Es por ello que los primeros objetivos de esta tesis,

OBJETIVOS 1 Y 2 son los siguientes:

1. Investigar los efectos que los cambios asociados al envejecimiento en el sistema dopaminérgico tienen sobre los SRA nigral y estriatal.
2. Investigar los efectos que tiene sobre el SRA nigroestriatal la manipulación de los receptores dopaminérgicos.

OBJETIVOS 3 Y 4

Si existen mecanismos de contrarregulación entre el SRA y el sistema dopaminérgico es posible que el bloqueo de los receptores AT1, buscando neuroprotección dopaminérgica, pudiese afectar a la función dopaminérgica. Es por ello que nos planteamos como **OBJETIVOS 3 Y 4** de la presente tesis los siguientes:

3. Investigar si la inhibición de los receptores AT1 como estrategia neuroprotectora podría producir una disminución contrarregulatoria en los niveles de dopamina estriatal,

potenciando el parkinsonismo.

4. Investigar si la inhibición de AT1 puede afectar a los niveles de dopamina derivada de la descarboxilación de la L-Dopa en pacientes de EP sometidos a este tratamiento.

OBJETIVOS 5 Y 6

Numerosos estudios han demostrado que los cambios en el SRA tisular están implicados en procesos degenerativos asociados a la edad (Basso et al., 2005; Benigni et al., 2009; Benigni et al., 2012). Nuestro grupo ha demostrado que la AII, a través de receptores AT1, exacerba la muerte dopaminérgica (Joglar et al., 2009; Rodríguez Pallares et al., 2008). Además, también hemos demostrado que el envejecimiento disminuye la microvascularización nigral (Villar-Cheda et al., 2009) e incrementa la actividad del SRA de la SN (Rodríguez-Pérez et al., 2012; Villar-Cheda et al., 2009). Sin embargo, la posible contribución de la sobreactivación del SRA, que se podría producir en el caso de hipoperfusión cerebral crónica, a la degeneración neuronal dopaminérgica se desconoce a día de hoy. Por ello nos planteamos como **OBJETIVOS 5 Y 6** de la presente tesis los siguientes:

5. Estudiar los efectos a largo plazo de la hipoperfusión cerebral crónica en la función dopaminérgica y la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas.
6. Estudiar los efectos a largo plazo de la hipoperfusión cerebral crónica sobre el SRA nigroestriatal e investigar si el bloqueo de los receptores AT1 puede inhibir la degeneración dopaminérgica derivada de la hipoperfusión.

OBJETIVO 7

Como ya se ha mencionado previamente, la AII incrementa la respuesta glial inflamatoria y el estrés oxidativo. Varios autores han demostrado que la vía RhoA/ROCK está implicada en la regulación al alza de varias moléculas que aceleran la inflamación y el estrés oxidativo (Hiroki et al., 2004; Schmandke et al., 2007). De hecho, se ha sugerido que la ruta RhoA/ROCK podría estar implicada en las lesiones coronarias y arterioscleróticas inflamatorias inducidas por la AII. Sin embargo, se desconoce el papel de la activación de la ruta RhoA/ROCK en la degeneración neuronal dopaminérgica mediada por AII. Por ello nos planteamos como **OBJETIVO 7** el siguiente:

7. Investigar si la activación de la ROCK está involucrada en el incremento de la muerte neuronal dopaminérgica inducida por la activación de los receptores AT1 por AII.

OBJETIVOS 8 Y 9

Estudios recientes sugieren que los estrógenos ejercen un efecto neuroprotector frente a la EP. Sin embargo, el mecanismo por el cual tiene lugar este efecto neuroprotector todavía no ha sido dilucidado. También se desconoce si los cambios en la actividad RhoA/ROCK afectan a la mayor vulnerabilidad que presentan las neuronas dopaminérgicas tras la depleción estrogénica y si el SRA está implicado en estos efectos. Por este motivo, nos planteamos como **OBJETIVOS 8 Y 9:**

8. Determinar si el incremento de la actividad del SRA inducido por la depleción estrogénica conduce a un incremento en la actividad de la vía RhoA/ROCK.
9. Determinar si cambios en la actividad de la vía RhoA/ROCK alteran la vulnerabilidad que presentan las neuronas dopaminérgicas tras la depleción estrogénica.

OBJETIVOS 10 Y 11

Se ha demostrado que las disfunciones en la homeostasis del hierro están implicadas en el envejecimiento, en la EP y en otros trastornos neurodegenerativos. Se cree que ello es debido a que incrementos del hierro lábil elevan las EROs y el estrés oxidativo (Snyder y Connor, 2009; Weinreb et al., 2013). Recientemente, se ha comprobado que la administración de AII en ratas provoca la acumulación de hierro y la inducción de ferritina en órganos periféricos como el riñón, el corazón y el hígado (Ishizaka et al., 2002; Ishizaka et al., 2005; Saito et al., 2005). Sin embargo, no se sabe si la AII afecta a la homeostasis del hierro en el sistema dopaminérgico. Es por ello que nos planteamos como **OBJETIVOS 10 Y 11:**

10. Investigar si la AII afecta a la homeostasis del hierro en neuronas dopaminérgicas y en células microgliales, en modelos *in vivo* e *in vitro*.
11. Estudiar si una posible desregulación en la homeostasis del hierro inducida por AII contribuiría a la degeneración dopaminérgica.





MATERIALES Y MÉTODOS



Los materiales y métodos empleados en cada uno de los experimentos realizados, así como el diseño experimental de los mismos, se detallan en cada uno de los artículos que componen la presente tesis doctoral. No obstante, a continuación, se realiza un resumen de los mismos.

3.1-LESIÓN Y TRATAMIENTO DE LOS ANIMALES

Todos los experimentos realizados se llevaron a cabo de acuerdo con el Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, *por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia*, transposición de la Directiva europea 2010/63/EU y fueron aprobados por el correspondiente comité ético de la Universidad de Santiago de Compostela.

3.1.1-Lesión con 6-hidroxidopamina

Las lesiones unilaterales del sistema dopaminérgico en ratas Sprague-Dawley, procedentes del animalario central de la Universidad de Santiago de Compostela, se realizaron mediante la inyección de 12 µg de 6-hidroxidopamina (6-OHDA; Sigma; preparada en 4 µl de salino estéril con un 0,2% de ácido ascórbico) en el fascículo prosencefálico medial derecho. Treinta minutos antes del comienzo de la cirugía, las ratas fueron tratadas con desipramina (Sigma; 25 mg/kg i.p.) para evitar la recaptación de la 6-OHDA por las terminales noradrenérgicas. Para la cirugía, los animales anestesiados con ketamina y medetomidina (0,5 y 75 mg/kg respectivamente) se colocaron en un sistema de estereotaxia (Stoelting), con la cabeza inmóvil y centrada y la barra dental situada en -3,3 mm. La inyección se realizó en las siguientes coordenadas estereotáxicas, de acuerdo con el atlas de Paxinos y Watson de 1986: 3,7 mm posterior respecto al bregma; -1,6 mm lateral respecto al bregma y -8,8 mm ventral respecto al cráneo. La solución de 6-OHDA se inyectó con una microjeringuilla Hamilton de 5 µl acoplada a un inyector automático (Stoelting) a una velocidad de 1 µl/min y, para evitar un posible reflujo, la aguja se mantuvo dos minutos adicionales después de la inyección antes de ser retirada lentamente. Tras retirar la aguja, se procedió al cierre de la piel con grapas. Finalmente, y para favorecer la recuperación de los animales, éstos se dispusieron bajo una fuente de calor. El grado de lesión se comprobó con un test de comportamiento rotacional, y sólo se emplearon en los subsiguientes estudios aquellos animales con denervación total o casi total.

3.1.2-Lesión con MPTP

Las lesiones bilaterales del sistema dopaminérgico se realizaron en ratones hembra o macho C57BL6J (Charles-River) y transgénicos B6.129P2-*Agtr1tm1Unc/J* (Jackson) mediante la inyección intraperitoneal de 30 mg/kg/día de MPTP (Sigma; base libre preparada en una dilución de 30 mg/ml en suero salino). Para favorecer su recuperación, durante las horas que siguieron a cada inyección los animales se mantuvieron a una temperatura ambiente de 37°C y su dieta fue complementada con leche condensada. En los casos en los que se administró el inhibidor de rho-quinasa, Y-27632 (Sigma; 5 mg/kg preparado en salino), esta administración tuvo lugar media hora antes de cada administración de MPTP.

3.1.3-Cirugía de Hipoperfusión Cerebral crónica

La cirugía de hipoperfusión cerebral crónica se llevó a cabo en ratas macho Sprague-Dawley mediante la ligadura de las arterias carótidas comunes con el fin de disminuir el aporte sanguíneo al cerebro. En animales ya anestesiados con ketamina y medetomidina (0,5 y 75 mg/kg respectivamente) se realizó una cirugía en la que, inicialmente, se expusieron las dos arterias carótidas comunes mediante una incisión en la línea media del cuello. Las arterias se aislaron cuidadosamente de la vaina carotídea poniendo especial cuidado en no dañar al nervio vago. Una vez aislada cada arteria fue ligada de forma permanente con seda de sutura de 5/0. Posteriormente, se cerró la incisión mediante sutura. Durante todo el procedimiento quirúrgico, se monitorizó la temperatura rectal de los animales y fue mantenida a 37 ± 0.5 °C mediante una manta térmica. Es necesario tener un cuidado extremo en el procedimiento quirúrgico para minimizar la mortalidad. El porcentaje de mortalidad fue de en torno a un 15-20%. Tras la cirugía, y para facilitar su recuperación, se dejó reposar a los animales bajo una fuente de calor y, además, se les inyectó suero glucosalino para su rehidratación.

3.1.4-Ovariectomía

Hembras de ratón de la cepa C57BL6J y transgénicos *AT1^{-/-}* se ovariectomizaron mediante la realización de una incisión dorsal, limpieza cuidadosa del tejido conectivo y posteriores cortes de la capa muscular, uno en el costado izquierdo y otro en el derecho, a través de las cuales se alcanzaron

los ovarios. A continuación éstos se separaron con una ligadura junto con unos 0.5 cm del cuerno uterino correspondiente y se extrajeron de la cavidad peritoneal. Finalmente se cerró la incisión. Los animales se mantuvieron bajo el calor de una lámpara de infrarrojos y estrictamente monitorizados a fin de facilitar su recuperación. Después de la operación, el pienso empleado como alimento para los animales fue sustituido por pienso sin estrógenos 2014S Teklad Rodent Maintenance Diet (Harlan).

3.1.5-Inhibición del SRA

La inhibición del SRA en modelos experimentales animales se llevó a cabo mediante el empleo del antagonista del receptor AT1, candesartan, que fue administrado, bien por vía oral (Atacand[®], AstraZeneca) o bien mediante inyección intraperitoneal (Sigma). El candesartan oral fue administrado a las ratas disuelto en el agua de bebida o suspendido en manteca de cacahuete en el pienso, dependiendo del experimento. En ratones, la administración se realizó suspendiendo el candesartan en manteca de cacahuete en el pienso. Para conseguir la disolución del candesartan y posibilitar su administración intraperitoneal, el fármaco se disolvió en agua usando como agente codisolvente carbonato sólido y posteriormente, tras la disolución, el pH se ajustó a 8 con HCl.

3.1.6-Tratamiento con L-Dopa

Los animales fueron tratados con L-Dopa (Sigma; preparada en salino) intraperitonealmente. Se administraron dosis de 6 mg/kg/día y de 18/mg/kg/día concomitantemente con 10 mg/kg de benserazida (Sigma). En los casos en los que además se administró Deprenyl (Sigma; preparado en salino), éste se inyectó media hora antes de cada administración de L-Dopa a una dosis de 1 mg/kg.

3.1.7-Tratamiento con 17- β -estradiol

Para el tratamiento con 17- β -estradiol se prepararon una serie de implantes de con tubos Silastic[®] (Diámetro interno=1,47 mm x Diámetro externo= 1,95 mm). Se cortaron fragmentos de 5 mm de longitud que se sellaron en uno de sus extremos con silicona y se dejaron secar durante 30 minutos. A continuación los implantes se llenaron con una mezcla 1:1 de 17- β -estradiol y colesterol (Sigma) y el extremo abierto se selló entonces con silicona (Febo et al., 2005). Se esterilizaron en

etanol 70%, se secaron y se mantuvieron en salino estéril durante, al menos, 12 horas con el fin de evitar el pico inicial de cesión de estradiol y que la liberación se encuentre en el estado estacionario en el momento de su implantación. Este procedimiento de administración estrogénica permite obtener niveles plasmáticos de 17- β -estradiol (E2) similares a los observados en proestro en ratones hembra normales (87 ± 9 pg/ml; Flugger et al., 2000) y también se ha comprobado que los valores de estradiol alcanzados en plasma se mantienen estables durante más de 30 días (Febo et al., 2005).



3.2-TESTS DE COMPORTAMIENTO DE LOS ANIMALES

3.2.1-Comportamiento rotacional

La rotación se evaluó en un rotómetro (Rota-count 8, Columbus Instruments). La asimetría en la rotación se evaluó restando, en cada animal, el número total de rotaciones contralaterales a la lesión (levógiras) del número total de rotaciones ipsilaterales a la lesión (dextrógiras). Las ratas se colocaron en el rotómetro 15 minutos antes de empezar el experimento a fin de aclimatarlas. Para la evaluación de las lesiones de 6-OHDA, a las cuatro semanas post-lesión los animales se trataron por vía subcutánea (en el cuello) con 0,05 mg/kg de apomorfina (Sigma) disuelta en una disolución al 0,02% de ascorbato salino. Se seleccionaron para estudios subsiguientes únicamente aquellas ratas que superaron el umbral de las 200 rotaciones contralaterales netas a la lesión en una hora, es decir, aquellas que obtuvieron un resultado inferior a -200 en una hora, lo que supone una pérdida de al menos un 90% de las neuronas dopaminérgicas.

Las ratas seleccionadas se trataron con L-DOPA al menos una semana tras la inyección de apomorfina. El comportamiento rotacional debido al tratamiento con L-DOPA se evaluó una semana después del inicio del tratamiento con L-DOPA o vehículo (dos semanas después del inicio del tratamiento con candesartan o su vehículo).

3.2.2-Test del cilindro

El uso espontáneo de las extremidades delanteras en las ratas se evaluó mediante el conocido como test del cilindro (Schallert et al., 1997). Las ratas se colocaron en un cilindro de vidrio de 20 cm de diámetro y fueron grabadas en vídeo mientras exploraban el entorno. Para facilitar la observación se colocaron espejos detrás del cilindro. Durante el test se contaron el número de toques que cada animal realizaba en la pared del cilindro con cada pata delantera. En ratas con inervación unilateral, la asimetría se expresa como el porcentaje del número total de toques con la pata izquierda respecto al total de toques con ambas patas delanteras (20 toques). Un animal no lesionado alcanzaría un valor cercano al 50%, mientras que uno lesionado reduciría este % debido a que la lesión disminuye el uso de la extremidad afectada, en este caso hasta valores por debajo de un 20% del total.

3.2.3-Test del Rotarod

El test del rotarod se realizó en una unidad rotarod de 4 carriles automatizada, conectada a un ordenador personal de control del sistema y que posibilita el tratamiento de datos (CR-1 Rotamex System, Columbus Instruments) siguiendo los protocolos establecidos previamente en nuestro laboratorio (Rozas y Labandeira-Garcia, 1997; Rozas et al., 1997). La unidad está formada por un cilindro rotatorio de 7,3 cm de diámetro dividido en diferentes compartimentos o carriles para cada rata. El sistema puede preprogramarse (permite ajustar la velocidad y sus variaciones) y registra la caída del animal, momento en el que se para el cronometraje registrándose el tiempo que el animal permaneció en la parte superior del cilindro. Los animales se entrenaron durante dos días consecutivos, a 5 revoluciones por min (rpm) y durante 10 minutos antes de empezar el experimento. Para el test, las ratas se colocaron en la parte superior del cilindro y se testaron a diferentes velocidades de rotación (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 y 45 rpm). Finalmente, se determinó el tiempo que cada animal permaneció en el cilindro a cada una de las diferentes velocidades. En todos los casos, los tests se realizaron durante tres días consecutivos y se determinaron los valores medios para cada animal a cada velocidad de rotación. Los valores de ORP (del inglés: *overall rotarod performance*) se calcularon a partir del área bajo la curva de la representación tiempo sobre el cilindro *versus* velocidad de rotación (Rozas et al., 1997; Rozas et al., 1998).

3.3-OBTENCIÓN Y TRATAMIENTO DE LOS DISTINTOS TIPOS CELULARES

3.3.1-Cultivos primarios mesencefálicos

Las células mesencefálicas fueron obtenidas de tejido mesencefálico ventral a partir de embriones de rata Sprague-Dawley de 14 días de gestación. Los embriones se extrajeron de la madre, profundamente anestesiada, por cesárea. Para la preparación de la suspensión celular se procedió a la disección de la porción mesencefálica ventral del cerebro, que fue inmediatamente incubada durante 20 minutos a 37°C en 0,05% de ADNasa (Sigma) disuelta en medio esencial mínimo de Dulbecco (DMEM, Invitrogen) con 0,1% de tripsina (Sigma). Seguidamente, se hicieron varios lavados y se disoció el tejido mecánicamente. La suspensión celular resultante fue centrifugada a 50 g durante 5 minutos, tras lo cual se extrajo el sobrenadante cuidadosamente y el pellet se resuspendió en el volumen final requerido. A continuación se procedió a la estimación del número de células viables usando una tinción de naranja de acridina (Sigma) y bromuro de etidio (Sigma). Por último, las células fueron sembradas en placas de 35 mm previamente tratadas con poli-L-lisina (100 µg/ml; Sigma) y laminina (4µg/ml; Sigma) a una densidad de 10×10^5 células/ml de medio de cultivo, mezcla 1:1 de DMEM y medio F12 de Ham (Invitrogen), suplementado con un 10% de suero fetal bovino. Las células se mantuvieron en un incubador humidificado con 5% de dióxido de carbono (CO₂) y a 37°C. Dos días después, el medio fue reemplazado por medio fresco, al cual se le añadió un 1% de una mezcla de penicilina/estreptomicina (Sigma). Los cultivos se mantuvieron desde entonces en un incubador humidificado con 5% de (CO₂) y a 37°C, cambiando el medio cada dos días, durante otros cuatro días, momento en el cual las placas fueron sometidas a los diferentes tratamientos.

3.3.2-Línea dopaminérgica MES23.5

La línea dopaminérgica MES23.5 fue donada por el Dr. Wei-dong Le del Baylor College of Medicine en Texas. Las células se cultivaron en frascos de 75 mm² de superficie en medio DMEM/F12 suplementado con el medio de crecimiento Sato, un 2% de suero fetal bovino, y un 1% de penicilina/estreptomicina en un incubador humidificado con 5% de CO₂ y a 37°C. Para la realización de los experimentos, las células MES23.5 se pasaron a placas de 35 mm, a cubreobjetos de vidrio o a placas de 96 pocillos previamente recubiertas de poli-L-ornitina (Sigma; 10 mg/ml) a una densidad de 0,5 x 10⁵ células/cm². Se estimuló la diferenciación de las células mediante el empleo de dibutilil-cAMP (Sigma, 1mM) al medio de crecimiento y se dejaron crecer hasta valores superiores al 80% de confluencia antes de empezar el tratamiento.

3.3.3-Línea microglial N9

La línea microglial murina N9 fue donada por la Dr. Paola Ricciardi-Castagnoli de la Singapore Immunology Network. Las células fueron cultivadas en medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640; Invitrogen), suplementado con un 5% de FBS, 2 mM de L-Glutamina (Sigma) y un 1% de penicilina/estreptomicina, y se mantuvieron en un incubador humidificado con 5% de CO₂ y a 37°C. Las células N9 se pasaron entonces a placas de 12 pocillos en una cantidad de 0,5 x 10⁶ células/pocillo para western blot y a placas de 96 pocillos en una cantidad de 1,25 x 10⁵ células/pocillo para el análisis de extinción de la señal de PG-SK.

3.4-DETERMINACIÓN DE NIVELES DE ARN mensajero, PROTEÍNAS, NEUROTRANSMISORES Y METABOLITOS

3.4.1-Microdiálisis

Para la implantación de las sondas de microdiálisis en el estriado del lado ipsilateral a la lesión, los animales fueron anestesiados y colocados en un aparato de estereotaxia, con la barra dental a -3,3. Las coordenadas empleadas, de acuerdo con el atlas de Paxinos y Watson de 1986, fueron: 0,6 mm anterior al bregma, -3,5 mm lateral y -6,0 mm ventral respecto al cráneo. Las cánulas guía se fijaron con dos tornillos de acero inoxidable y con cemento dental (TriplexCold, Ivoclar Vivadent). Tras la cirugía, las ratas se mantuvieron separadas hasta la microdiálisis. El día del experimento, a cada animal se le colocó una sonda concéntrica de microdiálisis (CMA 12 elite 4 mm, CMA, Suecia) para inmediatamente colocarlo en el sistema de microdiálisis. Las sondas se perfundieron con solución de Ringer, de composición: 140 mM de NaCl, 3,0 mM de KCl, 1,2 mM de CaCl₂ y 1,0 mM de MgCl₂, a un flujo constante de 1 µl/min. Las muestras se recogieron cada 20 minutos (20 µl) y se inyectaron en un HPLC (del inglés High Performance Liquid Chromatography; Shimadzu LC prominence) para la determinación de dopamina y sus metabolitos. Antes de colocar a los animales se dejó pasar líquido por el sistema de microdiálisis a fin de purgarlo de burbujas. Las muestras se tomaron durante las cuatro horas posteriores a la inyección de L-DOPA, tomándose, además, tres muestras antes de la inyección de L-DOPA que se emplearon para determinar los niveles basales.

3.4.2-HPLC

3.4.2.1-Separación de dopamina y metabolitos

Para la determinación de dopamina, serotonina (5-HT) y sus metabolitos, el tejido estriatal se diseccionó y se guardó a -80°C. El tejido estriatal se homogenizó en una solución al 6% de ácido perclórico en la fase móvil empleada para el análisis, la cual se detalla a continuación, y se centrifugó a 14000 g por 20 minutos a 4°C. Las fracciones de sobrenadante se decantaron, filtraron a través de un filtro de 0,22 µm y se inyectaron en el equipo de HPLC (Shimadzu LC prominente).

En el caso de la microdiálisis, se inyectó el perfusado directamente. La dopamina y sus metabolitos DOPAC y HVA, así como la serotonina y su metabolito, el ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) se separaron en una columna analítica de fase reversa (Walters Symmetry 300 C18). La fase móvil (70 mM KH₂PO₄, 1mM ácido octanosulfónico y 1 mM EDTA en 10% metanol a pH 4) se bombeó a una velocidad de 1 ml/min. La detección se llevó a cabo con un detector electroquímico coulombimétrico (ESA Coulochem III). Los electrodos se configuraron a +50 mV y +350 mV y la celda de guarda a -100 mV.

3.4.2.2-Separación de angiotensinas

Para la separación de angiotensinas el tejido estriatal se diseccionó y se guardó a -80°C. A continuación, se homogenizó en una mezcla 1:3 v/v de HCl 0,18 M y etanol. El homogenado se centrifugó a 15000 g durante 15 minutos a 4°C. Se recogieron los sobrenadantes, que fueron inmediatamente filtrados a través de una columna de extracción en fase sólida Sep Pak (Waters) previamente acondicionada con 1 ml de metanol y 1 ml de agua desionizada. A continuación, las columnas se lavaron con 1 ml de metanol al 5% en agua desionizada y las angiotensinas se eluyeron con 1 ml de metanol puro. Los eluyentes, que contenían las diferentes angiotensinas, fueron recogidos y secados en un concentrador a vacío (Savant ISS110). Las muestras, ya secas, se resuspendieron en 60 µl de una solución de acetonitrilo al 17% en 4 mM de tampón formiato de trietilamonio (TEAF) y 30 mM de ácido fórmico y se inyectaron en el sistema de HPLC. La separación de los péptidos se llevó a cabo en una columna de fase reversa (Walters Symmetry 300 C18) empleando un gradiente de acetonitrilo a 35°C a un flujo de 1,0 ml/min. Para la elaboración del gradiente se emplearon dos soluciones ácidas. La solución A presentaba una concentración 30

mM de ácido fórmico en 4 mM de TEAF, mientras que la solución B consistía en un 90% de acetonitrilo en 4 mM de TEAF con 30 mM de ácido fórmico. Se empleó un gradiente lineal que pasaba de un 11% a un 50% de B en 20 minutos. El eluido se monitorizó mediante detección UV-Vis (Shimadzu SPD-20 AV) a una longitud de onda de 220 nm. Las fracciones de AII, AIII, AIV y angiotensina V (AV) se recogieron mediante un colector de fracción (Shimadzu FRC-10A) y se secaron en un concentrador a vacío. La correcta separación de las diferentes angiotensinas se confirmó mediante espectrometría de masas/masas (Quatro Micro TM API ESCI). Finalmente, los niveles de AII se determinaron por ensayo inmunoenzimático (SPIbio), de acuerdo con las especificaciones del fabricante.

3.4.2.3-Determinación de niveles de 17- β -estradiol

Para la determinación de los niveles de 17- β -estradiol (Fernández et al., 1993; Piwowarska et al., 2010), se procedió a la extracción de sangre a los animales. Ésta fue tratada con una disolución 10 M de NaOH (0,5 ml por ml de sangre) y mezclada por agitación durante 5 minutos. A continuación, la mezcla se sometió a extracción con 5 ml de dietil éter mediante mezclado por inversión durante 10 minutos y posterior centrifugación a 700 g durante 5 minutos. La fase orgánica se llevó a un tubo de vidrio. El proceso se repitió con otros 5 ml de dietil éter. La fase orgánica obtenida se sometió a secado mediante burbujeo de N₂ a 37°C. El residuo seco obtenido tras el secado se redisolvió en 60 μ l de la fase móvil empleada en la separación (indicada a continuación) y se inyectó en el sistema de HPLC. El 17- β -estradiol se separó mediante la utilización de una columna analítica de fase reversa (Waters Symmetry 300 C18). La fase móvil empleada estaba compuesta por 100 mM de KH₂PO₄, un 19% de metanol y un 28,5% de acetonitrilo; y se bombeó a un flujo de 0,5 ml/min. La detección se llevó a cabo mediante detección UV-Vis (Shimadzu SPD 20-AV) a una longitud de onda de 260 nm.

3.4.2.4-Purificación y cuantificación de angiotensinógeno

Para la purificación y cuantificación de angiotensinógeno en cultivos celulares se recogió 1 ml del medio de cultivo, de los diferentes tipos de cultivos celulares estudiados. Los medios de cultivo se calentaron a 37°C y se inyectaron en el sistema de HPLC (20 μ l). La separación de las proteínas se llevó a cabo en una columna de fase reversa (Perkin Elmer Aquapore ODS 300) empleando un

gradiente de acetonitrilo a 37°C y a un flujo de 1,5 ml/min. Para la elaboración del gradiente se emplearon dos diluciones ácidas. La solución A consistía en una dilución al 0,1% de ácido fosfórico en agua, mientras que la solución B consistía en un 90% de acetonitrilo en agua con un 0,1% de ácido fosfórico. La separación se llevó a cabo empleando un gradiente lineal que pasaba de un 6% a un 74% de B durante un período de 40 minutos, que seguía a un periodo inicial de 5 minutos de elución isocrática a un 6% de B (modificado de Andrade et al., 2002). El eluido se monitorizó mediante detección UV-Vis (Shimadzu SPD 20-AV) a una longitud de onda de 240 nm. La fracción correspondiente al angiotensinógeno se recogió mediante un colector de fracción (Shimadzu FRC-10A) y se secó en un concentrador a vacío. La presencia de angiotensinógeno en la fracción se confirmó posteriormente mediante Western-Blot.

3.4.3-Estimación de niveles de MPP⁺ e identificación de angiotensina II por espectrometría de masas

3.4.3.1-Estimación de niveles de MPP⁺

Los estriados diseccionados se congelaron en hielo seco y fueron conservados a -80°C hasta el momento de realización del análisis. El día del ensayo (Hows et al., 2004), se pesaron las muestras estriatales y se sonicaron en una solución al 0,4 M de ácido perclórico que contenía un 0,1% de metabisulfito de sodio, un 0,01% de EDTA y 0,1% de L-Cisteína. Las muestras se centrifugaron a 13000 rpm y los sobrenadantes se emplearon para determinar los niveles de MPP⁺. La separación por HPLC se llevó a cabo en un sistema Waters Alliance 2795 (Waters) empleando una columna Atlantis dC18. La fase móvil consistió en dos soluciones diferentes, A (con un 0,1% de ácido fórmico) y B (acetonitrilo). El perfil de elución se obtuvo con un 95% de A por 1 minuto, seguido de un gradiente lineal que iba de un 95% de A a un 100% de B entre los minutos 1 y 1,5, seguido de un 100% de B hasta el minuto 5. Se empleó un tiempo de re-equilibración de 5 minutos entre inyecciones y se empleó un flujo de 0,2 ml/min. Los eluidos se detectaron con un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo acoplado a un Z-spray (Quattro Micro™ API ESCI). La ionización por electrospray se configuró en modo de polarización de iones positivo (ESI+) para la adquisición de los datos, empleando los siguientes fragmentos (m/z): 170,2>128,0; 170,2>154,4 y 170,2>115,1. El voltaje del capilar se fijó a 3 kV, la temperatura de desolvatación a 450°C, el voltaje del cono a 45 V, y el flujo de gas de desolvatación se estableció en 550 l/h. Todos los parámetros se ajustaron para

obtener condiciones de operación óptimas para la máxima intensidad de los fragmentos seleccionados. Se prepararon patrones para el calibrado de MPP^+ en la solución de homogenización.

3.4.3.2-Determinación de AII

La identificación de la AII por espectrometría de masas se llevó a cabo para comprobar la correcta separación de esta angiotensina en el fraccionamiento por HPLC. Las fracciones ya desecadas se resuspendieron en 100 ml de metanol y se analizaron en un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo acoplado a un Z-spray (Quattro Micro™ API ESCI). La ionización por electrospray se configuró en modo de polarización de iones positivo (ESI+) para la adquisición de los datos. El voltaje del capilar se fijó a 3,5 kV, la temperatura de desolvatación a 300°C, el voltaje del cono a 15-18 V y el flujo de gas de desolvatación se estableció en 1000 l/h. El análisis se llevó a cabo en el modo de detección de ión sencillo (SIR) donde se usaron las m/z 300,6; 311,8; 349,6 y 388,8 para la A(1-7), AIII, AII y AIV, respectivamente (Cui et al., 2007).

3.4.4-Western blot

Las muestras se homogenizaron en tampón RIPA con inhibidores de proteasas (P8340, Sigma) y PMSF (P7626, Sigma). Los homogenados se centrifugaron y la concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford. Se separaron cantidades idénticas de proteína en un gel al 5-10% de Bis-Tris poliacrilamida y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios correspondientes contra los receptores D2 (Santa Cruz), D1 (Frontier), 5HT1B (Santa Cruz), Angiotensinógeno (Santa Cruz) y contra la enzima TH (Sigma). Los secundarios empleados fueron proteína A (GE Healthcare), proteína G (Sigma), chicken Anti-Mouse (Santa Cruz) y donkey Anti-Rabbit (Santa Cruz). La inmunorreactividad se reveló con el kit de quimioluminiscencia Lumminata Crescendo HRP (Millipore) y se detectó en un sistema de detección por quimioluminiscencia (Molecular Imagen ChemiDoc XRS system, BioRad). Las membranas fueron reincubadas con anticuerpos anti-GAPDH como controles de carga. Para cada animal, la expresión de proteína se midió por densitometría de la banda correspondiente y se expresó como valor relativo respecto de la intensidad de las bandas de GAPDH.

3.4.5-PCR cuantitativa

El ARN total de la región de la SN se extrajo con Trizol (Invitrogen), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La concentración de ARN se determinó empleando una placa de Nanoquant y un lector de placas multipocillo Infinite M200. El ARN total se retrotranscribió a ADNc con dNTP(Invitrogen), cebadores aleatorios (Invitrogen), y MMLV (Invitrogen). Los niveles relativos de los mensajeros correspondientes se determinaron mediante PCR cuantitativa. Los experimentos se realizaron en un termociclador iCycler PCR Platform (Bio-RAD). Se emplearon como *housekeeping* los genes de la GAPDH y de la β -actina que se amplificaron en paralelo a los genes de interés. La expresión de cada gen se obtuvo como una medida relativa respecto del transcrito del *housekeeping*. Para determinar la expresión relativa del ARNm, se utilizó el método comparativo $2^{-\Delta\Delta CT}$, donde Ct es el límite de ciclo y los resultados fueron expresados como la media \pm SEM. Los diferentes cebadores F y R para cada uno de los experimentos se diseñaron mediante el empleo del *software* Beacon Designer (Biorad).

3.4.6-Estimación de la actividad ROCK

La actividad de la ROCK en tejido se midió con el kit ROCK Activity Assay (Cell biolabs), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Previamente, el tejido se homogenizó en un tampón de lisis (50 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 1 mM 2-glicerofosfato, 1% Triton X-100, 1mM EDTA; 1 mM EGTA; 1 mM Na_3VO_4) que contiene un cocktail inhibidor de proteasas (Sigma). La concentración de proteínas de los extractos se midió con el kit Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific) y se emplearon cantidades de 5 μg de proteína en el kit. La actividad de la fosforilación se determinó mediante la medición de la absorbancia a 450 nm en un lector multiplacas Infinite M200 (TECAN).

3.4.7-Determinación del hierro lábil en cultivos mediante la extinción de la señal de Phen Green-SK

El hierro lábil se midió mediante la extinción de la señal de fluorescencia del Phen Green-SK (PG-SK). Para llevarla a cabo, las células correspondientes se sembraron en placas de 96 pocillos. Tras el tratamiento, las células se lavaron dos veces en DPBS pretratado con Chelex-100 (Bio-Rad)

y se incubaron con diacetato de PG-SK (Molecular probes; 20 μM) en DPBS durante 20 minutos a 37°C. El exceso de PG-SK se lavó dos veces con DPBS, y la intensidad de la fluorescencia se midió empleando un fluorómetro de microplacas. La longitud de onda de excitación fue de 490 nm y la de emisión de 520 nm. Como control positivo se empleó una disolución de sulfato ferroso (1mM) en una disolución de ácido ascórbico de pH 6.



3.5-INMUNOHISTOQUÍMICA Y TINCIÓN

3.5.1-Inmunohistoquímica simple

Los animales se sacrificaron por sobredosis con ketamina/xilazina y se sometieron a perfusión, inicialmente con salino al 0,9% a 37°C y a continuación, con paraformaldehído al 4% en un tampón fosfato 0,1 M, a pH 7,4, frío. Seguidamente, se extrajeron los cerebros, se lavaron y se crioprotegieron. Posteriormente, se cortaron en un microtomo en secciones de 30 µm de grosor. Las secciones del ST y del mesencéfalo se procesaron para inmunohistoquímica de TH de la manera que se detalla a continuación. Las secciones se incubaron durante una hora en una solución de suero al 10% con un 0,25% de Triton X-100 y un 1% de seroalbúmina bovina en salino tamponado con un 20 mM de fosfato potásico a 4°C y posteriormente se incubaron durante toda la noche a 4°C con un anticuerpo anti-TH (Sigma). A continuación, las secciones se incubaron, inicialmente con el anticuerpo secundario correspondiente y después con el complejo avidina-biotina-peroxidasa (ABC, Vector; 1:100). Finalmente, el marcaje se reveló por tratamiento con un 0,04% de peróxido de hidrógeno, seguido de un tratamiento con un 0,05% de 3-3' diaminobenzidina (DAB, Sigma). Además, series alternas de secciones se tiñeron con violeta de cresilo. El número de células reactivas en tejido se estimó mediante el sistema Olympus CAST-grid.

3.5.2-Inmunohistoquímica doble

Los cultivos que se emplearon para inmunofluorescencia doble crecieron en cubreobjetos y se fijaron con un 4% de paraformaldehído en tampón salino fosfato de Dulbecco (DPBS) o tampón tris salino (TBS) para D1 y D2 a pH 7,4 durante 20 minutos. Los cultivos se procesaron para doble fluorescencia para D2 (1:200), D1 (1:400), TfR (1:200), DMT-1 (1:1000), ferritina (1:500) o Fp1 (1:1000); empleando TH (1:1000), GFAP (1:500), NeuN (1:500), CnPasa (1:100), y OX-42 (1:50) como marcadores celulares para células dopaminérgicas, astrocitos y microglía, respectivamente. Los cultivos se incubaron durante toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios correspondientes, diluídos en TBS con un 2,5% de suero normal de burro. A continuación y tras los lavados correspondientes, se incubaron durante 45 minutos con los anticuerpos secundarios adecuados, Alexa Fluor 568 (1:200) y Alexa Fluor 488 (1:200). Finalmente, se volvieron a lavar en TBS y se montaron con Immumount. La colocalización de los marcadores se confirmó por

microscopía laser confocal (TCS-SP2; Leica) y se usó un método de escaneado secuencial para evitar cualquier solapamiento.

En el caso de tejidos, éstos se procesaron para inmunofluorescencia frente a la ROCK II (1:500) y al CD45 (1:500), TH (1:250) o GFAP (1:250). Las secciones se incubaron inicialmente con el anticuerpo anti-ROCK durante toda la noche a 4°C; y tras lavar con KPBS, las secciones se incubaron con un anticuerpo cabra anti-ratón conjugado con cianina 3.18 (Cy3; Chemicon; 1:500). Para el segundo marcaje, las secciones se incubaron durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo correspondiente. Tras lavar las secciones, éstas se incubaron durante 60 minutos con el anticuerpo secundario correspondiente.

3.5.3-Histoquímica de lectina

La tinción histoquímica de las células microgliales activadas de tejido de ratón se realizó con isolectina de *Griffonia simplicifolia* (GSI-B4; Sigma 20 µg/ml). Las secciones se preincubaron en PBS con un 0,1 mM de CaCl₂, MgCl₂, MnCl₂ y un 0,3% de Triton X-100 durante 20 minutos. Las secciones se lavaron con PBS y se incubaron durante 90 minutos con el complejo de avidina-biotina-peroxidasa. El marcaje se visualizó con un 0,04% de peróxido de hidrógeno y un 0,05% de DAB con un 0,1% de sulfato de níquel para intensificar el marcaje. Los controles negativos se incubaron en una mezcla carente de GSI-B4.

3.5.4-Tinción de Perls

Se montaron secciones de mesencéfalo ventral en portaobjetos recubiertos de polilisina. Se dejaron secar y se rehidrataron a través de una serie de alcoholes de diferente grado, hasta llegar a agua Milli-Q. Las secciones se sumergieron durante 30 minutos en una solución que contenía una parte de una mezcla de 2% HCl en agua Milli-Q con un 1% de Triton X-100 y una parte de una mezcla de un 1% de ferrocianuro en agua Milli-Q con un 0,2% de Triton X-100. A continuación, se realizaron 3 lavados con agua Milli-Q. La actividad de la peroxidasa endógena se inhibió al incubar las secciones en un 3% de peróxido de hidrógeno por 20 minutos, antes de la tinción con DAB. Las secciones que no se incubaron en las soluciones de HCl y ferrocianuro de potasio se usaron como controles negativos. Todas las incubaciones y lavados se realizaron en recipientes de polipropileno limpios. El número de células positivas para hierro en la SN de cada animal se determinaron como

células/mm³ mediante el sistema Olympus CAST-Grid.



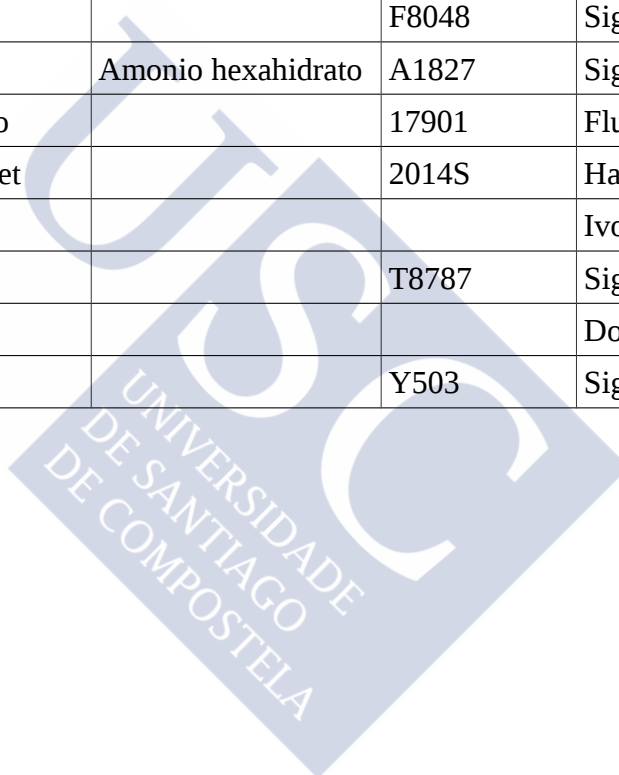
3.6-MATERIALES Y REACTIVOS QUÍMICOS EMPLEADOS (tabla 1)

Reactivo	Características	Referencia	Casa comercial
(-)-Quinpirole	Hidrocloruro	SC-253339	Santa Cruz
(+)-SKF-38393	Hidrocloruro	D047	Sigma
1-Metil-4-Fenil-1,2,3,6-Tetrahidropiridina (MPTP)	Hidrocloruro	M0896	Sigma
3-Hidroxitiramina (Dopamina)	Hidrocloruro	M8502	Sigma
5-Hidroxitriptamina	Hidrocloruro	H-9523	Sigma
6-Hidroxi-dopamina	Hidrocloruro	M4381	Sigma
Acetonitrilo	Chromasolv	34851	Sigma Aldrich
Ácido 3,4-Dihidroxifenilacético	96%	37860	Fluka
Ácido 5-Hidroxi-3-Indolacético (5-HIAA)	Para HPLC	55360	Fluka
Ácido Etilen Glicol-bis(2-Aminoetilen-N,N,N,N)-Tetraacético (EGTA)		E3889	Sigma
Ácido Etilendiamino Tetraacético (EDTA)	Disodio sal hidrato	ED2SS	Sigma Aldrich
Ácido Fórmico	50%	09676	Fluka
Ácido Homovanílico		H1252	Sigma
Ácido L(+)-Ascórbico	Pro Análisis	127	Merck
Ácido Octanosulfónico	Sal Sódica	08380	Sigma Aldrich
Ácido Ortofosfórico	50%	79607	Fluka
Alexa Fluor 488 Donkey Anti Goat		A11055	Life Technologies
Alexa Fluor 488 Donkey Anti Mouse		A21202	Life Technologies
Alexa Fluor 568 Donkey Anti Rabbit		A10042	Life Technologies
Angiotensina 1-7	Hidrato de sal de acetato	A9202	Sigma Aldrich
Angiotensina I/II (3-8) (Angiotensina IV)		4018068	Cymit
Angiotensina I/II (4-8) (Angiotensina V)		4030362	Cymit
Angiotensina II	Humana	A9525	Sigma

Reactivo	Características	Referencia	Casa comercial
Angiotensina III		4007359	Cymit
Angiotensinógeno	Humano	A2562	Sigma
Anti-5HT1B	rabbit	SC-1460-R	Santa Cruz
Anti-Angiotensin	goat	SC-7419	Santa Cruz
Anti-AT1 (C-18)	rabbit	SC-31181	Santa Cruz
Anti-AT2 (H-143)	goat	SC-9040	Santa Cruz
Anti-CD45	rat	MCA1388	ABD
Anti-CnPasa	mouse	C5922	Sigma
Anti-D1	guinea pig	D1R-GP-Af500	Frontier institute
Anti-D2DR (H-50)	rabbit	SC-9113	Santa Cruz
Anti-DMT-1	mouse	NRAMP21-S	Alpha Diagnostic
Anti-ferritina	rabbit	F5012	Sigma
Anti-Fp1	rabbit	MTP11-S	Alpha Diagnostic
Anti-GAPDH	rabbit	G9545	Sigma
Anti-GFAP	mouse	MAB360	Chemicon
Anti-NeuN	mouse	MAB377	Chemicon
Anti-OX-42 (CD11b)	mouse	MCA275R	Serotec
Anti-ROCK II	goat	SC-1851	Santa Cruz
Anti-TfR	mouse	13-6800	Invitrogen
Anti-TH	mouse	T2928	Sigma
Atipamezol (Antisedan®)			Pfizer
Avidin/Biotin Complex Kit (Vectastain® ABC)		PK-6900	Vector
B-Estradiol	98%	E2758	Sigma
B-Estradiol 3-Benzoato		E8515	Sigma
Benserazida	Hidrocloruro	B7283	Sigma
Bromuro de etidio	10 mg/ml en agua	E8751	Sigma
Candesartan Cilexetil (Atacand®)			Astra Zeneca
Chelex-100		142-2825	Bio Rad
Chicken anti-mouse IGG-HRP		SC-2954	Santa Cruz
Cloruro cálcico	Dihidrato	C-3881	Sigma
Cloruro magnésico	Hexahidrato	5833	Merck

Reactivo	Características	Referencia	Casa comercial
Cloruro de manganeso	Tetrahidrato	M8054	Sigma
Colesterol	95%	STBB5512	Sigma
Cryocool heat transfer fluid			Thermo
Cy3	Goat anti-mouse	AP128C	Chemicon
dATP		55082	Invitrogen
dCTP		55083	Invitrogen
Desipramina	Hidrocloruro	D3900	Sigma
dGTP		55084	Invitrogen
Diaminobencidina			
DMEM 1X		21969-035	Gibco
DMEM/F12 (1:1) 1X		11330-032	Gibco
Donkey anti-goat IGG-HRP		SC-2020	Santa Cruz
dTTP		55085	Invitrogen
F12 (HAM) 1X		21765-023	Gibco
Goat anti-rabbit IGG-HRP		SC-2004	Santa Cruz
GSI-B4		L2895	Sigma
Immumount		99-904-02	Thermo
IQ Sybr® green Supermix		170-8882	Bio Rad
Ketamina (Imalgene®)			Merial
L-3,4-Dihidroxifenilalanina éster (Levodopa)	metil Hidrocloruro	D1507	Sigma
Medetomidina (Domtor®)			Pfizer
Medetomidina (Medetor®)			Virbal
Metanol	Gradiente	65548	Sigma Aldrich
MMLV		28025-013	Invitrogen
MPP ⁺	Yoduro	D048	Sigma Aldrich
Naranja de acridina	Cloruro de Cinc	A6014	Sigma
Noradrenalina		273728	Braun
Ortovanadato Sódico		S6508	Sigma
Phen Green™ SK	Diacetato	P-14313	Life Technologies
Progesterona	99%	P8783	Sigma
Proteína A HRP		NA9120V	GE Healthcare
R(-)-Deprenyl	Hidrocloruro	M003	Sigma

Reactivo	Características	Referencia	Casa comercial
R(+)-SCH-23390	Hidrocloruro	D054	Sigma
Random primers		48190-011	Invitrogen
RNAase Away			MBF
RNAase Out		1000000840	Invitrogen
ROCK activity assay kit		STA-416	Cell Biolabs
Ropinirole	Hidrocloruro	SC-205843A	Santa Cruz
RPMI-1640		R0883	Sigma
S(-)-Eticlopride	Hidrocloruro	E101	Sigma
Sulfato Ferroso		F8048	Sigma Aldrich
Sulfato de Níquel	Amonio hexahidrato	A1827	Sigma Aldrich
Tampón Formiato Trietilamonio		17901	Fluka
Teklad Rodent Maintenance Diet		2014S	Harlan
Triplex cold®			Ivoclar Vivadent
Triton X-100		T8787	Sigma
Tubo Sylastic®			Dow Corning
Y-27632		Y503	Sigma





RESULTADOS



4.1-EFECTO DE LA MODULACIÓN DEL SISTEMA DOPAMINÉRGICO SOBRE EL SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA

[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\(7\):1726-1738.](#)

No se sabe si la disminución en la función dopaminérgica asociada al envejecimiento conduce a una mayor vulnerabilidad de las neuronas dopaminérgicas incrementando con ello, el riesgo de padecer la EP. Sí se ha demostrado que SRA, través de los receptores AT1, desempeña un papel importante en la respuesta inflamatoria, el estrés oxidativo neuronal, y en el incremento de vulnerabilidad dopaminérgica. En este trabajo se estudió si la disminución en la función dopaminérgica asociada al envejecimiento produce una sobreactivación del SRA.

Los resultados muestran una interacción contraregulatoria entre los receptores de dopamina y los de AII. En ratones jóvenes adultos deficientes en receptores D1 y D2 y en ratas jóvenes que muestran depleción de dopamina observamos una sobreexpresión de los receptores AT1 en el ST y en la SN, junto a una sobreexpresión compensatoria de receptores AT2 y una regulación a la baja de angiotensinógeno. En ratas envejecidas, observamos una regulación a la baja de dopamina y sus receptores junto con una sobreexpresión de los receptores AT1, sin presencia de los cambios compensatorios observados en los animales jóvenes. La terapia con L-DOPA inhibió la hiperactivación del SRA en ratas jóvenes que sufrían depleción de dopamina, pero fue ineficaz en ratas de edad avanzada. Los resultados sugieren que la dopamina, además de su rol como neurotransmisor esencial, puede desempeñar un papel importante en la modulación de estrés oxidativo y la inflamación en la SN y en el ST a través del SRA, cuya actividad se encuentra incrementada en animales envejecidos.



4.2- EFECTO DE LA MODULACIÓN DEL SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA SOBRE EL SISTEMA DOPAMINÉRGICO

4.2.1-Efectos de la inhibición del sistema renina-angiotensina sobre el sistema dopaminérgico.

[Domínguez-Meijide A, Villar-Cheda B, Garrido-Gil P, Sierra-Paredes G, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL \(2014\) Effect of chronic treatment with angiotensin type 1 receptor antagonists on striatal dopamine levels in normal rats and in a rat model of Parkinson's disease treated with L-Dopa. Neuropharmacology, 76\(Pt A\):156-168.](#)

Se han observado efectos beneficiosos del bloqueo del receptor AT1 en procesos cerebrales mediados por el estrés oxidativo y la neuroinflamación, entre los que se incluye la EP. Sin embargo, recientemente se han demostrado importantes interacciones contrarregulatorias entre los sistemas dopaminérgico y el SRA en varios tejidos periféricos, y es posible que una disminución en los niveles de dopamina debido a la inhibición de los receptores AT1, como una posible estrategia neuroprotectora, pudiese inducir una disminución contrarregulatoria en los niveles de dopamina en el ST, aumentando el parkinsonismo. Además, también es de particular interés conocer si la inhibición de AT1 puede afectar a los niveles de dopamina proveniente de la descarboxilación de L-DOPA en pacientes con EP tratados con este fármaco, lo que podría agravar los síntomas de la enfermedad. En el presente estudio investigamos ambas cuestiones empleando ratas con una innervación normal y ratas sujetas a denervación dopaminérgica (modelo experimental por 6-OHDA de la EP) y tratadas con L-DOPA.

Los resultados obtenidos muestran que el tratamiento con el inhibidor de los receptores AT1, candesartan, no afecta de manera significativa a los niveles de dopamina, serotonina o sus metabolitos y tampoco afecta al comportamiento motor, evaluado mediante el test del rotarod. Se demuestra además como la administración crónica de candesartan a ratas normales produce un incremento en la expresión de los receptores de dopamina D1 y una disminución en la expresión de los receptores de dopamina D2. En ratas lesionadas con 6-OHDA, modelo experimental de la enfermedad de Parkinson, tratadas con L-DOPA, no se observaron diferencias en los niveles de dopamina y serotonina estriatal entre las ratas tratadas con candesartán y las no tratadas, lo que sugiere que el tratamiento crónico con candesartán no afecta significativamente el proceso de

descarboxilación L-DOPA ni a la liberación de dopamina en pacientes de EP. El candesartan no indujo, a nivel estriatal, ninguna diferencia en los niveles de expresión de los receptores de dopamina D1 y D2, ni en los niveles de expresión receptor de serotonina 5-HT1B en ratas lesionadas con 6-OHDA y tratadas con L-DOPA. Los resultados sugieren que el tratamiento crónico con antagonistas de AT1, como una estrategia neuroprotectora, no afecta significativamente ni a la liberación de dopamina estriatal ni al comportamiento motor.



4.2.2- Efectos de la activación del sistema renina-angiotensina, inducida por la hipoperfusión cerebral crónica, sobre el sistema dopaminérgico.

Rodriguez-Perez AI, Dominguez-Mejide A, Lanciego JL, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL (2012) Dopaminergic degeneration is enhanced by chronic brain hypoperfusion and inhibited by angiotensin receptor blockage. Age, 35:1675-1690.

El SRA puede tener un papel fundamental como nexo entre la enfermedad vascular y la degeneración dopaminérgica, al ser ya conocido que el SRA local de la pared arterial se relaciona con la patofisiología de la enfermedad vascular y que los receptores AT1 son inductores de inflamación y de estrés oxidativo. En el presente estudio, se utilizó un modelo de quirúrgico de hipoperfusión cerebral crónica (CHP; Farkas et al., 2007) para estudiar los efectos a largo plazo de la hipoperfusión en la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas y los posibles efectos sinérgicos entre la hipoperfusión y factores que son perjudiciales para las neuronas dopaminérgicas (bajas dosis de la neurotoxina 6-OHDA). Especialmente, se estudió la participación del SRA nigral en esta degeneración dopaminérgica inducida por hipoperfusión. Para ello también investigamos si el bloqueo de los receptores AT1 puede inhibir la degeneración dopaminérgica inducida por la hipoperfusión.

Los niveles de expresión de los receptores AT2 se redujeron y los de los receptores de AT1, interleuquina-1 β y la actividad del complejo NADPH oxidasa, se incrementaron en la SN de ratas sometidas a hipoperfusión. Estos incrementos fueron reducidos con el tratamiento con candesartán. El incremento en la actividad del SRA cerebral inducido por hipoperfusión cerebral crónica indujo una pérdida significativa de neuronas dopaminérgicas estriatales, de las terminales estriatales y una reducción en los niveles de dopamina a nivel del ST. Esta reducción disminuye en parte al bloquear los receptores AT1 con candesartan.

Además, la administración intraestriatal de 6-OHDA en ratas sometidas a la hipoperfusión crónica, indujo una mayor pérdida de neuronas dopaminérgicas que en las ratas control. La pérdida de neuronas dopaminérgicas se redujo significativamente cuando los animales fueron tratados con el antagonista del receptor AT1, candesartán. Los resultados sugieren que el tratamiento precoz de la enfermedad vascular debe ser considerado en pacientes parkinsonianos de edad avanzada y en aquellos que presentan factores de riesgo cerebrovasculares. Los resultados también sugieren que la inhibición del SRA cerebral puede ser útil como estrategia neuroprotectora.



4.2.3- Efectos de la activación del sistema renina-angiotensina microglial, vía AT1/ROCK, en la degeneración dopaminérgica

4.2.3.1- Efectos de la activación del sistema renina-angiotensina microglial, vía AT1/ROCK, en la degeneración dopaminérgica. Papel de la angiotensina en la activación de la ruta RhoA/ROCK

Villar-Cheda B, Dominguez-Meijide A, Joglar B, Rodriguez-Perez AI, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL (2012) *Involvement of microglial RhoA/Rho-Kinase pathway activation in the dopaminergic neuron death. Role of angiotensin via angiotensin type 1 receptors. Neurobiol Dis.* 47(2):268-279.

Se ha demostrado recientemente que la pérdida de células dopaminérgicas inducida por neurotoxinas se ve incrementada por la AII, a través de los receptores AT1. Sin embargo, los mecanismos involucrados en la degeneración dopaminérgica y en los efectos inflamatorios cerebrales de la AII todavía no han sido dilucidados. La ruta RhoA/ROCK puede tener un papel crítico en los efectos inflamatorios y oxidativos de la AII. En la SN de ratones, la administración de la neurotoxina dopaminérgica MPTP produjo un incremento en la expresión de los niveles de ARN mensajero de RhoA y ROCK y en la actividad ROCK, que se vio inhibido en animales con delección del receptor AT1 (*knock out* para AT1a tratados con MPTP). Tanto la administración del inhibidor de la ROCK, Y27632, como la eliminación de los receptores de AT1 provocaron una disminución significativa en la activación microglial y en la muerte neuronal dopaminérgica inducida por MPTP. En cultivos primarios mesencefálicos tratados con MPP⁺, el incremento en la pérdida neuronal dopaminérgica inducido por la administración de AII también se vio inhibido tras el tratamiento con Y27632. Además, se observó una intensa expresión de ROCK II en células microgliales de la SN de ratones tratados con MPTP y se confirmó el papel fundamental de la ROCK microglial comparando cultivos primarios mesencefálicos sin y con microglía. Nuestros resultados indican que la activación de la ruta RhoA/ROCK participa en la degeneración dopaminérgica inducida por MPTP mediante el incremento de la respuesta microglial, vía AII/AT1. Todos estos datos sugieren que tanto los inhibidores de ROCK como los antagonistas del receptor AT1 pueden suponer nuevas estrategias neuroprotectoras frente a la progresión de la EP.



4.2.3.2- Efectos de la activación del sistema renina-angiotensina microglial vía AT1/ROCK, en la degeneración dopaminérgica. Interacciones con los estrógenos.

Rodriguez-Perez AI, Dominguez-Meijide A, Lanciego JL, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL (2013) *Inhibition of Rho kinase mediates the neuroprotective effects of estrogen in the MPTP model of Parkinson's disease*. Neurobiol Dis, 58:209-219.

El mecanismo mediante el cual la terapia estrogénica protege a las neuronas dopaminérgicas todavía no ha sido dilucidado. No se sabe si cambios en la actividad de la vía RhoA/ROCK podrían estar involucrados en la mayor vulnerabilidad que presentan las neuronas dopaminérgicas tras la depleción estrogénica. En este estudio mostramos como la pérdida de neuronas dopaminérgicas inducida por MPTP se ve incrementada en ausencia de estrógenos y es inhibida tras el tratamiento con estrógenos, la administración del inhibidor de ROCK, Y27632 y en la deleción del receptor de AII, AT1a (usando ratones hembra *knock out* para AT1a). En ratones hembra ovariectomizados, el tratamiento con MPTP produce un incremento marcado en la actividad ROCK, y en las expresiones de proteína y de ARN mensajero de RhoA y ROCK, incrementos que resultan significativamente mayores que en ratones ovariectomizados tratados con MPTP y reemplazo de estrógenos o deleción de los receptores de AT1. Nuestros resultados también muestran como la eliminación de estrógenos produce un incremento en la actividad ROCK, a través de un incremento en la vía mediada por los receptores de AT1. Esta activación de ROCK, a su vez, incrementa la expresión de receptores de AT1 sugiriendo un ciclo vicioso en el cual la vía ROCK y la vía AII/AT1 se activan mutuamente y promueven el proceso degenerativo. Los resultados de este trabajo sugieren, por tanto, que los antagonistas de AT1 y los inhibidores de ROCK pueden suponer una nueva y prometedora estrategia neuroprotectora, que permitiría evitar los riesgos de la terapia de reemplazo estrogénico y ser particularmente útil en mujeres menopáusicas.



4.2.4- Efectos de la activación del sistema renina-angiotensina sobre la homeostasis del hierro en la sustancia negra.

[Garrido-Gil P, Rodriguez-Pallares J, Dominguez-Meijide A, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL \(2013\) *Brain angiotensin regulates iron homeostasis in dopaminergic neurons and microglial cells.* Exp Neurol, 250:384-396.](#)

Las disfunciones en la homeostasis del hierro están involucradas en el envejecimiento, en la EP y en otras enfermedades neurodegenerativas. Estudios previos han demostrado que niveles elevados de hierro lábil dan lugar a un incremento en las EROs y, por tanto, estrés oxidativo. Como ya ha sido mencionado, la AII, a través de los receptores AT1, también exacerba el estrés oxidativo, la respuesta inflamatoria microglial y la progresión de la degeneración dopaminérgica. Sin embargo, no se sabe si la AII afecta a la homeostasis del hierro. En el presente estudio demostramos como, la administración de AII a cultivos mesencefálicos primarios, a la línea celular dopaminérgica MES23.5 y a ratas adultas jóvenes, incrementó significativamente los niveles de receptores de transferrina, transportador 1 de metales divalentes y ferroportina, lo que sugiere un incremento en la recaptación y en la liberación de hierro. Sin embargo, en cultivos primarios (neurona-glía) y en ratas jóvenes, la AII no indujo cambios significativos en los niveles de ferritina (proteína que actúa como almacén de hierro) o de hierro lábil, los cuales sí se incrementaron en neuronas en ausencia de glía (en cultivos enriquecidos en neuronas, en la línea celular dopaminérgica MES23.5). En ratas envejecidas, que muestran una hiperactivación del SRA, la ferritina y los depósitos de hierro en células microgliales se incrementaron. Finalmente, también demostramos como los cambios inducidos por la AII se inhiben tras el empleo de antagonistas de los receptores AT1, inhibidores de la NADPH oxidasa, antioxidantes e inhibidores de NF- κ B. Los resultados muestran, por tanto, que la AII, a través de los receptores AT1, modula la homeostasis del hierro en las neuronas dopaminérgicas y en las células microgliales, y que las células gliales juegan un papel determinante en la regulación eficiente de la homeostasis del hierro en las neuronas dopaminérgicas.





DISCUSIÓN



5.1-EFECTO DE LA MODULACIÓN DEL SISTEMA DOPAMINÉRGICO SOBRE EL SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran, por primera vez, la existencia de mecanismos compensatorios entre los receptores de dopamina y de angiotensina en el sistema nervioso central. Tanto los animales *knock out* para los receptores D1 como para los receptores D2 muestran una sobreexpresión de receptores AT1. La AII local, a través de los receptores AT1 contribuye al daño por estrés oxidativo al ser uno de los activadores principales del complejo NADPH oxidasa en diferentes tipos de células y tejidos (Garrido y Griendling, 2009). El complejo NADPH oxidasa es la fuente intracelular más importante de EROs tras las mitocondrias (Babior, 2004). Además, las EROs generadas por el complejo NADPH oxidasa promueven la producción de más EROs a nivel mitocondrial y a partir de otras fuentes intracelulares, lo que puede dar lugar a un círculo vicioso que amplifica y mantiene las EROs contribuyendo así a la muerte celular.

Se ha visto que la regulación al alza de oxidasas dependientes de NADPH está involucrada en la mayoría de las enfermedades relacionadas con el envejecimiento tales como hipertensión, diabetes, aterosclerosis y en la EP (Griendling et al., 2000; Rodríguez-Pallares et al., 2007; Wu et al., 2003). También se ha visto que el SRA, vía receptores AT1 y activación del complejo NADPH oxidasa, tiene un papel clave en el inicio y la perpetuación de la inflamación. En tejidos periféricos tales como la pared vascular, el incremento en la actividad del SRA da lugar a estrés oxidativo, producción de quimioquinas, citoquinas y moléculas de adhesión, las cuales contribuyen a la migración de células inflamatorias al tejido lesionado (Ruiz-Ortega et al., 2001; Suzuki et al., 2003). Además, la AII, a través de los receptores AT1 actúa sobre las células inflamatorias para inducir respuestas inflamatorias y para la liberación de altos niveles de EROs por activación del complejo NADPH-oxidasa en estas células. En trabajos anteriores de nuestro laboratorio, hemos comprobado que en el sistema nigroestriatal, la AII, a través de los receptores AT1, incrementa la activación de las células microgliales y el estrés oxidativo en las neuronas (Joglar et al., 2009; Rodríguez-Pallares et al., 2008). Los mecanismos involucrados en los efectos neuroprotectores y/o compensatorios mediados por los receptores AT2 no han sido dilucidados hasta el momento. Puede ser que los efectos compensatorios y neuroprotectores no se deban en exclusiva a la inhibición de AT1 y/o de la actividad NADPH oxidasa. Se han sugerido otros mecanismos tales como la inhibición de las MAK (del inglés *mitogen activated kinase*) quinasas y la activación de los receptores de bradiquinina (Padia y Carey, 2013). En cualquier caso, los resultados obtenidos, junto

con otros de estudios previos de nuestro grupo (Rodríguez-Pérez et al., 2012; Villar-Cheda et al., 2012) indican que un incremento en el ratio AT1/AT2 lleva a un incremento en los estados prooxidativo y proinflamatorio, así como también a un aumento en la vulnerabilidad dopaminérgica. La expresión de receptores AT2 es mayor en ratones deficientes en receptores D2, lo que sugiere un efecto compensatorio para contrarrestar la sobreexpresión de receptores AT1. Los ratones deficientes en receptores D1 sobreexpresan los receptores AT1 sin cambios significativos en la expresión de receptores AT2. Sin embargo, los niveles de angiotensinógeno y de actividad ECA sí son regulados a la baja, lo que sugiere la existencia de un mecanismo compensatorio alternativo en estos animales.

El mecanismo responsable de las diferentes respuestas compensatorias que contrarrestan la sobreexpresión de los receptores AT1 en ratones deficientes en receptores D1 y D2 todavía no ha sido clarificado. En ratones que sobreexpresan receptores D2, la expresión de receptores AT1 y AT2 se ve regulada a la baja con un incremento compensatorio en los niveles de angiotensinógeno y de actividad ECA, lo que concuerda con resultados obtenidos en ratones *knock out*.

Las ratas jóvenes normales lesionadas con 6-OHDA mostraron una mayor expresión de los receptores AT1 y AT2 sin mostrar una disminución significativa de los niveles de angiotensinógeno ni actividad ECA (con la excepción de la ECA en la SN). Esto es consistente con la pérdida simultánea de activación de los receptores D1 y D2.

En general, estos resultados muestran que los receptores de dopamina y AII se contrarregulan en el sistema nigroestriatal y que, la dopamina, además de su función esencial como neurotransmisor puede tener un papel importante en la modulación de la respuesta inflamatoria microglial y en el estrés oxidativo neuronal mediante el SRA cerebral. Hay estudios que han demostrado que la dopamina también puede inhibir la neuroinflamación a través de la estimulación de los receptores D2 de los astrocitos mediante mecanismos dependientes de la α B-cristalina (Shao et al., 2013). En este estudio, sugerimos que la activación de los receptores de dopamina modula la neuroinflamación mediante la interacción con el SRA y que esta interacción se ve alterada en animales envejecidos, lo que lleva a un estado prooxidativo y proinflamatorio. Se ha demostrado recientemente la existencia de interacciones importantes entre los receptores de dopamina y de AII en tejidos periféricos, especialmente en relación a la excreción de sodio renal y en la función cardiovascular (Gildea 2009; Khan et al., 2008; Zeng et al., 2006). También se ha demostrado que los agonistas de receptores D1 y D2 disminuyen la expresión de receptores AT1 (Hussain et al., 1998; Zeng et al., 2003) y que los receptores D1 median en la inhibición de la actividad del

complejo NADPH oxidasa (Li et al., 2009; Yang et al., 2006). Se ha sugerido que, en el riñón, los receptores AT1 y D1 o D2 se contrarregulan mutuamente mediante la formación de heterodímeros (Khan et al., 2008; Zeng et al., 2006). Actualmente, se acepta que las interacciones contrarregulatorias anormales tienen un papel determinante en los cambios degenerativos que se producen a nivel renal, en la hipertensión y en el envejecimiento (Chugh et al., 2013; Yang et al., 2012). En los ganglios basales de roedores y de primates, las neuronas dopaminérgicas, los astrocitos y la microglía tienen receptores de dopamina y también receptores AT1, AT2 y complejo NADPH oxidasa (Färber et al., 2005; Garrido-Gil et al., 2013; Joglar et al., 2009; Rodríguez-Pallares, 2008).

Una disminución en la función dopaminérgica, como la que se produce durante el envejecimiento puede llevar a una regulación al alza de la función SRA local tanto a nivel de las neuronas dopaminérgicas como en las células gliales. Esta sobreactivación del SRA puede exacerbar la respuesta inflamatoria microglial y el estrés oxidativo e incrementar la vulnerabilidad de las células dopaminérgicas a las neurotoxinas o a otros factores patogénicos. Estudios previos de nuestro grupo confirman que las ratas envejecidas muestran una mayor actividad del SRA, un incremento de los marcadores de inflamación y estrés oxidativo en el sistema nigroestriatal y una mayor vulnerabilidad de las neuronas dopaminérgicas a la neurotoxina 6-OHDA (Villar-Cheda et al., 2012). Nuestros estudios muestran que la hiperactividad del SRA desempeña un papel fundamental porque los marcadores de estrés oxidativo, neuroinflamación y vulnerabilidad dopaminérgica disminuyen significativamente tras el tratamiento de las ratas envejecidas con el antagonista de AT1 candesartán (Villar-Cheda et al., 2012). Estos resultados están en consonancia con resultados previos de nuestro laboratorio en los que se demuestra que el efecto neurotóxico producido al aplicar dosis bajas de neurotoxinas dopaminérgicas se ve incrementado por AII e inhibido por el tratamiento con inhibidores de la ECA (Lopez-Real et al., 2005; Muñoz et al., 2006) o antagonistas de AT1 (Joglar et al., 2009; Rey et al., 2007; Rodríguez-Pallares et al., 2008), lo cual lleva a un descenso significativo en la pérdida de neuronas dopaminérgicas, en los niveles de peroxidación lipídica y oxidación proteica a nivel de la SN, y a una reducción en la activación microglial.

En el presente estudio, el marcado descenso en la expresión de receptores D1 y D2 y la disminución significativa en la expresión de TH y los niveles de dopamina estriatales en ratas envejecidas en relación con ratas jóvenes concuerdan con resultados anteriores obtenidos tanto en roedores como en humanos (Colebrooke et al., 2006; Suzuki et al., 2001; Wang et al., 1998;

Yurek et al., 1998). Tal y como se ha observado, las ratas envejecidas presentan un marcado incremento de los receptores AT1, lo que puede ser causa del estado prooxidativo y proinflamatorio y de la elevada vulnerabilidad de las neuronas dopaminérgicas que se han observado en estudios anteriores (Villar-Cheda et al., 2012). Al contrario de lo que ocurre en ratones y ratas jóvenes, esta situación no se ve contrarrestada por un incremento en los receptores AT2 o por un descenso en los niveles de angiotensinógeno. Además, la expresión de receptores AT2 es menor que en ratas jóvenes normales. Para confirmar la falta de regulación compensatoria en ratas envejecidas, se trataron grupos de ratas jóvenes y envejecidas con 6-OHDA. Se observó que en ratas jóvenes, la depleción de dopamina provocaba un incremento significativo en la expresión de receptores AT1 y AT2, lo que no llevaba a cambios significativos en el ratio AT1/AT2. En ratas envejecidas, en las cuales los niveles de expresión de los receptores AT2 ya son bajos, la depleción dopaminérgica producía un incremento adicional en la expresión de receptores AT1 pero no en la de AT2, con lo que el ratio AT1/AT2 se veía incrementado. Tampoco se produjo una disminución compensatoria en los niveles de angiotensinógeno ni en la actividad ECA en estos animales. La ausencia de un incremento contrarregulatorio de AT2 en ratas envejecidas puede contribuir a un incremento de los estados prooxidativo y proinflamatorio y a un incremento en la vulnerabilidad dopaminérgica. La disminución de la capacidad de las ratas envejecidas para desarrollar mecanismos compensatorios ha sido observada en estudios anteriores. Se sabe que, en animales jóvenes, una falta de activación de los receptores de dopamina promueve la sobreexpresión compensatoria de receptores D2 y que el *turnover* de dopamina se incrementa en lesiones dopaminérgicas parciales (Fornaretto et al., 1993; Todd et al., 1996). Las ratas envejecidas muestran niveles menores de dopamina, de expresión de receptores de dopamina y ausencia de cambios en el *turnover* de dopamina. Además, recientemente hemos demostrado que el reemplazo estrogénico normaliza la expresión de receptores AT2 en ratas jóvenes sometidas a menopausia quirúrgica, resultados que la terapia estrogénica no consigue en ratas menopáusicas naturales (Rodríguez-Perez et al., 2012).

Las ratas envejecidas mostraron disminuciones en la actividad dopaminérgica e incrementos en la actividad SRA (incremento en el ratio AT1/AT2). Sin embargo, es interesante destacar que el tratamiento con 6-OHDA en estos animales produce un incremento en la actividad SRA (mayor expresión del receptor AT1 e incremento en el ratio AT1/AT2) mucho mayor que el producido en animales jóvenes pese a que estos últimos presentan mayores niveles fisiológicos de dopamina. Creemos que, además de la disminución en la actividad dopaminérgica existen factores adicionales que acentúan el incremento de la actividad SRA en ratas envejecidas. Estos factores adicionales

relacionados con la edad, no se contrarregulan tras la depleción dopaminérgica con 6-OHDA, lo que lleva a un mayor incremento en la expresión de AT1 en comparación con ratas jóvenes. Además, en el presente trabajo, se investigó el efecto del tratamiento con L-DOPA en el ratio AT1/AT2 en ratas jóvenes y envejecidas. En animales jóvenes se observó, tras el tratamiento con L-DOPA una disminución en la expresión de receptores AT1 y AT2. Sin embargo, no se observaron cambios significativos en ratas envejecidas tratadas con L-DOPA. Esto es de esperar, pues se sabe que la respuesta al tratamiento con L-DOPA de los parkinsonismos asociados a la edad es pobre o inexistente (Darbin, 2012; Hurley et al., 2011). Los niveles disminuidos de receptores de dopamina, la menor actividad de la L-DOPA descarboxilasa y otros cambios relacionados con el envejecimiento pueden llevar a un incremento muy pobre en la actividad dopaminérgica, lo que probablemente sea insuficiente para disminuir la actividad del SRA y particularmente para contrarrestar a los factores que pueden incrementar dicha actividad del SRA en ratas envejecidas.

Los resultados obtenidos muestran que, adicionalmente a su función principal como un neurotransmisor, la dopamina tiene un papel importante en la modulación del SRA cerebral a nivel de SN y ST. Este SRA tisular tiene un papel determinante en la respuesta inflamatoria microglial, el estrés oxidativo neuronal y por tanto, en el incremento de la vulnerabilidad dopaminérgica. La regulación a la baja de los receptores de dopamina y de la función dopaminérgica que se produce con el envejecimiento puede llevar a la regulación al alza de vías prooxidativa y proinflamatoria a través de la ruta AII/AT1. Los resultados también muestran que las ratas envejecidas no son capaces de incrementar la expresión de los receptores AT2 en respuesta a la depleción de la dopamina y a una regulación a la baja de los receptores de dopamina, lo cual incrementa los efectos deletéreos mediados por el aumento en la expresión de los receptores AT1 asociado al envejecimiento. La sobreactivación del SRA no es inhibida de manera significativa por el tratamiento con L-DOPA en ratas envejecidas. Previamente nuestro grupo ha demostrado que el incremento en neuroinflamación, indicadores del estrés oxidativo y vulnerabilidad dopaminérgica relacionado con la sobreactivación de los receptores AT1 se inhibe en ratas envejecidas cuando éstas son tratadas con antagonistas de los receptores AT1, fármacos que actualmente son empleados en la práctica clínica para el tratamiento de problemas vasculares.

5.2-EFECTO DE LA MODULACIÓN DEL SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA SOBRE EL SISTEMA DOPAMINÉRGICO

5.2.1-Efectos de la inhibición del sistema renina-angiotensina sobre el sistema dopaminérgico

Los resultados obtenidos en ratas con inervación dopaminérgica normal indican que el tratamiento crónico con candesartan no afecta de manera significativa a los niveles estriatales de dopamina ni de sus metabolitos y no altera de manera significativa el comportamiento motor. Tampoco se observan cambios significativos en los niveles estriatales de serotonina tras el tratamiento crónico de ratas con candesartan.

Estudios anteriores realizados en ratas con inervación normal demuestran que la administración aguda de AII directamente en el estriado (mediante sondas de microdiálisis) induce un incremento en los niveles extracelulares de dopamina, que se ve bloqueado tras la administración de antagonistas del receptor AT1 (Brown et al., 1996; Mendelsohn et al., 1993). Estos datos sugieren que la AII facilita la liberación de dopamina, vía receptores AT1, sin embargo, el mecanismo subyacente todavía no ha sido dilucidado. Por consiguiente, el tratamiento con antagonistas de AT1 podría reducir los niveles estriatales de dopamina. Sin embargo, la administración aguda de antagonistas del receptor AT1, por sí sola, no altera los niveles estriatales de dopamina (Brown et al., 1996; Jenkins, 2008) pero sí disminuye ligeramente, en torno a un 15%, los niveles de metabolitos (Jenkins, 2008; Mendelsohn et al., 1993). La administración crónica de antagonistas de AT1, o bien no induce ningún cambio, como hemos encontrado en este estudio, o induce un aumento en los metabolitos de dopamina en ratas normales (Dwoskin et al., 1992; Mendelsohn et al., 1993). Los diferentes efectos de la administración crónica de antagonistas de AT1 fueron atribuidos a mecanismos compensatorios desconocidos (Dwoskin et al., 1992; Mendelsohn et al., 1993). Nuestros datos demuestran que la administración aguda de candesartan induce un incremento de entre un 125 a un 130% en la expresión de los receptores D1 estriatales y una disminución de un 15% en la expresión de los receptores D2, mientras que la administración crónica de candesartan lleva a un incremento similar en la expresión de los receptores D1 y a una disminución de en torno a un 55% en la expresión de los receptores D2. Los cambios observados en la expresión de los receptores de dopamina pueden llevar a cambios compensatorios en la liberación de dopamina estriatal y en el comportamiento motor. Se cree que la liberación de dopamina por las

terminales dopaminérgicas está regulada por los autorreceptores D2 (Cubeddu y Hoffmann, 1982; De Mei et al., 2009) por lo tanto, la disminución en la expresión de receptores D2 puede llevar a un incremento compensatorio en la liberación de dopamina. Se ha demostrado que los heterorreceptores postsinápticos D2 juegan un papel importante en el control de los niveles estriatales de dopamina (Anzalone et al., 2012). Tal y como hemos comprobado, el candesartan no produce cambios en la expresión de receptores D2 en ratas denervadas, lo que puede sugerir que la regulación a la baja de D2 producida por el candesartan puede deberse a los autorreceptores. Sin embargo, otros factores como la denervación dopaminérgica y el tratamiento con L-DOPA pueden contrarrestar los cambios inducidos por el candesartan en la expresión de los D2 postsinápticos. Diferentes estudios han demostrado que los receptores AT1 y D1 se contrarregulan el uno al otro directamente en las células tubulares renales (Khan et al., 2008; Zeng et al., 2003). Nuestros resultados demuestran, por primera vez, que esta contrarregulación AT1/D1 también ocurre a nivel del estriado. Además, se ha observado dimerización entre los receptores AT1 y los del tipo D1 (D1, D3 o D5) a nivel de las células renales (Gildea, 2009; Khan et al., 2008; Zeng et al., 2006), lo que puede explicar la contrarregulación de los receptores D1 observada tras una única inyección del antagonista de AT1 candesartan.

En conjunto, nuestros resultados en ratas con inervación dopaminérgica normal sugieren que el tratamiento neuroprotector con antagonistas de AT1 para enfermedades como la enfermedad de Alzheimer (Kehoe y Wilcock, 2007; Mogi y Horiuchi, 2009), isquemia cerebral (Lou et al., 2004), lesión traumática cerebral (Villapol et al., 2012) y esclerosis múltiple (Platten et al., 2009; Stegbauer et al., 2009) no deberían afectar de manera significativa a la liberación de dopamina ni al comportamiento motor. De hecho, los antagonistas de AT1 han sido empleados como fármacos antihipertensivos durante la última década y no se ha visto que produzcan una inducción significativa de parkinsonismo. Sin embargo, los mecanismos involucrados en la síntesis y liberación de dopamina en estadios avanzados de la EP son diferentes.

En ausencia de terminales dopaminérgicas, las células no dopaminérgicas son responsables de la descarboxilación de L-DOPA exógena a dopamina. Nuestro grupo de investigación y otros han demostrado que las terminales serotoninérgicas estriatales son una fuente importante de dopamina (Hefti et al., 1981; Lopez et al., 2001; Lopez-Real et al., 2003), ya que las neuronas serotoninérgicas son capaces de expresar tanto el transportador de monoaminas vesicular como la aminoácido aromático descarboxilasa. La descarboxilación de la L-DOPA exógena y la liberación de dopamina por las terminales serotoninérgicas lleva a un descenso simultáneo en los niveles

estriatales de serotonina (Carta et al., 2008a; Navailles et al., 2011). La liberación de dopamina por las terminales serotoninérgica es parcialmente responsable de las discinesias inducidas por L-DOPA, las cuales son inhibidas por el tratamiento con agonistas de los receptores de serotonina 5-HT1A y 5-HT1B localizados en los cuerpos celulares y en las terminales estriatales de las neuronas serotoninérgicas (Carta et al., 2008b; Muñoz et al., 2008). En ratas lesionadas con 6-OHDA y tratadas con L-DOPA, se observa liberación de dopamina estriatal y una disminución simultánea en los niveles estriatales de serotonina. Nuestros resultados no mostraron diferencias en los niveles de serotonina estriatales ni en los niveles de 5-HT1B entre ratas denervadas tratadas y no tratadas con candesartan, lo que sugiere que el tratamiento crónico con candesartan no afecta de manera significativa al proceso de descarboxilación de la L-DOPA en las terminales serotoninérgicas. Tampoco hemos observado diferencias significativas en los niveles de dopamina y metabolitos a nivel estriatal entre ratas tratadas con candesartan y ratas no tratadas. De manera similar, tampoco se han encontrado diferencias significativas en los niveles extracelulares de dopamina y metabolitos entre animales denervados tratados con candesartan y animales denervados no tratados con candesartan. Además, los niveles estriatales de dopamina pueden incrementarse en ratas tratadas con L-DOPA más candesartan a niveles de ratas normales mediante el tratamiento simultáneo con deprenyl o mediante el aumento de la dosis de L-DOPA. Tampoco hemos observado diferencias significativas en el comportamiento motor entre ratas tratadas con L-DOPA más vehículo y L-DOPA más candesartan. Ambos grupos de animales mostraron un comportamiento rotacional similar y obtuvieron rendimientos semejantes, igualándose a niveles control. Los animales tratados con candesartan mostraron un incremento en las rotaciones contralaterales al aumentar la dosis de L-DOPA de 6 a 18 mg/kg, lo que concuerda con el incremento observado en los niveles estriatales de dopamina. En ratas lesionadas con 6-OHDA, el comportamiento motor es consecuencia del efecto sobre D1 y D2 de la dopamina formada a partir de la L-DOPA. En este estudio no observamos diferencias significativas en la expresión estriatal de D1 y D2 entre ratas tratadas con L-DOPA más vehículo y ratas tratadas con L-DOPA más candesartan. En ratas denervadas, la expresión estriatal de los receptores D1 y D2 puede ser el resultado de cambios inducidos por la denervación dopaminérgica, el tratamiento con L-DOPA y el candesartan. Diversos estudios previos han demostrado que la denervación dopaminérgica produce un incremento en la expresión de receptores D2 estriatales y una disminución en la expresión de receptores D1 estriatales, que son contrarrestados con la administración de L-DOPA (Fornaretto et al., 1993; Herrero et al., 1996; Todd et al., 1996). El candesartan también podría contrarrestar el efecto de la denervación por 6-

OHDA y facilitar el comportamiento motor, ya que hemos observado que el tratamiento de las ratas control con candesartan incrementa la expresión estriatal de receptores D1 y disminuye la expresión de receptores D2. Anteriormente, nuestro grupo ya había demostrado estos efectos contrarregulatorios entre los sistemas dopaminérgico y SRA en el ST (Villar-Cheda et al., 2010): la denervación con 6-OHDA produce un incremento significativo en la expresión de receptores AT1, lo que se normaliza tras el tratamiento con L-DOPA en ratas jóvenes. El incremento en la expresión estriatal de receptores AT1 puede contribuir a la disminución en la expresión de D1 y al aumento en la expresión de D2 que se observa tras la denervación dopaminérgica (Fornaretto et al., 1993; Todd et al., 1996), ya que es lo contrario a lo que produce el empleo de candesartan. La disminución en la expresión de AT1 inducida por el tratamiento con L-DOPA puede contribuir a los efectos observados en la expresión de los receptores de dopamina (Herrero et al., 1996).

Los resultados del presente estudio sugieren que el tratamiento crónico con antagonistas de AT1 como el candesartan, como tratamiento neuroprotector contra la progresión de la degeneración dopaminérgica no afecta significativamente a la liberación de dopamina derivada de la descarboxilación de la L-DOPA ni al comportamiento motor. Además, un incremento en las dosis de L-DOPA u otras estrategias, como el tratamiento adicional con deprenyl podrían contrarrestar cualquier empeoramiento de los síntomas parkinsonianos relacionados con mecanismos compensatorios inadecuados y seguiría proporcionando neuroprotección contra la progresión de la muerte de neuronas dopaminérgicas.

5.2.2-Efectos de la activación del sistema renina-angiotensina, inducida por la hipoperfusión cerebral crónica, sobre el sistema dopaminérgico

La hipoperfusión cerebral crónica es responsable directa de la degeneración dopaminérgica, pudiendo actuar de manera sinérgica con otros factores para incrementar la progresión de la pérdida neuronal dopaminérgica.

Datos obtenidos de diferentes estudios clínicos sugieren la existencia de interacciones entre la enfermedad cerebrovascular debida al envejecimiento, la hipoperfusión cerebral y la degeneración dopaminérgica. Se han observado signos parkinsonianos y pérdida celular dopaminérgica en ancianos que no presentan la EP (Buchman et al., 2012). También se ha visto una reducción de la función dopaminérgica presináptica en pacientes con parkinsonismo vascular (PV) (Zijlmans et al., 2007), y como, pacientes de PV tienen una buena respuesta al tratamiento con L-DOPA (Thanvi et al., 2005; Zijlmans et al., 2004a; Zijlmans et al., 2004b). El modelo de hipoperfusión cerebral crónica empleado muestra que la hipoperfusión crónica induce una pérdida significativa de neuronas dopaminérgicas y una disminución significativa en los niveles de dopamina en el ST y en el número de terminales dopaminérgicos. Además, la pérdida de neuronas dopaminérgicas y el descenso de los niveles de dopamina se revierte de manera significativa por el tratamiento con candesartan, el cual se inició 20 días tras la oclusión bilateral de las arterias carótidas, excluyendo, por lo tanto, la posibilidad de que la pérdida de neuronas dopaminérgicas fuera producida en la fase aguda hipóxico-isquémica y confirmando la pérdida de neuronas dopaminérgicas a largo plazo durante la fase crónica.

Una segunda cuestión abordada en este estudio es si la hipoperfusión derivada de la enfermedad vascular y/o del envejecimiento, actuando de manera sinérgica con factores que inducen la EP, puede incrementar el riesgo de desarrollo de la EP (acelerar la puesta en marcha de una EP latente) o exacerbar la progresión y la severidad de una EP ya establecida. Habitualmente, se reconoce que la presencia de lesiones en la materia blanca asociadas con el envejecimiento o la presencia de un trastorno vascular subclínico puede contribuir a la demencia y a otros síntomas de la EP como la inestabilidad postural y problemas para caminar, ésto como consecuencia de mecanismos aditivos o solapantes (Bohnen y Alvin 2011; Rektor et al., 2006; Rektor et al., 2009). Sin embargo, el presente estudio muestra que la hipoperfusión también puede llevar a un incremento en la muerte neuronal dopaminérgica al incrementar los efectos deletéreos de otros factores tales como dosis bajas de 6-OHDA.

Uno de los factores de riesgo más importantes para el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas, como la EP, es la edad avanzada, que también incrementa la prevalencia de enfermedades cerebrovasculares. Un estudio reciente demuestra que la presencia de patología en la SN de, al menos, un 40% en ancianos sin EP (Buchman et al., 2012). Lo que está en consonancia con resultados obtenidos en nuestro laboratorio que demuestran que el envejecimiento produce una disminución en la vascularización y en los niveles de factores de crecimiento vasculares endoteliales en la SN (Villar-Cheda et al., 2009). Los resultados del presente trabajo sugieren que la enfermedad cerebrovascular, asociada al envejecimiento y la hipoperfusión, contribuye a los cambios degenerativos en las neuronas dopaminérgicas y a la muerte neuronal consecuyente. Las ratas sometidas a hipoperfusión mostraron una disminución significativa en los niveles estriatales de dopamina y DOPAC sin que tuviesen lugar cambios significativos en el *turnover* de dopamina (ratio DOPAC/dopamina). Cabe recalcar que se ha demostrado un aumento compensatorio en el *turnover* de dopamina en animales jóvenes después de lesiones agudas dopaminérgicas y que este está completamente ausente en animales envejecidos (Collier et al., 2007). Nuestros resultados sugieren que la hipoperfusión crónica relacionada con el envejecimiento también podría estar involucrada en este efecto debido a la ausencia de aumento compensatorio de *turnover*. También puede ser que otros mecanismos estén implicados en la pérdida de *turnover* compensatorio observado tras la hipoperfusión crónica (Ben et al., 1999; Nandhagopal et al., 2011).

Los eslabones del mecanismo entre la hipoperfusión/enfermedad vascular y la neurodegeneración son desconocidos. En el presente estudio, la hipoperfusión crónica dio lugar a la muerte celular dopaminérgica así como a una expresión incrementada de IL-1 β y de actividad NADPH oxidasa, los cuales están involucrados en la progresión de la muerte celular dopaminérgica en modelos animales de EP y en pacientes de la EP (Koprach et al., 2008; Wu et al., 2003). Las NADPH oxidasas son una de las fuentes principales de superóxido y se encuentran reguladas al alza en enfermedades relacionadas con el envejecimiento como la hipertensión, la diabetes y la aterosclerosis (Griendling et al., 2000; Münzel y Keany, 2001). La muerte neuronal dopaminérgica, la expresión de IL-1 β y la actividad NADPH oxidasa disminuyeron tras el tratamiento con el antagonista de AT1, candesartan, lo que demuestra que el SRA nigral está involucrado en este proceso. En animales sometidos a hipoperfusión crónica, se comprobó que había una actividad SRA incrementada en la SN, un incremento en la expresión de los receptores AT1 y una disminución en la expresión de los receptores AT2. Los receptores AT1 y AT2 tienen efectos opuestos, con lo que su distribución específica determina los efectos inducidos por la AII (Sohn et al., 2000). La

activación de los receptores AT1 regula al alza la actividad de la NADPH oxidasa, la cual se inhibe por la activación de los receptores AT2. Otros componentes del SRA como la A(1-7)(Clark et al., 2001) o los receptores de prorenina (Valenzuela et al., 2010) pueden modular también la actividad del SRA cerebral (Labandeira-Garcia et al., 2011). En el caso de ratas sometidas a hipoperfusión crónica, cambios que tengan lugar en la actividad del SRA local crean un estado prooxidativo y proinflamatorio, como sugiere el incremento en la actividad NADPH y en la expresión de IL-1 β en relación con animales control.

Estudios recientes han demostrado que el SRA local participa en diversas funciones y desórdenes del cerebro (Labandeira-Garcia et al., 2011; Phillips y de Oliveira 2008; Wright y Harding, 2011). Hemos demostrado, en diferentes modelos animales de EP, que hay un SRA local en la SN y que la pérdida celular dopaminérgica está incrementada por la AII a través de los receptores AT1, la activación del complejo NADPH oxidasa microglial (Joglar et al., 2009; Rey et al., 2007; Rodriguez-Pallares et al., 2008) y por el estrés oxidativo resultante (Rodriguez-Pallares et al., 2012). También hemos observado un incremento en la actividad del SRA, incluyendo incrementos en la expresión de los AT1, la actividad NADPH oxidasa, valores de IL-1 β y disminución de la expresión de los AT2 en la SN de ratas envejecidas junto con una mayor vulnerabilidad a las neurotoxinas de las neuronas dopaminérgicas, la cual se ve inhibida por el tratamiento con el antagonista de AT1 candesartan (Rodriguez-Perez et al., 2012; Villar-Cheda et al., 2012). No está del todo claro cuál es el mecanismo responsable del incremento en la actividad del SRA en la SN. Sin embargo, resultados de nuestro grupo sugieren que el incremento puede deberse, al menos en parte, a la hipoperfusión crónica observada en la SN de animales envejecidos (Villar-Cheda et al., 2012).

5.2.3-Efectos de la activación del sistema renina-angiotensina microglial, vía AT1/ROCK, en la degeneración dopaminérgica

5.2.3.1-Efectos de la activación del sistema renina-angiotensina microglial, vía AT1/ROCK, en la degeneración dopaminérgica. Papel de la angiotensina en la activación de la ruta RhoA/ROCK

Los resultados de este trabajo demuestran, por primera vez, que la activación de la vía RhoA-ROCK II participa en la degeneración celular dopaminérgica inducida por MPTP y posiblemente en la EP y que los inhibidores de ROCK disminuyen la muerte celular inducida por el MPTP. También se demuestra la existencia de una importante interacción entre las vías AII/AT1 y RhoA/ROCK II en la lesión inducida por MPTP ya que se vio que la delección de los receptores AT1 inhibe los incrementos en la expresión de RhoA y ROCK II debidos al MPTP, así como el incremento de la actividad ROCK derivado del tratamiento con MPTP. El incremento en la actividad ROCK se ve disminuido por el empleo del antagonista de AT1 candesartan. Mediante el empleo de cultivos celulares se comprobó que el efecto de la AII en la muerte neuronal inducida por el MPP⁺ es bloqueado por el inhibidor de ROCK, Y-27632 lo que excluye posibles efectos debido a cambios en la función vascular.

Estudios previos de nuestro grupo en modelos animales de EP demuestran que la inhibición de la activación microglial juega un papel determinante en la muerte celular dopaminérgica inducida por neurotoxinas (Joglar et al., 2009; Rodríguez-Pallares et al., 2008; Villar Cheda et al., 2012). Los presentes resultados están en consonancia con los obtenidos anteriormente y revelan un papel importante de la vía RhoA/ROCK en este efecto, ya que tanto el tratamiento con el inhibidor de ROCK II, Y-27632, como la delección de AT1, demuestran la neuroprotección en la muerte celular dopaminérgica inducida por las neurotoxinas MPTP/MPP⁺ y la inhibición de la respuesta microglial inducida por MPTP. Además, el tratamiento de los cultivos en presencia y ausencia de células microgliales confirma el papel determinante de la activación microglial de ROCK en este proceso.

La activación de la vía RhoA/ROCK tiene lugar de manera muy temprana tras la inyección de MPTP. También se ha visto que ROCK media en la reacción inmune proinflamatoria y en la activación microglial inducida en el cerebro por la lisofosfatidilcolina, las cuales se inhiben al emplear inhibidores de ROCK (Sheikh et al., 2009) llegándose a confirmar el efecto neuroprotector de los inhibidores de ROCK en ratones tratados con MPTP (Tönges et al., 2012).

Se sabe que RhoA/ROCK es un regulador importante del citoesqueleto de actina, lo cual es especialmente importante para la migración de las células inflamatorias a las zonas inflamadas (Greenwood et al., 2003; Honing et al., 2004), incluyendo a la microglía (Yan et al., 2012). Se ha demostrado que durante la activación de las células inflamatorias, RhoA/ROCK induce cambios en el citoesqueleto de actina que dan lugar a retracción de los procesos celulares, expansión celular y cambios en la motilidad celular característicos de la activación de células inflamatorias tales como la microglía (Bernhart et al., 2010). De acuerdo con lo expuesto, la activación de la vía RhoA/ROCK se ha demostrado en modelos animales de varias patologías cerebrales que cursan con un importante componente neuroinflamatorio (Mueller et al., 2005; Toshima et al., 2000). En el presente estudio, la inhibición de la vía AII/AT1 produjo resultados similares a los observados tras el tratamiento con inhibidores de ROCK, lo que sugiere que la activación de ROCK puede jugar un papel crítico en la respuesta inflamatoria inducida por AII.

Se sabe que la AII actúa, a través de receptores AT1, para inducir respuestas inflamatorias y liberar altos niveles de EROs (Qin et al., 2004; Touyz et al., 2002), y el presente estudio demuestra que la activación vía RhoA/ROCK microglial desempeña un papel determinante en este proceso.

Nuestro grupo ha demostrado previamente que en el sistema nigroestriatal de modelos animales de EP (ratas y ratones lesionados con 6-OHDA y con MPTP, respectivamente), la AII, a través de receptores AT1, induce la activación del complejo NADPH oxidasa, aumenta el estrés oxidativo y la neuroinflamación, y conduce a la muerte de las neuronas dopaminérgicas, que a su vez, se acompaña de un aumento en los niveles de los principales indicadores de estrés oxidativo (oxidación de proteínas y peroxidación lipídica). Estos efectos son inhibidos por los antagonistas de AT1 (Rey et al., 2007) o por fármacos inhibidores del enzima conversor de AII (iECAs) (Lopez-Real et al., 2005; Muñoz et al., 2006). En el presente estudio, empleando ratones *knock out* para AT1 tratados con MPTP, hemos confirmado que la estimulación del receptor AT1 incrementa la muerte de células dopaminérgicas y que los receptores AT1 median la activación de la vía RhoA/ROCK inducida por MPTP y la activación microglial.

También se sabe que la AII, a través del receptor AT2, ejerce acciones directamente opuestas a las mediadas por AT1, antagonizando así muchos de los efectos de la estimulación de este último (Chabrashvili et al., 2003; Jones et al., 2008; Sohn et al., 2000). Villar-Cheda et al., (2010) demuestra en un interesante estudio como los ratones *knock out* para AT1 presentan una actividad del complejo NADPH oxidasa y una expresión de receptores AT2 a nivel SN significativamente menor que sus respectivos animales salvajes. El descenso de la actividad del complejo NADPH

oxidasa y la subsecuente neuroprotección posterior, puede ser atribuida a la ausencia de señal derivada de la activación de AII sobre AT1 (que activaría el complejo NADPH oxidasa y la activación de los receptores AT2 por AII (que inhibirían el complejo NADPH oxidasa en ausencia del efecto opuesto de los receptores AT1).

De acuerdo con lo expuesto hasta ahora, nuestro grupo también ha observado recientemente que la expresión de receptores AT1 de la SN se regula a la baja y la de los AT2 al alza cuando a animales ovariectomizados se les administra una terapia estrogénica de reemplazamiento hormonal (Rodríguez-Perez et al., 2010) y que los receptores AT1 se encuentran regulados al alza y los AT2 a la baja en ratas menopáusicas (Rodríguez-Perez et al., 2012) en comparación con ratas hembra jóvenes tratadas con estradiol. Se sabe además, que tanto la incidencia como la prevalencia de la EP son más altas en hombres que en mujeres y en mujeres postmenopáusicas más que en mujeres premenopáusicas de edad similar (Baldereschi et al., 2000; Diamond et al., 1990). Curiosamente, varios estudios recientes en el músculo liso vascular y en células endoteliales han demostrado que el estradiol inhibe y los andrógenos potencian la activación de la vía RhoA/ROCK (Hiroki et al., 2005; Ito et al., 2006; Song et al., 2006). Estos datos previos, junto con los presentados en este estudio, sugieren que la activación de la vía RhoA/ROCK puede ser un factor importante implicado en la mayor respuesta neuroinflamatoria y en la mayor susceptibilidad frente a neurotoxinas dopaminérgicas observados en ratas menopáusicas y ratas macho en comparación con ratas jóvenes ovariectomizadas con tratamiento estrogénico (Rodríguez-Perez et al., 2011; Rodríguez-Perez et al., 2012) y, posiblemente, en la mayor incidencia de PD observada en los hombres y las mujeres menopáusicas.

En lo referente a los efectos de la AII en neuronas y microglía, se ha demostrado que ésta es una molécula proinflamatoria y un activador principal del complejo del complejo NADPH oxidasa en diferentes tipos celulares. Las EROs derivadas de la activación de NADPH tienen un papel crucial en la señalización de la AII vía receptores AT1, pero también son inductores muy importantes del estrés oxidativo (Cai et al., 2003; Seshiah et al., 2002; Touyz et al., 2002). Esto ha sido ampliamente estudiado en las células vasculares ya que la inflamación crónica de la pared del vaso es el signo distintivo de la aterosclerosis. La AII actúa en este proceso en, al menos, dos niveles (Ruiz-Ortega et al., 2001; Suzuki et al., 2003). En primer lugar, la AII actúa sobre las células residentes (células endoteliales y células de músculo liso en la pared vascular; neuronas en el cerebro), en las que, a través de receptores AT1, estimula la producción de bajos niveles de EROs intracelulares por activación del complejo NADPH-oxidasa. Estas EROs actúan como segundos

mensajeros en varias vías de señalización, incluidas las que participan en la activación de la respuesta inflamatoria y la migración de células inflamatorias al área lesionada. En segundo lugar, la AII actúa sobre células inflamatorias (tales como las células microgliales en el cerebro), en las que la activación del complejo NADPH-oxidasa produce EROs con doble función: a) altas concentraciones de EROs se liberan extracelularmente para matar a microorganismos invasores; y b) los bajos niveles de EROs intracelular actúan como un segundo mensajero en varias vías de señalización implicadas en la respuesta inflamatoria (Babior, 2004; Qin et al, 2004).

El tratamiento con MPP⁺ induce la liberación mitocondrial de EROs, lo que a su vez induce una segunda secuencia de EROs derivadas de la NADPH oxidasa, la cual se ve disminuida por el tratamiento con el antagonista de AT1 candesartan (Zawada et al., 2011). Usando cultivos primarios de células mesencefálicas, hemos visto que los canales de potasio mitocondriales sensibles al ATP tienen un papel fundamental en la interacción entre las EROs derivadas de la NADPH y las mitocondriales tras el tratamiento con AII y/o neurotoxinas como el MPP⁺ y la 6-OHDA (Rodríguez-Pallares et al., 2009, Rodríguez-Pallares et al., 2011).

Como ya se ha mencionado, los receptores de AT1, AT2 y del complejo NADPH oxidasa están presentes en las neuronas dopaminérgicas y en microglía, y la inhibición de los receptores neuronales AT1 puede reducir las EROs derivadas de la activación del complejo NADPH oxidasa neuronal, lo que podría conducir a la inhibición directa de la muerte de las neuronas dopaminérgicas, seguido de una posterior reducción en la activación microglial. Sin embargo, esta posibilidad no está respaldada por nuestros estudios. Utilizando cultivos primarios mesencefálicos enriquecidos en neuronas hemos observado que sólo altas dosis de neurotoxinas pueden inducir la muerte de las neuronas dopaminérgicas en ausencia de células gliales (Joglar et al, 2009; Rodríguez Pallares et al, 2007; Rodríguez Pallares et al, 2008; Rodríguez-Pallares et al, 2009; Rodríguez Pallares et al, 2011). Esto ha sido confirmado en un estudio reciente con una línea celular dopaminérgica (Zawada et al, 2011) en la que sólo se observa una muerte celular significativa tras el tratamiento con dosis muy altas de MPP⁺ (300 mM). Sin embargo, en el estudio actual y en estudios anteriores nuestro grupo investigó los efectos de dosis muy bajas (0,25 µM MPP⁺) o subletales (10 µM 6-OHDA) de neurotoxinas. Los efectos de estas dosis bajas pueden ser más similares a los efectos causados por neurotoxinas ambientales o por otros factores nocivos implicados en la EP. Las dosis bajas o subletales de neurotoxinas no inducen una muerte significativa en cultivos neuronales puros. Sin embargo, las agresiones subletales pueden inducir señales proinflamatorias que, en presencia de células gliales, desencadenan la activación microglial

con el posterior aumento de EROs y citoquinas de origen microglial, que inducen la progresión de la muerte neuronal (Qin et al., 2004; Biber et al., 2007). Además, otros estudios han demostrado que la activación microglial y los radicales libres derivados de NADPH microglial juegan un papel importante en la toxicidad de la MPTP y posiblemente en la EP, y que las neuronas dopaminérgicas son particularmente vulnerables a las EROs derivadas de la activación del complejo NADPH oxidasa microglial (Gao et al, 2003a; Gao et al, 2003 b; Wu et al, 2003). La activación inducida AII del complejo NADPH oxidasa microglial y de la vía RhoA/ROCK desempeña un papel determinante en este proceso.

Recientemente se ha demostrado una interrelación entre la activación de la vía RhoA/ROCK y la activación del complejo NADPH oxidasa (Rodríguez-Perez et al., 2015) lo que ya había sido sugerido por otros autores tras las observaciones que demostraban como los inhibidores de la ROCK suprimían la activación del complejo NADPH oxidasa inducida por la AII (Budzyn et al., 2006; Hiroki et al., 2004). Sin embargo, también existen datos que sugieren que la AII puede activar a ROCK independientemente de la NADPH oxidasa en células vasculares musculares lisas (Ohtsu et al., 2006).

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren, por primera vez, un posible efecto beneficioso de la inhibición de ROCK en el tratamiento de la EP. En varios estudios anteriores hemos demostrado que agentes bloqueantes de los receptores AT1 (Joglar et al, 2009; Rey et al., 2007; Rodríguez-Pallares et al., 2008) e iECA (López-Real et al., 2005; Muñoz et al., 2006), ampliamente utilizados en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares y renales, protegen frente a la degeneración dopaminérgica inducida por neurotoxinas (Labandeira-García et al., 2011), y en el presente estudio también hemos observado que la delección de AT1 también inhibe la actividad ROCK.

5.2.3.2- Efectos de la activación del sistema renina-angiotensina microglial vía AT1/ROCK, en la degeneración dopaminérgica. Interacciones con los estrógenos

En este estudio, confirmamos las observaciones ya realizadas por nuestro grupo en ratas lesionadas con 6-OHDA y en ratones tratados con MPTP (Rodríguez-Perez et al., 2010; Rodríguez-Perez et al., 2012) al mostrar como la ausencia de estrógenos incrementa la mortalidad de las células dopaminérgicas debida a neurotoxinas, mientras que la administración de estrógenos la disminuye. También comprobamos en nuestro grupo como la ausencia de estrógenos incrementa la actividad del SRA en la región de la SN de ratas hembra y como el tratamiento con estrógenos provoca una regulación a la baja de la actividad del SRA, produciendo una disminución en la expresión de los receptores AT1 y un incremento en la expresión de receptores AT2 (Rodríguez-Perez et al., 2010; Rodríguez-Perez et al., 2012). El hecho de que se produzca una disminución en la muerte neuronal celular debido a una regulación a la baja de los receptores AT1 causada por los estrógenos coincide con resultados anteriores obtenidos por nuestro grupo (Joglar et al., 2009; Rey et al., 2007; Rodríguez-Pallares et al., 2008) y por otros (Grammatopoulos et al., 2007; Zawada et al., 2011). Es destacable el hecho de que las ratas ovariectomizadas expresan una cantidad menor de receptores AT2 que las ratas tratadas con estrógenos (Rodríguez-Perez et al., 2010; Rodríguez-Perez et al., 2012), circunstancia que puede incrementar la pérdida de neuronas dopaminérgicas, ya que los receptores AT2 tienen un efecto opuesto al de los receptores AT1 (Chabrashvili et al., 2003; Jones et al., 2008; Sohn et al., 2000).

En este estudio demostramos que el bloqueo de los receptores AT1 inhibe el incremento en la muerte neuronal dopaminérgica inducida por la ausencia de estrógenos en el modelo de EP por MPTP. Los experimentos realizados con ratones *knock out* para AT1 muestran como este efecto no está relacionado con ningún efecto farmacológico adicional de los antagonistas de los receptores de AT1, sino que se deben únicamente al bloqueo de dichos receptores. Los mecanismos que participan en la regulación de los componentes del SRA por los estrógenos no han sido dilucidados. En el cerebro y en tejidos periféricos, la administración de estrógenos induce una disminución en la expresión de proteína de los receptores AT1, pero no produce cambios significativos en la expresión del ARN mensajero de AT1. Se ha sugerido que los estrógenos regulan la expresión de AT1 a nivel postranscripcional a través de proteínas citosólicas que se unen a elementos en cis en la secuencia líder del ARN mensajero de AT1, interfieren con el escaneo ribosomal e inhiben la eficiencia traslacional (Krishnamurthi et al., 1999; Wu et al., 2003).

Los resultados del presente trabajo, muestran que la inhibición de la RhoA/ROCK está relacionada con los efectos neuroprotectores de la administración de estrógenos. También se muestra la existencia de una relación entre la inhibición de la actividad RhoA/ROCK, los efectos neuroprotectores del bloqueo de los receptores AT1, ésto se debe a las siguientes razones. Primero, comprobamos como el empleo del inhibidor de la ROCK, Y-27632, y como la supresión del receptor de AT1 inhiben el incremento en la muerte neuronal dopaminérgica debido a la ausencia de estrógenos. Segundo, observamos el hecho de que la ausencia de estrógenos produce un incremento significativo en la actividad de la ROCK, incremento que se ve bloqueado por el empleo del antagonista de los receptores AT1 candesartan. A mayores, también comprobamos como el MPTP incrementa de manera significativa la actividad ROCK en ratones hembra ovariectomizados, hecho que no se produce en ratones tratados con estrógenos ni en animales *knock out* para AT1. También comprobamos que el MPTP produce un incremento en los niveles de expresión de ARN mensajero y de proteína de RhoA y ROCK II en ratones ovariectomizados, siendo el efecto del MPTP menor en ratones ovariectomizados tratados con estrógenos y en ratones ovariectomizados *knock out* para AT1. En conjunto, estos resultados sugieren que la activación de la ROCK puede tener un papel fundamental en la vulnerabilidad incrementada de las neuronas dopaminérgicas que se observa tras la eliminación de los estrógenos y que este efecto está mediado por la activación de la ruta AII/AT1. Finalmente estudiamos si la hiperactivación de la ROCK debida a la ausencia de estrógenos también afecta a la expresión de AT1 en un mecanismo de control anticipativo.

Observamos una expresión muy intensa de ROCK II en las células microgliales en la SN de ratones macho tratados con MPTP, y confirmamos el papel fundamental de la ROCK microglial al comparar cultivos mesencefálicos con, y sin microglía. RhoA/ROCK es un regulador importante del citoesqueleto de actina, lo que es de especial relevancia para la migración de células inflamatorias, incluyendo la microglía (Yan et al., 2012), hacia zonas inflamadas (Greenwood et al., 2003; Honing et al., 2004). Durante la activación de las células inflamatorias, RhoA/ROCK induce cambios en el citoesqueleto de actina característicos de la activación de dichas células (Bernhart et al., 2010). La activación de la ROCK ha sido observada en modelos de varios desórdenes del SNC; lesiones cerebrales y de la médula espinal activan a la ROCK, que se revela como un mediador fundamental de la respuesta neuroinflamatoria (Mueller et al., 2005; Sheikh et al., 2009).

Se ha confirmado recientemente el efecto neuroprotector de los inhibidores de la ROCK en ratones tratados con MPTP (Tönges et al., 2012), y se ha sugerido que el efecto neuroprotector de la inhibición de la ROCK puede estar también relacionado con una mayor supervivencia del

pericarion y con una mayor integridad de los axones en neuronas dopaminérgicas a través de una señalización de Akt incrementada tras la inhibición de la ROCK (Tönges et al., 2012). Se sabe que la inhibición de ROCK fomenta el crecimiento de neuritas (Borisoff et al., 2003; Lehmann et al., 1999) y que tiene funciones de estabilización de los axones (Gallo, 2004). También se sabe que la inhibición de los receptores AT1 y la activación de los receptores AT2 también promueven el crecimiento axonal (Laflamme et al., 1996; Meffert et al., 1996), la regeneración axonal (Lucius et al., 1998; Reinecke et al., 2003) y la diferenciación neuronal, lo que también observamos en nuestro grupo que se produce en neuronas dopaminérgicas (Rodríguez-Pallares et al., 2004). También se ha visto que los estrógenos inducen el crecimiento de los axones en diferentes tipos neuronales, aunque el mecanismo implicado no ha sido clarificado (Gollapudi y Oblinger, 2001; Mérot et al., 2009). En el presente estudio demostramos que los estrógenos inducen inhibición de la ROCK y que los estrógenos disminuyen la expresión del receptor AT1 e incrementa la expresión del receptor AT2 (Rodríguez-Perez et al., 2010; Rodríguez-Perez et al., 2012); estos son mecanismos posibles subyacentes al crecimiento axonal inducido por estrógenos.

También se ha observado la existencia de interacciones entre la AII y la ROCK en células musculares lisas vasculares, ya que tanto la activación de AII/AT1 como de ROCK tienen un papel fundamental en la hipertensión y en la arteriosclerosis. Se ha sugerido que la ruta RhoA/ROCK se encuentra después en la cascada de activación del SRA en las células musculares lisas vasculares y que la AII, a través del receptor AT1 activa RhoA/ROCK, dando lugar a una remodelación vascular y a hipertensión (Hiroki et al., 2004; Ohtsu et al., 2006). Esto es consistente con lo observado en el mesencéfalo ventral en este estudio. Por lo tanto, una disminución de la expresión del receptor AT1 y de la actividad ROCK inducidas por los estrógenos puede explicar, al menos de manera parcial, las diferencias asociadas al género y las diferencias entre mujeres pre- y postmenopáusicas en la susceptibilidad a la EP (Baldereschi et al., 2000; Currie et al., 2004; Mayeux et al., 1995; Ragonese et al., 2006a; Ragonese et al., 2006b; Van den Eeden et al., 2003) y en la enfermedad vascular (Barton et al., 2007; Dubey et al., 2002; Reckelhoff, 2005).

5.2.4-Efectos de la activación del sistema renina-angiotensina sobre la homeostasis del Fe²⁺ en la sustancia negra

Los resultados de este trabajo demuestran que la AII, a través de los receptores AT1 modula la homeostasis del hierro en las neuronas dopaminérgicas y en las células microgliales, y que las células gliales juegan un papel importante en la regulación de la homeostasis del hierro en las neuronas dopaminérgicas. En la línea neuronal dopaminérgica MES23.5 y en cultivos primarios de mesencéfalo ventral enriquecidos en neuronas (carentes de glía), la administración de AII induce un incremento significativo en los niveles de TfR, DMT1 y Fp1 sugiriendo un incremento, inducido por la AII, en la captación y transporte de hierro. También se vieron incrementos significativos en los niveles de hierro lábil y en los niveles neuronales de ferritina, posiblemente como respuesta compensatoria al incremento en los niveles de hierro. Hemos demostrado que el incremento, debido a la AII, de las proteínas reguladores del hierro es inhibido con el empleo del antagonista de AT1, ZD7155, y por el inhibidor de la NADPH-oxidasa, apocinina, pero no por el antagonista de AT2, PD123319. Esto implica que este efecto es mediado por los receptores AT1 y por la activación de la NADPH-oxidasa. La administración del antioxidante N-acetil cisteína, NAC, lleva a efectos inhibitorios similares, lo que sugiere que la activación de AT1 incrementa los niveles de superóxido producidos por la NADPH oxidasa, lo que a su vez incrementa la expresión de TfR, DMT1 y Fp1. El incremento de las proteínas reguladoras del hierro debido a la AII fue bloqueado por el inhibidor de NF-κB, ditiocarbamato de pirrolidina (PDTC, del inglés *pyrrolidine dithiocarbamate*), lo cual sugiere que la traslocación nuclear de NF-κB está involucrada en el proceso. Esto es consistente con datos previos que muestran que NF-κB es un señalizador intracelular para la AII en células renales y vaculares (Li y Zhuo, 2008; Tham et al., 2002).

En cultivos mesencefálicos primarios la administración de concentraciones 100 nM de AII produce incrementos significativos en los niveles de TfR, DMT1 y Fp1, lo que indica un incremento en la recaptación y en el transporte de hierro. Sin embargo, no se han detectado cambios significativos en los niveles de hierro lábil o de ferritina, lo que sugiere un almacenaje de hierro efectivo. Empleando inmunofluorescencia y microscopía confocal en cultivos primarios, investigamos la implicación de las neuronas dopaminérgicas y las células microgliales separadamente. En neuronas dopaminérgicas, observamos un incremento significativo en los niveles de TfR, DMT1 y Fp1 y no observamos cambio significativo alguno en los niveles de ferritina. En células microgliales, observamos un incremento ligero, pero significativo, en los

niveles de ferritina, el cual es difícil de detectar en el cultivo por WB. Nuestros resultados sugieren que la AII produce un incremento en la captación y el transporte de hierro. En ausencia de glía, se produjeron incrementos significativos en los niveles de hierro lábil y de ferritina neuronal, lo que sugiere una desregulación de la homeostasis del hierro. En presencia de glía no se observaron cambios significativos en los niveles de hierro lábil o de ferritina en las neuronas dopaminérgicas, lo que revela el rol de las células gliales en la regulación de la homeostasis del hierro tras la administración de AII. Además, observamos un incremento significativo en los niveles de ferritina en las células microgliales, lo que sugiere que la microglía juega un papel importante en el almacenamiento del hierro y en su homeostasis.

La microglía, las neuronas y los oligodendrocitos expresan ferritina, indicando que todos estos tipos celulares tienen la capacidad de almacenar hierro. Por el contrario, los astrocitos expresan muy poca ferritina, lo que indica que estas células tienen muy poca capacidad de almacenaje (Mehlhase et al., 2006; Zecca et al., 2004a,b). Los oligodendrocitos son las células que, predominantemente, contienen hierro y ferritina en el cerebro normal, lo que es esencial para la mielinización normal (Todorich et al., 2009). Las células microgliales también contienen elevados niveles de ferritina, lo que juega un papel importante en el almacenaje de hierro y en su homeostasis, y la ferritina liberada por la microglía es una fuente significativa de hierro para los oligodendrocitos (Zhang et al., 2006). La microglía no expresa TfR y, supuestamente, obtiene el hierro mediante la captación de ferritina por fagocitosis (Leitner y Connor, 2012) o vía DMT1 (Urrutia et al., 2013).

En estudios anteriores se ha sugerido que los niveles microgliales de ferritina cambian en respuesta al estrés oxidativo y a la activación microglial (Mehlhase et al., 2006). Se ha comprobado además un incremento transitorio en los niveles de ferritina microglial al inicio de la respuesta inflamatoria o en presencia de un leve estrés oxidativo (Cheepsunthorn et al., 2001; MacKenzie et al., 2008; Orino et al., 2001). Sin embargo, diferentes estudios han demostrado que la activación microglial y el estrés oxidativo persistente promueve la liberación del hierro por la ferritina (Yoshida et al., 1995) y la disminución de los niveles de ferritina microgliales. Ésto probablemente sea debido a la oxidación de ferritina intracelular y a la degradación proteosomal consecuente, así como a una reducción en la síntesis de ferritina (Mehlhase et al., 2005; Mehlhase et al., 2006). La liberación del hierro por parte de la ferritina en la microglía activada puede incrementar el daño oxidativo derivado de la respuesta microglial. Los resultados del análisis histológico confirman que la ferritina se localiza fundamentalmente en la microglía y en los oligodendrocitos y que los niveles son o bien muy bajos o bien indetectables en neuronas. Nuestros resultados han mostrado que una

única inyección de AII incrementa los niveles de ferritina y los depósitos de hierro en las células microgliales de rata y que la AII también produce un incremento en los niveles de ferritina en las células microgliales en cultivo. Sin embargo, los niveles de ferritina disminuyen tras una estimulación prolongada con AII (administración crónica de 5 μ M de AII). Se sabe que la AII, a través de los receptores AT1, activa el complejo NADPH oxidasa en células microgliales, lo que produce un incremento en los niveles de EROs (Joglar et al., 2009; Rodríguez-Pallares et al., 2008). La AII también produce un incremento en el almacenaje de hierro por la ferritina. Sin embargo, un estrés oxidativo inducido por la AII que se prolongue en el tiempo conduce a una degradación de la ferritina y a un incremento en los niveles de hierro lábil, lo que puede incrementar el daño oxidativo derivado de la respuesta microglial. Esto concuerda con el incremento en la respuesta microglial y en la degeneración dopaminérgica debido a la sobreactivación del SRA observado en estudios anteriores (Joglar et al., 2009; Rodríguez-Pallares et al., 2008).

Hay cierta controversia sobre la existencia o ausencia de diferencias en los niveles de hierro y de ferritina en la SN entre enfermos de la EP y sujetos normales (Dusek et al., 2012; Friedman et al., 2009). Las diferencias en los procedimientos de cuantificación, en la edad de los sujetos y en el estadio de la enfermedad pueden explicar los diferentes resultados obtenidos. El envejecimiento y la EP ejercen diferentes efectos sobre el hierro y la ferritina, así, el contenido total de hierro y ferritina puede verse incrementado en la SN debido a factores asociados con el envejecimiento, mientras que por otra parte el hierro lábil puede verse incrementado a la vez que la ferritina disminuida en la SN de pacientes de EP (Friedman et al., 2009). Una sobreactivación del SRA y el estrés oxidativo inducen un incremento en el hierro lábil microglial y una disminución en los niveles de ferritina. Estudios llevados a cabo previamente por nuestro grupo en modelos experimentales de la EP, MPTP y 6-OHDA, muestran que la respuesta neuroinflamatoria, el estrés oxidativo y la degeneración dopaminérgica producidos por la administración de dosis bajas de neurotoxinas se ven incrementados por la administración de AII y disminuidos por la administración de antagonistas de AT1 (Joglar et al., 2009; Labandeira-García et al., 2013; Rodríguez-Pallares et al., 2008). También hemos demostrado que ello es debido a un incremento de las EROs inducido por la AII. La AII produce cambios en la homeostasis del hierro, lo que puede desempeñar un papel importante en el incremento observado de EROs y en los efectos de la sobreactivación actividad de SRA en la progresión de la degeneración dopaminérgica. Un estrés oxidativo moderado y la hiperactividad del SRA llevan a un incremento en los niveles de ferritina y de hierro almacenado. Sin embargo, entender los procesos de la homeostasis del hierro en las neuronas dopaminérgicas humanas es

complicado debido a la presencia en éstas de neuromelanina. La neuromelanina está involucrada en la homeostasis del hierro en las neuronas dopaminérgicas humanas pero su rol exacto en el metabolismo y en el empleo del hierro aún no está del todo claro (Double y Halliday, 2006; Snyder y Connor, 2009; Zecca et al., 2001). Hay también cierta controversia respecto a cuánto hierro se encuentra unido a la neuromelanina (Hirsch et al., 1991; Jellinger et al., 1992).

En general se acepta que las cantidades de hierro y ferritina en la SN se ven incrementadas con la edad (Dusek et al., 2012). Sin embargo, se desconoce el por qué de este incremento. Se han postulado diferentes hipótesis tales como una disfunción de la barrera hematoencefálica o una disminución de los compuestos antioxidantes entre otras (Farrall y Wardlaw, 2009; Kaur et al., 2009). Habitualmente se acepta que la ferritina aumenta en respuesta a la presencia de niveles de hierro mayores de los habituales (Focht et al., 1997; Zecca et al., 2004). Sin embargo, también se ha sugerido que el incremento en ferritina microglial se relaciona con un control menos eficiente de la homeostasis del hierro en la microglía senescente (Lopes et al., 2008). En estudios anteriores en animales envejecidos, se observó una hiperactividad del SRA en la SN, junto con la presencia de niveles elevados de marcadores de neuroinflamación y de activación de la NADPH, los cuales son inhibidos por el tratamiento con candesartan (Rodríguez-Perez et al., 2012; Rodríguez-Perez et al., 2013; Villar-Cheda et al., 2012). Hemos observado que los incrementos en los niveles de depósitos de hierro y de ferritina en ratas envejecidas se inhiben por el tratamiento con candesartan, lo que sugiere que la hiperactividad del SRA juega un papel muy importante en los incrementos de ferritina y de hierro en la SN. Los estudios histológicos revelan que los incrementos que se producen con la edad en los depósitos de hierro y de ferritina se localizan en células gliales, particularmente en células microgliales. Por el contrario, no se detectaron incrementos en neuronas dopaminérgicas.

El incremento en la actividad del SRA debido al envejecimiento puede inducir un incremento en el almacenamiento de hierro microglial y contribuir a una mayor susceptibilidad a la degeneración de las neuronas dopaminérgicas en animales viejos (Collier et al., 2007; Villar-Cheda et al., 2009; Villar-Cheda et al., 2012). En animales viejos, un incremento adicional en los niveles de estrés oxidativo puede llevar a la disminución de los niveles de ferritina y a la liberación del hierro lábil (Mehlhase et al., 2005; Mehlhase et al., 2006; Yoshida et al., 1995), y, por lo tanto, a mayor disponibilidad de hierro para inducir la formación de radicales libres y exacerbar la respuesta microglial y el daño oxidativo.



CONCLUSIONES



Los resultados obtenidos nos permiten concluir que:

1. Existen mecanismos de contrarregulación entre los receptores de dopamina y de angiotensina en el sistema nervioso central. El envejecimiento está asociado a una regulación a la baja de los receptores de dopamina y de la función dopaminérgica a nivel nigroestriatal, lo que conlleva, a su vez, una regulación al alza de fenómenos pro-oxidantes y pro-inflamatorios mediados por la vía AII/AT1.
2. En ratones carentes del receptor D2 se produce un incremento de la expresión de AT1 y como mecanismo compensatorio la sobreexpresión de AT2. En ratones carentes del receptor D1, se sobreexpresan los receptores AT1 pero baja la expresión de angiotensinógeno. La sobreexpresión de receptores D2 en ratones lleva a una regulación a la baja de la expresión de los receptores AT1 y AT2 junto con un incremento compensatorio de los niveles de angiotensinógeno y angiotensina y de la actividad del enzima conversor de angiotensina.
3. La administración de candesartán, aguda o crónica, no induce cambios en los niveles estriatales de dopamina, ni de sus metabolitos y no altera de manera significativa el comportamiento motor.
4. El tratamiento crónico con candesartan, como estrategia neuroprotectora contra la progresión de la degeneración dopaminérgica, no afecta a los niveles de dopamina derivada de la descarboxilación de la L-DOPA.
5. La hipoperfusión cerebral crónica produce un incremento en la actividad del sistema renina-angiotensina en la sustancia negra, en la pérdida de neuronas dopaminérgicas y potencia los efectos tóxicos de la neurotoxina 6-OHDA.
6. El bloqueo de los receptores AT1, mediante el empleo de candesartan, ejerce un efecto neuroprotector en condiciones de hipoperfusión cerebral, lo que confirma la implicación del SRA en la degeneración neuronal dopaminérgica.
7. La activación de la vía RhoA/ROCK microglial está involucrada en el incremento de la muerte neuronal dopaminérgica inducida por la activación de los receptores AT1 por AII.
8. El incremento de la actividad del SRA inducida por la depleción estrogénica conduce a un incremento en la actividad de la vía RhoA/ROCK.
9. La sobreactivación de la vía RhoA/ROCK contribuye de manera significativa al incremento de la vulnerabilidad de las neuronas dopaminérgicas tras la depleción estrogénica.
10. La AII, a través de los receptores AT1, modula la homeostasis del hierro en las neuronas

dopaminérgicas y en las células microgliales. Se confirma, además, el papel determinante de las células gliales en la regulación de la homeostasis del hierro en las neuronas dopaminérgicas.

11. El estrés oxidativo inducido por la AII y prolongado en el tiempo, como ocurre en animales envejecidos, conduce a una degradación de la ferritina y a un incremento en los niveles de hierro lábil, lo que puede incrementar el daño oxidativo derivado de la respuesta microglial y, a consecuencia de ello, la degeneración dopaminérgica.





BIBLIOGRAFÍA



- Aguilera G, Kiss A (1996) Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and vasopressin secretion. Role of angiotensin II. *Adv Exp Med Biol*, 396:105-112.
- Alberio T, Lopiano L, Fasano M (2012) Cellular models to investigate biochemical pathways in Parkinson's disease. *FEBS J* 279(7):1146-1155.
- Albin RL, Young AB, Penney JB (1989) The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci*, 12:366-375.
- Aldred GP, Chai SY, Song K, Zhuo J, MacGregor DP, Mendelsohn FA (1993) Distribution of angiotensin II receptor subtypes in the rabbit brain. *Regul Pept*, 44(2):119-130.
- Alexander GE, DeLong MR, Strick PL (1986) Parallel organization of functionally segregated circuits linking basal ganglia and cortex. *Annu Rev Neurobiol*, 9:357-381.
- Allain H, Bentué-Ferrer D, Akwa Y (2008) Disease-modifying drugs and Parkinson's disease. *Prog Neurobiol*, 84(1):25-39.
- Allen AM, MacGregor DP, McKinley MJ, Mendelsohn FA (1999) Angiotensin II receptors in the human brain. *Regul Pept*, 79(1):1-7.
- Allen AM, Moeller I, Jenkins TA, Zhuo J, Aldred GP, Chai SY, Mendelsohn FA (1998) Angiotensin receptors in the nervous system. *Brain Res Bull*, 47(1):17-28.
- Allen AM, Zhuo J, Mendelsohn FA (2000) Localization and function of angiotensin AT1 receptors. *Am J Hypertens*, 13(1 pt 2):31S-38S.
- Amano M, Nakayama M, Kaibuchi K (2010) Rho-kinase/ROCK: A key regulator of the cytoskeleton and cell polarity. *Cytoskeleton (Hoboken)*, 67(9):545-554.
- Ambrosi G, Cerri S, Blandini F (2014) A further update on the role of excitotoxicity in the pathogenesis of Parkinson's disease. *J Neural Transm*, 121(8):849-859.
- Amin E, Dubey BN, Zhang SC, Gremer L, Dvorsky R, Moll JM, Taha MS, Nager-Steger L, Piekorz RP et al. (2013) Rho-kinase: regulation, (dys)function, and inhibition. *Biol Chem*, 394(11):1399-1410.
- Andrade AQ, Casarini DE, Schor N, Boim MA (2002) Characterization of renin mRNA expression and enzyme activity in rat and mouse mesangial cells. *Braz J Med Biol Res*, 35(1):17-24.
- Andrews RJ (2010) Neuromodulation: advances in the next decade. *Ann N Y Acad Sci*, 1199:212-220.
- Anzalone A, Lizardi-Ortiz JE, Ramos M, De Mei C, Hopf FW, Iaccarino C, Halbout B, Jacobsen J, Kinoshita C, Welter M et al. (2012) Dual control of dopamine synthesis and release by presynaptic and postsynaptic dopamine D2 receptors. *J Neurosci*, 32(26):9023-9034.

- Aperia AC (2000) Intrarenal dopamine: a key signal in the interactive regulation of sodium metabolism. *Annu Rev Physiol*, 62:621-647.
- Arenas E (2002) Stem cells in the treatment of Parkinson's disease. *Brain Res Bull* 57:795-808.
- Arenas E (2010) Towards stem cell replacement therapies for Parkinson's disease. *Biochem Biophys Res Commun*, 396(1):152-156.
- Asghar M, Tayebati SK, Lokhandwala MF, Hussain T (2011) Potential dopamine-1 receptor stimulation in hypertension management. *Curr Hypertens Rep*, 13(4):294-302.
- Aulakh GK, Sodhi RK, Singh M (2007) An update on non-peptide angiotensin receptor antagonists and related RAAS modulators. *Life Sci*, 81(8):615-639.
- Babior BM (2004) NADPH oxidase. *Curr Opin Immunol*, 16(1):42-47.
- Bader M (2010) Tissue renin-angiotensin-aldosterone systems: Targets for pharmacological therapy. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 50:439-465.
- Bader M, Ganten D (2000) Regulation of renin: new evidence from cultured cells and genetically modified mice. *J Mol Med (Berl)*, 78(3):130-139.
- Baldereschi M, Di Carlo A, Rocca WA, Vanni P, Maggi S, Perissinotto E, Grigoletto F, Amaducci L, Inzitari D (2000) Parkinson's disease and parkinsonism in a longitudinal study: two-fold higher incidence in men. ILSA Working Group. Italian Longitudinal Study on Aging. *Neurology*, 55(9):1358-1363.
- Barton M, Meyer MR, Haas E (2007) Hormone replacement therapy and atherosclerosis in postmenopausal women: does aging limit therapeutic benefits? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 27(8):1669-1672.
- Benabid AL (2003) Deep brain stimulation for Parkinson's disease. *Curr Opin Neurobiol*, 13(6):696-706.
- Benicky J, Sánchez-Lemus E, Pavel J, Saavedra JM (2009) Anti-inflammatory effects of angiotensin receptor blockers in the brain and the periphery. *Cell Mol Neurobiol*, 29(6-7):781-792.
- Benigni A, Cassis P, Remuzzi G (2010) Angiotensin II revisited: new roles in inflammation, immunology and aging. *EMBO Mol Med*, 2(7):247-257.
- Benoit-Marand M, Ballion B, Borrelli E, Boraud T, Gonon F (2011) Inhibition of dopamine uptake by D2 antagonists: an in vitro study. *J Neurochem*, 116(3):449-458.
- Bergson C, Mrzljak L, Smiley JF, Pappy M, Levenson R, Goldman-Rakic PS (1995) Regional, cellular, and subcellular variations in the distribution of D1 and D5 dopamine receptors in

- primate brain. *J Neurosci*, 15(12):7821-7836.
- Bernhart E, Kollros M, Rechberger G, Reicher H, Heinemann A, Schratl P, Hallström S, Wintersperger A, Nussold C et al. (2010) Lysophosphatidic acid receptor activation affects the C13NJ microglia cell line proteome leading to alterations in glycolysis, motility, and cytoskeletal architecture. *Proteomics*, 10(1):141-158.
- Berridge MJ (2009) Inositol trisphosphate and calcium signalling mechanisms. *Biochim Biophys Acta*, 1793(6):933-940.
- Biber K, Neumann H, Inoue K, Boddeke HW (2007) Neuronal 'On' and 'Off' signals control microglia. *Trends Neurosci*, 30(11):596-602.
- Bjorklund T, Kordower JH (2010) Gene therapy for Parkinson's disease. *Mov Disord*, 25(Suppl. 1):S161-173.
- Blandini F (2010) An update on the potential role of excitotoxicity in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Funct Neurol*, 25(2):65-71.
- Blandini F, Armentero MT, Martignoni E (2008) The 6-hydroxydopamine model: news from the past. *Parkinsonism Relat Disord*, 14(Suppl. 2):S124-129.
- Blesa J, Phani S, Jackson-Lewis V, Przedborski S (2012) Classic and new animal models of Parkinson's disease. *J Biomed Biotechnol*, 2012:846518.
- Boguski MS, McCormick F (1993) Proteins regulating Ras and its relatives. *Nature*, 366(6456):643-654.
- Bohnen NI, Albin RL (2011) White matter lesions in Parkinson disease. *Nat Rev Neurol*, 7 (4):229-236.
- Bonuccelli U, Del Dotto P (2006) New pharmacologic horizons in the treatment of Parkinson disease. *Neurology*, 67:S30-38.
- Borisoff JF, Chan CC, Hiebert GW, Oschipok L, Robertson GS, Zamboni R, Steeves JD, Tetzlaff W (2003) Suppression of Rho-kinase activity promotes axonal growth on inhibitory CNS substrates. *Mol Cell Neurosci*, 22(3):405-416.
- Borrajo A, Rodriguez-Perez AI, Diaz-Ruiz C, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL (2014) Microglial TNF- α mediates enhancement of dopaminergic degeneration by brain angiotensin. *Glia*, 62(1):145-157.
- Borrajo A, Rodriguez-Perez AI, Villar-Cheda B, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL (2014) Inhibition of the microglial response is essential for the neuroprotective effects of Rho-kinase inhibitors on MPTP-induced dopaminergic cell death. *Neuropharmacology*, 85:1-8.
- Brendel A, Felzen V, Morawe T, Manthey D, Behl C (2013) Differential regulation of apoptosis-

- associated genes by estrogen receptor alpha in human neuroblastoma cells. *Restor Neurol Neurosci*, 31(2):199-211.
- Brown DC, Steward LJ, Ge J, Barnes NM (1996) Ability of angiotensin II to modulate striatal dopamine release via the AT1 receptor in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol*, 118(2):414-420.
- Buchman AS, Shulman JM, Nag S, Leurgans SE, Arnold SE, Morris MC, Schneider JA, Bennett DA (2012) Nigral pathology and parkinsonian signs in elders without Parkinson's disease. *Ann Neurol*, 71(2):258-266.
- Budzyn K, Marley PD, Sobey CG (2006) Targeting Rho and Rho-kinase in the treatment of cardiovascular disease. *Trend Pharmacol Sci*, 27(2):97-104.
- Bunnemann B, Fuxe K, Ganten D (1992) The brain renin-angiotensin system: localization and general significance. *J Cardiovasc Pharmacol*, 19 (Suppl 6):S51-S62.
- Burke WJ, Kumar VB, Pandey N et al. (2008) Aggregation of α -synuclein by DOPAL, the monoamine oxidase metabolite of dopamine. *Acta Neuropathologica*, 115(2):193-203.
- Burke RE, O'Malley K (2013) Axon degeneration in Parkinson's disease. *Exp Neurol*, 246:72-83.
- Burns RS, LeWitt PA, Ebert MH, Pakkenberg H, Kopin IJ (1985) The clinical syndrome of striatal dopamine deficiency. Parkinsonism induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *N Engl J Med*, 312(22):1418-1421.
- Cadet JL, Jayanthi S, McCoy MT, Beauvais G, Cai NS (2010) Dopamine D1 receptors, regulation of gene expression in the brain, and neurodegeneration. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 9(5):526-538.
- Cai H, Griendling KK, Harrison DG (2003) The vascular NAD(P)H oxidases as therapeutic targets in cardiovascular diseases. *Trends Pharmacol Sci*, 24(9):471-478.
- Campos FL, Cristovão AC, Rocha SM, Fonseca CP, Baltazar G (2012) GDNF contributes to oestrogen-mediated protection of midbrain dopaminergic neurones. *J Neuroendocrinol*, 24(11):1386-1397.
- Carey RM (2001) Theodore Cooper Lecture: Renal dopamine system: paracrine regulator of sodium homeostasis and blood pressure. *Hypertension*, 38(3):297-302.
- Carlsson A (2001) A half-century of neurotransmitter research: impact on neurology and psychiatry. Nobel lecture. *Biosci Rep*, 21(6):691-710.
- Carta M, Carlsson T, Muñoz A, Kirik D, Björklund A (2008) Involvement of the serotonin system in L-dopa-induced dyskinesias. *Parkinsonism Relat Disord*, 14(2):S154-S158.
- Carta M, Carlsson T, Muñoz A, Kirik D, Björklund A (2008) Serotonin-dopamine interaction in the induction and maintenance of L-DOPA-induced dyskinesias. *Prog Brain Res*, 172:465-478.

- Cassis P, Conti S, Remuzzi G, Benigni A (2010) Angiotensin receptors as determinants of life span. *Pflugers Arch*, 459(2):325-332.
- Castro SW, Strange PG (1993) Differences in the ligand binding properties of the short and long versions of the D2 dopamine receptor. *J Neurochem* 60(1):372-375.
- Catanzaro DF, Frishman WH (2010) Angiotensin receptor blockers for management of hypertension. *South Med J*, 103(7):669-673.
- Célérier J, Cruz A, Lamandé N, Gasc JM, Corvol P (2002) Angiotensinogen and its cleaved derivatives inhibit angiogenesis. *Hypertension*, 39(2):224-228.
- 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(1):R117-124.
- Cheepsunthorn P, Radov L, Menzies S, Reid J, Connor JR (2001) Characterization of a novel brain-derived microglial cell line isolated from neonatal rat brain. *Glia*, 35(1):53-62.
- Chen K, Deng K, Wang X, Wang Z, Zheng S, Ren H, He D, Han Y, Asico LD, Jose PA, Zeng C (2015) Activation of D4 dopamine receptor decreases angiotensin II type 1 receptor expression in rat renal proximal tubule cells. *Hypertension*, 65(1):153-160.
- Chen J, Yang S, Hu S, Choudhry MA, Bland KI, Chaudry IH (2008) Estrogen prevents intestinal inflammation after trauma-hemorrhage via downregulation of angiotensin II and angiotensin II subtype I receptor. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 295(5):G1131-1137.
- Choi MR, Medici C, Gironacci MM, Correa AH, Fernández BE (2009) Angiotensin II regulation of renal dopamine uptake and Na(+),K(+)-ATPase activity. *Nephron Physiol*, 111(4):p53-58.
- Choi DY, Zhang J, Bing G (2010) Aging enhances the neuroinflammatory response and alpha-synuclein nitration in rats. *Neurobiol Aging*, 31(9):1649-1653.
- Chu Y, Dodiya H, Aebischer P, Olanow CW, Kordower JH (2009) Alterations in lysosomal and proteasomal markers in Parkinson's disease: relationship to alpha-synuclein inclusions. *Neurobiol Dis*, 35(3):385-398.
- Chu Y, Morfini GA, Langhamer LB, He Y, Brady ST, Kordower JH (2012) Alterations in axonal transport motor proteins in sporadic and experimental Parkinson's disease. *Brain*, 135(Pt 7):2058-2073.
- Chugh G, Pokkunuri I, Asghar M (2013) Renal dopamine and angiotensin II receptor signaling in age-related hypertension. *Am J Physiol Ren Physiol*, 304(1):F1-F7.
- Chung O, Köhl H, Stoll M, Unger T (1998) Physiological and pharmacological implications of AT1 versus AT2 receptors. *Kidney Int Suppl*, 67:S95-S99.

- Clark MA, Diz DI, Tallant EA (2001) Angiotensin-(1-7) downregulates the angiotensin II type I receptor in vascular smooth muscle cells. *Hypertension*, 37(4):1141-1146.
- Clerk A, Sugden PH (2000) Small guanine nucleotide-binding proteins and myocardial hypertrophy. *Circ Res*, 86(10):1019-1023.
- Colebrooke RE, Humby T, Lynch PJ, McGowan DP, Xia J, Emson PC (2006) Age-related decline in striatal dopamine content and motor performance occurs in the absence of nigral cell loss in a genetic mouse model of Parkinson's disease. *Eur J Neurosci*, 24(9):2622-2630.
- Collier TJ, Lipton J, Daley BF, Palfi S, Chu Y, Sortwell C, Bakay RAE, Sladek Jr JR, Kordower JH (2007) Aging-related changes in the nigrostriatal dopamine system and the response to MPTP in nonhuman primates: Diminished compensatory mechanisms as a prelude to parkinsonism. *Neurobiol Dis*, 26(1):56-65.
- Connor JR, Boyer PJ, Menzies SL, Dellinger B, Allen RP, Ondo WG, Earley CJ (2003) Neuropathological examination suggests impaired brain iron acquisition in restless legs syndrome. *Neurology*, 61(3):304-309.
- Connor JR, Snyder BS, Arosio P, Loeffler DA, LeWitt P (1995) A quantitative analysis of isoferitins in select regions of aged, parkinsonian, and Alzheimer's diseased brains. *J Neurochem*, 65(2):717-724.
- Cotzias GC, Van Woert MH, Schiffer LM (1967) Aromatic amino acids and modification of parkinsonism. *N Engl J Med*, 276:374-378.
- Crews L, Spencer B, Desplats P, Patrick C, Paulino A, Rockenstein E, Hansen L, Adame A, Galasko D, Masliah E (2010) Selective molecular alterations in the autophagy pathway in patients with Lewy body disease and in models of alpha-synucleinopathy. *PloS One*, 5(2):e9313.
- Cruz-Muros I, Afonso-Oramas D, Abreu P, Pérez-Delgado MM, Rodríguez M, González-Hernández T (2009) Aging effects on the dopamine transporter expression and compensatory mechanisms. *Neurobiol Aging*, 30(6):973-986.
- 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(9):1183-1185.
- Cubeddu LX, Hoffman IS (1982) Operational characteristics of the inhibitory feedback mechanism for regulation of dopamine release via presynaptic receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 223(2):497-501.
- Cui L, Nithipatikom K, Campbell WB (2007) Simultaneous analysis of angiotensin peptides by LC-MS and LC-MS/MS: metabolism by bovine adrenal endothelial cells. *Anal Biochem*, 369(1):27-33.
- Culman J, Baulmann J, Blume A, Unger T (2001) The renin-angiotensin system in the brain: an

- update. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*, 2(2):96-102.
- Culman J, Blume A, Gohlke P, Unger T (2002) The renin-angiotensin system in the brain: possible therapeutic implications for AT(1)-receptor blockers. *J Hum Hypertens*, 16 (Suppl 3):S64-S70.
- Currie LJ, Harrison MB, Trugman JM, Bennett JP, Wooten GF (2004) Postmenopausal estrogen use affects risk for Parkinson disease. *Arch Neurol*, 61(6):886-888.
- Danyel LA, Schmerler P, Paulis L, Unger T, Steckelings UM (2013) Impact of AT2-receptor stimulation on vascular biology, kidney function and blood pressure. *Integr Blood Press Control*, 6:153-161.
- Darbin O (2012) The aging striatal dopamine function. *Parkinsonism Relat Disord*, 18(5):426-432.
- Darby IA, Sernia C (1995) In situ hybridization and immunohistochemistry of renal angiotensinogen in neonatal and adult rat kidneys. *Cell Tissue Res*, 281(2):197-206.
- Das A, Smith JA, Gibson C, Varma AK, Ray SK, Banik NL (2011) Estrogen receptor agonists and estrogen attenuate TNF- α -induced apoptosis in VSC4.1 motoneurons. *J Endocrinol*, 208(2):171-182.
- Dauer W, Przedborski S (2003) Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron*, 39:889-909.
- De Bundel D, Smolders I, Vanderheyden P, Michotte Y (2008) Ang II and Ang IV: unraveling the mechanism of action on synaptic plasticity, memory, and epilepsy. *CNS Neurosci Ther*, 14(4):315-339.
- de Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright JW, Unger T (2000) International union of pharmacology. XIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev*, 52(3):415-472.
- DeLong MR (1990) Primate model of movement disorders of basal ganglia origin. *Trends Neurosci*, 13:281-285.
- De Mei C, Ramos M, Iitaka C, Borrelli E (2009) Getting specialized: presynaptic and postsynaptic dopamine D2 receptors. *Curr Opin Pharmacol*, 9(1):53-58.
- De Mello WC, Frohlich ED (2014) Clinical perspectives and fundamental aspects of local cardiovascular and renal renin-angiotensin systems. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 5:16.
- Dean SA, Tan J, O'Brien ER, Leenen FH (2005) 17 β -estradiol downregulates tissue angiotensin-converting enzyme and ANG II type 1 receptor in female rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 288(3):R759-766.
- Defagot MC, Malchiodi EL, Villar MJ, Antonelli MC (1997) Distribution of D4 dopamine receptor in rat brain with sequence-specific antibodies. *Brain Res Mol Brain Res*, 45(1):1-12.
- Dehay B, Bove J, Rodriguez-Muela N, Perier C, Recasens A, Boya P, Vila M (2010) Pathogenic

- lysosomal depletion in Parkinson's disease. *J Neurosci*, 30(37):12535-12544.
- Diamond SG, Markham CH, Hoehn MM, McDowell FH, Muentner MD (1990) An examination of male-female differences in progression and mortality of Parkinson's disease. *Neurology*, 40(5):763-766.
- Diaz J, Lévesque D, Lammers CH, Griffon N, Martres MP, Schwartz JC, Sokoloff P (1995) Phenotypical characterization of neurons expressing the dopamine D3 receptor in the rat brain. *Neuroscience*, 65(3):731-745.
- Diaz J, Pilon C, Le Foll B, Gros C, Triller A, Schwartz JC, Sokoloff P (2000) Dopamine D3 receptors expressed by all mesencephalic dopamine neurons. *J Neurosci*, 20(23):8677-8684.
- Dickson DW, Braak H, Duda JE, Duyckaerts C, Gasser T, Halliday GM, Hardy J, Leverenz JB, Del Tredici K, Wszolek ZK, Litvan I (2009) Non-motor extranigral signs and symptoms in Parkinson's disease. *Lancet Neurol*, 8(12):1150-1157.
- Ding J, Li QY, Wang X, Sun CH, Lu CZ, Xiao BG (2010) Fasudil protects hippocampal neurons against hypoxia-reoxygenation injury by suppressing microglial inflammatory responses in mice. *J Neurochem*, 114(6):1619-1629.
- Ding J, Yu JZ, Li QY, Wang X, Lu CZ, Xiao BG (2009) Rho kinase inhibitor Fasudil induces neuroprotection and neurogenesis partially through astrocyte-derived G-CSF. *Brain Behav Immun*, 23(8):1083-1088.
- Diógenes MJ, Outeiro TF (2010) Neurotrophic factors as a protective strategy in Parkinson's disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 9(6):754-763.
- Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, Donovan M, Woolf B, Robinson K, Jeyaseelan R, Breitbart RE, Acton S (2000) A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ Res*, 87(5):E1-9.
- Double KL, Halliday GM (2006) New face of neuromelanin. *J Neural Transm Suppl*, 70:119-123
- Dubey RK, Oparil S, Imthurn B, Jackson EK (2002) Sex hormones and hypertension. *Cardiovasc Res*, 53(3):688-708.
- Dupont AG, Brouwers S (2010) Brain angiotensin peptides regulate sympathetic tone and blood pressure. *J Hypertens*, 28(8):1599-1610.
- Dusek P, Jankovic J, Le W (2012) Iron dysregulation in movement disorders. *Neurobiol Dis*, 46(1):1-18.
- Duty S, Jenner P (2011) Animal models of Parkinson's disease: a source of novel treatments and clues to the cause of the disease. *Br J Pharmacol*, 164(4):1357-1391.

- Dwoskin LP, Jewell AL, Cassis LA (1992) DuP 753, a nonpeptide angiotensin II-1 receptor antagonist, alters dopaminergic function in rat striatum. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 345(2):153-159.
- Ebrahimi-Fakhari D, Saidi LJ, Wahlster L (2013) Molecular chaperones and protein folding as therapeutic targets in Parkinson's disease and other synucleinopathies. *Acta Neuropathol Commun*, 1(1):79.
- Ebrahimi-Fakhari D, Wahlster L, McLean PJ (2012) Protein degradation pathways in Parkinson's disease: curse or blessing. *Acta Neuropathol*, 124(2):153-172.
- Ernsberger P, Zhou J, Damon TH, Douglas JG (1992) Angiotensin II receptor subtypes in cultured rat renal mesangial cells. *Am J Physiol*, 263(3 Pt 2):F411-F416.
- Esteves AR, Arduíno DM, Swerdlow RH, Oliveira CR, Cardoso SM (2009) Oxidative stress involvement in alpha-synuclein oligomerization in Parkinson's disease cybrids. *Antioxid Redox Signal*, 11(3):439-448.
- Evans JR, Barker RA (2008) Neurotrophic factors as a therapeutic target for Parkinson's disease. *Expert Opin Ther Targets*, 12:437-447.
- Färber K, Pannasch U, Kettenmann H (2005) Dopamine and noradrenaline control distinct functions in rodent microglial cells. *Mol Cell Neurosci*, 29(1):128-138.
- Farkas E, Luiten PG, Bari F (2007) Permanent, bilateral common carotid artery occlusion in the rat: a model for chronic cerebral hypoperfusion-related neurodegenerative diseases. *Brain Res Rev*, 54(1):162-180.
- Farrall AJ, Wardlaw JM (2009) Blood-brain barrier: ageing and microvascular disease - systematic review and meta-analysis. *Neurobiol Aging*, 30(3):337-352.
- Febo M, Ferris CF, Segarra AC (2005) Estrogen influences cocaine-induced blood oxygen level-dependent signal changes in female rats. *J Neurosci*, 25:1132-1136.
- Feng LR, Maguire-Zeiss KA (2010) Gene therapy in Parkinson's disease: rationale and current status. *CNS Drugs*, 24(3):177-192.
- Fernández N, García JJ, Díez MJ, Terán MT, Sierra M (1993) Rapid high-performance liquid chromatographic assay of ethinyloestradiol in rabbit plasma. *J Chromatogr*, 619(1):143-147.
- Ferreira AJ, Santos RA (2005) Cardiovascular actions of angiotensin-(1-7). *Braz J Med Biol Res*, 38(4):499-507.
- Ferro A, Gilbert R, Krum H (2006) Importance of renin in blood pressure regulation and therapeutic potential of renin inhibition. *Int J Clin Pract*, 60(5):577-581.
- Fink GD (1997) Long-term sympatho-excitatory effect of angiotensin II: a mechanism of

- spontaneous and renovascular hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 24(1):91-95.
- Fink JS, Schumacher JM, Ellias SL, et al. (2000) Porcine xenografts in Parkinson's disease and Huntington's disease patients: Preliminary results. *Cell Transplant*, 9:273-278.
- Fiorentini C, Busi C, Spano P, Missale C (2010) Dimerization of dopamine D1 and D3 receptors in the regulation of striatal function. *Curr Opin Pharmacol*, 10(1):87-92.
- Fitzsimons JT (1998) Angiotensin, thirst, and sodium appetite. *Physiol Rev*, 78(3):583-686.
- Flugger HN, Foster TC, Gustafsson J, Rissman EF (2000) Novel effects of estradiol and estrogen receptor alpha and beta on cognitive function. *Brain Res*, 883:258-264
- Focht SJ, Snyder Bsm Beard JL, Van Gelder W, Williams LR, Connor JR (1997) Regional distribution of iron, transferrin, ferritin, and oxidatively-modified proteins in young and aged Fischer 344 rat brains. *Neuroscience*, 79(1):255-261.
- Fornaretto MG, Caccia C, Caron MG, Fariello RG (1993) Dopamine receptors status after unilateral nigral 6-OHDA lesion. Autoradiographic and in situ hybridization study in the rat brain. *Mol Chem Neuropathol*, 19(1-2):147-162.
- Friedman A, Galzazka-Friedman J, Kozirowski D (2009) Iron as a cause of Parkinson disease – a myth or a well established hypothesis? *Parkinsonism Relat Disord*, 15(Supp 3):S212-S214.
- Friedrich S, Schmieder RE (2013) Review of direct renin inhibition by aliskiren. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*, 14(3):193-196.
- Gallo G (2004) Myosin II activity is required for severing-induced axon retraction in vitro. *Exp Neurol*, 189(1):112-121.
- Gallo G, Letourneau PC (2004) Regulation of growth cone actin filaments by guidance cues. *J Neurobiol*, 58(1):92-102.
- Ganten D, Minnich JL, Granger P, Hayduk K, Brecht HM, Barbeau A, Boucher R, Genest J (1971) Angiotensin-forming enzyme in brain tissue. *Science*, 173(3991):64-65.
- Gao X, Chen H, Schwarzschild MA, Ascherio A (2011) Use of ibuprofen and risk of Parkinson disease. *Neurology*, 76(10):863-869.
- Gao HM, Liu B, Zhang W, Hong JS (2003a) Critical role of microglial NADPH oxidase-derived free radicals in the in vitro MPTP model of Parkinson's disease. *FASEB J*, 17(13):1954-1956.
- Gao HM, Liu B, Zhang W, Hong JS (2003b) Synergistic dopaminergic neurotoxicity of MPTP and inflammogen lipopolysaccharide: relevance to the etiology of Parkinson's disease. *FASEB J*, 17(3):1957-1959.
- Gard PR (2002) The role of angiotensin II in cognition and behaviour. *Eur J Pharmacol* 438(1-2):1-

14.

- Gardoni F, Bellone C (2015) Modulation of the glutamatergic transmission by Dopamine: a focus on Parkinson, Huntington and Addiction diseases. *Front Cell Neurosci*, 9:25.
- Garrido AM, Griendling KK (2009) NADPH oxidases and angiotensin II receptor signaling. *Mol Cell Endocrinol*, 302(2):148-158.
- 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 Func*, 218(2):373-388.
- Gerfen CR, Engber TM, Mahan LC, Susel Z, Chase TN, Monsma FJ, Sibley DR (1990) *Science*, 250(4986):1429-1432.
- Gerhard A, Pavese N, Hotton G, Turkheimer F, Es M, Hammers A, Eggert K, Oertel W, Banati RB, Brooks DJ (2006) In vivo imaging of microglial activation with [¹¹C](R)-PK11195 PET in idiopathic Parkinson's disease. *Neurobiol Dis*, 21(2):404-412.
- Ghosh A, Roy A, Liu X, Kordower JH, Mufson EJ, Hartley DM, Ghosh S, Mosley RL, Gendelman HE, Pahan K (2007) Selective inhibition of NF-kappaB activation prevents dopaminergic neuronal loss in a mouse model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci*, 104:18754-18759.
- Gibb WR, Lees AJ (1988) The relevance of the Lewy body to the pathogenesis of idiopathic Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 51(6):745-752.
- Gildea JJ (2009) Dopamine and angiotensin as renal counterregulatory systems controlling sodium balance. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 18(1):28-32.
- Gimenez-Roqueplo AP, C el erier J, Lucarelli G, Corvol P, Jeunemaitre X (1998) Role of N-glycosylation in human angiotensinogen, 273(33):21232-21238.
- Gingrich JA, Caron MG (1993) Recent advances in the molecular biology of dopamine receptors. *Annu Rev Neurosci*, 16:299-321.
- Giros B, Sokoloff P, Martres MP, Riou JF, Emorine LJ, Schwartz JC (1989) Alternative splicing directs the expression of two D2 dopamine receptor isoforms. *Nature* 342(6252):923-926.
- Gohlke P, Kox T, J urgensen T, von K ugelgen S, Rascher W, Unger T, Culman J (2002) Peripherally applied candesartan inhibits central responses to angiotensin II in conscious rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 365(6):477-483.
- Gohlke P, Weiss S, Jansen A, Wienen W, Stangier J, Rascher W, Culman J, Unger T (2001) AT1 receptor antagonist telmisartan administered peripherally inhibits central responses to angiotensin II in conscious rats. *J Pharmacol Exp Ther*, 298(1):62-70.

- Goldberg LI, Volkman PH, Kohli JD (1978) A comparison of the vascular dopamine receptor with other dopamine receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 18:57-79.
- Gollapudi L, Oblinger MM (2001) Estrogen effects on neurite outgrowth and cytoskeletal gene expression in ERalpha-transfected PC12 cell lines. *Exp Neurol*, 171(2):308-316.
- Grammatopoulos TN, Jones SM, Ahmadi FA, Hoover BR, Snell LD, Skoch J, Jhaveri VV, Poczobutt AM, Weyhenmeyer JA et al (2007) Angiotensin type 1 receptor antagonist losartan, reduces MPTP-induced degeneration of dopaminergic neurons in substantia nigra. *Mol Neurodegener*, 2:1.
- Greenwood J, Walters CE, Pryce G, Kanuga N, Beraud E, Baker D, Adamson P (2003) Lovastatin inhibits brain endothelial cell Rho-mediated lymphocyte migration and attenuates experimental autoimmune encephalomyelitis. *FASEB J*, 17(8):905-907.
- Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M (2000) NADPH oxidase. Role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res*, 36:494-501
- Gu Z, Nakamura T, Lipton SA (2010) Redox reactions induced by nitrosative stress mediate protein misfolding and mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases. *Mol Neurobiol*, 41(2-3): 55-72.
- Guang C, Jiang B, Phillips RD, Milani F (2012) Inhibition of renin and the (pro)renin receptor system. *Blood Press*, 21(6):377-385.
- Guzman JN, Sanchez-Padilla J, Wokosin D, Kondapalli J, Ilijic E, Schumacker PT, Surmeier DJ (2010) Oxidant stress evoked by pacemaking in dopaminergic neurons is attenuated by DJ-1. *Nature*, 468(7324):696-700.
- Hajjar I, Rodgers K (2013) Do angiotensin receptor blockers prevent Alzheimer's disease? *Curr Opin Cardiol*, 28(4):417-425.
- Hall H, Sedvall G, Magnusson O, Kopp J, Halldin C, Farde L (1994) Distribution of D1- and D2-dopamine receptors, and dopamine and its metabolites in the human brain. *Neuropsychopharmacology*, 11(4):245-256.
- Hallberg M (2009) Targeting the insulin-regulated aminopeptidase/AT4 receptor for cognitive disorders. *Drug News Perspect*, 22(3):133-139.
- Hamai M, Iwai M, Ide A, Tomochika H, Tomono Y, Mogi M, Horiuchi M (2006) Comparison of inhibitory action of candesartan and enalapril on brain ischemia through inhibition of oxidative stress. *Neuropharmacology*, 51(4):822-828.
- Hamre K, Tharp R, Poon K, Xiong X, Smeyne RJ (1999) Differential strain susceptibility following 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) administration acts in an autosomal dominant fashion: quantitative analysis in seven strains of *Mus musculus*. *Brain Res*, 828(1-

2):91-103.

- Harding JW, Sullivan MJ, Hanesworth JM, Cushing LL, Wright JW (1988) Inability of [¹²⁵I]Sar1, Ile⁸-angiotensin II to move between the blood and cerebrospinal fluid compartments. *J Neurochem*, 50(2):554-447.
- Hauser Ra, Zesiewicz Ta (2007) Advances in the pharmacologic management of early Parkinson disease. *Neurologist*, 13(3):126-132.
- Hedlund E, Perlmann T (2009) Neuronal cell replacement in Parkinson's disease. *J Intern Med*, 266(4):358-371.
- Hefti F, Melamed E, Wurtman RJ (1981) The site of dopamine formation in rat striatum after L-dopa administration. *J Pharmacol Exp Ther*, 217(1):189-197.
- Heikkila RE, Sonsalla PK, Duvoisin RC (1989) Biochemical models of Parkinson's disease. *Neuromethods vol 12: drugs as tools in neuroscience research* (Boulton AB, Baker GB, Juorio AV, Ed) Humana Press, Clifton NJ Pp:351-384.
- Hermann K, McDonald W, Unger T, Lang RE, Ganten D (1984) Angiotensin biosynthesis and concentrations in brain of normotensive and hypertensive rats. *J Physiol (Paris)*, 79(6):471-480.
- Herrero MT, Augood SJ, Asensi H, Hirsch EC, Agid Y, Obeso JA, Emson PC (1996) Effects of L-DOPA-therapy on dopamine D2 receptor mRNA expression in the striatum of MPTP-intoxicated parkinsonian monkeys. *Brain Res Mol Brain Res*, 42(1):149-155.
- Hersch SM, Ciliax BJ, Gutekunst CA, Rees HD, Heilman CJ, Yung KK, Bolam JP, Ince E, Yi H, Levey AI (1995) Electron microscopic analysis of D1 and D2 dopamine receptor proteins in the dorsal striatum and their synaptic relationships with motor corticostriatal afferents. *J Neurosci*, 15 (7 pt 2):5222-5237.
- Hirsch EC, Brandel JP, Galle P, Javoy-Agid F, Agid Y (1991) Iron and aluminum increase in the substantia nigra of patients with Parkinson's disease: An X-Ray microanalysis. *J Neurochem*, 56(2):446-451.
- Hiroki J, Shimokawa H, Higashi M, Morikawa K, Kandabashi T, Kawamura N, Kubota T, Ichiki T, Amano M, Kaibuchi K et al. (2004) Inflammatory stimuli upregulate Rho-kinase in human coronary vascular smooth muscle cells. *J Mol Cell Cardiol*, 37(2):537-546.
- Hiroki J, Shimokawa H, Mukai Y, Ichiki T, Takeshita A (2005) Divergent effects of estrogen and nicotine on Rho-kinase expression in human coronary vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 326(1):154-159.
- Hodaie M, Neimat JS, Lozano AM (2007) The dopaminergic nigrostriatal system and Parkinson's disease: molecular events in development, disease, and cell death, and new therapeutic strategies. *Neurosurgery*, 60(1):17-28.

- Höglinger GU, Féger J, Prigent A, Michel PP, Parain K, Champy P, Ruberg M, Oertel WH, Hirsch EC (2003) Chronic systemic complex I inhibition induces a hypokinetic multisystem degeneration in rats. *J Neurochem*, 84(3):491-502.
- Honing H, van den Berg TK, van der Pol SM, Dijkstra CD, van der Kammen RA, Collard JG, de Vries HE (2004) RhoA activation promotes transendothelial migration of monocytes via ROCK. *J Leukoc Biol*, 75(3):523-528.
- Horiuchi M, Mogi M (2011) Role of angiotensin II receptor subtype activation in cognitive function and ischaemic brain damage. *Br J Pharmacol*, 163(6):1122-1130.
- Horiuchi M, Mogi M, Iwai M (2010) The angiotensin II type 2 receptor in the brain. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*, 11(1):1-6.
- Hows ME; Ashmeade TE, Billinton A, Perren MJ, Austin AA, Virley DJ, Organ AJ, Shah AJ (2004) High-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry assay for the determination of 1-metil-4 phenyl pyridinium (MPP+) in brain tissue homogenates. *J Neurosci Methods*, 137(2):221-226.
- Hurley PJ, Elsworth JD, Whittaker MC, Roth RH, Redmond Jr, DE (2011) Aged monkeys as a partial model for Parkinson's disease. *Pharmacol Biochem Behav*, 99(3):324-332.
- Hussain T, Abdul-Wahab R, Kotak DK, Lokhandwala MF (1998) Bromocriptine regulates angiotensin II response on sodium pump in proximal tubules. *Hypertension*, 32:1054-1059.
- Ichihara A, Sakoda M, Kurauchi-Mito A, Narita T, Kinouchi K, Bokuda K, Itoh H (2010) New approaches to blockade of the renin-angiotensin-aldosterone system: characteristics and usefulness of the direct renin inhibitor aliskiren. *J Pharmacol Sci*, 113(4):296-300.
- Inden M, Kitamura Y, Abe M, Tamaki A, Takata K, Taniguchi T (2011) Parkinsonian rotenone mouse model: reevaluation of long-term administration of rotenone in C57BL/6 mice. *Biol Pharm Bull*, 34(1):92-96.
- Inden M, Kitamura Y, Takeuchi H et al. (2007) Neurodegeneration of mouse nigrostriatal dopaminergic system induced by repeated oral administration of rotenone is prevented by 4-phenylbutyrate, a chemical chaperone. *J Neurochem* 101(6):1491-1504.
- Ingelfinger JR, Schunkert H, Ellison KE, Pivor M, Zuo WM, Pratt P, Dzau VJ (1990) Intrarenal angiotensinogen: localization and regulation. *Pediatr Nephrol*, 4(4):424-428.
- Ischiropoulos H, al-Mehdi AB (1995) Peroxynitrite-mediated oxidative protein modifications. *FEBS Lett*, 364:279-282.
- Ishizaka N, Aizawa T, Yamazaki I, Usui S, Mori I, Kurokawa K, Tang SS, Ingelfinger JR, Ohno M, Nagai R (2002) Abnormal iron deposition in renal cells in the rat with chronic angiotensin II administration. *Lab Invest*, 82(1):87-96.

- Ishizaka N, Saito K, Noiri E, Sata M, Ikeda H, Ohno A, Ando J, Mori I, Ohno M, Nagai R (2005) Administration of ANG II induces iron deposition and upregulation of TGF-beta1 mRNA in the rat liver. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 288(4):R1063-R1070.
- Ito K, Hirooka Y, Kimura Y, Sagara Y, Sunagawa K (2006) Ovariectomy augments hypertension through rho-kinase activation in the brain stem in female spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, 48(4):651-657.
- Iversen SD, Iversen LL (2007) Dopamine: 50 years in perspective. *Trends Neurosci*, 30(5):188-193.
- Javitch JA, D'Amato RJ, Strittmatter SM, Snyder SH (1985) Parkinsonism-inducing neurotoxin, N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine: uptake of the metabolite N-methyl-4-phenylpyridine by dopamine neurons explains selective toxicity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 82(7):2173-2177.
- Jellinger K (1987) The pathology of parkinsonism. *Movement disorders 2* (C.D. Marsden and S. Fahn, Ed) Butterworths, London. Pp: 124-165.
- Jellinger K, Kienzl E, Rumpelmair G, Riederer P, Stachelberger H, Ben-Shachar D, Youdim MB (1992) Iron-Melanin complex in substantia nigra of parkinsonian brains: An X-Ray microanalysis. *J Neurochem*, 59(3):1168-1171.
- Jellinger KA (2009) Formation and development of Lewy pathology: a critical update. *J Neurol*, 256(Suppl. 3):270-279.
- Jenkins TA (2008) Effect of angiotensin-related antihypertensives on brain neurotransmitter levels in rats. *Neurosci Lett*, 444(2):186-189.
- Jenner P (2003) The MPTP-treated primate as a model of motor complications in PD: primate model of motor complications. *Neurology* 61(6 Suppl. 3):S4-11.
- Joglar B, Rodriguez-Pallares J, Rodriguez-Perez A, 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.
- Johren O, Inagami T, Saavedra JM (1995) AT1A, AT1B, and AT2 angiotensin II receptor subtype gene expression in rat brain. *Neuroreport*, 6(18):2549-2552.
- Jones ES, Vinh A, McCarthy CA, Gaspari TA, Widdop RE (2008) AT2 receptors: functional relevance in cardiovascular disease. *Pharmacol Ther*, 120(3):292-316.
- Joseph K, Kaplan AP (2005) Formation of bradykinin: a major contributor to the innate inflammatory response. *Adv Immunol*, 86:159-208.
- Kakar SS, Riel KK, Neill JD (1992) Differential expression of angiotensin II receptor subtype mRNAs (At-1A and AT-1B) in the brain. *Biochem Biophys Res Commun*, 185(2):688-692.

- Katoh H, Aoki J, Ichikawa A, Negishi M (1998) p160 RhoA-binding kinase ROK α induces neurite retraction. *J Biol Chem*, 273(5):2489-2492.
- Katwa LC; Ratajska A, Cleutjens JP, Sun Y, Zhou G, Lee SJ, Weber KT (1995) Angiotensin converting enzyme and kininase-II-like activities in cultured valvular interstitial cells of the rat heart. *Cardiovasc Res*, 29(1):57-64.
- Kaur D, Lee D, Ragapalan S, Andersen JK (2009) Glutathione depletion in immortalized midbrain-derived dopaminergic neurons results in increases in the labile iron pool: implications for Parkinson's disease. *Free Radic Biol Med*, 46(5):593-598.
- Keane PC, Kurzawa M, Blain PG, Morris CM (2011) Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Parkinsons Dis*, 2011:716871.
- Kebabian JW, Calne DB (1979) Multiple receptors for dopamine. *Nature*, 227(5692):93-96.
- Kehoe PG, Wilcock GK (2007) Is inhibition of the renin-angiotensin system a new treatment option for Alzheimer's disease? *Lancet Neurol*, 6(4):373-378.
- Khan F, Spicarová Z, Zelenin S, Holtbäck U, Scott L, Aperia A (2008) Negative reciprocity between angiotensin II type 1 and dopamine D1 receptors in rat renal proximal tubule cells. *Am J Physiol Ren Physiol*, 295(4):F1110-F1116.
- Khan ZU, Gutiérrez A, Martín R, Peñafiel A, Rivera A, de la Calle A (2000) Dopamine D5 receptors of rat and human brain. *Neuroscience*, 100(4):689-699.
- Khan ZU, Gutiérrez A, Martín R, Peñafiel A, Rivera A, de la Calle A (1998) Differential regional and cellular distribution of dopamine D2-like receptors: an immunocytochemical study of subtype-specific antibodies in rat and human brain. *J Comp Neurol*, 402(3):353-371.
- Kim HJ (2011) Stem cell potential in Parkinson's disease and molecular factors for the generation of dopamine neurons. *Biochim Biophys Acta*, 1812(1):1-11.
- Klaidman LK, Adams JD, Leung AC, Kim SS, Cadenas E (1993) Redox cycling of MPP⁺: evidence for a new mechanism involving hydride transfer with xanthine oxidase, aldehyde dehydrogenase, and lipoamide dehydrogenase. *Free Radic Biol Med*, 15:169-179.
- Kopin IJ (1993) Parkinson's disease: past, present, and future. *Neuropsychopharmacology*, 9(1):1-12.
- Koprach JB, Reske-Nielsen C, Mithal P, Isacson O (2008) Neuroinflammation mediated by IL-1 β increases susceptibility of dopamine neurons to degeneration in an animal model of Parkinson's disease. *J Neuroinflammation*, 5:8.
- Krishnamurthi K, Verbalis JG, Zheng W, Wu Z, Clerch LB, Sandberg K (1999) Estrogen regulates angiotensin AT1 receptor expression via cytosolic proteins that bind to the 5' leader sequence of the receptor mRNA. *Endocrinology*, 140(11):5435-5438.

- Kumar A, Rassoli A, Raizada MK (1988) Angiotensinogen gene expression in neuronal and glial cells in primary cultures of rat brain. *J Neurosci Res*, 19(3):287-290.
- Kumar R, Singh VP, Baker KM (2007) The intracellular renin-angiotensin system: a new paradigm. *Trends Endocrinol Metab*, 18(5):208-214.
- Kumar R, Thomas CM, Yong QC, Chen W, Baker KM (2012) The intracrine renin-angiotensin system. *Clin Sci (Lond)*, 123(5):273-284.
- Kumar KR, Weissbach A, Heldmann M, Kasten M, Tunc S, Sue CM, Svetel M, Kostić VS, Segura-Aguilar J, Ramirez A, Simon DK, Vieregge P, Münte TF, Hagenah J, Klein C, Lohmann K (2012) Frequency of the D620N mutation in VPS35 in Parkinson disease. *Arch Neurol*, 69(10):1360-1364.
- 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(10):1337-1342.
- Labandeira-Garcia JL, Rodriguez-Pallares J, Rodríguez-Perez AI, Garrido-Gil P, Villar-Cheda B, Valenzuela R, Guerra MJ (2012) Brain angiotensin and dopaminergic degeneration: relevance to Parkinson's disease. *Am J Neurodegener Dis*, 1(3):226-244.
- Labandeira-Garcia JL, Rodriguez-Pallares J, Villar-Cheda B, Rodríguez-Perez AI, Garrido-Gil P, Guerra MJ (2011) Aging, angiotensin system and dopaminergic degeneration in the substantia nigra. *Aging Dis*, 2(3):257-274.
- Labandeira-Garcia JL, Rodriguez-Perez AI, Villar-Cheda B, Borrajo A, Dominguez-Meijide A, Guerra MJ (2014) Rho Kinase and Dopaminergic Degeneration: A Promising Therapeutic Target for Parkinson's Disease. *Neuroscientist*, [ahead of print]
- Laflamme L, Gasparo M, Gallo JM, Payet MD, Gallo-Payet N (1996) Angiotensin II induction of neurite outgrowth by AT₂ receptors in NG108-15 cells. Effect counteracted by the AT₁ receptors. *J Biol Chem*, 271(37):22729-22735.
- Langley KC, Bergson C, Greengard P, Quimet CC (1997) Co-localization of the D1 dopamine receptor in a subset of DARPP-32-containing neurons in rat caudate-putamen. *Neuroscience*, 78(4):977-983.
- Langston JW (1985) MPTP neurotoxicity: an overview and characterization of phases of toxicity. *Life Sci*, 36(3):201-206.
- Langston JW, Langston EB, Irwin I (1984) MPTP-induced parkinsonism in human and non-human primates – clinical and experimental aspects. *Acta Neurol Scand Suppl*, 100:49-54.
- Le Moine C, Normand E, Bloch B (1991) Phenotypical characterization of the rat striatal neurons expressing the D1 dopamine receptor gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88(10):4205-4209.

- Lehmann M, Fournier A, Selles-Navarro I, Dergham P, Sebok A, Leclerc N, Tigyi G, McKerracher L (1999) Inactivation of Rho signaling pathway promotes CNS axon regeneration. *J Neurosci*, 19(17):7537-7547.
- Leitner DF, Connor JR (2012) Functional roles of transferrin in the brain. *Biochim Biophys Acta*, 1820(3):393-402.
- Lenkei Z, Palkovits M, Corvol P, Llorens-Cortes C (1996) Distribution of angiotensin II type-2 receptor (AT2) mRNA expression in the adult rat brain. *J Comp Neurol*, 373(3):322-339.
- Lenkei Z, Palkovits M, Corvol P, Llorens-Cortès C (1997) Expression of angiotensin type-1 (AT1) and type-2 (AT2) receptors mRNAs in the adult rat brain: a functional neuroanatomical review. *Front Neuroendocrinol*, 18(4):383-439.
- Lepley D, Paik JH, Hla T, Ferrer F (2005) The G protein-coupled receptor S1P2 regulates Rho/Rho kinase pathway to inhibit tumor cell migration. *Cancer Res*, 65:3788-3795.
- Levey AI, Hersch SM, Rye DB, Sunahara PK, Niznik HB, Kitt CA, Price DL, Maggio R, Brann MR, Ciliax BJ (1993) Localization of D1 and D2 dopamine receptors in brain with subtype-specific antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90(19):8861-8865.
- Levivier M, Przedborski S, Bencsics C, Kang UJ (1995) Intrastriatal implantation of fibroblasts genetically engineered to produce brain-derived neurotrophic factor prevents degeneration of dopaminergic neurons in a rat model of Parkinson's disease. *J Neurosci*, 15:7810-7820.
- Levy YS, Stroomza M, Melamed E, Offen D (2004) Embryonic and adult stem cells as a source for cell therapy in Parkinson's disease. *J Mol Neurosci*, 24(3):353-386.
- Li H, Han W, Villar VA, Keever LB, Lu Q, Hopfer U, Quinn MT, Felder RA, Jose PA, Yu P (2009) D1-like receptors regulate NADPH oxidase activity and subunit expression in lipid raft microdomains of renal proximal tubule cells. *Hypertension*, 53:1054-1061.
- Li ECK, Heran BS, Wright JM (2014) Angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors versus angiotensin receptor blockers for primary hypertension. *Cochrane Database Syst Rev*, 8:CD009096.
- Li J, Culman J, Hörtnagl H, Zhao Y, Gerova N, Timm M, Blume A, Zimmermann M, Seidel K, Dirnagl U, Unger T (2005) Angiotensin AT2 receptor protects against cerebral ischemia-induced neuronal injury. *FASEB J*, 19(6):617-619.
- Li N, Ragheb K, Lawler G, Sturgis J, Rajwa B, Melendez JA, Robinson JP (2003) Mitochondrial complex I inhibitor rotenone induces apoptosis through enhancing mitochondrial reactive oxygen species production. *J Biol Chem*, 278(10):8516-8525.
- Li SW, Lin TS, Minter S, Burke WJ (2001) 3,4-Dihydroxyphenylacetaldehyde and hydrogen peroxide generate a hydroxyl radical: possible role in Parkinson's disease pathogenesis. *Brain*

Res Mol Brain Res, 93(1):1-7.

- Li XC, Zhuo JL (2008) Nuclear factor-kappaB as a hormonal intracellular signaling molecule: focus on angiotensin II-induced cardiovascular and renal injury. *Curr Opin Nephrol, Hypertens*, 17(1):37-43.
- Li ZS, Schmauss C, Cuenca A, Ratcliffe E, Gershon MD (2006) Physiological modulation of intestinal motility by enteric dopaminergic neurons and the D2 receptor: analysis of dopamine receptor expression, location, development, and function in wild-type and knock-out mice. *J Neurosci*, 26(10):2798-2807.
- Liu B (2006) Modulation of microglial pro-inflammatory and neurotoxic activity for the treatment of Parkinson's disease. *AAPS J*, 8(3):E606-E621.
- Liu B, Hong JS (2003) Role of microglia in inflammation-mediated neurodegenerative diseases: mechanisms and strategies for therapeutic intervention. *J Pharmacol Exp Ther*, 304(1):1-7.
- Lopes KO, Sparks DL, Streit WJ (2008) Microglial dystrophy in the aged and Alzheimer's disease brain is associated with ferritin immunoreactivity. *Glia*, 56(10):1048-1060.
- Lopez A, Muñoz A, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL (2001) Mechanisms of the effects of exogenous levodopa on the dopamine-denervated striatum. *Neuroscience*, 103(3):639-651.
- Lopez-Martin E, Caruncho HJ, Rodriguez-Pallares J, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL (1999) Striatal dopaminergic afferents concentrate in GDNF-positive patches during development and in developing intrastriatal striatal grafts. *J Comp Neurol*, 406(2):199-206.
- Lopez-Real A, Rey P, Soto-Otero R, Mendez-Alvarez E, Labandeira-Garcia JL (2005) Angiotensin-converting enzyme inhibition reduces oxidative stress and protects dopaminergic neurons in a 6-hydroxydopamine rat model of Parkinsonism. *J Neurosci Res*, 81(6):865-873.
- Lopez-Real A, Rodriguez-Pallares J, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL (2003) Localization and functional significance of striatal neurons immunoreactive to aromatic L-amino acid decarboxylase or tyrosine hydroxylase in rat Parkinsonian models. *Brain Res*, 969(1-2):135-146.
- Lou M, Blume A, Zhao Y, Gohlke P, Deuschl G, Herdegen T, Culman J (2004) Sustained blockade of brain AT1 receptors before and after focal cerebral ischemia alleviates neurologic deficits and reduces neuronal injury, apoptosis, and inflammatory responses in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab*, 24(5):536-547.
- Lucius R, Gallinat S, Rosentiel P, Herdegen T, Sievers J, Unger T (1998) The angiotensin II type 2 (AT2) receptor promotes axonal regeneration in the optic nerve of adult rats. *J Exp Med*, 188(4):661-670.
- MacGregor DP, Murone C, Song K, Allen AM, Paxinos G, Mendelsohn FA (1995) Angiotensin II receptor subtypes in the human central nervous system. *Brain Res*, 675(1-2):231-240.

- MacKenzie EL, Ray PD, Tsuji Y (2008) Role and regulation of ferritin H in rotenone-mediated mitochondrial oxidative stress. *Free Radic Biol Med*, 44(9):1762-1771.
- Maggio R, Aloisi G, Silvano E, Rossi M, Millan MJ (2009) Heterodimerization of dopaminergic receptors: new insights into functional and therapeutic significance. *Parkinsonism Relat Disord*, 15(Suppl. 4):S2-7.
- Maggio R, Millan MJ (2010) Dopamine D2-D3 receptor heteromers: pharmacological properties and therapeutic significance. *Curr Opin Pharmacol*, 10(1):100-107.
- Malmberg A, Jackson DM, Eriksson A, Mohell N (1993) Unique binding characteristics of antipsychotic agents interacting with human dopamine D2A, D2B, and D3 receptors. *Mol Pharmacol*, 43(5):749-754.
- Marc Y, Llorens-Cortes C (2011) The role of the brain renin-angiotensin system in hypertension: implications for new treatment. *Prog Neurobiol*, 95(2):89-103.
- Maries E, Dass B, Collier TJ, Kordowe JH, Steece-Collier K (2003) The role of α -synuclein in Parkinson's disease: insights from animal models. *Nat Rev Neuroscience*, 4(9):727-738.
- Mattson MP (2007) Calcium and neurodegeneration. *Aging Cell*, 6:337-350.
- Mayeux R, Marder K, Cote LJ, Denaro J, Hemenegildo N, Mejia H, Tang MX, Lantigua R, Wilder D, Gurland B et al (1995) The frequency of idiopathic Parkinson's disease by age, ethnic group, and sex in northern Manhattan, 1988-1993. *Am J Epidemiol*, 142(8):820-827.
- McKinley MJ, Albiston AL, Allen AM, Mathal ML, May CN, McAllen RM, Oldfield BJ, Mendelsohn FA, Chai SY (2003) The brain renin-angiotensin system: location and physiological roles. *Int J Biochem Cell Biol*, 35(6):901-918.
- Medin T, Rinholm JE, Owe SG, Sagvolden T, Gjedde A, Storm-Mathisen J, Bergersen LH (2013) Low dopamine D5 receptor density in hippocampus in an animal model of attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD). *Neuroscience*, 242:11-20.
- Meffert S, Stoll M, Steckelings UM, Bottari SP, Unger T (1996) The angiotensin II AT2 receptor inhibits proliferation and promotes differentiation in PC12W cells. *Mol Cell Endocrinol*, 122(1):59-67.
- Mehlhase J, Gieche J, Widmer R, Grune T (2006) Ferritin levels in microglia depend upon activation: Modulation by reactive oxygen species. *Biochim Biophys Acta*, 1763(8):854-859.
- Mehlhase J, Sandig G, Pantopoulos K, Grune T (2005) Oxidation-induced ferritin turnover in microglial cells: role of proteasome. *Free Radic Biol Med*, 38(2):276-285.
- Mendelsohn FA, Jenkins TA, Berkovic SF (1993) Effects of angiotensin II on dopamine and serotonin turnover in the striatum of conscious rats. *Brain Res*, 613(2):221-229.

- Mentz RJ, Bakris GL, Waeber B, McMurray JJ, Gheorghide M, Ruilope LM, Maggioni AP, Swedberg K, Piña IL, Fiuzat M, O'Connor CM, Zannad F, Pitt B (2013) The past, present and future of renin-angiotensin aldosterone system inhibition. *Int J Cardiol*, 167(5):1677-1687.
- Meredith GE, Sonsalla PK, Chesselat MF (2008) Animal models of Parkinson's disease progression. *Acta Neuropathol*, 115(4):385-398.
- Mérot Y, Ferrière F, Gailhouste L, Huet G, Percevault F, Saligaut C, Flouriot G (2009) Different outcomes of unligated and ligated estrogen receptor- α on neurite outgrowth in PC12 cells. *Endocrinology*, 150(1):200-211.
- Mertens B, Vanderheyden P, Michotte Y, Sarre S (2010) Direct angiotensin II type 2 receptor stimulation decreases dopamine synthesis in the rat striatum. *Neuropharmacology*, 58(7):1038-1044.
- Meyer AK, Maisel M, Hermann A, Stirl K, Storch A (2010) Restorative approaches in Parkinson's disease: which cell type wins the race? *J Neurol Sci*, 289(1-2):93-103.
- Milsted A, Barna BP, Ransohoff RM, Brosnihan KB, Ferrario CM (1990) Astrocyte cultures derived from human brain tissue express angiotensinogen mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87(15):5720-5723.
- Missale C, Nash SR, Robinson SW, Jaber M, Caron MG (1998) Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev*, 78(1):189-225.
- Mizuno Y, Sone N, Suzuki K, Saitoh T (1988) Studies on the toxicity of 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP⁺) against mitochondria of mouse brain. *J Neurol Sci*, 87:97-110.
- Mogi M, Horiuchi M (2009) Effects of angiotensin II receptor blockers on dementia. *Hypertens Res*, 32(9):738-740.
- Mogi M, Togari A, Kondo T, Mizuno Y, Komure O, Kuno S, Ichinose H, Nagatsu T (1999) Brain-derived growth factor and nerve growth factor concentrations are decreased in the substantia nigra in Parkinson's disease. *Neurosci Lett*, 270(1):45-48.
- Morale MC, Serra PA, L'episcopo F, Tirolo C, Caniglia S, Testa N, Gennuso F, Giaquinta G, Rocchitta G, Desole MS et al. (2006) Estrogen, neuroinflammation and neuroprotection in Parkinson's disease: glia dictates resistance versus vulnerability to neurodegeneration. *Neuroscience*, 138(3):869-878.
- Mueller BK, Mack H, Teusch N (2005) Rho kinase, a promising drug target for neurological disorders. *Nat Rev Drug Discov*, 4(5):387-398.
- Mukoyama M, Nakajima M, Horiuchi M, Sasamura H, Pratt RE, Dzau VJ (1993) Expression cloning of type 2 angiotensin II receptor reveals a unique class of seven-transmembrane receptors. *J Biol Chem*, 268(33):24539-24542.

- Müller DN, Hilgers KF, Bohlender J, Lippoldt A, Wagner J, Fischli W, Ganten D, Mann JF, Luft FC (1995) Effects of human renin in the vasculature of rats transgenic for human angiotensinogen. *Hypertension*, 26(2):272-278.
- Muly EC, Maddox M, Khan ZU (2010) Distribution of D1 and D5 dopamine receptors in the primate nucleus accumbens. *Neuroscience*, 169(4):1557-1566.
- Münzel T, Keaney JF Jr (2001) Are ACE inhibitors a “magic bullet” against oxidative stress? *Circulation*, 104(13):1571-1574.
- Muñoz A, Li Q, Gardoni F, Marcello E, Quin C, Carlsson T, Kirik D, Di Luca M, Björklund A et al. (2008) Combined 5-HT1A and 5-HT1B receptor agonists for the treatment of L-DOPA-induced dyskinesia. *Brain*, 131(12):3380-3394.
- Muñoz A, Rey P, Guerra MJ, Mendez-Alvarez E, Soto-Otero R, Labandeira-Garcia JL (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 AM, Rey P, Soto-Otero R, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL (2004) Systemic administration of N-acetylcysteine protects dopaminergic neurons against 6-hydroxydopamine-induced degeneration. *J Neurosci Res*, 76(4):551-562.
- Murphy TJ, Alexander RW, Griendling KK, Runge MS, Bernstein KE (1991) Isolation of a cDNA encoding the vascular type-1 angiotensin II receptor. *Nature*, 351(6323):233-236.
- Nagatsu T, Mogi M, Ichinose H, Togari A (2000) Changes in cytokines and neurotrophins in Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl*, 60:277-290.
- Nagatsu T, Sawada M (2007) Biochemistry of postmortem brains in Parkinson's disease: historical overview and future prospects. *J Neural Transm Suppl*, 72:113-120.
- Nakagawa O, Fujisawa K, Ishizaki T, Saito Y, Nakao K, Narumiya S (1996) Rock-I and Rock-II, two isoforms of Rho-associated coiled-coil forming protein serine/threonine kinase in mice. *FEBS Lett*, 392(2):189-193.
- Nakajima S, Gerretsen P, Takeuchi H, Caravaggio F, Chow T, Le Foll B, Mulsant B, Pollock B, Graff-Guerrero A (2013) The potential role of dopamine D₃ receptor neurotransmission in cognition. *Eur Neuropsychopharmacol*, 23(8):799-813.
- Nakamura F (2013) FilGAP and its close relatives: a mediator of Rho-Rac antagonism that regulates cell morphology and migration. *Biochem J*, 453: 17-25.
- Nap A, Balt JC, Mathy MJ, Pfaffendorf M, van Zwieten PA (2004) Different AT1 receptor subtypes at pre- and postjunctional sites: AT1A versus AT1B receptors. *J Cardiovas Pharmacol*, 43(1):14-20.
- Navailles S, Bioulac B, Gross C, De Deurwardère P (2011) Chronic L-DOPA therapy alters central

- serotonergic function and L-DOPA-induced dopamine release in a tragon-dependent manner in a rat model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis*, 41(2):585-590.
- Navar LG, Harrison-Bernard LM, Imig JD, Cevenka L, Mitchell KD (2000) Renal responses to AT1 receptor blockade. *Am J Hypertens*, 13:45S-54.
- Navarro A, Boveris A (2009) Brain mitochondrial dysfunction and oxidative damage in Parkinson's disease. *J Bioenerg Biomembr*, 41(6):517-521.
- Nicklas WJ, Vyas I, Heikkila RE (1985) Inhibition of NADH-linked oxidation in brain mitochondria by 1-emthyl-4-phenyl-piridine, a metabolite of the neurotoxin, 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Life Sci*, 36:2503-2508.
- Nickelnig G, Bäumer AT, Grohè C, Kahlert S, Strehlow K, Rosenkranz S, Stäblein A, Beckers F, Smits JF, Daemen MJ, Vetter H, Böhm M (1998) Estrogen modulates AT1 receptor gene expression in vitro and in vivo. *Circulation*, 97(22):2197-2201.
- Nishimura Y, Ito T, Hoe K, Saavedra JM (2000) Chronic peripheral administration of the angiotensin II AT(1) receptor antagonist candesartan blocks brain AT(1) receptors. *Brain Res*, 871(1):29-38.
- Nunes C, Almeida L, Laranjinha J (2008) 3,4-Dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) modulates the toxicity induced by nitric oxide in PC-12 cells via mitochondrial dysfunctioning. *Neurotoxicology*, 29(6):998-1007.
- O'Caoimh R, Kehoe PG, Molloy DW (2014) Renin angiotensin aldosterone system inhibition in controlling dementia-related cognitive decline. *J Alzheimers Dis*, 42(Suppl 4):S575-S586.
- Obeso JA, Grandas F, Vaamonde J, Luquin MR, Artieda J, Lera G, Rodriguez MF, Martínez-Lage HM (1989) Motor complications associated with chronic levodopa therapy in Parkinson's disease. *Neurology*, 39(Suppl. 2):11-19.
- Obeso JA, Rodríguez-Oroz MC, Rodríguez M, Lanciego JL, Artieda J, Gonzalo N, Olanow CW (2000) Pathophysiology of the basal ganglia in Parkinson's disease. *Trends Neurosci*, 23: S8-S19.
- Ocaranza MP, Godoy I, Jalil JE, Varas M, Collantes P, Pinto M, Roman M, Ramirez C, Copaja M, Diaz-Araya G, Castro P, Lavandero S (2006) Enalapril attenuates downregulation of Angiotensin-converting enzyme 2 in the late phase of ventricular dysfunction in myocardial infarcted rat. *Hypertension*, 48(4):572-578.
- Ohnishi J, Ishido M, Shibata T, Inagami T, Murakami K, Miyazaki H (1992) The rat angiotensin II AT1A receptor couples with three different signal transduction pathways. *Biochem Biophys Res Commun*, 186(2):1094-1101.
- Ohtsu H, Suzuki H, Nakashima H, Dhobale S, Frank GD, Motley ED, Eguchi S (2006) Angiotensin II signal transduction through small GTP-binding proteins: mechanism and significance in

- vascular smooth muscle cells. *Hypertension*, 48(4):534-540.
- Olanow CW, Tatton WG (1999) Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Annu Rev Neurosci*, 22:123-144.
- Orino K, Lehman L, Tsuji Y, Ayaki H, Torti SV, Torti FM (2001) Ferritin and the response to oxidative stress. *Biochem J*, 357(Pt 1):241-247.
- Ouchi Y, Yoshikawa E, Sekine Y, Futatsubashi M, Kanno T, Ogusu T, Torizuka T (2005) Microglial activation and dopamine terminal loss in early Parkinson's disease. *Ann Neurol*, 57(2):168-175.
- Padia SH, Carey RM (2013) AT2 receptors: beneficial counter-regulatory role in cardiovascular and renal function. *Pflugers Arch*, 465(1):99-110.
- Padia Sh, Kemp BA,, Howell NL, Keller SR, Gildea JJ, Carey RM (2012) Mechanisms of dopamine D(1) and angiotensin type 2 receptor interaction in natriuresis. *Hypertension*, 59(2):437-445.
- Panneton WM, Kumar VB, Gan Q, Burke WJ, Galvin JE (2010) The neurotoxicity of DOPAL: behavioral and stereological evidence for its role in Parkinson disease pathogenesis. *PloS One*, 5(12):e15251.
- Papavasiliou PS, Cotzias GC, Duby SE, Steck AJ, Fehling C, Bell MA (1972) Levodopa in parkinsonism: potentiation of central effects with a peripheral inhibitor. *N Engl J Med*, 286:8-14.
- Parkinson J (1817) *An essay on the shaking palsy*. Sherwood, Neely and Jones, London.
- Paxinos G, Watson C (1986) *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press, New York.
- Pelegri-da-Silva A, Rosa E, Guethe LM, Juliano MA, Prado WA, Martins AR (2009) Angiotensin III modulates the nociceptive control mediated by the periaqueductal gray matter. *Neuroscience*, 164(3):1263-1273.
- Perese DA, Ulman J, Viola J, Ewing SE, Bankiewicz KS (1989) A 6-hydroxydopamine-induced selective parkinsonian rat model. *Brain Res*, 494(2):285-293.
- Perez-Olea J, Quevedo M, Silva R (1981) Enhancement of blood pressure response to dopamine by angiotensin II. *Hypertension*, 3(6 pt 2):138-141.
- Perfeito R, Cunha-Oliveira T, Rego AC (2013) Reprint of: revisiting oxidative stress and mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of Parkinson disease-resemblance to the effect of amphetamine drugs of abuse. *Free Radic Biol Med*, 62:186-201.
- Phillips MI, de Oliveira EM (2008) Brain renin angiotensin in disease. *J Mol Med (Berl)* 86(6):715-722.
- Pivovarova NB, Andrews SB (2010) Calcium-dependent mitochondrial function and dysfunction in

- neurons. *FEBS J*, 227(18):3622-3636.
- Piwowarska J, Radowicki S, Pachecka J (2010) Simultaneous determination of eight estrogens and their metabolites in serum using liquid chromatography with electrochemical detection. *Talanta*, 81(1-2):275-280.
- Platten M, Youssef S, Hur EM, Ho PP, Han MH, Lanz TV, Phillips LK, Goldstein MJ, Bhat R, Raine CS, Sobel RA, Steinman L (2009) Blocking angiotensin-converting enzyme induces potent regulatory T cells and modulates TH1- and TH17-mediated autoimmunity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106(35):14948-14953.
- Polidori C, Ciccocioppo R, Pompei P, Cirillo R, Massi M (1996) Functional evidence for the ability of angiotensin AT1 receptor antagonists to cross the blood-brain barrier in rats. *Eur J Pharmacol*, 307(3):259-267.
- Premer C, Lamondin C, Mitzey A, Speth RC, Brownfield MS (2013) Immunohistochemical localization of AT1a, AT1b, and AT2 angiotensin II receptor subtypes in the rat adrenal, pituitary and brain with a perspective commentary. *Int J Hypertens*, 2013:175428.
- Prozherina YA (2008) Involvement of angiotensin II and angiotensin IV in producing the individual characteristics of defensive and feeding behavior in rats. *Neurosci Behav Physiol*, 38(6):563-572.
- Przedborski S (2005) Pathogenesis of nigral cell death in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*, 11(Suppl. 1):S3-7.
- Przedborski S, Jackson-Lewis V, Djaldetti R, Liberatore G, Vila M, Vukosavic S, Almer G (2000) The parkinsonian toxin MPTP: action and mechanism. *Restor Neurol Neurosci*, 16:135-142.
- Przedborski S, Vila M (2003) The 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model: a tool to explore the pathogenesis of Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci*, 991:189-198.
- Qin L, Liu Y, Wang T, Wei SJ, Block ML, Wilson B, Liu B, Hong JS (2004) NADPH oxidase mediates lipopolysaccharide-induced neurotoxicity and proinflammatory gene expression in activated microglia. *J Biol Chem*, 279(2):1415-1421.
- Quian L, Flood PM, Hong JS (2010) Neuroinflammation is a key player in Parkinson's disease and a prime target for therapy. *J Neural Transm*, 117(8):971-979.
- Ragonese P, D'Amelio M, Callari G, Salemi G, Morgante L, Savettieri G (2006a) Age at menopause predicts age at onset of Parkinson's disease. *Mov Disord*, 21(12):2211-2214.
- Ragonese P, D'Amelio M, Savettieri G (2006b) Implications of estrogens in Parkinson's disease: an epidemiological approach. *Ann N Y Acad Sci*, 1089:373-382.
- Ramsay RR, Singer TP (1986) Energy-dependent uptake of N-methyl-4-phenylpyridinium, the neurotoxic metabolite of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, by mitochondria. *J Biol*

Chem, 216(17):7585-1787.

Rao SS, Hofmann LA; Shakil A (2006) Parkinson's disease: diagnosis and treatment. *Am Fam Physician*, 74(12):2046-2054.

Rascol O, Brooks DJ, Korczyn AD, De Deyn PP, Clarke CE, Lang AE (2000) A five-year study of the incidence of dyskinesia in patients with early Parkinson's disease who were treated with ropinirole or levodopa 056 study group. *New Engl J Med*, 342:1484-1491.

Re RN, Cook JL (2006) The intracrine hypothesis: an update. *Regul Pept*, 133(1-3):1-9.

Reaux A, Fournie-Zaluski MC, Llorens-Cortes C (2001) Angiotensin III: a central regulator of vasopressin release and blood pressure. *Trends Endocrinol Metab*, 12(4):157-162.

Recasens A, Dehay B, Bové J, Carballo-Carbajal I, Dovero S, Pérez-Villalba A, Fernagut PO, Blesa J, Parent A, Perier C et al. (2014) Lewy body extracts from Parkinson disease brains trigger α -synuclein pathology and neurodegeneration in mice and monkeys. *Ann Neurol*, 75(3):351-362.

Reckelhoff JF (2005) Sex steroids, cardiovascular disease, and hypertension: unanswered questions and some speculations. *Hypertension*, 45(2):170-174.

Reinecke K, Lucius R, Reinecke A, Rickert U, Herdegen T, Unger T (2003) Angiotensin II accelerates functional recovery in the rat sciatic nerve in vivo: role of the AT2 receptor and the transcription factor NF-kappaB. *FASEB J*, 17(14):2094-2096.

Rektor I, Goldemund D, Sheardová K, Rektorová I, Michálková Z, Dufek M (2009) Vascular pathology in patients with idiopathic Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*, 15(1):24-29.

Rektor I, Rektorová I, Kubová D (2006) Vascular parkinsonism – an update. *J Neurol Sci*, 248(1-2):185-191.

Rey P, Lopez-Real A, Sanchez-Iglesias S, Muñoz A, Soto-Otero R, Labandeira-Garcia JL (2007) Angiotensin type-1-receptor antagonists reduce 6-hydroxydopamine toxicity for dopaminergic neurons. *Neurobiol Aging*, 28(4):555-567.

Richardson JR, Hossain MM (2013) Microglial ion channels as potential targets for neuroprotection in Parkinson's disease. *Neural Plast*, 2013:587418.

Rinne UK, Bracco F, Chouza C, Dupont E, Gershanik O, Marti Masso JF, Montastruc JL, Mardsen CD (1998) Early treatment of Parkinson's disease with cabergoline delays the onset of motor complications. Results of a double-blind levodopa controlled trial. The PKDS009 Study Group. *Drugs*, 55(Suppl. 1):23-30.

Robles NR, Cerezo I, Hernandez-Gallego R (2014) Renin-angiotensin system blocking drugs. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*, 19(1):14-33.

- Rodriguez MC, Obeso JA, Olanow CW (1998) Subthalamic nucleus-mediated excitotoxicity in Parkinson's disease: A target for neuroprotection. *Ann Neurol*, 44:S175-188.
- 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(1):82-95.
- Rodriguez-Pallares J, Parga JA, Joglar B, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL (2011) 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(4):863-880.
- Rodriguez-Pallares J, Parga JA, Muñoz A, Rey P, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL (2007) Mechanism of 6-hydroxydopamine neurotoxicity: the role of NADPH oxidase and microglial activation in the 6-hydroxydopamine-induced degeneration of dopaminergic neurons. *J Neurochem*, 103:145-156.
- Rodriguez-Pallares J, Quiroz CR, Parga JA, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL (2004) Angiotensin II increases differentiation of dopaminergic neurons from mesencephalic precursors via angiotensin type 2 receptors. *Eur J Neurosci*, 20(6):1489-1498.
- Rodriguez-Pallares J, Rey P, Parga JA, Muñoz A, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL (2008) Brain angiotensin enhances dopaminergic cell death via microglial activation and NADPH-derived ROS. *Neurobiol Dis*, 31(1):58-73.
- Rodriguez-Perez AI, Borrajo A, Rodriguez-Pallares J, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL (2015) Interaction between NADPH-oxidase and Rho-kinase in angiotensin II-induced microglial activation. *Glia*, 63(3):466-482.
- Rodriguez-Perez AI, Dominguez-Meijie A, Lanciego JL, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL (2013) Dopaminergic degeneration is enhanced by chronic hypoperfusion and inhibited by angiotensin receptor blockage. *Age (Dordr)*, 35(5):1675-1690.
- 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(Pt 1):124-138.
- 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(2):517-726.
- Rondou P, Haegerman G, Van Craenenbroeck K (2010) The dopamine D4 receptor: biochemical and signalling properties. *Cell Mol Life Sci*, 67(12):1971-1986.
- Rozas G, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL (1997) An automated rotarod method for quantitative drug-free evaluation of overall motor deficits in rat models of parkinsonism. *Brain Res Brain Res Protoc*, 2(1):75-84.

- Rozas G, Labandeira-Garcia JL (1997) Drug-free evaluation of rat models of parkinsonism and nigral grafts using a new automated rotarod test. *Brain Res*, 749(2):188-199.
- Rozas G, López-Martín E, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL (1998) The overall rod performance test in the MPTP-treated-mouse model of Parkinsonism. *J Neurosci Methods*, 83(2):165-175.
- Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Ruperez M, Suzuki Y, Egidio J (2001) Proinflammatory actions of angiotensin II. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 10(3):321-329.
- Ruster C, Wolf G (2006) Renin-angiotensin-aldosterone system and progression of renal disease. *J Am Soc Nephrol*, 17(11):2985-2991.
- Saavedra JM (1992) Brain and pituitary angiotensin. *Endocr Rev*, 13(2):329-380.
- Saavedra JM (2005) Brain angiotensin II: new developments, unanswered questions and therapeutic opportunities. *Cell Mol Neurobiol*, 25(3-4):485-512.
- Saavedra JM, Sánchez-Lemus E, Benicky J (2011) Blockade of brain angiotensin II AT1 receptors ameliorates stress, anxiety, brain inflammation and ischemia: Therapeutic implications. *Psychoneuroendocrinology*, 36(1):1-18.
- Saito K, Ishizaka N, Aizawa T, Sata M, Iso-o N, Noiri E, Mori I, Ohno M, Nagai R (2005) Iron chelation and a free radical scavenger suppress angiotensin II-induced upregulation of TGF-beta1 in the heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 288(4):H1836-1843.
- Sanchez B, Lopez-Martin E, Segura C, Labandeira-Garcia JL, Perez-Fernandez R (2002) 1,25-dihydroxyvitamin D(3) increases striatal GDNF mRNA and protein expression in adult rats. *Brain Res Mol Brain Res*, 108:143-146.
- Santos RA, Brosnihan KB, Chappell MC, Pesquero J, Chernicky CL, Greene LJ, Ferrario CM (1988) Converting enzyme activity and angiotensin metabolism in the dog brainstem. *Hypertension*, 11(2 pt 2):I153-157.
- Santos RA, Ferreira AJ, Pinheiro SV, Sampaio WO, Touyz R, Campagnole-Santos MJ (2005) Angiotensin-(1-7) and its receptor as a potential targets for new cardiovascular drugs. *Expert Opin Investig Drug*, 14(8):1019-1031.
- Santos RA, Ferreira AJ, Verano-Braga T, Bader M (2013) Angiotensin-converting enzyme 2, angiotensin (1-7) and Mas: new players of the renin-angiotensin system. *J Endocrinol*, 216(2):R1-R17.
- Sasaki K, Yamano Y, Bardhan S, Iwai N, Murray JJ, Hasegawa M, Matsuda Y, Inagami T (1991) Cloning and expression of a complementary DNA encoding a bovine adrenal angiotensin II type-1 receptor. *Nature*, 351(6323):230-233.
- Schallert T, Kozlowski DA, Humm JL, Cocke RR (1997) Use-dependent structural events in

- recovery of function. *Adv Neurol*, 73:229-238.
- Schapira AH, Cooper JM, Dexter D, Jenner P, Clark JB, Marsden CD (1989) Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *Lancet*, 1(8649):1269.
- Schmandke A, Schmandke A, Strittmatter SM (2007) ROCK and Rho: biochemistry and neuronal functions of Rho-associated protein kinases. *Neuroscientist*, 13(5):454-469.
- Schofield AV, Bernard O (2013) Rho-associated coiled-coil kinase (ROCK) signaling and disease. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 48(4):301-316.
- Sealey JE, Laragh JH (2007) Aliskiren, the first renin inhibitor for treating hypertension: reactive renin secretion may limit its effectiveness. *Am J Hypertens*, 20(5):587-597.
- Seeman P (2006) Targeting the dopamine D2 receptor in schizophrenia. *Expert Opin Ther Targets*, 10(4):515-531.
- Seeman P, Wilson A, Gmeiner P, Kapur S (2006) Dopamine D2 and D3 receptors in human putamen, caudate nucleus, and globus pallidus. *Synapse*, 60(3):205-211.
- Simple PF (1995) Putative mechanisms of cough after treatment with angiotensin converting enzyme inhibitors. *J Hypertens Suppl*, 13(3):S17-S21.
- Seshiah PN, Weber DS, Rocic P, Valppu L, Taniyama Y, Griendling KK (2002) Angiotensin II stimulation of NAD(P)H oxidase activity: upstream mediators. *Circ Res*, 91(5):406-413.
- Shao W, Zhang SZ, Tang M, Zhang XH, Zhou Z, Yin YQ, Zhou QB, Huang YY, Liu YJ, Wawrousek E et al. (2013) Suppression of neuroinflammation by astrocytic dopamine D2 receptors via α -crystallin. *Nature*, 494(7435):90-94.
- Sheikh AM, Nagai A, Ryu JK, McLarnon JG, Kim SU, Masuda J (2009) Lysophosphatidylcholine induces glial cell activation: role of rho kinase. *Glia*, 57(8):898-907.
- Sherer TB, Betarbet R, Testa CM, Seo BB, Richardson JR, Kim JH, Miller GW, Yagi T, Matsuno-Yagi A, Greenamyre JT (2003) Mechanism of toxicity in rotenone models of Parkinson's disease. *J Neurosci*, 23(34):10756-10764.
- Shi J, Wei L (2007) Rho kinase in the regulation of cell death and survival. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 55(2):61-75.
- Shimura H, Hattori N, Kubo Si, Mizuno Y, Asakawa S, Minoshima S, Shimizu N, Iwai K, Chiba T, Tanaka K, Suzuki T (2000) Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nat Genet*, 25(3):302-305.
- Shoulson I (2002) Experimental neurotherapeutics: leaps and bounds. *Arch Neurol*, 59(5):689-691.
- Sian-Hülsmann J, Mandel S, Youdim MB, Riederer P (2011) The relevance of iron in the

- pathogenesis of Parkinson's disease. *J Neurochem*, 118(6):939-957.
- Sibley DR (1999) New insights into dopaminergic receptor function using antisense and genetically altered animals. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 39:313-341.
- Singh N, Pillay V, Choonara YE (2007) Advances in the treatment of Parkinson's disease. *Prog Neurobiol*, 81(1):29-44.
- Siragy HM (2010) The angiotensin II type 2 receptor and the kidney. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*, 11(1):33-36.
- Skidgel RA, Engelbrecht S, Johnson AR, Erdös EG (1984) Hydrolysis of substance p and neurotensin by converting enzyme and neural endopeptidase. *Peptides*, 5(4):769-776.
- Skidgel RA, Schulz WW, Tam LT, Erdös EG (1987) Human renal angiotensin I converting enzyme and neutral endopeptidase. *Kidney Int Suppl*, 20:S45-S48.
- Smith Y, Wichmann T, Factor SA, DeLong MR (2012) Parkinson's disease therapeutics: New developments and challenges since the introduction of levodopa. *Neuropsychopharmacology*, 37(1):213-246.
- Snyder AM, Connor JR (2009) Iron, the substantia nigra and related neurological disorders. *Biochim Biophys Acta*, 1790(7):606-614.
- Sohn HY, Raff U, Hoffmann A, Gloe T, Heermeier K, Galle J, Pohl U (2000) Differential role of angiotensin II receptor subtypes on endothelial superoxide formation. *Br J Pharmacol*, 131(4):667-672.
- Sokoloff P, Diaz J, Le Foll B, Guillin O, Leriche L, Bezard E, Gross C (2006) The dopamine D3 receptor: a therapeutic target for the treatment of neuropsychiatric disorders. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 5(1):25-43.
- Sokoloff P, Giros B, Martres MP, Andrieux M, Besancon R, Pilon C, Bouthenet ML, Souil E, Schwartz JC (1992) Localization and function of the D3 dopamine receptor. *Arzneimittelforschung*, 42(2A):224-230.
- Sokoloff P, Giros B, Martres MP, Bouthenet ML, Schwartz JC (1990) Molecular cloning and characterization of a novel dopamine receptor (D3) as a target for neuroleptics. *Nature*, 347(6289):146-151.
- Song DD, Haber SN (2000) Striatal responses to partial dopaminergic lesion: evidence for compensatory sprouting. *J Neurosci*, 20(13):5102-5114.
- Song K, Kanehara H, Takai S, Shiota N, Wada T, Inada Y, Miyazaki M (1999) Inhibition of the angiotensin II type 1 receptor by TCV-116: quantitation by in vitro autoradiography. *Jpn J Pharmacol*, 79(2):131-139.

- Song J, Kost CK Jr, Martin DS (2006) Androgens potentiate renal vascular responses to angiotensin II via amplification of the Rho kinase signaling pathway. *Cardiovasc Res*, 72(3):456-463.
- Sonsalla PK, Coleman C, Wong LY, Harris SL, Richardson JR, Gadad BS, Li W, German DC (2013) The angiotensin converting enzyme inhibitor captopril protects nigrostriatal dopamine neurons in animal models of parkinsonism. *Exp Neurol*, 250:376-383.
- Soto-Otero R, Méndez-Alvarez E, Hermida-Ameijeiras A, López-Real AM, Labandeira-Garcia JL (2002) Effects of (-)-nicotine and (-)-cotinine on 6-hydroxydopamine-induced oxidative stress and neurotoxicity: relevance for Parkinson's disease. *Biochem Pharmacol*, 64(1):125-135.
- Soto-Otero R, Méndez-Alvarez E, Hermida-Ameijeiras A, Muñoz-Patiño AM, Labandeira-Garcia JL (2000) Autoxidation and neurotoxicity of 6-hydroxydopamine in the presence of some antioxidants: potential implication in relation to the pathogenesis of Parkinson's disease. *J Neurochem*, 74(4):1605-1612.
- Spillantini MG (1999) Parkinson's disease, dementia with Lewy bodies and multiple system atrophy are alpha-synucleinopathies. *Parkinsonism Relat Disord*, 5(4):157-162.
- Staessen JA, Li Y, Richart T (2006) Oral renin inhibitors. *Lancet*, 368(9545):1449-1456.
- Steckelings UM, Larhed M, Hallberg A, Widdop RE, Jones ES, Wallinder C, Namsolleck P, Dahlöf B, Unger T (2011) Non-peptide AT₂-receptor agonists. *Curr Opin Pharmacol*, 11(2):187-192.
- Stegbauer J, Lee DH, Seubert S, Ellrichmann G, Manzel A, Kvakana H, Muller DN, Gaupp S, Rump LC, Gold R, Linker RA (2009) Role of the renin-angiotensin system in autoimmune inflammation of the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106(35):14942-14947.
- Stornetta RL, Hawelu-Johnson CL, Guyenet PG, Lynch KR (1988) Astrocytes synthesize angiotensinogen in brain. *Science*, 242(4884):1444-1446.
- Stragier B, De Bundel D, Sarre S, Smolders I, Vauquelin G, Dupont A, Michotte Y, Vanderheyden P (2008) Involvement of insulin-regulated aminopeptidase in the effects of the renin-angiotensin fragment angiotensin IV: a review. *Heart Fail Rev*, 13(3):321-337.
- Subramanian T (2001) Cell transplantation for the treatment of Parkinson's disease. *Semin Neurol*, 21(1):103-115.
- Sugamori KS, Demchyshyn LL, Chung M, Niznik HB (1994) D1A, D1B, and D1C dopamine receptors from *Xenopus laevis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91(22):10536-10540.
- Sullivan AM, Toulouse A (2011) Neurotrophic factors for the treatment of Parkinson's disease. *Cytokine Growth Factor Rev*, 22(3):157-165.
- Sunahara RK, Guan HC, O'Dowd BF, Seeman P, Laurier LG, Ng G, George SR, Torchia J, Van Tol HH, Niznik HB (1991) Cloning of the gene for a human dopamine D5 receptor with higher affinity for dopamine than D1. *Nature*, 350(6319):614-619.

- Suzuki K, Mizuno Y, Yoshida M (1990) Effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-like compounds on mitochondrial respiration. *Adv Neurol*, 53:215-218.
- Suzuki M, Hatano K, Sakiyama Y, Kawasumi Y, Kato T, Ito K (2001) Age-related changes of dopamine D1-like and D2-like receptor binding in the F344/N rat striatum revealed by positron emission tomography and in vitro receptor autoradiography. *Synapse*, 41(4):285-239.
- Suzuki S, Brown CM, Dela Cruz CD, Yang E, Bridwell DA, Wise PM (2007) Timing of estrogen therapy after ovariectomy dictates the efficacy of its neuroprotective and antiinflammatory actions. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104:6013-6018.
- Suzuki Y, Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Ruperez M, Esteban V, Egido J (2003) Inflammation and angiotensin II. *Int J Biochem Cell Biol*, 35(6):881-900.
- Tagawa T, Dampney RA (1999) AT(1) receptors mediate excitatory inputs to rostral ventrolateral medulla pressor neurons from hypothalamus. *Hypertension*, 34(6):1301-1307.
- Takahashi J (2007) Stem cell therapy for Parkinson's disease. *Expert Rev Neurother*, 7:667-675.
- Takayama H, Ray J, Raymon HK, Baird A, Hogg J, Fisher LJ, Gage FH (1995) Basic fibroblast growth factor increases dopaminergic graft survival and function in a rat model of Parkinson's disease. *Nat Med* 1:53-58.
- Takei Y, Joss JM, Kloas W, Rankin JC (2004) Identification of angiotensin I in several vertebrate species: its structural and functional evolution. *Gen Comp Endocrinol*, 135(3):286-292.
- Tham DM, Martin-McNulty B, Wang YX, Wilson DW, Vergona R, Sullivan ME, Dole W, Rutledge JC (2002) Angiotensin II is associated with activation of NF-kappaB-mediated genes and downregulation of PPARs. *Physiol Genomics*, 11(1):21-30.
- Thanvi B, Lo N, Robinson T (2005) Vascular parkinsonism – an important cause of parkinsonism in older people. *Age Ageing*, 34(2):114-119.
- Thomas B, Beal MF (2007) Parkinson's disease. *Hum Mol Genet*, 16:R183-194.
- Thomas WG, Greenland KJ, Shinkel TA, Sernia C (1992) Angiotensinogen is secreted by pure rat neuronal cell cultures. *Brain Res*, 588(2):191-200.
- Thomas WG, Mendelsohn FA (2003) Angiotensin receptors: form and function and distribution. *Int J Biochem Cell Biol*, 35(6):774-779.
- Tiberi M, Jarvie KR, Silvia C, Falardeau P, Gingrich JA, Godinot N, Bertrand L, Yang-Feng TL, Fremeau RT, Caron MG (1991) Cloning, molecular characterization, and chromosomal assignment of a gene encoding a second D1 dopamine receptor subtype: differential expression pattern in rat brain compared with the D1A receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88(17):7491-7495.

- Timmermans PB, Carini DJ, Chiu AT, Duncia JV, Price WA Jr, Wells GJ, Johnson AL, Wexler RR (1991) The discovery of a new class of highly specific nonpeptide angiotensin II receptor antagonists. *Am J Hypertens*, 4(4 Pt 2):275S-281S.
- Tipnis SR, Hooper NM, Hyde R, Karran E, Christie G, Turner AJ (2000) A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *J Biol Chem*, 275(43):33238-33243.
- Todd RD, Carl J, Harmon S, O'Malley KL, Permuter JS (1996) Dynamic changes in striatal dopamine D2 and D3 receptor protein and mRNA in response to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) denervation in baboons. *J Neurosci*, 16(23):7776-7782.
- Todorich B, Pasquini JM, Garcia CI, Paez PM, Connor JR (2009) Oligodendrocytes and myelination: the role of iron. *Glia*, 57(5):467-478.
- Tönges L, Frank T, Tatenhorst L, Saal KA, Koch JC, Szego ÉM, Bähr M, Weishaupt JH, Lingor P (2012) Inhibition of rho kinase enhances survival of dopaminergic neurons and attenuates axonal loss in a mouse model of Parkinson's disease. *Brain*, 135(Pt 11):3355-3370.
- Toshima Y, Satoh S, Ikegaki I, Asano T (2000) A new model of cerebral microthrombosis in rats and the neuroprotective effect of a Rho-kinase inhibitor. *Stroke*, 31(9):2245-2250.
- Touyz RM (2004) Reactive oxygen species and angiotensin II signaling in vascular cells – implications in cardiovascular disease. *Braz J Med Biol Res*, 37(8):1263-1273.
- Touyz RM, Chen X, Tabet F, Yao G, He G, Quinn MT, Pagano PJ, Schiffrin EL (2002) Expression of a functionally active gp91phox-containing neutrophil-type NAD(P)H oxidase in smooth muscle cells from human resistance arteries: regulation by angiotensin II. *Circ Res*, 90(11):1205-1213.
- Tripanichkul W, Sripanichkulchai K, Finkelstein DI (2006) Estrogen down-regulates glial activation in male mice following 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine intoxication. *Brain Res*, 1084(1):28-37.
- Unger T, Badoer E, Ganten D, Lang RE, Rettig R (1988) Brain angiotensin: pathways and pharmacology. *Circulation*, 77(6 Pt 2):I40-I54.
- Unger T, Chung O, Csikos T, Culman J, Gallinat S, Gohlke P, Höhle S, Meffert S, Stoll M, Stroth U, Zhu YZ (1996) Angiotensin receptors. *J Hypertens Suppl*, 14(5):S95-103.
- Ungerstedt U (1968) 6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *Eur J Pharmacol*, 5(1):107-110.
- Urrutia P, Aguirre P, Esparza A, Tapia V, Mena NP, Arredondo M, González-Billault C, Núñez MT (2013) Inflammation alters the expression of DMT1, FNP1 and hepcidin, and it causes iron accumulation in central nervous system cells. *J Neurochem* 126(4):541-549.

- Valenzuela R, Barroso-Chinea P, Muñoz A, Joglar B, Villar-Cheda B, Lanciego JL, Labandeira-Garcia JL (2010) Location of prorenin receptors in primate substantia nigra: effects on dopaminergic cell death. *J Neuropathol Exp Neurol*, 69(11):1130-1142.
- Valjent E, Bertran-Gonzalez J, Hervé D, Fisone G, Girault JA (2009) Looking BAC at striatal signaling: cell-specific analysis in new transgenic mice. *Trends Neurosci*, 32(10):538-547.
- Van den Eeden SK, Tanner CM, Bernstein AL, Foss RD, Leimpeter A, Bloch DA, Nelson LM (2003) Incidence of Parkinson's disease: variation by age, gender and race/ethnicity. *Am J Epidemiol*, 157(11):1015-1022.
- Vanderheyden PM (2009) From angiotensin IV binding site to AT4 receptor. *Mol Cell Endocrinol*, 302(2):159-166.
- Vegeto E, Benedusi V, Maggi A (2008) Estrogen anti-inflammatory activity in brain: a therapeutic opportunity for menopause and neurodegenerative diseases. *Front Neuroendocrinol*, 29(4):507-519.
- Viazzi F, Leoncini G, Pontremoli R (2013) Antihypertensive treatment and renal protection: the role of drugs inhibiting the renin-angiotensin-aldosterone system. *High Blood Press Cardiovasc Prev*, 20(4):273-282.
- Villapol S, Yaszemski AK, Logan TT, Sánchez-Lemus E, Saavedra JM, Symes AJ (2012) Candesartan, an angiotensin II AT1-receptor blocker and PPAR- γ agonist, reduces lesion volume and improves motor and memory function after traumatic brain injury in mice. *Neuropsychopharmacology*, 37(13):2817-2829.
- Villar VA, Jones JE, Armando I, Palmes-Saloma C, Yu P, Pascua AM, Keever L, Arnaldo FB, Wang Z, Luo Y, Felder RA, Jose PA (2009) G protein-coupled receptor kinase 4 (GRK4) regulates the phosphorylation and function of the dopamine D3 receptor. *J Biol Chem*, 284(32):21425-21434.
- Villar-Cheda B, Rodríguez-Pallares J, Valenzuela R, Muñoz 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(10):1695-1706.
- Villar-Cheda B, Sousa-Ribeiro D, Rodriguez-Pallares J, Rodriguez-Perez AI, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL (2009) Aging and sedentarism decrease vascularization and VEGF levels in the rat substantia nigra. Implication for Parkinson's disease. *J Cereb Blood Flow Metab*, 29(2):230-234.
- 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(1):204.e1-11.

- Vitek JL (2008) Deep brain stimulation: how does it work? *Cleve Clin J Med*, 75(Suppl. 2):S59-65.
- Von Bohlen und Halbach O (2005) Animal models of Parkinson's disease. *Neurodegenerative Dis*, 2:313-320.
- Von Bohlen und Halbach O, Albrecht D (2006) The CNS renin-angiotensin system. *Cell Tissue Res*, 326(2):599-616.
- Wang Y, Chan GL, Holden JE, Dobko T, Mak E, Schulzer M, Huser JM, Snow BJ, Ruth TJ, Calne DB et al. (1998) Age-dependent decline of dopamine D1 receptors in human brain: a PET study. *Synapse*, 30(1):56-61.
- Wang ZQ, Moore AF, Ozono R, Siragy HM, Carey RM (1998) Immunolocalization of subtype 2 angiotensin II (AT₂) receptor protein in rat heart. *Hypertension*, 32(1):78-83.
- Weinreb O, Mandel S, Youdim MB, Amit T (2013) Targeting dysregulation of brain iron homeostasis in Parkinson's disease by iron chelators. *Free Radic Biol Med*, 62:52-64.
- Wilms H, Zecca L, Rosenstiel P, Sievers J, Deuschl G, Lucius R (2007) Inflammation in Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases: Cause and therapeutic implications. *Curr Pharm Des*, 13:1925-1928.
- Witkovsky P (2004) Dopamine and retinal function. *Doc Ophthalmol*, 108(1):17-40.
- Wolf G, Butzmann U, Wenzel UO (2003) The renin-angiotensin system and progression of renal disease: from hemodynamics to cell biology. *Nephron Physiol*, 93(1):P3-13.
- Wolters ECh (2009) Non-motor extranigral signs and symptoms in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*, 15(Suppl.3):S6-12.
- Wong E, Cuervo AM (2010) Integration of clearance mechanisms: the proteasome and autophagy. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2(12):a006734.
- Wright JW, Harding JW (2011) Brain renin-angiotensin—a new look at an old system. *Prog Neurobiol*, 95(1):49-67.
- Wright JW, Kawas LH, Harding JW (2013) A role for the brain RAS in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 4:158.
- Wright JW, Krebs LT, Stobb JW, Harding JW (1995) The angiotensin IV system: functional implications. *Front Neuroendocrinol*, 16(1):23-52.
- Wright JW, Yamamoto BJ, Harding JW (2008) Angiotensin receptor subtype mediated physiologies and behaviors: New discoveries and clinical targets. *Prog Neurobiol*, 84(2):157-181.
- Wu Y, Lu H, Cassis LA, Daugherty A (2011) Molecular and pathophysiological features of angiotensinogen: a mini review. *N Am J Med Sci (Boston)*, 4(4):183-190.

- Wu D, Teisman P, Tieu K, Vila M, Jackson-Lewis V, Ischiropoulos H, Przedborski S (2003) NADPH oxidase mediates oxidative stress in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100(10):6145-6150.
- Wu Z, Zheng W, Sandberg K (2003) Estrogen regulates adrenal angiotensin type 1 receptors by modulating adrenal angiotensin levels. *Endocrinology*, 144(4):1350-1356.
- Xie W, Wan OW, Chung KK (2010) New insights into the role of mitochondrial dysfunction and protein aggregation in Parkinson's disease. *Biochem Biophys Acta*, 1802(11):935-941.
- Yamamoto N, Sawada H, Izumi Y, Kume T, Katsuki H, Shimohama S, Akaike A (2007) Proteasome inhibition induces glutathione synthesis and protects cells from oxidative stress: relevance to Parkinson disease. *J Biol Chem*, 282(7):4364-4372.
- Yan J; Zhou X, Guo JJ, Mao L, Wang YJ, Sun J, Sun LX, Zhang LY, Zhou XF, Liao H (2012) Nogo-66 inhibits adhesion and migration of microglia via GTPase Rho pathway in vitro. *J Neurochem*, 120(5):721-731.
- Yang Z, Asico LD, Yu P, Wang Z, Jones JE, Escano CS, Wang X, Quinn MT, Sibley DR, Romero GG et al. (2006) D5 dopamine receptor regulation of reactive oxygen species production, NADPH oxidase and blood pressure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 290(1):R96-R104.
- Yang S, Han Y, Zheng S, Kou X, Asico LD, Huang H, Gao Z, Jose PA, Zeng C (2015) Enhanced Natriuresis and Diuresis in Wistar Rats Caused by the Costimulation of Renal Dopamine D3 and Angiotensin II Type 2 Receptors. *Am J Hypertens*, [ahead of print]
- Yang S, Yao B, Zhou Y, Yin H, Zhang MZ, Harris RC (2012) Intrarenal dopamine modulates progressive angiotensin II-mediated renal injury. *Am J Physiol Renal Physiol*, 302(6):F742-749.
- Yasuhara T, Shingo T, Date I (2007) Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) therapy for Parkinson's disease. *Acta Med Okayama*, 61:51-56.
- Yoshida H, Kakuchi J, Guo DF, Furuta H, Iwai N, van der Meer-de Jong R, Inagami T, Ichikawa I (1992) Analysis of the evolution of angiotensin II type 1 receptor gene in mammals (mouse, rat, bovine and human). *Biochem Biophys Res Commun*, 186(2):1042-1049.
- Yoshida T, Tanaka M, Sotomatsu A, Hirai S (1995) Activated microglia cause superoxide-mediated release of iron from ferritin. *Neurosci Lett*, 190(1):21-24.
- Yugandhar VG, Clark MA (2013) Angiotensin III: a physiological relevant peptide of the renin angiotensin system. *Peptides*, 46:26-32.
- Yurek DM, Hipkens SB, Hebert MA; Gash DM, Gerhardt GA (1998) Age-related decline in striatal dopamine release and motoric function in brown Norway/Fischer 344 hybrid rats. *Brain Res*, 791(1-2):246-256.

- Zalba G, San José G, Moreno MU, Fortuño MA, Fortuño A, Beaumont FJ, Díez J (2001) Oxidative stress in arterial hypertension: role of NAD(P)H oxidase. *Hypertension*, 38(6):1395-1399.
- Zawada WM, Banninger GP, Thornton J, Marriott B, Cantu D, Rachubinski AL, Das M, Griffin WS, Jones SM (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.
- Zecca L, Gallorini M, Schünemann V, Trautwein AX, Gerlach M, Riederer P, Vezzoni P, Tampellini D (2001) Iron, neuromelanin and ferritin content in the substantia nigra of normal subjects at different ages: consequences for iron storage and neurodegenerative processes. *J Neurochem*, 76(6):1766-1773.
- Zecca L, Stroppolo A, Gatti A, Tampellini D, Toscani M, Gallorini M, Giaveri G, Arosio P, Santambrogio P, Fariello RG et al. (2004) The role of iron and copper molecules in the neuronal vulnerability of locus coeruleus and substantia nigra during aging. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101(26):9843-9848.
- Zecca L, Youdim MB, Riederer P, Connor JR, Crichton RR (2004) Iron, brain ageing and neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurosci*, 5:863-873.
- Zeng C, Liu Y, Wang Z, He D, Huang L, Yu P, Zheng S, Jones JE, Asico LD, Hopfer U et al. (2006) Activation of D3 dopamine receptor decreases angiotensin II type 1 receptor expression in rat renal proximal tubule cells. *Circ Res*, 99:494-500.
- Zeng C, Luo Y, Asico LD, Hopfer U, Eisner GM, Felder RA, Jose PA (2003) Perturbation of D1 dopamine and AT1 receptor interaction in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, 42:787-792.
- Zeng X, Chen J, Deng X, Liu Y, Rao MS, Cadet J, Freed WJ (2006) An in vitro model of human dopaminergic neurons derived from embryonic stem cells: MPP⁺ toxicity and GDNF neuroprotection. *Neuropsychopharmacology*, 31(12):2708-2715.
- Zhang X, Surguladze N, Slagle-Webb B, Cozzi A, Connor JR (2006) Cellular iron status influences the functional relationship between microglia and oligodendrocytes. *Glia*, 54(8):795-804.
- Zhang Z, Ottens K, Larner SF, Kobeissy FH, Williams ML, Hayes RL, Wang KKW (2005) Direct rho-associated kinase inhibition induces cofilin dephosphorylation and neurite outgrowth in PC-12 cells. *Cell Mol Biol Lett*, 11(1):12-29.
- Zigmond MJ, Abercrombie ED, Berger TW, Grace AA, Stricker EM (1990) Compensations after lesions of central dopaminergic neurons: some clinical and basic implications. *Trends Neurosci*, 13(7):290-296.
- Zijlmans J, Evans A, Fontes F, Katzenschlagen R, Gacinovic S, Lees AJ, Costa D (2007) [¹²³I] FP-CIT spect study in vascular parkinsonism and Parkinson's disease. *Mov Disord*, 22(9):1278-1285.

Zijlmans JC, Daniel SE, Hughes AJ, Révész T, Lees AJ (2004) Clinicopathological investigation of vascular parkinsonism, including clinical criteria for diagnosis. *Mov Disord*, 19(6):630-640.

Zijlmans JC, Katzenschlager R, Daniel SE, Lees AJ (2004) The L-dopa response in vascular parkinsonism. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 75(4):545-547.

