



ESCUELA DE DOCTORADO
INTERNACIONAL DE LA USC

María A
Pedrosa Sánchez

Tesis doctoral

Receptores de angiotensina en
neuroinflamación e inflamación
periférica. Implicaciones en la
degeneración dopaminérgica.

Santiago de Compostela, 2022

Programa de doctorado en Neurociencia y Psicología Clínica



TESIS DE DOCTORADO

**RECEPTORES DE ANGIOTENSINA EN
NEUROINFLAMACIÓN E INFLAMACIÓN
PERIFÉRICA. IMPLICACIONES EN LA
DEGENERACIÓN DOPAMINÉRGICA.**

María A Pedrosa Sánchez

**ESCUELA DE DOCTORADO INTERNACIONAL DE LA UNIVERSIDAD
DE SANTIAGO DE COMPOSTELA**

PROGRAMA DE DOCTORADO EN NEUROCIENCIA Y PSICOLOGÍA CLÍNICA

SANTIAGO DE COMPOSTELA

2022

D./Dña. **María Ángeles Pedrosa Sánchez**

Título de la tesis: **Receptores de angiotensina en neuroinflamación e inflamación periférica. Implicaciones en la degeneración dopaminérgica.**

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

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

Y me comprometo a presentar el Compromiso Documental de Supervisión en el caso que el original no esté depositado en la Escuela.

En **Santiago de Compostela** , **15 de noviembre de 2022**.

Firma electrónica

**AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR / TUTOR DE
LA TESIS**

**RECEPTORES DE ANGIOTENSINA EN
NEUROINFLAMACIÓN E INFLAMACIÓN
PERIFÉRICA. IMPLICACIONES EN LA
DEGENERACIÓN DOPAMINÉRGICA**

D./D^a. José Luis Labandeira García

INFORMA/N:

Que la presente tesis, se corresponde con el trabajo realizado por D/D^a. María Ángeles Pedrosa Sánchez, bajo mi dirección/tutorización, y autorizo su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como director de esta no incurre en las causas de abstención establecidas en la Ley 40/2015.

De acuerdo con lo indicado en el Reglamento de Estudios de Doctorado, declara también que la presente tesis doctoral es idónea para ser defendida en base a la modalidad de Monográfica con reproducción de publicaciones, en los que la participación del doctorando/a fue decisiva para su elaboración y las publicaciones se ajustan al Plan de Investigación.

En Santiago de Compostela., 15 de Noviembre de 2022

Firma electrónica: José Luis Labandeira García

AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR DE LA TESIS

RECEPTORES DE ANGIOTENSINA EN NEUROINFLAMACIÓN E INFLAMACIÓN PERIFÉRICA. IMPLICACIONES EN LA DEGENERACIÓN DOPAMINÉRGICA

D./D^a. Ana Isabel Rodríguez Pérez

INFORMA/N:

Que la presente tesis, se corresponde con el trabajo realizado por D/D^a. María Ángeles Pedrosa Sánchez, bajo mi dirección, y autorizo su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como director de esta no incurre en las causas de abstención establecidas en la Ley 40/2015.

De acuerdo con lo indicado en el Reglamento de Estudios de Doctorado, declara también que la presente tesis doctoral es idónea para ser defendida en base a la modalidad de Monográfica con reproducción de publicaciones, en los que la participación del doctorando/a fue decisiva para su elaboración y las publicaciones se ajustan al Plan de Investigación.

En Santiago de Compostela., 15 de Noviembre de 2022

Firma electrónica: Ana Isabel Rodríguez Pérez

INDICE

AGRADECIMIENTOS	I
RESUMEN	IV
ABSTRACT	VI
ARTÍCULOS DERIVADOS DE LA TESIS	VIII
OTRAS PUBLICACIONES REALIZADAS DURANTE EL PERÍODO DE TESIS	X
ABREVIATURAS	XI
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA. RECEPTORES.	1
1.1.1. <i>Tratamientos moduladores del SRA y sus receptores</i>	7
1.2. SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA CEREBRAL	8
1.2.1. <i>Enfermedad de Parkinson</i>	11
1.2.1.1. <i>Neuroinflamación en la enfermedad de Parkinson</i>	14
1.2.2. <i>Receptores de angiotensina en la fisiopatología de la enfermedad de Parkinson</i>	20
1.2.2.1. <i>Tratamientos moduladores de los receptores del SRA: Efecto en neuroinflamación y degeneración dopaminérgica</i>	24
1.3. INFLAMACIÓN PERIFÉRICA, NEUROINFLAMACIÓN Y NEURODEGENERACIÓN DOPAMINÉRGICA. IMPLICACIÓN DE RECEPTORES DE ANGIOTENSINA	28
1.3.1. <i>Inflamación periférica crónica y receptores de angiotensina: síndrome metabólico</i>	30
1.3.2. <i>Inflamación periférica aguda y receptores de angiotensina: COVID-1932</i>	
1.4. SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA PULMONAR Y SARS-CoV-2	32
1.4.1. <i>Enzima convertora de Angiotensina II (ECA2) como receptor de SARS-CoV-2</i>	33
1.4.1.1. <i>Efecto del bloqueo de receptores de angiotensina o de ECA sobre ECA2</i>	36
1.4.1.2. <i>Efecto de moduladores indirectos de receptores de angiotensina sobre ECA2. Anti-inflamatorios no esteroideos</i>	37
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	40
3. MATERIAL Y MÉTODOS	43
3.1. IMPLICACIÓN DEL RECEPTOR AT1 EN LA NEUROINFLAMACIÓN Y DEGENERACIÓN DOPAMINÉRGICA EN UN MODELO DE PARKINSON BASADO EN SINUCLEINOPATÍA	43
3.1.1. <i>Diseño experimental</i>	43
3.1.2. <i>Modelo de lesión con AAV9-α-syn-WT y AAV9-α-syn-A53T en ratas</i>	46

3.1.3.	<i>Pruebas de comportamiento motor del modelo de lesión con α-syn</i>	47
3.1.4.	<i>Técnicas de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia en el modelo de lesión con α-syn</i>	48
3.1.4.1.	Cuantificación estereológica y densidad de terminales estriatales	52
3.1.4.2.	Microscopia confocal: análisis de colocalización	52
3.1.5.	<i>Cromatografía de alto rendimiento para el modelo de lesión de α-syn</i>	53
3.1.6.	<i>Análisis de la proteína α-syn mediante western blot</i>	53
3.1.7.	<i>Extracción de ARN, RT-PCR Y Q-PCR del modelo de lesión con α-syn</i>	55
3.1.8.	<i>Análisis de inflamación por actividad enzimática y ELISA en el modelo de lesión con α-syn</i>	56
3.2.	IMPLICACIÓN DEL RECEPTOR AT2 EN INFLAMACIÓN	57
3.2.1.	<i>Diseño experimental</i>	57
3.2.2.	<i>Pruebas de comportamiento motor en un modelo de envejecimiento</i>	62
3.2.3.	<i>Inmunohistoquímica de TH y análisis estereológico</i>	62
3.2.4.	<i>Cromatografía de alto rendimiento del sistema dopaminérgico</i>	62
3.2.5.	<i>Microdissección por captura láser</i>	62
3.2.6.	<i>Aislamiento de mitocondrias cerebrales y análisis de la actividad del citocromo c oxidasa</i>	63
3.2.7.	<i>Análisis de proteínas mediante western blot</i>	64
3.2.8.	<i>Extracción de ARN, RT-QPCR y Q-PCR</i>	65
3.2.9.	<i>Modelos in vitro</i>	65
3.2.9.1.	Cultivos primarios de microglía	65
3.2.9.2.	Línea celular microglial (N9)	66
3.2.10.	<i>Análisis de inflamación por actividad enzimática y ELISA en células microgliales</i>	67
3.2.11.	<i>Análisis de factores de transcripción en células microgliales</i>	68
3.2.12.	<i>Modelo de supresión de hormonas sexuales en ratón y modelo de masculinización cerebral</i>	69
3.2.13.	<i>Aislamiento de microglía adulta</i>	70
3.2.14.	<i>Técnica de hibridación in situ RNAscope en microglía adulta</i>	71
3.3.	RECEPTORES DE ANGIOTENSINA EN INFLAMACIÓN PERIFÉRICA CRÓNICA DE SÍNDROME METABÓLICO. IMPLICACIÓN EN LA NEURODEGENERACIÓN DOPAMINÉRGICA	75
3.3.1.	<i>Diseño experimental</i>	75
3.3.2.	<i>Desarrollo de un modelo de síndrome metabólico en rata</i>	77
3.3.3.	<i>Modelo de lesión con 6-OHDA en ratas con síndrome metabólico</i>	78
3.3.4.	<i>Modelo de infusión sistémica de ATI-AA humanos en rata</i>	79
3.3.5.	<i>Modelo de lesión con AAV9-α-syn-A53T en ratas con infusión de ATI-AA humanos</i>	80

3.3.6.	<i>Extracción de líquido cefalorraquídeo y sangre en modelo de rata</i>	80
3.3.7.	<i>Determinación de autoanticuerpos en líquido cefalorraquídeo y suero de rata</i>	81
3.3.8.	<i>Análisis de permeabilidad de la barrera hematoencefálica en un modelo de síndrome metabólico</i>	81
3.3.9.	<i>Análisis inmunohistoquímico de TH y OX-6</i>	82
3.3.10.	<i>Análisis de expresión de los componentes y receptores del SRA cerebral</i>	82
3.3.11.	<i>Análisis de inflamación y estrés oxidativo por actividad enzimática y ELISA</i>	83
3.4.	RECEPTORES DE ANGIOTENSINA E INFLAMACIÓN PERIFÉRICA AGUDA. INFLAMACIÓN PULMONAR EN COVID-19.	83
3.4.1.	<i>Diseño experimental</i>	83
3.4.2.	<i>Experimentos in vitro</i>	87
3.1.1.1.	<i>Cultivo de la línea endotelial pulmonar humana (A549)</i>	87
3.4.3.	<i>Transfección de ECA2 en la línea celular A549</i>	88
3.4.4.	<i>Análisis de internalización de la proteína spike en la línea celular A549</i>	88
3.4.5.	<i>Análisis de expresión de los componentes y receptores del SRA pulmonar</i>	89
3.4.6.	<i>Cromatografía de alto rendimiento para niveles de angiotensina pulmonar</i>	91
3.4.7.	<i>Análisis de actividad enzimática para la dinámica celular de ECA2</i>	92
3.4.8.	<i>Análisis de mediadores inflamatorios en células A549 mediante ELISA</i>	93
3.5.	ANÁLISIS ESTADÍSTICOS Y REPRESENTACIÓN GRÁFICA	94
4.	RESULTADOS	95
4.1.	RECEPTORES AT1 CEREBRALES E INFLAMACIÓN: NEUROINFLAMACIÓN Y DEGENERACIÓN DOPAMINÉRGICA EN UN MODELO DE PARKINSON BASADO EN SINUCLEINOPATÍA.	95
4.1.1.	<i>Sobreexpresión de la proteína α-syn mediante la inyección estereotáxica de AAV9</i>	95
4.1.2.	<i>Pérdida de neuronas dopaminérgicas en un modelo de Parkinson basado en sinucleinopatía. Efecto neuroprotector de los bloqueantes del receptor AT1</i>	100
4.1.3.	<i>Implicación del receptor AT1 en la neuroinflamación mediada por la sobreexpresión de α-syn</i>	107
4.2.	RECEPTORES AT2 CEREBRALES E INFLAMACIÓN	112
4.2.1.	<i>Receptores AT2 cerebrales en inflamación periférica crónica (envejecimiento) y aguda (LPS)</i>	112
4.2.2.	<i>Receptores AT2 y degeneración dopaminérgica</i>	121

4.2.3.	<i>Receptores AT2 en neuroinflamación. Células microgliales. Dimorfismo sexual</i>	131
4.3.	RECEPTORES DE ANGIOTENSINA EN LA INFLAMACIÓN PERIFÉRICA CRÓNICA DEL SÍNDROME METABÓLICO (METS). IMPLICACIÓN EN LA NEURODEGENERACIÓN DOPAMINÉRGICA	138
4.3.1.	<i>Caracterización de un modelo animal experimental de MetS</i>	138
4.3.2.	<i>Activación del eje pro-inflamatorio mediado por receptores AT1 en la sustancia nigra de animales con MetS</i>	139
4.3.3.	<i>Sobreactivación del receptor AT1 media mayor vulnerabilidad a degeneración dopaminérgica en MetS</i>	141
4.3.4.	<i>Aumento de citoquinas circulantes, 27-OHC y autoanticuerpos (AA) frente a receptores del SRA en un modelo experimental de MetS</i>	143
4.3.5.	<i>Aumento de AA frente a receptores del SRA en LCR de un modelo experimental de MetS.</i>	147
4.3.6.	<i>Infusión de AA frente al receptor AT1 (AT1-AA) mediante minibombas intraperitoneales</i>	148
4.3.7.	<i>Efectos de la infusión intraperitoneal crónica de AT1-AA sobre receptores del SRA cerebral y la vulnerabilidad dopaminérgica</i>	149
4.4.	RECEPTORES DE ANGIOTENSINA EN LA INFLAMACIÓN PERIFÉRICA AGUDA DEL COVID-19	153
4.4.1.	<i>Efecto de tratamientos moduladores del SRA sobre receptores de angiotensina en tejido pulmonar de ratas adultas jóvenes</i>	153
4.4.2.	<i>Efecto de tratamientos moduladores del SRA y receptores de angiotensina en tejido pulmonar de modelos animales de inflamación crónica especialmente vulnerables a COVID-19: MetS y envejecimiento.</i>	158
4.4.3.	<i>Efecto del tratamiento con moduladores del SRA en modelos in vitro de infección pulmonar por SARS-CoV-2.</i>	164
5.	DISCUSIÓN	173
5.1.	RECEPTORES AT1 CEREBRALES, NEUROINFLAMACIÓN Y DEGENERACIÓN DOPAMINÉRGICA EN UN MODELO DE PARKINSON BASADO EN SINUCLEINOPATÍA	173
5.1.1.	<i>Aumento de la muerte neuronal dopaminérgica en un modelo de sobreexpresión de α-syn</i>	173
5.1.2.	<i>Aumento de la respuesta microglial inflamatoria en un modelo de sobreexpresión de α-syn</i>	174
5.1.3.	<i>Efecto neuroprotector y anti-inflamatorio de los bloqueantes del receptor AT1 en un modelo de sobreexpresión de α-syn</i>	175
5.2.	RECEPTORES AT2 CEREBRALES E INFLAMACIÓN	177
5.2.1.	<i>Receptores AT2 cerebrales en inflamación periférica crónica (envejecimiento) y aguda (LPS)</i>	177
5.2.2.	<i>Receptores AT2 y degeneración dopaminérgica</i>	180
5.2.3.	<i>Receptores AT2 en células microgliales. Neuroinflamación. Dimorfismo sexual</i>	183

5.3.	RECEPTORES DE ANGIOTENSINA EN INFLAMACIÓN PERIFÉRICA CRÓNICA DEL SÍNDROME METABÓLICO (METS). IMPLICACIÓN EN LA NEURODEGENERACIÓN DOPAMINÉRGICA _____	186
5.3.1.	<i>Activación del eje pro-inflamatorio mediado por receptores AT1 en la sustancia nigra de animales con MetS. Vulnerabilidad a degeneración dopaminérgica en MetS _____</i>	186
5.3.2.	<i>Aumento de citoquinas circulantes, 27-OHC y autoanticuerpos (AA) frente a receptores del SRA en un modelo animal de MetS _____</i>	187
5.3.3.	<i>Efectos de la infusión intraperitoneal crónica de AT1-AA sobre el SRA cerebral y la vulnerabilidad dopaminérgica _____</i>	191
5.4.	RECEPTORES DE ANGIOTENSINA EN LA INFLAMACIÓN PERIFÉRICA AGUDA DEL COVID-19 _____	192
5.4.1.	<i>Efecto de tratamientos moduladores del SRA sobre receptores de angiotensina en el tejido pulmonar de ratas adultas jóvenes _____</i>	192
5.4.2.	<i>Efecto de tratamientos moduladores del SRA sobre receptores de angiotensina en tejido pulmonar de modelos animales de inflamación crónica especialmente vulnerables a COVID-19: MetS y envejecimiento. _____</i>	193
5.4.3.	<i>Efecto de tratamientos moduladores del SRA sobre receptores de angiotensina en modelos in vitro de infección pulmonar por SARS-CoV-2. _____</i>	195
6.	CONCLUSIONES _____	203
7.	CONCLUSIONS _____	206
8.	BIBLIOGRAFÍA _____	209
	ANEXO I _____	245
	ANEXO II _____	249
	FINANCIACIÓN _____	250
	INFORME BIOÉTICA DE LA USC _____	251

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a todas las personas que han colaborado enormemente a la elaboración de esta tesis doctoral, especialmente:

Al Profesor **José Luis Labandeira García**, por su enorme dedicación, esfuerzo y pasión que ofrece cada día a la investigación. Gracias por haberme permitido formar parte de este gran grupo, por enseñarme y por iniciarme en el mundo de la investigación.

A la profesora **María José Guerra Seijas**, por todo su trabajo y por su amabilidad y generosidad que nos transmite siempre.

A **Ana Isabel**, gracias por tu lucha incansable, por tu inmensa dedicación, por lo mucho que me has enseñado, por apoyarme, por escucharme, por guiarme y por inspirarme. Para mí ha sido una grandísima suerte haber trabajado juntas en esta tesis.

A **Pablo Garrido**, con quien he podido trabajar mano a mano, gracias por tu inmensa amabilidad, capacidad de enseñanza, paciencia y buen humor.

A **Rita**, con la que he afrontado innumerables retos, contigo he aprendido cosas valiosísimas y lo que significa un trabajo con calidad científica.

Al profesor **Juan Suárez Quintanilla**, con quien he tenido el placer de trabajar y compartir tantas conversaciones interesantes, útiles y divertidas. Siempre me has ayudado, gracias.

A **Jannette Rodríguez**, gracias por haberme enseñado y ayudado en las prácticas y servirme de ejemplo para la docencia y la investigación.

A **Ana Muñoz**, gracias por transmitir paz y tranquilidad, por ser buena profesora y por tu rigurosidad en el trabajo.

A **Juan Parga**, gracias por tus innumerables gestiones, por tu enorme paciencia, por tu tranquilidad y buen estar.

A **Cris**, cuyo ánimo, energía, buen humor, pasión y entrega nos ayudan a todos cada día. Gracias por estar siempre ahí, por tu sabiduría y apoyo personal.

A **Pili**, gracias por ser como eres, luchadora, cercana, con carácter explosivo, con energía y con empeño.

A **Iria**, gracias por ser profesional, rigurosa y organizada. Además, tus sugerencias me han animado a hacer escapadas y conocer muchos rincones de Galicia.

A **Carmen Díaz**, gracias por ser tan atenta, por cuestionártelo todo y aportar un punto de vista diferente.

A **Begoña Villar**, gracias por la fuerza que siempre transmites, por tus consejos y por tu buen humor.

A **Antonio Domínguez**, gracias por abarcar y enseñarnos tantísimos conocimientos, siempre es un placer hablar contigo.

A **Alicia**, gracias por tu buen humor tan contagioso y por tu compañerismo.

A **Andrea**, tu inmensa bondad y tu gran capacidad de trabajo te hacen una persona única y admirable. Gracias por ayudarme en todo y por estar siempre ahí.

A **María García** gracias por tu rigurosidad en el trabajo, por ser una atenta y buena compañera.

A **Aloia**, me ha gustado mucho enfrentarme contigo a nuevos retos, agradezco tu ayuda, tu compañía y tu buen humor.

A **Lucía**, muchas gracias por el apoyo que me has dado siempre a mí y por la alegría que transmites.

A **Carmen Labandeira**, gracias por todo tu trabajo, que nos ha permitido embarcarnos en desafíos extraordinarios.

A **Ana Muñoz Manchado**, gracias por esa inolvidable y provechosa estancia, por abrirme las puertas de Karolinska, por haber sido tan cercana y atenta, y por ser un gran ejemplo a seguir.

A **Fernando**, una persona con un corazón que no le cabe en el pecho, un amigo con el que poder contar siempre. Me has apoyado en todos los malos momentos y hemos celebrado todo los buenos. Simplemente, gracias.

A mi gran amigo **Ismael**, me alegro mucho de haber compartido contigo esta intensa aventura gallega. Has sido un grandísimo apoyo. Eres una excelente persona y te mereces lo mejor.

A **Albica**, qué te voy a decir a ti. Gracias inmensas por todo, por tu positivismo extremo, por tus consejos, por tu empatía, por todas las aventuras que hemos vivido, por hacerme tan feliz, por ser tú, única.

A **Mari**, la persona responsable de ser quien soy. Con la que he crecido, con la que he aprendido, con la que he viajado. Gracias por compartir conmigo las carcajadas, los miedos y los triunfos.

A mi **Tita Mari**, mi segunda madre. Me has enseñado importantes lecciones de vida. Gracias por todo el cariño, por cuidarme y por apoyarme siempre. Gracias por la tradición “sábados de arroz”, que nos permiten reunirnos como **familia**. Gracias a todos por vuestra alegría, consejos y cariño.

A mi hermana **Pina**. Me has apoyado y has confiado en mí **siempre**. Gracias por cuidarme, por ser hermana y amiga, por todo lo que he aprendido de ti y por todo lo que seguiré aprendiendo. A mi padre **Antonio**, gracias por todo lo que me has enseñado, por ayudarme, por inspirarme, por permitirme cumplir mis sueños y por hacerme reír. A mi madre **Pina**, luchadora, alegre, buena, entregada a los demás. No dejes de ser quien porque todos te necesitamos. Gracias por confiar en mí y apoyarme en cada paso. Todo lo que he conseguido ha sido gracias a ti, te quiero.

Y, por supuesto, a **Antonio**. Tú has apostado y luchado por esta tesis tanto como yo. Gracias por ser mi apoyo incondicional, por tu cariño, por tu confianza y por tu buen corazón. Contigo cada día es una alegría y una aventura. Gracias por hacerme feliz y por recorrer el mundo conmigo.

RESUMEN

La desregulación en la expresión de receptores de angiotensina puede mediar procesos de neuroinflamación, promoviendo así, neurodegeneración dopaminérgica. Esta desregulación puede verse afectada por eventos patológicos de inflamación periférica crónica (como el envejecimiento o síndrome metabólico) y aguda (como la infección por SARS-CoV-2). El uso de tratamientos moduladores de los componentes y receptores del Sistema Renina-Angiotensina (SRA) pueden mediar, por tanto, mecanismos neuroprotectores y anti-inflamatorios.

El objetivo principal de la presente tesis doctoral se centra en el estudio de los receptores de angiotensina en la neuroinflamación e inflamación periférica, así como su implicación en la neurodegeneración dopaminérgica. Los resultados obtenidos muestran la implicación del receptor AT1 cerebral en la neuroinflamación y muerte neuronal dopaminérgica en un modelo animal de enfermedad de Parkinson (EP) inducido por la sobreexpresión de la proteína α -sinucleína. Además, se observó un efecto neuroprotector de los antagonistas del receptor AT1 mediante la inhibición de la respuesta inflamatoria microglial en el modelo animal de EP. Las respuestas inflamatorias de las células microgliales están mediadas por la expresión de receptores de angiotensina. En condiciones basales, los receptores AT2 regulan a la baja la expresión de los receptores del eje pro-inflamatorio del SRA (receptores AT1) en células microgliales. Sin embargo, en condiciones de inflamación periférica crónica (envejecimiento) y aguda (LPS), se reduce la expresión de receptores AT2, lo que conduce a un incremento en la expresión de los receptores AT1, promoviendo así fenómenos de neuroinflamación, que pueden ser revertidos mediante el empleo de antagonistas del receptor AT1. Además, la microglía de ratones hembra presenta mayor expresión del receptor AT2 que la microglía de machos, independientemente de las hormonas femeninas circulantes.

La inflamación periférica crónica con la que cursa el síndrome metabólico, o la administración crónica de autoanticuerpos agonistas del receptor AT1 (AT1-AA), provocan un aumento en la expresión de

los receptores del eje pro-inflamatorio del SRA cerebral y una disminución en los receptores del eje anti-inflamatorio, así como un incremento de la muerte neuronal dopaminérgica y de la respuesta inflamatoria microglial en modelos animales de EP, que son revertidos por el tratamiento con el antagonista del receptor AT1, candesartán.

Finalmente, en la inflamación periférica aguda desencadenada por COVID-19, también está implicado el SRA. El enzima ECA2 se identificó como el receptor funcional de entrada para el virus SARS-CoV-2. Dada la importancia del SRA en la inflamación periférica, se generó entonces un debate sobre el uso, perjudicial o beneficioso, de tratamientos que modulan el SRA y sus receptores, sobretodo en pacientes de mayor vulnerabilidad a la gravedad por COVID-19 (envejecimiento y síndrome metabólico). Nuestros resultados sugieren que el tratamiento con bloqueantes del receptor AT1 (candesartán), con inhibidores del enzima ECA (captopril) o con moduladores indirectos de los receptores del SRA (ibuprofeno) aumenta la expresión de los receptores del eje anti-inflamatorio del SRA (AT2 y Mas) y del enzima ECA2 a nivel pulmonar, efecto particularmente pronunciado en los modelos que cursan con inflamación periférica crónica (envejecimiento y síndrome metabólico). Este incremento en la expresión de ECA2 se confirmó a nivel celular en cultivos de neumocitos humanos de tipo II. Se comprobó, además, que la posible regulación positiva de la entrada viral a través del aumento de expresión de ECA2 transmembrana inducido por tratamientos moduladores del SRA es contrarrestada por mecanismos adicionales de los tratamientos mencionados, particularmente por la inhibición de la actividad de proteasas implicadas en la entrada celular de SARS-CoV-2 (ADAM17 y TMPRSS2).

ABSTRACT

Dysregulation of angiotensin receptor expression can mediate neuroinflammation processes, thus promoting dopaminergic neurodegeneration. This dysregulation can be affected by pathological events such as chronic peripheral inflammation (aging or Metabolic Syndrome) and acute inflammation (SARS-CoV-2 infection). Therefore, the use of modulating treatments of the Renin-Angiotensin System (RAS) receptors can mediate neuroprotective and anti-inflammatory mechanisms.

The role of angiotensin receptors in neuroinflammation and peripheral inflammation, as well as their involvement in dopaminergic neurodegeneration, has been studied in this doctoral thesis. The results obtained demonstrate the role of brain AT1 receptor in neuroinflammation and dopaminergic neuronal death in an animal model of Parkinson's disease (PD) induced by overexpression of α -synuclein protein. In addition, neuroprotective effect of AT1 receptor antagonists by inhibition of microglial inflammatory response was observed in PD animal model. Inflammatory responses of microglial cells are mediated by angiotensin receptor expression. In basal conditions, AT2 receptors downregulate the expression of RAS pro-inflammatory receptors in microglial cells. However, in chronic (aging) and acute (LPS) peripheral inflammation, the expression of AT2 receptors is reduced, which leads to an increase in the expression of AT1 receptors, thus promoting neuroinflammation processes that can be reversed by AT1 receptor antagonists. In addition, microglia from female mice exhibits higher expression of the AT2 receptor than microglia from males, independent of circulating female hormones.

Chronic peripheral inflammation associated with the metabolic syndrome, or chronic administration of AT1 receptor agonistic autoantibodies (AT1-AA), cause an increase in pro-inflammatory receptor expression and a decrease in anti-inflammatory receptor expression of brain RAS. Additionally, both chronic peripheral inflammation models increase dopaminergic neuronal death and microglial inflammatory response in animal models of PD, which are

reversed by the treatment with the AT1 receptor antagonist, candesartan.

Finally, RAS is also implicated in the acute peripheral inflammation triggered by COVID-19. The ACE2 enzyme was identified as the functional entry receptor for the SARS-CoV-2 virus. Therefore, a major question was generated about whether the use of modulating treatments of RAS receptors was harmful or beneficial, especially in patients vulnerable to severe COVID-19 (aging and metabolic syndrome). The results suggest that treatment with AT1 receptor antagonists (candesartan), with ACE enzyme inhibitors (captopril) or with indirect modulators of the RAS receptors (ibuprofen) increases the expression of RAS anti-inflammatory receptors (AT2 and Mas) and ACE2 enzyme at the pulmonary level. This effect was particularly pronounced in chronic peripheral inflammation models (aging and metabolic syndrome). The increase in ACE2 expression was confirmed at the cellular level in type II human pneumocyte cultures. Furthermore, possible up-regulation of viral entry by the increase in expression of transmembrane ACE2 induced by RAS modulating treatments is counteracted by additional mechanisms, particularly by treatments-induced inhibition of activity of proteases involved in the viral entry of SARS-CoV-2 (ADAM17 and TMPRSS2).

ARTÍCULOS DERIVADOS DE LA TESIS

Pedrosa MA, Labandeira CM, Valenzuela R, Quijano A, Sanchez-Andrade M, Suarez-Quintanilla JA, Lanciego JL, Labandeira-Garcia JL, Rodriguez-Perez AI. AT1 receptor autoantibodies mediate effects of Metabolic syndrome on dopaminergic vulnerability. 2022. *Brain, Behaviour, and Immunity*, en primera revisión. IF(2021): **19,227; Q1**.

Garrido-Gil P*, **Pedrosa MA***, Garcia-Garrote M, Pequeño-Valtierra A, Rodriguez-Castro J, Garcia-Souto D, Rodriguez-Perez AI, Labandeira-Garcia JL. Microglial angiotensin type 2 receptors mediate sex-specific expression of inflammatory cytokines independently of circulating estrogen. 2022 ***Garrido-Gil P y Pedrosa MA contribuyeron igualmente a este trabajo.** *Glia*: 1-33. DOI: 10.1002/glia.24255. IF(2021): **8,073; Q1**.

Valenzuela R*, **Pedrosa MA***, Garrido-Gil P, Labandeira CM, Navarro G, Franco R, Rodriguez-Perez AI, Labandeira-Garcia JL. Interactions between ibuprofen, ACE2, renin-angiotensin system, and spike protein in the lung. Implications for COVID-19. 2021 ***Valenzuela R y Pedrosa MA contribuyeron igualmente a este trabajo.** *Clinical and Translational Medicine*: 4-11, pp. e371. DOI: 10.1002/CTM2.371. IF(2021): **8,554; Q1**.

Pedrosa MA, Valenzuela R, Garrido-Gil P, Labandeira CM, Navarro G, Franco R, Labandeira-Garcia JL, Rodriguez-Perez AI. Experimental data using candesartan and captopril indicate no double-edged sword effect in COVID-19. 2021. *Clinical Science*: 135-3, pp. 465-481. DOI: 10.1042/CS20201511. IF(2021): **6,876; Q1**.

Rodriguez-Perez AI, Garrido-Gil P, **Pedrosa MA**, Garcia-Garrote M, Valenzuela R, Navarro G, Franco R, Labandeira-Garcia JL. Angiotensin type 2 receptors: Role in aging and neuroinflammation in the substantia nigra. 2020. *Brain, Behaviour and Immunity*: 87, pp. 256-271. DOI: 10.1016/j.bbi.2019.12.011. IF(2020): **7,217; Q1**.

Rodriguez-Perez AI, Sucunza D, **Pedrosa MA**, Garrido-Gil P, Kulisevsky J, Lanciego JL, Labandeira-Garcia JL. Angiotensin Type 1 Receptor Antagonists Protect Against Alpha-Synuclein-Induced Neuroinflammation and Dopaminergic Neuron Death. 2018. *Neurotherapeutics*: 4 pp. 1063-1081. DOI: 10.1007/s13311-018-0646-z. IF(2018): **5,552; Q1**.

OTRAS PUBLICACIONES REALIZADAS DURANTE EL PERÍODO DE TESIS

Labandeira CM, **Pedrosa MA**, Quijano A, Valenzuela R, Garrido-Gil P, Sanchez-Andrade M, Suarez-Quintanilla JA, Rodriguez-Perez AI, Labandeira-Garcia JL. Angiotensin type-1 receptor and ACE2 autoantibodies in Parkinson's disease. 2022. *Npj Parkinson's disease*: 8:76. DOI: 10.1038/s41531-022-00340-9. IF (2021): **9,304; Q1**.

Labandeira CM, **Pedrosa MA**, Suarez-Quintanilla JA, Cortes-Ayaso M, Labandeira-Garcia JL, Rodriguez-Perez AI. Angiotensin system autoantibodies correlate with routine prognostic indicators for COVID-19 severity. 2022. *Frontiers in Medicine*: 9, 840662. DOI: 10.3389/fmed.2022.840662. IF (2020): 5,093, Q1 / IF (2021): **5,058; Q2**.

Labandeira-Garcia JL, Labandeira CM, Valenzuela R, **Pedrosa MA**, Quijano A, Rodriguez-Perez AI. Drugs modulating Renin-Angiotensin System in COVID-19 treatment. 2022. *Biomedicines*: 10, 502. DOI: 10.3390/biomedicines10020502. IF (2020): 6,081; Q1 / IF (2021): **4,757; Q2**.

Rodriguez-Perez AI, Labandeira CM, **Pedrosa MA**, Valenzuela R, Suarez-Quintanilla JA, Cortes-Ayaso M, Mayán-Conesa P, Labandeira-Garcia JL. Autoantibodies Against ACE2 and angiotensin type-1 receptor autoantibodies increase severity of COVID-19. 2021. *Journal of Autoimmunity*: 122:102683. DOI: 10.1016/j.jaut.2021.102683. IF(2021): **14,511; Q1**.

Labandeira-Garcia JL, Garrido-Gil P, **Pedrosa MA**, Labandeira CM, Rodriguez-Perez AI. Chapter 29: Interaction between brain angiotensin and dopaminergic systems and Parkinson's disease. 2020. *Genetics, Neurobiology, Behaviour, and Diet in Parkinson's Disease. The Neuroscience of Parkinson's Disease*: 2, pp. 463-271. Elsevier. Editores: Martin C y Preedy VR. DOI: <https://doi.org/10.1016/C2017-0-03836-3>.

ABREVIATURAS

27-OHC: 27-hidroxicolesterol

6-OHDA: 6-hidroxidopamina

α -syn: α -sinucleína

AA: autoanticuerpo

AAV: vector viral adenoasociado, del inglés *Adeno-associated virus*

AAV9: vector viral adenoasociado tipo 9, del inglés *Adeno-associated virus 9*

ACE2-AA: autoanticuerpos frente al enzima ECA2

ADAM17: dominio 17 de la desintegrina y metalopeptidasa

ADN: ácido desoxirribonucleico

Ang I: angiotensina I

Ang II: angiotensina II

AINE: anti-inflamatorio no esteroideo

ANG: angiotensinógeno

Ang(1-7): angiotensina 1-7

Ang III: angiotensina III

Ang IV: angiotensina IV

ANOVA: análisis de la varianza, del inglés *analysis of variance*

ARAI: antagonista / bloqueante del receptor AT1

ARG-1: arginasa 1

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

AT1: receptor de angiotensina tipo 1

AT1-AA: autoanticuerpos agonistas del receptor AT1

AT2: receptor de angiotensina tipo 2

AT2KO: silenciamiento génico, del inglés *Knock-Out*, para el receptor AT2

AT4: receptor de angiotensina tipo 4

ATP: adenosín trifosfato

AUC: área bajo la curva, del inglés *area under curve*

BDNF: factor neurotrófico derivado del cerebro, del inglés *brain-derived neurotrophic factor*

BHE: barrera hematoencefálica

BSA: proteína seroalbúmina bovina, del inglés *bovine serum albumin*

CCL-2: ligando de quimiocina 2, del inglés *chemokine (C-C motif) ligand 2*

GMPc: guanosín monofosfato cíclico

C21: compuesto 21

CAND: candesartán

CAPT: captopril

CD68: cluster de diferenciación 68

CG: CGP-42112

COVID-19: coronavirus 2019

COX: citocromo C oxidasa

COX-2: ciclooxigenasa tipo 2

COX IV: complejo IV de la cadena respiratoria mitocondrial

Ct: ciclo comparativo, del inglés *cycle threshold*.

D1: receptores de dopamina tipo I

D2: receptores de dopamina tipo II

DA: dopamina

DAB: 3,3'-diaminobezidina

Dnp: 2,4-dinitrofenilo, del inglés *2,4-dinitrophenyl*

DOPAC: ácido 3,4-dihidroxiifenilacético, del inglés *3,4 - dihydroxyphenylacetic acid*

EA: enfermedad de Alzheimer

ECA: enzima convertora de angiotensina

ECA2: enzima convertora de angiotensina II

ELISA: ensayo inmunoenzimático, del inglés *enzyme-linked immunosorbent assay*

EP: enfermedad de Parkinson

ERK: quinasa regulada por señales extracelulares, del inglés *extracellular signal-regulated kinase*

FBS: suero fetal bovino

FRET: transferencia de energía por resonancia de fluorescencia

GBA: glucocerebrosidasa

GDNF: factor neurotrófico derivado de la glía, del inglés *glial cell-derived neurotrophic factor*

GFAP: proteína ácida fibrilar glial, del inglés *anti-glia fibrillary acidic protein*

GFAP-ir: inmunorreactiva para GFAP

GFP: proteína verde fluorescente

GTP: guanosín trifosfato

GRKs: receptores quinasas acoplados a proteína G, del inglés *G protein-coupled receptor kinase*

HFD: dieta alta en grasa, del inglés *High fat diet*

HPLC: cromatografía líquida de alto rendimiento, del inglés *high performance liquid chromatography*

HRP: peroxidasa de rábano, del inglés *horseradish peroxidase*

HVA: ácido homovanílico

Iba-1: molécula adaptadora de unión a calcio ionizado 1, del inglés *Ionized calcium binding adaptor molecule 1*

Iba-1-ir: inmunorreactiva para Iba-1

IBUP: ibuprofeno

IGF-1: factor de crecimiento insulínico tipo 1

IgG: inmunoglobulina de tipo G

IECA: inhibidor del enzima convertora de angiotensina

IFN- γ : interferón γ

IL-1 β : interleucina 1 β

IL-4: interleucina 4

IL-6: interleucina 6

IL-10: interleucina 10

IL-13: interleucina 13

IL-17: interleucina 17

iNOS: óxido nítrico sintasa inducible

IP3: inositol trifosfato

DAG: diacilglicerol

PKC: proteína quinasa C

JAK: quinasa Janus

KO: silenciamiento, del inglés *knock out*

KPBS: PBS potásico

L-Arg: L-arginina

LCR: líquido cefalorraquídeo

L-DOPA: L-3,4-dihroxifenilalanina

L-NAME: N ω -Nitro-L-arginina metil éster clorhidrato

LPS: lipopolisacárido

LRKK2: quinasa de repetición 2, del inglés *leucine rich repeat kinase 2*

LV: lentivirus

MAPK: proteína quinasa activada por mitógeno

MetS: Síndrome Metabólico del inglés *Metabolic Syndrome*

Mca: acetilo de 7-Metoxicumarina-4-il, del inglés *7-Methoxycoumarin-4-yl acetyl*

MHCII: complejo mayor de histocompatibilidad tipo 2

MMA: Mitramicina A

MMLV: transcriptasa inversa, del inglés *Moloney Murine Leukemia Virus reverse transcriptase*

MPTP: 1-metil-4-fenil-1,2,3,6 tetrahidropiridina

MrgD: receptor acoplado a proteína G relacionado con Mas

NF- κ B: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

NO: óxido nítrico, del inglés *nitric oxide*

NOS: óxido nítrico sintetasa, del inglés *nitric oxide synthetase*

NOX: nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato-oxidasas

OCT: compuesto de temperatura de corte óptima, del inglés *optimal cutting temperature compound*

OD: densidad óptica, del inglés *optical density*

ODQ: 1H-[1,2,4]-oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one

OVX: ovariectomía

OX-6: MHC de clase II

PBS: buffer fosfato salino

PINK-1: quinasa 1 inducida por PTEN, del inglés *PTEN-induced kinase 1*

PKC: proteína quinasa C

PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonido, del inglés *phenylmethylsulfonyl fluoride*

PPAR- γ : receptor gamma activado por proliferador de peroxisoma

PRR: receptor de (pro)renina

Q-PCR: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa, del inglés *quantitative polymerase chain reaction*

RBD: dominio de unión al receptor, del inglés *receptor binding domain*

ROCK: rho quinasa

ROS: especies reactivas de oxígeno, del inglés *reactive oxygen species*

RT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa, del

inglés *reverse transcriptase polymerase chain reaction*

SARS-CoV-2: coronavirus de tipo 2 causante del síndrome respiratorio agudo severo 2

SEM: error estándar de la media, del inglés *standard Error of the Mean*

SIRT1: sirtuina tipo 1

SIRT3: sirtuina tipo 3

SNC: sistema nervioso central

SNpc / SN: sustancia negra pars compacta

SNpr: sustancia negra pars reticulada

SO: superóxido

SRA: Sistema Renina-Angiotensina

ST: núcleo estriado

TELM: telmisartán

TG2: transglutaminasa 2

TGF- β : factor de crecimiento transformador de tipo β

TH: tiroxina hidroxilasa

TH-ir: inmunorreactiva para TH

TLR4: receptor toll like tipo 4

TMPRSS2: proteasa transmembrana serina 2, del inglés *transmembrane protease serine 2*

TNF- α : factor de necrosis tumoral

TNFSF14/LIGHT: miembro 14 de la superfamilia del factor de necrosis tumoral

VEGF: factor de crecimiento vascular endotelial

WB: *Western Blot*

WT: forma salvaje, del inglés *wild type*

UFR: unidad de fluorescencia relativa

ZD: ZD-7155

1. INTRODUCCIÓN

1.1.SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA. RECEPTORES.

El Sistema Renina-Angiotensina (SRA) se conoce clásicamente como un sistema hormonal circulante encargado de regular la presión arterial y la homeostasis del sodio y el agua. El precursor inicial de este sistema es el Angiotensinógeno (ANG), el cual se transforma en Angiotensina I (Ang I), un péptido inactivo, por acción del enzima Renina. La Ang I puede transformarse, a través de la acción del enzima conversora de angiotensina (ECA), en Angiotensina II (Ang II), la cual se considera el péptido efector más importante del SRA (Sparks *et al.*, 2014). La Ang II actúa a través de dos receptores principales: el receptor de angiotensina tipo 1 (AT1) y el receptor de angiotensina tipo 2 (AT2) (Unger *et al.*, 1996).

Además, se han observado nuevos componentes y receptores del SRA como el enzima conversora de angiotensina II (ECA2) y nuevos péptidos como Angiotensina (1-7) (Ang(1-7)), Angiotensina III (Ang III) y Angiotensina IV (Ang IV) en diferentes células y tejidos. También se ha identificado un receptor específico para el enzima renina y su precursor pro-renina, el receptor PRR, que desencadena su propia vía de señalización (Figura 1) (Nguyen, 2010).

La síntesis y función de los diferentes componentes del SRA se describen a continuación:

-Renina: es una proteasa que cataliza la escisión del extremo N-terminal del ANG para formar Ang I. La principal fuente de renina en la circulación es el riñón, donde su expresión y secreción se encuentran reguladas por cambios en la presión arterial y el equilibrio de sal (Lorenz *et al.*, 1993; Bell *et al.*, 2003). La cantidad de renina presente

en el torrente sanguíneo es la que limita los niveles de Ang II y, por lo tanto, la actividad del SRA (Sparks *et al.*, 2014).

-ECA: es una peptidasa que cataliza la escisión del extremo C-terminal del precursor inactivo Ang I para formar Ang II. Su expresión es testicular y somática, siendo ésta última abundante en la superficie de células endoteliales de todo el cuerpo, principalmente pulmón, intestino, plexo coroideo, placenta y riñón. Además, existe una forma soluble en plasma formada por la escisión de su dominio transmembrana (Beldent *et al.*, 1993).

-Ang II: es un péptido vasoactivo que, clásicamente, regula la presión arterial. Las acciones biológicas de Ang II están mediadas por receptores de la superficie celular que pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteína G de siete hélices transmembrana (Sparks *et al.*, 2014). Los dos receptores principales de Ang II son:

-Receptores AT1: los estudios sugieren que la mayoría de las funciones clásicamente reconocidas del SRA están mediadas por los receptores AT1. En ratón (Sasamura *et al.*, 1992) y rata (Iwai e Inagami, 1992), se han identificado dos subtipos de este receptor, denominados AT1a y AT1b; ambos comparten el 95% de la secuencia aminoacídica, sin embargo, difieren en su distribución, localización cromosómica y regulación transcripcional. No se ha confirmado la existencia de AT1b en humanos, siendo el AT1a murino el homólogo más cercano (Sparks *et al.*, 2014).

La Ang II se une al receptor AT1, activando la vía de señalización mediada por fosfolipasa C que provoca la hidrólisis del fosfatidilinositol bifosfato formando inositol trifosfato (IP3), el cual provoca la liberación de Ca^{++} de los depósitos intracelulares, y diacilglicerol (DAG), el cual activa la proteína quinasa C (PKC). Además, la acción de este receptor se ha relacionado con otras vías de señalización como la quinasa Janus (JAK), la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK) y la quinasa regulada por señales extracelulares (ERK), así como con vías dependientes de β -arrestina

(Herichova y Szantoova, 2013; Forrester *et al.*, 2018). Estas rutas moleculares tienen un efecto directo en la promoción del crecimiento en miocitos cardíacos, fibroblastos y células de músculo liso vascular, que causa remodelación cardiovascular. Además, otro mecanismo importante mediado por el eje Ang II/AT1 es la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés *Reactive Oxygen Species*) mediante el aumento de expresión y de activación del enzima nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa (NOX / NADPH-oxidasa), cuyo efecto da lugar a diversos procesos fisiopatológicos, que incluyen vasoconstricción, fibrosis, aumento de la absorción renal de sodio, liberación de aldosterona y arginina vasopresina e inflamación (Herichova y Szantoova, 2013; de Morais *et al.*, 2018).

Sin embargo, la función de los receptores AT1 es más compleja. Los receptores pueden formar homodímeros y heterodímeros provocando cambios importantes en sus efectos fisiológicos. Así, se ha demostrado la formación de dímeros con el receptor AT2, con el receptor de endotelina B, con el receptor Mas, con adrenoceptores tipo B1 y B2 y con bradiquina B2 entre otros (Forrester *et al.*, 2018).

-Receptores AT2: estos receptores se expresan en gran cantidad durante el desarrollo fetal (Sparks *et al.*, 2014) y sus niveles de expresión pueden ser modulados por Ang II y ciertos factores de crecimiento (Ichiki *et al.*, 1995). Asimismo, se ha sugerido que su expresión puede incrementarse en estados patológicos, ya que se ha observado su implicación en la modulación de la proliferación y diferenciación celular (Rodríguez-Pallares *et al.*, 2004) y procesos de regeneración y apoptosis (Labandeira-García *et al.*, 2011).

Los mecanismos de señalización del receptor AT2 aún son especulativos en comparación con los descritos para el receptor AT1. Los receptores AT2 parecen emitir señales mediante el acoplamiento a las proteínas G α 2 y G α 3, y están relacionadas con la activación de fosfatasa para MAPK y ERK. Además, se

ha sugerido que la activación de estos receptores estimula la producción de bradicinina, óxido nítrico (NO, del inglés *nitric oxide*) y guanosín monofosfato cíclico (GMPc), promoviendo la natriuresis y la disminución de la presión arterial en el sistema cardiovascular. De esta manera, la estimulación del receptor AT2 contrarresta la constricción inducida por el receptor AT1 en la vasculatura (Sparks *et al.*, 2014; Forrester *et al.*, 2018).

-Nuevos componentes del SRA: la Ang II se considera el efector más importante del SRA, pero actualmente se conoce que no es el único componente bioactivo.

La Angiotensina (1-12) es un péptido presente en plasma, corazón, riñón y otros tejidos. Se forma a partir del ANG por una escisión independiente de renina, y actúa como precursor de la formación de Ang II (Ferrario *et al.*, 2019); La Ang III es un péptido formado a partir de Ang II por la acción de la aminopeptidasa A (Yugandhar y Clark, 2013). La Angiotensina A es otro péptido derivado de Ang II y que solo se diferencia de ésta en el primer aminoácido de su secuencia (Coutinho *et al.*, 2014). Estos tres tipos de angiotensinas tienen acciones muy similares a la Ang II, por lo que causan vasoconstricción y proliferación de células de músculo liso mediante la activación del receptor AT1 (Hussain y Awan, 2018). A nivel periférico, Ang III induce natriuresis y diuresis al actuar sobre el receptor AT2 (Kemp *et al.*, 2019).

Otros péptidos como Ang IV, Ang(1-7), Angiotensina (1-9) y alamandina ejercen efectos protectores, opuestos a los demostrados por la Ang II/AT1. La Ang(1-7) se puede formar a partir de varias vías. Una de ellas es a partir de la Ang II por acción del enzima ECA2 (Santos *et al.*, 2018). Ang(1-7) actúa sobre el receptor Mas (MasR) en varios tejidos, participando en procesos fisiológicos y patológicos como el reclutamiento e inflamación de leucocitos, remodelación cardíaca, función renal y alteración vascular (Chappell, 2007; Simoes e Silva *et al.*, 2013). Además, algunos estudios recientes sugieren que la Ang(1-7) puede promover su señalización a través de otros receptores como el receptor acoplado a proteína G relacionado con Mas (MrgD), promoviendo la producción de ácido araquidónico (Karnik *et al.*, 2017). MrgD también funciona como receptor de alamandina, estimulando la

producción de NO participando en respuestas anti-hipertensivas (Lautner *et al.*, 2013).

De forma general, ECA2 es un enzima que regula negativamente la función sistémica del SRA. Además de la generación de Ang(1-7), ECA2 limita la producción de Ang II y puede actuar sobre otros péptidos vasoactivos con funciones importantes en la regulación de la presión arterial (Kuba *et al.*, 2013). Recientemente, el ECA2 ha cobrado mucha atención, ya que este enzima es el receptor funcional del virus que provoca el síndrome respiratorio agudo severo del coronavirus 2 (SARS-CoV-2), el agente etiológico de la enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19; Zhu *et al.*, 2020); por lo que su regulación se ha relacionado con la función pulmonar, cerebral, cardiovascular y renal.

Actualmente, y teniendo en cuenta todos los componentes y receptores, el SRA se define como un sistema constituido por dos brazos de acción opuesta (Figura 1). El brazo presor está compuesto por el eje Ang II/AT1, que media los efectos vasoconstrictor, proliferativo, hipertensivo, oxidativo, proinflamatorio y profibrótico del SRA (Labandeira *et al.*, 2017, 2021). El brazo depresor está compuesto principalmente por el eje Ang(1-7)/MasR que actúa como mediador de los efectos depresores, vasodilatadores, antiproliferativos, antioxidantes, anti-inflamatorios y antifibróticos, y por el eje Ang II/AT2, que se opone a los efectos mediados por la activación del receptor AT1 (Labandeira *et al.*, 2017, 2021; Santos *et al.*, 2019). Ambos ejes funcionan de forma conjunta, de manera que el equilibrio en la expresión de los diferentes componentes y receptores garantiza el correcto funcionamiento del SRA. La alteración de la expresión de cualquiera de los componentes provoca un desequilibrio del SRA que se ha relacionado con gran diversidad de eventos patológicos (Labandeira-Garcia *et al.*, 2011, 2013, 2017, 2021).

Además del SRA humoral o sistémico, se ha demostrado la existencia de un **SRA local o tisular** que presenta una regulación independiente del sistémico (Sigmund *et al.*, 2017). Los componentes del SRA tisular se han demostrado en diferentes tejidos y órganos, como corazón, riñón, pulmón, hígado, retina y cerebro (Marshall, 2003; Ola *et al.*, 2013; Labandeira-Garcia *et al.*, 2017; Sigmund *et al.*, 2017). El SRA local

regula la supervivencia y diferenciación celular, así como los procesos inflamatorios a nivel celular y, por tanto, específicos de tejido. Así, los tratamientos moduladores del SRA, como los antagonistas del receptor AT1 (ARAII), empleados en la práctica clínica habitual como anti-hipertensivos, pueden desencadenar efectos específicos de tejidos, más allá de su efecto sistémico sobre la presión arterial y otros eventos cardiovasculares (Zaman *et al.*, 2002). En los últimos años, se ha destacado la importancia de estudiar los posibles efectos protectores y anti-inflamatorios en tejidos específicos, como pueden ser a nivel cerebral (Labandeira-Garcia *et al.*, 2021) o pulmonar (Tan *et al.*, 2018).

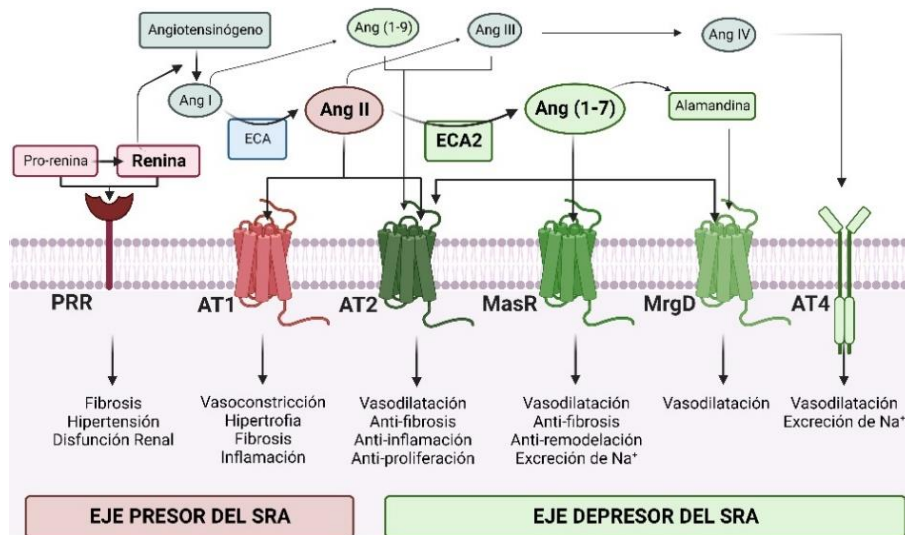


Figura 1. Esquema de los principales péptidos, enzimas y receptores identificados en la señalización del Sistema Renina-Angiotensina (SRA). La Pro-renina y la Renina se unen al receptor PRR mientras que la Angiotensina I (Ang I) es escindida por el enzima convertidor de angiotensina (ECA) y da lugar a la Angiotensina II (Ang II), que puede estimular los receptores de angiotensina tipo 1 (AT1), formándose el eje presor del SRA. Por otro lado, en el eje depresor del SRA, la Ang II también puede estimular los receptores de angiotensina tipo 2 (AT2), Ang I puede ser escindido a Ang (1-9) y actuar sobre los receptores AT2. Además, Ang II puede convertirse en Ang(1-7) mediante la acción del enzima convertidor de angiotensina II (ECA2) o en Ang III mediante la acción de una aminopeptidasa. Se ha demostrado que la Ang(1-7) se une a los receptores AT2, Mas y MrgD, además puede formar alamandina que es un ligando para el receptor MrgD. La Ang III se puede unir tanto a los receptores AT1 como a los AT2, y se puede escindir formando Ang IV que se une principalmente al receptor de angiotensina tipo 4 (AT4). Esquema de elaboración propia con www.biorender.com

1.1.1. Tratamientos moduladores del SRA y sus receptores

Los principales tratamientos que modulan el SRA y sus receptores se centran en bloquear los componentes del brazo presor del sistema, como son los inhibidores de ECA (IECAs) y los antagonistas o bloqueantes del receptor AT1 (ARAI). Estos fármacos presentan una gran importancia en el tratamiento de la hipertensión, así como en la insuficiencia y remodelación cardíaca posteriores al infarto de miocardio (Zaman *et al.*, 2002).

Los principales tratamientos que regulan la expresión y actividad del SRA y sus receptores son:

-IECAs: se han desarrollado diferentes tipos para uso clínico, entre los que se encuentran el benazepril, captopril, enalapril, fosinopril, entre los más utilizados. Todos ellos tienen el mismo efecto farmacológico, es decir, actúan uniéndose al sitio activo de ECA e interfieren en la capacidad del enzima para unirse y escindir sus sustratos, como la Ang I, disminuyendo, por tanto, la fuente de síntesis de Ang II. Los diferentes fármacos difieren en la duración de la inhibición de ECA, en la absorción, vida media y disponibilidad metabólica (Zaman *et al.*, 2002).

En su administración crónica, se ha observado que los IECAs no inhiben completamente la generación de Ang II, fenómeno conocido como escape de Ang II, a pesar de que se mantiene su efecto anti-hipertensivo. Los mecanismos que subyacen a este evento aún no han sido descritos, pero se ha sugerido un aumento de la transcripción de ECA, así como un aumento de su actividad catalítica en células endoteliales tras el tratamiento crónico de un IECA (King y Oparil, 1992). Así mismo, el efecto protector de los IECAs puede verse aumentado por la bradiquinina. ECA cataliza la hidrólisis de bradiquinina en productos biológicamente activos, por lo que sus inhibidores conducen a la acumulación de bradiquinina la cual estimula la liberación de prostaglandinas vasodilatadoras y de NO, con efectos antioxidantes y anti-hipertensivos (Zaman *et al.*, 2002).

-ARAII: son los tratamientos anti-hipertensivos más utilizados en hipertensión y trastornos cardiovasculares. Son altamente efectivos y bien tolerados por los pacientes. Se han desarrollado diferentes tipos entre los que se encuentran el losartán, valsartán, irbesartan, candesartán, telmisartán, entre los más utilizados. Todos ellos son compuestos no peptídicos que bloquean específicamente la unión de Ang II al receptor AT1 ocupando el espacio entre las siete hélices transmembrana del receptor, y sin actuar sobre los receptores AT2 (Zaman *et al.*, 2002).

Además, muchos estudios han demostrado que los ARAII presentan dobles mecanismos con efectos importantes. Específicamente el telmisartán también funciona como agonista de los receptores activados por proliferadores peroxisomales tipo γ (PPAR- γ , del inglés *peroxisome proliferator-activated receptors γ*), los cuales se caracterizan por tener efectos anti-inflamatorios (Garrido-Gil *et al.*, 2012).

Por diversas razones, entre las que se encuentran la falta de biodisponibilidad oral, la variabilidad en la eficacia anti-hipertensiva y la eficacia terapéutica de los IECAs y ARAII, el desarrollo de tratamientos clínicos sobre otras dianas del SRA se ha visto reducido (Zaman *et al.*, 2002; Seva Pessoa *et al.*, 2013). Por ejemplo, los agonistas del receptor AT2, como el Compuesto 21 (C21) y el CGP-42112 (CG), han sido ampliamente estudiados. Sin embargo, el efecto protector de C21, disminuyendo mediadores pro-inflamatorios y activando la cascada NO/GMPc, se ha demostrado sólo en células renales (Verdonk *et al.*, 2012) mientras que, el compuesto CG sólo ha mediado efectos hipotensores al combinarse con tratamientos bloqueantes del receptor AT1 (Tanaka *et al.*, 1999). Los inhibidores de receptores Mas, como el A779, han demostrado el importante papel protector que presentan estos receptores (Zimpelmann y Burns, 2009).

1.2.SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA CEREBRAL

El Sistema Nervioso Central (SNC) se encuentra protegido por la barrera hematoencefálica (BHE) que evita el paso de la mayoría de los componentes circulantes del SRA sistémico. Sin embargo, se ha

comprobado la existencia de todos los componentes de este sistema dentro del cerebro, demostrándose la existencia de un SRA local cerebral (Labandeira-Garcia *et al.*, 2011, 2017, 2021; Jackson *et al.*, 2018). Así, los astrocitos son la principal fuente de síntesis de ANG; la renina se expresa en células neuronales (Grobe *et al.*, 2008), mientras que su receptor PRR se expresa en neuronas y microglía de regiones de regulación cardiovascular y en otras, como córtex y núcleos basales (Nguyen *et al.*, 2002; Valenzuela *et al.*, 2010; Garrido-Gil *et al.*, 2013, 2017); los receptores AT1 y AT2, se expresan en neuronas, astrocitos, oligodendrocitos y microglía de varias secciones del cerebro (Rodríguez-Pallares *et al.*, 2008; Joglar *et al.*, 2009; Garrido-Gil *et al.*, 2013, 2017). Los componentes y receptores del eje ECA2/Ang(1-7)/MasR también se expresa en células cerebrales (Jiang *et al.*, 2013; Costa-Besada *et al.*, 2018).

Además de su expresión en la membrana plasmática, los receptores del SRA se han encontrado a nivel intracelular, lo que sugiere la existencia de un tercer nivel del SRA, **intracelular o intracrino** (Garrido-Gil *et al.*, 2013; Labandeira-Garcia *et al.*, 2021). Específicamente, el SRA neuronal se ha visto implicado en el funcionamiento mitocondrial (Valenzuela *et al.*, 2016; Costa-Besada *et al.*, 2018), nuclear (Villar-Cheda *et al.*, 2017) y de vesículas neurosecretoras, (Grobe *et al.*, 2008).

De forma general, el SRA cerebral presenta un papel importante en la homeostasis cerebral actuando principalmente a través de los cuatro subtipos de receptores: AT1, AT2, MasR y AT4. Como ocurre en el SRA sistémico los receptores tienen efectos opuestos, constituyendo los dos ejes del SRA. La activación de los receptores AT1 por Ang II promueve la vasoconstricción, la proliferación, la inflamación y el estrés oxidativo y, junto con el receptor PRR, conforman el brazo pro-oxidativo y pro-inflamatorio del SRA. Por otro lado, la activación de los receptores AT2 por la Ang II y de MasR por Ang(1-7) contrarrestan los efectos del receptor AT1, mientras que la función del receptor AT4 todavía es objeto de estudio. Recientemente, se ha demostrado la existencia de un nuevo receptor mitocondrial relacionado con MasR, denominado MrgE en células neuronales y gliales. MrgE actúa como

receptor de Ang(1-7) y alamandina, y se encarga de la producción de NO (Valenzuela *et al.*, 2021). Todos estos receptores y componentes conforman el eje anti-oxidativo y anti-inflamatorio del SRA cerebral.

La desregulación de los dos ejes del SRA cerebral se ha asociado con el envejecimiento y con eventos patológicos como el estrés oxidativo excesivo, neuroinflamación, disfunción endotelial, respuesta inflamatoria microglial y alteraciones en la secreción de neurotransmisores (Labandeira *et al.*, 2011, 2013, 2016, 2017, 2021; Cosarderelioglu *et al.*, 2020). Todos estos mecanismos pueden conducir a la muerte neuronal y se encuentran relacionados con enfermedades neurodegenerativas (Figura 2). En los últimos años se ha destacado la importancia del SRA cerebral en la neuroinflamación y muerte neuronal que cursa en la enfermedad de Parkinson (EP).

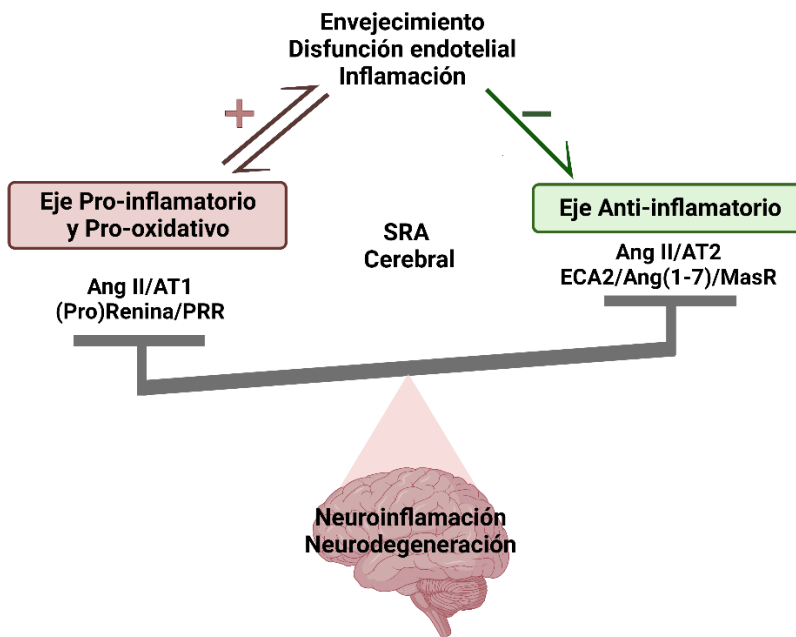


Figura 2: Representación esquemática de la desregulación de los dos ejes del Sistema Renina-Angiotensina (SRA) cerebral. Diferentes eventos patológicos (envejecimiento, disfunción endotelial, inflamación) promueven la hiperactivación del eje pro-inflamatorio y pro-oxidativo del SRA cerebral mediante Ang II (Angiotensina II) /AT1 (receptor de angiotensina tipo 1) y (Pro)renin-PRR (receptor de pro-renina). Así mismo, el eje pro-

inflamatorio potencia la progresión de las patologías estableciéndose una retroalimentación positiva en la desregulación de sistema. Además, los eventos patológicos inhiben el eje anti-inflamatorio del SRA cerebral mediante Ang II/AT2 (receptor de angiotensina tipo 2) y ECA2 (enzima convertidora de angiotensina II)/Angiotensina(1-7)/MasR. La desregulación del SRA conduce a eventos relacionados con la neuroinflamación y neurodegeneración. Esquema de realización propia con biorender.com

1.2.1. Enfermedad de Parkinson

La EP es la segunda enfermedad neurodegenerativa más frecuente, afectando aproximadamente a 6 millones de personas en todo el mundo (Armstrong y Okun, 2020). Los principales marcadores neuropatológicos de la EP son la pérdida del 50-70% de las neuronas dopaminérgicas localizadas en la *Sustancia Negra pars compacta* (SNpc), cuyos axones se proyectan a los núcleos basales, y las inclusiones citoplasmáticas que contienen agregados de la proteína α -sinucleína (α -syn), conocidas como cuerpos de Lewy (Poewe *et al.*, 2017). Así, los principales síntomas de la EP son provocados por estos dos eventos neuropatológicos:

-Neuronas dopaminérgicas de la SNpc: son las encargadas de sintetizar el neurotransmisor de dopamina (DA) y establecen conexiones con el núcleo estriado (ST), conformando la vía nigroestriatal, responsable de la regulación del circuito motor de los núcleos basales.

El funcionamiento de los núcleos basales se ha establecido por la regulación de dos circuitos, denominados vía directa e indirecta. En la vía directa, las proyecciones gabaérgicas del núcleo ST, se dirigen a la *Sustancia Negra pars reticulata* (SNpr) mesencefálica y al núcleo basal denominado Globo pálido interno, cuyas neuronas presentan receptores de DA tipo I (D1), excitadoras. En la vía indirecta, las proyecciones del ST se dirigen al núcleo basal denominado Globo Pálido externo y de éste se envían al núcleo subtalámico, cuyas neuronas presentan receptores de DA tipo II (D2), inhibitoras. La pérdida de neuronas dopaminérgicas que cursa en la EP, produce una reducción de la activación del ST, que conduce a una reducción de la actividad de los receptores D1 (vía directa) y a un aumento de la actividad de los receptores D2 (vía indirecta), lo que desemboca en una inhibición excesiva de las neuronas del tálamo motor y de la corteza, lo que

conduce a la manifestación de los principales síntomas físicos asociados con la EP: bradicinesia, rigidez, temblor en reposo e inestabilidad postural (Obeso *et al.*, 2008; Obeso y Lanciego, 2011; Calabresi *et al.*, 2014; Marino *et al.*, 2020).

-Agregados de α -syn: la función fisiológica de la proteína α -syn no ha sido completamente dilucidada, sin embargo, sí se ha descrito su papel en la dinámica de vesículas sinápticas, en la función mitocondrial y en el tráfico intracelular (Burre, 2015; Soldner *et al.*, 2016). El proceso patogénico comienza cuando los monómeros de α -syn solubles forman oligómeros, que posteriormente se combinan progresivamente formando pequeñas protofibrillas y, finalmente, grandes fibrillas insolubles que adquieren propiedades neurotóxicas (Kim y Lee, 2008; Melki, 2015). El mecanismo molecular que subyace en la neurotoxicidad de la α -syn insoluble todavía es poco conocido. Sin embargo, se ha sugerido que la respuesta inflamatoria microglial es un mecanismo importante de la toxicidad de la α -syn (Zhang *et al.*, 2017). Los desencadenantes subyacentes a la acumulación y agregación de α -syn pueden ser múltiples como, por ejemplo, una sobreproducción relativa de la proteína o la presencia de mutaciones que aumentan la probabilidad de su plegamiento incorrecto y oligomerización (como las mutaciones A53T y A30P), o deficiencias en las vías moleculares encargadas de su degradación (Poewe *et al.*, 2017). Todos estos agregados forman parte de los cuerpos de Lewy que se presentan en diferentes regiones cerebrales de pacientes con EP (Poewe *et al.*, 2017). Es importante señalar que muchas de estas regiones afectadas por los cuerpos de Lewy están estrechamente relacionadas con síntomas no motores asociados con la EP como son fatiga, depresión, disfunción olfatoria, constipación y discapacidad cognitiva (Hansen y Li, 2012; Marino *et al.*, 2020).

La causa de la degeneración de neuronas dopaminérgicas, así como la agregación de α -syn, no se conoce, pero se considera que la EP es una enfermedad multifactorial (Preux *et al.*, 2000), cuyos factores de riesgo pueden ser tanto genéticos como medioambientales. Aproximadamente el 90% de los casos de EP son idiopáticos, y su principal factor de riesgo es el envejecimiento. Por otro lado, el 10%

restante de los casos de EP son heredados y se han vinculado a diversas mutaciones en un pequeño número de proteínas, entre las que se encuentran GBA (glucocerebrosidasa), LRRK2 (quinasa de repetición 2, del inglés *leucine rich repeat kinase 2*), Parkin, α -syn, PINK-1 (quinasa 1 inducida por PTEN del inglés *PTEN-induced kinase 1*) y DJ-1. Sin embargo, aún no está claro cuál de estas alteraciones genéticas desempeña un papel clave en el origen de la muerte celular (Hansen y Li, 2012).

El origen multifactorial de EP establece numerosas vías que participan en la neurodegeneración dopaminérgica, a través de diferentes mecanismos patogénicos que no son mutuamente excluyentes (Olanow, 2007). Se ha descrito un gran número de mecanismos involucrados en el proceso de neurodegeneración dopaminérgica, incluyendo la proteostasis de α -syn, la disfunción mitocondrial, el aumento de estrés oxidativo, la neuroinflamación, la excitotoxicidad, las alteraciones en el sistema ubiquitina-proteosoma y diversos factores genéticos (Olanow, 2007; Poewe *et al.*, 2017; Boyd *et al.*, 2022). Es importante destacar que todos estos mecanismos implicados en la fisiopatología de EP se encuentran estrechamente relacionados entre sí. La homeostasis intracelular de la α -syn se mantiene fundamentalmente mediante las acciones de dos sistemas: el proteosoma de ubiquitina y enzimas lisosomales, y ambos se encuentran alterados con las principales mutaciones genéticas de la EP, GBA y LRRK2 (Poewe *et al.*, 2017; Sucunza *et al.*, 2021). Además, se ha demostrado la presencia de α -syn en el interior de la mitocondria, donde su acumulación conduce a disfunción mitocondrial y la consecuente generación de ROS, estableciendo un estado pro-oxidativo (Devi *et al.*, 2008). Así mismo, la disfunción mitocondrial y el aumento del estrés oxidativo pueden conducir al agotamiento lisosomal (Dehay *et al.*, 2010), reduciendo, así su actividad en la degradación de agregados proteicos de α -syn. Estos agregados proteicos provocan un aumento de la respuesta inflamatoria de las células microgliales, dando lugar a una secreción de citoquinas pro-inflamatorias como la ciclooxigenasa tipo 2 (COX-2), factor de necrosis tumoral (TNF- α), interleucina 1 β (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6) y NO (Qian y Flood, 2008; Roodveldt *et al.*, 2013; Labandeira-García *et al.*, 2017). Finalmente, la respuesta inflamatoria

microglial también se puede ver exacerbada por una acumulación de glutamato en el espacio extracelular, ya que las células microgliales son las encargadas de reabsorber y responder a dicho neurotransmisor (Iovino *et al.*, 2020). Todas las relaciones entre los diferentes eventos patológicos provocan mecanismos en cascada que sufren retroalimentación positiva, por lo que sus efectos se suman a lo largo del tiempo provocando una aceleración de la progresión de la EP. Además, el equilibrio de estas rutas fisiológicas se ve alterado con el envejecimiento, principal factor de riesgo de la enfermedad. Sin embargo, sigue sin conocerse si algunos de éstos, u otros mecanismos aún desconocidos, son causantes de la enfermedad o consecuencia de ésta.

1.2.1.1. Neuroinflamación en la enfermedad de Parkinson

La neuroinflamación es un mecanismo patofisiológico de la EP (Boyd *et al.*, 2022) y, probablemente un importante desencadenante de la degeneración de las neuronas dopaminérgicas. Las respuestas inflamatorias ocurren en condiciones fisiológicas para preservar la homeostasis del SNC, sin embargo, una respuesta inflamatoria prolongada o desequilibrada desemboca en efectos perjudiciales para las células nerviosas. El control de la inflamación dentro del SNC lo realizan principalmente las células microgliales que, junto con los macrófagos perivasculares, actúan como centinelas inmunes residentes dentro del parénquima cerebral y cooperan con las células neuronales para garantizar el correcto funcionamiento del SNC (Picca *et al.*, 2021). Dependiendo de los estímulos que reciban, las células microgliales pasan de un estado en reposo a un estado activado, en el cual pueden polarizarse a fenotipos pro-inflamatorio o anti-inflamatorio, liberando diferentes moléculas y ejerciendo funciones distintas (Tang y Le, 2016).

En la polarización hacia el **estado pro-inflamatorio**, la microglía produce citoquinas pro-inflamatorias (TNF- α , IL-6 e IL-1 β), quimioquinas (MCP-1, RANTES y eotaxina), diferentes marcadores de inflamación como iNOS, COX-2 y CD68, y ROS. En este estado, la microglía adquiere una morfología ameboide con alta capacidad para fagocitar, eliminar restos de células apoptóticas e interactuar con las células T (Lee *et al.*, 2021). Todos estos mediadores inflamatorios

promueven la apoptosis de neuronas, oligodendrocitos y astrocitos, favoreciendo la degeneración celular (Lee *et al.*, 2009; Sanchez-Guajardo *et al.*, 2010).

La polarización hacia el **estado anti-inflamatorio** de la microglía normalmente se inicia mediante la estimulación de IL-4 o interleucina 13 (IL-13), que son secretadas por las células Th2 (Ghosh *et al.*, 2016). Con este fenotipo, la microglía produce citoquinas anti-inflamatorias como la Arginasa-1 (ARG-1), la interleucina tipo 10 (IL-10) y el factor de crecimiento transformador de tipo β (TGF- β), quimioquinas (TARC y MDC) y factores de crecimiento que suprimen las respuestas pro-inflamatorias y contribuyen a la reparación y remodelación neuronal (David y Kroner, 2011).

Por lo tanto, el fenotipo microglial puede tener efectos contrapuestos en los procesos que desencadenan la neurodegeneración (Joers *et al.*, 2017). En referencia a la EP, se ha demostrado que la SNpc es una región muy densa en células microgliales y se caracteriza por la presencia de neuronas dopaminérgicas altamente vulnerables a las respuestas pro-inflamatorias (Picca *et al.*, 2021). Múltiples estudios han demostrado la existencia de una respuesta inflamatoria microglial en SN y ST de pacientes con EP (Sanchez-Guajardo *et al.*, 2010; Joers *et al.*, 2017). Sin embargo, la presencia de microglía reactiva por sí sola no define su función, beneficiosa o perjudicial, en la neurodegeneración de la EP. La evaluación de los factores solubles, como las citoquinas, tanto en el tejido cerebral como en el líquido cefalorraquídeo (LCR) y plasma, puede proporcionar datos sobre el fenotipo microglial y, por tanto, el efecto de la respuesta inflamatoria microglial en el inicio y progresión de la enfermedad (Joers *et al.*, 2017).

Además de la respuesta inflamatoria microglial, la existencia de astrocitos reactivos en el parénquima cerebral también es una característica de la neuroinflamación (Ransohoff y Perry, 2009). La astrogliosis se caracteriza por el aumento de los niveles de expresión de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP, del inglés *anti-glia fibrillary acidic protein*) y la hipertrofia del cuerpo celular y de las extensiones celulares en respuesta a estímulos inflamatorios, como el lipopolisacárido (LPS), IL-1 β y TNF- α (Wang *et al.*, 2015a). En

consecuencia, los astrocitos producen mediadores inflamatorios, aunque en estadios más tardíos que la microglía, amplificando la neuroinflamación. La respuesta inflamatoria astrogliosa se ha observado en regiones cerebrales afectadas en pacientes de EP, así como en modelos animales y celulares (Yamada *et al.*, 1992; Fellner *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2015a).

La implicación de la respuesta inflamatoria microglial y los fenómenos de neuroinflamación en el inicio y progresión de la EP ha sido descrita (Joers *et al.*, 2017). Sin embargo, los mecanismos por los cuales contribuyen a la patología de dicha enfermedad no han sido completamente dilucidados y requieren de estudios más profundos.

♦ **Implicación de la microglía en modelos de EP**

Los modelos animales de EP actuales sólo reproducen parcialmente la enfermedad, debido a que aún no se conocen todas las causas que inician y mantienen la neurodegeneración dopaminérgica (Falkenburger *et al.*, 2016). Sin embargo, la neuroinflamación y la respuesta inflamatoria microglial han sido detectadas en diversos modelos de la enfermedad.

Los **modelos animales basados en neurotoxinas** son los más ampliamente utilizados en EP, ya que permiten obtener una muerte celular selectiva de las neuronas dopaminérgicas y son capaces de generar un estado de estrés oxidativo e inflamación en la SNpc y/o en el ST (Blesa *et al.*, 2012; Bezard *et al.*, 2013). Las principales neurotoxinas utilizadas son:

-6-Hidroxidopamina (6-OHDA): se trata de una molécula que se diferencia de la DA por la presencia de un grupo hidroxilo, lo que la convierte en una molécula tóxica para las neuronas dopaminérgicas. Debido a que la 6-OHDA es un producto propio del metabolismo endógeno de la DA, y produce lesiones específicas en la ruta nigroestriatal, se considera un buen candidato para el desarrollo de modelos animales de EP (Rodríguez-Pallares *et al.*, 2007, 2008; Blesa *et al.*, 2012; Jackson-Lewis *et al.*, 2012).

-1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP): esta molécula es transformada, por la acción del enzima monoamino oxidasa B cerebral, en su metabolito activo (MPP⁺), el cual es captado por el transportador de DA. El MPP⁺ intracelular se concentra en las mitocondrias, donde inhibe el complejo I de la cadena de transporte de electrones (Tipton y Singer, 1993) produciendo una reducción en la generación de adenosín trifosfato (ATP) y un aumento en la producción de radicales libres (Chan *et al.*, 1991), lo que conduce a la muerte de neuronas dopaminérgicas.

Los modelos inducidos por las mencionadas neurotoxinas cursan con una elevada respuesta inflamatoria microglial horas después de su administración, y antes de que se produzca una muerte neuronal dopaminérgica significativa (Blandini *et al.*, 2008; Boyd *et al.*, 2022). El aumento de expresión de citoquinas pro-inflamatorias también se ha encontrado en estos modelos, aunque existe variabilidad en cuanto al tipo de citoquinas. Probablemente estas diferencias se encuentren asociadas a diferentes dosis y tiempos utilizados en el modelo desarrollado, así como el lugar de la inyección (Depino *et al.*, 2003).

Además, otros estudios han demostrado que la administración a dosis no neurotóxica de la toxina inflamatoria LPS aumenta la degeneración neuronal inducida por 6-OHDA (Koprach *et al.*, 2008), lo que sugiere una relación entre la inflamación periférica con la muerte neuronal dopaminérgica. Por lo tanto, la inhibición de la reacción glial y los procesos inflamatorios puede representar un enfoque terapéutico importante para retrasar la progresión de la EP (Lee *et al.*, 2009). Sin embargo, aún se encuentran resultados contradictorios sobre los efectos neuroprotectores de los tratamientos con efectos anti-inflamatorios. Esto puede deberse a que los modelos animales basados en neurotoxinas no reproducen fielmente la patofisiología de la EP, especialmente en lo que a sinucleinopatía se refiere (Sarkar *et al.*, 2016; Visanji *et al.*, 2016; Koprach *et al.*, 2017). Es importante destacar, que en los últimos años se ha descrito una importante relación entre la neuroinflamación y respuesta inflamatoria microglial con la toxicidad generada por la proteína α -syn (Zhang *et al.*, 2017). En consecuencia,

se está avanzando rápidamente hacia la implementación de **modelos animales basados en sinucleinopatía** (Fajardo-Serrano *et al.*, 2021).

Así, se han desarrollado varios **modelos de animales transgénicos** que sobreexpresan el tipo salvaje (WT, del inglés *Wild type*) o formas mutadas de α -syn humana (A30P, E36K, A53T) con el objetivo de estudiar los efectos de la acumulación y agregación de α -syn en la muerte de neuronas dopaminérgicas (Magen y Chesselet, 2010). Los ratones transgénicos que sobreexpresan α -syn desarrollan neurodegeneración, pérdida de DA estriatal, disfunción locomotora e inclusiones citoplasmáticas, aunque éstas no conforman una estructura fibrilar que se asemeje a los cuerpos de Lewy con exactitud (Chia *et al.*, 2020). Sin embargo, la pérdida neuronal suele ser débil o en regiones no relacionadas con EP, por lo que la principal limitación de estos modelos es que no imita la expresión espaciotemporal de α -syn que se muestra en pacientes de EP (Visanji *et al.*, 2016; Volpicelli-Daley, 2017).

Para corregir estas limitaciones, actualmente se están desarrollando modelos que inducen la sobreexpresión de α -syn utilizando vectores virales, en particular **vectores virales adenoasociados (AAV)** (Bey *et al.*, 2020), los cuales, gracias a la incorporación de promotores específicos, permiten una transducción y sobreexpresión de α -syn en regiones y/o tipos celulares relacionados con la fisiopatología de la EP humana. De forma general, se han encontrado 12 serotipos de AAV diferentes, siendo el serotipo 9 (AAV9) uno de los únicos capaz de atravesar la BHE y el que ha demostrado mayor eficacia de transducción en el SNC (Bey *et al.*, 2020). Diversos estudios han demostrado que la sobreexpresión de α -syn humana mediada por vectores AAV reproduce distintas etapas de progresión de la enfermedad que coinciden con las etapas pre-sintomáticas, sintomáticas tempranas y avanzadas observadas en pacientes con EP (Decressac *et al.*, 2012; Volpicelli-Daley, 2017).

En modelos con sobreexpresión de α -syn se ha demostrado una intensa respuesta neuroinflamatoria (Sanchez-Guajardo *et al.*, 2010; Barkholt *et al.*, 2012). Diversos estudios han observado que la microgliosis generada en estos modelos se produce en etapas iniciales

en las que la muerte neuronal dopaminérgica todavía no es significativa. Por tanto, se ha sugerido que los agregados proteicos de α -syn liberan señales que inducen microgliosis e inflamación, provocando que un número creciente de células microgliales reaccionen y migren al sitio de la lesión para defender la progresiva muerte neuronal (Chavarría *et al.*, 2022). Este evento dirige a la activación de la microglía con fenotipo pro-inflamatorio, encargado de la fagocitosis de α -syn y, posteriormente, a la activación de diferentes eventos pro-inflamatorios junto con una liberación elevada de citoquinas, lo que potencia la pérdida de neuronas dopaminérgicas y un estado de inflamación cerebral crónica en EP (Su *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2010). Sin embargo, los diferentes modelos de α -syn siguen mostrando resultados contradictorios. Las diferentes formas de α -syn exhiben diferentes efectos sobre la fagocitosis microglial y la respuesta inflamatoria. Por ejemplo, la proteína mutada α -syn-A53T desencadena una respuesta microglial pro-inflamatoria exacerbada y altera la fagocitosis (Hoenen *et al.*, 2016).

Hay que tener en cuenta que los modelos animales no son los únicos disponibles para estudiar procesos de neuroinflamación que transcurren durante la progresión de la neurodegeneración. Los modelos celulares son una forma rápida, menos costosa que los modelos animales, y que ofrecen la posibilidad de estudiar efectos y respuestas de diferentes tipos de células de forma individual (Falkenburger *et al.*, 2016). Los resultados *in vitro* han demostrado el efecto neuroinmunomodulador de la microglía a través de la liberación de sustancias citotóxicas (ROS, NO, ácido araquidónico, citoquinas) (Harry y Kraft, 2008). Generalmente, la estimulación del fenotipo neurotóxico se induce por el tratamiento con LPS o el interferón tipo γ (IFN- γ) (Melchior *et al.*, 2006).

Los experimentos *in vitro* más utilizados son aquellos que utilizan líneas celulares inmortalizadas derivadas de poblaciones celulares de un organismo celular (Lopes *et al.*, 2017), siendo las más utilizadas para microglía: N9, BV2 (ambas de linaje de ratón), HAPI, MLS-9 (ambas de linaje de rata), CHME-5 y HMO6 (ambas de linaje humano) (Timmerman *et al.*, 2018). Los cultivos primarios, también

muy utilizados en modelos celulares, están constituidos por uno o más tipos celulares que han sido aislados de un tejido, generalmente embrionario (Lopes *et al.*, 2017). En el caso de la microglía, los cultivos primarios generalmente derivan del tejido cerebral de animales neonatos (Timmerman *et al.*, 2018). Hay que tener en cuenta que diversos estudios han revelado diferencias importantes entre las líneas microgliales de roedores y la microglía primaria (Horvath *et al.*, 2008), por lo que los resultados obtenidos deben extrapolarse con precaución. Además, también existen diferencias entre la microglía *in vitro* e *in vivo*, atribuidas principalmente a la dificultad de cultivar microglía en un estado de reposo inactivo (Harry y Kraft, 2008).

Las células microgliales pueden co-cultivarse con otros tipos celulares, como las neuronas, o realizar cultivos primarios mesencefálicos en los que se encuentran diversos tipos celulares. En estos cultivos multicelulares pueden realizarse estudios de la neuroinflamación de la EP mediante el uso de neurotoxinas (6-OHDA, MPTP) o α -syn (Lopes *et al.*, 2017).

1.2.2. Receptores de angiotensina en la fisiopatología de la enfermedad de Parkinson

La expresión de diferentes componentes y receptores del SRA se ha demostrado en las estructuras cerebrales relacionadas con la EP. En la SNpc se han observado receptores AT1 y AT2 en neuronas dopaminérgicas, astrocitos y microglía de ratas (Rodríguez-Pallares *et al.*, 2008), ratones (Joglar *et al.*, 2009), primates no humanos (Valenzuela *et al.*, 2010; Garrido-Gil *et al.*, 2013, 2017) y cerebros humanos (Garrido-Gil *et al.*, 2013). Además, estos receptores también se observaron en neuronas dopaminérgicas y células gliales de cultivos de células primarias de la región mesencefálica y varias líneas celulares neuronales y gliales (Rodríguez-Pallares *et al.*, 2004, 2008; Joglar *et al.*, 2009; Rodríguez-Perez *et al.*, 2015).

La relación entre el SRA y la EP fue definida por primera vez por Allen *et al.* (1992). A día de hoy, son numerosos los estudios en los que se ha demostrado el papel determinante del SRA en diversos procesos patológicos implicados en la progresión de la EP (Grammatopoulos *et*

al., 2007; Zawada *et al.*, 2011; Labandeira-Garcia *et al.*, 2017), como son el envejecimiento, el estrés oxidativo y la neuroinflamación. Otros mecanismos importantes que subyacen en la EP, como son los cambios en el sistema dopaminérgico nigroestriatal y la implicación de hormonas sexuales, como los estrógenos, también se encuentran estrechamente relacionados con el SRA cerebral (Villar-Cheda *et al.*, 2010, 2014; Rodriguez-Perez *et al.*, 2012).

♦ Estrés oxidativo y neuroinflamación

El SRA cerebral se ha relacionado, tanto con procesos de estrés oxidativo y generación de ROS, como con la neuroinflamación en el SNC.

La generación de ROS es esencial para el funcionamiento celular pero, una excesiva producción puede conducir a un estado de estrés oxidativo (Li *et al.*, 2013), que constituye un factor principal de la muerte neuronal dopaminérgica que cursa en la EP (Wright *et al.*, 2012). En las neuronas, la activación de los ejes Ang II/AT1 y (Pro)renina/PRR media propiedades pro-oxidativas y pro-inflamatorias, mientras que la activación de los ejes Ang II/AT2 y ECA2/Ang(1-7)/MasR media efectos anti-inflamatorios (Costa-Besada *et al.*, 2018). Las evidencias acumuladas sugieren que la activación del eje Ang II/AT1 incrementa la producción de ROS, a través del complejo enzimático NOX. Se ha demostrado que NOX produce superóxido (SO), el cual activa las vías del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF-kB) y RhoA/Rho quinasa (ROCK) (Joglar *et al.*, 2009; Borrajo *et al.*, 2014b; Rodriguez-Perez *et al.*, 2015; Lopez-Lopez *et al.*, 2021). Es importante destacar que la activación de los receptores AT1 nucleares regula la expresión génica y desencadena varios mecanismos que protegen a las células contra el estrés oxidativo. En neuronas, el SRA nuclear aumenta la expresión del receptor AT2 y del ANG, y activa los ejes Ang II/AT2 y ECA2/Ang(1-7)/MasR para contrarrestar los efectos pro-oxidativos de la estimulación de los receptores AT1 (Villar-Cheda *et al.*, 2017; Costa-Besada *et al.*, 2018). En células microgliales esta relación está menos estudiada.

Diversos estudios han demostrado que la actividad y expresión de los componentes y receptores del SRA desempeñan un papel inmunorregulador, debido a que afecta a la función y fenotipo microglial mediante la activación de los receptores AT1, AT2 y MasR en mitocondrias, núcleos y membranas celulares (Garrido-Gil *et al.*, 2013; Regenhardt *et al.*, 2013; Costa-Besada *et al.*, 2018). La respuesta pro-inflamatoria mediada por la estimulación del receptor AT1 es un mecanismo que exagera la muerte neuronal e inflamación; mientras que la respuesta anti-inflamatoria, mediada por la estimulación del receptor AT2, conduce a la producción de citoquinas anti-inflamatorias y a la regulación positiva de los receptores fagocíticos que ayudan al aclaramiento sináptico (Rodríguez-Pallares *et al.*, 2008; Regenhardt *et al.*, 2013; Fouda *et al.*, 2017). La regulación de la expresión de los receptores de Ang II, en células microgliales es compleja, y puede alterarse en eventos patológicos e inflamatorios, por lo que se necesitan más estudios para esclarecer los mecanismos que intervienen en esta compleja regulación.

♦ **Envejecimiento**

Muchos estudios han demostrado que los niveles de los diferentes componentes y receptores del SRA cambian a lo largo de la edad acelerando la senescencia celular y disfunción de tejidos y órganos mediante mecanismos de estrés oxidativo, inflamación, apoptosis y cambios vasculares (Cosarderelioglu *et al.*, 2020). En el SRA cerebral, los niveles de expresión del receptor AT1 están regulados al alza en el envejecimiento (Abadir, 2011). También se observó que la expresión del eje Ang(1–7)/MasR disminuyó en ratas envejecidas (Costa-Besada *et al.*, 2018). De manera similar, diversos estudios demostraron que la sobreactivación del eje Ang II/AT1/NOX cerebral conduce a una mayor vulnerabilidad celular al estrés oxidativo, debido a una disminución de los niveles de sirtuina tipo 3 (SIRT3), y que, además, los ejes de sirtuina tipo 1 (SIRT1), y Ang II/AT1 se encuentran alterados en animales envejecidos (Díaz-Ruiz *et al.*, 2015; 2020).

♦ **Sistema dopaminérgico nigro-estriatal**

Las interacciones entre la DA y Ang II, tanto en el ST como en la SN de roedores, se han demostrado en diversos estudios (Villar-Cheda *et al.*, 2010, 2014). Particularmente, se ha observado que existe una regulación inversa entre los receptores de Ang II y de DA. Una disminución de los niveles de DA conduce a un aumento en la expresión de receptores AT1 en la SN y ST, lo que potencia la respuesta inflamatoria microglial y contribuye a la muerte de neuronas dopaminérgicas. Además, la DA también tiene función inmunomoduladora, ya que se encuentra presente en células inmunitarias, tanto en el SNC como en tejidos periféricos (Arreola *et al.*, 2016). Estudios previos demuestran que la DA desempeña un papel anti-inflamatorio a través de la inhibición del SRA cerebral, y que la disminución de los niveles de DA en las primeras etapas de la EP y en el envejecimiento pueden promover la neuroinflamación y la progresión de la degeneración neuronal a través de la hiperactivación del eje pro-inflamatorio del SRA mediante los receptores AT1 (Dominguez-Meijide *et al.*, 2017).

♦ **Dimorfismo sexual y efecto de las hormonas sexuales.**

Diversos estudios han mostrado la existencia de un dimorfismo sexual en el SRA cerebral, lo que puede repercutir en las respuestas inflamatorias microgliales y en progresión de la EP. En los últimos años se ha demostrado que la pérdida de estrógenos puede conducir a la activación del eje pro-oxidativo del SRA y al aumento de la vulnerabilidad de la muerte de neuronas dopaminérgicas en la SN de roedores (Rodríguez-Perez *et al.*, 2010; 2011, 2012; Labandeira-Garcia *et al.*, 2016). Se sabe que los efectos anti-inflamatorios de los estrógenos constituyen un mecanismo importante de neuroprotección (Vegeto *et al.*, 2008). En consonancia con esto, diversos estudios han demostrado que el sistema nigroestriatal de las ratas macho muestra una mayor actividad del eje pro-oxidativo del SRA en comparación con las ratas hembra (Rodríguez-Perez *et al.*, 2011). Curiosamente, el tratamiento con un bloqueante del receptor AT1 (ARAI), específicamente con candesartán, reduce significativamente la pérdida de neuronas dopaminérgicas en ratas menopáusicas ovariectomizadas

(Rodríguez-Perez *et al.*, 2012), destacándose la importancia del receptor AT1 en las diferencias de sexo. La implicación de otros componentes del SRA está menos estudiado.

1.2.2.1. Tratamientos moduladores de los receptores del SRA: Efecto en neuroinflamación y degeneración dopaminérgica

Actualmente, las terapias farmacológicas disponibles para la EP se centran en compensar la ausencia de señalización de DA en los núcleos basales y rescatar los síntomas motores cardinales (Valdes y Schneider, 2016; Kim *et al.*, 2021), ya sea por la administración de un fármaco, como el precursor de la DA, L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) (Carlsson *et al.*, 1957; Birkmayer y Hornykiewicz, 1998), o por la intervención quirúrgica de la estimulación cerebral profunda (Larson, 2014). Estas terapias son exclusivamente sintomáticas, incapaces de frenar la pérdida progresiva de neuronas dopaminérgicas y, aunque proporcionan beneficios de mejora en los síntomas motores de EP a corto plazo, la terapia crónica puede dar lugar a fluctuaciones motoras y discinesias (Kim *et al.*, 2021). Se hace evidente, por tanto, la necesidad de desarrollar nuevas terapias neuroprotectoras (Dong *et al.*, 2016).

En los últimos años, la tasa de descubrimiento de fármacos para las enfermedades neurodegenerativas ha sido inferior a la tasa media obtenida para otras indicaciones terapéuticas (Wong *et al.*, 2019). Una de las razones de esta falta de éxito puede atribuirse a la complejidad etiológica y a las numerosas vías biológicas implicadas en la neurodegeneración (Kim *et al.*, 2021). Así, la búsqueda de biomarcadores tempranos de la enfermedad y, de una diana terapéutica común de la mayoría de los eventos patológicos que ocurren en la EP, podría ser una buena estrategia para el desarrollo de terapias neuroprotectoras.

En apartados anteriores se ha definido que el envejecimiento, el estrés oxidativo y la neuroinflamación son factores determinantes en el desarrollo y progresión de la muerte neuronal dopaminérgica que cursa la EP, y se ha descrito como todos estos factores son regulados

por el SRA cerebral y sus receptores. El efecto neuroprotector mediado por los tratamiento que modulan el SRA y sus receptores, ya sea con ARAII o IECAs, se lleva demostrando desde hace más de 20 años (Barnes *et al.*, 1992; Tracy *et al.*, 1997), en diferentes modelos celulares y animales, de diferentes enfermedades cerebrales (Jackson *et al.*, 2018) (Tabla 1).

Concretamente, en modelos animales de EP inducidos por neurotoxinas (6-OHDA y MPTP), se observa que la activación del eje pro-oxidativo del SRA (Ang II/AT1) exagera la muerte neuronal dopaminérgica en la SN (Joglar *et al.*, 2009; Rey *et al.*, 2007; Garrido-Gil *et al.*, 2012; Villar-Cheda *et al.*, 2012; Rodriguez-Perez *et al.*, 2013). En consonancia con esto, el tratamiento con IECA (Lopez-Real *et al.*, 2005; Muñoz *et al.*, 2006; Sonsalla *et al.*, 2013) o ARAII (Grammatopoulos *et al.*, 2007; Rey *et al.*, 2007) induce una reducción significativa de la degeneración neuronal dopaminérgica, al inhibir la activación del eje pro-oxidativo del SRA. Sin embargo, en modelos animales con sinucleinopatía, el uso de estos tratamientos está menos estudiado.

A pesar de todos los datos experimentales que demuestran los efectos neuroprotectores de los tratamientos que modulan el SRA y sus receptores (como IECAs y ARAII) (Tabla 1), los estudios clínicos sobre los efectos de estas terapias son todavía escasos. Los efectos de varios tipos de tratamientos moduladores del SRA y sus receptores sobre el riesgo de EP se han estudiado en varios estudios de pacientes y controles (Reardon *et al.*, 2000; Becker *et al.*, 2008; Perez-Lloret *et al.*, 2017; Laudisio *et al.*, 2017). Sin embargo, el número de pacientes utilizados en los estudios clínicos sigue siendo demasiado bajo. Además, se ha cuestionado la metodología de algunos de estos estudios debido a que los autores se han centrado en el uso y efecto actual de los tratamientos anti-hipertensivos y no durante un período adecuado de seguimiento, así como el uso de un amplio rango de dosis, inicio y duración de los tratamientos, y su capacidad para atravesar la BHE y acceder al parénquima cerebral (Labandeira-Garcia *et al.*, 2013; 2021; Koren *et al.*, 2019; Kim *et al.*, 2021; Jo *et al.*, 2022). Estudios más recientes han observado efectos neuroprotectores significativos de los

bloqueantes del receptor AT1 (ARAI) al disminuir de forma significativa el riesgo de padecer EP (Lee *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2021; Lin *et al.*, 2022). Además, estudios llevados a cabo mediante análisis computacional de base de datos de pacientes con EP concluyeron que los bloqueantes del receptor AT1 reducen la oligomerización de la proteína α -syn en pacientes de EP (Visanji *et al.*, 2021).

De todo lo expuesto se deduce que son necesarios estudios adicionales para aclarar la eficacia de los bloqueantes del receptor AT1, y otros tratamientos moduladores del SRA, como fármacos neuroprotectores contra la EP y sus mecanismos implicados. La gran ventaja de proponer estos tratamientos como candidatos en el desarrollo de nuevas estrategias neuroprotectoras en la EP es su amplio uso actual en la práctica clínica como tratamientos anti-hipertensivos, por lo que se plantea como un **reposicionamiento de fármacos** de terapias de uso clínico actual. Así, la existencia de una doble diana terapéutica de los tratamientos que regulan los receptores del SRA merece ser estudiada.

Moduladores del SRA	Modelo Animal	Efecto	Referencia
Losartán	Modelo de intoxicación etílica	Reduce el deterioro cognitivo	Tracy <i>et al.</i> , 1997
	Modelo transgénico de EA	Reduce la formación de placas β -amiloide e inflamación	Danielyan <i>et al.</i> , 2010
	Modelo animal de EA	Reducción del deterioro cognitivo	Tian <i>et al.</i> , 2012; Hamel <i>et al.</i> , 2016; Ongali <i>et al.</i> , 2014
	Modelo <i>in vitro</i> de EP por MPTP	Neuroprotección dopaminérgica	Grammatopoulos <i>et al.</i> , 2007
	Modelo de epilepsia	Reducción de la respuesta inflamatoria astrocítica y del estrés oxidativo	Hong <i>et al.</i> , 2012
Valsartán	Modelo <i>in vitro</i> de EA	Atenuación de la oligomerización de β -amiloide	Wang <i>et al.</i> , 2007
Olmesartán	Modelo transgénico de EA	Atenuación de la disfunción cerebrovascular	Takeda <i>et al.</i> , 2009

Telmisartán	Modelos de EA	Disminución de la carga amiloide y la inflamación microglial	Torika <i>et al.</i> , 2016
	Modelo de isquemia cerebral	Aumento del flujo sanguíneo cerebral, mejora en la memoria espacial y disminución de apoptosis e inflamación	Iwanami <i>et al.</i> , 2010; Haraguchi <i>et al.</i> , 2010
	Modelo de EP por MPTP	Reducción de neurodegeneración dopaminérgica y respuesta microglial	Garrido-Gil <i>et al.</i> , 2012; Sekar <i>et al.</i> , 2018
	Modelo de estrés crónico	Atenuación de la disfunción cognitiva	Wincewicz y Braszko, 2014; 2015
	Modelo de Inflamación por LPS	Efectos anti-inflamatorios	Prathab Balaji <i>et al.</i> , 2015
	Modelo de ratas hipertensas	Atenuación del déficit cognitivo	Kishi <i>et al.</i> , 2012
	Modelo de ratas diabéticas	Atenuación del déficit cognitivo y prevención del daño en la BHE	Min <i>et al.</i> , 2012
Candesartán	Modelos de inflamación por LPS	Atenuación de la inflamación microglial y astrogial	Bhat <i>et al.</i> , 2016; Mertens <i>et al.</i> , 2011
	Modelo de EP por 6-OHDA	Neuroprotección dopaminérgica	Rodríguez-Pallares <i>et al.</i> , 2007; Villar-Cheda <i>et al.</i> , 2012
	Modelo de envejecimiento	Atenuación de la respuesta pro-inflamatoria	Díaz-Ruiz <i>et al.</i> , 2020
	Modelo de EP por 6-OHDA en ratas menopáusicas	Neuroprotección dopaminérgica y disminución de estrés oxidativo	Rodríguez-Pérez <i>et al.</i> , 2012
	Modelo de EP por rotenona	Disminución de la apoptosis de neuronas dopaminérgicas	Gao <i>et al.</i> , 2017; Wu <i>et al.</i> , 2013
	Modelo de hipoperfusión lesionado con 6-OHDA	Neuroprotección dopaminérgica y anti-inflamación	Rodríguez-Pérez <i>et al.</i> , 2013
	Cilazapril	Modelo animal de hipertensión	Respuesta mejorada en la disfunción de memoria
Enalapril	Modelo animal diabetes	Mejora en los problemas de aprendizaje	Manschot <i>et al.</i> , 2003
Captopril	Modelo Transgénico de EA	Reducción del procesamiento amiloide e inflamación	AbdAlla <i>et al.</i> , 2013; Asraf <i>et al.</i> , 2018

<i>Enalapril</i>	Modelo de EP por MTPT	Neuroprotección dopaminérgica y reducción de estrés oxidativo	Muñoz <i>et al.</i> , 2006; Sonsalla <i>et al.</i> , 2013
	Modelo de EP por 6-OHDA	Neuroprotección dopaminérgica	Lopez-Real <i>et al.</i> , 2005
	Modelo animal de Esclerosis Múltiple	Atenuación de la desmielinización de oligodendrocitos e inflamación	Stegbauer <i>et al.</i> , 2009

Tabla 1: Resumen del efecto de los tratamientos moduladores del SRA y sus receptores en modelos de diferentes eventos neuropatológicos. LPS: lipopolisacárido, EA: enfermedad de Alzheimer, MPTP: 1-metil-4-fenil-1,2,3,6 tetrahidropiridina, 6-OHDA: 6-hidroxi dopamina, EP: enfermedad de Parkinson, BHE: Barrera Hematoencefálica.

1.3. INFLAMACIÓN PERIFÉRICA, NEUROINFLAMACIÓN Y NEURODEGENERACIÓN DOPAMINÉRGICA. IMPLICACIÓN DE RECEPTORES DE ANGIOTENSINA

En los últimos años se ha destacado la implicación de la inflamación periférica en la neuroinflamación y en procesos de neurodegeneración. Muchos estudios han demostrado que los cambios periféricos del sistema inflamatorio e inmune preceden a la neurodegeneración y podrían considerarse un desencadenante de la patogénesis de la enfermedad cerebral (Rocha *et al.*, 2015; Harms *et al.*, 2021).

La BHE previene y controla el paso de la mayoría de los componentes periféricos al SNC. Las células endoteliales que la conforman están unidas por uniones estrechas, mientras que la membrana basal, los pericitos y los astrocitos realizan funciones reguladoras y de apoyo (Van Dyken y Lacoste, 2018). La integridad de la BHE es fundamental para el correcto funcionamiento cerebral, y su daño se ha relacionado, en gran medida, con la inflamación periférica y la neuroinflamación. La invasión de leucocitos, la liberación de citoquinas y aumento del estrés oxidativo pueden inducir la apertura o disrupción de la BHE, permitiendo así el paso de mediadores pro-inflamatorios y componentes del sistema inmune, provocando así respuestas inflamatorias microgliales y daño neuronal (Lee *et al.*, 2009; Van Dyken y Lacoste, 2018).

En referencia a la neurodegeneración dopaminérgica, los pacientes con EP presentan elevados niveles de diferentes citoquinas pro-

inflamatorias como TNF- α , interleucina tipo 2 (IL-2), IL-6, IFN- γ en suero y que, además, se correlacionan con el estado clínico y progresión de la enfermedad (Reale *et al.*, 2009; Schwab *et al.*, 2020). Estos cambios no sólo se han observado en los mediadores pro-inflamatorios sino también en las células inmunitarias de la periferia. Los pacientes con EP presentan un menor número de linfocitos, de células T y de células B (Czlonkowska *et al.*, 2002; Rocha *et al.*, 2015). Sin embargo, aún no se conoce si estas alteraciones de inflamación sistémica son una causa y/o consecuencia de la neuroinflamación y neurodegeneración cerebral.

El principal factor de riesgo de la EP es el envejecimiento, que se asocia a un estado de inflamación crónica periférica que podría contribuir a una disrupción de la BHE y, por tanto, favorecer fenómenos de inflamación cerebral (Rocha *et al.*, 2015; Kempuraj *et al.*, 2016). Muchos estudios demuestran que la BHE está alterada en pacientes de EP (Pisani *et al.*, 2012; Gray y Woulfe, 2015).

Otro estado asociado a fenómenos de inflamación crónica periférica y de prevalencia creciente en la sociedad actual es el generado por el síndrome metabólico (MetS, del inglés *Metabolic Syndrome*), enfermedad caracterizada por la presencia de al menos tres de los siguientes criterios: obesidad abdominal, resistencia a la insulina, hipertensión, hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia (Alberti *et al.*, 2009). En los últimos años se ha estudiado la implicación de los factores que definen el MetS en la fisiopatología de la EP (Zhang y Tian, 2014).

Las condiciones patológicas del MetS producen efectos de amplio alcance, y muchos de ellos afectan al SNC mediante la disfunción de la BHE (Van Dyken y Lacoste, 2018). Por un lado, el aumento de la presión arterial que cursa en el MetS afecta a las células endoteliales de la BHE provocando su disrupción (Van Dyken y Lacoste, 2018), mientras que, por otro lado, la disrupción de BHE también se ha relacionado en gran medida con elevados niveles de mediadores pro-inflamatorios que cursan en el MetS (Varatharaj y Galea, 2017). Estudios recientes, demuestran que en modelos animales, la obesidad inducida por una dieta alta en grasa, empeora los síntomas motores inducidos por la neurotoxina 6-OHDA debido a un agotamiento

significativo de los pericitos, a la ausencia de una respuesta angiogénica y al desarrollo de patología vascular de la BHE (Elabi *et al.*, 2021). El estrés mitocondrial, la producción de ROS y la inflamación que cursan en el MetS también son considerados, por otros estudios, como impulsores de la neurodegeneración (Soni y Shah, 2022). La inflamación periférica y el aumento en los niveles séricos de diferentes tipos de citoquinas como son TNF- α , IL-1 β e IL-6 (Whitton, 2007), así como las cantidades de ROS, involucrados en la etiología de la EP, se encuentran elevadas en suero de pacientes con MetS y diabetes (Zhang y Tian, 2014; Esser *et al.*, 2014). Sin embargo, los posibles mecanismos que vinculan los procesos periféricos con la neuroinflamación y la neurodegeneración todavía no han sido del todo dilucidados.

1.3.1. Inflamación periférica crónica y receptores de angiotensina: síndrome metabólico

El SRA sistémico se encuentra hiperactivado en situaciones de inflamación crónica provocada por enfermedades cardiovasculares, hipertensión, diabetes, enfermedades autoinmunes, MetS y envejecimiento, entre otras (de Kloet *et al.*, 2010; Capettini *et al.*, 2012). Así mismo, niveles crónicos y elevados de Ang II estimulan la generación de estrés oxidativo y citoquinas pro-inflamatorias, alteraciones en el SNC, alteraciones cardiovasculares y activación del sistema inmunológico (Satou *et al.*, 2018). Se establece, por tanto, un estado de retroalimentación positiva en la activación de eje pro-inflamatorio del SRA que estabiliza la inflamación crónica en el organismo. Niveles elevados de citoquinas pro-inflamatorias también se han relacionado con la activación del sistema inmune y la generación de autoanticuerpos (AA) frente a receptores del SRA (LaMarca *et al.*, 2008, 2011; Dhillion *et al.*, 2012; Miziolek *et al.*, 2021).

Los autoanticuerpos agonistas al receptor AT1 (AT1-AA) son un miembro de la familia de inmunoglobulina G (IgG) de tipo 3 que se unen al receptor en una secuencia de siete aminoácidos del segundo bucle extracelular (Wallukat *et al.*, 1999; Hubel *et al.*, 2007) y desencadena un efecto agonista con una cascada de señalización similar a la generada por Ang II/AT1, contribuyendo así a la generación de ROS por la activación del enzima NOX (Dechend *et al.*, 2003). Otros

estudios han demostrado que los AT1-AA producen liberación de Ca^{++} en células endoteliales del músculo liso, lo que conduce a alteraciones vasculares (Sun *et al.*, 2008). Además, el efecto de los AT1-AA es bloqueado por el uso de ARAII como el valsartán (Wang *et al.*, 2017) e irbesartán (Wenzel *et al.*, 2011).

La causa que origina la producción de AT1-AA no ha sido del todo dilucidada. Sin embargo, la inflamación periférica parece ser un mecanismo implicado en la liberación de antígenos para la producción de los autoanticuerpos (LaMarca *et al.*, 2009; Parrish *et al.*, 2010; Mistry y Kaplan, 2017). Diferentes estudios han demostrado que la infusión de citoquinas circulantes, como el miembro 14 de la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNFSF14 / LIGHT) (Luo *et al.*, 2016) e IL-17 (Dhillion *et al.*, 2012) son estimuladores de la producción de AT1-AA en modelos animales.

Curiosamente en MetS se ha demostrado un aumento en mediadores pro-inflamatorios séricos (Whitton, 2007; Harlid *et al.*, 2017), mientras que otros estudios demuestran que una dieta rica en grasa promueve la producción de AA en animales de experimentación (Arai *et al.*, 2013). Además, estudios recientes, muestran que el MetS conduce a inflamación e hiperactivación del SRA tanto del tejido adiposo como del circulante (Ramkumar y Kohan, 2019; Schutten *et al.*, 2017). Otro estudio demostró que el desarrollo de obesidad en un modelo animal induce un aumento en los niveles de Ang II circulante y un aumento en los niveles séricos de LIGHT (Harlid *et al.*, 2017), el cual es capaz de activar el enzima transglutaminasa 2 (TG2). Este enzima se ha visto implicada en mecanismos de glicosilación del receptor AT1, lo que podría promover la producción de neoantígenos para producir AT1-AA (Liu *et al.*, 2017a).

Sin embargo, los niveles de AA frente a receptores del SRA no se han estudiado de forma específica en modelos animales de MetS, y aún se desconoce hasta qué punto estas respuestas inmunitarias periféricas contribuyen a la alteración de los receptores del SRA cerebral, así como al inicio y progresión de la EP.

Además, la progresión y la gravedad de varios procesos relacionados con la inflamación periférica se han asociado con la presencia de autoanticuerpos frente a otros componentes del SRA, como los autoanticuerpos frente al enzima ECA2 (ACE2-AA). Su función se ha relacionado con la inhibición de la función catalítica del enzima ECA2, lo que provoca una disminución en la síntesis de Ang(1-7) y, por tanto, una disminución del eje anti-inflamatorio del SRA (Takahashi *et al.*, 2010). Sin embargo, la causa y mecanismos de su producción aún no está definida.

1.3.2. Inflamación periférica aguda y receptores de angiotensina: COVID-19

En el último año se ha destacado la relación entre el SRA y el SARS-CoV-2, debido a que el ECA2 de la membrana celular se ha identificado como el receptor funcional de entrada del virus (Wan *et al.*, 2020; Xu *et al.*, 2020).

Uno de los eventos fisiopatológicos asociados a la infección de SARS-CoV-2 y que, aumenta la gravedad de la COVID-19, es la respuesta inflamatoria sistémica aguda conocida como tormenta de citoquinas (Portales *et al.*, 2022). La entrada del SARS-CoV a la célula media la liberación, tisular y sérica, de diferentes tipos de citoquinas pro-inflamatorias, estableciendo un estado de inflamación periférica aguda en el organismo (Cheung *et al.*, 2005; Jiang *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2010). En apartados anteriores, se define que la inflamación periférica crónica asociada al envejecimiento puede provocar cambios en la expresión del ECA2, y otros receptores del SRA, en células cerebrales (Labandeira-Garcia *et al.*, 2011; Costa-Besada *et al.*, 2018; Diaz *et al.*, 2020). Por tanto, la inflamación periférica aguda asociada a la COVID-19 podría promover cambios en la expresión de diferentes receptores y componentes del SRA pulmonar, lo cual a su vez, podría promover una mayor severidad en la progresión de esta enfermedad.

1.4.SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA PULMONAR Y SARS-CoV-2

En los últimos años, la infección de SARS-CoV-2 ha generado una pandemia responsable de más de 600 millones de casos de infección y

más de 6 millones de muertes acumuladas según la Organización Mundial de la Salud.

Los principales síntomas de COVID-19 son respiratorios, sin embargo, los altos niveles de citoquinas asociados a la infección viral provocan síndrome de dificultad respiratoria aguda, insuficiencia orgánica y coagulopatía diseminada, lesiones cardíacas y renales agudas, arritmias, anomalías de la función intestinal y hepática, así como complicaciones neurológicas (Gheblawi *et al.*, 2020; Guo *et al.*, 2020; Sulzer *et al.*, 2020; Mascolo *et al.*, 2021).

El mecanismo de entrada del virus SARS-CoV-2 se realiza mediante una proteína de su superficie celular denominada proteína Spike, que es responsable de unirse al ECA2 de membrana. Específicamente, la proteína Spike forma un trímero y cada monómero alberga un dominio de unión al receptor (RBD, del inglés *Receptor Binding Domain*) que interactúa con el ECA2 presente en la superficie celular (Xu *et al.*, 2020), formando un complejo de unión distinto del sitio catalítico de ECA2 (Gheblawi *et al.*, 2020; Bian y Li, 2021). Además, el SARSCoV-2 ha evolucionado para utilizar una amplia gama de proteasas del huésped celular que incluyen catepsina L, catepsina B, tripsina, factor X, elastasa, furina y TMPRSS2 (proteasa transmembrana serina 2 del inglés *transmembrane protease serine 2*) para preparar a la proteína Spike, así como a su receptor ECA2, y facilitar su entrada a la célula (Millet y Whittaker, 2015; Gheblawi *et al.*, 2020).

1.4.1. Enzima convertora de Angiotensina II (ECA2) como receptor de SARS-CoV-2

La expresión del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) de ECA2 se ha demostrado prácticamente en todos los órganos (Harmer *et al.*, 2002). En el tracto respiratorio, la mayoría (aproximadamente el 83%) de las células que expresan ECA2 son células del epitelio alveolar tipo II (Zou *et al.*, 2020). Sin embargo, ECA2 también se expresa en otros tejidos, incluidos el corazón, el riñón, el endotelio, el intestino delgado y cerebro (Crackower *et al.*, 2002; Hamming *et al.*, 2004; Danilczyk *et al.*, 2006; Costa-Besada *et al.*, 2018). El ECA2 desempeña un papel clave en el equilibrio de los componentes y receptores del SRA, una

disminución en sus niveles de expresión puede provocar un estado pro-inflamatorio y pro-oxidativo, que puede conducir al desarrollo de diversas enfermedades como la insuficiencia cardíaca, infarto de miocardio, hipertensión y enfermedad pulmonar (Gheblawi *et al.*, 2020). La infección de SARS-CoV-2 produce una disminución en la expresión de ECA2 a través de dos vías: por la vía endocítica y por la vía proteolítica:

-Endocitosis mediada por receptor: el virus se introduce en el citoplasma celular mediante la formación de un endosoma, que contiene también el receptor de membrana ECA2. La principal vía endocítica para SARS-CoV es la dependiente de clatrina (Inoue *et al.*, 2007). Además, se encontró endocitosis dependiente de balsas lipídicas como una nueva vía de entrada especializada de SARS-CoV (Lu *et al.*, 2008).

-Fusión de membrana: la fusión directa de la membrana plasmática está mediada por TMPRSS2, y a diferencia de la endocitosis mediada por receptor, el ECA2 participa sólo en la detención y fijación del virus en la superficie, mientras que TMPRSS2 es la encargada de inducir la fusión de la membrana entre el virus y la célula huésped (Hoffmann *et al.*, 2020).

Sin embargo, todos los mecanismos de entrada de SARS-CoV-2 se están viendo sujetos a una alta variabilidad en los resultados de investigación. Resulta evidente la necesidad de más ensayos experimentales que ayuden a determinar los diferentes mecanismos y qué papel tienen las diferentes proteínas asociadas al mecanismos de entrada del virus en diferentes tipos celulares.

Además de la forma transmembrana, ECA2 también se ha encontrado en forma soluble en plasma y orina (Shaltout *et al.*, 2007). Esta forma se produce principalmente por la acción de dos proteasas (dominio 17 de desintegrina y metalopeptidasa (ADAM17) y TMPRSS2, que realizan una escisión proteolítica del dominio extracelular de ECA2, proceso conocido como desprendimiento (Lambert *et al.*, 2005). Los efectos de la ECA2 soluble aún presentan controversia, pero se sugiere que el enzima pierde la actividad

catalítica. Específicamente, la actividad de ADAM17 se regula al alza tras la unión del SARS-CoV-2 y ECA2, facilitando la entrada viral (Liu *et al.*, 2020), así como la pérdida de expresión de ECA2 de membrana. Esta pérdida promueve la acumulación de Ang II, lo que se ha corroborado con estudios que demuestran un aumento significativo en los niveles de Ang II en muestras de plasma de pacientes infectados con SARS-CoV-2 (Liu *et al.*, 2020), y éstos niveles se correlacionaron con la carga viral y la lesión pulmonar (Bian y Li, 2021). El aumento de Ang II, con la consecuente activación del receptor AT1, desencadena una cascada de señalización que activa MAPK y produce la fosforilación de ADAM17 por la formación de ROS inducidas por NOX (Scott *et al.*, 2011). Esta fosforilación aumenta la actividad de la proteasa, estableciéndose una retroalimentación positiva en la que los receptores del SRA tienen un papel clave.

La expresión y actividad del enzima ECA2 también puede verse alterada por otros mecanismos independientes de la infección de SARS-CoV-2, y, que de forma indirecta pueden afectar a su entrada celular. Algunos factores implicados en la inactivación catalítica de ECA2 son la presencia de citoquinas pro-inflamatorias (Chen *et al.*, 2020) y la acción de la aldosterona a través de la vía NOX (Keidar *et al.*, 2005). Recientemente, se ha demostrado la interacción del ECA2 de membrana con receptores acoplados a proteínas G del SRA en tejido pulmonar de ratón adulto (Franco *et al.*, 2020). Se ha demostrado que la interacción de ECA2 con el receptor AT1 conduce a una disminución de la expresión de ECA2 de membrana, mientras que la interacción con AT2 conduce a un aumento de expresión de ECA2 (Franco *et al.*, 2020). Por ello, la expresión de otros receptores del SRA también tienen un papel relevante en la infección de SARS-CoV-2. Se sugiere que los cambios en los niveles de expresión son compensatorios en lugar de causales, ya que el SRA puede cambiar su equilibrio para restaurar la homeostasis y evitar el daño tisular, estableciéndose una regulación dinámica (Smart *et al.*, 2020).

Así mismo, la expresión de los diferentes receptores del SRA se ve alterada con el uso de tratamientos moduladores del SRA y sus receptores, y que, además, son ampliamente utilizados, como los anti-

inflamatorios no esteroideos (ibuprofeno), los bloqueantes del receptor AT1 (ARAII) y los inhibidores de ECA (IECAs). Por ello, se ha generado una gran controversia sobre si el uso de IECAs o ARAII puede aumentar el riesgo de infección viral, y, si los pacientes hipertensos, deben sustituir estos tratamientos anti-hipertensivos (Bian y Li, 2021).

1.4.1.1. Efecto del bloqueo de receptores de angiotensina o de ECA sobre ECA2

Aunque el ECA2 no es la diana celular directa de los ARAII, tanto su transcripción, traducción y actividad catalítica se ven modificadas por el uso de estos tratamientos debido a la interconectada naturaleza del SRA (Gheblawi *et al.*, 2020; Labandeira-Garcia *et al.*, 2022). El uso de IECA y ARAII, inhibe el eje ECA/Ang II/AT1 potenciando los efectos del ECA2 como contrarregulador endógeno del SRA (Gheblawi *et al.*, 2020; Labandeira-Garcia *et al.*, 2022). Actualmente, existe una alta controversia sobre cómo afectan estos tratamientos a la expresión de ECA2. Estudios recientes han demostrado que los ARAII aumentan de manera constante la expresión de ARNm, los niveles de proteína y la actividad catalítica de ECA2 en corazón, riñón y aorta torácica, pero los niveles en la expresión y en la actividad difieren entre los modelos experimentales (Gheblawi *et al.*, 2020). Otros estudios demostraron que los IECAs, lisinopril y enalapril, pueden aumentar la expresión del ARNm de ECA2 en corazón de un modelo de hipertensión (Jessup *et al.*, 2006) y de un modelo de infarto de miocardio (Ocaranza *et al.*, 2006) en ratas. Además, otro estudio demostró que el IECA perindopril fue capaz de aumentar la expresión hepática de ECA2 en condiciones de fibrosis hepática en un modelo de rata (Huang *et al.*, 2010). Sin embargo, otro estudio demostró que el IECA ramipril no aumentó la expresión de ECA2 después de un infarto de miocardio en un modelo de rata (Burchill *et al.*, 2012). La controversia en los diferentes estudios puede deberse a varias razones. Una de ellas es la regulación específica a nivel tisular de ECA2, ya que se ha demostrado que los niveles de ARNm más altos se encuentran en el corazón mientras que su actividad catalítica es más alta en riñón (Gembardt *et al.*, 2005). Otra razón puede deberse a las diferentes dosis

y tiempos de tratamientos utilizados en los diferentes estudios, así como los diferentes modelos de inflamación utilizados. Resulta evidente que la regulación de la expresión y de la actividad de ECA2 por inhibidores del SRA requiere una caracterización adicional, sobretodo en tejidos principalmente afectados por la infección de SARS-CoV-2, como es el caso del pulmón, para poder concluir su efecto, adverso o beneficioso, en los pacientes infectados por SARS-CoV-2 (Labandeira-Garcia *et al.*, 2022).

1.4.1.2.Efecto de moduladores indirectos de receptores de angiotensina sobre ECA2. Anti-inflamatorios no esteroideos

Además de las posibles consecuencias de la administración de fármacos inhibidores/bloqueantes de receptores del SRA a pacientes con COVID-19, la seguridad de los anti-inflamatorios no esteroideos, en particular el ibuprofeno, también ha sido ampliamente cuestionada (Moore *et al.*, 2020). Muchos estudios han discutido si el ibuprofeno aumenta o disminuye la expresión de ECA2 en pulmón y, por tanto, si afecta a la entrada del SARS-CoV-2 (Labandeira-Garcia *et al.*, 2022).

El principal mecanismo de acción del ibuprofeno es la inhibición del enzima COX-2. Estudios previos muestran interacciones entre COX-2 y receptores del SRA en varios tejidos (Wu *et al.*, 2005). Por un lado, se ha demostrado que COX-2 aumenta la liberación de renina y la formación de Ang II, lo que provoca un aumento en la presión arterial por la activación del receptor AT1 (Quadri *et al.*, 2016). Por otro lado, la activación del eje Ang II/AT1 conduce a la producción de mediadores inflamatorios entre los que se encuentra COX-2 (Suzuki *et al.*, 2003). En este caso, el ibuprofeno puede mejorar la respuesta del eje protector ECA2/Ang(1-7)/MasR al inhibir la respuesta de los receptores del eje pro-inflamatorio del SRA (Smart *et al.*, 2020).

Los anti-inflamatorios no esteroideos también participan en la inhibición de la actividad de NF- κ B durante un estado de inflamación. El factor de transcripción NF- κ B controla la expresión de COX-2, entre una gran cantidad de otros mediadores inflamatorios, y tiene múltiples implicaciones en la patogénesis de la infección por SARS-CoV-2. En

primer lugar, se observa que la inhibición de NF- κ B evita la sobreexpresión renal del receptor AT1 en un modelo animal de ratas obesas (Luo *et al.*, 2015). En segundo lugar, otro estudio, utilizando células endoteliales pulmonares, se ha observado que NF- κ B es utilizado por el virus SARS-CoV para regular al alza el micro-ARN-200c-3p, responsable de regular a la baja la ECA2 (Liu *et al.*, 2017b). Por tanto, la seguridad del uso de ibuprofeno en la infección por SARS-CoV-2 se ha cuestionado debido a su capacidad de regular al alza la expresión de ECA2 en diferentes modelos animales, como, por ejemplo, en fibrosis miocárdica de ratas diabéticas (Qiao *et al.*, 2015). Sin embargo, el mecanismo directo por el que lleva a cabo este proceso aún es desconocido.

Por tanto, diversos estudios postulan, que el aumento de ECA2 en el tejido pulmonar, ya sea por el tratamiento de anti-inflamatorios no esteroideos como el ibuprofeno, de bloqueantes del receptor AT1 (ARAI) o de inhibidores de ECA (IECAs), conduciría a una mayor susceptibilidad a la infección viral por SARS-CoV-2, aumentando la gravedad de la infección y conduciendo a un peor pronóstico. Sin embargo, muchos otros estudios han demostrado que un aumento en la actividad de ECA2 es esencial para equilibrar el SRA hacia la respuesta anti-inflamatoria y, por tanto, inhibir respuestas pro-inflamatorias. Así, varios estudios previos han demostrado efectos protectores de la activación del eje ECA2/Ang(1-7) en modelos experimentales de lesiones pulmonares (Rockx *et al.*, 2009; Klein *et al.*, 2013; Sarzani *et al.*, 2020). Por tanto, se necesitan más estudios para establecer los mecanismos de regulación del ECA2, y otros receptores del SRA, por parte de dichos tratamientos, así como su influencia, beneficiosa o perjudicial, en la infección e inflamación ocasionada por SARS-CoV-2 (Figura 3).

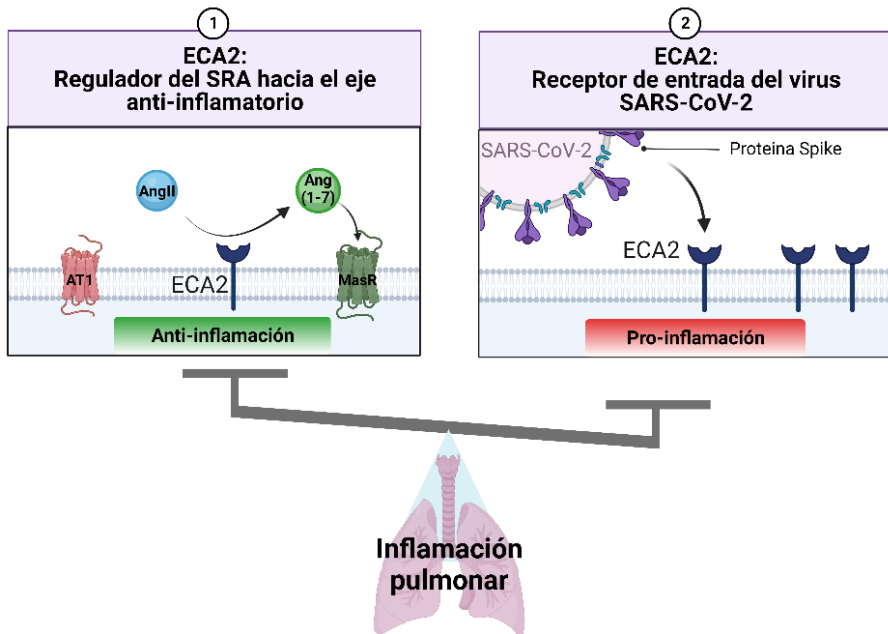


Figura 3: Representación esquemática de la doble función de ECA2 en la inflamación pulmonar inducida por la infección por SARS-CoV-2. El enzima ECA2 (enzima convertora de angiotensina II) es responsable de la conversión de Ang II (angiotensina II) en Angiotensina(1-7) y, por tanto, de regular el SRA (Sistema Renina-Angiotensina) hacia el eje anti-inflamatorio, disminuyendo la actividad del eje pro-inflamatorio mediado por Ang II/AT1 (receptores de angiotensina tipo1) (1). Por otro lado, el ECA2 es el receptor de entrada celular del virus SARS-CoV-2 (coronavirus de tipo 2 causante del síndrome respiratorio agudo severo 2), por lo que su expresión puede asociarse con una mayor susceptibilidad y un aumento en la gravedad de la infección que desemboca en un incremento de la inflamación pulmonar (2).

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Estudios recientes han demostrado que la neuroinflamación es un proceso clave en muchas enfermedades neurológicas. La hiperactivación del receptor AT1 cerebral potencia el estrés oxidativo y la neuroinflamación. En particular, promueve la muerte neuronal dopaminérgica y la respuesta inflamatoria microglial. Por ello, fármacos antagonistas del receptor AT1 (ARAI) podrían resultar altamente eficaces en el desarrollo de nuevas terapias neuroprotectoras. En el caso de la enfermedad de Parkinson, el desarrollo de dichas terapias se ha visto obstaculizado, en parte, por la ausencia de modelos animales que reproduzcan adecuadamente la progresión de la enfermedad de Parkinson humana, sobre todo en referencia a la sinucleinopatía. Además, el estudio de la expresión de los receptores del Sistema Renina-Angiotensina (SRA) en las células microgliales, en situaciones de inflamación, puede ayudar a esclarecer los mecanismos de neuroinflamación y muerte neuronal dopaminérgica, así como, dilucidar la eficacia del uso de terapias moduladoras de los receptores del SRA como tratamientos anti-inflamatorios.

La inflamación periférica crónica también implica a los receptores del SRA. El síndrome metabólico es un claro modelo de inflamación periférica crónica y activación del sistema inmune. La inflamación periférica, podría provocar una desregulación en la expresión de los receptores del SRA cerebral, lo que establecería una relación entre el síndrome metabólico y la neurodegeneración y neuroinflamación características de la enfermedad de Parkinson. El conocimiento de los efectos que, sobre el SRA cerebral y sus receptores podrían inducir el síndrome metabólico es, por consiguiente, de gran interés. Además, el uso de antagonistas del receptor AT1 (ARAI) podría tener, por tanto,

efectos neuroprotectores en eventos de inflamación desencadenados por el síndrome metabólico.

En la inflamación periférica aguda desencadenada por la infección de SARS-CoV-2, también está implicado el SRA. Además, la inflamación periférica aguda que cursa en COVID-19 podría tener efectos a largo plazo sobre la neurodegeneración dopaminérgica, como se ha visto en pandemias previas como la denominada gripe española del pasado siglo. El enzima ECA2 se identificó como el receptor funcional de entrada para el virus SARS-CoV-2. Dada la importancia del SRA en la inflamación periférica, se generó entonces un debate sobre el uso, perjudicial o beneficioso, de tratamientos que modulan el SRA y sus receptores, sobre todo en pacientes de mayor vulnerabilidad a la gravedad por COVID-19 (envejecimiento y síndrome metabólico). Resolver esta cuestión era de vital importancia en los momentos iniciales y más críticos de la pandemia, cuando las vacunas todavía se encontraban en fase de desarrollo.

Objetivo general: Estudiar los receptores de angiotensina en la neuroinflamación e inflamación periférica, así como su implicación en la degeneración dopaminérgica.

Objetivos concretos:

- 1. Estudio de los receptores AT1 en procesos de neuroinflamación y degeneración dopaminérgica inducidos por un modelo de enfermedad de Parkinson basado en sinucleinopatía.**
 - 1.1. Desarrollar y caracterizar un modelo animal de enfermedad de Parkinson basado en la sobreexpresión de la proteína α -sinucleína humana obtenida mediante el empleo de vectores virales adenoasociados serotipo 9.
 - 1.2. Estudiar el posible efecto neuroprotector y anti-inflamatorio del bloqueo del receptor AT1 (candesartán y telmisartán) en el modelo animal generado.

- 2. Estudiar la implicación del receptor AT2 cerebral en la inflamación.**
 - 2.1. Estudiar el papel del receptor AT2 en la neuroinflamación inducida por inflamación periférica crónica (envejecimiento) y aguda (modelo de LPS).
 - 2.2. Estudiar la implicación de los receptores AT2 en la degeneración dopaminérgica.
 - 2.3. Estudiar el dimorfismo sexual del receptor AT2 en células microgliales. Implicaciones en neuroinflamación.

- 3. Estudiar el papel de los receptores de angiotensina en la inflamación periférica crónica del síndrome metabólico y su implicación en la neurodegeneración dopaminérgica.**
 - 3.1. Estudiar la implicación del síndrome metabólico en la expresión de receptores del SRA cerebral, en la inflamación y en la muerte neuronal dopaminérgica. Posible papel neuroprotector del bloqueo del receptor AT1.
 - 3.2. Estudiar la implicación de los autoanticuerpos agonistas de los receptores AT1 en la expresión de receptores y otros componentes del SRA cerebral, inflamación y muerte neuronal dopaminérgica. Posible papel neuroprotector del bloqueo del receptor AT1.

- 4. Estudiar el papel de los receptores de angiotensina en la inflamación periférica aguda del COVID-19.**
 - 4.1. Estudio del efecto de tratamientos moduladores del SRA sobre los receptores y componentes del SRA pulmonar de ratas jóvenes adultas y en modelos animales de inflamación crónica especialmente vulnerables en COVID-19 (envejecimiento y MetS).
 - 4.2. Estudiar el efecto de tratamientos moduladores del SRA sobre receptores y componentes del SRA en modelos *in vitro* de infección pulmonar por SARS-CoV-2

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. IMPLICACIÓN DEL RECEPTOR AT1 EN LA NEUROINFLAMACIÓN Y DEGENERACIÓN DOPAMINÉRGICA EN UN MODELO DE PARKINSON BASADO EN SINUCLEINOPATÍA

3.1.1. Diseño experimental

En la primera parte de esta tesis se desarrolló y caracterizó un novedoso modelo animal de EP basado en la sobreexpresión de la proteína α -syn humana obtenido mediante el empleo de vectores virales adenoasociados serotipo 9 (AAV9, del inglés *Adeno-associated virus 9*) en ratas macho Sprague Dawley, para estudiar la implicación del receptor AT1 en la neuroinflamación y muerte neuronal dopaminérgica (**Objetivo 1**). Se utilizaron dos tipos de AAV9, uno para sobreexpresar la forma salvaje, no mutada (WT, del inglés *wild type*) de la proteína α -syn humana (AAV9- α -syn-WT) y otro para sobreexpresar la forma mutada A53T de la proteína α -syn humana (AAV9- α -syn-A53T). En ambos modelos se estudió la muerte neuronal dopaminérgica, la respuesta inflamatoria microglial y el posible efecto neuroprotector del tratamiento con los bloqueantes del receptor AT1, candesartán y telmisartán.

Los experimentos se realizaron en ratas macho adultas *Rattus norvegicus* de la cepa Sprague-Dawley. Al inicio del experimento los animales contaban con 3 meses de edad y pesaban en torno a 300-350g.

Todos los animales que se utilizaron en esta tesis fueron mantenidos a una temperatura constante de 22°C, bajo un ciclo de 12 horas luz/oscuridad y con acceso *ad libitum* a comida y agua. Los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo con la Directiva del consejo de las Comunidades Europeas 2010/63/UE, a la Directiva 86/609/CEE y el Real Decreto español 526/2014, y fueron aprobados por el comité

correspondiente de la Universidad de Santiago de Compostela. Los procedimientos fueron desarrollados en el centro usuario autorizado de la Facultad de Medicina de la Universidad de Santiago de Compostela, bajo el registro REGA: ES150780263401 y en el Centro de Biomedicina Experimental de la Universidad de Santiago de Compostela (CEBEGA), enmarcados en el proyecto autorizado para experimentación animal con los códigos 15005/15/002 y 5012/2021/012. Los animales dispusieron de un período mínimo de aclimatación de 7 días antes del comienzo de los experimentos y ninguno fue sometido a estudios previos.

Para el estudio se utilizaron un total de 220 ratas macho adultas que se dividieron aleatoriamente en tres grandes grupos (**ANEXO I, Tabla I**):

-**Grupo A**: formado por ratas lesionadas mediante la inyección estereotáxica unilateral en el mesencéfalo derecho y sacrificadas a la semana de la lesión (**Experimento I**). Los animales del grupo A (n = 50) fueron distribuidos en tres subgrupos:

-**Grupo A1**: formado por ratas lesionadas con AAV9- α -syn-WT (n = 5) y un grupo de ratas lesionadas tratadas simultáneamente con candesartán (n = 5) o telmisartán (n = 5), desde 1 semana antes de la lesión hasta el sacrificio.

-**Grupo A2**: formado por ratas lesionadas con AAV9- α -syn-A53T (n = 5) y un grupo de ratas lesionadas tratadas simultáneamente con candesartán (n = 5) o telmisartán (n = 5), desde 1 semana antes de la lesión hasta el sacrificio.

-**Grupo A3**: formado por ratas control (sin lesión estereotáxica; n = 5) y por ratas lesionadas en el mesencéfalo derecho mediante la inyección estereotáxica de solución salina (n = 5), o de vectores AAV9 neuroespecíficos vacíos (Φ) (AAV9-vacío; n = 5), o de AAV9 neuroespecíficos que expresan proteína verde fluorescente (GFP) humana (n = 5), desde 1 semana antes de la lesión hasta el sacrificio.

-Grupo B: formado por ratas lesionadas mediante la inyección estereotáxica unilateral en el mesencéfalo derecho y sacrificadas a las cuatro semanas post-lesión (**Experimento II**). Los animales del grupo B (n = 170) fueron distribuidos en tres subgrupos:

-Grupo B1: formado por (1) ratas lesionadas con AAV9- α -syn-WT (n = 21), (2) ratas lesionadas tratadas simultáneamente con candesartán (n = 18) o telmisartán (n = 18).

- Grupo B2: formado por (1) ratas lesionadas con AAV9- α -syn-A53T (n = 21); (2) ratas lesionadas tratadas simultáneamente con candesartán (n=18) ó (3) telmisartán (n = 18).

-Grupo B3: formado por (1) ratas control (sin lesión estereotáxica; n = 15); (2) ratas lesionadas en el mesencéfalo derecho mediante la inyección estereotáxica de solución salina (n = 15), ó (3) de vectores AAV9 neuroespecíficos vacíos (Φ) (AAV9-vacío; n = 14), ó (4) de AAV9 neuroespecíficos que expresan proteína verde fluorescente (GFP) humana (n = 12).

Los tratamientos con los bloqueantes del receptor AT1, candesartán o telmisartán, de los grupos de animales A y B se administraron por vía oral, dispersos en la mínima cantidad necesaria de crema de avellanas (“Nocilla”; Nutrexa, Barcelona, España). Los tratamientos se iniciaron una semana antes de la inyección estereotáxica y se mantuvieron hasta el sacrificio de los animales con una dosis de 1mg/Kg/día para ambos fármacos, seleccionadas en base a resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio (Garrido-Gil *et al.*, 2012; Rodríguez-Perez *et al.*, 2012). Los animales del grupo control A3 y B3 recibieron únicamente la crema de avellanas. Los tratamientos fueron administrados entre las 9:00-10:00h de cada día.

Para el sacrificio, los animales fueron anestesiados con la combinación de ketamina (50mg/kg) / medetomidina (0,4mg/kg) inyectada intraperitonealmente.

Una parte de las ratas de los diferentes grupos se perfundió con el fin de realizar los estudios histológicos, en los que se analizó la sobreexpresión de α -syn o GFP o α -syn fosforilada en las neuronas dopaminérgicas, en las células microgliales y en astrocitos de la SNpc mediante doble inmunofluorescencia y microscopía confocal de barrido láser. También se realizó inmunohistoquímica para determinar la muerte de células dopaminérgicas (junto con una tinción Nissl) o la respuesta inflamatoria microglial.

Otra parte de las ratas de los diferentes grupos fue utilizada-para determinar los niveles de expresión de receptores del SRA y marcadores de actividad microglial, así como medidas de actividad enzimática. Para ello, los cerebros fueron extraídos, la región de la SNpc disecada y congelada inmediatamente en nitrógeno líquido y posteriormente, almacenada en -80°C . Sobre este material se realizaron determinaciones de RT-qPCR (reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa, del inglés *reverse transcriptase polymerase chain reaction*), WB (Western Blot) y ensayos enzimáticos para determinar la expresión del receptor AT1, actividad NOX, marcadores de actividad fagocítica (CD68, *cluster* de diferenciación 68), y marcadores de microglía con fenotipo pro-oxidante como iNOS (óxido nítrico sintasa inducible), TNF- α , IL-1 β e IL-6 y anti-oxidante(ARG-1).

3.1.2. Modelo de lesión con AAV9- α -syn-WT y AAV9- α -syn-A53T en ratas

El modelo de EP basado en la sobreexpresión de la proteína α -syn humana se realizó mediante la inyección estereotáxica unilateral de los AAV9- α -syn-WT o AAV9- α -syn-A53T (**Grupos A y B**) y salino, AAV9-vacío o AAV9-GFP (**Grupo C**).

Todos los vectores virales utilizados en el presente modelo fueron sintetizados y diseñados en el laboratorio de Neuroanatomía de los Ganglios Basales del Dr. José Luis Lanciego, en el Centro de Investigación Médica Aplicada de la Universidad de Navarra, España.

Para realizar la cirugía, los animales fueron anestesiados con una inyección intraperitoneal de una combinación de ketamina (50mg/kg) / medetomidina (0,4mg/kg) y fueron colocados en el aparato de

estereotaxia (Kopf Instruments) con la barra dental a -2,3 mm. La inyección se realizó en el mesencéfalo dorsal derecho siguiendo las coordenadas: -5,4 mm anterior al bregma, -1,9 mm a la derecha de la línea media y -7,0 mm ventral a la duramadre (Paxinos y Watson, 1986). La solución se inyectó usando una jeringa Hamilton de 5 μ l acoplada a un inyector monitorizado (Stoeling), a una velocidad de 0,5 μ l/min (2 μ l para el grupo AAV9- α -syn-WT y 1 μ l AAV9- α -syn-A53T) y la aguja se mantuvo *in situ* en torno a 10 minutos una vez se realizó la inyección para evitar el reflujo del vector viral a través del tracto de la inyección.

3.1.3. Pruebas de comportamiento motor del modelo de lesión con α -syn

Tras 4 semanas de lesión se realizaron pruebas de comportamiento animal para evaluar la eficacia de la lesión dopaminérgica inducida por la inyección de AAV9- α -syn-WT o AAV9- α -syn-A53T, así como el efecto neuroprotector de los ARAII, candesartán y telmisartán. Todas las pruebas motoras se realizaron durante el período de oscuridad, en el cual los animales se encuentran en su fase activa del ciclo.

-Test del cilindro: se realizó para evaluar la acinesia de las extremidades anteriores (Schallert *et al.*, 1997). Los animales se colocaron individualmente en un cilindro de vidrio de 20cm de diámetro con dos espejos, para permitir la visualización desde todas las direcciones. Los animales fueron grabados en video y se contó el número de contactos que realizan con cada una de sus extremidades anteriores en la pared del cilindro, hasta un total de 20 contactos. Los datos se expresaron como porcentaje de contactos con la extremidad impedida en relación con el total.

-Test de actividad locomotora: la actividad locomotora global de los animales se monitorizó automáticamente con un analizador de movimiento Videomex-X (Columbus Instruments), el cual realiza un vídeo que monitoriza la imagen a tiempo real (20 fotogramas por segundo; Rozas *et al.*, 1996). Con el programa de monitorización de movimiento múltiple se estimó la actividad total (tasa de movimiento) que representa la

cantidad de cambios en la imagen de un fotograma a otro. De este modo, el programa cuenta el número de cambios de píxeles causados por los movimientos de cada animal. El ensayo se llevó a cabo en una caja abierta de paredes y suelo negros, con las siguientes dimensiones: 70 x 75 x 40 cm. Cada animal se aclimató durante, al menos, 10 minutos, y se monitorizó la actividad locomotora durante 30 minutos.

-Test del rotarod: permite una evaluación automatizada de los déficits motores generales ocasionados en modelos de EP y una identificación de los cambios inducidos por tratamientos neuroprotectores (Rozas *et al.*, 1997). Se realizó con una unidad de rotarod automatizada de 4 carriles (CR-1 Rotamex System, Columbus Instruments, Columbus, OH) aplicando un protocolo de velocidad de rotación acelerada. Los animales fueron colocados en la barra giratoria, a una velocidad inicial de 4 revoluciones por minuto (rpm). A continuación, se incrementó la velocidad de la barra hasta 44 rpm durante 90 segundos, y se registró el tiempo total de carrera sobre la barra. Los animales fueron entrenados 2 días consecutivos para alcanzar un rendimiento estable en la prueba, y los datos se tomaron en los 3 días siguientes de forma consecutiva. Los resultados se obtuvieron como la media de los 3 días para cada animal. Finalmente, se presentaron los resultados de cada animal como el área bajo la curva (AUC del inglés *Area Under Curve*; Rozas *et al.*, 1997; Lundblad *et al.*, 2003).

3.1.4. Técnicas de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia en el modelo de lesión con α -syn

La técnica de inmunohistoquímica se realizó para confirmar la lesión dopaminérgica mediante el marcaje y conteo de células inmunorreactivas al marcador de tirosina hidroxilasa (TH-ir, junto con una tinción de Nissl) y para estudiar la respuesta inflamatoria microglial mediante el marcaje y conteo de células inmunorreactivas para MHC de clase II (OX-6-ir).

Los animales fueron anestesiados y perfundidos con 0,9% de salino e inmediatamente después con paraformaldehído frío al 4% en 0,2M de tampón fosfato (0,162M de Na_2HPO_4 y 0,036M NaH_2PO_4), a pH 7,4. Tras la perfusión, los cerebros fueron extraídos, lavados y almacenados durante 48 horas en una solución crioprotectora (tampón fosfato con 20% de sacarosa) a 4°C. A continuación, el tejido fue cortado en secciones de 40 μm usando un microtomo de congelación y se almacenaron en una solución crioprotectora a -20°C hasta su procesamiento.

En primer lugar, se seleccionaron secciones a nivel de la SN y del ST. Las secciones de tejido fueron incubadas 1 hora a temperatura ambiente en una solución con 10% de suero porcino normal, 0,25% de Triton X-100 en 20mM de PBS (buffer fosfato salino) potásico (KPBS) que contenían 1% de BSA (seroalbúmina bovina, del inglés *bovine serum albumin*) (KPBS-BSA). Posteriormente las secciones fueron incubadas a 4°C durante toda la noche con los anticuerpos primarios correspondientes (Tabla 2).

Tirosina hidroxilasa (TH): se trata del enzima limitante en la síntesis de DA, considerándose un marcador de neuronas dopaminérgicas. Se utilizó, por tanto, un anticuerpo primario anti-TH (1:10.000, T2928, Sigma; ver Tabla 2)

MHC de clase II (OX-6): se trata de un complejo proteico que desempeña un papel importante tanto en la respuesta inmunitaria innata como en la adaptativa, y se ha demostrado su expresión en microglía por inducción de α -syn en experimentación *in vivo* e *in vitro* (Harms *et al.*, 2013). Se considera un marcador de microglía con respuesta inflamatoria, por lo que se utilizó un anticuerpo anti-MHCII (1:50, MCA46G, BioRad, ver Tabla 2).

Todos los anticuerpos primarios fueron diluidos en una solución con 2% de suero normal de caballo, 0,25% de Triton X-100 en 20mM de KPBS con un 1% de BSA. Al día siguiente, las secciones se incubaron durante 90 minutos en los correspondientes anticuerpos secundarios biotinilados (caballo anti-ratón, 1:200, ver Tabla 3) y, a

continuación, se trataron durante 90 minutos con un complejo avidina-biotina-peroxidasa (1:50, Vector, Burlingame, CA) a temperatura ambiente. Finalmente, las secciones se revelaron con 0,04% de peróxido de hidrogeno y 0,005 % de 3,3'-diaminobezidina (DAB). Para intensificar la tinción microglial (OX-6) se añadió 0,1% de níquel a la solución del revelado. Para la tinción de control negativo, las secciones se incubaron en solución, sin anticuerpos primarios. Una vez reveladas, las secciones se montaron en portaobjetos recubiertos de gelatina para su visualización. Las microfotografías fueron realizadas empleando el microscopio Eclipse, NIKON (139263, Japón).

Para confirmar la muerte de las células dopaminérgicas, y no sólo la disminución de la actividad enzimática de TH, se realizó una tinción de Nissl. Para ello se seleccionaron secciones a nivel de SN, se montaron en portaobjetos recubiertos con gelatina y se tiñeron durante 5 minutos con violeta de Cresilo al 1% (C0775, Sigma) disuelto en agua destilada. A continuación, las secciones teñidas se deshidrataron mediante etanol graduado (100%, 95%, 70% y 50%), se aclararon en xileno durante 5 minutos, se montaron con medio de montaje DPX (Panreac Applichem, Barcelona, España) y se cubrieron con un portaobjetos para su posterior visualización y contaje.

La técnica de inmunofluorescencia se realizó para confirmar la sobreexpresión y colocalización de α -syn, GFP o α -syn fosforilada en las neuronas dopaminérgicas (TH-ir), las células microgliales (Iba-1-ir, molécula adaptadora de unión a calcio ionizado 1, del inglés *Ionized calcium binding adaptor molecule 1*), y astrocitos (GFAP-ir, proteína ácida fibrilar glial, del inglés *anti-glia fibrillary acidic protein*) en la SNpc utilizando microscopía confocal de barrido láser.

Los cerebros fueron procesados como se ha descrito anteriormente y las secciones correspondientes al nivel de la SNpc fueron utilizadas para el estudio.

Para el análisis de expresión de la proteína α -syn humana en los diferentes tipos celulares, se realizó una recuperación antigénica en las secciones. Para ello, las secciones fueron incubadas a 37°C durante 30 minutos en tampón citrato de sodio (10 mM de citrato de sodio, 0,05%

de Tween 20, pH 6,0). Posteriormente, las secciones se incubaron en solución salina tamponada con KPBS-BSA y 5% de suero porcino normal durante 60 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se incubaron a 4°C durante toda la noche con los anticuerpos primarios (Tabla 2).

Por un lado, se realizó un marcaje de doble inmunofluorescencia para identificar las células que expresan GFP, α -syn o α -syn-fosforilada. Por otro lado, los anticuerpos contra α -syn se combinaron con TH, GFAP o Iba-1 para estudiar su posible colocación con los marcadores celulares para neuronas dopaminérgicas, astrocitos y microglía, respectivamente (Tabla 2).

Tras la incubación de los anticuerpos primarios, la inmunorreacción se visualizó con los correspondientes anticuerpos secundarios fluorescentes (Tabla 3). Por último, las secciones se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente con el colorante de unión al ácido desoxirribonucleico (ADN) Hoechst 33342 (10 μ g/ml; 3 x 10⁻⁵ M, sigma) en KPBS para la tinción nuclear. Las secciones se montaron en portaobjetos recubiertos de gelatina y se cubrieron con Shandon Immu Mount (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA).

Antígeno	Especie	Tipo	Dilución	Casa Comercial /Referencia
TH	Ratón	Monoclonal	1:10000	Sigma / T2928
OX-6	Ratón	Monoclonal	1:50	BioRad / MCA46G
α -syn-WT	Ratón	Monoclonal	1:500	Abcam / ab80627
α -syn-A53T	Ratón	Monoclonal	1:200	Invitrogen / 18-0215
α -syn-fosforilada	Conejo	Monoclonal	1:1000	Abcam / ab51253
TH	Conejo	Policlonal	1:1000	Merck Millipore / ab152
GFAP	Ratón	Monoclonal	1:500	Merck Millipore / MAB360
Iba-1	Conejo	Policlonal	1:500	Wako / 019-19741

Tabla 2: Anticuerpos primarios utilizados en inmunohistoquímica e inmunofluorescencia en el modelo de lesión con AAV9- α -syn. Abreviaturas: TH, Tiroxina Hidroxilasa; OX-6, MHC de clase II; α -syn, α -sinucleína; WT, forma salvaje; GFAP, proteína ácida fibrilar glial; Iba-1, molécula adaptadora de unión a calcio ionizado 1.

Antígeno	Especie	Dilución	Casa Comercial / Referencia
IgG Ratón	Caballo	1:200	Vector Laboratories / BA2001
IgG Conejo	Mono	1:200	Molecular Probes / A-21202 (Alexa Fluor 568)
IgG Ratón	Burro	1:200	Molecular Probes / A-10042 (Alexa Fluor 488)

IgG Ratón	Cabra	1:200	Molecular Probes / A-11004 (Alexa Fluor 568)
-----------	-------	-------	--

Tabla 3: Anticuerpos secundarios utilizados en inmunohistoquímica e inmunofluorescencia en el modelo de lesión con AAV9- α -syn. Abreviaturas: IgG, inmunoglobulina de tipo G

3.1.4.1. Cuantificación estereológica y densidad de terminales estriatales

El número total de neuronas TH positivas (TH-ir), de células OX-6 positivas (OX6-ir) y el número total de neuronas de la SNpc se estimaron mediante el método de estereología imparcial (fraccionador óptico) utilizando un sistema Olympus CAST-Grid (Computer Assited Stereological Toolbox; Olympus, Ballerup, Dinamarca). La cuantificación se realizó en la SNpc de, al menos, seis secciones elegidas al azar para cada uno de los grupos experimentales mediante una rejilla estereológica (fraccionador), y se estimó el volumen de la SNpc según el método de Cavalieri (Gundersen *et al.*, 1988; Rey *et al.*, 2007).

La densidad de los terminales dopaminérgicos estriatales se estimó con la ayuda del software de análisis de imágenes NIH-Image 1.55 (National Institutes of Health, Bethesda, MD) en un ordenador acoplado a una videocámara (CCD-72, DAGE-MTI, INC, Michigan City, IND) y a una mesa de luz de iluminación constante (Northern Light, St. Catharines, Canadá). Se midieron, al menos, cuatro secciones del ST central y, para cada sección, se corrigieron las densidades ópticas mediante la diferencia del fondo seleccionada en el cuerpo caloso.

3.1.4.2. Microscopia confocal: análisis de colocalización

Las secciones de inmunofluorescencia se visualizaron con un microscopio confocal de barrido láser (AOBS-SP5X; Leica Microsystems Heidelberg GmbH, Mannheim, Alemania). Para el análisis de colocalización de GFP, α -syn o α -syn fosforilada con los diferentes tipos celulares, se obtuvieron tres imágenes de la SNpc por animal en diferentes coordenadas de su eje antero-posterior (-5'20, -5'60 y -6'04 mm desde el bregma). Las imágenes se obtuvieron con el objetivo 10x utilizando parámetros de microscopia constantes y una intensidad de láser similar. Se delimitó la SNpc en cada imagen y se

midió la tasa de colocalización de α -syn con los diferentes marcadores celulares mediante el software LAS AF Lite (Leica).

3.1.5. Cromatografía de alto rendimiento para el modelo de lesión de α -syn

La técnica de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC, del inglés *High Performance Liquid Chromatography*) fue empleada para la medición de DA y sus metabolitos, el ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC, del inglés *3,4-dihydroxyphenylacetic acid*) y el ácido homovanílico (HVA) en el ST de ratas lesionadas.

En primer lugar, el tejido estriatal animal fue homogenizado con ayuda de un politrón y centrifugado a 14.000 g durante 20 minutos a 4°C. A continuación, se filtró el sobrenadante con filtros de 0,22 μ m y se inyectaron 20 μ l/inyección directamente en el HPLC (Shimadzu LC prom-ence, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japón). DA, DOPAC y HVA se separaron en una columna analítica de fase inversa (Waters Symmetry300C18; Waters, Milford, MA). La fase móvil (pH = 4) consistió en una solución del 10% de MeOH, 70mM de KH_2PO_4 , 1mM de ácido octanosulfónico y 1mM de EDTA y se administró a una velocidad de 1ml por minuto. La detección se realizó con un detector electroquímico coulométrico (ESA Coulochem III; ESA, Chelmsford, MA). Los datos se adquirieron y procesaron con el software Shimadzu LC solution (Shimadzu Coporation) y el resultado se expresó como nanogramos por miligramo de tejido húmedo. Se calculó la relación DOPAC/DA para cada uno de los animales como índice del recambio de DA (Garrido-Gil *et al.*, 2018).

3.1.6. Análisis de la proteína α -syn mediante western blot

Los niveles de expresión de las proteínas α -syn y α -syn fosforilada se determinaron mediante la técnica de WB. En primer lugar, se realizó una extracción de proteínas específicamente según la muestra:

-Extracción para análisis de α -syn: las fracciones de tejido pertenecientes a la SN se homogenizaron con ayuda de un politrón en un tampón de radioinmunoprecipitación que contenía inhibidores de proteasas (P8340, Sigma), fluoruro de

fenilmetilsulfonilo (P7626, Sigma) e inhibidores de fosfatasa (P5726, Sigma). El homogenado resultante se centrifugó 20 minutos a 12.000 g y se recogió el sobrenadante.

-Extracción para análisis de α -syn-fosforilada: las fracciones de SN se homogenizaron con ayuda de un politrón en un tampón de radioinmunoprecipitación que contenía inhibidores de proteasas, fluoruro de fenilmetilsulfonilo e inhibidores de fosfatasa. Posteriormente, los homogenizados se incubaron 1 hora en hielo, se ultracentrifugaron durante 30 minutos a 120.000 g y se recogió el sobrenadante resultante (Van der Perren *et al.*, 2015).

Las concentraciones de proteína de los sobrenadantes se determinaron mediante el ensayo de proteínas BCA (Pierce 23225). La absorbancia a 525 nm fue medida en el lector de placas TECAN, infinite M20, y el método de análisis cuantitativo se realizó a partir de una recta patrón utilizando diluciones seriadas de la proteína BSA. Las muestras se diluyeron en buffer de radioinmunoprecipitación y tampón de carga, se desnaturalizaron con un choque térmico, calentándolas durante 4 minutos a 95°C y se procedió a la separación de las proteínas utilizando una electroforesis discontinua con geles de poliacrilamida Bis-Tris al 8%-12%. La electroforesis fue realizada en una fuente de voltaje (BioRad). A continuación, se realizó la transferencia de las proteínas desde el gel de poliacrilamida a una membrana de nitrocelulosa.

Para el análisis de las proteínas de pequeño peso molecular como α -syn y α -syn-fosforilada, las membranas fueron fijadas con paraformaldehído al 0,4% durante 30 minutos a temperatura ambiente antes de bloquearlas con el agente fosfobloqueante (10%; AKR-103, Cell Biolabs, San Diego, CA) durante 1h a RT.

Finalmente, las membranas se incubaron durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario correspondiente (α -syn, 1:1000, abcam ab138501; α -syn fosforilada, 1:1000, abcam ab51253).

Tras la incubación del anticuerpo primario, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de HRP: IgG anti-conejo, 1:2500 (Santa Cruz, sc-2357) durante 1 hora a

temperatura ambiente. Las bandas inmunoreactivas se detectaron con un kit de quimioluminiscencia HRP (170–5044; Bio-Rad, Hercules, CA, USA) que se visualizó en un sistema de detección de quimioluminiscencia (Molecular Imager ChemiDoc XRS System, Bio-Rad). A continuación, las membranas fueron tratadas con una solución de lavado para realizar la incubación con el control de carga GAPDH (1:25.000, G9545, Sigma). El nivel de expresión de las proteínas se cuantificó por densitometría de cada una de las bandas usando el software Quantity One y se expresó en relación con el valor de la banda control de GAPDH. Los datos se normalizaron con respecto a los valores del grupo control de la misma membrana (es decir, se expresaron en relación con el valor obtenido para el grupo control, 100%) y se expresaron como medias \pm error estándar de la media (SEM, del inglés *Standard error of the mean*).

3.1.7. Extracción de ARN, RT-PCR Y Q-PCR del modelo de lesión con α -syn

La expresión de ARNm del receptor AT1, de marcadores de actividad fagocítica CD68, y de marcadores de respuesta inflamatoria microglial (iNOS; TNF- α , IL-1 β e IL-6) y fenotipo antiinflamatoria, anti-oxidante (ARG-1), fue analizada mediante el método de RT-PCR y Q-PCR.

Para ello el ARN total de la SN fue homogenizado en Trizol (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante, con ayuda de un politrón. Las concentraciones de ARNm se estimaron utilizando una placa NanoQuant y un lector de placas Infinite M200 (TECAN, Salzburgo, Austria). El ARNm total (1 μ g) se retrotranscribió a ácido desoxirribonucleico complementario a través de Reverse transcriptase (RT), añadiendo a la reacción desoxinucleótidos trifosfato, cebadores aleatorios y la enzima transcriptasa inversa MMLV (del inglés *Moloney Murine Leukemia Virus reverse transcriptase*; 200 U; Invitrogen). Posteriormente, se utilizó la reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (q-PCR) para examinar los niveles relativos de ARNm a los transcritos correspondientes (Tabla 4). Los experimentos se realizaron con una plataforma de reacción en cadena de la polimerasa iCycler en tiempo real (Bio-Rad) o utilizando un termociclador (QuantStudio 3

Real-Time PCR Systems; ThermoFisher) para amplificar en paralelo los genes de interés y los genes que se usan como transcrito normalizador (β -Actina). Las muestras de cada animal se analizaron por duplicado.

Para cada gen fue diseñada una pareja de oligonucleótidos (*forward* y *reverse*) utilizando el programa Primer-BLAST NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>) (Tabla 4). Los oligonucleótidos se diseñaron teniendo en cuenta que estuviesen ubicados entre exones, para así evitar la amplificación de ADN genómico. Cuando esto no fue posible, las muestras fueron tratadas con un kit de DNAasa (EN0521; ThermoScientific) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se utilizó el método de los valores umbrales de ciclo comparativo (Ct, del inglés *Cycle threshold*) para examinar la expresión relativa del ARNm, en el que se obtiene un valor normalizado restando el Ct del transcrito normalizador al Ct del transcrito de interés (Δ Ct). Finalmente, se utilizó el parámetro delta-delta Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) para expresar los datos de expresión relativa (Livak y Schmittgen, 2001; Pfaffl, 2001). Los resultados se expresaron como valores medios \pm SEM.

3.1.8. Análisis de inflamación por actividad enzimática y ELISA en el modelo de lesión con α -syn

-Actividad enzimática de NOX: la actividad de NOX del tejido mesencefálico de rata se midió mediante quimioluminiscencia potenciada por lucigenina en un lector de placas multipocillo Infinite M200 (TECAN). El tejido fue homogenizado en un tampón de lisis (10^{-1} mol/L de K_2HPO_4 , 10^{-3} mol/L fluoruro de fenilmetilsulfonilo, 0.2% Triton X-100), centrifugado a 12.000g durante 30 minutos a 4°C, se recogieron los sobrenadantes y se les analizó la concentración de proteína con un kit de ensayo de proteínas BCA de Pierce (Thermo Scientific, Fremont, CA). La actividad de NOX se midió sobre los sobrenadantes en presencia de su sustrato NADPH (10^{-4} mol/L; Sigma) y lucigenina (5×10^{-6} mol/L; Sigma). La reacción se realizó con 10-20 μ l tejido homogenizado que contenía entre 20-50 μ g de proteína

(Griendling *et al.*, 2000; Hong *et al.*, 2006). La quimioluminiscencia se expresó como unidades de luz relativas (ULR/mg de proteína x min).

-Kit ELISA de TNF- α tisular: el tejido mesencefálico de rata se homogeneizó en un tampón RIPA que contenía un cóctel de inhibidores de la proteasa (P8340, Sigma) y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (P7626, Sigma). A continuación, se centrifugó a 12.000g durante 20 minutos a 4 °C, y se midieron las concentraciones de proteína, mediante un ensayo de proteínas BCA de Pierce (Thermo Scientific, Fremont, CA). Los niveles de TNF- α se cuantificaron en los sobrenadantes con un kit de ensayo inmunoenzimático (ELISA, del inglés *enzyme-linked immunosorbent assay*) según las instrucciones del fabricante (TNF- α de rata de Diaclone 865.000.96, Gen-Probe Diaclone SAS, Besançon, Francia) usando un lector de placas multipocillo Infinite M200 (TECAN). Por último, el contenido de TNF- α se obtuvo en pg/mL de proteína y se expresó como porcentaje del contenido en las muestras del grupo de control.

3.2. IMPLICACIÓN DEL RECEPTOR AT2 EN INFLAMACIÓN

3.2.1. Diseño experimental

En la siguiente parte de esta tesis se estudió (1) el papel de los receptores AT2 en la neuroinflamación inducida por inflamación periférica crónica (envejecimiento) y aguda (modelo de inflamación por LPS), así como su implicación en la muerte neuronal dopaminérgica, y (2) el dimorfismo sexual del receptor AT2 en células microgliales (**Objetivo 2**). Para ello se utilizaron un total de 257 animales, una línea celular microglial y cultivos primarios de microglía. Los experimentos de dividieron en 3 grandes grupos (**ANEXO I, Tabla II**):

-Grupo 1: se realizaron experimentos *in vivo* para estudiar el efecto de la ausencia del receptor AT2 en el comportamiento motor, en la expresión y metabolismo del sistema dopaminérgico, en la muerte neuronal dopaminérgica de la SNpc y en la expresión de componentes y receptores del SRA en la inflamación periférica crónica mediada por el envejecimiento (**Experimento III**). Para ello se utilizaron los siguientes animales de investigación, formado por grupos aleatorizados: ratones macho C57/BL6 adultos jóvenes (2 meses), de

mediana edad (12 meses) y envejecidos (18 meses), y ratas adultas jóvenes (n = 6) y envejecidas (n = 6). Las cepas de ratón utilizados fueron:

-La cepa de tipo salvaje u homocigótica (WT; Charles River, Francia).

-La cepa *knock-out* (KO) para el receptor AT2 (AT2KO; Dr. Daniel Henrion).

Los ratones se dividieron en cuatro subgrupos (A-D):

-Grupo 1A: formado por ratones WT adultos jóvenes (n = 7) y ratones AT2KO adultos jóvenes (n = 7); por ratones WT de mediana edad (n = 7) y ratones AT2KO de mediana edad (n = 7); y por ratones WT envejecidos (n = 7) y ratones AT2KO envejecidos (n = 7). El grupo 1A se utilizó para estudiar los efectos de la inflamación crónica mediada por el envejecimiento, la deficiencia del receptor AT2 y su interacción en la función nigroestriatal (actividad locomotora, metabolismo de la DA, expresión de receptores de DA), los marcadores pro-inflamatorios y pro-oxidativos así como los principales componentes y receptores del SRA. Las pruebas de comportamiento se realizaron durante la semana anterior al sacrificio de los animales y durante el período de oscuridad, en el cual los animales se encuentran en su fase activa del ciclo.

-Grupo 1B: este grupo fue utilizado para estudiar el efecto de la inflamación periférica aguda (modelo de LPS) en la expresión de componentes y receptores del SRA cerebral. Fue formado por ratones adultos jóvenes AT2KO tratados con solución salina (n = 7) o con LPS (lipopolisacárido; 5 mg/kg por inyección intraperitoneal; n = 5). Los animales fueron sacrificados 24 h después para observar la respuesta al estímulo inflamatorio del LPS en ausencia de receptores AT2.

-Grupo 1C: formado por ratones adultos jóvenes AT2KO (n = 5) y WT (n = 4). Los ratones fueron perfundidos y preparados para técnicas histológicas con el fin de investigar una posible

pérdida de neuronas dopaminérgicas en la SNpc en ausencia del receptor AT2.

-Grupo 1D: formado por ratones adultos AT2KO y WT (n=21) y ratas jóvenes (n=6) y envejecidas (n=6). Los animales fueron utilizados para confirmar los resultados obtenidos en experimentos *in vitro* (ver más adelante) en referencia a la regulación del receptor AT2 en la expresión del ARNm del receptor AT1.

Para los estudios bioquímicos (grupos 1A y 1B), los ratones fueron sacrificados, los cerebros fueron extraídos, se disecó la región de la SNpc y se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido y, posteriormente, almacenada en -80°C. Además, se utilizaron mitocondrias puras aisladas del cerebro de ratón para evaluar la actividad de la citocromo C oxidasa (COX). Los animales del grupo 1D se utilizaron para aislar la microglía y neuronas dopaminérgicas de los cerebros adultos, que se obtuvieron mediante la clasificación magnética de la microglía (utilizando microperlas anti CD11b) y la microdisección por captura láser, respectivamente.

-Grupo 2: se realizaron experimentos *in vitro* para estudiar los mecanismos moleculares implicados en la regulación de los receptores AT2 en células microgliales en estado de inflamación y su implicación en la muerte neuronal dopaminérgica (**Experimento IV**). Para ello se emplearon dos subgrupos:

-Grupo 2A: Un primer grupo de experimentos se realizó para estudiar el papel de la interacción de los receptores AT1/AT2 microgliales en condiciones de inflamación microglial. Para ello, se utilizaron cultivos de microglía primaria y la línea celular microglial N9, tratados con LPS (10 nM; Sigma) o con LPS y/o el agonista para el receptor AT2, CGP-42112 (CG, 200 nM; Sigma), o LPS y/o el antagonista del receptor AT1 (ARAI), ZD-7155 (1 µM; Sigma). Los agonistas y/o antagonistas se administraron 30 minutos antes de añadir el tratamiento con LPS (n = 6, por grupo). Después de 24 horas, se recogieron las células y/o el medio de cultivo para determinar la

expresión de ARNm y proteínas de los receptores AT1 y AT2, la actividad NOX, la liberación de TNF- α y la actividad de ROCK. Las dosis utilizadas se seleccionaron en función de estudios anteriores (Borrajo *et al.*, 2014a, 2014b; Dominguez-Meijide *et al.*, 2017). También se determinó el efecto de la supresión del receptor AT2 en la expresión del receptor AT1 utilizando microglía primaria de ratón AT2KO.

-Grupo 2B: se utilizó para investigar los posibles mecanismos implicados en la regulación de la expresión del receptor AT1 mediados por AT2 durante la respuesta inflamatoria microglial inducida por LPS. Para ello se utilizaron cultivos de microglía primaria y línea celular microglial N9 tratadas con LPS (10nM) y/o con el inhibidor del enzima NOS, N ω -Nitro-L-arginina metil éster clorhidrato (L-NAME, 100 μ M, Sigma), o el inhibidor específico para el enzima GMPC, 1H-[1,2,4]-oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ, 10 μ M; Sigma), o el inhibidor específico del factor de transcripción Sp1, Mitramicina A (MMA, 400nM; Sigma) o el antagonista del receptor Mas, A779 (1 μ M; Bachem). Algunos cultivos fueron tratados con LPS o LPS más CG para estudiar posibles efectos de la activación de AT2 en la activación de los factores de transcripción Sp1 y Sp3. Los distintos inhibidores se administraron 30 minutos antes de la adición del tratamiento con LPS (n = 6, por grupo), y se determinó la expresión del ARNm y de la proteína del receptor AT1 o la actividad de los factores de transcripción Sp1 o Sp3 24 h después. Las dosis utilizadas en los experimentos se seleccionaron en la base a estudios anteriores con L- NAME y A779 (Costa-Besada *et al.*, 2018), ODQ (Nimmervoll *et al.*, 2009) y MMA (Wang *et al.*, 2014a).

Todos los datos procedentes de los experimentos de cultivos celulares se obtuvieron de, al menos, tres experimentos independientes con, al menos, n = 6, por grupo.

-Grupo 3: se realizaron experimentos para estudiar el dimorfismo sexual en la expresión del receptor AT2 y su influencia en la

neuroinflamación y generación de mediadores inflamatorios (**Experimento V**). Para ello se realizaron los siguientes subgrupos:

-Grupo 3A: se aislaron células microgliales adultas de cerebros de ratones WT machos (n = 14), hembras (n = 14) y hembras ovariectomizadas (OVX) (n = 14) y se usaron para estudiar el efecto del sexo y de los niveles de estrógeno circulante sobre la expresión del ARNm del receptor AT2 y de citoquinas anti-inflamatorias (IL-10) y pro-inflamatorias (IL-1 β , IL-6). Se usaron dos cerebros de ratón para obtener una muestra de células microgliales. Un segundo grupo de ratones WT machos (n = 8) y hembras (n = 8) se perfundieron rápidamente con solución salina fría, se extrajeron los cerebros y se procesaron para el aislamiento microglial, como controles para excluir cualquier contaminación por células sanguíneas circulantes. Se incluyó un grupo adicional de ratones WT machos (n = 5) y hembras (n = 10) para observar la expresión de ARNm de los receptores AT2 en células microgliales en secciones de tejido cerebral que contenían la SNpc mediante hibridación *in situ* con RNAscope.

-Grupo 3B: se aislaron células microgliales adultas de ratones macho AT2KO (n = 14), ratones hembra AT2KO (n = 14) y ratones hembra AT2KO ovariectomizados (n = 14) para evaluar el efecto de la ausencia del receptor AT2 en las diferencias relacionadas con el sexo y los niveles de estrógeno circulante en la expresión de citoquinas pro y anti-inflamatorias.

-Grupo 3C: se aislaron células microgliales adultas de ratones hembra WT (n = 8) y ratones hembra AT2KO (n = 8) tratados con LPS (5 mg/kg por inyección intraperitoneal) o con salino (n = 8) y sacrificados 24 h más tarde para observar la respuesta inflamatoria periférica aguda en presencia y en ausencia del receptor AT2, y entre machos y hembras.

-Grupo 3D: se investigaron otros posibles mecanismos implicados en las diferencias de sexo observadas en la expresión del receptor AT2 microglial. En un primer experimento, los ratones WT macho fueron orquiectomizados bilateralmente (n =

10) para analizar los posibles efectos de las hormonas gonadales masculinas. En un segundo experimento, las crías WT hembra (n = 12) se sometieron a masculinización cerebral mediante inyecciones subcutáneas de benzoato de estradiol.

3.2.2. Pruebas de comportamiento motor en un modelo de envejecimiento

Para estudiar la implicación del receptor AT2 en el comportamiento motor influenciado por la inflamación periférica crónica que cursa el envejecimiento, se realizaron las pruebas de comportamiento motor: test de actividad locomotora y test de rotarod, descritas de forma detallada en el apartado anterior **3.1.3. Pruebas de comportamiento motor del modelo de lesión con α -syn**

3.2.3. Inmunohistoquímica de TH y análisis estereológico

El efecto de la ausencia del receptor AT2 sobre la supervivencia de neuronas dopaminérgicas fue estudiado mediante el análisis inmunohistoquímico del marcador TH en la región de la SNpc de ratones WT y AT2KO, descrito en el apartado **3.1.4. Técnicas de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia en el modelo de lesión con α -syn**.

3.2.4. Cromatografía de alto rendimiento del sistema dopaminérgico

Con el fin de estudiar la influencia del receptor AT2 en el sistema dopaminérgico estriatal, se analizaron los niveles de DA y su metabolito DOPAC en el estriado de ratones WT y AT2KO mediante la técnica HPLC descrita en el apartado **3.1.5. Cromatografía de alto rendimiento para el modelo de lesión de α -syn**.

3.2.5. Microdissección por captura láser

La microdissección por captura láser de las neuronas de la SN de ratón fue realizada siguiendo el protocolo descrito previamente por Garrido-Gil *et al.*, (2017), con ligeras modificaciones. Los cerebros fueron extraídos rápidamente, congelados con nitrógeno líquido y almacenados a -80°C. Posteriormente, se cortaron secciones coronales

con un criostato (Thermo Scientific) a un grosor de 20 μ m a nivel de la SN. Dichas secciones se montaron en un portaobjetos de vidrio y fueron teñidas con un protocolo acordado para rojo neutro al 1% en agua DEPC, durante 2 minutos en frío. Finalmente, las secciones de tejido fueron deshidratadas con concentraciones crecientes de etanol y se les realizó la microdissección por captura láser usando el sistema PALM MicroBeam (Zeiss) controlado por el software Robo PALM.

Las neuronas dopaminérgicas de la SN se visualizaron bajo microscopía de campo brillante con un aumento de 40x con la ayuda de una cámara AxioCam Icc (Zeiss). Se seleccionaron grupos de células (1000 neuronas por animal) usando el software correspondiente, y luego se cortaron y catapultaron mediante pulsos de láser a una tapa de microtubo adhesivo (Zeiss). Los grupos de células se lisaron inmediatamente durante 30 minutos a temperatura ambiente en un tampón de lisis (RNesy Microkit, Qiagen) y se almacenaron a -80°C hasta la posterior extracción de ARNm.

3.2.6. Aislamiento de mitocondrias cerebrales y análisis de la actividad del citocromo c oxidasa

En homogenados cerebrales de ratones WT y AT2KO jóvenes (2 meses), adultos (12 meses) y envejecidos (18 meses) se midió la actividad del complejo IV de la cadena respiratoria mitocondrial (COX IV) como marcador de la función mitocondrial y la producción de ROS, ya que la disfunción mitocondrial (es decir, la disminución de la actividad del complejo IV) se ha asociado con el estrés oxidativo observado durante el envejecimiento (Payne y Chinnery, 2015). En primer lugar, se aislaron las mitocondrias cerebrales. Para ello el tejido cerebral se lavó en buffer de aislamiento frío (0,32 M de sacarosa, 1 mM y 10 mM de TRIS; pH 7,4), se diseccionó en trozos pequeños y se transfirió a un homogeneizador Dounce con solución Percoll al 12%. A continuación, se homogeneizó el tejido en un mortero de vidrio, se colocó sobre un gradiente de Percoll y se ultracentrifugó a 30.700g durante 5 minutos a 4 °C. La fracción mitocondrial enriquecida (entre las capas de 26% y 40% de Percoll), se retiró cuidadosamente, se lavó con buffer de aislamiento y se centrifugó a 16.700g durante 10 minutos a 4 °C. El pellet mitocondrial puro se resuspendió suavemente en buffer

de aislamiento y se concentró mediante centrifugación a 7300g durante 10 min a 4 °C. Finalmente, se determinó el contenido proteico en las mitocondrias aisladas utilizando el kit Pierce BCA Protein Assay (Thermo Scientific).

La actividad de COX se midió utilizando el ensayo de actividad de mitocondrias, según las especificaciones del fabricante (KC310100; Biochain). Para el ensayo se utilizaron 10 µg de proteína de mitocondria aislada con 0,1% de ditiotreitól. Se añadió ferrocitocromo c, un sustrato de la COX, a cada muestra y se leyó inmediatamente la absorbancia a 550 nm durante 55 segundos. La actividad de COX (unidad/ml) de cada muestra se estimó a partir de la disminución de la absorbancia debida a la oxidación enzimática del ferrocitocromo c a ferricintocromo c.

3.2.7. Análisis de proteínas mediante western blot

Los cambios de expresión proteica de diferentes componentes y receptores del SRA fueron analizados por la técnica de WB. Las fracciones de tejido pertenecientes a la SN se homogenizaron con ayuda de un politrón en un tampón de radioinmunoprecipitación que contenía inhibidores de proteasas (P8340, Sigma), fluoruro de fenilmetilsulfonilo (P7626, Sigma) e inhibidores de fosfatasa (P5726, Sigma). El homogenado resultante se centrifugó 20 minutos a 12.000 g y se recogió el sobrenadante.

Las concentraciones de proteína se determinaron mediante el ensayo BCA (Pierce 23225). Las muestras se diluyeron en buffer de radioinmunoprecipitación y tampón de carga, se desnaturalizaron con un choque térmico, calentándolas durante 4 minutos a 95°C y se procedió a la separación de las proteínas utilizando una electroforesis discontinua con geles de poliacrilamida Bis-Tris al 8%-12%. A continuación, se realizó la transferencia de las proteínas desde el gel de poliacrilamida a una membrana de nitrocelulosa. Finalmente, las membranas se incubaron con una solución de bloqueo (leche al 10%) durante una hora a temperatura ambiente y, a continuación, se incubaron durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario correspondiente. Los niveles proteicos de ANG y de los receptores AT1 y Mas fueron analizados en homogenados de cerebros de ratones WT y

AT2KO utilizando los anticuerpos primarios correspondientes: ANG (1:200, sc-7419), receptor AT1 (1:200, sc-31181, SantaCruz), receptor Mas (1:1000, AAR-013, Alomone labs). La expresión proteica del receptor AT1 también fue analizada en los diferentes tratamientos de las células microgliales N9 utilizando el mismo anticuerpo AT1 (1:200, sc-31181, SantaCruz Biotechnology). Para el revelado se utilizaron los anticuerpos secundarios HRP anti-conejo IgG (1:5000, sc-2004, SantaCruz Biotechnology) y anti-cabra IgG (1:3000, sc-2020, SantaCruz Biotechnology). Finalmente, las membranas fueron incubadas con el control de carga GAPDH (1:25.000, G9545, Sigma). El nivel de expresión de las proteínas se cuantificó por densitometría de cada una de las bandas usando el software Quantity One y se expresó en relación con el valor de la banda control de GAPDH. Los datos se normalizaron con respecto a los valores del grupo control de la misma membrana (es decir, se expresaron en relación con el valor obtenido para el grupo control, 100%) y se expresaron como medias \pm SEM.

3.2.8. Extracción de ARN, RT-QPCR y Q-PCR

La expresión del ARNm de los componentes y receptores del SRA (ANG, receptores AT1, AT2, Mas), del sistema dopaminérgico (receptores D1, D2) y de diferentes mediadores de inflamación (IL-1 β , IL-6, NFk β , p47 phox) fueron analizados mediante RT-PCR y Q-PCR previamente descrita **3.1.7. Extracción de ARN, RT-PCR y Q-PCR del modelo de lesión con α -syn** utilizando la secuencia de cebadores correspondiente (Tabla 4).

3.2.9. Modelos *in vitro*

3.2.9.1. Cultivos primarios de microglía

Los cultivos primarios de microglía se realizaron a partir de cerebros de neonatos P1-P3 de ratas Sprague-Dawley o de ratones WT o AT2KO. Para cada experimento se utilizaron un mínimo de 20 neonatos. Los cerebros se extrajeron en condiciones de esterilidad bajo la llama de un mechero bunsen e inmediatamente después se lavaron en una solución fría (4°C) de glucosalino y penicilina/estreptomicina al 1%. Seguidamente, con la ayuda de un bisturí, se eliminaron las meninges, plexos coroides y los restos de médula espinal. A

continuación, en el interior de una campana de flujo laminar, se llevó a cabo la disociación mecánica con un bisturí y se realizó la filtración de los fragmentos mediante un filtro de nylon de tamaño de poro de 100 μm (Falcon). La suspensión celular obtenida se centrifugó a temperatura ambiente durante 10 minutos a 2.000 rpm y se eliminó el sobrenadante. El pellet celular se resuspendió en el volumen de medio requerido para cada experimento (10 ml de medio por cerebro aislado) y fue sembrado en frascos de 75 cm^2 (BD Falcon, $2,5 \times 10^7$ células/frasco). La siembra se realizó con medio de cultivo DMEM completado con 10% suero fetal bovino, 1% de penicilina/estreptomicina (Sigma) y 1% de anfotericina B (Sigma). Las células en cultivo se mantuvieron en una incubador a 37°C, 5% de CO_2 y humedad al 95% hasta que llegaron a su máxima confluencia (aproximadamente 12-15 días). El primer cambio de medio se realizó cuatro días después de la siembra inicial y, posteriormente, se cambió cada cuatro días. Una vez llegaron a la máxima confluencia, los frascos se agitaron durante 4 horas a 180 rpm en una incubador a 37°C, 5% de CO_2 y humedad al 95%, con el objetivo de extraer la microglía. Tras la agitación, se recogió el medio de cultivo, se centrifugó a 2.000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente y el pellet obtenido se resuspendió en medio de cultivo al volumen de siembra requerido. La cuantificación de células viables se realizó en una cámara de Neubauer sobre una suspensión en azul de tripano. Las células microgliales fueron sembradas en placas de 35mm (Falcon) tratadas con poli-L-lisina (Sigma; 10mg/ml) a una concentración aproximada de 1×10^6 células/ml. Una hora después de la siembra se cambió el medio, para eliminar las células no adheridas y, finalmente, los cultivos fueron mantenidos en condiciones de cultivo 24 horas antes de realizar el ensayo, para evitar el estado activado de las células microgliales tras la agitación. Mediante esta técnica de aislamiento se consigue una pureza de células positivas para el marcador microglial OX-42 de más del 95% (Dominguez-Meijide *et al.*, 2017).

3.2.9.2. Línea celular microglial (N9)

La línea microglial murina N9 fue proporcionada por la Dra. Paola Ricciardi-Castagnoli (Red de Inmunología de Singapur, Agencia

de Ciencia, Tecnología e Investigación, Singapur). Las células se mantuvieron en condiciones de cultivo en una incubador a 37°C, 5% de CO₂ y humedad al 95%, y se cultivaron en medio de Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640; Invitrogen) completado con 10% de suero fetal bovino, 2mM de L-glutamina (Sigma) y un 1% de penicilina/estreptomicina. Para realizar los ensayos las células se cuantificaron y se sembraron a una densidad de $0,5 \times 10^6$ células/pocillo en placas de 12 pocillos (Falcon).

3.2.10. Análisis de inflamación por actividad enzimática y ELISA en células microgliales

Para estudiar la inflamación mediada por los receptores de angiotensina en las células microgliales (cultivos primarios de microglía y línea celular N9) se cuantificaron los niveles de actividad enzimática NOX y ROCK, así como los niveles de expresión de TNF- α mediante kit ELISA.

-Actividad enzimática de NOX: se midió mediante quimioluminiscencia potenciada por lucigenina en un lector de placas multipocillo Infinite M200 (TECAN). Las células o el tejido fueron homogenizados en un tampón de lisis (10^{-1} mol/L de K₂HPO₄, 10^{-3} mol/L fluoruro de fenilmetilsulfonilo, 0.2% Triton X-100) y centrifugados a 12.000g durante 30 minutos a 4°C. A continuación, se recogieron los sobrenadantes y se les analizó la concentración de proteína con un kit de ensayo de proteínas BCA de Pierce (Thermo Scientific, Fremont, CA). La actividad de NOX se midió en los sobrenadantes en presencia de su sustrato NADPH (10^{-4} mol/L; Sigma) y lucigenina (5×10^{-6} mol/L; Sigma). La reacción se realizó con 10-20 μ l de células o tejido homogenizado que contenía entre 20-50 μ g de proteína (Griendling *et al.*, 2000; Hong *et al.*, 2006). La quimioluminiscencia se expresó como unidades de luz relativas (ULR/mg de proteína x min).

-Actividad enzimática de ROCK: la actividad de ROCK se midió con un kit de ensayo de actividad de ROCK (STA-416; Cell Biolabs, San Diego, CA) según las instrucciones del

fabricante. En funcionamiento de este kit se basa en un inmunoensayo enzimático desarrollado para la detección de la fosforilación específica de la subunidad 1 de la miosina fosfatasa en Thr696 mediada por el enzima ROCK. Las células primarias de microglía y N9 se homogeneizaron en un buffer de lisis (50 mM Tris-HCl pH7.5, 150 mM NaCl, 1 mM 2-glicerofosfato, 1% Triton X-100, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA y 1 mM Na_3VO_4) que contenía un cóctel de inhibidores de proteasas (P8340; Sigma). A continuación, se midió la concentración de proteínas en los extractos con un kit de ensayo de proteínas BCA de Pierce (Thermo Scientific, Fremont, CA). La reacción se realizó con una cantidad final de proteína de 5 μg /pocillo y la fosforilación se evaluó midiendo la absorbancia a 450 nm en un lector de placas multipocillo Infinite M200 (TECAN).

-Determinación de TNF- α : los niveles de TNF- α liberados al medio en los cultivos celulares de microglía (microglía primaria y línea celular microglial N9) fueron determinados mediante kit ELISA (TNF- α de rata de Diaclone 865.000.96, Gen-Probe Diaclone SAS, Besançon, Francia) siguiendo las instrucciones del fabricante y usando un lector de placas multipocillo Infinite M200 (TECAN). El contenido de TNF- α se obtuvo en pg/mL de proteína y se expresó como porcentaje del contenido en las muestras del grupo de control.

3.2.11. Análisis de factores de transcripción en células microgliales

La activación de los factores de transcripción Sp1 y Sp3, implicados en la regulación de la expresión del receptor AT1, en células de microglía primaria se realizó con un kit TransAM (Active Motif, Carlsland) basado en un ensayo inmunoenzimático de unión al ADN. Se incubaron 10 μg /pocillo de extracto nuclear aislado de los cultivos celulares siguiendo las instrucciones del fabricante. Finalmente, se midió la absorbancia a 450 nm en un lector de placas multipocillo Infinite M200 (TECAN).

3.2.12. Modelo de supresión de hormonas sexuales en ratón y modelo de masculinización cerebral

Para estudiar la posible implicación de las hormonas sexuales adultas en la expresión del receptor AT2 microglial, se realizaron modelos de supresión de hormonas sexuales en ratones macho y hembra:

-Los ratones macho se orquiectomizaron bilateralmente a través de una pequeña incisión escrotal. Para ello, inicialmente, se anestesió a los animales, se les inmovilizó, se les rasuró y se les desinfectó. Una vez hecho esto, se expusieron los testículos y el epidídimo. A continuación, se colocó una ligadura de seda estéril alrededor de la zona caudal del cordón espermático, se extrajeron los testículos y el epidídimo, y el tejido restante se devolvió a las bolsas testiculares. Finalmente, se cerró la pared muscular con puntos y la piel con grapas. En los animales control se abrió el saco escrotal sin extraer los testículos. Finalmente, se permitió que los animales se recuperaran durante 2 semanas antes del estudio (Jia *et al.*, 2020).

-La ovariectomía es el modelo de menopausia más utilizado en la investigación y se puede realizar con diversos procedimientos quirúrgicos. En el presente estudio, el modelo de ovariectomía se realizó con una doble incisión dorsolateral, la cual permite un fácil acceso a los ovarios de ratón y una rápida recuperación postoperatoria (Souza *et al.*, 2019). Para realizar la cirugía los animales fueron anestesiados con una inyección intraperitoneal de una combinación de ketamina (50mg/kg) / medetomidina (0,4mg/kg) y se les realizó una incisión dorsolateral en el lado derecho e izquierdo. A continuación, se separó la musculatura y se extrajo la grasa ovárica. Con un hilo estéril se realizaron dos nudos para delimitar el área a retirar y finalmente se retiraron los ovarios de cada lado del animal. Finalmente, se permitió que los animales se recuperaran durante 4 semanas antes del estudio.

Para estudiar la posible implicación de las hormonas sexuales femeninas en la expresión del receptor AT2 microglial durante el

desarrollo, se realizó la masculinización cerebral mediante inyecciones subcutáneas de 5 mg de benzoato de 17β -estradiol (E8515, Sigma) disueltos en 50 ml de aceite de girasol estéril. Se inyectaron en crías de WT machos y hembras los días P2, P5 y P8 (Villa *et al.*, 2018). La eficacia de la intervención se probó mediante la evaluación microscópica de los tipos de células presentes en los frotis vaginales, un procedimiento común utilizado para documentar las etapas del ciclo estral (Cora *et al.*, 2015). Finalmente, se observó que las hembras masculinizadas no pudieron ciclar a las 8 semanas de edad, y se procedió al aislamiento de microglía para su posterior análisis.

3.2.13. Aislamiento de microglía adulta

Las células microgliales de cerebros adultos de ratón fueron extraídas para el estudio de la expresión de los receptores AT1 y AT2 y mediadores inflamatorios.

Tras el sacrificio de los animales, los cerebros fueron extraídos rápidamente, se lavaron en medio de cultivo libre de suero (DMEM /F12 con penicilina / estreptomycin y glucosa) y se disociaron con un bisturí en una placa Petri helada. Cada hemisferio cerebral disociado se transfirió a un homogeneizador Dounce de 10 ml que contenía la mezcla enzimática: 5 ml de una solución DMEM / F12 con HEPES 12,5 mM y NaCl 37,5 mM que contenía 1 mg / ml de papaína, 6U / ml de dispasa y 20U / ml de DNasa. Se trituró con 12 pasadas usando el homogeneizador en frío. Posteriormente, el tejido homogeneizado se incubó a 37 ° C, durante 30 min. Después de la digestión enzimática, la suspensión celular se lavó con 10 ml de solución salina equilibrada de Hanks (HBSS) fría y se filtró (con un tamaño de poro de 100 μ m). Seguidamente, la suspensión celular se centrifugó durante 5 min a 300g a 4°C, y el pellet resultante fue resuspendido en 8 ml de Percoll al 35% a temperatura ambiente y se transfirió a un tubo Falcon limpio. A cada muestra se añadieron 5 ml de HBSS y se dejó reposar durante 5 min en hielo. Las muestras fueron nuevamente centrifugadas durante 20 min a 800g y a 4°C sin freno. Se aspiró el sobrenadante, incluida la capa de mielina, el pellet se resuspendió en HBSS y se filtró (tamaño de poro de 30 μ m). De nuevo, la suspensión celular se centrifugó 5 min a 400g y a 4°C, se resuspendió en 90 μ l de tampón de separación (solución de

PBS con albúmina de suero bovino al 0,5% y EDTA 2 mM) y se transfirió a un tubo Falcon. Posteriormente, las muestras se incubaron con el anticuerpo anti-CD11b unido a microesferas magnéticas (10 µl; 130–093–634, MACS Miltenyi Biotec) durante 15 min a 4°C con agitación suave. La suspensión celular se lavó para eliminar las microesferas no unidas, se resuspendió en 500 µl de tampón de separación y se dispuso en columnas MS (130–042–210, MACS Miltenyi Biotec), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Finalmente, la microglía purificada de dos cerebros se reunió en una única muestra. Las células de microglía se lavaron, se resuspendieron en tampón de lisis (RNeasy Microkit, Qiagen) y se almacenaron a -80°C hasta su posterior extracción de ARN.

3.2.14. Técnica de hibridación *in situ* RNAscope en microglía adulta

La expresión del receptor AT2 en microglía adulta de la región de la SNpc en ratones macho y hembra se estudió a nivel de célula individual mediante la técnica de hibridación *in situ* RNAscope.

La tecnología de RNAscope permite la visualización de una sola molécula de ARNm en células individuales, tanto en tejido como en cultivo celular. El funcionamiento de esta técnica se basa en una hibridación *in situ*, utilizando sondas específicas del marcador a las que se unen fluoróforos para su detección. La principal ventaja de la técnica se debe al diseño altamente específico de las sondas y a que contiene un sistema de amplificación de señal y supresión del fondo incorporado, idóneo para detectar transcritos de baja expresión. Esta tecnología ha sido desarrollada y patentada por la casa comercial *Advanced Cell Diagnostic Inc.* (ACD, Newark, CA).

A.) RNAscope Multiplex: esta técnica se realizó en cortes de tejido fresco de ratón adulto (machos y hembras), a nivel del mesencéfalo (SNpc). Para ello, se diseccionaron los cerebros y se sumergieron directamente en crio-montaje OCT (compuesto de temperatura de corte óptima, del inglés *optimal cutting temperature compound*). Inmediatamente, se congelaron con isopentano y hielo seco y se mantuvieron a -80°C hasta el corte de las secciones. Las secciones

coronales se obtuvieron utilizando un criostato (Thermo Scientific) con un grosor de 15 μm , se montaron en portaobjetos de vidrio (SuperFrost Plus, Thermo Scientific) y se almacenaron en -80°C hasta su uso. La obtención y corte de tejido se realizó en condiciones libres de enzimas ARNasa.

El ensayo RNAscope Multiplex se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante, utilizando el kit de reactivos RNAscope® Fluorescent Multiplex Reagent (320293-USM; ACD): las secciones de tejido cerebral se fijaron durante 30 min a 4°C en paraformaldehído al 4%, se deshidrataron pasándolas por etanol en concentraciones crecientes (al 50%, 70% y 100%) durante 5 min y se incubaron con un pre-tratamiento con proteasa IV (322340, ACD) durante 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente, las secciones se incubaron en el horno ACD HyBEZTM II (321720, ACD) a 40°C , durante 2 h con las siguientes sondas diana para ratón:

-ARNm del receptor de angiotensina II tipo 2 (Agtr2) para la especie *Mus musculus* (número de acceso NM_007429.5, región diana 397-1697).

-ARNm de la subunidad de integridad Alpha M, variante de transcripción 1 (Itgam) para la especie *Mus musculus* (número de acceso NM_001082960.1, región objetivo 538-1528). Utilizado como marcador de célula microglial.

Para verificar la especificidad de las sondas y el rendimiento de la técnica se utilizaron los siguientes controles: RNAscope 3-plex Negative Control Probe_Mm (320871, ACD), como control negativo; 3plex Positive Control Probe_Mm (320881, ACD) como control positivo.

Tras la hibridación, las secciones se incubaron secuencialmente en el horno ACD HyBEZTM II a 40°C con reactivos de amplificación (todos pertenecientes al kit de reactivos de detección, 320851, ACD): AMP-1 durante 30 min, AMP-2 durante 15 min, AMP-3 durante 30 min y AMP-4C durante 15 min, que asignaron los diferentes fluoróforos a cada canal: Atto 555 (para Agtr2) y Atto 647 (para Itgam). Finalmente, las secciones se incubaron con DAPI (320858) durante 30 segundos a

temperatura ambiente y se cubrieron inmediatamente con medio de montaje Fluoromount-G™ (00-4958-02, Invitrogen). Las preparaciones se mantuvieron a -20°C hasta su visualización por microscopía de barrido láser.

B.) RNAscope combinado con Inmunofluorescencia: esta técnica se realizó en cortes de tejido perfundido de ratón adulto hembra. Para ello, los animales fueron perfundidos transcárdialmente con salino al 0,9% y luego con paraformaldehído frío al 4% en solución salina tamponada con fosfato 0,1 M, pH 7,4. Los cerebros se extrajeron, se lavaron y se crioprotegieron en el mismo tampón que contenía sacarosa al 20% durante 24h a 4°C. A continuación, se embebieron en OCT, se congelaron con isopentano-nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C. Luego, se cortaron secciones coronales (15 µm de espesor) que contenían la SN a -20°C con un criostato (Thermo Scientific), fueron montadas en portaobjetos de vidrio (SuperFros Plus de adhesión de polisina EpreDia™, Thermo Fisher Scientific) y se almacenaron a -80°C hasta su uso.

El ensayo de RNAscope se realizó utilizando el kit de fluorescencia roja RNAscope® Technology 2.5 para tejido fijado según las instrucciones del fabricante (Advanced Cell Diagnostics (ACD) Hayward, CA), con algunas modificaciones (Villapol *et al.*, 2017; LanFranco *et al.*, 2017). Las secciones se incubaron en el horno ACD HybEZ™ II durante 30 min a 60°C, se incubaron con peróxido de hidrógeno (322335, ACD) durante 10 min a temperatura ambiente, fueron hervidas con RNAscope Target Retrieval (322001, ACD) durante 5 minutos y lavadas en etanol al 100%. Finalmente, las secciones se incubaron con Protease Plus (322331, ACD) durante 30 min a 40°C. La hibridación *in situ* se realizó en el horno ACD HybEZ™ II (321720, AC) a 40 ° C durante 2 h utilizando ARNm del receptor de angiotensina II tipo 2 (Agtr2) para *Mus musculus* (número de acceso NM_007429.5, región objetivo 397-1697; 403991-C1, ACD). Tras la hibridación, las secciones se incubaron secuencialmente en el horno ACD HybEZ™ II a 40°C con reactivos de amplificación (kit Detection Reagent-RED, 322360, ACD): AMP-1 durante 30 min, AMP-2 durante 15 min, AMP-3 durante 30 minutos, AMP-4 durante 15

minutos, AMP-5 durante 30 minutos y AMP-6 durante 15 minutos. Finalmente, las secciones de cerebro se incubaron con Red-B diluido en Red-A (1:60) durante 10 min a temperatura ambiente, asignando el fluoróforo rojo lejano (*FAR RED*; excitación 647 nm; emisión 690 nm) a las moléculas de ARNm del receptor AT2.

Tras el ensayo de RNAscope, se comenzó con el protocolo de inmunofluorescencia para el marcaje de la microglía. Para ello, las secciones se bloquearon con PBS-Tween y suero de burro normal al 5% (Sigma) durante 1 hora. La inmunofluorescencia se realizó utilizando un anticuerpo policlonal anti-conejo Iba-1 (019-19741, Wako; 1:100), durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se incubaron con anticuerpo anti-conejo de burro conjugado con Alexa fluor 488 durante 2h a temperatura ambiente. Finalmente, las secciones de tejido se incubaron con DAPI (320858, ACD), durante 30 minutos a temperatura ambiente y se cubrieron inmediatamente con medio de montaje Fluoromount-G™ (00-4958-02, Invitrogen). Las preparaciones se mantuvieron a -20°C hasta su visualización por microscopía de barrido láser.

Las imágenes de las señales fluorescentes de la hibridación *in situ* por RNAscope se obtuvieron con objetivo de 40x en un microscopio confocal de escaneo láser (Leica TCS SP8) y se procesaron para mejorar el contraste y el brillo con Photoshop (CS5, Adobe). La hibridación se cuantificó en seis campos (con un objetivo de 40x, en un área de 0,15 mm²) dentro de la SNpc de cinco ratones por grupo. Se contó manualmente el número de células positivas para ARNm de AT2 que se co-localizaron con células positivas para ARNm de CD11b (Irgam) y DAPI. Las imágenes se analizaron con el software LAS X Life Science y se cuantificaron con el software ImageJ64.

3.3. RECEPTORES DE ANGIOTENSINA EN INFLAMACIÓN PERIFÉRICA CRÓNICA DE SÍNDROME METABÓLICO. IMPLICACIÓN EN LA NEURODEGENERACIÓN DOPAMINÉRGICA

3.3.1. Diseño experimental

En el presente apartado de la tesis se realizaron los siguientes experimentos *in vivo* con ratas macho de la cepa Sprague-Dawley (2-3 meses de edad) para estudiar el papel de los receptores del SRA cerebral en modelos de inflamación periférica crónica del MetS, y su posible implicación en la neurodegeneración dopaminérgica (**Objetivo 3**). Para ello se utilizaron los siguientes animales distribuidos de forma aleatoria en los grupos experimentales (**ANEXO I, Tabla III**):

-Grupo A: para estudiar la implicación de la inflamación periférica crónica del MetS (obesidad, aumento de la presión arterial e hiperglucemia) en los componentes y receptores del SRA cerebral, inflamación y muerte neuronal dopaminérgica (**Experimento VI**). Se utilizaron los siguientes grupos experimentales:

-Grupo A1: formado por ratas control (n = 6) y ratas con MetS (n = 6). Este grupo fue utilizado para la caracterización del modelo de MetS inducido por una dieta alta en grasa durante 18 semanas, mediante cuantificación de peso, presión arterial y niveles séricos de triglicéridos, colesterol y glucosa. Transcurridas 18 semanas, el LCR y suero fueron extraídos para el análisis de AT1-AA, ACE2-AA, mediadores pro-inflamatorios y 27-hidroxicolesterol (27-OHC).

-Grupo A2: formado por ratas control (n = 12), ratas con MetS (n = 12) y ratas con MetS tratadas con el bloqueante del receptor AT1, candesartán (n = 12). El candesartán se administró por vía oral (1 mg/kg/día durante al menos 2 semanas; entre las 9:00-10:00h de cada día) mezclado con crema de avellanas “Nocilla” (Nutrexpa, Barcelona, España), tras 18 semanas de dieta alta en grasa. A los animales no tratados con candesartán, se les administró únicamente crema de avellanas “Nocilla”. La mitad de los animales de cada grupo fue utilizada para analizar los

componentes y receptores del SRA, mediadores pro-inflamatorios y marcadores de estrés oxidativo en cerebro, mientras que la otra mitad de los grupos fue utilizada para el análisis de permeabilidad de la BHE. El peso, el suero y la medición de la presión arterial (antes del tratamiento con candesartán) de los animales de este grupo, se utilizaron además, para aumentar el tamaño muestral para la caracterización del modelo de MetS (Grupo A1).

-Grupo A3: se utilizó para estudiar la implicación del MetS en la progresión de la muerte neuronal dopaminérgica. Estaba compuesto por ratas control (n = 5), ratas lesionadas con 6-OHDA (n = 5), ratas con MetS y lesionadas con 6-OHDA (n = 5) y ratas con MetS, lesionadas con 6-OHDA y tratadas con el bloqueante del receptor AT1, candesartán (n = 5). Tras 18 semanas de dieta alta en grasa los animales fueron lesionados mediante inyección estereotáxica de la neurotoxina 6-OHDA. El candesartán fue administrado desde una semana antes de la lesión estereotáxica (1 mg/kg/día) hasta el sacrificio (4 semanas después de la lesión con la neurotoxina). Finalmente, los animales fueron sacrificados y el cerebro fue procesado para los estudios inmunohistoquímicos de muerte neuronal dopaminérgica.

-Grupo B: destinado a estudiar la implicación de los AT1-AA en la expresión de los componentes y receptores del SRA cerebral, respuesta inflamatoria microglial y muerte neuronal dopaminérgica (**Experimento VII**). Para ello se utilizaron los siguientes grupos experimentales:

-Grupo B1: formado por ratas control (n = 6), ratas con administración intraperitoneal de 0,25 µg/µl de AT1-AA humanos (n = 6), ratas con administración de 0,15 µg/µl de AT1-AA humanos (n = 12). Se destinó a caracterizar el efecto en la presión arterial y los niveles de IgG humanos en LCR y suero durante 1 y 2 semanas después de la administración de autoanticuerpos.

-Grupo B2: formado por ratas control ($n = 5$), ratas con administración intraperitoneal de AT1-AA ($0.15 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, $n = 5$) y ratas con administración de AT1-AA y tratadas con el bloqueante del receptor AT1 candesartán, ($1 \text{ mg}/\text{Kg}/\text{día}$ durante al menos 2 semanas; administrados entre las 9:00-10:00h de cada día). Quince días después de la administración de AT1-AA, los animales fueron sacrificados y utilizados para analizar los componentes y receptores del SRA, mediadores pro-inflamatorios y marcadores de estrés oxidativo a nivel de la SNpc.

-Grupo B3: destinado a estudiar la implicación de los AT1-AA en la progresión de la muerte neuronal dopaminérgica se utilizaron ratas control ($n = 6$), ratas lesionadas con AAV9- α -syn-A53T ($n = 6$), ratas infundidas con AT1-AA y lesionadas con AAV9- α -syn-A53T ($n = 6$) y ratas-lesionadas con AAV9- α -syn-A53T, infundidas con AT1-AA y tratadas con el bloqueante del receptor AT1, candesartán ($n = 6$). La administración de los AT1-AA se realizó mediante la implantación intraperitoneal de mini-bombas osmóticas (modelo x, Alzet) que contenían $200 \mu\text{l}$ de una disolución de AT1-AA con una concentración de $0,15 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, durante 6 semanas (1 semana antes de la inyección con AAV9- α -syn-A53T). El tratamiento con candesartán ($1\text{mg}/\text{kg}/\text{día}$) se inició 1 semana antes de la administración de AT1-AA y se continuó hasta el momento del sacrificio (4 semanas después de la lesión con AAV9- α -syn-A53T) tras el cual el cerebro fue procesado para los estudios inmunohistoquímicos de muerte neuronal dopaminérgica e inflamación microglial.

3.3.2. Desarrollo de un modelo de síndrome metabólico en rata

El desarrollo de un modelo de MetS (obesidad, aumento de la presión arterial e hiperglucemia) se realizó en ratas macho de 150-200g que recibieron *ad libitum* una dieta alta en grasa (D18042603; Research Diets, U.S.A.) durante un periodo de 18 semanas. La incorporación de

esta dieta en edad temprana facilita y homogeniza el desarrollo del MetS entre los diferentes individuos (Sharma y Taliyan, 2018).

Mensualmente, a los animales se les extrajo sangre por la vena lateral de la cola, que fue utilizada para la determinación de los niveles séricos de triglicéridos, colesterol y glucosa utilizando kits enzimáticos colorimétricos comerciales (1001093; 1001314; 1001191; Spinreact, España, respectivamente), siguiendo las instrucciones del fabricante. Además, a los animales se les hizo un seguimiento mensual del aumento de peso y medición de la presión arterial utilizando un sistema de presión no invasiva MRBP (IITC Life Science, California, EE.UU.).

3.3.3. Modelo de lesión con 6-OHDA en ratas con síndrome metabólico

El estudio de la implicación de la inflamación periférica inducida por MetS en la progresión de la muerte neuronal dopaminérgica se realizó en un modelo animal de EP basado en la inyección estereotáxica de la neurotoxina 6-OHDA.

En primer lugar, a los animales se les indujo MetS mediante la administración de una dieta alta en grasa durante 18 semanas. Una vez desarrollado el MetS, se les inyectó, unilateralmente por estereotaxia, la neurotoxina 6-OHDA en el estriado derecho.

Para realizar la cirugía, los animales fueron anestesiados con una inyección intraperitoneal de una combinación de ketamina (50mg/kg) / medetomidina (0,4mg/kg) y fueron colocados en el aparato de estereotaxia (Kopf Instruments) con la barra dental a -3,3mm. Con un bisturí se realizó una incisión en la línea media y se calcularon las coordenadas craneométricas en base al bregma correspondientes al ST derecho: 1,0mm anterior, 3mm lateral a la línea media y 5,5mm ventral a la duramadre (Paxinos y Watson, 1986).

A continuación, se trepanó el cráneo para inyectar 7,5µg de 6-OHDA disueltos en 3µl de solución salina estéril con 0,2% de ácido ascórbico (Sigma, EE.UU.). La solución se inyectó usando una jeringa Hamilton de 10µl acoplada a un inyector monitorizado (Stoeling), a una velocidad de 0,5µl/min y la aguja se mantuvo *in situ* 5 minutos, una vez

realizada la inyección, a fin de evitar el reflujo de la toxina. A los animales utilizados como control salino, se les realizó la misma cirugía inyectando únicamente solución salina. Transcurridas 4 semanas tras lesión, los animales fueron sacrificados.

3.3.4. Modelo de infusión sistémica de AT1-AA humanos en rata

Los AT1-AA humanos se obtuvieron de muestras de suero de mujeres embarazadas que sufrieron preeclampsia. Estas mujeres eran pacientes del Servicio de Obstetricia del Complejo hospitalario Universitario de Santiago de Compostela, todas fueron informadas del propósito y protocolo del estudio y firmaron un consentimiento informado. Este estudio obtuvo la aprobación del Comité Ético de Investigación en Medicamentos de Galicia (CEIm-G), protocolo 2017/618, y la investigación se llevó a cabo de acuerdo con los principios de la Declaración de Helsinki.

El aislamiento de AT1-AA de suero humano se realizó mediante cromatografía de afinidad y se cuantificó utilizando ELISA (LaMarca *et al.*, 2011). Un ml de suero fue pasado por una columna de purificación para IgG, y se obtuvo la fracción de IgG específica de AT1-AA mediante la unión del epítipo a la secuencia correspondiente del segundo bucle extracelular del receptor AT1 (SC1208; síntesis química de péptidos) unido covalentemente al gel activado por Sepharose 4B CNBr (GE17-0430- 01; Sigma-Aldrich). La fracción de IgG no unida se eliminó por lavado y la IgG unida (AT1-AA) se eluyó con tampón de glicina 200 mM. La fracción de IgG eluida se mantuvo en tampón de neutralización (3M TRIS-HCl y 3M KCl). Finalmente, la concentración final de AT1-AA se cuantificó en un espectrofotómetro Nanodrop 252 (Thermo Fisher Scientific).

Para la infusión de AT1-AA humanos en rata se utilizaron minibombas osmóticas (Alzet Model 2002, Durect Corp, Cupertino, CA), que se prepararon con 200ul de AT1-AA diluidos (concentraciones; 0,15µg/µl ó 0,25µg/µl) siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente, las minibombas se insertaron por vía intraperitoneal, en ratas anestesiadas como se describió anteriormente

(Cunningham *et al.*, 2016). La administración intraperitoneal mediante el empleo de minibombas, permite la infusión continua y constante de AT1-AA durante dos semanas.

La dosis de 0,15 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ se calculó inicialmente como la dosis más baja que inducía un ligero, pero significativo aumento, de la presión arterial, lo que demostraba la funcionalidad de los AT1-AA purificados.

3.3.5. Modelo de lesión con AAV9- α -syn-A53T en ratas con infusión de AT1-AA humanos

El estudio de la implicación de la infusión sistémica de AT1-AA en la progresión de la neurodegeneración dopaminérgica y neuroinflamación fue estudiada en un modelo de EP basado en la sobreexpresión de la proteína α -syn humana mutada AAV9- α -syn-A53T.

En primer lugar, a ratas macho adultas se les realizó la infusión de AT1-AA humanos tal y como se describe en el apartado anterior **3.3.4. Modelo de infusión sistémica de AT1-AA humanos en rata.**

Una semana después de la implantación de las bombas miniosmóticas, a las ratas se les realizó una inyección estereotáxica unilateral de AAV9- α -syn-A53T, que se describe detalladamente en el apartado **3.1.3. Modelo de lesión con AAV9- α -syn-WT y AAV9- α -syn-A53T en ratas.**

3.3.6. Extracción de líquido cefalorraquídeo y sangre en modelo de rata

La extracción de LCR se realizó siguiendo el método descrito anteriormente (Pegg *et al.*, 2010). Las ratas fueron anestesiadas con una inyección intraperitoneal de una combinación anestésica de ketamina (50mg/kg) / medetomidina (0,4mg/kg) y colocadas en el aparato de estereotaxia (Kopf Instruments) con la cabeza flexionada 45° hacia abajo. Seguidamente, con un bisturí se realizó una incisión en la parte ventral de la cabeza y las capas de músculos superficiales y subyacentes se separaron a lo largo de la línea media mediante disección roma y hasta la exposición de la duramadre de la cisterna magna.

Inmediatamente después, el LCR fue extraído con una aguja de 30G acoplada a una jeringa de 1ml insertada en un ángulo de 30° con respecto a la superficie de la duramadre. El LCR se almacenó inmediatamente a -80°C hasta su procesado.

Para la obtención del suero, se procedió a la extracción de sangre por decantación tras la decapitación del animal, previamente anestesiado. La sangre recogida se centrifugó a 2000g durante 10min. Finalmente, se recogió el sobrenadante, que corresponde a la muestra de suero, y se almacenó a -80°C hasta su procesamiento.

3.3.7. Determinación de autoanticuerpos en líquido cefalorraquídeo y suero de rata

Los niveles de AT1-AA y ACE2-AA fueron medidos usando kit ELISA humano con ligeras modificaciones previamente descritas (Zhang *et al.*, 2010). Se utilizó un anticuerpo secundario HRP-conjugado de cabra anti-IgG de rata (1:2500, ab97057, abcam), la inmunoreacción se detectó con un kit de quimioluminiscencia HRP (170-5044; Bio-Rad, Hercules, CA, USA) y la señal de luminiscencia ULR se midió con un lector de placas multipocillo Infinite M200 (TECAN).

3.3.8. Análisis de permeabilidad de la barrera hematoencefálica en un modelo de síndrome metabólico

Para estudiar la permeabilidad de la BHE en un modelo de MetS y la implicación del bloqueo del receptor AT1 se realizó la infusión de colorante Evans Blue (E2129, Sigma-Aldrich). El colorante se inyectó en una sola inyección (solución salina al 4 % a 2 ml/kg) a través de la vena femoral. Dos horas después de la inyección, los animales fueron perfundidos con solución salina al 0,9% para eliminar el exceso de colorante. Posteriormente, los animales fueron decapitados, el tejido cerebral aislado y se diseccionaron las regiones correspondientes a corteza, ST y SN. Los tejidos cerebrales recogidos se suspendieron en 1:1 peso (mg): volumen (ml) de ácido tricloroacético al 50 % (T6399; Sigma-Aldrich) y se homogeneizaron con politrón. Los homogeneizados se centrifugaron a 10.000 g durante 20 min y los sobrenadantes se sometieron a detección espectrométrica a 620 nm en

un volumen 1:4 de etanol al 95 % utilizando un lector de placas multipocillo Infinite M200 (TECAN). Para la cuantificación, se prepararon curvas de colorante Evans Blue estándar paralelas por duplicado (Wang y Lai, 2014).

3.3.9. Análisis inmunohistoquímico de TH y OX-6

Cuatro semanas después de la lesión estereotáxica con 6-OHDA en ratas con MetS o con AAV9- α -syn-A53T en ratas infundidas con AT1-AA humanos, los animales fueron perfundidos y procesados para el análisis inmunohistoquímico previamente descrito en el apartado **3.1.4. Técnicas de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia en el modelo de lesión con α -syn.**

3.3.10. Análisis de expresión de los componentes y receptores del SRA cerebral

El efecto de la inflamación periférica inducida por el MetS o la administración sistémica de AT1-AA sobre la expresión de los componentes y receptores del SRA cerebral (ECA2 y receptores PRR, AT1, AT2 y Mas) fue analizada en los homogenados de la región de la SN.

Los niveles de expresión proteica se estudiaron mediante la técnica de WB descrita detalladamente en el apartado anterior **3.2.7. Análisis de proteínas mediante western blot.**

Las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios: ECA2 (ab108252; Abcam; 1:1000), AT1 (sc-31181; Santa Cruz; 1:200), AT2 (sc-9040; Santa Cruz; 1:200), Mas (AAR-013; Alomone labs; 1:1000) y (pro)-renina (ab40790; Abcam; 1:3000). La especificidad de todos los anticuerpos primarios utilizados se evaluó en nuestro laboratorio mediante la aplicación de diferentes técnicas (Valenzuela *et al.*, 2010, 2016; Labandeira-Garcia *et al.*, 2017).

Se usaron los siguientes anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano (HRP, del inglés *horseradish peroxidase*): cabra anti-HRP de conejo y cabra anti-HRP de ratón (Santa Cruz Biotechnology; 1:2500).

Los niveles de expresión de los transcritos de ARNm de los componentes y receptores del SRA cerebral se estudiaron mediante la técnica RT-QPCR y Q-PCR descrita detalladamente en el apartado anterior **3.2.8.Extracción de ARN, RT-QPCR y Q-PCR**.

La secuencia de los cebadores para ECA2 y receptores AT1, AT2, PRR y Mas de rata se especifican en la Tabla 4.

3.3.11. Análisis de inflamación y estrés oxidativo por actividad enzimática y ELISA

En los homogenados de SN de rata con MetS se midieron los marcadores pro-inflamatorios, particularmente relacionados con la degeneración dopaminérgica como el TNF- α (ELISA, 865.000.96; Gen-Probe Diaclone), y marcadores de estrés oxidativo, como la NOX, mediante quimioluminiscencia potenciada por lucigenina.

En suero de rata con MetS se midieron los niveles de interleucinas pro-inflamatorias: interleucina tipo 17 (IL-17), IL-6; LIGHT, TNF- α e IL-1 β y del 27-OHC con kits de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas específicos para ratas de acuerdo con las instrucciones del fabricante (MBS2503506 para IL-17; MBS701221 para IL-6; MBS2021982 para LIGHT; MBS284210 para IL-1 β ; MBS9712719 para 27-OHC; de MyBioSource y KRC3011 para TNF- α de Invitrogen).

3.4.RECEPTORES DE ANGIOTENSINA E INFLAMACIÓN PERIFÉRICA AGUDA. INFLAMACIÓN PULMONAR EN COVID-19.

3.4.1. Diseño experimental

En la última parte de esta tesis se estudiaron los efectos de los tratamientos con bloqueantes del receptor AT1 (candesartán), inhibidores de ECA (captopril) y moduladores indirectos de los receptores del SRA (AINEs; ibuprofeno) sobre la expresión pulmonar de ECA2 y demás receptores del SRA pulmonar en ratas adultas jóvenes y en modelos animales de individuos vulnerables a COVID-19 grave (MetS y envejecimiento). Usando un modelo *in vitro*, se

estudiaron los efectos de estos mismos tratamientos en (1) cambios inducidos por la proteína viral en los niveles de ECA2 transmembrana; (2) en los niveles de internalización de la proteína vírica y (3) en la respuesta inflamatoria aguda asociada al tratamiento de la proteína viral (IL-6, TNF- α y CCL-2 (ligando de quimiocina 2, del inglés *chemokine (C-C motif) ligand 2*)) (**Objetivo 4**). Para ello, se utilizaron un total de 98 animales y una línea celular del endotelio pulmonar distribuidos en dos grandes grupos (**ANEXO I, Tabla IV**):

-Grupo 1: en el que se abordó el estudio del efecto de los tratamientos de ARAII (candesartán) e IECA (captopril) en la expresión de los principales receptores del SRA pulmonar (**Experimento VIII**). Para ello, se utilizaron un total de 68 animales distribuidos de forma aleatoria, y una línea celular divididos en dos subgrupos:

-Grupo 1A: en este primer grupo de experimentos se utilizaron ratas macho adultas jóvenes de 10 semanas de edad ($n = 30$; $n = 6$ por grupo) para comprobar el efecto del tratamiento con candesartán (1 o 10 mg/Kg/día; AstraZeneca) o captopril (5 o 40 mg/Kg/día; C4042; Sigma) sobre la expresión del ECA2 y los principales receptores del SRA pulmonar.

En un segundo grupo de experimentos, se utilizaron modelos animales de vulnerabilidad al COVID-19 grave por infección por SARS-CoV-2: ratas macho con MetS ($n = 20$; $n = 6$ por grupo) tratadas con las dosis altas de candesartán (10 mg/kg/día) y captopril (40 mg/Kg/día) durante tres semanas; ratas envejecidas de 18-20 meses de edad ($n = 18$; $n = 5$ por grupo) tratadas con candesartán (1 mg/Kg/día) durante tres semanas.

Los tratamientos fueron administrados por vía oral, mezclados con crema de avellanas (“Nocilla”; Nutrexp, Barcelona, España) durante de 3 semanas. Los animales del grupo control recibieron únicamente la crema de avellanas. Las dosis se establecieron en base a experimentos preliminares y estudios *in vivo* anteriores (Inada *et al.*, 1999; Zhu *et al.*, 2000; Arumugam *et al.*, 2012; Abdel-Wahab *et al.*, 2014). Los tratamientos fueron administrados entre las 9:00-10:00h de cada día. Tras el

sacrificio, los pulmones fueron extraídos y procesados para análisis bioquímicos. La expresión de ECA2 y de los principales receptores del SRA (receptores AT1, AT2 y Mas) se determinaron por RT-QPCR y se confirmaron por WB. Además, se determinaron los niveles de actividad enzimática de ECA2 en los homogenados pulmonares.

-Grupo 1B: los experimentos *in vitro* se realizaron con la línea celular de neumocitos alveolares humanos de tipo II, A549 (CSC-C6236X, Creative Bioarray). Por un lado, las células fueron tratadas con candesartán (1 μ M; 4791; Tocris) o captopril (50 ng/ml; C4042; Sigma), durante 24 o 48 h para medir el efecto de los fármacos en la expresión del ARNm de ECA2. Además, se realizó un análisis de la expresión proteica del ECA2 en la línea celular para estudiar la influencia de la confluencia celular sobre la expresión de ECA2 (Gandhi *et al.*, 2019).

En otro grupo de experimentos, las células fueron tratadas con candesartán (1 μ M) o captopril (50 ng/ml) durante 24 horas, y posteriormente fueron tratadas con RBD-Fc-Spike (1 μ g/ml; 40592-V02H, Sino Biological), que se dejó actuar 3 horas a 37°C. A continuación, se recogieron las células y el sobrenadante celular. Este grupo experimental se utilizó para comprobar los efectos de los fármacos en los cambios inducidos por RBD-Fc-Spike en la expresión de las diferentes formas de ECA2 (transmembrana, intracelular, soluble), en la actividad de ECA2 y ADAM17 y en la liberación de citoquinas pro-inflamatorias (IL-6, TNF- α y CCL-2). Los datos obtenidos se compararon con células control (sin tratamientos) y con células tratadas sólo con proteína RBD-Fc-Spike (1 μ g/ml).

Finalmente, en otro grupo de experimentos, las células fueron transfectadas con ECA2-GFP y tratadas sólo con RBD-Fc-Spike (1 μ g/ml) o con RBD-Fc-Spike y candesartán (1 μ M) o captopril (50 ng/ml). Este grupo permitió estudiar los cambios inducidos por los fármacos en la tasa de internalización de la proteína Spike. A los cultivos celulares se les realizó un ensayo de

inmunofluorescencia y se midieron las intensidades de fluorescencia citoplasmática con imágenes de microscopía de barrido láser.

Las dosis utilizadas en los experimentos *in vitro* se establecieron en base a estudios preliminares y estudios *in vitro* anteriores (Uhal *et al.*, 1998; Patra *et al.*, 2020). Todos los datos se obtuvieron de al menos tres experimentos independientes con al menos $n = 5$.

-Grupo 2: en la última parte de esta tesis se estudió el efecto del tratamiento con el ibuprofeno en la expresión de los principales receptores del SRA pulmonar. Para ello, se utilizaron un total de 30 animales, distribuidos en grupos experimentales de forma aleatoria, y una línea celular de neumocitos alveolares humanos de tipo II, A549, divididos en los siguientes grupos:

-Grupo 2A: compuesto por ratas macho adultas jóvenes de 10 semanas de edad ($n = 6$ por grupo) y ratas macho adultas con MetS ($n = 6$ por grupo).

Ambos grupos experimentales se trataron con el AINE ibuprofeno (40 mg/kg/día; I4883, Merck KGaA; Darmstadt, Alemania). El tratamiento fue administrado por vía oral mezclado con crema de avellanas (“Nocilla”; Nutrexpá, Barcelona, España) durante 3 semanas, entre las 9:00-10:00h de cada día. Los animales del grupo control (ratas macho jóvenes y ratas macho con MetS) recibieron únicamente la crema de avellanas. La dosis se estableció en base a experimentos preliminares y estudios *in vivo* previos (Moore *et al.*, 2020).

Tras el sacrificio, los pulmones fueron extraídos para análisis bioquímicos. La expresión de ECA2 y de los principales receptores del SRA (AT1, AT2 y Mas) se determinó por RT-QPCR y se confirmó por WB. Además, se determinaron los niveles de actividad enzimática de ECA2 en los homogenados pulmonares de machos jóvenes y los niveles de Ang II y Ang(1-7) en animales con MetS.

-Grupo 2B: los experimentos *in vitro* se realizaron con la línea celular de neumocitos alveolares humanos de tipo II, A549. Por un lado, las células fueron tratadas con ibuprofeno (400 μ M; I4883, Merck KGaA; Darmstadt, Alemania) durante 24 o 48 h para medir el efecto del tratamiento en la expresión del ARNm de ECA2.

En un segundo grupo de experimentos, las células fueron tratadas con ibuprofeno (400 μ M) durante 24 horas, y posteriormente, fueron tratadas con RBD-Fc-Spike (1 μ g/ml; 40592-V02H, Sino Biological), que se dejó actuar 3 horas a 37°C. A continuación, se recogieron las células y el sobrenadante celular. Este grupo experimental se utilizó para comprobar los efectos del ibuprofeno en los cambios inducidos por RBD-Fc-Spike, en la expresión de las diferentes formas de ECA2 (transmembrana, intracelular, soluble) y en la actividad de diferentes proteasas (ADAM17 y TMPRSS2) así como en la liberación de citoquinas pro-inflamatorias (IL-6, TNF- α y CCL-2). Los datos se compararon con células control (sin tratamientos) y con células tratadas únicamente con proteína RBD-Fc-Spike (1 μ g/ml).

Finalmente, en el último grupo de experimentos, las células A549 fueron transfectadas con ECA2-GFP y tratadas sólo con RBD-Fc-Spike (1 μ g/ml) o con RBD-Fc-Spike e ibuprofeno (400 μ M) para estudiar los cambios inducidos por el fármaco en la tasa de internalización de la proteína Spike. A los cultivos celulares se les realizó un ensayo de inmunohistoquímica de fluorescencia y se midieron las intensidades de fluorescencia citoplasmática con imágenes de microscopía de barrido láser.

Las dosis utilizadas en los experimentos *in vitro* se establecieron en base a estudios preliminares y estudios *in vitro* anteriores (Haga *et al.*, 2010). Todos los datos se obtuvieron de al menos tres experimentos independientes con al menos n = 5.

3.4.2. Experimentos *in vitro*

3.1.1.1. Cultivo de la línea endotelial pulmonar humana (A549)

La línea celular de neumocitos alveolares humanos de tipo II A549 se sembró en medio DMEM/F12 complementado con 10% de FBS (suero fetal bovino), 2mM de L-glutamina (Sigma), 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina. Las células se cultivaron hasta alcanzar la máxima confluencia para obtener altos niveles de ECA2 en las células (Gandhi *et al.*, 2019). Para realizar los ensayos, las células se cuantificaron y se sembraron a $0,5 \times 10^6$ células/pocillo en placas de 6 ó 12 pocillos (Falcon).

3.4.3. Transfección de ECA2 en la línea celular A549

La línea celular de neumocitos alveolares humanos de tipo II, A549 se sembró a una densidad de $0,35 \times 10^6$ /pocillo en placas de 12 pocillos y se transfectó con 2 µg de ADNc de ECA2 humano (ECA2 marcado con t-GFP, RG208442, Origene) utilizando el reactivo de transfección comercial, Turbofect (R0533, Thermo Scientific) en una proporción 2:1. La solución de transfección se preparó sin FBS y sin antibióticos, se dejó actuar durante 6 h, y finalmente, se retiró y se cambió por medio completo. Cuarenta y ocho horas después de la transfección, las células se trataron con los correspondientes tratamientos, se fijaron y se procesaron para los estudios de microscopía láser confocal.

3.4.4. Análisis de internalización de la proteína spike en la línea celular A549

El análisis de internalización celular se realizó para comprobar la internalización de la proteína RBD-Spike humana mediante el ECA2, y el posible efecto de los tratamientos (candesartán, captopril e ibuprofeno) en dicha internalización. Para ello, se empleó la técnica de inmunofluorescencia y su análisis por microscopía láser confocal.

En primer lugar, las células fueron transfectadas con ECA2 marcado con t-GFP, y tratadas con los correspondientes tratamientos. Seguidamente, se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 20 min. A continuación, fueron incubadas toda la noche a 4°C con el anticuerpo monoclonal de ratón contra la fracción constante de IgG humana (Fc-IgG, ab99757, abcam, 1:500) diluido en DPBS que contenía 1% de BSA, 2% de suero normal de cabra y 0,05% de Tritón X-100, con el objetivo de marcar la proteína Spike de origen humano. Al día

siguiente, las células se incubaron con el anticuerpo secundario fluorescente Alexa Fluor 568-conjugado con IgG de cabra anti-ratón (Molecular Probes; 1:200) durante 2,5 h a temperatura ambiente. Finalmente, se realizó el montaje con Immu-mount (Thermo-Shandon) para su visualización por microscopía láser confocal (AOBS-SP5X; Leica Microsystems Heidelberg GmbH, Mannheim, Alemania). Para cada muestra, se fotografiaron 25-30 campos ópticos utilizando un objetivo x63. Para la cuantificación, se utilizaron imágenes de células en un único plano. La tasa de internalización de la proteína RBD-Spike se expresó como la relación de las intensidades de fluorescencia medidas a las longitudes de onda de excitación de 568 nm (correspondiente a la señal Fc-IgG humana) y 488 nm (señal ECA2-GFP). La intensidad de fluorescencia se midió a nivel del citoplasma celular y se restó el fondo de cada imagen antes de calcular la ratio utilizando, para ello, el software Leica LAS AF. En todo el proceso experimental de microscopía se utilizaron los mismos tiempos de exposición.

3.4.5. Análisis de expresión de los componentes y receptores del SRA pulmonar

La implicación del candesartán, captopril e ibuprofeno en los niveles de expresión de los componentes y receptores del SRA pulmonar (ECA2 y los receptores AT1, AT2 y Mas) fueron analizados en ratas jóvenes adultas y en modelos de inflamación periférica crónica (envejecimiento y MetS), vulnerables a COVID-19 grave.

Los niveles de expresión de proteína se estudiaron mediante la técnica de WB descrita detalladamente en el apartado anterior **3.2.7. Análisis de proteínas mediante western blot.**

Las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios: ECA2 (ab108252; Abcam; 1:1000), AT1 (sc-31181; Santa Cruz; 1:200), AT2 (sc-9040; Santa Cruz; 1:200) y Mas (AAR-013; Alomone labs; 1:1000). Se usaron los siguientes anticuerpos secundarios conjugados con HRP: cabra anti-HRP de conejo y cabra anti-HRP de ratón (Santa Cruz Biotechnology; 1:2500).

Los niveles de expresión de los transcritos de ARNm se estudiaron mediante la técnica RT-QPCR y Q-PCR descrita detalladamente en el apartado anterior **3.2.8.Extracción de ARN, RT-QPCR y Q-PCR.**

La secuencia de los cebadores para ECA2 de rata y humano y para los receptores AT1, AT2, PRR y Mas de rata se especifican en la Tabla 4.

	Gen	Olig. Forward (5'-3')	Olig. Resverse (5'-3')
Rata	iNOS	AAGCTGCATGTG ACTCCAT	GGTGAAGGGTGTCTGTGAA
	ARG-1	ATATCTGCCAAGGACATCGT	TCCACTTCAGTCATTGAGAAATAC
	AT1	TTCAACCTCTACGCCAGTGTG / GTTAAGGGCCATTTTGTCTCTGG	GCCAAGCCAGCCATCAGC / CCCAACACACTAAATAGGTCTGTT
	AT2	AACATCTGCTGAAGACCAATAG	GGAAGGTACAAGACTGGAAGA
	MasR	CTTTGTGGAGAACGGAT	GGAGATGTCAGCAATGGA
	ECA2	GTGAGGGATGGTCTTTCAGG-3	CACCAACGATCCCGCTTCA
	CD68	AGACGACAATCAACTACC	ATGCTGAAGAAATGAGGA
	IL-1B	ATCTCACACAGCAGCATCTC	TAGCAGGTCGCATCATC
	IL-6	CAGCCAGTTGCCTTCTTG	CCTCTGTGAAGTCTCCTCTC
	B-Actina	TCGTGCGTGACATTAAGAG	TGCCACAGGATTCATACC
	ANG	CTGCTGGCTGAGGACAAG	AAGAGTTATCGTAGGAGGAGC
Ratón	AT1	CTCTGCTGCTCTCCCGACTTAA	TGGGTCTTTTCGTTTTACCGGGA
	AT2	CTGGCAAGCATCTTATGTAGTTC	ACTTATGAATCCACACTTACGAAG
	D1	CAGCGTGACAGGTATTGG	AGACAAGAGTATAGGAAGTAAGGT
	D2	GCAGACCACCACCAACTA	CAGATAGACCTCCACCACC
	IL-1B	CCGTGCTTCTCTAAAGTATGG	CGAGTCCCAGTGTTCTTTG
	IL-6	GACTGATGCTGGTGACAAC	TGAAGTGCTCCTATGGTGAG
	MasR	AGGGTGAAGTACTGAGTTTGG	CGAGGACAGGAGAATGGAAG
	NF-κB	AATGGCGGAGTTTGGGAA	CAGTTGTAATGTTTCGGTCG
	P47phox	CCCAACTACGCAGGTGAACC	CTTCCCCTATAGTGCCGA
B-Actina	TCGTGCGTGACATTAAGAG	CCATACCTTAGGACACCGT	
Humano	ECA2	TTCCATGCTAACGACCCAGGA	TTTGTGCACATAAGGATCCTGAAGT
	B-Actina	AGCACTGTGTGGCGTACAG	GGACTTCGAGCAAGAGATGG

Tabla 4: Secuencias de los cebadores utilizados en los experimentos de Q-PCR. Abreviaturas: iNOS, óxido nítrico sintasa inducible; ARG-1, arginasa 1; AT1, receptor de angiotensina tipo I; AT2, receptor de angiotensina tipo II; ECA2, enzima conversora de angiotensina II; CD68, cluster de diferenciación 68; IL-1β, interleucina 1β; IL-6, interleucina 6; ANG, angiotensinógeno; D1, receptores de dopamina tipo I; D2, receptores de dopamina tipo II; NF-κB, factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas.

3.4.6. Cromatografía de alto rendimiento para niveles de angiotensina pulmonar

Para estudiar el efecto del tratamiento con ibuprofeno en el metabolismo de la angiotensina pulmonar, se midieron los niveles de Ang II y Ang(1-7), sustrato y producto de la actividad de ECA2 respectivamente, mediante HPLC seguido de un inmunoensayo enzimático (Brosnihan y Chappell, 2017). Inicialmente, el tejido fue homogenizado, utilizando un politrón, en una solución de ácido (HCl)-etanol con EDTA y un cóctel de inhibidores de proteasas (P8340, Sigma). Seguidamente, las muestras se centrifugaron, se incubaron a -20°C y se acidificaron con una solución de ácido heptafluorobutírico. Posteriormente, los sobrenadantes se pasaron por unas columnas de extracción en fase sólida (Sep-Pak C18, Oasis HLB 1cc, WAT094225, Waters Chromatography Europe BV; Etten-Leur, Países Bajos) y los péptidos de angiotensina se eludieron con una solución de ácido heptafluorobutírico-metanol. El eluyente se deshidrató en Savant (ISS110, Thermo Scientific; Massachusetts, EE. UU.), sin aplicación de calor y, finalmente, el sedimento se resuspendió en una solución de acetonitrilo al 12% con ácido heptafluorobutírico al 0,015% y se inyectó en el sistema de HPLC. Los péptidos de angiotensina se separaron usando un gradiente de cuatro pasos con acetonitrilo acidificado (0.1% de ácido heptafluorobutírico; gradiente lineal al 12-32%, condiciones isocráticas al 32%, gradiente lineal al 32-12% y condiciones isocráticas al 12%) en una columna de fase inversa (Symmetry300 C18, Waters Chromatography Europe BV; Etten-Leur, Países Bajos). La velocidad de inyección fue de 0'35 ml por minuto a una temperatura de 25°C.

Las fracciones de angiotensina se controlaron a 220 nm con un detector UV-VIS (SPD-20 AV, Shimadzu Corporation; Kyoto, Japón), se recogieron en un colector de fracciones (FRC-10A, Shimadzu Corporation; Kyoto, Japón) y se secaron en Savant. El sedimento se resuspendió y finalmente se determinaron los niveles de Ang II y Ang(1-7) mediante inmunoensayo enzimático (LS-F10589, LSBio; Washington, EE.UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los datos se expresaron como fmol por gramo de tejido húmedo.

3.4.7. Análisis de actividad enzimática para la dinámica celular de ECA2

El efecto de los tratamientos con candesartán, captopril e ibuprofeno en la actividad enzimática de ECA2 pulmonar, así como en la actividad enzimática de las proteasas encargadas del desprendimiento de ECA2 fueron medidas con kit específicos de actividad enzimática.

-Actividad enzimática de ECA2: se midió utilizando un kit comercial de actividad de ECA2 (Anaspec, AS-72086) siguiendo las instrucciones del fabricante. El funcionamiento del kit se basa en el péptido de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) acetilo 7-Metoxicumarina-4-il (Mca, del inglés *7-Methoxycoumarin-4-yl acetyl*) / 2,4-dinitrofenilo (Dnp, del inglés *2,4-dinitrophenyl*) (10 μM). Específicamente, el kit contiene un péptido FRET, cuya fluorescencia de Mca es inhibida por Dnp. Sin embargo, cuando se produce una escisión del sustrato, provocada por la acción del enzima ECA2, éste produce una separación en dos fragmentos, de modo que la fluorescencia de la Mca deja de estar inhibida y puede medirse en el rango de excitación/emisión a 330/390 nm utilizando un lector de placas multipocillo Infinite M200 (TECAN). La actividad de ECA2 se midió en 20 μg de tejido pulmonar de rata o en 5 μg de lisado celular de A549, y se confirmó con el inhibidor específico de ECA2, DX600 (1 μM), incluido como control en el mismo kit (AnaSpec, AS-72086). La fluorescencia se expresó como ULR (unidades de luminiscencia relativas).

-Actividad enzimática de ADAM17: se midió utilizando un kit comercial de actividad ADAM17 (AnaSpec, AS-72085) siguiendo las instrucciones del fabricante. El funcionamiento del kit se basa en el péptido de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) basado en 5-FAM/QXL® 520 (1 μM). Específicamente, el kit contiene un péptido FRET, cuya fluorescencia de la 5-FAM es inhibida por el QXL® 520. Sin embargo, cuando se produce la escisión del sustrato, provocada por la acción enzimática de ADAM17, éste produce

una separación en dos fragmentos, así que la fluorescencia de 5-FAM se puede medir en rango de excitación/emisión a 490/520 nm utilizando un lector de placas multipocillo Infinite M200 (TECAN). La actividad de ADAM17 se midió en 20 μg de lisado de celular de A549, y se confirmó con el inhibidor de ADAM17, TAPI-0 (10 μM), incluido como control en el mismo kit.

-Actividad enzimática de TMPRSS2: se midió utilizando un kit comercial de proteasas (AS-71124, AnaSpec; California, EE.UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante. El funcionamiento del kit se basa en la escisión proteolítica, mediante la acción de enzimas proteasas, de la caseína-HiLyte Flour 488 lo que da lugar a una fluorescencia que se puede medir en el rango de excitación/emisión a 488/520 nm en una placa multipocillo utilizando un equipo Infinite M200 (TECAN GmbH; Grödigg, Austria). La actividad de TMPRSS2 se midió en 125 μg de lisado celular de A549 homogenizado en tampón fosfato de sodio 20 mM, pH 8. La actividad específica para TMPRSS2 se midió restando la actividad total de proteasas menos la actividad inhibida por un inhibidor específico para TMPRSS2 (mesilato de Camostat, 100 μM , SML0057, Merck KGaA; Darmstadt, Alemania; Deshotels *et al.*, 2014). La fluorescencia se expresó como ULR/mg de proteína.

3.4.8. Análisis de mediadores inflamatorios en células A549 mediante ELISA

El análisis de la liberación de marcadores pro-inflamatorios por la línea A549 se llevó a cabo en los sobrenadantes del cultivo celular, después de los correspondientes tratamientos. Los sobrenadantes fueron recogidos y centrifugados a 2.000 g durante 10 min para eliminar los restos celulares. Las concentraciones de los diferentes marcadores se cuantificaron utilizando kits ELISA, siguiendo las instrucciones del fabricante: TNF- α (BMS223HS, Invitrogen), CCL-2 (ab179886, Abcam), IL-6 (BMS213HS, Invitrogen).

Las densidades ópticas se midieron con un lector de placas multipocillo Infinite M200 (TECAN) y se cuantificaron las concentraciones de cada citoquina utilizando la curva estándar específica de cada kit comercial (ajuste de curva 4PL).

3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS Y REPRESENTACIÓN GRÁFICA

Todos los datos fueron obtenidos de al menos tres experimentos independientes y se expresaron como la media \pm SEM.

El número mínimo de animales por grupo fue estimado teniendo en cuenta el principio de las tres erres, remplazamiento, refinamiento y reducción (RRR), empleando la herramienta calculadora estadística en la página <https://www.imim.cat/ofertadeserveis/software-public/granmo/> del Instituto Hospital del Mar de investigaciones Médicas del Parque de Investigaciones Biomédicas de Barcelona. Los análisis estadísticos fueron realizados únicamente en estudios donde el tamaño muestral era igual o superior a cinco.

La normalidad de todos los conjuntos de datos se comprobó con la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Si el conjunto de datos superaba la prueba de normalidad, se utilizaron pruebas paramétricas: la prueba *t* de Student para las comparaciones de dos grupos y el análisis de la varianza (ANOVA, del inglés *analysis of variance*) de una vía seguido de la prueba post-hoc de Student-Newman-Keuls para las comparaciones múltiples. Si el conjunto de datos no superaba la prueba de normalidad, se utilizaron pruebas no paramétricas: las comparaciones de dos grupos se realizaron mediante la prueba de suma de rangos de Mann-Whitney y las comparaciones múltiples, mediante el análisis unidireccional de varianza de Kruskal-Wallis seguido de la prueba post hoc Student-Newman-Keuls o Dunn's. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$.

Todos los análisis estadísticos fueron realizados con el programa SigmaPlot 3.0 ó 11.0 (Jandel Scientific, Systat Software, Inc., CA, EE.UU). Para la representación gráfica de los resultados se emplearon los softwares SigmaPlot y GraphPad Prism 8 (Graph Pad Inc., San Diego, CA, EE.UU).

4. RESULTADOS

4.1. RECEPTORES AT1 CEREBRALES E INFLAMACIÓN: NEUROINFLAMACIÓN Y DEGENERACIÓN DOPAMINÉRGICA EN UN MODELO DE PARKINSON BASADO EN SINUCLEINOPATÍA.

Para estudiar la implicación del receptor AT1 en la neuroinflamación y muerte neuronal dopaminérgica que cursan en la EP, se desarrolló un modelo basado en la sobreexpresión de la proteína α -syn humana con el objetivo de representar más fielmente la sinucleinopatía con la que cursan los pacientes de EP.

4.1.1. Sobreexpresión de la proteína α -syn mediante la inyección estereotáxica de AAV9

En primer lugar, para probar la eficacia de la lesión, se demostró la sobreexpresión de dos formas de la proteína α -syn, la forma WT y la forma mutada A53T, en las neuronas TH-ir de la SNpc, inducida tras la inyección estereotáxica de vectores AAV9- α -syn-WT y AAV9- α -syn-A53T, respectivamente, comparada con la inyección de AAV9-GFP utilizada como grupo control. Para ello se realizaron análisis de inmunofluorescencia en secciones mesencefálicas y se estudió la colocalización de los marcadores de diferentes tipos celulares y la proteína α -syn.

Las imágenes de microscopía láser confocal con doble inmunofluorescencia revelaron que la inyección del vector AAV9 inducía una sobreexpresión de GFP o α -syn en neuronas dopaminérgicas, pero no en las células microgliales ni astrocitos de la SNpc de rata. Una semana después de la inyección del vector AAV9, se observó una expresión generalizada de GFP o α -syn que colocalizó con el marcador TH mostrando una eficiente transducción en las neuronas dopaminérgicas de la SNpc (Figura 4a, d, g, j). En

consonancia con estudios previos (Pignataro *et al.*, 2018), no se encontró señal de colocación significativa entre α -syn o GFP y el marcador de población microglial Iba-1 (Figura 4b, e, h, k) o el marcador de astrocitos GFAP (Figura 4c, f, i, l). Además, se observó colocación en neuronas negativas para TH, es decir, no dopaminérgicas.

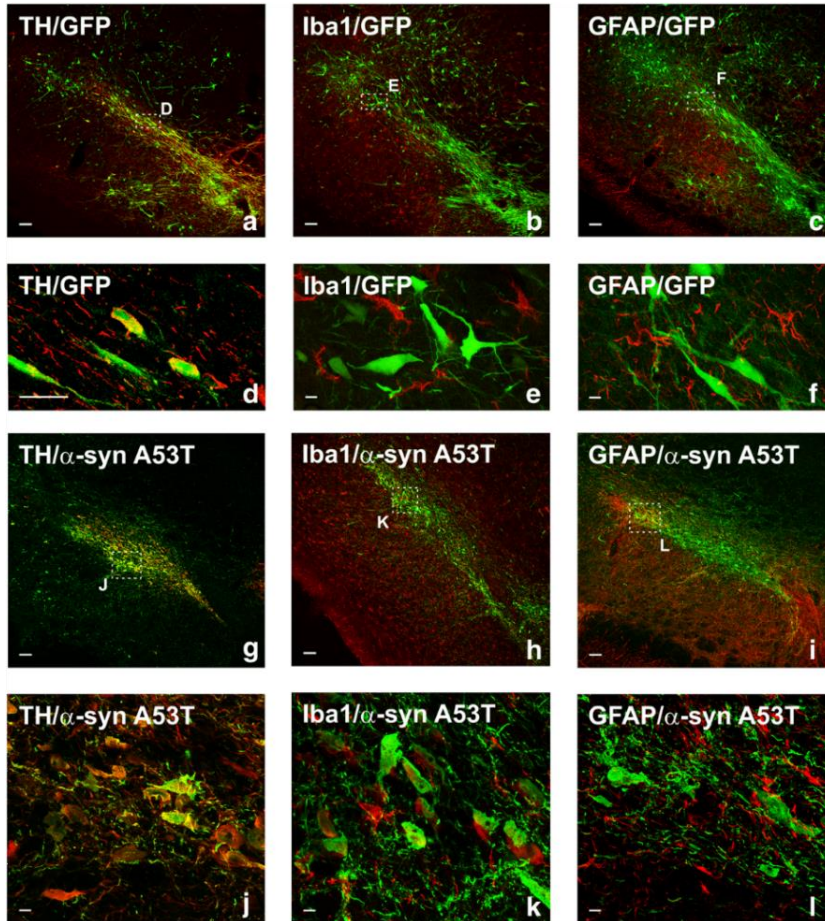


Figura 4. Doble inmunofluorescencia del marcador neuronal dopaminérgico TH (a, d, g, j), o el marcador microglial Iba-1 (b, e, h, k), o el marcador astrocítico (c, f, i, l) (rojo) y diferentes transgenes (GFP: a-f; α -syn-A53T: g-l) en la región de la sustancia negra 1 semana después de la inyección del vector AAV9 que expresan GFP humano o α -syn-A53T humana, respectivamente (verde). Las imágenes de microscopia láser confocal muestran la

colocalización (amarillo) de GFP o α -syn-A53T con el marcador neuronal dopaminérgico TH (a, d, g, j). Sin embargo, GFP o α -syn-A53T no se expresan en células microgliales ni astrocitos (b, c, e, f, h, i, k, l). Las áreas cuadradas en (a-c) y (g-i) se amplían en (d-f) y (j-l), respectivamente. Barras de escala = 75 μ m (a-c, g-i), 25 μ m (d) y 7,5 μ m (e-f, j-l). Abreviaturas: TH, tiroxina hidroxilasa; GFAP, proteína ácida fibrilar glial; Iba-1, molécula adaptadora de unión a calcio ionizado 1; GFP, proteína verde fluorescente; α -syn, α -sinucleína. Esta figura ha sido traducida de Rodríguez-Perez *et al.*, 2018; y se distribuye bajo los términos de Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Cuatro semanas después de la inyección, se observó una clara pérdida de células dopaminérgicas TH-ir en la SNpc de los grupos lesionados con ambos vectores de α -syn. A pesar de la intensa reacción microglial observada en la zona ventral del mesencéfalo ipsilateral a la lesión (véase más adelante), la expresión de α -syn se localizó exclusivamente en neuronas (Figura 5a-f). Sin embargo, se observaron algunas células microgliales fagocíticas envolviendo a neuronas que expresaban α -syn (Figura 5g-k).

La tasa de colocalización de las neuronas dopaminérgicas fue similar en los vectores de α -syn-WT y α -syn-A53T. Además, se determinó un marcaje intenso de la proteína α -syn fosforilada en las neuronas dopaminérgicas supervivientes en los grupos lesionados (Figura 6b-g; j-l). Los resultados obtenidos por WB demuestran la expresión de la proteína α -syn transcurrida una semana post-lesión. Sin embargo, 4 semanas tras la lesión se observa un aumento de expresión de α -syn fosforilada en serina p129, la cual no fue observada en la primera semana de lesión (Figura 6h-i).

Para estudiar si los antagonistas del receptor AT1 están implicados en la fosforilación de la proteína α -syn, se analizó la tasa de fosforilación de α -syn/TH en ratas tratadas con candesartán o telmisartán. Los resultados muestran que la tasa de fosforilación no disminuyó en ratas tratadas con bloqueantes del receptor AT1, en comparación con ratas no tratadas, lo que sugiere que la disminución de la expresión y de la fosforilación de la proteína α -syn no es un mecanismo responsable de los efectos neuroprotectores de candesartán y telmisartán descritos en los siguientes apartados (Figura 6b, c).

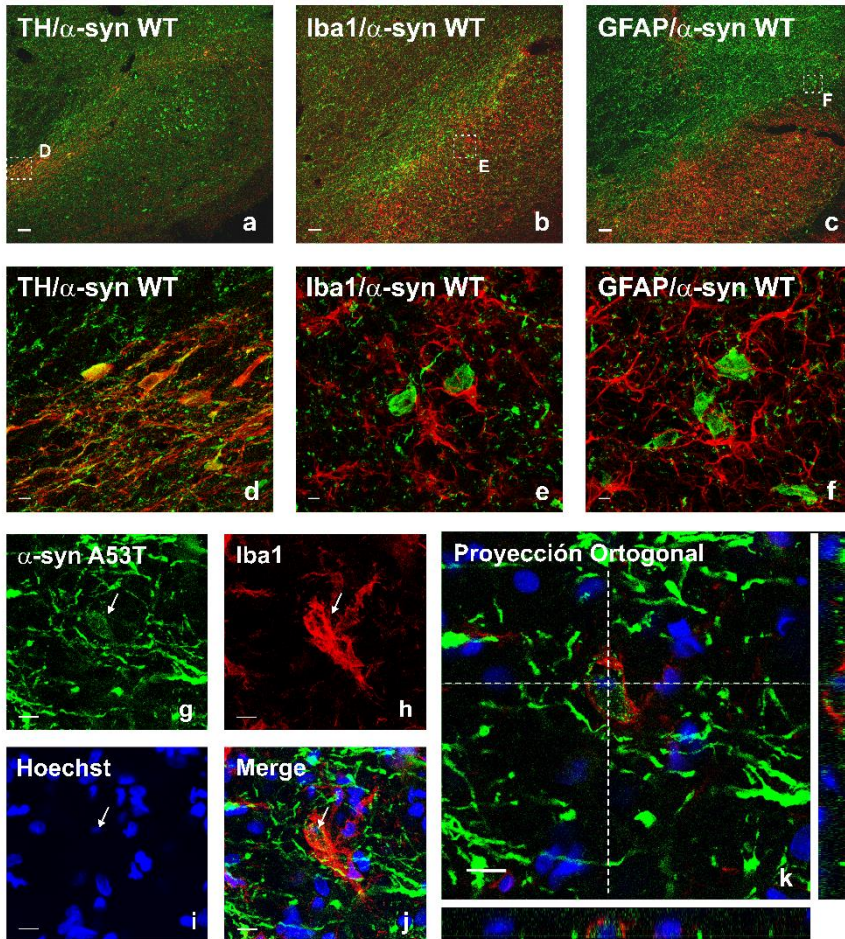


Figura 5. Doble y triple inmunofluorescencia del marcador neuronal dopaminérgico TH (a, d), o el marcador astrocítico GFAP (c, f), o el marcador microglial Iba-1 (b, e, g-k) (rojo), o el marcador nuclear Hoechst 33342 (i-k; azul), y diferentes transgenes (α -syn-WT: a-f; α -syn-A53T: g-k) (verde) en la región de la sustancia negra 4 semanas después de la inyección de AAV9 que expresa α -syn-WT humana (a-f) o α -syn-A53T humana (g-k), respectivamente. Las imágenes de microscopia láser confocal muestran la colocalización (amarillo) de α -syn-WT con el marcador neuronal dopaminérgico TH (a, d). Sin embargo, α -syn-WT no se expresa en la microglía ni en los astrocitos. Las áreas cuadradas en (a-c) se amplían en (d-f). En (b, e) se observa una intensa respuesta inflamatoria microglial. En (g, k) se muestra una célula microglial envolviendo a una neurona que expresa α -syn-A53T (flecha). Barras de escala = 75 μ m (a-c), 7,5 μ m (d), 5 μ m (e-f), y 10 μ m (g-k). Abreviaturas: TH, tiroxina hidroxilasa; GFAP, proteína ácida fibrilar glial; Iba-1, molécula adaptadora de unión a calcio ionizado 1; α -syn, α -sinucleína.

Esta figura ha sido traducida de Rodriguez-Perez *et al.*, 2018 y se distribuye bajo los términos de Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

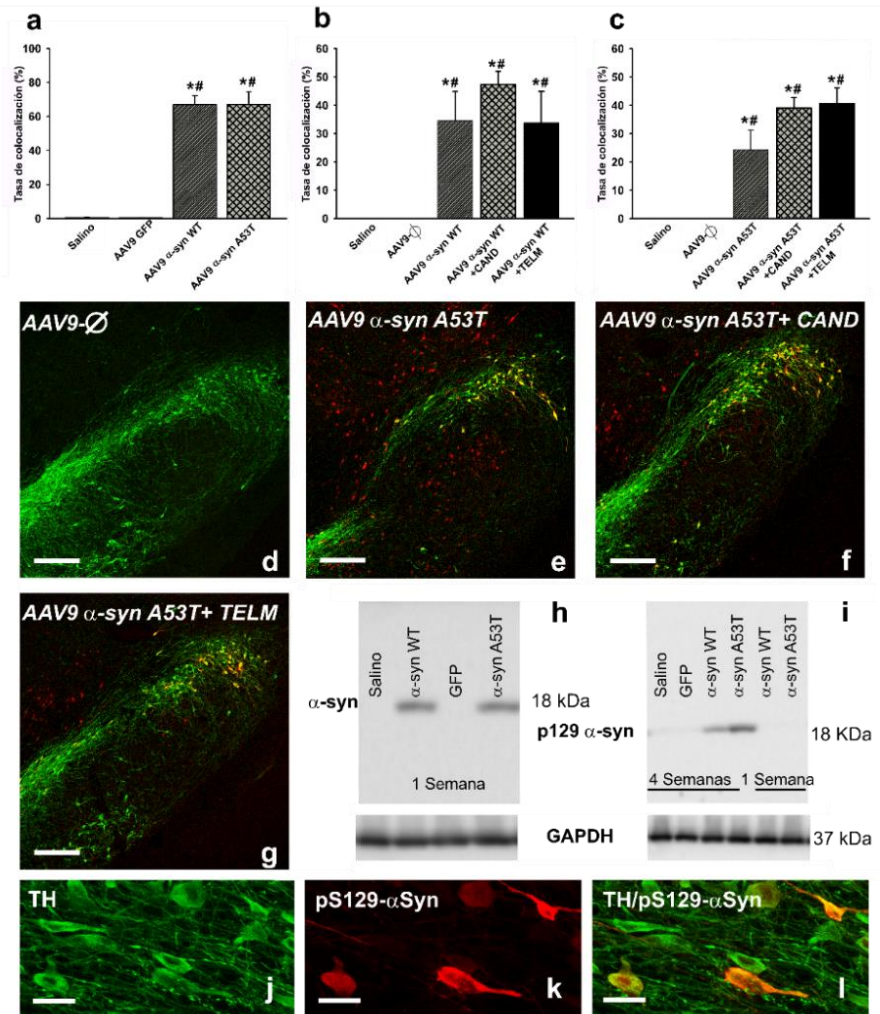


Figura 6. Expresión de α -syn (a, h) y α -syn fosforilada (pS129- α -syn) (b-g, i-l) a 1 semana (a, h) y a 4 semanas (b-g, i-l) después de la inyección de vectores AAV9. La tasa de expresión de α -syn en neuronas dopaminérgicas (TH-ir) de ratas inyectadas con AAV9- α -syn-WT o AAV9- α -syn-A53T se muestra en (a). La tasa de expresión de α -syn fosforilada en neuronas dopaminérgicas (TH-ir) de ratas inyectadas con AAV9- α -syn-WT o AAV9- α -syn-A53T y tratadas o no con candesartán (CAND) o telmisartán (TELM) se muestra en (b, c). La colocalización (amarillo) de α -syn fosforilada (roja) y neuronas dopaminérgicas (verde) en los

diferentes grupos experimentales se ilustra en (d, g) y se amplía en (j, l). La expresión de α -syn 1 semana después de la inyección (h) y α -syn fosforilada en la región nigral (es decir, células dopaminérgicas y no dopaminérgicas) 1 y 4 semanas después de la inyección (i) se confirmó mediante WB. Los datos se representan como la media \pm SEM. * $p < 0,05$ en relación con el grupo inyectado con solución salina; # $p < 0,05$ en relación con el grupo inyectado con AAV9- Φ . ANOVA de una vía seguido de la prueba post hoc de Holm-Sidak. Barras de escala = 250 μ m (d-g) y 25 μ m (j-l). Abreviaturas: TH, tiroxina hidroxilasa; GFP, proteína verde fluorescente; α -syn, α -sinucleína; AAV9, vector viral adenoasociado tipo 9; CAND, candesartán; TELM, telmisartán; WT, forma salvaje. Esta figura ha sido traducida de Rodríguez-Perez *et al.*, 2018 y se distribuye bajo los términos de Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

4.1.2. **Pérdida de neuronas dopaminérgicas en un modelo de Parkinson basado en sinucleinopatía. Efecto neuroprotector de los bloqueantes del receptor AT1**

Para comprobar la muerte neuronal dopaminérgica y la pérdida de densidad de los terminales estriales que caracteriza a los modelos animales de EP se realizó un análisis inmunohistoquímico del marcador TH en la SNpc y en el ST, respectivamente. En relación con estudios anteriores en los que utilizan modelos animales similares (Decressac *et al.*, 2012, Van der Perren *et al.*, 2015), no se produjo una pérdida apreciable de la viabilidad de neuronas dopaminérgicas (Figura 7a) una semana después de la inyección. Además, no se observaron cambios significativos en las células TH-ir del estriado, lo que sugiere que no se produjo una pérdida significativa de terminales dopaminérgicos estriales (Figura 8a).

Cuatro semanas después de la inyección, mediante cuantificación estereológica, se demostró que el número de las neuronas TH-ir en la SNpc ipsilateral a la lesión de ratas inyectadas con solución salina no fue significativamente diferente del cuantificado en los animales con inyección de vectores vacíos. Sin embargo, la inyección de AAV9- α -syn-WT o AAV9- α -syn-A53T indujo una pérdida de neuronas TH-ir próxima al 57% con respecto a los grupos control (Figura 7b-f). La pérdida de neuronas en la SNpc se confirmó mediante el recuento celular de secciones con tinción de Nissl. Además, la pérdida de terminales estriales dopaminérgicos se confirmó mediante análisis de densidad óptica de TH-ir estriatal, tanto en las ratas inyectadas con AAV9- α -syn-WT, como en las inyectadas con AAV9- α -syn-A53T, que

mostraron una disminución significativa de la TH-ir estriatal en relación con las ratas control o las inyectadas con vectores AAV9 vacíos (Figura 8b-f).

Las ratas inyectadas con AAV9- α -syn-WT y tratadas con el antagonista del receptor AT1 (ARAII), candesartán, mostraron una diferencia significativa en la pérdida de neuronas dopaminérgicas (alrededor de un 40%) y de terminales dopaminérgicos estriatales en comparación con los grupos control. Sin embargo, la pérdida de neuronas y de terminales estriatales fue significativamente menor que la observada en ratas inyectadas con AAV9- α -syn-WT y no tratadas con candesartán. Un efecto neuroprotector similar fue observado en ratas inyectadas con AAV9- α -syn-WT y tratadas con telmisartán. También se observaron efectos neuroprotectores similares en ratas inyectadas con AAV9- α -syn-A53T y tratadas con candesartán o telmisartán (Figuras 7b, c, g-i y 8b, c, g-i). La pérdida de neuronas en la SNpc también se confirmó mediante el recuento celular de secciones con tinción de Nissl en los grupos tratados.

Además, mediante análisis de HPLC, se estudiaron los niveles de DA y de sus principales metabolitos, con el objetivo de confirmar los cambios bioquímicos causantes de la pérdida de neuronas dopaminérgicas. Cuatro semanas después de la lesión, en consonancia con la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la SNpc y de terminales estriatales, el análisis por HPLC reveló una marcada disminución de los niveles de DA y sus metabolitos (DOPAC y HVA) en ratas inyectadas con AAV9- α -syn-WT (Figura 9a-d) y en ratas inyectadas con AAV9- α -syn-A53T (Figura 9e-h) en comparación con los controles. Además, se observó un aumento en la ratio DOPAC/DA, lo que sugería un aumento en el recambio de DA. Curiosamente, los niveles de DA y sus metabolitos aumentaron significativamente en las ratas lesionadas y tratadas con candesartán o telmisartán (Figura 9).

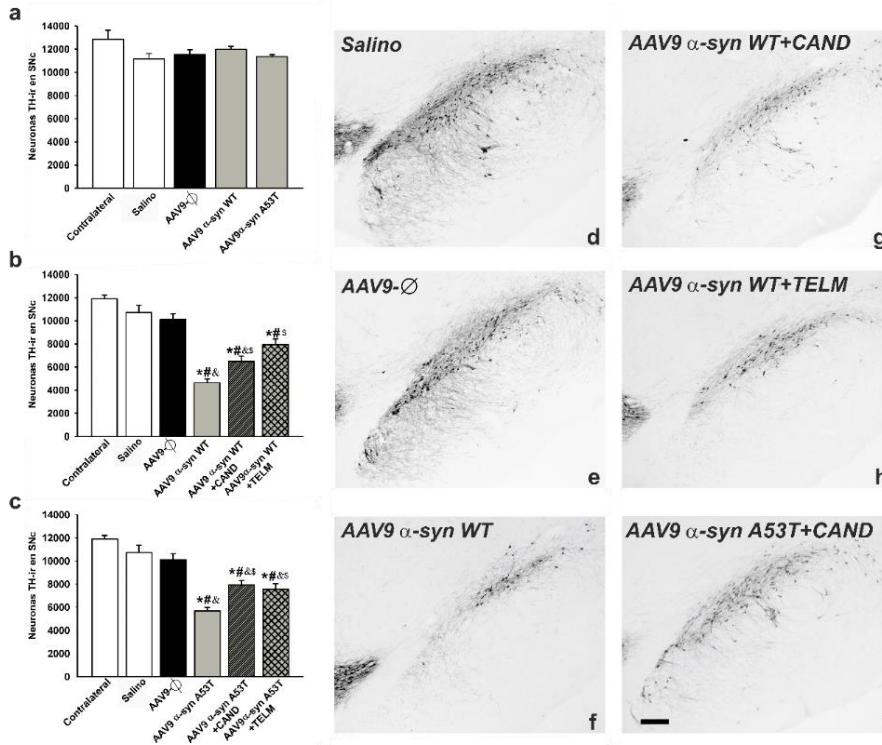


Figura 7. Neuronas dopaminérgicas (TH-ir) en la SNpc del lado no inyectado (contralateral, control) a 1 semana (a) o a 4 semanas (b-i) después de la inyección de solución salina, o vectores AAV9 vacíos (AAV9-∅), o AAV9- α -syn-WT humana, o AAV9- α -syn-A53T humana en ratas no tratadas o tratadas con el antagonista AT1, candesartán (CAND) o telmisartán (TELM). En (d, i) se muestran fotomicrografías representativas de la sustancia negra compacta de diferentes grupos de ratas. El número total estimado de neuronas dopaminérgicas (TH-ir) en la sustancia negra compacta de los diferentes grupos experimentales se muestra en (a-c). Los datos se representan como la media \pm SEM. * $p < 0,05$ respecto al lado no inyectado (contralateral, control), # $p < 0,05$ respecto al grupo tratado con solución salina, & $p < 0,05$ respecto al grupo inyectado con AAV9-∅, \$ $p < 0,05$ en relación con el grupo inyectado con AAV9 que expresa α -syn-WT humana (b) o que expresa α -syn-A53T humana (c). ANOVA de una vía y prueba post hoc de Holm-Sidak. Barra de escala = 200 μ m. Abreviaturas: TH-ir, inmunorreactiva a tiroxina hidroxilasa; α -syn, α -sinucleína; AAV9, vector viral adenoasociado tipo 9; CAND, candesartán; TELM, telmisartán; WT, forma salvaje; SNpc: sustancia negra pars compacta. Esta figura ha sido traducida de Rodríguez-Perez *et al.*, 2018 y se distribuye bajo los términos de Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

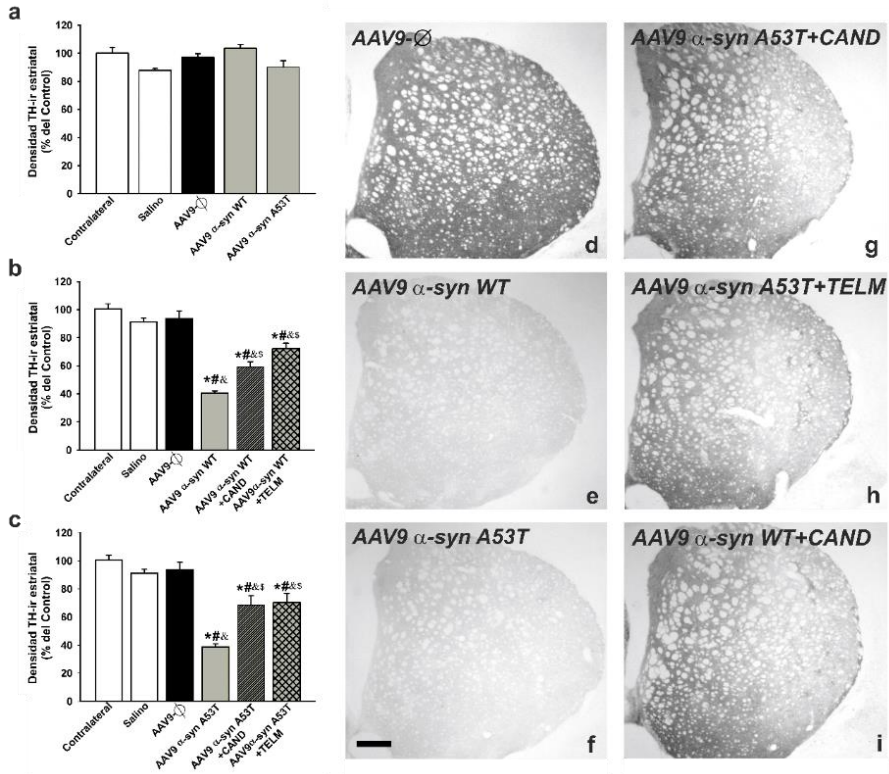


Figura 8. Densitometría óptica de los terminales estriatales dopaminérgicos (TH-ir) del lado no inyectado (contralateral, control) a 1 semana (a) o a 4 semanas (b- i) después de la inyección de solución salina, o de vectores AAV9 vacíos (AAV9-Φ), o AAV9-α-syn-WT humana, o AAV9-α-syn-A53T humana en ratas no tratadas o tratadas con los antagonistas AT1, candesartán (CAND) o telmisartán (TELM). Las fotomicrografías representativas de la inmunorreactividad TH estriatal de diferentes grupos de ratas se muestran en (d-i). La densitometría óptica de la TH de terminales estriatales de los diferentes grupos experimentales se muestra en (a-c). Los datos son representados como la media ± SEM. *p < 0,05 en relación con el lado no inyectado (contralateral, control), #p < 0,05 en relación con el grupo tratado con solución salina, &p < 0,05 en relación con el grupo inyectado con AAV9-Φ, \$p < 0,05 en relación con el grupo inyectado con AAV9-α-syn-WT humana (b) o AAV9-α-syn-A53T humana (c). ANOVA de una vía y prueba post hoc de Holm-Sidak. Barra de escala = 500 μm. Abreviaturas: TH-ir, inmunorreactiva a tiroxina hidroxilasa; α-syn, α-sinucleína; AAV9, vector viral adenoasociado tipo 9; WT, forma salvaje. Esta figura ha sido traducida de Rodríguez-Perez *et al.*, 2018 y se distribuye bajo los términos de Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

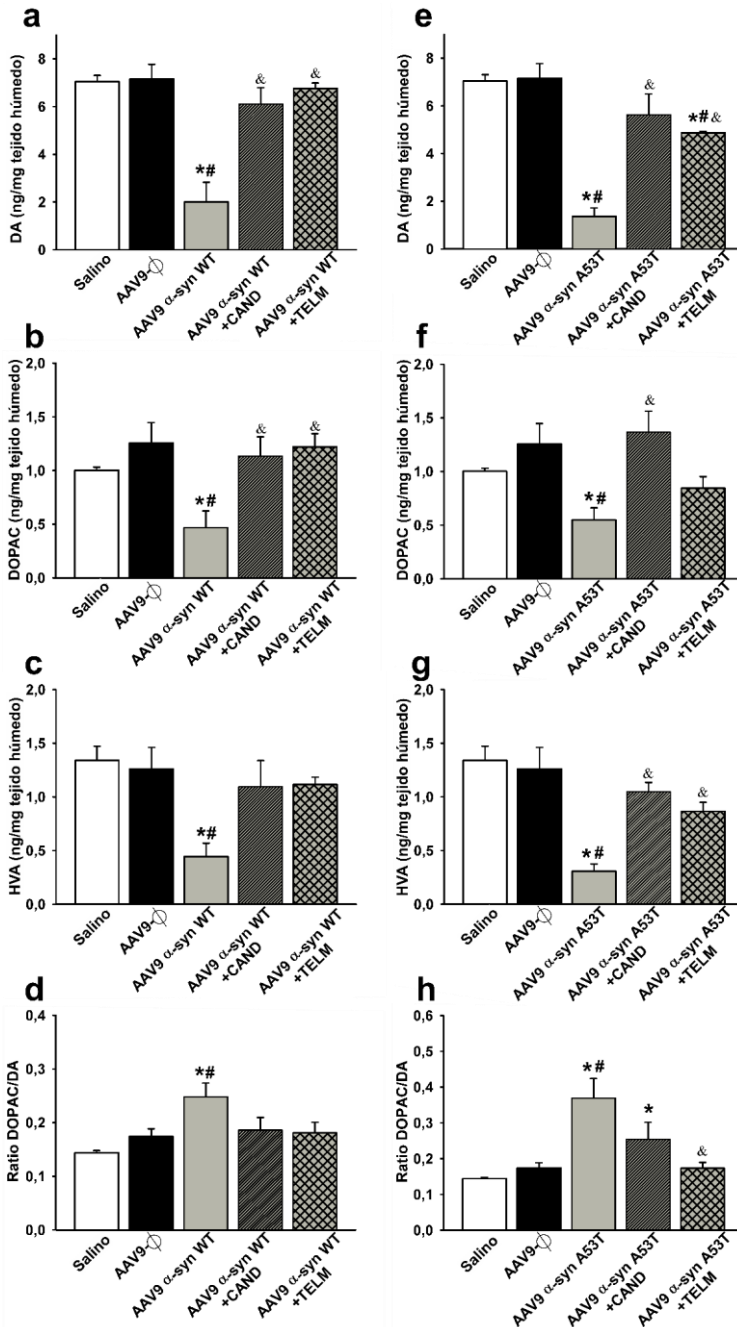


Figura 9. Análisis por HPLC de los niveles estriatales de DA (a, e), DOPAC (b, f) y HVA (c, g) a 4 semanas después de la inyección de vectores AAV9 en los grupos de control y en los grupos inyectados con AAV9- α -syn-WT (a-d) o AAV9- α -syn-A53T (e-h). También se muestra el recambio estriatal de DA calculado por la relación DOPAC/DA (d, h). Las mediciones muestran reducciones significativas de la DA y los metabolitos en las ratas lesionadas en relación con los controles (solución salina y vectores vacíos), que mejoraron significativamente con el tratamiento con candesartán o telmisartán. Los datos se representan como la media \pm SEM. * $p < 0,05$ en relación con el grupo inyectado con solución salina; # $p < 0,05$ en relación con el grupo inyectado con AAV9- Φ ; & $p < 0,05$ en relación con el grupo inyectado con AAV9- α -syn-WT humana (a, b) o AAV9- α -syn-A53T humana (e-h). ANOVA de una vía seguido de la prueba post hoc de Holm-Sidak. Abreviaturas: WT, forma salvaje; α -syn, α -sinucleína; CAND, candesartán; DA, dopamina; DOPAC, ácido 3,4- dihidroxifenilacético; HVA, ácido homovanílico; TELM, telmisartán; AAV9, vector viral adenoasociado tipo 9. Esta figura ha sido traducida de Rodríguez-Perez *et al.*, 2018 y se distribuye bajo los términos de Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Finalmente, para confirmar que los resultados obtenidos en análisis bioquímicos e histológicos ocasionaban un efecto en el comportamiento motor de los animales se realizaron diferentes pruebas de comportamiento (test del cilindro, test del rotarod y test de actividad locomotora). Los animales inyectados con AAV9- α -syn-WT (Figura 10a-c) y con AAV9- α -syn-A53T (Figura 10d-f) mostraron una disminución significativa en el uso espontáneo de la pata delantera deteriorada (Figura 10a, d), en el rendimiento del rotarod (Figura 10b, e) y en la actividad locomotora (Figura 10c, f), que mejoraron significativamente en las ratas lesionadas tratadas con candesartán o telmisartán.

En base a estos resultados, se demostró que el bloqueo de los receptores AT1 provoca un efecto protector en las neuronas dopaminérgicas, acompañado de un mejor rendimiento del comportamiento motor.

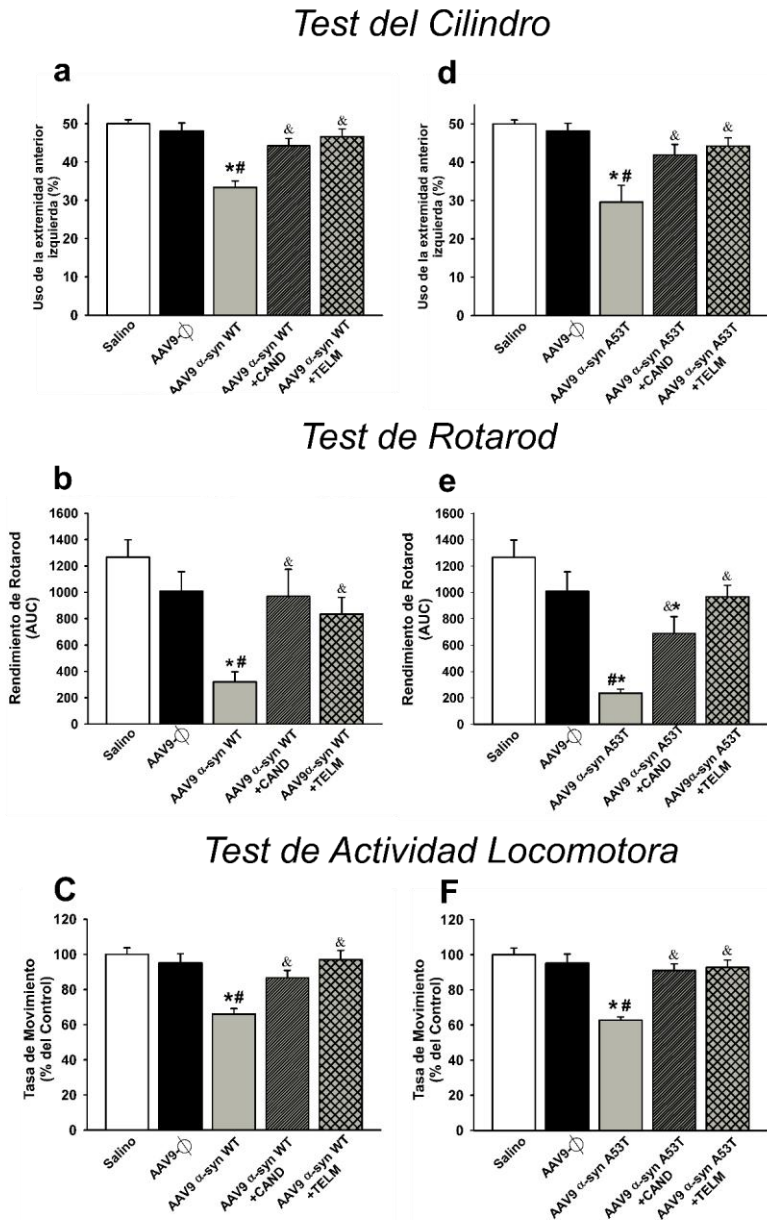


Figura 10. Análisis del comportamiento motor en los diferentes grupos experimentales a 4 semanas después de la inyección de los vectores AAV9. El rendimiento motor fue analizado mediante la prueba del cilindro (a, d), la prueba del rotarod (b, e) y la prueba de campo abierto

para la actividad locomotora (c, f). Las mediciones muestran reducciones significativas del rendimiento motor en las ratas lesionadas en relación con los controles (solución salina y vectores vacíos), que mejoraron significativamente con el tratamiento con candesartán o telmisartán. Los datos se presentan como la media \pm SEM. * $p < 0,05$ en relación con el grupo inyectado con solución salina; # $p < 0,05$ en relación con el grupo inyectado con AAV9- Φ ; & $p < 0,05$ en relación con el grupo inyectado con AAV9- α -syn-WT humana (a-c) o AAV9- α -syn-A53T humana (d-f). ANOVA de una vía seguido de la prueba post hoc de Holm-Sidak. Abreviaturas: WT, forma salvaje; α -syn, α -sinucleína; CAND, candesartán; TELM, telmisartán; AAV9, vector viral adenoasociado tipo 9; AUC, área bajo la curva. Esta figura ha sido traducida de Rodríguez-Perez *et al.*, 2018 y se distribuye bajo los términos de Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

4.1.3. Implicación del receptor AT1 en la neuroinflamación mediada por la sobreexpresión de α -syn

Estudios previos han demostrado una importante relación entre la sinucleinopatía y la respuesta inflamatoria microglial. Otros estudios han observado una estrecha relación entre la hiperactivación del eje pro-oxidativo del SRA, Ang II/AT1/NOX, y la neuroinflamación. Por ello, se estudió si el uso de antagonistas del receptor AT1 podrían tener un efecto beneficioso en la inflamación mediada por la sobreexpresión de α -syn. Para ello, se llevaron a cabo análisis de inmunofluorescencia e inmunohistoquímica de microglía reactiva. Además, se estudió la expresión del ARNm de las principales citoquinas de fenotipo microglial pro-inflamatorio/pro-oxidante (TNF- α , IL-6, IL-1 β , iNOS) y fenotipo anti-inflamatorio/anti-oxidante (ARG-1).

En las imágenes de fluorescencia, se observó que 1 semana después de la inyección de AAV9- α -syn se produjo un aumento en la densidad de células Iba-1-ir en la SNpc (Figura 4h, k). Sin embargo, los fenotipos fagocíticos, así como, la microglía fagocítica que envolvía las neuronas que sobreexpresaban α -syn eran poco abundantes. Cuatro semanas después de la inyección de los vectores virales, se observó un marcado aumento de la respuesta microglial, acompañada de un abundante fenotipo de microglía activada y un alto número de células microgliales envolviendo las neuronas positivas para α -syn (Figura 5b, e g-k).

Por otro lado, el elevado número de fenotipos morfológicos de microglía clásicamente activada se confirmó con inmunohistoquímica y cuantificación esterológica de OX-6 en la SNpc. Las ratas inyectadas con AAV9- α -syn-WT o AAV9- α -syn-A53T mostraron un número

significativamente mayor de células OX6-ir que las inyectadas con salino o con vectores vacíos cuatro semanas después de la inyección. Sin embargo, los efectos de la α -syn en la respuesta microglial fueron significativamente menores en las ratas tratadas con los antagonistas del receptor AT1, candesartán o telmisartán (Figura 11).

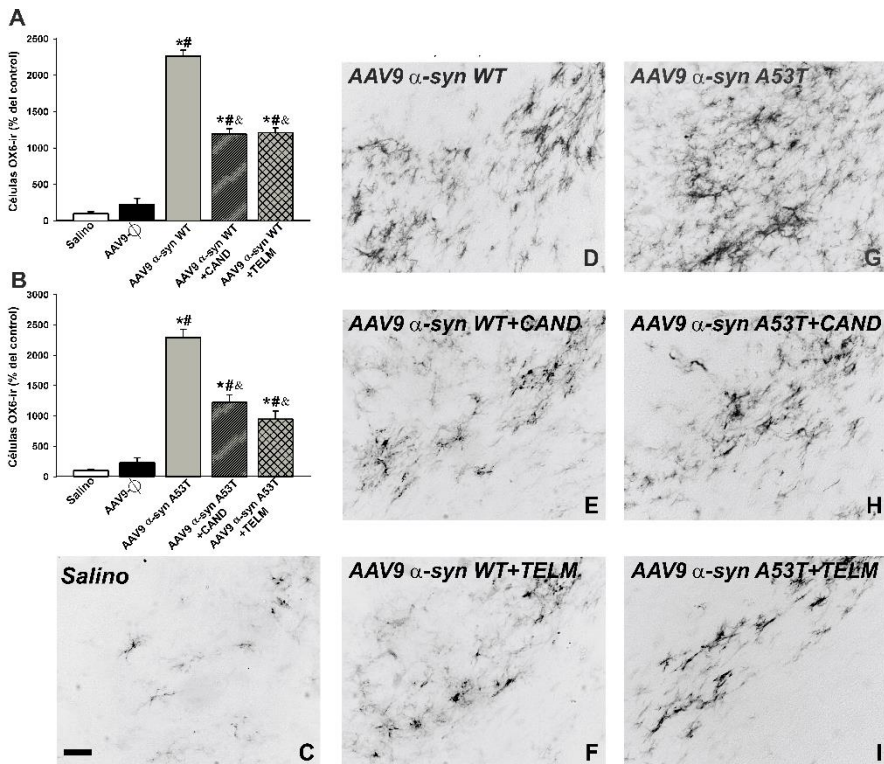


Figura 11. Células microgliales inmunorreactivas a OX6 en la sustancia negra a las 4 semanas después de la inyección de solución salina, o vectores AAV9 vacíos (AAV9- Φ), o AAV9- α -syn-WT, o AAV9- α -syn-A53T en ratas no tratadas o tratadas con el antagonista AT1 candesartán (CAND) o telmisartán (TELM). En (C-I) se muestran fotomicrografías representativas de la sustancia negra compacta de diferentes grupos de ratas. El número estimado de células positivas para OX6 en la sustancia negra de los diferentes grupos experimentales se muestra en (A, B). Las células microgliales se muestran como porcentajes de las observadas en los controles (es decir, ratas inyectadas con solución salina), y los datos son representados como la media \pm SEM. * $p < 0,05$ en relación con el grupo tratado con solución salina, # $p < 0,05$ en relación con el grupo inyectado con AAV9- Φ -, & $p < 0,05$ en relación con el grupo inyectado con AAV9 expresando α -syn-WT humana (A) o expresando α -syn-A53T humana (B). ANOVA de una vía y prueba post hoc de Holm-Sidak. Barra de escala = 100 μ m.

Abreviaturas: WT, forma salvaje; α -syn, α -sinucleína; DA, dopamina; DOPAC, ácido 3,4-dihidroxifenilacético; HVA, ácido homovanílico; AAV9, vector viral adenoasociado tipo 9; OX6-ir, inmunorreactivas a OX-6; CAND, candesartán; TELM, telmisartán. Esta figura ha sido traducida de Rodríguez-Pérez *et al.*, 2018 y se distribuye bajo los términos de Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Tras los resultados obtenidos, se estudió si la sobreexpresión de α -syn podría provocar un aumento del eje pro-oxidativo del SRA, tal y como se ha demostrado en otros modelos de EP (Labandeira-García *et al.*, 2021). Para ello, se estudió la expresión del ARNm del receptor AT1 mediante RT-QPCR y la actividad de NOX en homogenado de SNpc de ratas inyectadas con AAV9- α -syn y AAV9- \emptyset . Los resultados mostraron que los animales que sobreexpresaban α -syn tenían incrementada la expresión de los receptores AT1 y de la actividad NOX en la región nigral en comparación con las ratas control inyectadas con vectores vacíos (Figura 12a, b, d). Esta hiperactivación del eje pro-oxidativo del SRA podría inhibirse con el uso de antagonistas del receptor de AT1 (ARAI). Por ello, se trataron animales inyectados con AAV9- α -syn-WT ó AAV9- α -syn-A53T con antagonistas de AT1, candesartán y telmisartán. El uso de ambos tratamientos demostró una disminución de la hiperactivación del eje pro-oxidativo del SRA, disminuyendo así, la expresión del ARNm del AT1 y la actividad de NOX, con respecto a ratas inyectadas con AAV9- α -syn sin tratamiento (Figura 12a, b, d).

En consonancia con estos resultados, las ratas inyectadas con AAV9- α -syn mostraron un aumento significativo de la expresión del marcador de actividad fagocítica CD68 (Figura 12c) y de los marcadores del fenotipo microglial pro-inflamatorio (iNOS, TNF- α , IL-1 β e IL-6) (Figura 13a-e) y una disminución significativa de la expresión del marcador del fenotipo microglial anti-inflamatorio ARG-1 (Figura 13f). Estos cambios en los marcadores de respuesta inflamatorias microgliales fueron inhibidos por el tratamiento simultáneo con los antagonistas de AT1, candesartán o telmisartán (Figura 13a-f).

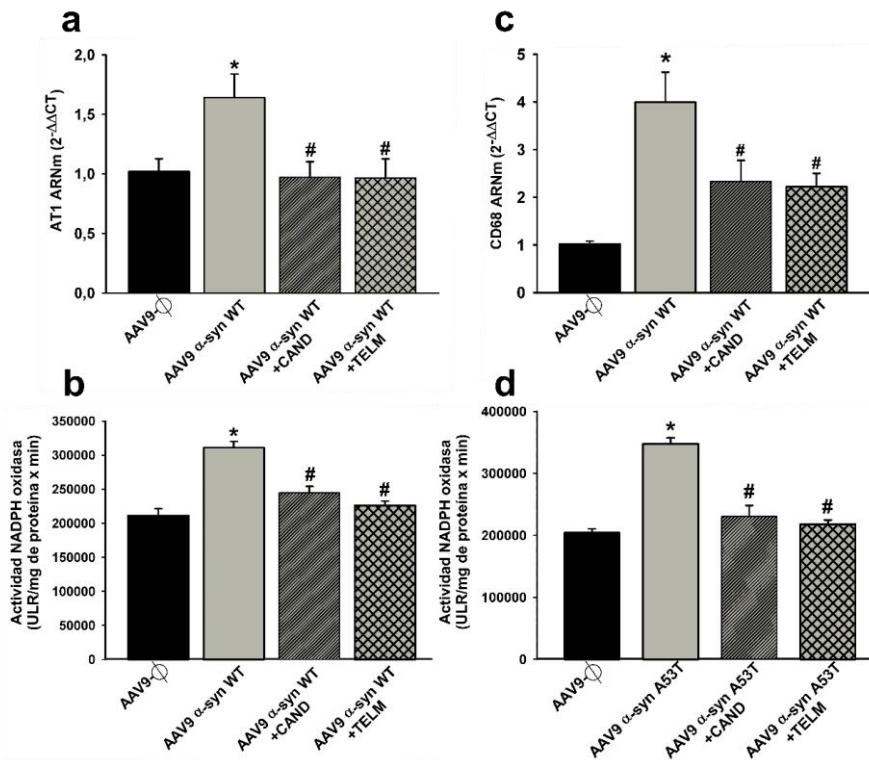


Figura 12. Efecto de los vectores AAV9 vacíos (AAV9-Φ) o AAV9- α -syn sobre la expresión del ARNm del receptor AT1, la actividad NOX y los marcadores de actividad fagocítica (CD68) en ratas no tratadas o tratadas con el antagonista AT1, candesartán (CAND) o telmisartán (TELM). AAV9- α -syn-WT indujo un aumento significativo de la expresión del ARNm del receptor AT1 (a), de la actividad NOX (b) y de CD68 (c). En (d) se muestra un aumento significativo de la actividad NOX inducido por AAV9- α -syn-A53T. Estos cambios fueron inhibidos por el tratamiento simultáneo con los antagonistas de AT1, candesartán o telmisartán (a-d). En (a, c), los resultados se normalizaron con respecto a los valores del grupo de control. Para la RT-QPCR, se utilizó el método de valores umbral de ciclo comparativo ($2^{-\Delta\Delta C_t}$). La expresión de ARNm se midió en relación con la de los transcritos de mantenimiento (β -actina). La actividad de NOX se expresó como unidades de luminiscencia relativas (ULR/min/mg de proteína). Los datos son representados como la media \pm SEM. * $p < 0,05$ en relación con el grupo inyectado con AAV9-Φ; # $p < 0,05$ en relación con el grupo inyectado con AAV9 que expresa α -syn humana. ANOVA de una vía seguido de la prueba post hoc de Holm-Sidak. Abreviaturas: WT, forma salvaje; α -syn, α -sinucleína; AAV9, vector viral adenoasociado tipo 9; CAND, candesartán; TELM, telmisartán; AT1, receptor de angiotensina tipo 1; CD68, cluster de diferenciación 68. Esta figura ha sido traducida de Rodríguez-Perez *et al.*, 2018 y se distribuye bajo los términos de Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

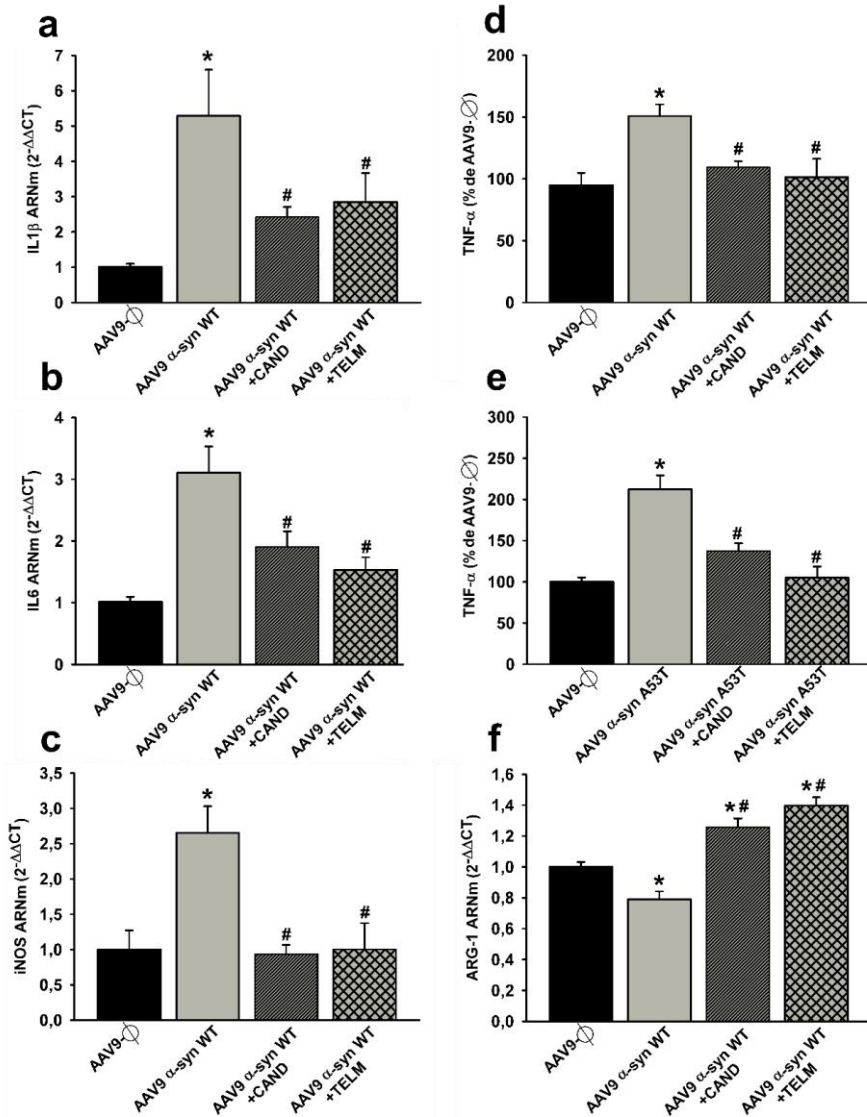


Figura 13. Efecto de los vectores AAV9 vacíos (AAV9- Φ) o AAV9- α -syn humana sobre la expresión de marcadores del fenotipo microglial en ratas no tratadas o tratadas con el antagonista AT1, candesartán (CAND) o telmisartán (TELM). El AAV9- α -syn-WT indujo un aumento significativo de la expresión de marcadores del fenotipo pro-oxidante (IL-1 β , IL-6, iNOS y TNF- α) (a-d). El marcado aumento de la expresión de TNF- α inducido por AAV9- α -syn-A53T se muestra en (e). Sin embargo, se observó una disminución de la expresión del marcador del fenotipo de reparación/regeneración anti-inflamatorio ARG-1 (f). Estos cambios

fueron inhibidos por el tratamiento simultáneo con los antagonistas de AT1, candesartán (CAND) o telmisartán (TELM) (a-f). Los resultados se normalizaron con respecto a los valores del grupo de control. Para la RT-PCR, se utilizó el método de valores umbrales de ciclo comparativo ($2^{-\Delta\Delta C_t}$). Se midió la expresión ARNm en relación con el de los transcritos de mantenimiento (β -actina). Los niveles de TNF- α se cuantificaron con kits de ensayo inmunoenzimático (ELISA) específicos para ratas en picogramos por mililitro por miligramo de proteína y se expresaron como porcentajes del contenido en las muestras del grupo de control. Los datos se representan como la media \pm SEM. * $p < 0,05$ en relación con el grupo inyectado con AAV9- Φ ; # $p < 0,05$ en relación con el grupo inyectado con AAV9 que expresa α -syn humana. ANOVA de una vía seguido de la prueba post hoc de Holm-Sidak. Abreviaturas: Abreviaturas: WT, forma salvaje; α -syn, α -sinucleína; CAND, candesartán; TELM, telmisartán; AAV9, vector viral adenoasociado tipo 9; IL-1 β , interleucina 1 β ; IL-6, interleucina 6; iNOS, óxido nítrico sintasa inducible; TNF- α , factor de necrosis tumoral. Esta figura ha sido traducida de Rodríguez-Perez *et al.*, 2018 y se distribuye bajo los términos de Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

En resumen, los resultados obtenidos muestran un importante papel de los receptores AT1 en la neuroinflamación mediada por la sobreexpresión de la proteína α -syn humana en un modelo de rata. El tratamiento con bloqueantes del receptor AT1, candesartán y telmisartán, disminuyó la respuesta microglial inflamatoria promoviendo así, un efecto neuroprotector en la muerte neuronal dopaminérgica en la SNpc resultando en un mejor rendimiento del comportamiento motor.

4.2. RECEPTORES AT2 CEREBRALES E INFLAMACIÓN

Los resultados anteriormente presentados muestran un importante papel del receptor AT1 en la neuroinflamación y respuesta microglial de un modelo de neurodegeneración dopaminérgica. Sin embargo, la implicación del receptor AT2 en dichos procesos ha sido menos estudiada. Es por ello que, el siguiente objetivo de la tesis se centró en estudiar el papel del receptor AT2, bajo situaciones de inflamación periférica crónica, y su posible implicación en la degeneración dopaminérgica con la que cursa la EP.

4.2.1. Receptores AT2 cerebrales en inflamación periférica crónica (envejecimiento) y aguda (LPS)

El envejecimiento es un proceso fisiológico que desemboca en diversos mecanismos pro-oxidativos que promueven un estado de inflamación crónica en el organismo. Este estado de inflamación podría

influir en la expresión del receptor AT2 cerebral. Para estudiar la expresión del receptor AT2 en el envejecimiento se compararon ratones WT jóvenes (2m), adultos (12m) y envejecidos (18m). Los análisis de RT-QPCR revelaron que, en el homogenizado de la SN, la expresión de ARNm del receptor AT2 mostraba una marcada disminución con el envejecimiento (Figura 14A).

Seguidamente, se analizó cómo podría influir la disminución de la expresión del receptor AT2 observada en el envejecimiento sobre otros componentes y receptores del SRA cerebral. Para ello se utilizaron ratones AT2KO jóvenes y envejecidos, y ratones WT jóvenes y envejecidos, y se realizaron análisis de transcritos mediante RT-QPCR y análisis de expresión de proteínas mediante WB.

Los resultados muestran que, en el homogenado de SN, la expresión de ARNm del receptor AT1 mostró un marcado aumento en ratones envejecidos (Figura 14B). Curiosamente, los niveles altos de expresión de ARNm del receptor AT1 ya era significativos en ratones AT2KO jóvenes con respecto a WT jóvenes (2m), y no cambiaron significativamente con el envejecimiento (12m y 18m) (Figura 14B).

Los resultados obtenidos también muestran una disminución significativa en la expresión de ARNm del MasR en ausencia de AT2 en comparación con ratones WT jóvenes. En ratones WT, la expresión del receptor MasR disminuyó con el envejecimiento y no hubo diferencias significativas en la expresión del receptor Mas entre los ratones WT adultos y envejecidos y los ratones AT2 KO (Figura 14C). Además del aumento de la expresión de AT1, los ratones AT2KO de diferentes edades (2m, 12m, 18m) mostraron un aumento significativo en la expresión de ARNm y de proteína del ANG en relación con los controles WT correspondientes (Figura 14D). Por último, los cambios importantes observados en la expresión de ARNm en ratones AT2KO jóvenes se confirmaron a nivel de proteína mediante WB (Figura 14E-G).

Todos estos resultados indican un marcado desequilibrio en la expresión de componentes y receptores del SRA cerebral hacia el eje pro-inflamatorio y pro-oxidativo en ratones AT2KO y WT envejecidos.

Este desequilibrio podría desembocar en un incremento de la respuesta inflamatoria cerebral. Por ello se estudió la expresión de ARNm de diferentes marcadores pro-inflamatorios. Los resultados mostraron un aumento en la expresión de marcadores pro-inflamatorios como IL-1 β , NF-kB e IL-6 en animales envejecidos WT, que ya se encontraba incrementada en los ratones AT2KO (Figura 15A, B, C). También se observó un aumento de la expresión de ARNm de marcadores de estrés oxidativo como la subunidad p47 de NOX (p47 fagocito oxidasa) y una disminución de la actividad COX en la SNpc de ratones AT2KO con respecto a ratones WT (Figura 15D-E). Curiosamente, se observó un aumento similar en la expresión de los marcadores pro-oxidativos en ratones WT envejecidos (Figura 15D-E).

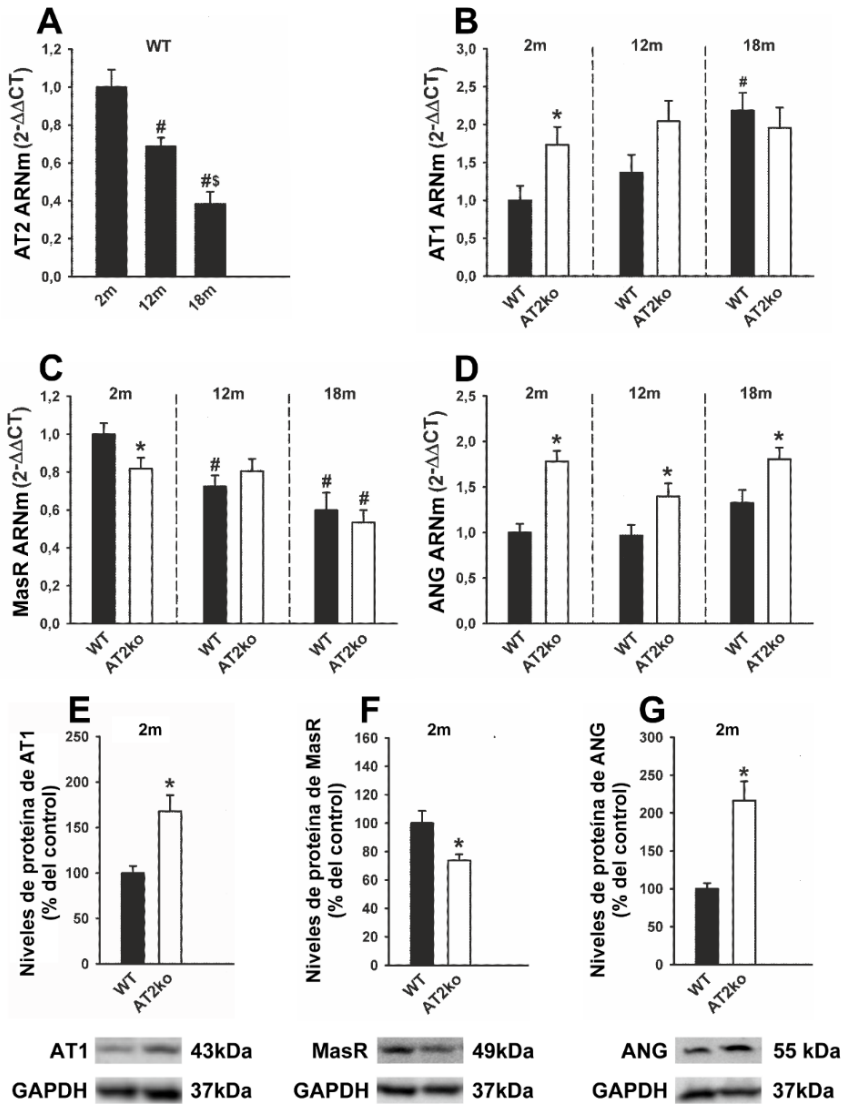


Figura 14. Cambios en los componentes y receptores del SRA con el envejecimiento en la región de la SNpc en ratones WT y en ratones AT2KO. Los ratones WT mostraron una disminución progresiva de la expresión del ARNm del receptor AT2 (A) y del MasR (C) y un aumento del ARNm del receptor AT1 (B) y del ANG (D); estadísticamente no significativo) con el envejecimiento, que ya se observa en los ratones AT2KO jóvenes (B-D). Los principales cambios en la expresión del ARNm de los receptores AT1 y Mas y del ANG se confirmaron a nivel proteico mediante un análisis de WB (E-G). La expresión proteica se midió en relación

con la banda de la proteína de mantenimiento GAPDH y la expresión de ARNm se midió en relación con la de los transcritos de mantenimiento (β -Actina). Los valores de las proteínas fueron normalizados a los valores de los controles (100%). Para el ARNm se utilizó el método de los valores umbrales del ciclo comparativo ($2^{-\Delta\Delta C_t}$). Los datos son representados como la media \pm SEM. * $p < 0,05$ en comparación con el control WT correspondiente, # $p < 0,05$ en comparación con el grupo joven (2m) WT o joven (2m) AT2KO, \$ $p < 0,05$ en comparación con el grupo adulto (12m) WT. ANOVA de una vía (A) o ANOVA de dos vías (B-D) seguido de la prueba post hoc de Student-Newman-Keuls, y prueba t de Student (E-G). Abreviaturas: WT, forma salvaje; AT2, receptor de angiotensina tipo 2; AT1, receptor de angiotensina tipo 1; ANG, angiotensinógeno; AT2KO, *Knock-Out* para el receptor AT2. Esta figura ha sido traducida de Rodríguez-Perez *et al.*, 2019 (con autorización de Elsevier).

Con el objetivo de estudiar la respuesta a estímulos pro-inflamatorios periféricos agudos en ausencia de los receptores AT2, a un grupo de ratones jóvenes AT2KO se les inyectó LPS para inducir una respuesta inflamatoria periférica aguda. Con este modelo se observó que la expresión de ARNm de marcadores pro-inflamatorios (IL-6, IL-1 β) mostró un aumento adicional tras la inyección de LPS. Sin embargo, no se observó (al menos con la dosis 5mg/kg y al tiempo utilizado, 24 h) un aumento adicional en la expresión del ARNm del receptor AT1 (Figura 15F). Estos resultados están en consonancia con lo observado en ratones AT2KO (Figuras 14B y 15A–C), ya que el envejecimiento induce un aumento adicional de los marcadores pro-inflamatorios pero no un aumento adicional de la expresión del ARNm de AT1 en animales AT2KO.

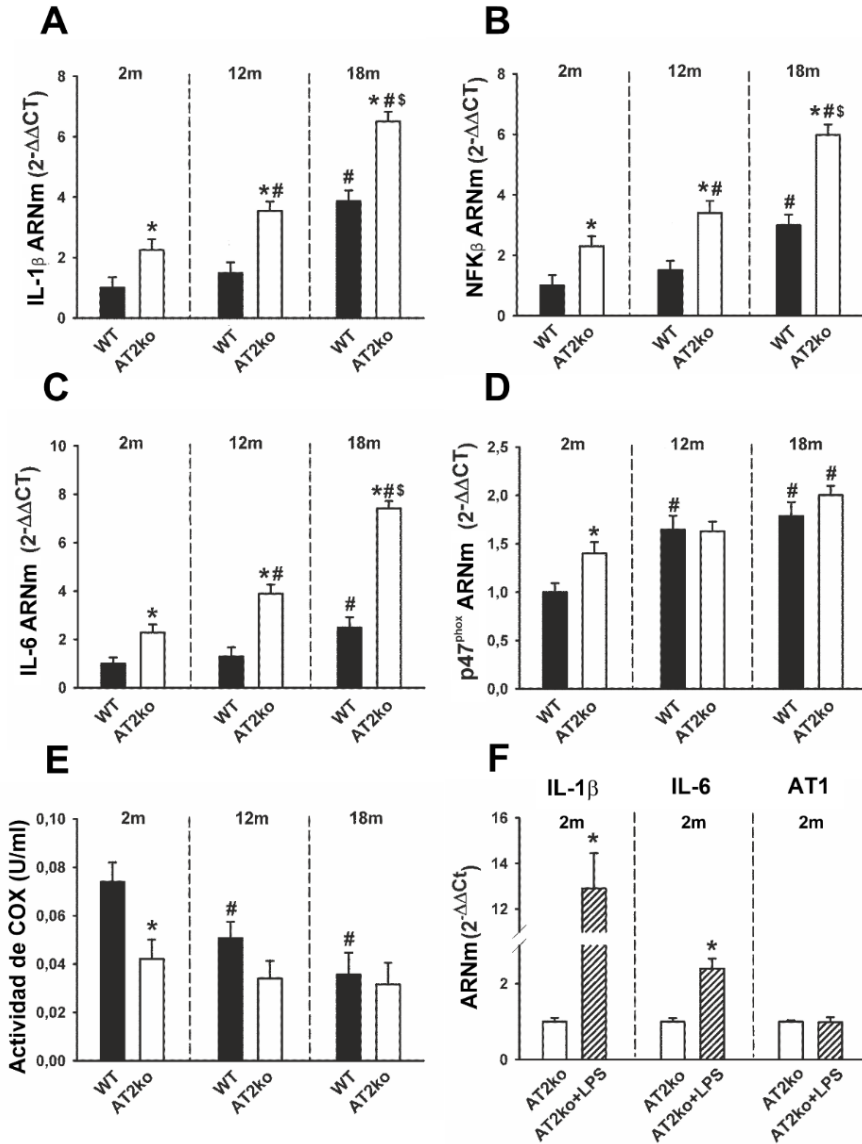


Figura 15. Cambios en los marcadores pro-inflamatorios (expresión de ARNm de IL-1 β , NF- κ B, IL-6) y pro-oxidativos (expresión de ARNm de p47^{phox}, actividad de COX) durante el envejecimiento en la región de la SN en ratones WT y AT2KO. Los ratones WT mostraron una disminución progresiva de la actividad COX (E) y un aumento de la expresión marcadores pro-inflamatorios y pro-oxidativos (A-D) con el envejecimiento, lo que ya se observa en los ratones

AT2KO jóvenes (A-E). En los ratones AT2KO, la inyección de LPS indujo un mayor aumento de la expresión del ARNm de los marcadores pro-inflamatorios (IL-1 β , IL-6), pero no un mayor aumento de la expresión del ARNm de AT1 (F). La expresión de cada gen se determinó en relación con los transcritos de mantenimiento (β -actina). Para el ARNm se utilizó el método de los valores umbrales del ciclo comparativo ($2^{-\Delta\Delta C_t}$). Los datos se representan como la media \pm SEM. * $p < 0,05$ en comparación con el control WT correspondiente, # $p < 0,05$ en comparación con WT joven (2m) o AT2KO joven (2m), \$ $p < 0,05$ en comparación con WT adulto (12m) o AT2KO adulto (12m). ANOVA de dos vías seguido de la prueba post hoc de Student-Newman-Keuls (A-E), y la prueba t de Student (F). Abreviaturas: WT, forma salvaje; AT1, receptor de angiotensina tipo 1; ANG, angiotensinógeno; AT2KO, *Knock-Out* para el receptor AT2; IL-1 β , interleucina 1 β ; IL-6, interleucina 6; NF- κ B, factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas; LPS, lipopolisacárido; COX, citocromo c oxidasa. Esta figura ha sido traducida de Rodríguez-Perez *et al.*, 2019 (con autorización de Elsevier).

Estudios previos han demostrado una relación entre el SRA y el sistema dopaminérgico (Felder y Jose, 2006; Villar-Cheda *et al.*, 2014). Por tanto, en base a los resultados obtenidos en la región mesencefálica de ratones jóvenes AT2KO, se estudió el posible papel de la ausencia del receptor AT2 en el sistema dopaminérgico, y su consecuente implicación en el comportamiento motor.

Mediante análisis de HPLC se analizaron los niveles de DA y sus metabolitos estriales (DOPAC). Los resultados obtenidos mostraron que, en condiciones basales, no se detectaron cambios significativos en los niveles de DA ni de sus metabolitos, y sólo se observó una ligera, pero significativa disminución de la ratio DOPAC/DA (es decir, una disminución del recambio de DA; Figura 16D-F) en animales AT2KO en comparación con ratones WT. Además, mediante análisis de transcritos por RT-QPCR, se observó una marcada disminución de la expresión del ARNm del receptor D1 estriatal y del ratio D1/D2 en ratones AT2KO, lo que puede conducir a una disminución de la actividad de la vía directa de los núcleos basales, y una consecuente disminución de la actividad motora (Figura 16H-J). Por ello, se estudió el comportamiento motor de animales AT2KO en comparación con animales WT mediante test de locomoción y velocidad media. Curiosamente, los resultados obtenidos muestran que ratones AT2KO jóvenes (2m) mostraron una marcada disminución de la actividad motora global espontánea, que fue similar a la de los ratones WT envejecidos (18 m) (Figura 16A). El análisis de la velocidad media también mostró una disminución significativa en los ratones AT2KO en relación con los ratones WT (Figura 16B), aunque las diferencias

fueron menos marcadas que las observadas en el comportamiento motor global.

Además, se estudió si los ratones AT2KO presentaban una disminución del número de neuronas dopaminérgicas de la SNpc mediante análisis de inmunohistoquímica y cuantificación estereológica del marcador TH. Los resultados no mostraron diferencias significativas en el número de neuronas TH-ir entre los ratones AT2KO y los ratones WT (Figura 16G), ni en el número de neuronas con tinción de Nissl en la SNpc entre ambos grupos. Sin embargo, los resultados obtenidos muestran una importante implicación del receptor AT2 en la actividad del sistema dopaminérgico.

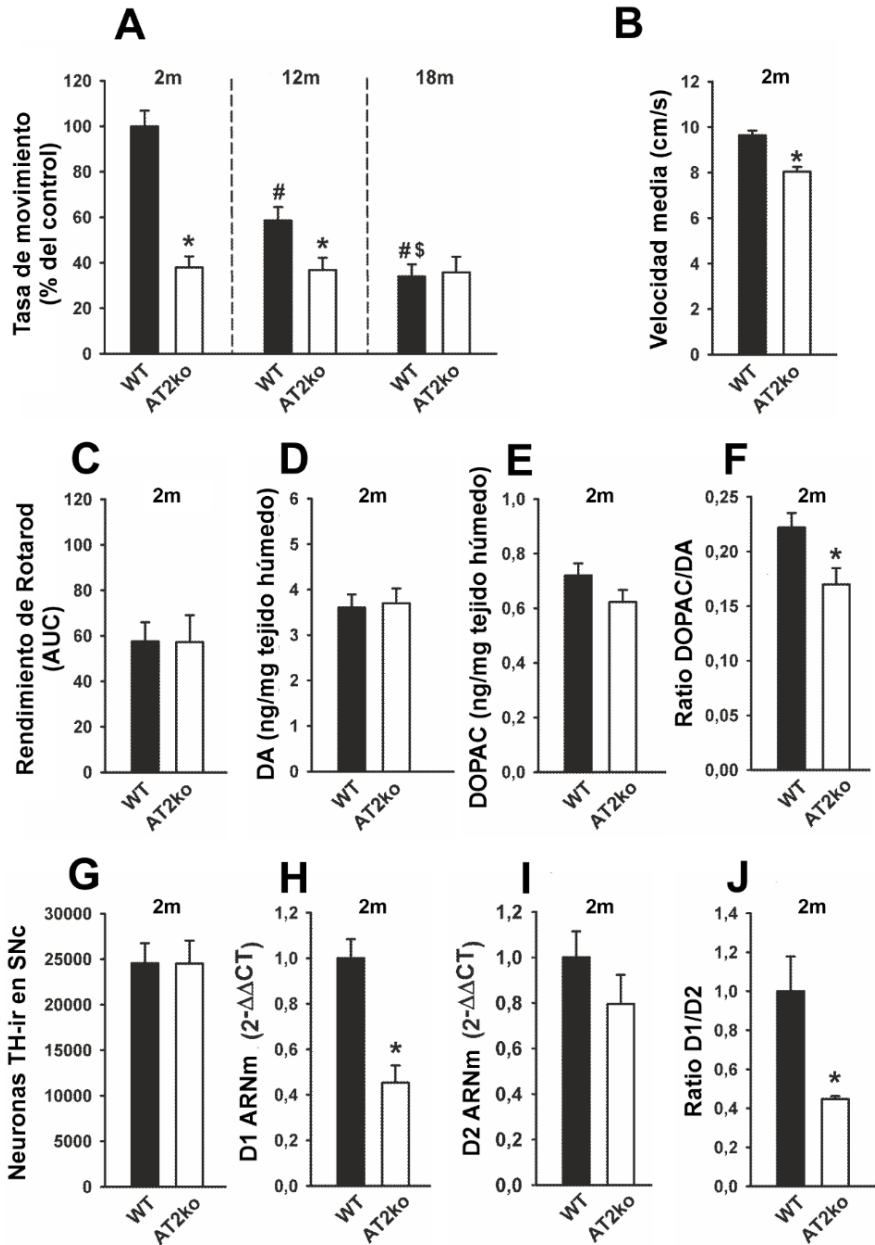


Figura 16. Comportamiento motor y componentes del sistema dopaminérgico en ratones AT2KO en relación con ratones WT. La actividad motora (tasa de movimiento), la velocidad media de locomoción y el rendimiento de rotarod se muestran en A-C. La DA estriatal, DOPAC y la relación DOPAC/DA se muestran en D-F. No se observó una pérdida significativa de neuronas dopaminérgicas en los ratones AT2KO (G). Sin embargo, se observó una disminución significativa de la expresión del ARNm del receptor de dopamina D1 estriatal y de la relación D1/D2 (H-J). La expresión de cada gen fue determinada en relación con los transcritos de mantenimiento (β -Actina). Para el ARNm se utilizó el método de los valores umbrales del ciclo comparativo ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). Los datos se representan como la media \pm SEM. * $p < 0,05$ en comparación con el control WT correspondiente, # $p < 0,05$ en comparación con los controles WT jóvenes (2 m), \$ $p < 0,05$ en comparación con los controles WT adultos (12 m). ANOVA de dos vías seguido de la prueba post hoc de Student-Newman-Keuls (A) y la prueba t de Student (B-J). Abreviaturas: WT, forma salvaje; AT2KO, *Knock-Out* para el receptor AT2; AUC, área bajo la curva; DA, dopamina; DOPAC, ácido 3,4-dihidroxifenilacético; TH-ir, inmunorreactivas a TH; D1, receptor de dopamina tipo 1; D2, receptor de dopamina tipo 2. Esta figura ha sido traducida de Rodríguez-Pérez *et al.*, 2019 (con autorización de Elsevier).

4.2.2. Receptores AT2 y degeneración dopaminérgica

Con el fin de estudiar los mecanismos moleculares implicados en la regulación de la expresión de los receptores AT2 en células microgliales, y, por tanto, su posible implicación en fenómenos de inflamación y muerte neuronal dopaminérgica, se realizaron experimentos *in vitro* utilizando microglía primaria y la línea celular microglial N9.

En las células microgliales se observó que la expresión proteica y de ARNm de los receptores AT1 y AT2 cambió en respuesta a la toxina pro-inflamatoria LPS. El tratamiento con LPS, inflamación aguda, indujo un aumento en la expresión del ARNm del receptor AT1 y una disminución en la expresión del ARNm del receptor AT2, lo que condujo a un marcado aumento de la relación AT1/AT2 (Figura 17A, B, C, D). Curiosamente, el tratamiento de los cultivos microgliales con el agonista del receptor AT2, CGP-42112A, inhibió el aumento inducido por el LPS en la expresión del ARNm de la AT1. (Figura 17A, B). En consonancia con esto, los cultivos de microglía primaria de ratones AT2KO mostraron un aumento significativo de la expresión de ARNm del receptor AT1 (Figura 17E).

El tratamiento de las células microgliales con LPS también indujo un aumento significativo de marcadores de inflamación microglial, como la actividad de NOX, los niveles proteicos de TNF- α y la

actividad ROCK, lo que sugiere que los receptores AT1 desempeñan un papel importante en la respuesta microglial inducida por LPS, y que ésta es modulada por los receptores AT2 (Figuras 18 y 19).

Los resultados presentados muestran la importante regulación del receptor AT2 en la expresión de AT1, y su implicación en la inflamación microglial. Sin embargo, los mecanismos moleculares implicados en dicha regulación aún no están completamente descritos.

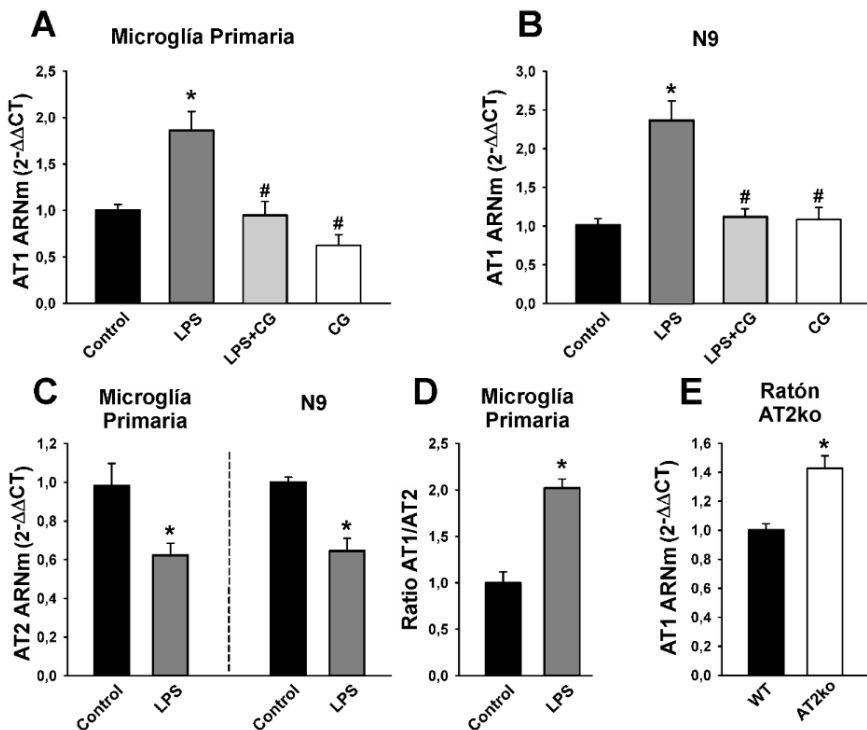


Figura 17. Efectos del LPS (A-D), de la activación del receptor AT2 con el agonista CG (A, B) o de la supresión del receptor AT2 (E) sobre la expresión de ARNm de los receptores AT1 (A, B, E) y AT2 (C) y la relación AT1/AT2 (D) en cultivos de microglía primaria (A, C-E) o en la línea celular microglial N9 (B, C). El LPS provocó una disminución de la expresión del ARNm de AT2 y un aumento de la expresión del ARNm de AT1, que fue inhibido por el tratamiento con el agonista de AT2, CG. En consonancia con esto, la microglía primaria de los ratones AT2KO mostró un aumento de la expresión del ARNm del receptor AT1 (E). La expresión de cada gen se determinó en relación con el transcripciones de mantenimiento (β -Actina). Para el ARNm se utilizó el método de los valores umbrales del ciclo comparativo ($2^{-\Delta\Delta C_t}$). Los datos son representados como la media \pm SEM. * $p < 0,05$ en comparación con el control

correspondiente, #p < 0,05 en comparación con las células tratadas con LPS. Análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido de la prueba post hoc de Student-Newman-Keuls (A-B) y la prueba t de Student (C-E). Abreviaturas: WT, forma salvaje; AT2KO, *Knock-Out* para el receptor AT2; AT1, receptor de angiotensina tipo 1; AT2, receptor de angiotensina tipo 2; LPS, lipopolisacárido; CG, CGP-42112A. Esta figura ha sido traducida de Rodriguez-Perez *et al.*, 2019 (con autorización de Elsevier).

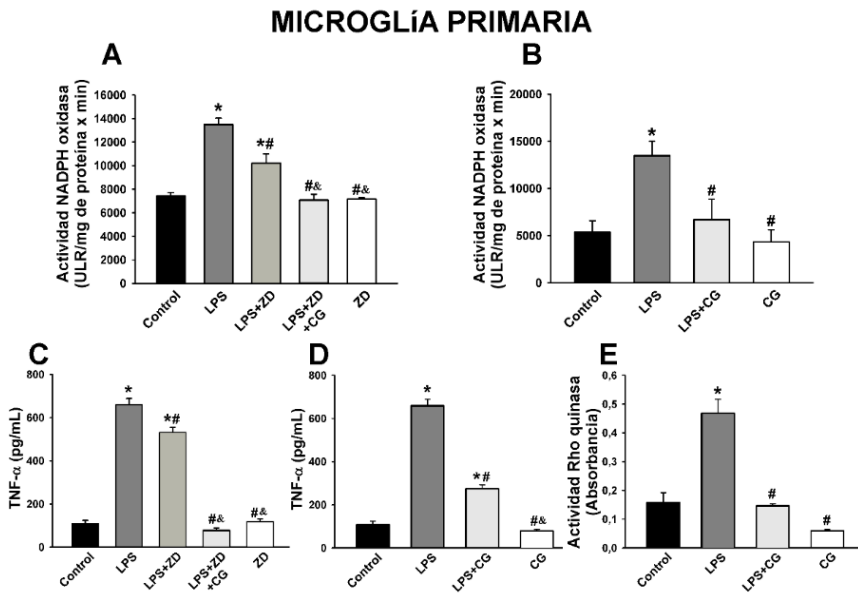


Figura 18. Efectos del LPS, de la inhibición de los receptores AT1 con el antagonista ZD, y de la activación de los receptores AT2 con el agonista CG, sobre la expresión del marcador de estrés oxidativo (actividad de NOX), (A, B) y de marcadores inflamatorios (TNF- α , Rho quinasa), (C-E) en cultivos de microglía primaria. El LPS indujo un marcado aumento de estrés oxidativo y de marcadores pro-inflamatorios, que fue inhibido por el antagonista AT1 (ZD) y el agonista AT2 (CG). Los datos son representados como la media \pm SEM. *p < 0,05 en comparación con el control correspondiente, #p < 0,05 en comparación con las células tratadas con LPS, y &p < 0,05 en comparación con LPS + ZD (C) o LPS + CG (D). Análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido de una prueba post hoc de Student Newman-Keuls. Abreviaturas: LPS, lipopolisacárido; CG, CGP-42112A; ZD, ZD-7155; ULR, unidades de luminiscencia relativa; TNF- α : factor de necrosis tumoral. Esta figura ha sido traducida de Rodriguez-Perez *et al.*, 2019 (con autorización de Elsevier).

LÍNEA CELULAR N9

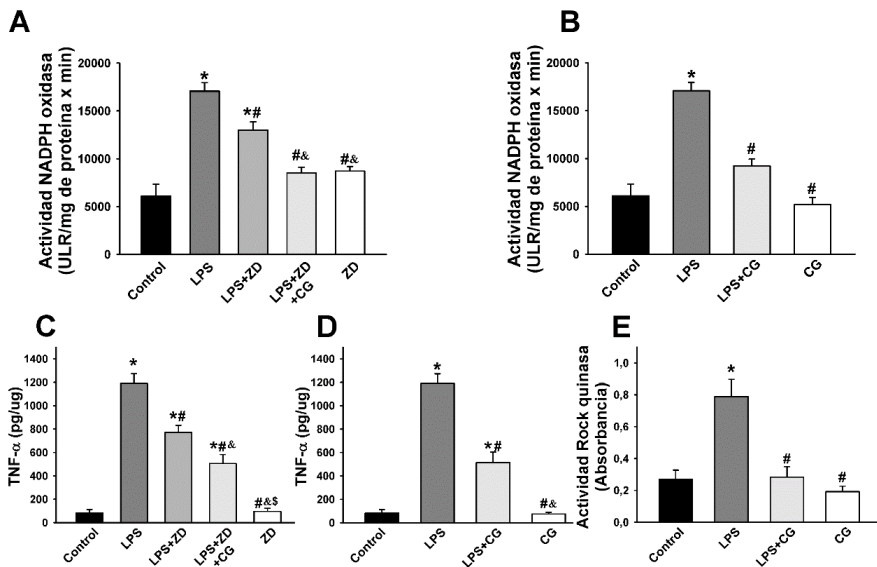


Figura 19. Efectos de la administración del LPS, inhibición de los receptores AT1 con el antagonista ZD y activación de los receptores AT2 con el agonista CG sobre la expresión prooxidativa (actividad de NOX y marcadores proinflamatorios (TNF- α , ROCK) en cultivos de la línea microglial N9. El LPS indujo un marcado aumento en el estrés oxidativo y los marcadores inflamatorios, que fue inhibido por el antagonista de del receptor AT1, ZD, y el agonista del receptor AT2, CG. Para el ARNm se utilizó el método de valores umbral de ciclo comparativo ($2^{-\Delta\Delta C_t}$). Los datos son representados como la media \pm SEM. * $p < 0.05$ en comparación con el control correspondiente, # $p < 0.05$ en comparación con las células tratadas con LPS, & $p < 0.05$ en comparación con LPS + ZD (A, C) o LPS + CG (D), \$ $p < 0.05$ en comparación con LPS + ZD + CG. Análisis de varianza unidireccional (ANOVA) seguido de la prueba post hoc de Student-Newman-Keuls. Abreviaturas: LPS, lipopolisacárido; CG, CGP-42112A; ZD, ZD-7155; ULR, unidades de luminiscencia relativa; TNF- α : factor de necrosis tumoral. Esta figura ha sido traducida de Rodríguez-Perez *et al.*, 2019 (con autorización de Elsevier).

Por tanto, con el fin de investigar los posibles mecanismos moleculares implicados en la regulación a la baja de la expresión del ARNm de AT1 mediante la estimulación de AT2, se trataron células microgliales (microglía primaria y células microgliales N9) con el inhibidor de la actividad de óxido nítrico sintasa (NOS), L-NAME, o el inhibidor específico de GMPC, ODQ. Ambos inhibidores bloquearon el efecto inhibitor del agonista de AT2, CGP-42112A, sobre el aumento inducido por LPS en la expresión del ARNm y de la proteína del

receptor AT1 en microglía primaria (Figura 20A, B) y en la línea celular microglial, N9 (Figuras 21A, B y 22A, B).

Diversos estudios han demostrado que el receptor AT1 también es regulado, en diversos tipos celulares, por diversos factores de transcripción, entre los que destacan los factores Sp1 y Sp3 (Zhao *et al.*, 2001; Elton y Martin, 2007). Sin embargo, en microglía esta regulación no está del todo demostrada. En los experimentos *in vitro* realizados se observó que el aumento inducido por LPS en la expresión de ARNm y proteína de AT1 fue bloqueado por el inhibidor específico del factor de transcripción Sp1, MMA, tanto en microglía primaria (Figura 20C), como en la línea microglial N9 (Figuras 21C y 22C). Además, la activación de los receptores AT2 con CGP-42112A inhibió la activación inducida por LPS de Sp1 (Figura 20D). Sin embargo, CGP-42112A no indujo cambios significativos en la actividad del factor de transcripción Sp3 (Figura 20E).

En conjunto, estos resultados indican que, en las células microgliales, la activación del receptor AT2 disminuye la expresión de AT1 y del factor de transcripción Sp1, y disminuye los efectos inducidos por AT1 mediante la activación de la vía NOS/NO/GMPc.

Esto demuestra una clara inhibición del eje pro-oxidativo del SRA mediante la activación del eje anti-inflamatorio en células microgliales. El eje anti-inflamatorio del SRA está formado por los receptores AT2 y también por los receptores Mas. Por tanto, se estudió si MasR también presentaba un papel en la regulación del receptor AT1 y, por tanto, del eje pro-oxidativo del SRA en células microgliales.

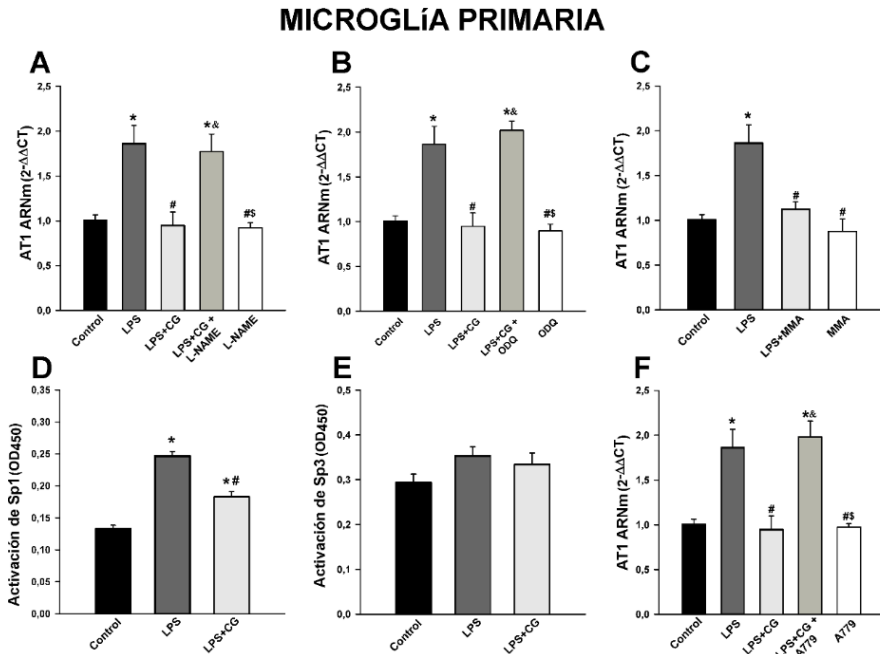


Figura 20. En cultivos primarios de microglía, el efecto inhibitor del agonista del receptor AT2 (CG) sobre la expresión del ARNm de AT1 fue bloqueado por el inhibidor de la actividad del enzima NOS, L- NAME (A), por el inhibidor específico de GMPc, ODQ (B), por el inhibidor específico del factor de transcripción Sp1, MMA (C), y por el antagonista del receptor Mas, A779 (F). En consonancia con esto, la activación de los receptores AT2 con CG inhibió la activación de Sp1 inducida por LPS (D). Sin embargo, el tratamiento con CG no produjo cambios significativos en la actividad del factor de transcripción Sp3 (E). La expresión de cada gen fue determinada en relación con los transcritos de mantenimiento (β -Actina). Para el ARNm se utilizó el método de los valores umbrales del ciclo comparativo ($2^{-\Delta\Delta C_t}$). Los datos son representados como la media \pm SEM. * $p < 0,05$ en comparación con el control correspondiente, # $p < 0,05$ en comparación con las células tratadas con LPS, y & $p < 0,05$ en comparación con LPS + CG, \$ $p < 0,05$ en comparación con LPS + CG + L-NAME (A) o LPS + CG + ODQ (B) o LPS + CG + A779 (F). Análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido de la prueba post hoc de Student-Newman-Keuls. Abreviaturas: LPS, lipopolisacárido; CG, CGP-42112A; AT1, receptor de angiotensina tipo 1; OD, densidad óptica; ODQ, 1H-[1,2,4]-oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one; MMA, Mitramicina A; L-NAME: N ω -Nitro-L-arginina metil éster clorhidrato. Esta figura ha sido traducida de Rodríguez-Perez *et al.*, 2019 (con autorización de Elsevier).

Los resultados obtenidos muestran que la inhibición de la actividad del receptor MasR tras la administración de A779 bloqueó el efecto inhibitor de AT2 sobre el aumento de expresión proteica y de ARNm

del receptor AT1 inducido por LPS, revelando que el eje de receptores AT2/Mas presenta un importante papel en la regulación de la respuesta inflamatoria microglial (Figuras 20F; 21D y 22D).

LÍNEA CELULAR N9

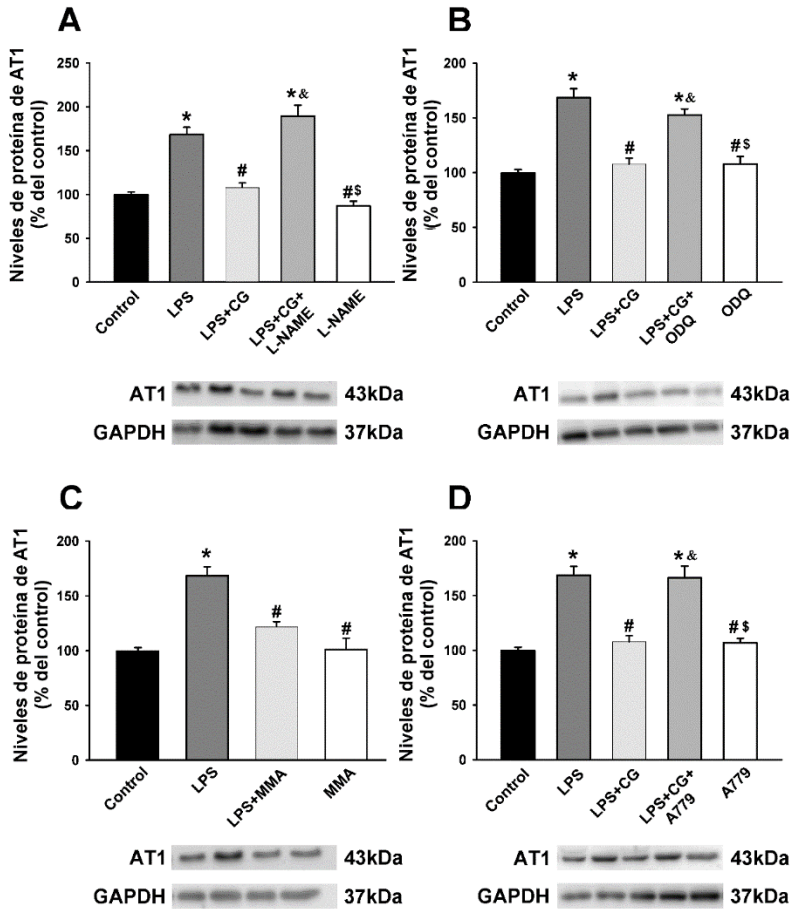


Figura 21. En cultivos de células microgliales N9, el efecto inhibitor del agonista del receptor AT2 (CG) sobre la expresión de la proteína del receptor AT1 fue bloqueado por el inhibidor de NOS, L-NAME (A), el inhibidor específico de GMPc, ODQ (B), el inhibidor específico del factor de transcripción Sp1, MMA (C), y el antagonista del receptor Mas, A779 (D). La expresión proteica se midió en relación con el valor de la banda de la proteína de

mantenimiento, GAPDH. Los valores de proteína se normalizaron con respecto a los valores de los controles (100%). Los datos son representados como la media \pm SEM. * $p < 0,05$ en comparación con el control correspondiente, # $p < 0,05$ en comparación con las células tratadas con LPS, & $p < 0,05$ en comparación con LPS + CG, \$ $p < 0,05$ en comparación con LPS + CG + L-NAME (A) o LPS + CG + ODQ (B) o LPS + CG + A779 (F). Análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido de la prueba post hoc de Student-Newman-Keuls. Abreviaturas: LPS, lipopolisacárido; CG, CGP-42112A; AT1, receptor de angiotensina tipo 1; OD, densidad óptica; ODQ, 1H-[1,2,4]-oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one; MMA, Mitramicina A; L-NAME: N ω -Nitro-L-arginina metil éster clorhidrato. Esta figura ha sido traducida de Rodríguez-Perez *et al.*, 2019 (con autorización de Elsevier).

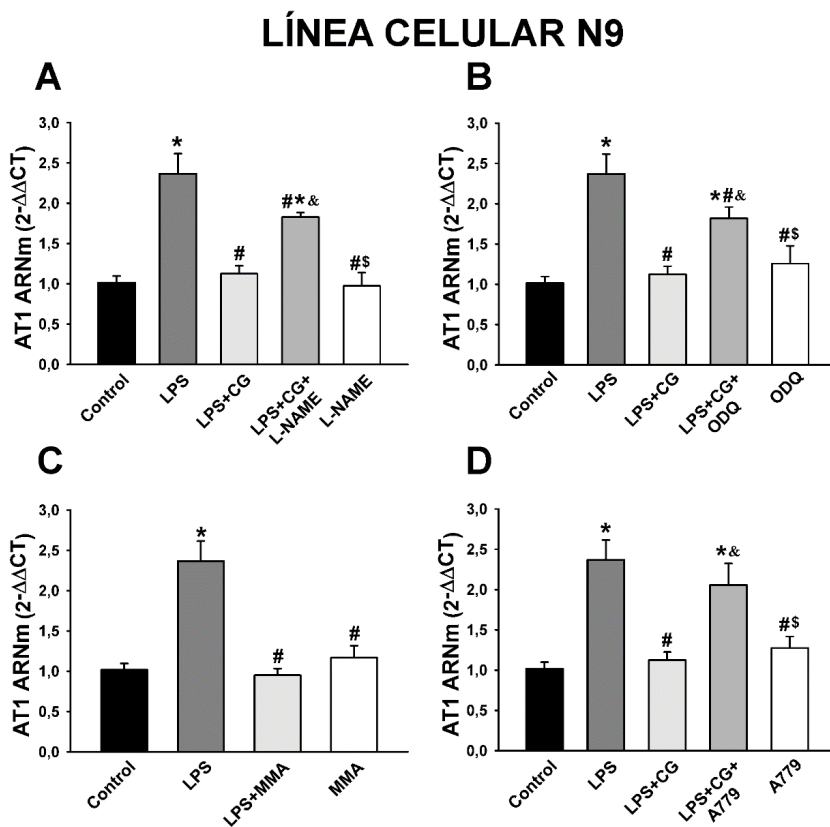


Figura 22. En cultivos de células microgliales N9, el efecto inhibitor del agonista del receptor de AT2 (CG) sobre la expresión de AT1 fue bloqueado por el inhibidor de NOS, L-NAME (A), el inhibidor de cGMP, ODQ (B), el inhibidor específico del factor de transcripción Sp1, MMA (C) y el antagonista del receptor Mas, A779 (D). La expresión de cada gen se determinó en relación con las transcripciones de mantenimiento (β -actina). Para el ARNm se utilizó el

método de valores umbral de ciclo comparativo ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). Los datos son la media \pm SEM. * $p < 0.05$ en comparación con el control correspondiente, # $p < 0.05$ en comparación con las células tratadas con LPS, & $p < 0.05$ en comparación con LPS + CG, \$ $p < 0.05$ en comparación con LPS + CG + ODQ (B) o LPS + CG + A779 (D). Análisis de varianza unidireccional (ANOVA) seguido de la prueba post hoc de Student-Newman-Keuls. Abreviaturas: LPS, lipopolisacárido; CG, CGP-42112A; AT1, receptor de angiotensina tipo 1; OD, densidad óptica; ODQ, 1H-[1,2,4]-oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one; MMA, Mitramicina A; L-NAME: N ω -Nitro-L-arginina metil éster clorhidrato. Esta figura ha sido traducida de Rodríguez-Perez *et al.*, 2019 (con autorización de Elsevier).

Los efectos de la actividad del receptor AT2 sobre la expresión del receptor AT1 observados en cultivos de microglía primaria y células microgliales N9 se confirmaron en microglía extraída de cerebros adultos. De acuerdo con las observaciones *in vitro* y con lo observado en homogenados de SN, la microglía aislada de cerebros de ratones AT2KO mostró un marcado aumento en la expresión de ARNm de AT1 (Figura 23A).

Además, en neuronas dopaminérgicas de cerebros adultos aisladas mediante captura láser, también se confirmó la regulación de la expresión del ARNm de AT1 por los receptores AT2. Las neuronas dopaminérgicas de ratones AT2KO mostraron un incremento significativo en la expresión del ARNm de AT1 frente a los ratones control WT (Figura 23B). También se observó una disminución significativa del ARNm de AT2 y un incremento significativo del ARNm de AT1 en las neuronas dopaminérgicas aisladas de cerebros de ratas envejecidas frente a neuronas dopaminérgicas aisladas de cerebros de ratas jóvenes (Figura 23C, D), lo que es consistente con los resultados obtenidos en la SN de homogenados de ratones envejecidos y ratones AT2KO (Figura 14A, B).

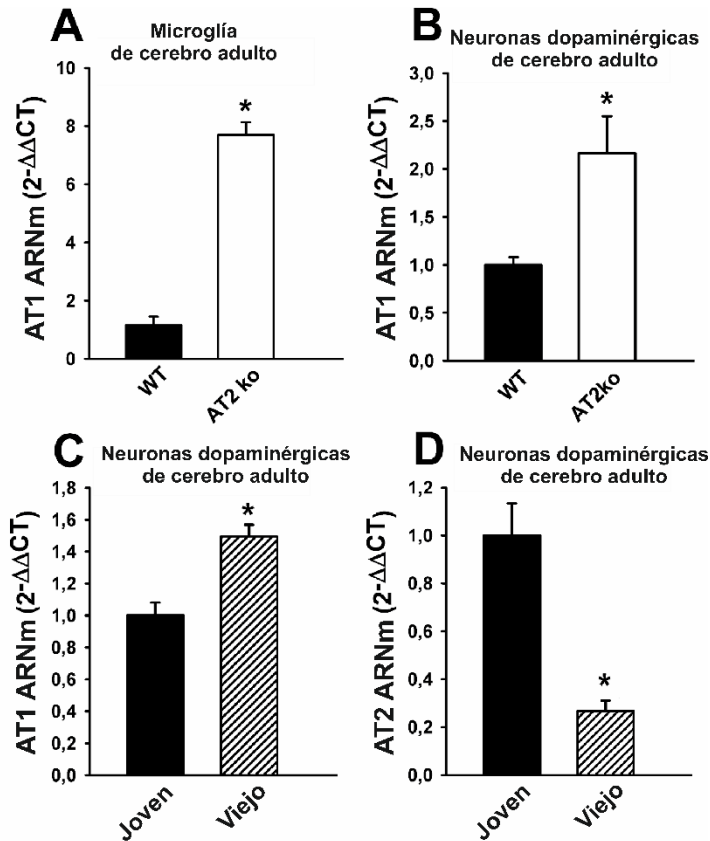


Figura 23. El efecto de la actividad del receptor AT2 sobre la expresión del receptor AT1 observado en los cultivos microgliales se confirmó en microglía de cerebros adultos utilizando micro-perlas anti CD11b y en neuronas dopaminérgicas de cerebros adultos utilizando microdissección por captura láser. Tanto la microglía (A) como las neuronas dopaminérgicas (B) de los ratones AT2KO mostraron un marcado incremento en la expresión del ARNm de AT1 en relación con los controles WT. En consonancia con esto, las neuronas dopaminérgicas envejecidas mostraron una marcada disminución de la expresión del receptor AT2 (D) y un aumento de la expresión del receptor AT1 (C). La expresión de cada gen se determinó en relación con el transcrito de mantenimiento (β -Actina). Para el ARNm se utilizó el método de valores umbrales de ciclo comparativo ($2^{-\Delta\Delta C_t}$). Los datos son representados como la media \pm SEM. * $p < 0,05$ en comparación con los WT correspondiente o de los controles jóvenes. Prueba t de Student. Abreviaturas: WT, forma salvaje; AT2KO, *Knock-Out* para el receptor AT2; AT1, receptor de angiotensina tipo 1; AT2, receptor de angiotensina tipo 2. Esta figura ha sido traducida de Rodríguez-Pérez *et al.*, 2019 (con autorización de Elsevier).

4.2.3. Receptores AT2 en neuroinflamación. Células microgliales. Dimorfismo sexual

Estudios previos han demostrado que las células microgliales son sexualmente dimórficas (Kerr *et al.*, 2019; Han *et al.*, 2021). Por ello, en el presente trabajo se estudió si las células de la microglía eran sexualmente dimórficas para la expresión del receptor AT2, independientemente de las hormonas circulantes femeninas, y su implicación en los procesos inflamatorios.

En primer lugar, se analizó la expresión de ARNm del receptor AT2 y de diferentes citoquinas relacionadas con la inflamación en microglía adulta aislada de cerebros perfundidos (Figura 24A-D) y no perfundidos (Figura 24E-H) de machos adultos WT, hembras WT y hembras WT OVX. La expresión de ARNm de AT2 fue mucho mayor en la microglía de hembras y hembras OVX que en la microglía de machos (Figura 24A, E). Curiosamente, hubo una disminución en la expresión de AT2 microglial en las hembras OVX en comparación con las hembras WT que no fue estadísticamente significativa. Por otro lado, la microglía aislada de cerebros masculinos mostró niveles más bajos de expresión de ARNm de la citoquina anti-inflamatoria IL-10 en comparación con la microglía de hembras control y hembras OVX, mientras que no se observaron diferencias significativas entre hembras y hembras OVX (Figura 24B, F). Sin embargo, la expresión de ARNm para las citoquinas pro-inflamatorias, IL-1 β e IL-6, fue significativamente mayor en la microglía aislada de machos que en la microglía aislada de hembras o hembras OVX, y no se detectaron diferencias significativas en la expresión de IL-1 β e IL-6 entre hembras y hembras OVX (Figura 24C, D, G, H). Estos resultados se confirmaron, tanto en cerebros perfundidos, como no perfundidos de ratones WT, lo que indica que estos efectos no están relacionados con los macrófagos circulantes. En conjunto, los resultados obtenidos sugieren que las diferencias en la expresión de los receptores AT2, de la citoquina anti-inflamatoria IL-10 y de las citoquinas pro-inflamatorias IL-1 β e IL-6 en la microglía de ratones WT adultos sanos están relacionadas principalmente con el sexo de los ratones.

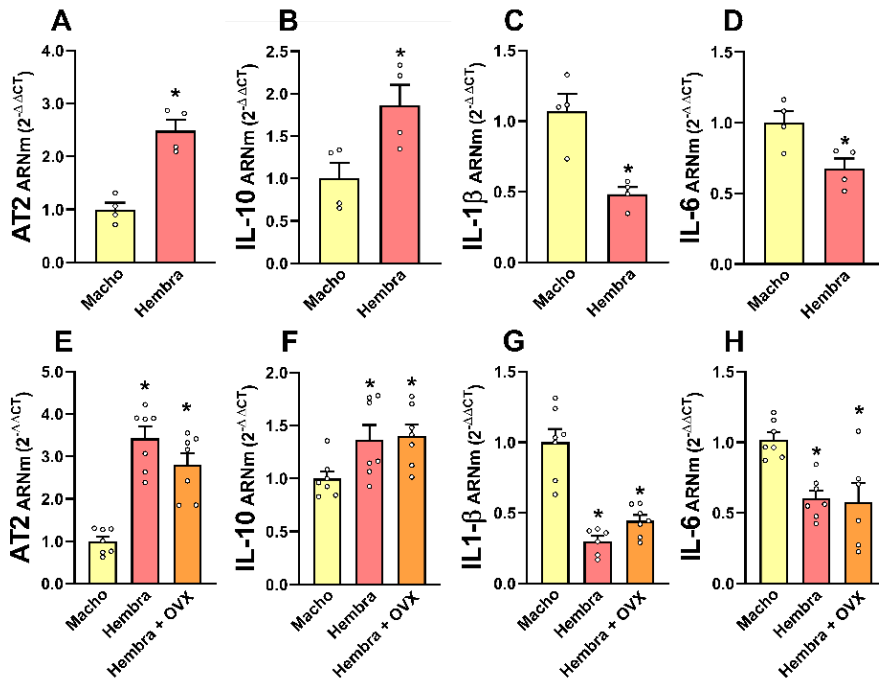


Figura 24. Expresión del ARNm de AT2, IL-10, IL-1β e IL-6 en microglía aislada de cerebros masculinos y femeninos perfundidos con salino (A-D) y de cerebros masculinos, femeninos y femeninos OVX mediante RT-QPCR. Para el ARNm se usó el método de valores de umbral de ciclo comparativo ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). Los datos se representan como las medias \pm SEM. * $p < 0,05$ en comparación con los machos. Las comparaciones simples se realizaron con t de Student (A-D) y las comparaciones múltiples se analizaron mediante ANOVA unidireccional seguido de la prueba post-hoc de Student-Newman-Keuls. Abreviaturas: OVX, ovariectomizados; AT2, receptor de angiotensina tipo 2; IL-1β, interleucina 1β; IL-6, interleucina 6; IL-10, interleucina 10. Esta figura ha sido traducida de Garrido-Gil *et al.*, 2022 y se distribuye bajo los términos de Creative Commons Attribution 4.0 International License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

A continuación, se confirmó la expresión del ARNm del receptor AT2 en microglía adulta de ratones macho y hembra WT sanos usando la técnica de hibridación *in situ* RNAscope en secciones de tejido de la región de la SNpc, así como con la técnica de hibridación *in situ* de RNAscope combinada con inmunohistoquímica (Figura 25). Los resultados obtenidos por microscopía confocal confirmaron la expresión de AT2 en células marcadas con marcadores microgliales y que mostraban morfología microglial clara en los cerebros de ratón

adulto control. Como se observó en la microglía aislada, el marcaje de ARNm de AT2 fue más abundante en la microglía de ratones hembra que en la de machos (Figura 24A-L). La cuantificación de las imágenes de microscopía confocal mostró que las hembras presentaban un mayor número de células microgliales positivas para el ARNm de AT2, en comparación con la microglía de machos (Figura 24M-O). Además, a nivel de células individuales, las células microgliales de las hembras presentaban un mayor número de moléculas de ARNm de AT2 que las de machos (Figura 24P).

A continuación, se estudió si la ausencia del receptor AT2 producía un cambio en la expresión de las citoquinas inflamatorias en las células microgliales adultas. Para ello se utilizaron machos, hembras y hembras OVX de tipo salvaje y AT2KO para saber si las diferencias en la expresión microglial de IL-10, IL-1 β e IL-6 entre machos y hembras (control o hembras OVX), y no dependiente de hormonas sexuales femeninas circulantes, podría estar relacionado con las diferencias observadas en la expresión de ARNm del receptor AT2 entre machos y hembras. Los cambios en la expresión de IL-10, IL-1 β e IL-6 inducidos por la ausencia de AT2 fueron más marcados en hembras que en machos, lo que es consistente con los niveles más altos de expresión de AT2 observados en hembras en relación con machos. Curiosamente, no se observaron diferencias significativas en la expresión microglial de IL-10, IL-1 β e IL-6 entre machos, hembras y hembras OVX de ratones AT2KO, lo que sugiere que las diferencias en la expresión de AT2 juegan un papel importante en las diferencias sexuales inflamatorias de los cerebros de ratones control (Figura 26A-C).

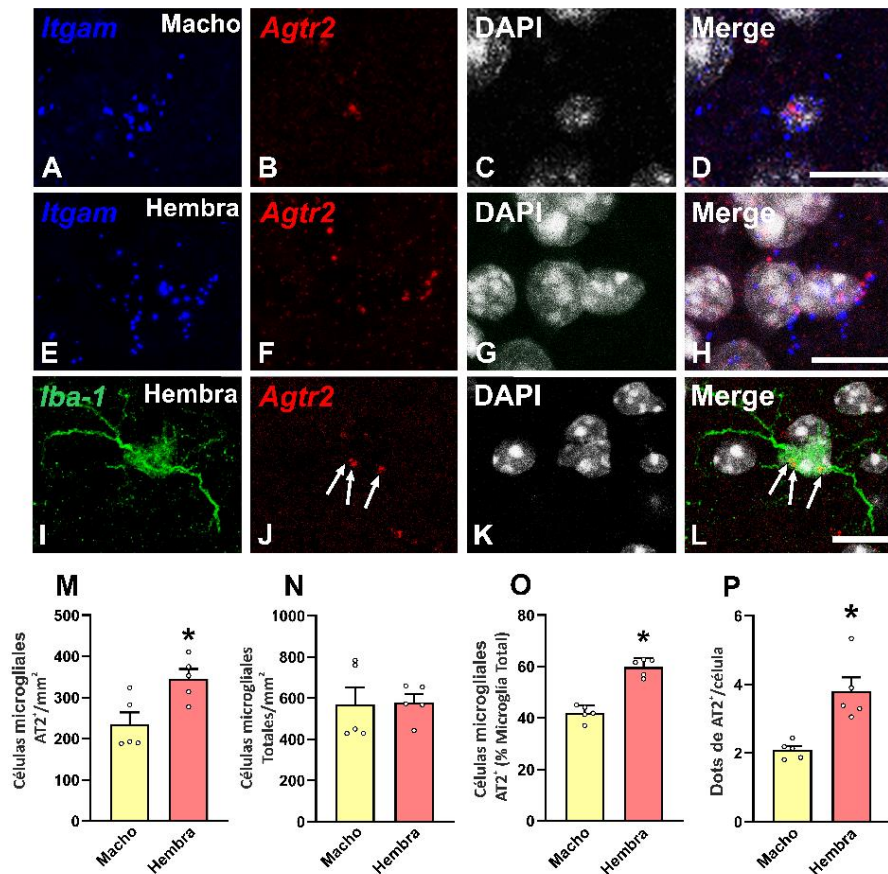


Figura 25. Expresión del ARNm del receptor AT2 en microglía de la SN de ratón adulto. Imágenes de fluorescencia representativas de la expresión del ARNm del receptor AT2 (*Agr2*; rojo) en células con expresión de α -integrina (*Itgam*, células microgliales; azul) y marcaje de núcleo celular (DAPI, blanco) en cerebro de ratón macho (A-D) y hembra (E-H). Imágenes de inmunohistoquímica usando Iba-1 (marcador microglial; verde) y el ARNm de *Agr2* (rojo) (I-L). La cuantificación por mm² de células microgliales positivas para *Agr2* fue mayor en hembras que en machos (M), sin variación en el número total de células microgliales entre ambos sexos (N). El porcentaje de microglía positiva para *Agr2* en base al número total de células microgliales y el número de moléculas de ARNm (dots) para el gen *Agr2* en células microgliales fueron mayores en hembras que en machos (O, P). Los datos son representados como las medias \pm SEM. * $p < 0,05$, en comparación con los machos. Las comparaciones se realizaron con *t* de Student. Barra de escala de 12,5 μ m. Abreviaturas: AT2, receptor de angiotensina tipo 2; iba-1, molécula adaptadora de unión a calcio ionizado 1. Esta figura ha sido traducida de Garrido-Gil *et al.*, 2022 y se distribuye bajo los términos de Creative Commons Attribution 4.0 International License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

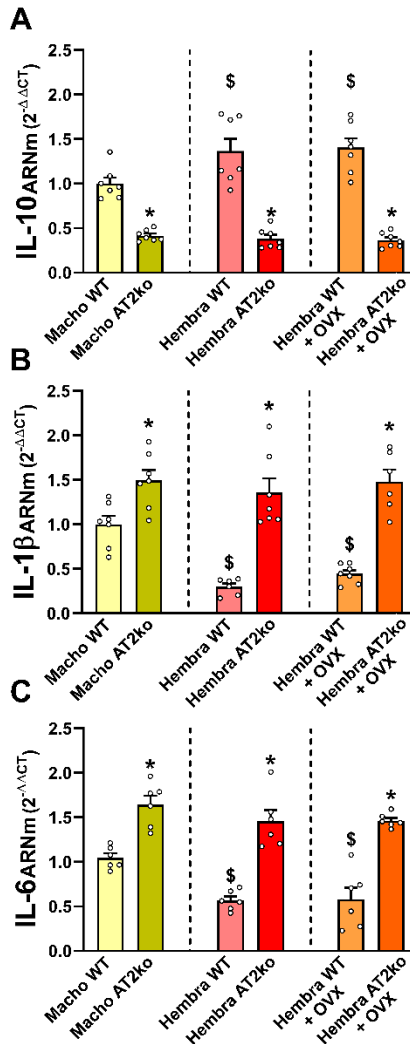


Figura 26. ARNm de IL-10 (a), IL-1 β (b) e IL-6 (c) en microglía aislada de diferentes grupos de ratones. Los cerebros masculinos, femeninos y femeninos OVX de WT o AT2KO se analizaron mediante RT-QPCR. Para el ARNm, se usó el método de valores de umbral de ciclo comparativo ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). Los datos se representan como la media \pm SEM. * $p < 0,05$ en comparación con el control WT correspondiente, \$ $p < 0,05$ en comparación con los machos WT. Las comparaciones múltiples se analizaron mediante ANOVA de dos vías seguido de la prueba post-hoc de Student-Newman-Keuls (b-c) y ANOVA de dos vías en los rangos de Kruskal Wallis, (a). Abreviaturas: OVX, ovariectomizados; AT2KO, *knock-out* para el receptor AT2; WT, forma salvaje; IL-1 β , interleucina 1 β ; IL-6, interleucina 6; IL-10, interleucina 10. Esta figura ha sido traducida de Garrido-Gil *et al.*, 2022 y se distribuye bajo los términos de Creative

Commons Attribution 4.0 International License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Los resultados previos de la presente tesis muestran la importancia de los receptores de angiotensina en la respuesta inflamatoria periférica. Por ello, se estudió la expresión de citoquinas inflamatorias en microglía aislada de ratones bajo un estímulo inflamatorio periférico agudo con LPS. Los resultados mostraron un aumento significativo en los niveles de expresión de ARNm para IL-10 en ratones WT que fue mucho más alto que el observado en ratones AT2KO, mientras que la expresión de ARNm de la citoquina pro-inflamatoria IL-6 fue significativamente mayor en los ratones AT2KO en relación con los ratones WT (Figura 27a, b).

Finalmente, se estudió si el dimorfismo sexual del receptor AT2 observado en los resultados presentados podría estar ocasionado por el efecto de la exposición a las hormonas gonadales durante el desarrollo perinatal o por las hormonas sexuales masculinas. Los resultados obtenidos mostraron que: (1) la expresión del ARNm de AT2 era significativamente mayor en la microglía aislada de cerebros de hembras masculinizadas en relación con la microglía de los machos, lo que no respalda la posibilidad de que la exposición perinatal a los estrógenos sea responsable del aumento permanente de la expresión del receptor AT2 en la microglía de las hembras adultas (Figura 27c); (2) se observó que la expresión del ARNm de AT2 no fue significativamente diferente en la microglía aislada de cerebros de machos WT orquiectomizados en relación con la microglía de machos WT control, lo que no respalda la posibilidad de que los andrógenos sean responsables de las diferencias sexuales al regular a la baja la expresión del receptor AT2 en la microglía de los machos adultos (Figura 27d).

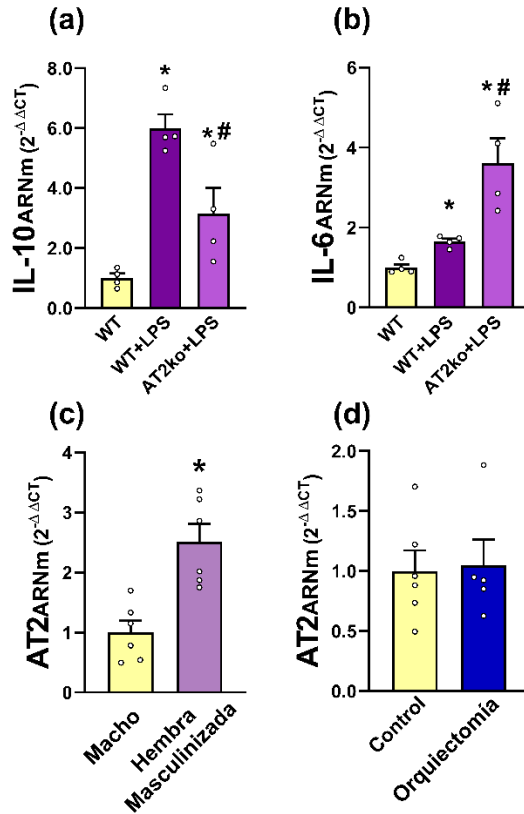


Figura 27. Efectos de la inyección de LPS en la expresión de ARNm de interleucina microglial en presencia o ausencia de receptores AT2 (a, b), y efecto de la masculinización del cerebro femenino (c) y la orquiectomía masculina (d) en la expresión de ARNm de AT2 usando RT-QPCR. La inyección *in vivo* de LPS indujo un marcado aumento en los niveles de expresión de ARNm de IL-10 en microglía aislada de ratones WT que fue mucho mayor que en microglía de ratones AT2KO (a), mientras que la expresión de ARNm de IL-6 fue significativamente mayor en microglía de ratones AT2KO que en microglía de ratones WT (b). La microglía de cerebros hembra masculinizados mostró una mayor expresión de ARNm de AT2 que la microglía de machos WT (c). La microglía de los machos WT orquiectomizados mostró una expresión de ARNm de AT2 similar a la microglía de los machos control WT (d). Para el ARNm se usó el método de valores de umbral de ciclo comparativo ($2^{-\Delta\Delta CT}$). Los datos son representados como media \pm SEM. * $p < 0,05$ en comparación con el control WT correspondiente, # $p < 0,05$ en comparación con WT + LPS. ANOVA de una vía seguido de la prueba post-hoc de Newman-Keuls de Student (a); Análisis de una vía de Kruskal-Wallis de la varianza en los rangos seguido de la prueba post-hoc de Newman-Keuls de Student (b) y las pruebas t de Student (c, d). Abreviaturas: AT2KO, *knock-out* para el receptor AT2; WT, forma salvaje; LPS, lipopolisacárido; AT2, receptor de angiotensina tipo 2; IL-6, interleucina 6; IL-10, interleucina

10. Esta figura ha sido traducida de Garrido-Gil *et al.*, 2022 y se distribuye bajo los términos de Creative Commons Attribution 4.0 International License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

4.3. RECEPTORES DE ANGIOTENSINA EN LA INFLAMACIÓN PERIFÉRICA CRÓNICA DEL SÍNDROME METABÓLICO (METS). IMPLICACIÓN EN LA NEURODEGENERACIÓN DOPAMINÉRGICA

4.3.1. Caracterización de un modelo animal experimental de MetS

Con el objetivo de estudiar la implicación de la inflamación periférica crónica mediada por el MetS en los receptores de angiotensina, en primer lugar, se caracterizó el modelo de MetS en ratas macho adultas inducido por la alimentación de dieta alta en grasa durante 18 semanas. Los resultados muestran un aumento del peso y la presión arterial en animales con MetS respecto al grupo control alimentado con dieta normal (Figura 28A, C). Además, los niveles séricos de colesterol, triglicéridos y glucosa aumentaron significativamente en las ratas con MetS respecto al grupo control (Figura 28B). Por tanto, estos resultados indican el desarrollo de los principales factores que definen al MetS (hipertensión, aumento de peso, hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia).

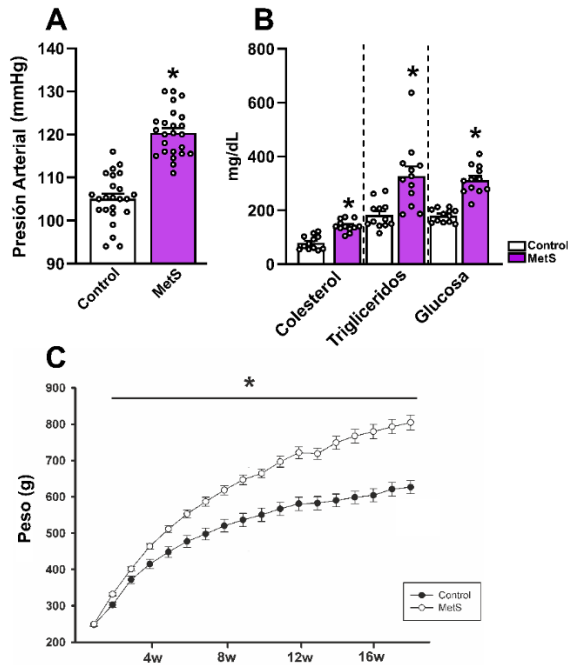


Figura 28. Caracterización de un modelo de rata de MetS. La presión arterial (A) los niveles séricos de colesterol, triglicéridos y glucosa (B), y el peso (C) fueron monitorizados para confirmar si se incrementaban en las ratas con MetS respecto a las ratas control. Los animales fueron analizados durante 18 semanas. Los datos son expresados como la media \pm SEM.* $P < 0.05$ respecto a los animales control (Student's test and Mann-Whitney rank sum test). Abreviaturas: MetS, síndrome metabólico.

4.3.2. Activación del eje pro-inflamatorio mediado por receptores AT1 en la sustancia negra de animales con MetS

La expresión (ARNm y proteína) de los principales receptores del SRA fueron estudiados en la SN de ratas con MetS y en ratas control. En animales con MetS, se observó un aumento significativo en la expresión de los receptores del eje pro-inflamatorio, como los receptores AT1 y los receptores de PRR, y una disminución en la expresión de los componentes y receptores del eje anti-inflamatorio, incluidos los receptores AT2 y MasR y el enzima ECA2. Estos cambios fueron inhibidos por el tratamiento con el antagonista del receptor AT1, candesartán, lo que sugiere que la sobreactivación de los receptores

AT1 juega un papel importante en la expresión de los componentes del SRA cerebral durante el transcurso del MetS (Figura 29A-D). De acuerdo con observaciones previas, la sobreactivación del eje pro-inflamatorio del SRA se asoció con un aumento significativo en los marcadores de estrés oxidativo, como la actividad NOX, y la inflamación, como el TNF- α , en la SN (Figura 29E, F). Dicho incremento fue revertido en los animales con MetS y tratados con candesartán. Estos resultados corroboran la implicación del receptor AT1 en fenómenos pro-oxidativos y neuroinflamatorios mediados por inflamación periférica crónica.

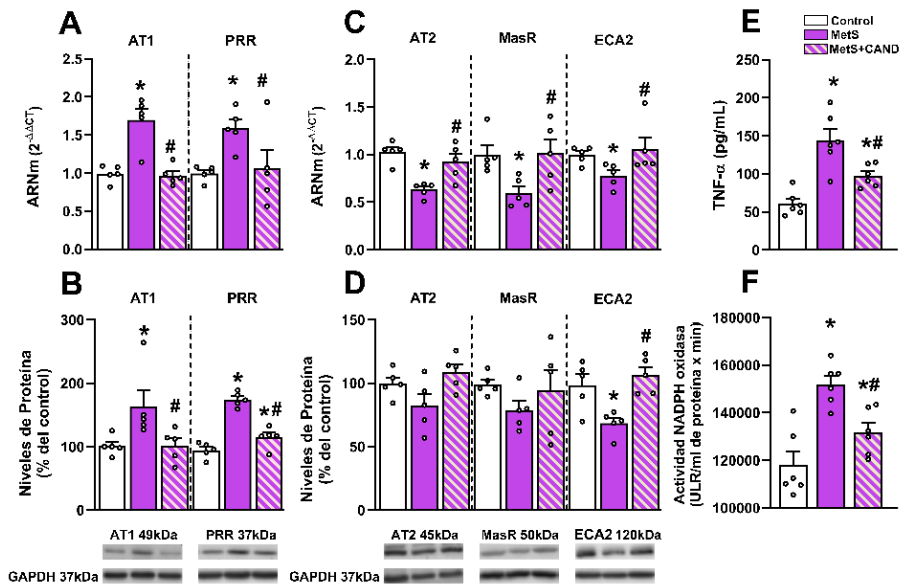


Figura 29. Efectos del MetS y del candesartán en la Sustancia Nigra de ratas. Expresión de ARNm (A, C) y proteína (B, D) de componentes y receptores del SRA pro-inflamatorios (receptores AT1 y PRR; incrementados) y anti-inflamatorios (receptores AT2, receptores Mas y ECA2; disminuidos). Los marcadores de inflamación (TNF- α ; E) y estrés oxidativo (actividad de NADPH-oxidasa; F) aumentaron en ratas con MetS, lo que fue inhibido por el tratamiento con candesartán. Los datos son representados como las medias \pm SEM. *P < 0,05 en relación con las ratas control, #P < 0,05 en relación con ratas tratadas con MetS (ANOVA unidireccional con prueba post hoc del método de Student-Newman-Keuls o análisis de varianza unidireccional de Kruskal-Wallis en rangos con Student-Newman - Prueba post hoc del Método Keuls). Abreviaturas: MetS, síndrome metabólico; AT1, receptor de angiotensina tipo 1; AT2, receptor de angiotensina tipo 2; ECA2, enzima convertora de angiotensina II; CAND,

candesartán; PRR, receptor de pro-renina; TNF- α , factor de necrosis tumoral; ULR, unidades de luminiscencia relativas.

4.3.3. Sobreactivación del receptor AT1 media mayor vulnerabilidad a degeneración dopaminérgica en MetS

Los resultados presentados muestran una importante implicación de la inflamación periférica crónica que cursa el MetS en la sobreactivación del receptor AT1, inflamación y estrés oxidativo cerebral. Muchos estudios han demostrado la implicación de dichos procesos en la progresión de la EP. Por ello, a continuación, se estudió si los animales que habían desarrollado MetS eran más vulnerables a la lesión dopaminérgica inducida por la neurotoxina 6-OHDA. Los resultados obtenidos muestran que las ratas con MetS tratadas con 6-OHDA presentan un aumento moderado, pero significativo, en la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la SN junto con un aumento significativo en la pérdida de terminales dopaminérgicos estriatales en comparación con ratas lesionadas con 6-OHDA sin MetS. Curiosamente, el aumento de la vulnerabilidad se inhibió mediante el tratamiento con el antagonista del receptor AT1, candesartán, lo que sugiere la implicación de dicho receptor en el incremento de la muerte neuronal en animales que han desarrollado MetS (Figura 30).

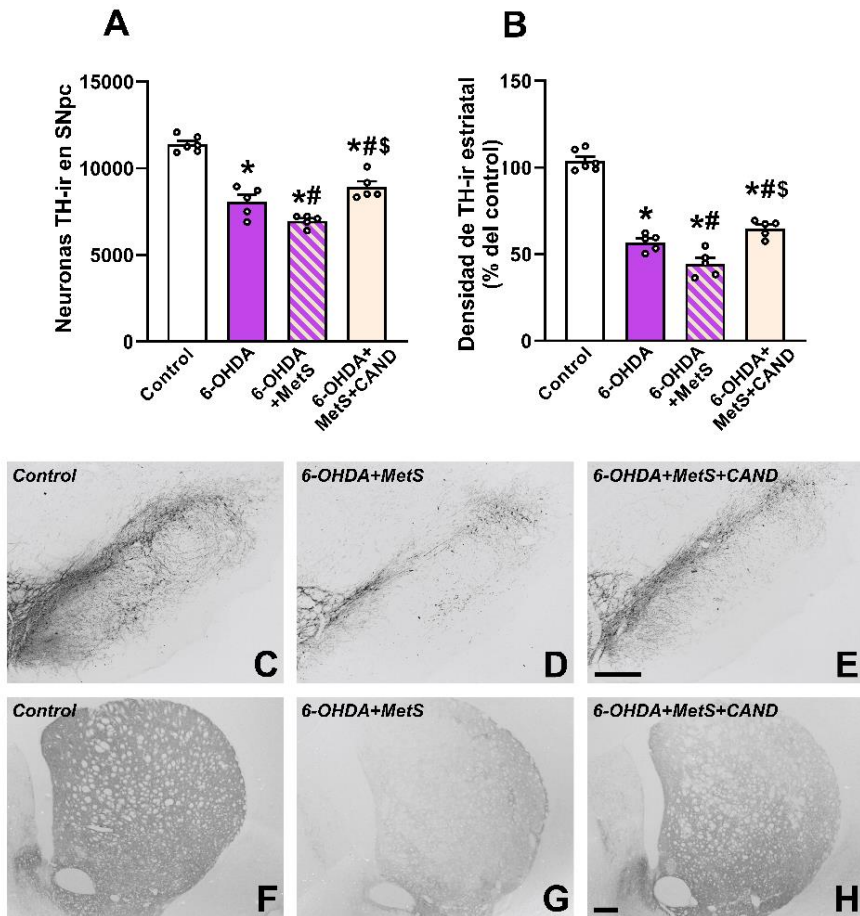


Figura 30. Efecto del MetS en la vulnerabilidad de la degeneración dopaminérgica. La inflamación periférica crónica inducida por el MetS incrementó los efectos nocivos de la inyección intraestriatal de 6-OHDA en ratas, lo que provocó un aumento significativo en la pérdida de neuronas dopaminérgicas (TH-ir) en la SN (A) y una pérdida de terminales dopaminérgicos en el estriado (B), que fue inhibido por el tratamiento simultáneo con el bloqueante del receptor AT1, candesartán. Fotomicrografías de SN de rata que muestran neuronas dopaminérgicas (C-E) y terminales estriatales (F-H) en ratas de control (C, F), ratas MetS tratadas con 6-OHDA (D, G) y ratas MetS tratadas con 6-OHDA más candesartán (E, H). Barra de escala 200 μ m. Los datos se dan como medias \pm SEM. * $P < 0,05$ en comparación con el grupo de control correspondiente, # $P < 0,05$ en comparación con el grupo 6-OHDA; \$ $P < 0,05$ en comparación con el grupo MetS+6-OHDA. Análisis de varianza unidireccional y prueba post hoc de Student-Newman-Keuls. Abreviaturas: MetS, síndrome metabólico; SNpc, Sustancia negra *pars compacta*; CAND, candesartán; 6-OHDA, 6-hidroxidopamina; TH-ir, inmunorreactivas a TH.

4.3.4. Aumento de citoquinas circulantes, 27-OHC y autoanticuerpos (AA) frente a receptores del SRA en un modelo experimental de MetS

Los niveles séricos de las principales citocinas pro-inflamatorias (IL-17, IL-1 β , IL-6, TNF- α y LIGHT) aumentaron significativamente en ratas que habían desarrollado MetS en comparación con animales control (Figura 31A). También se observó un aumento significativo del 27-OHC en el suero de ratas con MetS (Figura 31B).

Las ratas con MetS mostraron, así mismo, un aumento significativo en los niveles séricos de AT1-AA y ACE2-AA circulantes (Figura 31C, D) que, además, presentaron una correlación significativa entre sí ($r=0,670$, $P= 0,0171$) (Figura 31E). Además, los niveles séricos de AT1-AA y ACE2-AA mostraron correlaciones significativas con las concentraciones séricas de los marcadores de los principales factores que definen el MetS: colesterol, triglicéridos y glucosa (excepto, para ACE2-AA y la glucosa) (Figura 32). También se observaron correlaciones significativas entre AT1-AA y los niveles séricos de IL-1 β , IL-17, LIGHT y 27-OHC (Figura 33A, C, E, F). Los niveles séricos de ACE2-AA mostraron correlaciones significativas con los niveles de IL-1 β y 27-OHC (Figuras 34A, F).

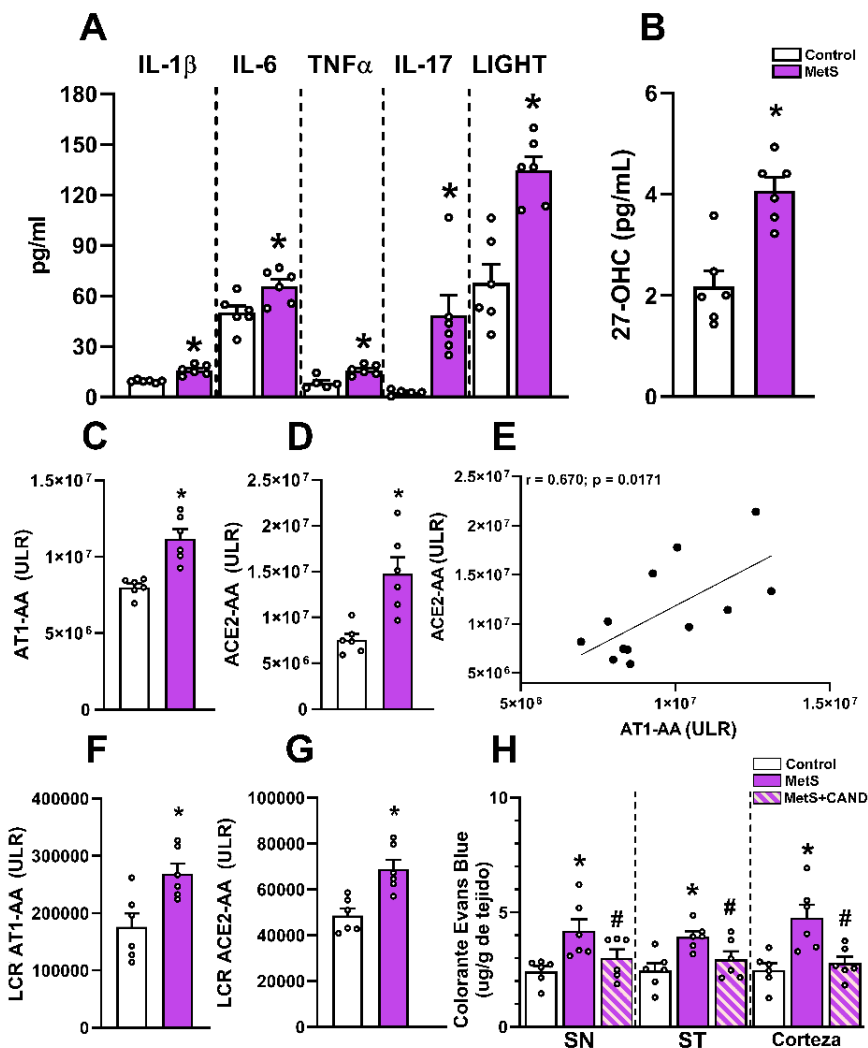


Figura 31. Niveles de citoquinas pro-inflamatorias, 27-OHC, AT1-AA y ACE2-AA en suero (A-E) y LCR (F, G) y aumento de la permeabilidad de BHE (H) en ratas con MetS. Los niveles séricos de las principales citoquinas pro-inflamatorias, incluidas IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-17 y LIGHT (TNFSF14) (A) y 27-OHC (B) aumentaron significativamente en ratas con MetS en comparación con el grupo control. Las ratas con MetS también mostraron un aumento significativo en los niveles circulantes de AT1-AA y ACE2-AA (C, D) y hubo una correlación significativa entre los niveles séricos de AT1-AA y ACE2-AA (E, [$r = 0.670$, $P = 0,0171$]). Los niveles de AT1-AA y ACE2-AA aumentaron significativamente en el LCR de ratas con MetS en comparación con los controles (F, G). Las ratas con MetS, a las que se les inyectó Evans Blue, mostraron un aumento significativo en la extravasación del colorante en la SN, el ST y la

corteza, lo que reveló una disrupción de la BHE, que fue inhibida por el tratamiento con candesartán (H). Los datos se dan como medias \pm SEM. * $P < 0,05$ en comparación con el grupo de control correspondiente, # $P < 0,05$ en comparación con el grupo MetS. Prueba t de Student o prueba de suma de rangos de Mann-Whitney (A-G). Análisis de varianza unidireccional y prueba post hoc de Student-Newman-Keuls (H). Abreviaturas: MetS, síndrome metabólico; AT1-AA, autoanticuerpos agonistas del receptor de angiotensina tipo 1; ACE2-AA, autoanticuerpos frente al enzima convertora de angiotensina II; CAND, candesartán; LCR, líquido cefalorraquídeo; SN, sustancia negra; ST, núcleo estriado; 27-OHC, 27-hidroxicolesterol; IL-6, interleucina 6; TNF- α , factor de necrosis tumoral; IL-17, interleucina 17; IL-1 β : interleucina 1 β ; LIGHT, miembro 14 de la superfamilia del factor de necrosis tumoral; ULR, unidades de luminiscencia relativas.

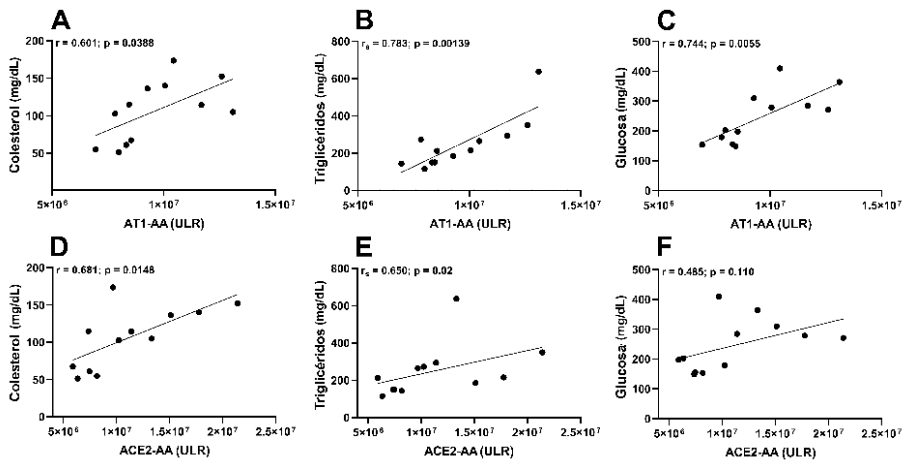


Figura 32. Correlación de los autoanticuerpos séricos frente a receptores del SRA y los niveles de los marcadores de los factores que definen el MetS. Niveles séricos AT1-AA en ratas con MetS (A-C) mostraron una correlación positiva significativa con los principales componentes del MetS, como el colesterol [Coeficiente de correlación de Pearson, (r) = 0.601, p = 0.0388], triglicéridos [Coeficiente de correlación de Spearman, (r_s) = 0.783, p = 0.00139] y glucosa [r = 0.744, p = 0.0055]. Correlaciones positivas y significativas fueron encontradas para ACE2-AA y colesterol (D), [r = 0.681, p = 0.0148], y triglicéridos (E), [r_s = 0.650, p = 0.02] pero no con glucosa (F). Abreviaturas: AT1-AA, autoanticuerpos agonistas del receptor de angiotensina tipo 1; ACE2-AA, autoanticuerpos frente al enzima convertora de angiotensina II; ULR, unidades de luminiscencia relativas.

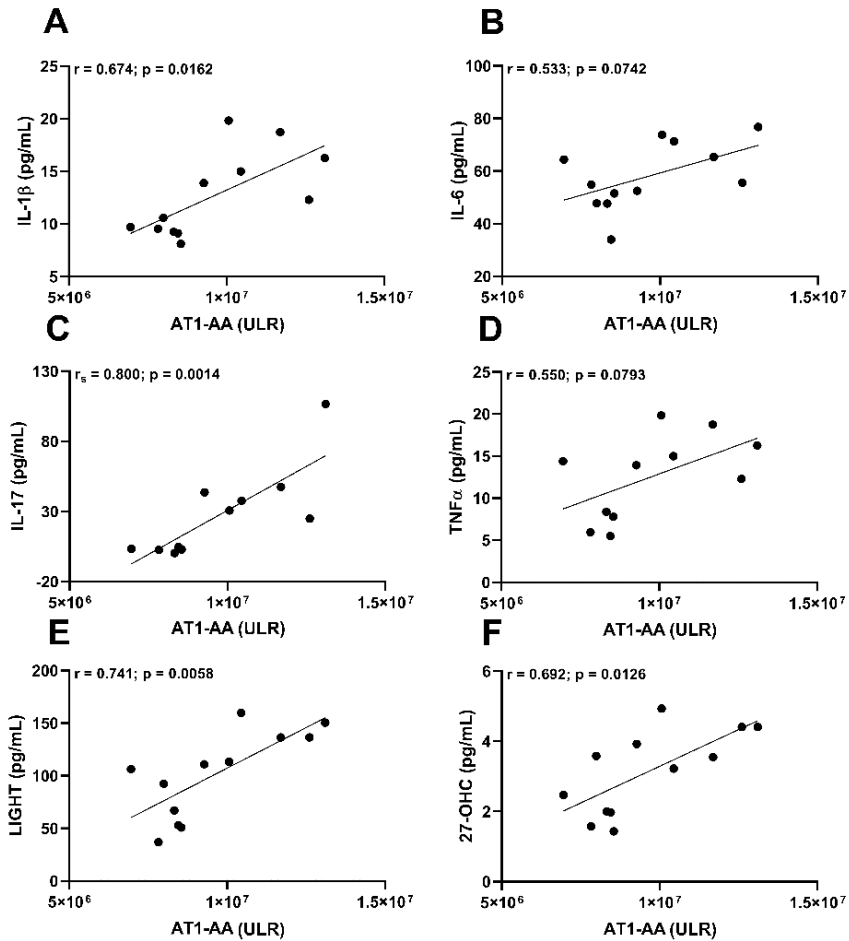


Figura 33. Correlación de AT1-AA séricos y los niveles de citoquinas y 27-OHC. Las gráficas de correlación muestran la relación entre AT1-AA de suero de ratas con MetS y las citoquinas IL-1 β (A; [r = 0.674, P = 0.0162]), IL-6 (B; [r = 0.533, P = 0.0742]), IL-17 (C; $r_s = 0.800$, P = 0.0014), TNF- α (D; [r = 0.550, P = 0.0793]), LIGHT (E; [r = 0.741, P = 0.0058]) y 27-OHC (F; [r = 0.692, P = 0.0126]). Abreviaturas: AT1-AA, autoanticuerpos agonistas del receptor de angiotensina tipo 1; 27-OHC, 27-hidroxicolesterol; IL-6, interleucina 6; TNF- α , factor de necrosis tumoral; IL-17, interleucina 17; IL-1 β : interleucina 1 β ; LIGHT, miembro 14 de la superfamilia del factor de necrosis tumoral; ULR, unidades de luminiscencia relativas.

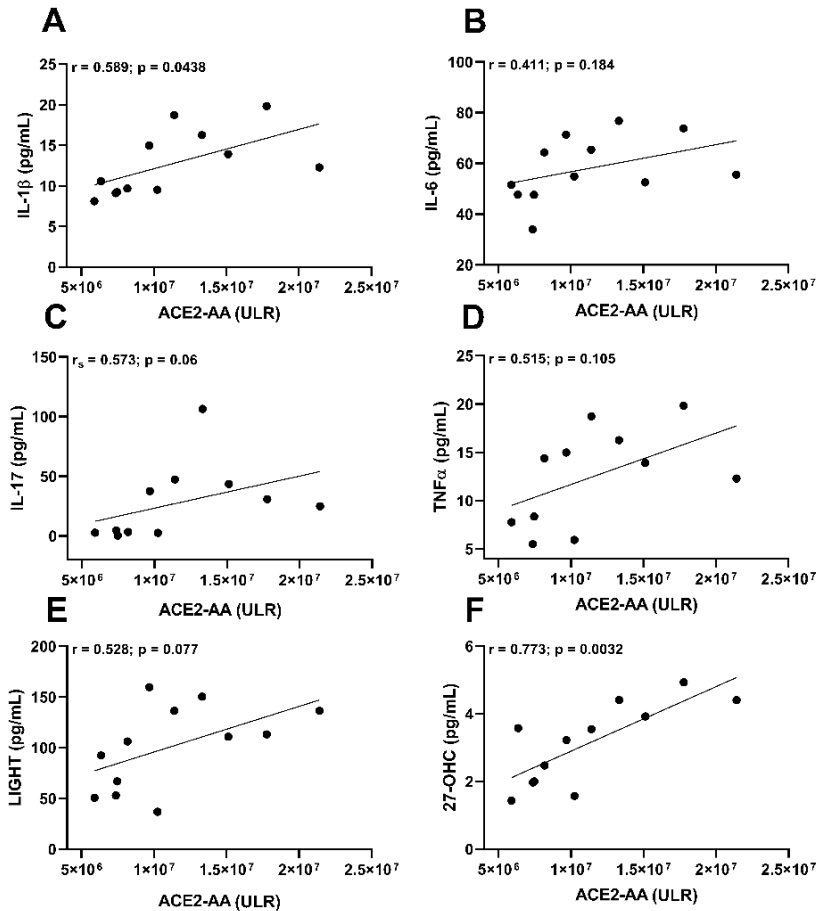


Figura 34. Correlación de ACE2-AA séricos y los niveles de citoquinas y 27-OHC. Las gráficas de correlación muestran la relación entre ACE2-AA de suero de ratas con MetS y las citoquinas IL-1 β (A; [r = 0.589, P = 0.0438]), IL-6 (B; [r = 0.411, P = 0.184]), IL-17 (C; $r_s = 0.573$, P = 0.06), TNF- α (D; [r = 0.515, P = 0.105]), LIGHT (E; [r = 0.528, P = 0.077]), y 27-OHC (F; [r = 0.773, P = 0.0032]). Abreviaturas: ACE2-AA, autoanticuerpos frente al enzima convertora de angiotensina II; 27-OHC, 27-hidroxicolesterol; IL-6, interleucina 6; TNF- α , factor de necrosis tumoral; IL-17, interleucina 17; IL-1 β : interleucina 1 β ; LIGHT, miembro 14 de la superfamilia del factor de necrosis tumoral; ULR, unidades de luminiscencia relativas.

4.3.5. Aumento de AA frente a receptores del SRA en LCR de un modelo experimental de MetS.

Los niveles de AT1-AA y ACE2-AA también fueron cuantificados en el LCR de ratas con MetS y control. Los resultados muestran un

aumento significativo de ambos autoanticuerpos en ratas con MetS en comparación con ratas del grupo control (Figura 31F, G). Los resultados obtenidos sugieren que (1) los autoanticuerpos circulantes pueden atravesar la BHE o (2) que las células B activadas pueden atravesar la BHE, migrar al compartimento intratecal y mediar una expansión clonal que conduce a la síntesis intratecal de los autoanticuerpos. Para comprobar esta hipótesis, se realizó un estudio de permeabilidad de la BHE en ratas con MetS y control. Los resultados mostraron un aumento significativo de la extravasación del colorante Evans Blue en diferentes regiones del parénquima cerebral (SN, ST y corteza) en el grupo MetS, lo que es indicativo de un aumento de la permeabilidad de la BHE. Dicho incremento en la extravasación del colorante Evans Blue fue inhibido mediante el tratamiento con el antagonista del receptor AT1, candesartán (Figura 31H), lo que indica que el incremento en la permeabilidad de la BHE observado en MetS está mediado, en parte, por los receptores AT1.

4.3.6. Infusión de AA frente al receptor AT1 (AT1-AA) mediante minibombas intraperitoneales

Para estudiar el efecto aislado de un incremento en los niveles séricos de AT1-AA sobre los fenómenos de inflamación y degeneración dopaminérgica, en primer lugar, se caracterizó un modelo de administración crónica mediante el uso de bombas miniosmóticas intraperitoneales (Alzet; 0,15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Varios estudios anteriores han demostrado que los niveles de inmunoglobulinas humanas, incluidos los AT1-AA, administradas a roedores no se ven afectados significativamente por el sistema inmunológico de los roedores huésped durante varias semanas y mantienen su actividad biológica (Zhou *et al.*, 2008).

En consonancia con esto, las ratas tratadas con AT1-AA humanos circulantes, mostraron un aumento significativo de la presión arterial como marcador *in vivo* de la actividad de AT1-AA (Figura 35A), así como un aumento significativo en los niveles de IgG humana en suero 1 semana ó 2 semanas después de la implantación de la minibomba (Figura 35B). Sin embargo, usando esta dosis de AT1-AA (0,15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), no se pudo detectar una presencia clara de IgG humana en LCR

de rata con el método de detección utilizado. Por lo tanto, se procedió a administrar AT1-AA a una dosis más alta (0,25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) con la que se pudo observar un aumento significativo en los niveles de IgG humana en LCR de ratas infundidas con minibombas, respecto al grupo control (Figura 35C). Este resultado demuestra que los AT1-AA humanos son capaces de atravesar la BHE en el presente modelo animal.

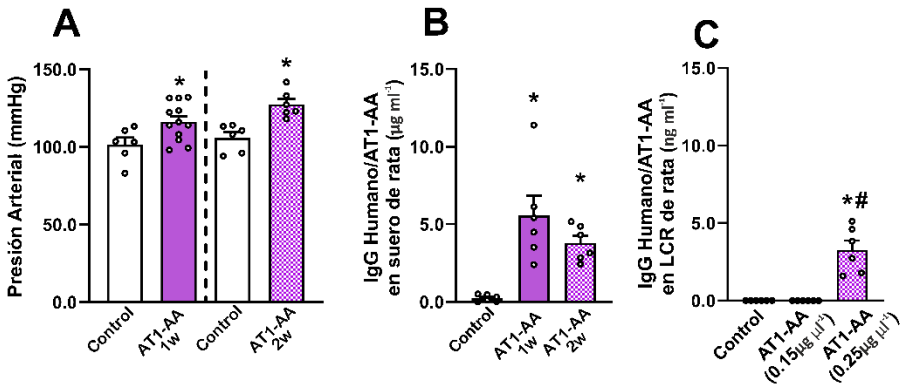


Figura 35. Administración crónica de AT1-AA usando minibombas intraperitoneales. El aumento significativo en la presión arterial reveló actividad *in vivo* de AT1-AA (A). La presencia de IgG humana se confirmó en suero tanto 1 semana como 2 semanas después de la implantación de la bomba (B). La detección de IgGs humanas en LCR de rata con el presente método requirió un aumento en la concentración de AT1-AA en las bombas (0,25 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$) (C). Los datos se dan como las medias \pm SEM. * $P < 0,05$ en comparación con el grupo de control correspondiente, # $P < 0,05$ en relación con AT1-AA (0,25 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$). Prueba t de Student (A), análisis de varianza de una vía de Kruskal-Wallis en rangos con prueba post hoc del método de Student-Newman-Keuls (B, C). Abreviaturas: AT1-AA, autoanticuerpos agonistas del receptor de angiotensina tipo 1; LCR, líquido cefalorraquídeo; IgG, inmunoglobulina tipo G.

4.3.7. Efectos de la infusión intraperitoneal crónica de AT1-AA sobre receptores del SRA cerebral y la vulnerabilidad dopaminérgica

Como se observó en ratas con inflamación periférica crónica mediada por el MetS, la administración de AT1-AA mediante minibombas intraperitoneales condujo a un aumento en la expresión (ARNm y proteína) de los receptores pro-inflamatorios del SRA en la SN (receptores AT1 y PRR) (Figura 36A, B) y una disminución en la expresión de ARNm de los componentes y receptores anti-inflamatorios (receptores AT2 y MasR, y el enzima ECA2) así como en la expresión proteica (receptores MasR y el enzima ECA2), (Figura

36C, D). Estos cambios inducidos por los AT1-AA fueron revertidos por el tratamiento con el antagonista del receptor AT1, candesartán.

Los efectos de la infusión crónica de AT1-AA sobre la vulnerabilidad dopaminérgica se estudió en el modelo de EP inducido por la sobreexpresión de la proteína mutada α -syn-A53T humana previamente caracterizado (apartado **4.1.1. Sobreexpresión de la proteína α -syn mediante la inyección estereotáxica de AAV9** de la presente tesis doctoral). La pérdida de neuronas dopaminérgicas en la SN y la pérdida de terminales estriatales dopaminérgicos aumentaron significativamente con la administración periférica crónica de AT1-AA y se bloquearon con el tratamiento simultáneo del antagonista del receptor AT1, candesartán. Además, la pérdida de neuronas dopaminérgicas se acompañó de un aumento significativo en la respuesta neuroinflamatoria microglial, que aumentó notablemente con la administración de AT1-AA y se inhibió con el tratamiento de candesartán (Figura 37).

En general, los resultados presentados muestran que en el modelo animal de MetS, y en el modelo de infusión crónica de AT1-AA, se produce un incremento en la respuesta neuroinflamatoria, así como un incremento en la expresión de receptores y componentes del brazo pro-oxidativo/pro-inflamatorio del SRA cerebral, lo que potencia la neurodegeneración dopaminérgica. Dicha degeneración se revierte mediante la administración de antagonistas del receptor AT1, como el candesartán.

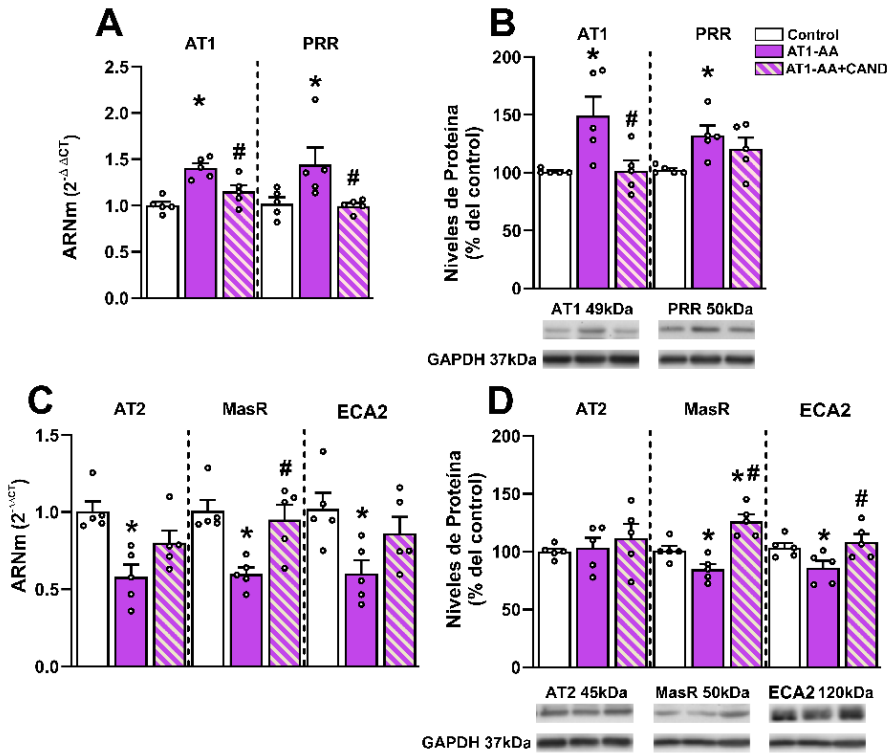


Figura 36. Efectos de la administración crónica de AT1-AA y el antagonista del receptor AT1, candesartán, en la SN de ratas. Expresión de ARNm (A, C) y proteína (B, D) de componentes y receptores pro-inflamatorios del SRA (receptores AT1 y PRR; A, B) y anti-inflamatorios (receptores AT2 y Mas, ACE2; C, D). Los datos son representados como las medias \pm SEM. * $P < 0,05$ en relación con las ratas control, # $P < 0,05$ en relación con las ratas tratadas con AT1-AA (ANOVA unidireccional con prueba post hoc del método de Student-Newman-Keuls o análisis de varianza unidireccional de Kruskal-Wallis en los rangos con -Newman- Método de Keuls prueba post hoc). Abreviaturas: AT1-AA, autoanticuerpos agonistas del receptor de angiotensina tipo 1; CAND, candesartán; AT1, receptor de angiotensina tipo 1; PRR, receptor de pro-renina; AT2, receptor de angiotensina tipo 2; ECA2, enzima convertora de angiotensina II.

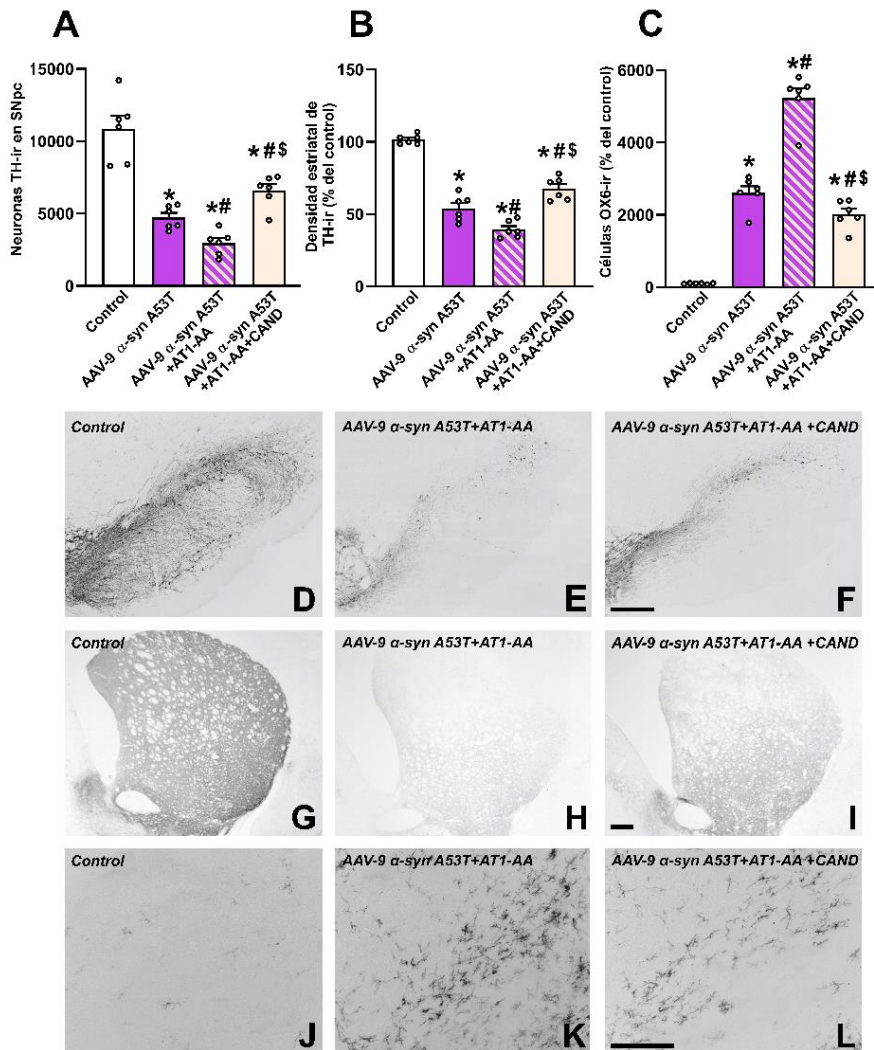


Figura 37. Efectos de la infusión crónica de AT1-AA en la muerte neuronal dopaminérgica y la respuesta microglial inflamatoria en un modelo de sobreexpresión de α -syn A53T. La administración sistémica usando bombas miniosmóticas intraperitoneales de AT1-AA aumenta el efecto nocivo de la inyección de AAV9- α -syn-A53T, produciendo un aumento significativo en la pérdida de neuronas dopaminérgicas (TH-ir) de la SN (A), en la pérdida de terminales dopaminérgicos estriatales (B) y en la respuesta inflamatoria microglial (células OX6-ir; C), lo cual fue inhibido por el tratamiento simultáneo con candesartán. Fotomicrografías de las neuronas dopaminérgicas de la SN (D-F), de los terminales dopaminérgicos estriatales (G-I), de la microglía inflamatoria de la SN (J-L), en ratas control (D, G, J), en ratas tratadas con

AAV9- α -syn-A53T y AT1-AA (E, H, K) y en ratas tratadas con AAV9- α -syn-A53T y AT1-AA más candesartán (F, I, L). Barra de escala: 200 μ m (D-I) y 100 μ m (J-L). Los datos son representados como la media \pm SEM. * $P < 0.05$ comparadas con el grupo control correspondiente, # $P < 0.05$ comparadas con AAV-9- α -synA53T; \$ $P < 0.05$ comparadas con AAV-9- α -synA53T y AT1-AA. Análisis de varianza unidireccional y prueba post hoc de Student-Newman-Keuls. Abreviaturas: AT1-AA, autoanticuerpos agonistas del receptor de angiotensina tipo 1; CAND, candesartán; AAV9, vector viral adenoasociado tipo 9; α -syn, α -sinucleína; SNpc, sustancia negra *pars compacta*; TH-ir, inmunorreactivas a TH; OX6-ir, inmunorreactivas a OX-6.

4.4. RECEPTORES DE ANGIOTENSINA EN LA INFLAMACIÓN PERIFÉRICA AGUDA DEL COVID-19

Durante el desarrollo de la presente tesis doctoral emergió la pandemia COVID-19. En la inflamación periférica aguda desencadenada por la infección de SARS-CoV-2, también está implicado el SRA, y se generó un debate sobre el uso, perjudicial o beneficioso, de los tratamientos que modulan el SRA y sus receptores, sobre todo en pacientes de mayor vulnerabilidad a la gravedad por COVID-19 (envejecimiento y MetS).

El enzima ECA2 se identificó como el receptor funcional de entrada a la célula del virus SARS-CoV-2. Sin embargo, la regulación de ECA2 pulmonar aún no había sido completamente descrita. Los tratamientos que regulan el SRA y sus receptores, así como, condiciones de inflamación periférica aguda, podrían ocasionar cambios importantes en la expresión de ECA2 pulmonar, y en otros receptores del SRA, tal y como iban demostrando nuestros resultados previos, obtenidos a nivel cerebral, bajo condiciones de inflamación periférica crónica. La desregulación en la expresión de ECA2 pulmonar podría, por tanto, tener importantes consecuencias en la progresión de la infección viral. Es por ello por lo que se abordó su estudio en la última etapa de la presente tesis doctoral.

4.4.1. Efecto de tratamientos moduladores del SRA sobre receptores de angiotensina en tejido pulmonar de ratas adultas jóvenes

Una expresión adecuada del enzima ECA2 es esencial para equilibrar el SRA hacia la respuesta anti-inflamatoria. Sin embargo, estudios recientes demostraron que la expresión tisular de ECA2, se incrementaba en pacientes tratados con ARAII e IECAs, así como en

pacientes tratados con moduladores indirectos del SRA (AINEs como el ibuprofeno). Se generó entonces un debate sobre el uso de este tipo de tratamientos en pacientes con COVID-19. Para resolver estas controversias, se trataron ratas adultas jóvenes con un ARAII, el candesartán, un IECA, el captopril, y un AINE, el ibuprofeno. Con el objetivo de comprobar los cambios en la expresión de los principales componentes y receptores del SRA pulmonar provocados por los tratamientos mencionados se realizaron análisis de expresión de transcritos mediante RT-QPCR y análisis de niveles de proteína mediante WB en homogenados de pulmón de ratas macho adultas.

Los resultados mostraron que el tratamiento con candesartán durante tres semanas inducía un aumento significativo de los niveles pulmonares de ECA2, tanto a dosis bajas (1 mg/kg) como a dosis más altas (10 mg/kg). Los receptores del SRA del eje anti-inflamatorio también fueron regulados al alza. Concretamente, la expresión de los receptores MasR fue significativamente incrementada tras la administración de ambas dosis, mientras que los receptores AT2 lo fueron con la dosis de 10 mg/kg (Figuras 38A, B y 39a, b). El tratamiento con captopril (5 o 40 mg/kg) durante tres semanas indujo un aumento de los niveles de ECA2 sólo con la dosis más alta, y se observó un aumento significativo de la expresión de los receptores Mas con ambas dosis (Figuras 38D, E y 39c, d). El tratamiento, tanto con candesartán como con captopril, incrementó significativamente la actividad enzimática de ECA2 pulmonar (Figura 38C, F). El tratamiento con ibuprofeno (40 mg/kg) durante 3 semanas aumentó significativamente la expresión y la actividad enzimática de la ECA2 pulmonar, y aumentó la expresión de los receptores del eje anti-inflamatorio del SRA (receptores AT2 y Mas) (Figura 40A, B, C). Además, el ibuprofeno indujo una disminución significativa de la expresión del receptor AT1 pro-inflamatorio (Figura 40A, B), que no fue observada con el candesartán ni captopril.

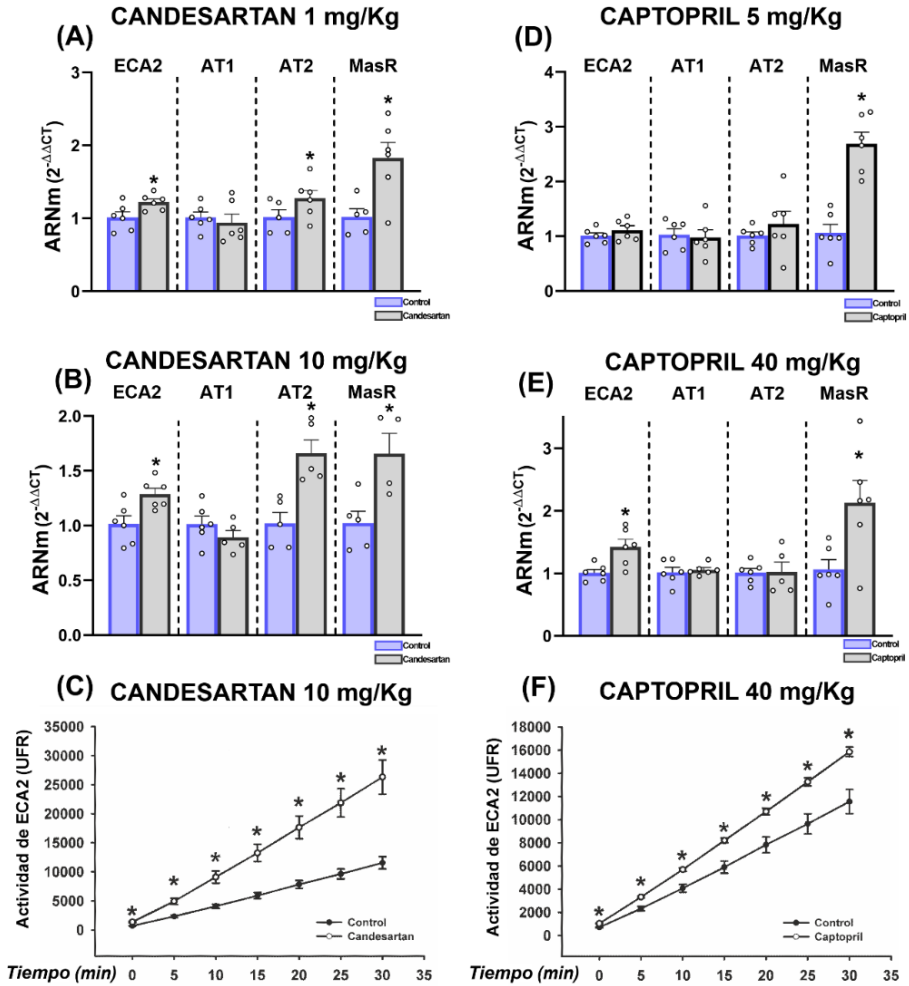


Figura 38. Efecto del candesartán y el captopril en la expresión de receptores del SRA pulmonar de ratas jóvenes. Efectos del candesartán (A-C) y del captopril (D-F) en la expresión del ARNm de ECA2 y de los receptores AT1, AT2 y Mas (A, B, D, E) y en la actividad enzimática de la ECA2 (C, F) en el pulmón de ratas adultas. Los datos son representados como la media \pm SEM. * $p < 0,05$ en relación con el grupo de control (prueba t de Student's y prueba de suma de rangos de Mann-Whitney). Abreviaturas: AT1, receptor de angiotensina tipo 1; ECA2, enzima convertora de angiotensina II; AT2, receptor de angiotensina tipo 2; UFR, unidades de fluorescencia relativas. Esta figura ha sido traducida de Pedrosa *et al.*, 2021 y se distribuye bajo los términos de Creative Commons Attribution 4.0 International License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

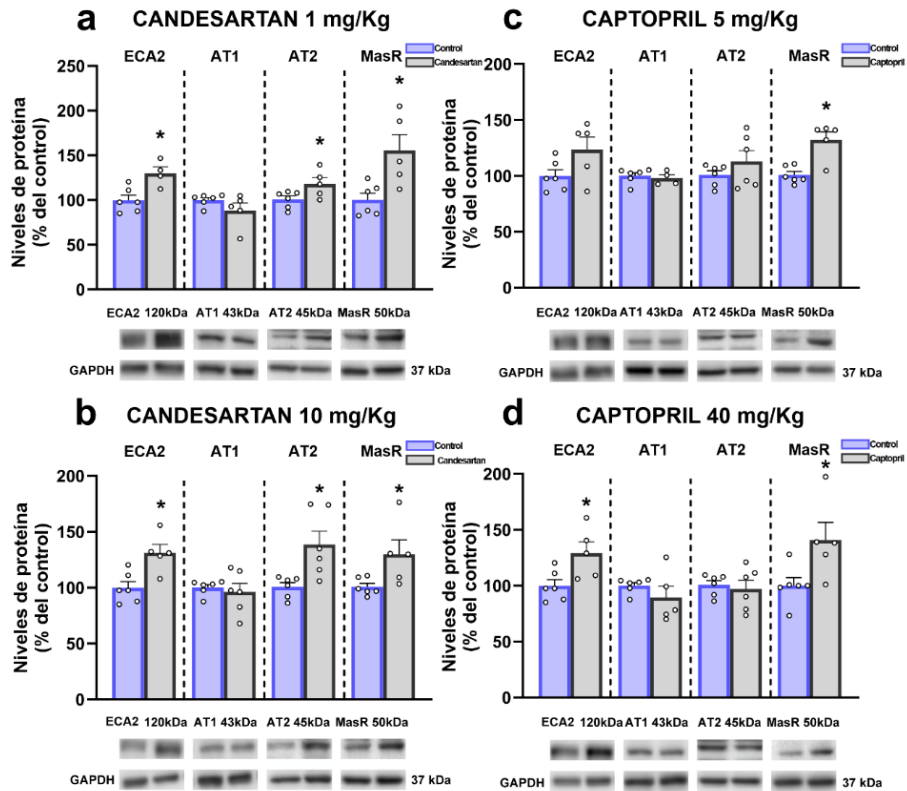


Figura 39. Efectos del tratamiento con el antagonista del receptor AT1, candesartán (a, b) y captopril (c, d) sobre la expresión de proteínas de los receptores ECA2, AT1, AT2 y Mas en el tejido pulmonar de rata adulta. Los datos son representados como la media \pm SEM. * $p < 0.05$ relativo al grupo de control (prueba t de Student's y prueba de suma de rangos de Mann-Whitney). Abreviaturas: AT1, receptor de angiotensina tipo 1; ECA2, enzima convertora de angiotensina II; AT2, receptor de angiotensina tipo 2. Esta figura ha sido traducida de Pedrosa *et al.*, 2021 y se distribuye bajo los términos de Creative Commons Attribution 4.0 International License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

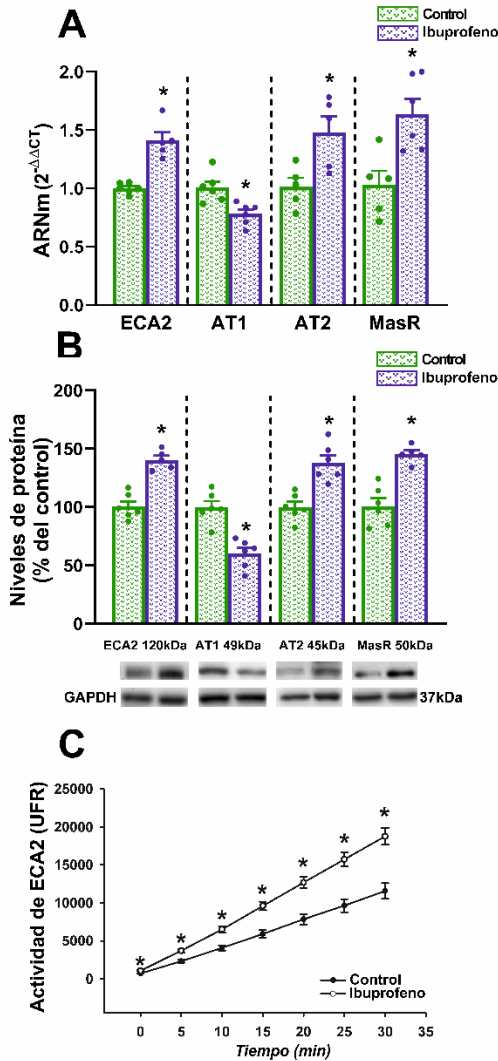


Figura 40. Efectos del ibuprofeno sobre la expresión del ARNm (A) y de proteína (B) de los receptores ECA2, AT1, AT2 y Mas; y actividad enzimática de ECA2 (C) en el tejido pulmonar de ratas jóvenes control y tratadas con ibuprofeno. Los datos son representados como la media \pm SEM. * $p < 0.05$ en relación con las ratas control. Para las comparaciones entre dos grupos se utilizó la prueba de t Student's o la prueba de suma de rangos de Mann-Whitney. Abreviaturas: AT1, receptor de angiotensina tipo 1; ECA2, enzima convertora de angiotensina II; AT2, receptor de angiotensina tipo 2; UFR, unidades de fluorescencia relativas. Esta figura ha sido traducida de Valenzuela *et al.*, 2021 y se distribuye bajo los términos de Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

4.4.2. Efecto de tratamientos moduladores del SRA y receptores de angiotensina en tejido pulmonar de modelos animales de inflamación crónica especialmente vulnerables a COVID-19: MetS y envejecimiento.

Los resultados presentados en esta tesis demuestran el importante papel de la inflamación periférica en la expresión de los diferentes componentes del SRA cerebral y el mantenimiento del equilibrio entre los ejes pro-oxidativo y anti-inflamatorio. Por tanto, se estudió la posible implicación de la inflamación periférica crónica, en modelos animales de ratas envejecidas y ratas con MetS, sobre los cambios en la expresión y actividad de los receptores del SRA pulmonar, y el efecto del tratamiento con un agente bloqueante del receptor AT1 (candesartán); un inhibidor de ECA (captopril) y un modulador indirecto de la expresión de los receptores del SRA (ibuprofeno).

La expresión de los receptores AT2 y del enzima ECA2 disminuyó significativamente en tejido pulmonar de animales con MetS frente a animales control. Estos niveles fueron incrementados significativamente con candesartán, captopril e ibuprofeno (Figuras 41A, B; 42a-d y 43A, B). Curiosamente, las ratas con MetS también mostraron un aumento de la expresión en tejido pulmonar de los receptores del eje pro-inflamatorio (es decir, los receptores AT1) que se redujo significativamente con el tratamiento con candesartán, captopril e ibuprofeno (Figuras 41A, B; 42a, c y 43A, B). Además, el homogenado pulmonar de ratas con MetS, analizado por HPLC, mostró un aumento de los niveles de Ang II y una disminución de los niveles de Ang(1-7) en comparación con ratas control. El tratamiento con ibuprofeno provocó que los niveles de angiotensinas revirtieran a niveles de ratas control (Figura 43C, D).

Todos los resultados obtenidos indican un desequilibrio en la expresión de componentes y receptores del SRA hacia el eje pro-inflamatorio en tejido pulmonar de ratas con MetS, y que los tratamientos candesartán, captopril e ibuprofeno, no sólo disminuyen la expresión de los receptores del eje pro-inflamatorio, sino que aumentan la expresión de los receptores del eje anti-inflamatorio.

Resultados similares fueron obtenidos en tejido pulmonar de ratas envejecidas, que mostraron una disminución significativa de la expresión de ECA2 y de los receptores del eje anti-inflamatorio del SRA (Mas y AT2), y un aumento significativo de la expresión del receptor AT1. El tratamiento con candesartán aumentó significativamente la expresión de ECA2 y de los receptores AT2 y Mas, y disminuyó la expresión del receptor AT1 (Figuras 41C y 42e).

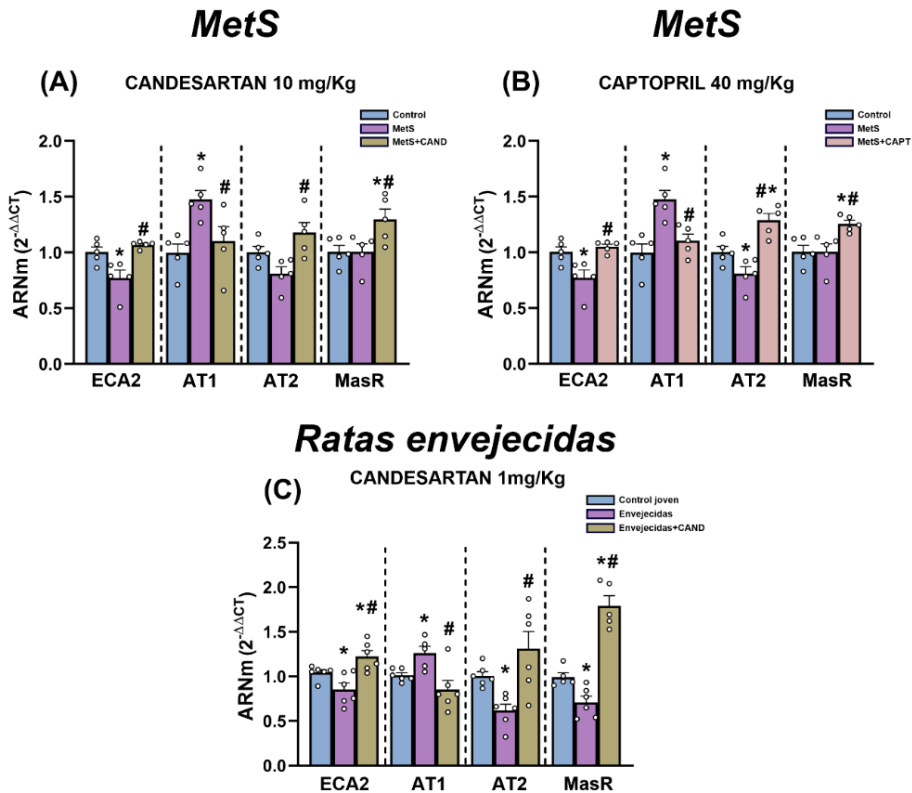


Figura 41. Efecto del candesartán y el captopril en la expresión de receptores del SRA pulmonar de ratas con MetS y ratas envejecidas. Efectos del candesartán (A y C) y del captopril (B) en la expresión del ARNm de ECA2 y de los receptores AT1, AT2 y Mas en tejido pulmonar de ratas con MetS (A y B) y de ratas envejecidas (C). Las ratas tratadas con candesartán (A) o captopril (B) se compararon con el mismo grupo de animales no tratados en (A) y (B). Los datos se presentan como media \pm SEM. * $p < 0,05$ en relación con las ratas adultas de control; # $p < 0,05$ en relación con las ratas no tratadas con MetS (A y B) o las ratas envejecidas (C). ANOVA de una vía con prueba post hoc Student-Newman-Keuls o análisis de varianza de una vía de Kruskal-Wallis sobre rangos con prueba post hoc de Student-Newman-Keuls. Abreviaturas: MetS, síndrome metabólico; AT1, receptor de angiotensina tipo 1; ECA2, enzima convertora de angiotensina II; AT2, receptor de angiotensina tipo 2; CAND, candesartán; CAPT, captopril. Esta figura ha sido traducida de Pedrosa *et al.*, 2021 y se distribuye bajo los términos de Creative Commons Attribution 4.0 International License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

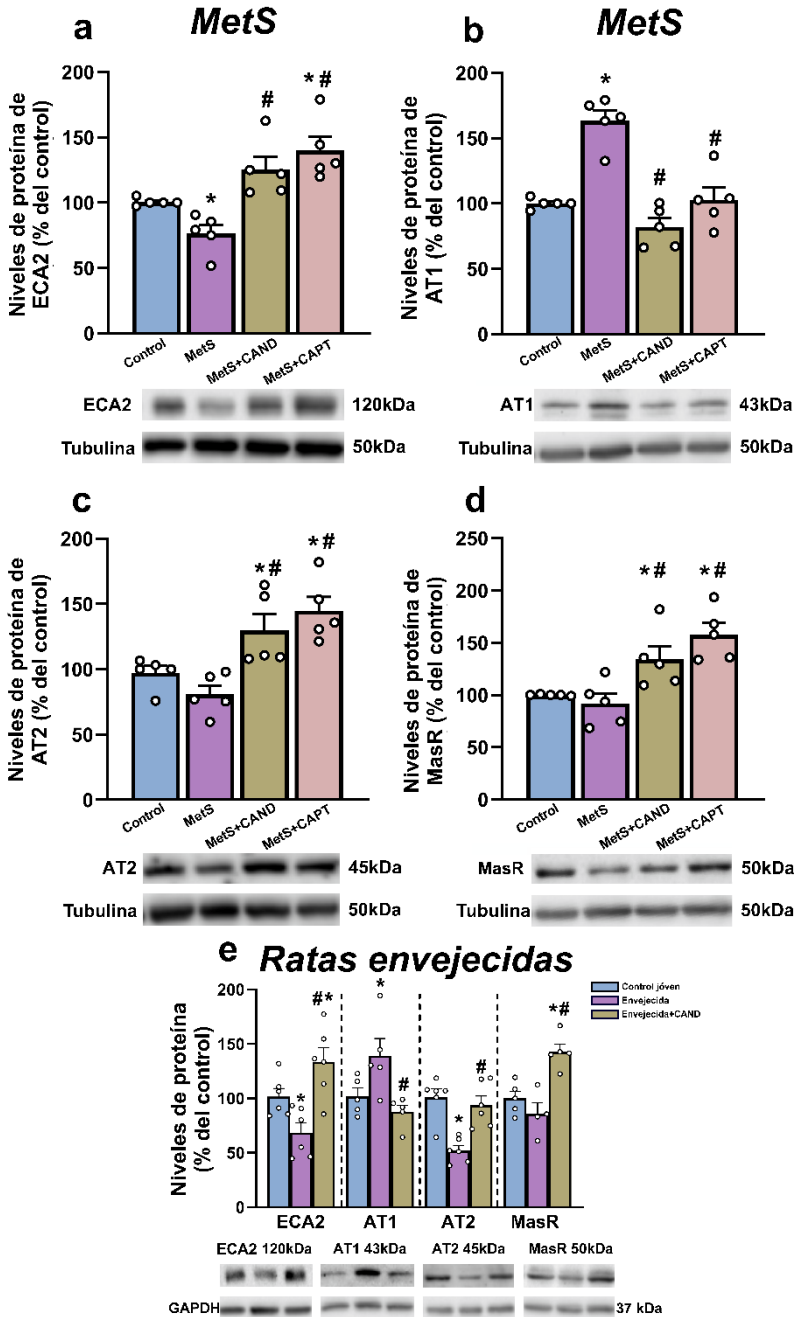


Figura 42. Niveles de proteína del enzima ECA2 (a) y de los receptor AT1 (b), AT2 (c) y Mas (d) en el tejido pulmonar de ratas control y ratas con MetS no tratadas o tratadas con candesartán y captopril, y ratas envejecidas no tratadas o tratadas con candesartán (e). Los datos son representados como la media \pm SEM. * $p < 0,05$ en relación con ratas control adultas, # $p < 0,05$ en relación con ratas de MetS no tratadas (a-d) o ratas envejecidas (e). ANOVA unidireccional con prueba post hoc Student-Newman-Keuls o análisis de varianza unidireccional de Kruskal-Wallis en rangos con prueba post hoc Student-Newman-Keuls. Abreviaturas: MetS, síndrome metabólico; AT1, receptor de angiotensina tipo 1; ECA2, enzima convertora de angiotensina II; AT2, receptor de angiotensina tipo 2; CAND, candesartán; CAPT, captopril. Esta figura ha sido traducida de Pedrosa *et al.*, 2021 y se distribuye bajo los términos de Creative Commons Attribution 4.0 International License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

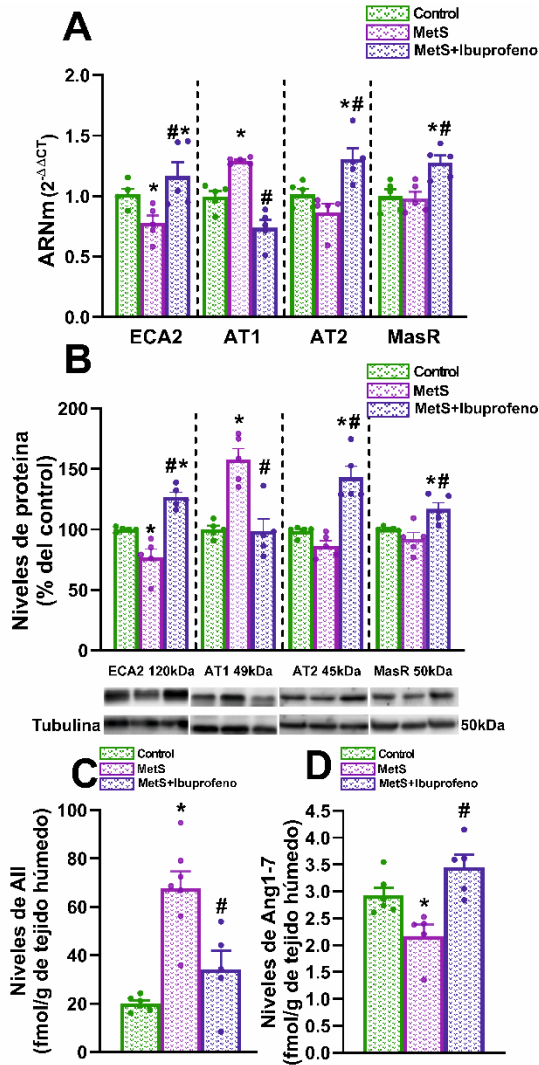


Figura 43. Efectos del tratamiento con ibuprofeno sobre la expresión del ARNm (A) y de proteína (B) de los receptores ECA2, AT1, AT2 y Mas, y los niveles de AngII (F) y Ang(1-7) (G) en el tejido pulmonar de ratas control, ratas con MetS y ratas con MetS tratadas con ibuprofeno. Los datos son representados como la media \pm SEM. * $p < 0.05$ en relación con las ratas control; # $p < 0.05$ en relación con las ratas de MetS no tratados. Para las comparaciones múltiples se utilizó ANOVA con prueba post hoc de Student-Newman-Keuls o el ANOVA de una vía de Kruskal-Wallis sobre rangos con la prueba post hoc de Student-Newman-Keuls). Abreviaturas: MetS, síndrome metabólico; AT1, receptor de angiotensina tipo 1; ECA2, enzima convertidora de angiotensina II; AT2, receptor de angiotensina tipo 2; AngII, angiotensina II;

Ang(1-7), angiotensina (1-7). Esta figura ha sido traducida de Valenzuela *et al.*, 2021 y se distribuye bajo los términos de Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

4.4.3. Efecto del tratamiento con moduladores del SRA en modelos *in vitro* de infección pulmonar por SARS-CoV-2.

Los resultados presentados demuestran una importante regulación de la expresión de ECA2 pulmonar por parte del candesartán, captopril e ibuprofeno. Sin embargo, existía controversia sobre si el aumento de expresión de ECA2 provocaba un efecto beneficioso o perjudicial bajo la inflamación aguda mediada por la progresión de la infección por SARS-CoV-2. Para demostrar este efecto se realizaron experimentos *in vitro* con la línea celular de neumocitos alveolares humanos tipo II (A549) tratadas con la proteína viral, Spike.

En primer lugar, se demostró la expresión de la proteína ECA2 en la línea celular A549 mediante WB y, además, estos niveles correlacionaban con una mayor confluencia celular (Figura 44A), en consonancia con estudios previos (Gandhi *et al.*, 2019).

En segundo lugar, se comprobó si los tratamientos candesartán, captopril e ibuprofeno podían modificar la expresión de ECA2 como se observó en los experimentos *in vivo*. Curiosamente se observó que el tratamiento con candesartán y captopril, a las dosis utilizadas, provocaba un aumento de expresión de ARNm de ECA2 en la línea pulmonar A549, especialmente 24h después del tratamiento (Figura 44B). Sin embargo, el tratamiento con ibuprofeno aumentaba los niveles de expresión de ECA2, tanto 24h como 48h después del tratamiento (Figura 46A).

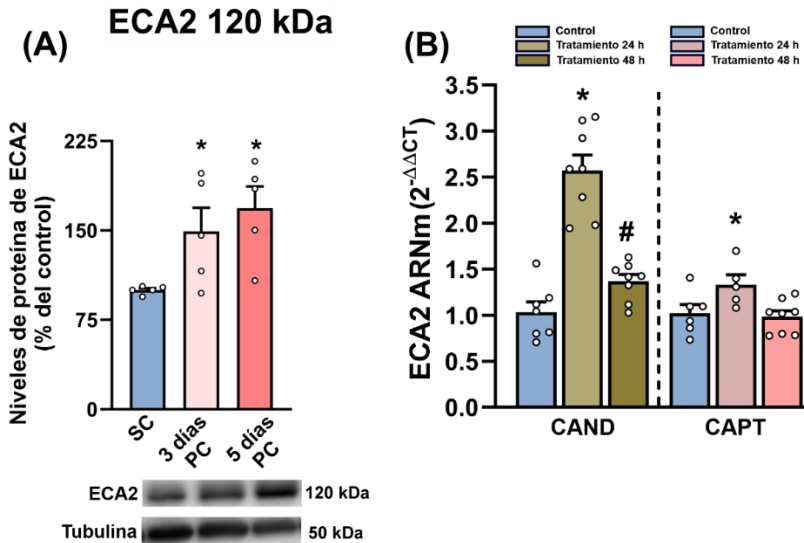


Figura 44. Niveles de expresión del enzima ECA2 en cultivos de células humanas alveolares tipo II A549 tratadas y no tratadas con candesartán o captopril. La confluencia celular aumentó los niveles celulares de la proteína ECA2 (A). Efecto de los tratamientos con candesartán y captopril a tiempos de 24 o 48 h sobre la expresión del ARNm del enzima ECA2 (B). Los datos son representados como la media \pm SEM. * $p < 0,05$ en relación con la subconfluencia (A) o los controles no tratados (B), # $p < 0,05$ en relación con el tratamiento de 24 h (ANOVA de una vía con la prueba post hoc de Student-Newman-Keuls o análisis de varianza de una vía de Kruskal-Wallis en rangos con la prueba post hoc de Student-Newman-Keuls). Abreviaturas: PC, post-confluencia; SC, sub-confluencia; ECA2, enzima convertora de angiotensina II; CAND, candesartán; CAPT, captopril. Esta figura ha sido traducida de Pedrosa *et al.*, 2021 y se distribuye bajo los términos de Creative Commons Attribution 4.0 International License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Mediante análisis de la expresión proteica por WB, se observó que el tratamiento con la proteína viral Spike (SARS-CoV-2 spike-RBD; 1 $\mu\text{g/ml}$) inducía una disminución significativa de los niveles celulares de la proteína ECA2 de longitud completa (120 kDa), que era inhibida por el pre-tratamiento con candesartán, captopril (Figura 45A) e ibuprofeno (Figura 46B). También se observó que el tratamiento con la proteína Spike inducía una disminución de la actividad de ECA2 en el lisado celular, que era inhibida por el pre-tratamiento con candesartán, captopril (Figura 45B, C) e ibuprofeno (Figura 46C). Curiosamente, la expresión de una isoforma corta de la proteína ECA2 (60 kDa) aumentó en las células después del tratamiento con la proteína Spike y se reducía

significativamente por el pre-tratamiento con candesartán, captopril (Figura 45D) e ibuprofeno (Figura 46D). Además, el tratamiento con la proteína Spike provocó un aumento en los niveles de ECA2 soluble (105 kDa) en el medio de cultivo, que se reducía por el pre-tratamiento con los fármacos (Figuras 45E y 46E).

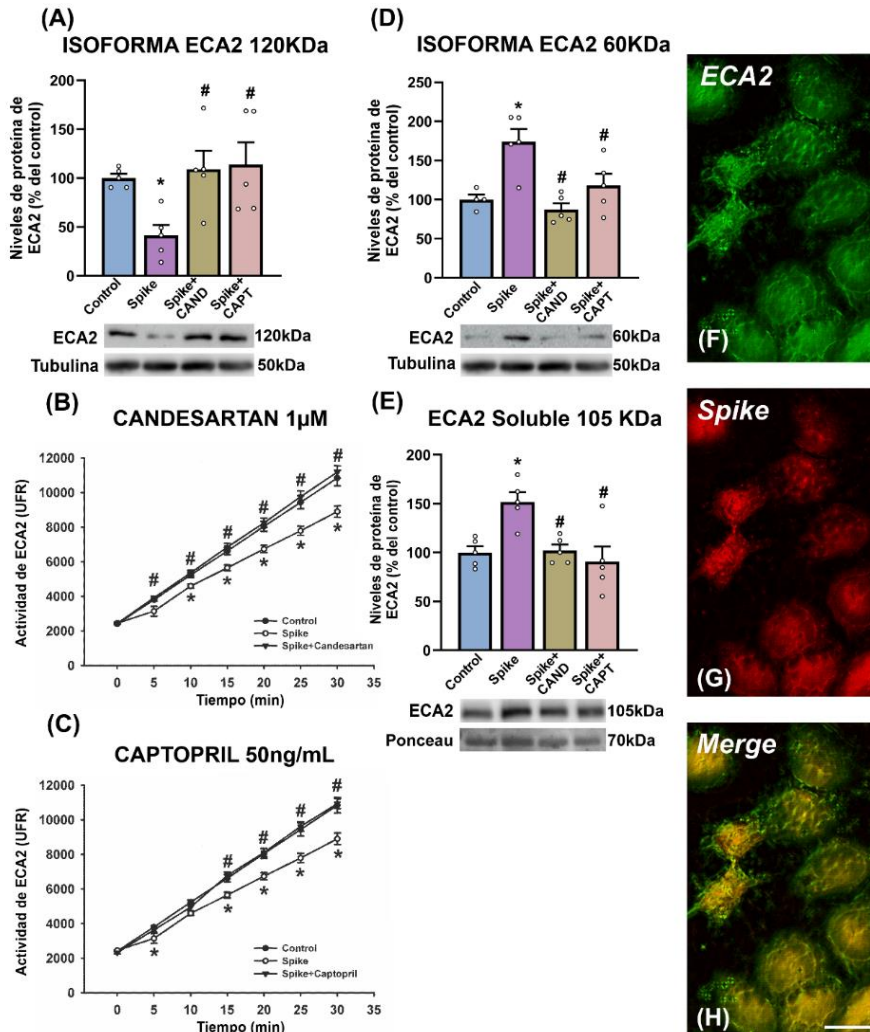


Figura 45. Niveles de expresión proteica de diferentes isoformas de ECA2 y de la actividad enzimática de ECA2 en las células o en el medio de cultivo después de los tratamientos con la proteína Spike, candesartán y captopril. Niveles de la proteína ECA2 (A, D y E) y de su

actividad enzimática (B y C) en las células (A y D) y en el sobrenadante celular (E) de cultivos de células alveolares humanas de tipo II A549 tratadas sólo con proteína Spike o con proteína Spike junto con candesartán o captopril. Microscopía confocal láser que muestra la colocalización (H, amarillo) de ECA2 (verde, F) y la proteína Spike (rojo, G) en las células después del tratamiento de los cultivos con la proteína Spike. Los datos son representados como la media \pm SEM. * $p < 0,05$ en relación con los controles no tratados; # $p < 0,05$ en relación con las células tratadas sólo proteína Spike (ANOVA de una vía con prueba post hoc Student-Newman-Keuls o análisis de varianza de una vía de Kruskal-Wallis sobre rangos con prueba post hoc Student-Newman-Keuls); barra de escala (para F-H): 25 μ m. Abreviaturas: ECA2, enzima conversora de angiotensina II; CAND, candesartán; CAPT, captopril; UFR, unidades de fluorescencia relativa. Esta figura ha sido traducida de Pedrosa *et al.*, 2021 y se distribuye bajo los términos de Creative Commons Attribution 4.0 International License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

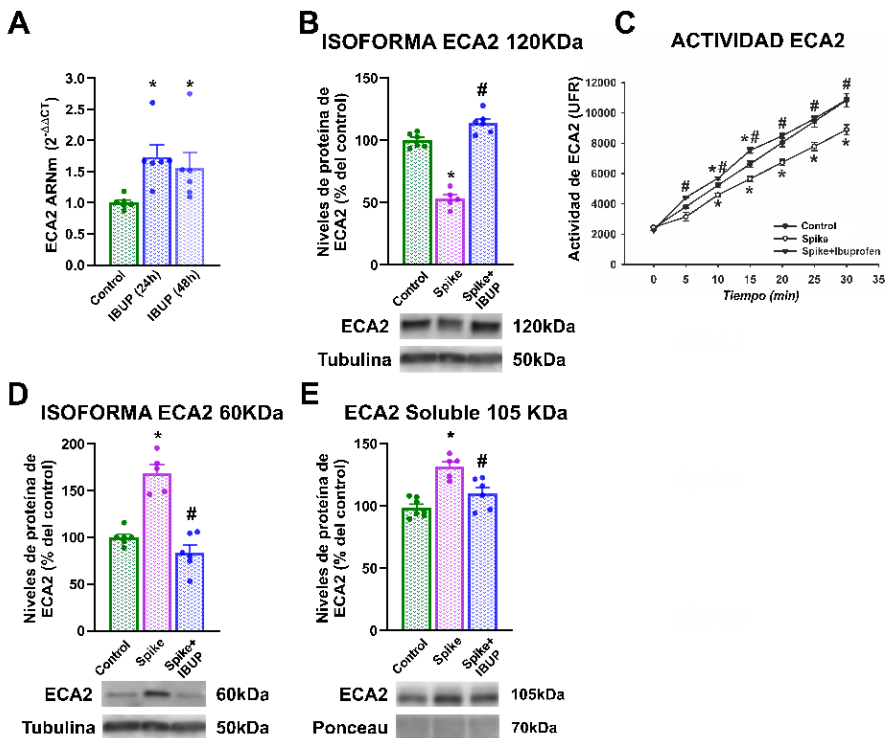


Figura 46. Efectos del tratamiento con ibuprofeno a las 24 o 48 h en la expresión celular del ARNm de ECA2 (A) en cultivos de células alveolares humanas de tipo II A549. Niveles de proteína de (B, D, E) y de la actividad enzimática (C) de ECA2 en las células (B-D) y en el sobrenadante celular (E) de los cultivos tratados sólo con proteína Spike o con proteína Spike e ibuprofeno. Los datos son representados como la media \pm SEM. * $p < 0.05$ en relación con controles no tratados; # $p < 0.05$ en relación con las células tratadas sólo con proteína Spike (ANOVA de una vía con prueba post hoc de Student-Newman-Keuls o ANOVA de una vía de

Kruskal-Wallis sobre rangos con prueba post hoc de Student-Newman-Keuls). Abreviaturas: ECA2, enzima convertora de angiotensina II; IBUP, ibuprofeno; UFR, unidades de fluorescencia relativa. Esta figura ha sido traducida de Valenzuela *et al.*, 2021 y se distribuye bajo los términos de Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Para estudiar los efectos de los tratamientos moduladores del SRA en la internalización de la proteína Spike hacia el citoplasma celular se realizaron experimentos utilizando microscopía láser confocal. En primer lugar, se confirmó que la proteína Spike era internalizada por los neumocitos cultivados que expresaban ECA2 (Figura 45F-H). A continuación, se investigaron los efectos del candesartán, el captopril y el ibuprofeno en la tasa de internalización de la RBD-Fc-Spike del SARS-CoV-2 midiendo las intensidades de fluorescencia citoplasmática de la proteína Spike (Figuras 47 y 48A-J). Para minimizar la posibilidad de que los cambios en los niveles de proteína Spike internalizada pudieran estar relacionados con las diferencias de expresión del receptor ECA2, en base a la confluencia celular (Figura 44A), se utilizaron células A549 transfectadas con ECA2-GFP y establecer unos niveles homogéneos de expresión de dicha enzima en la línea celular. Los resultados de internalización de la proteína Spike se expresaron en relación con los niveles de ECA2 en cada una de las células (Figuras 47A y 48J). Los resultados muestran altos niveles de internalización de la proteína Spike en relación con los controles no tratados con la proteína Spike. En los cultivos tratados con proteína Spike y candesartán (Figura 47A, H-J), captopril (Figura 47A, K-M) o ibuprofeno (Figura 48A-J), la fluorescencia de la proteína Spike en las células disminuyó alrededor del 50% en relación con las células sólo tratadas con proteína Spike (Figuras 47E-G y 48D-F). En consonancia con estos resultados, también se observó que el tratamiento con proteína Spike provocó un aumento significativo de los niveles de las citoquinas pro-inflamatorias IL-6, TNF- α y CCL2 liberadas al medio de cultivo, que se reducían significativamente cuando las células eran pre-tratadas con candesartán, captopril (Figura 49A-C) o ibuprofeno (Figura 48K-M).

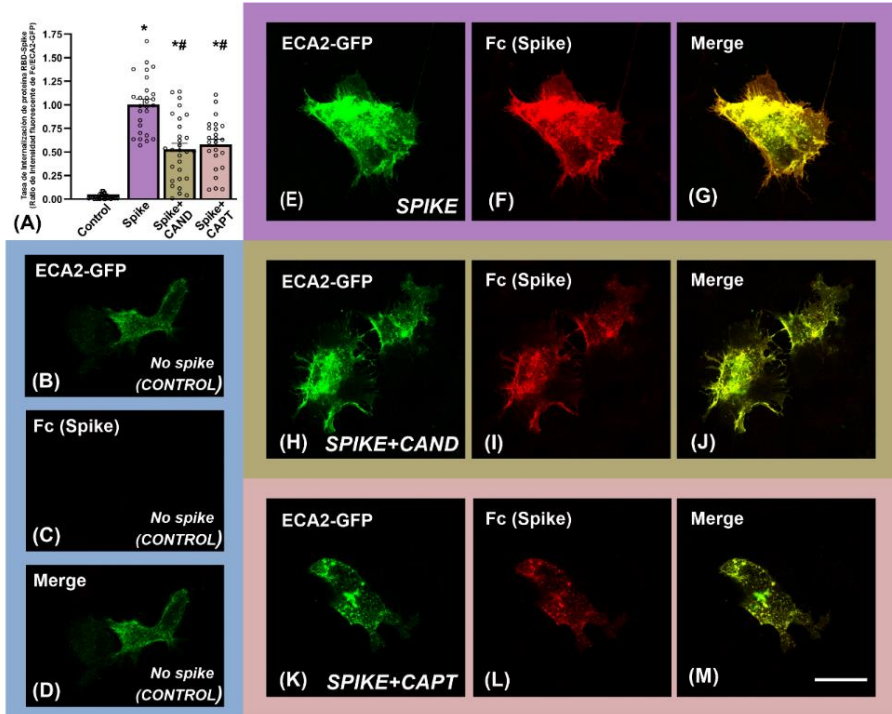


Figura 47. Efectos del tratamiento con candesartán y captopril en la internalización de la proteína Spike en cultivos de células alveolares humanas de tipo II A549. Efectos del candesartán y el captopril en la tasa de internalización de la proteína RBD-Fc-Spike del SARS-CoV-2 con la medición de las intensidades de fluorescencia citoplasmática de la proteína Spike mediante microscopía láser confocal (A). Fluorescencia de ECA2-GFP (verde), de la proteína Spike (rojo) y de la fusión (amarillo) en los controles no tratados (B-D), y en los cultivos tratados sólo con la proteína Spike (E-G) o con la proteína Spike y candesartán (H-J) o con la proteína Spike y captopril (K-M). Los datos son representados como la media \pm SEM. * $p < 0,05$ en relación con los controles no tratados, # $p < 0,05$ en relación con las células tratadas con solo con Spike (análisis de varianza de una vía de Kruskal-Wallis sobre rangos con la prueba post hoc Dunn); barra de escala (para todas las fotografías): 25 μ m. Abreviaturas: ECA2, enzima convertora de angiotensina II; CAND, candesartán; CAPT, captopril; GFP, proteína verde fluorescente. Esta figura ha sido traducida de Pedrosa *et al.*, 2021 y se distribuye bajo los términos de Creative Commons Attribution 4.0 International License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

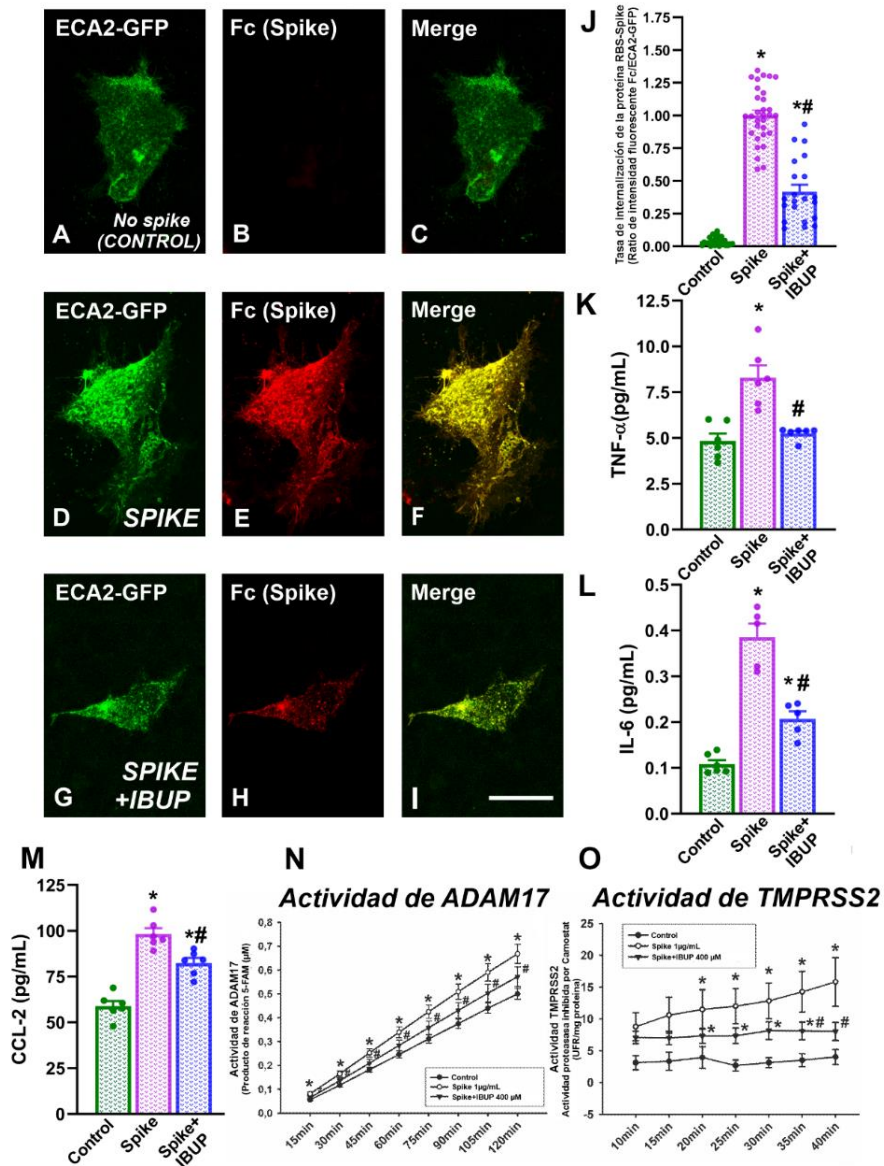


Figura 48. Efectos del tratamiento con ibuprofeno en el nivel de internalización de la proteína RBD-Fc-Spike del SARS-CoV-2 cuantificada como intensidad de fluorescencia celular utilizando un microscopio de láser confocal (A-J), en cultivos de células alveolares humanas de tipo II A549. Marcaje fluorescente para ECA2 (verde), proteína Spike (rojo) y colocalización de ECA2 y proteína Spike (amarillo) en células no tratadas con proteína Spike (A-C), células

sólo tratadas con la proteína Spike (D-F) y células tratadas con proteína Spike e ibuprofeno (G-I). Niveles de TNF- α (K), IL-6 (L), CCL-2 (M) en células alveolares humanas tipo II A549 tratados sólo con proteína Spike o con proteína Spike e ibuprofeno. Actividades enzimáticas de ADAM17 (N) y TMPRSS2 (O) en células alveolares humanas de tipo II A549 tratadas sólo con proteína Spike o proteína Spike junto con ibuprofeno. Los datos son representados como la media \pm SEM. * $p < 0.05$ en relación con los controles no tratados; # $p < 0.05$ en relación con las células tratadas sólo con proteína Spike (ANOVA de una vía con la prueba post hoc de Student-Newman-Keuls post o ANOVA de una vía de Kruskal-Wallis sobre rangos con prueba post hoc de Student-Newman-Keuls). Barra de escala (para todas las fotografías): 25 μ m. Abreviaturas: ECA2, enzima convertidora de angiotensina II; IBUP, ibuprofeno; GFP, proteína verde fluorescente; TNF- α , factor de necrosis tumoral; IL-6, interleucina 6; CCL-2, ligando de quimiocina 2; ADAM17, dominio 17 de la desintegrina y metalopeptidasa; TMPRSS2, proteasa transmembrana serina 2; UFR, unidades de fluorescencia relativa. Esta figura ha sido traducida de Valenzuela *et al.*, 2021 y se distribuye bajo los términos de Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Debido a los efectos observados en la internalización de la proteína Spike tras el tratamiento con candesartán, captopril e ibuprofeno, se concluyó que no todos ellos podían deberse exclusivamente al aumento de expresión de ECA2, por lo que se investigaron otros posibles mecanismos implicados en la internalización de la proteína Spike y provocados por dichos tratamientos.

En primer lugar, debido a que se observó un aumento en los niveles de ECA2 soluble (105kDa) con el tratamiento de la proteína Spike, se analizaron posibles cambios en la actividad de ADAM17. Curiosamente, la actividad de ADAM17 aumentó significativamente en las células tratadas con la proteína Spike en relación con las células del grupo control (no tratadas). Sin embargo, el aumento fue inhibido por el pre-tratamiento con candesartán, captopril (Figura 49D, E) e ibuprofeno (Figura 48N). Además, se observó que la actividad de TMPRSS2 aumentó significativamente en las células tratadas con proteína Spike en comparación con los controles no tratados, y que dicha actividad se reducía significativamente tras el pre-tratamiento con ibuprofeno (Figura 48O).

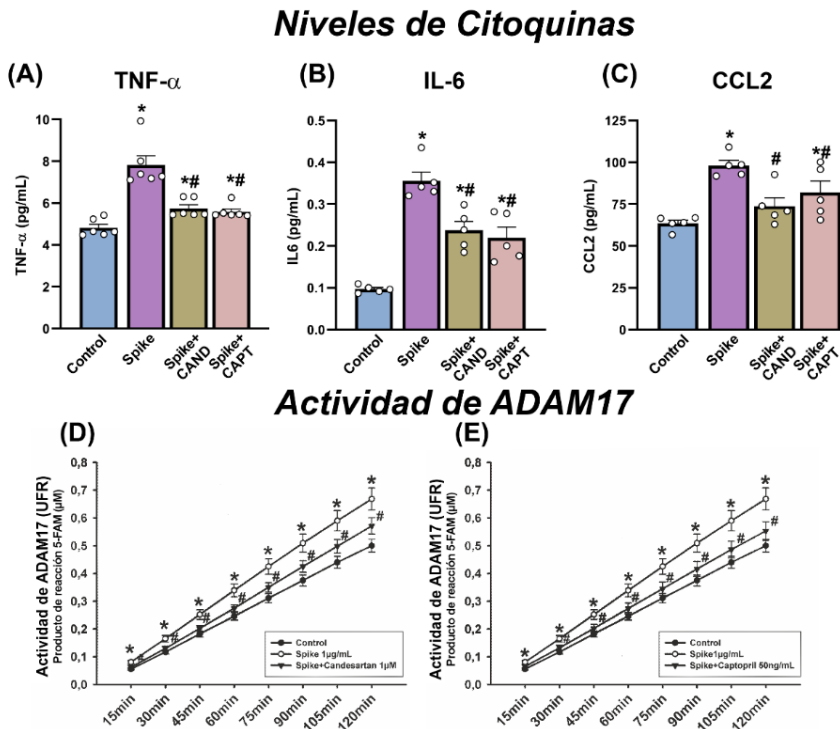


Figura 49. Niveles de citoquinas pro-inflamatorias y actividad enzimática de ADAM17 en los cultivos de células alveolares humanas de tipo II A549, tratados con proteína Spike, candesartán y captopril. Niveles de citoquinas pro-inflamatorias (TNF- α , IL-6, CCL-2; A-C) y actividad enzimática ADAM17 (D y E) en el medio de cultivo (A-C) y en las células (D y E) de cultivos de células alveolares humanas de tipo II A549 tratadas sólo con proteína Spike o con proteína Spike junto con candesartán o captopril. Los datos son representados como la media \pm SEM. * $p < 0,05$ en relación con los controles no tratados; # $p < 0,05$ en relación con las células sólo tratadas con proteína Spike (ANOVA de una vía con prueba post hoc Student-Newman-Keuls o análisis de varianza de una vía de Kruskal-Wallis sobre rangos con prueba post hoc Student-Newman-Keuls). Abreviaturas: CAND, candesartán; CAPT, captopril; TNF- α , factor de necrosis tumoral; IL-6, interleucina 6; CCL-2, ligando de quimiocina 2; ADAM17, dominio 17 de la desintegrina y metalopeptidasa; UFR, unidades de fluorescencia relativa. Esta figura ha sido traducida de Pedrosa *et al.*, 2021 y se distribuye bajo los términos de Creative Commons Attribution 4.0 International License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

5. DISCUSIÓN

5.1. RECEPTORES AT1 CEREBRALES, NEUROINFLAMACIÓN Y DEGENERACIÓN DOPAMINÉRGICA EN UN MODELO DE PARKINSON BASADO EN SINUCLEINOPATÍA.

5.1.1. Aumento de la muerte neuronal dopaminérgica en un modelo de sobreexpresión de α -syn

Los resultados presentados demuestran que la inyección estereotáxica de los vectores AAV9- α -syn-WT y AAV9- α -syn-A53T condujo a la sobreexpresión de α -syn humana en las neuronas dopaminérgicas de la SNpc en un modelo animal de rata, lo que indujo una marcada pérdida de neuronas dopaminérgicas junto con una respuesta neuroinflamatoria asociada a las células microgliales. Gracias a la incorporación del promotor de sinapsina en los AAV9, la sobreexpresión de α -syn pudo restringirse a las neuronas de la SNpc, y no a células microgliales ni astrocitos, lo que aporta una gran ventaja respecto a modelos transgénicos y a otros modelos que utilizan AAV (Fajardo-Serrano *et al.*, 2021; Chavarria *et al.*, 2022). Las mutaciones de α -syn relacionadas con la degeneración dopaminérgica, incluida la mutación A53T, han mostrado una aceleración de la agregación proteica con respecto a la proteína en su forma salvaje, WT (Breydo *et al.*, 2012). En el modelo presentado, se utilizaron dos tipos de proteína α -syn, la salvaje WT y la mutación A53T. Ambas provocaron una marcada muerte neuronal a las 4 semanas y un aumento en la respuesta inflamatoria microglial transcurrida una semana tras la lesión. Tanto en experimentos realizados preliminarmente, como en consonancia con otros estudios anteriores (Lu *et al.*, 2015) se observó una mayor toxicidad de la proteína mutada A53T en comparación con la WT. Es por ello por lo que, en el presente trabajo se utilizó una dosis de vector más baja (la mitad con respecto a la α -syn WT) para la α -syn A53T

mutada y así poder obtener resultados similares utilizando ambas formas proteicas.

5.1.2. Aumento de la respuesta microglial inflamatoria en un modelo de sobreexpresión de α -syn

En el modelo animal de EP caracterizado en la presente tesis doctoral se observó una respuesta microglial significativa una semana después de la inyección del vector AAV (es decir, antes de la observación de una muerte neuronal significativa), lo que sugiere que la acumulación intraneuronal de α -syn puede desencadenar una respuesta inflamatoria microglial antes de que se produzca una muerte significativa de las neuronas, como se demuestra en otros modelos basados en sinucleinopatía (Izco *et al.*, 2021). Es probable que las señales derivadas de las neuronas alteradas por la acumulación de α -syn o la α -syn liberada por las neuronas independientemente de la muerte celular (Yamada e Iwatsubo, 2018) inicien la respuesta inflamatoria microglial. En etapas posteriores, un efecto directo de la α -syn extracelular liberada por las neuronas degeneradas puede activar aún más la respuesta microglía. Además, la neuroinflamación mediada por la microglía y el daño neuronal inducido por la α -syn pueden estimularse mutuamente estableciéndose una retroalimentación positiva, perpetuando así la progresión de la neurodegeneración (Poewe *et al.*, 2017).

Los mecanismos subyacentes a la respuesta inflamatoria microglial inducida por α -syn aún no han sido totalmente aclarados. Varios estudios *in vitro* han observado que la α -syn extracelular puede inducir la inflamación microglial y causar daño neuronal (Zhang *et al.*, 2005; Reynolds *et al.*, 2008), sin embargo, esta interacción en modelos animales aún no está tan estudiada. Varios estudios *in vitro* han observado que la α -syn puede activar los receptores de tipo Toll de las células microgliales y estimular diferentes vías de inflamación microglial, incluidas las vías NF- κ B y de la proteína quinasa activada por mitógenos (Zhang *et al.*, 2017). También se ha demostrado que la α -syn induce la migración microglial (Wang *et al.*, 2015b). Curiosamente, se ha observado que la NOX microglial es activada por la α -syn (Lu *et al.*, 2015, Pignataro *et al.*, 2018). La activación de NOX

induce la liberación de SO y desempeña un papel fundamental en la polarización microglial hacia un fenotipo pro-inflamatorio, que puede inhibirse mediante el agotamiento o la inhibición de NOX (Zhang *et al.*, 2007, Jiang *et al.*, 2015).

5.1.3. Efecto neuroprotector y anti-inflamatorio de los bloqueantes del receptor AT1 en un modelo de sobreexpresión de α -syn

En los últimos años se ha demostrado una importante interacción entre el SRA y NOX en la respuesta inflamatoria microglial (Villar-Cheda *et al.*, 2012, Borrajo *et al.*, 2014b, Rodríguez-Perez *et al.*, 2015). Estudios anteriores han demostrado la existencia de un SRA local en las neuronas y células gliales de la SNpc y el ST de roedores y primates, incluidos los humanos (Garrido-Gil *et al.*, 2013; 2017). En resumen, el SRA local parece estar implicado en la regulación de los niveles de DA (Mendelsohn *et al.*, 1993; Brown *et al.*, 1996; Dominguez-Meijide *et al.*, 2014), la modulación de los niveles intraneuronales de estrés oxidativo (Valenzuela *et al.*, 2016; Villar-Cheda *et al.*, 2017; Costa-Besada *et al.*, 2018) y la modulación de la respuesta neuroinflamatoria (Rodríguez-Perez *et al.*, 2015, Dominguez-Meijide *et al.*, 2017). En las células microgliales, el eje Ang II/AT1/NOX conduce a una activación y polarización microglial hacia el fenotipo pro-inflamatorio y pro-oxidante (Rodríguez-Perez *et al.*, 2015; Labandeira-García *et al.*, 2017) y modula los niveles de citoquinas pro-inflamatorias microgliales (como el TNF- α) y la actividad ROCK (Villar-Cheda *et al.*, 2012; Borrajo *et al.*, 2014a; 2014b; Lopez-Lopez *et al.*, 2021).

El presente estudio se ha centrado en la respuesta microglial inflamatoria mediada por α -syn y, en particular, su posible modulación por antagonistas del receptor AT1. Los resultados muestran que la sobreexpresión de la α -syn neuronal conduce a un aumento de la expresión del receptor AT1 y de la actividad de NOX junto con un aumento de la respuesta inflamatoria microglial hacia el fenotipo pro-inflamatorio.

La observación de la activación de NOX por α -syn es de especial interés para el presente estudio, porque es bien sabido que el eje pro-

inflamatorio del SRA (Ang II/AT1) es un importante activador del complejo NOX en diferentes tipos de células, y, en particular en las células inflamatorias como las microgliales (Zalba *et al.*, 2001, Rodríguez-Perez *et al.*, 2015). Las señales pro-inflamatorias aumentan la expresión y la actividad del receptor AT1 microglial (Miyoshi *et al.*, 2008), y de los receptores de tipo Toll, los cuales participan en la inflamación microglial clásica y, a su vez, pueden interactuar con el receptor AT1 (Daniele *et al.*, 2015, Biancardi *et al.*, 2016).

En consonancia con esto, la administración de los antagonistas del receptor AT1, como el candesartán y el telmisartán, en ratas que sobreexpresan α -syn, condujo a una disminución significativa del número de células microgliales OX6-ir, de la expresión del ARNm del marcador fagocítico, CD68, de la actividad del NOX, de la expresión de los marcadores del fenotipo pro-inflamatorio, así como de la muerte de las neuronas dopaminérgicas inducida por la α -syn.

El candesartán y el telmisartán son los bloqueantes del receptor AT1 más eficaces a la hora de atravesar la BHE, y la administración sistémica a dosis bajas, es capaz de inducir efectos sobre el SRA cerebral en estudios *in vivo* (Gohlke *et al.*, 2002, Unger, 2003) e *in vitro* (Borrajo *et al.*, 2014a, Xu *et al.*, 2015). Además de la inhibición del eje Ang II/AT1/NOX, el candesartán y el telmisartán pueden proteger las neuronas dopaminérgicas por mecanismos adicionales. Los antagonistas del receptor AT1, en particular el telmisartán, pueden conducir a la activación de los receptores PPAR- γ , los cuales tienen función anti-inflamatoria mediante un doble mecanismo que implica un efecto farmacológico agonista para PPAR- γ independiente del receptor AT1 y un efecto directo del bloqueo de la propio receptor AT1, que también induce la activación de PPAR- γ , estableciéndose un mecanismo de retroalimentación positiva (Garrido-Gil *et al.*, 2012, Wang *et al.*, 2014b). La regulación de los niveles de α -syn y factores tróficos (como BDNF y GDNF) también se han sugerido como mecanismos adicionales implicados en la neuroprotección mediada por telmisartán (Sathiyaraj *et al.*, 2013, Tong *et al.*, 2016).

El nivel de muerte neuronal dopaminérgica inducido en el presente modelo es comparable con otros modelos animales que utilizaron

construcciones de vectores AAV eficientes entre las 4 y 5 semanas tras la inyección del vector (Decressac *et al.*, 2012, Van der Perren *et al.*, 2015). En algunos estudios se observó un aumento adicional del 10% en la muerte celular durante las 4 semanas siguientes (Decressac *et al.*, 2012). Sin embargo, los tiempos cortos de lesión (es decir, 1 y 4 semanas después de la inyección) son más adecuados para estudiar los efectos directos de la α -syn en la respuesta microglial, en comparación con las etapas más crónicas o avanzadas. Por tanto, el modelo obtenido presenta las condiciones patológicas para poder ser empleado en el testaje de tratamientos neuroprotectores cuyo mecanismo de acción se centre en la disminución de la respuesta inflamatoria microglial.

Curiosamente en el presente modelo *in vivo*, una inhibición de la respuesta microglial condujo a una disminución significativa en la muerte de neuronas dopaminérgicas, al restablecimiento del metabolismo de la DA nigroestriatal y a una mejora en los problemas motores generados por la sobreexpresión de α -syn

Los resultados presentados revelan que la inhibición de la respuesta inflamatoria microglial es un mecanismo principal involucrado en el efecto neuroprotector de los bloqueantes del receptor AT1, candesartán y telmisartán, en la muerte de células dopaminérgicas inducida por la sobreexpresión de α -syn en el presente modelo animal. Por todo ello, los resultados presentados sugieren el reposicionamiento de tratamientos inhibidores del SRA, como estrategia neuroprotectora en el abordaje terapéutico de la EP. Además, se destaca la importancia de estudiar los mecanismos neuroinflamatorios en los que participa el SRA y que pueden estar implicados en la neurodegeneración dopaminérgica.

5.2. RECEPTORES AT2 CEREBRALES E INFLAMACIÓN

5.2.1. Receptores AT2 cerebrales en inflamación periférica crónica (envejecimiento) y aguda (LPS)

En el presente estudio, se demuestra que los ratones jóvenes AT2KO presentan una alteración en la expresión de diferentes receptores del SRA cerebral y cambios en los niveles de marcadores pro-inflamatorios y pro-oxidativos similares a los observados en ratones WT con inflamación periférica crónica (envejecimiento).

Además, se demuestra una disminución progresiva en la expresión de los receptores AT2 con el envejecimiento en la SN de ratón, que puede dar lugar a un importante desequilibrio de los dos ejes del SRA cerebral.

Los resultados obtenidos sugieren que una disminución inicial en la expresión del receptor AT2 puede desempeñar un papel importante en los efectos relacionados con la inflamación periférica crónica promovida por el envejecimiento asociados con la hiperactividad del receptor AT1. En la SN de ratones se observó que la ausencia del receptor AT2 condujo a un aumento en la expresión del receptor AT1, mientras que en cultivos de células microgliales se observó que la activación de los receptores AT2 condujo a una disminución en los efectos y en la expresión del receptor AT1. Por tanto, se demuestra una contra-regulación de los principales receptores para la Ang II en el SRA cerebral. Además, la supresión de AT2 (AT2KO) también condujo a una disminución de la expresión de ARNm y proteína de otros receptores implicados en el eje anti-inflamatorio y anti-oxidante del SRA, como los receptores Mas. Así mismo, la supresión de AT2 aumenta los niveles de ANG, sustrato de Ang II, lo que puede desembocar en la activación de los receptores AT1 pro-oxidantes. Todos estos cambios conducen a una regulación al alza del eje pro-inflamatorio del SRA. En consonancia con esto, se demuestra que los cambios inflamatorios presentes en ratones envejecidos WT ya se encuentran presentes en ratones jóvenes AT2KO, destacándose la importancia de este receptor en los procesos neuroinflamatorios que cursan en el envejecimiento.

En los últimos años, se han descrito diversos mecanismos del SRA que interactúan de forma recíproca con varios componentes implicados en el envejecimiento, como las sirtuinas (Díaz-Ruiz *et al.*, 2015, 2020), el factor de crecimiento similar a la insulina 1 (Labandeira-García *et al.*, 2016; Rodríguez-Pérez *et al.*, 2016) y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF; Villar-Cheda *et al.*, 2009; Muñoz *et al.*, 2018). La SIRT3 se ha relacionado directamente con la prolongación de la vida útil en humanos (Brown *et al.*, 2013; Ansari *et al.*, 2017), y se observó una disminución de los niveles de SIRT3 en la SN, tanto en animales WT envejecidos, como en ratones

AT2KO, así como tras la activación del eje AT1/NOX (Díaz-Ruiz *et al.*, 2020). El presente trabajo demuestra la estrecha relación entre el receptor AT2 y el envejecimiento.

En el presente estudio, se destaca la importancia del receptor AT2 en el equilibrio de los ejes del SRA y en la inflamación microglial de la región mesencefálica, formada principalmente por el sistema dopaminérgico y encargada del comportamiento motor. Por tanto, se estudió si los cambios del receptor AT2 provocaban un efecto en la regulación de la DA, en la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas, y por consiguiente, en el comportamiento motor.

Los resultados presentados no mostraron cambios significativos en los niveles de DA y metabolitos estriatales, pero sí una ligera disminución significativa de la relación DOPAC/DA que refleja una disminución del reciclaje de DA. Además, no se observó ninguna pérdida significativa de neuronas dopaminérgicas en la SN entre animales WT y AT2KO. Sin embargo, sí se observó una marcada disminución de la expresión estriatal del ARNm del receptor D1 y una reducción de la ratio D1/D2. Esto puede originar una disminución de la vía activadora directa de los núcleos basales, lo que puede provocar una disminución de la actividad motora espontánea (Albin *et al.*, 1989). Nuestros resultados avalan esta hipótesis, al demostrarse una marcada disminución de la actividad motora espontánea en los ratones AT2KO en comparación con los ratones WT, como ya había sido demostrado en estudios anteriores (Hein *et al.*, 1995; Ichiki *et al.*, 1995). Se destaca, por tanto, la importancia de la regulación del receptor D1 por parte del SRA cerebral en el comportamiento motor.

La disminución de la expresión del ARNm del receptor D1 puede estar relacionada con los cambios en la expresión de los receptores AT1 y AT2 en los ratones AT2KO, ya que se han observado interacciones entre los receptores de Ang II y DA en las células que contienen dichos receptores, tanto en tejidos periféricos (Gildea, 2009; Garrido-Gil *et al.*, 2018), como a nivel de los ganglios basales (Villar-Cheda *et al.*, 2014). En los últimos años se han demostrado efectos reguladores opuestos entre los receptores de DA y los receptores AT1 y AT2 en la SN y ST utilizando ratones KO para diferentes receptores de DA (Villar-Cheda

et al., 2014) o cambios en los niveles de DA (Villar-Cheda *et al.*, 2010). Particularmente en el riñón, se han sugerido varios mecanismos que interaccionan entre sí. Se ha demostrado que la activación de los receptores GRKs (Receptores quinasas acoplados a proteína G, del inglés *G protein-coupled receptor kinase*), en particular GRK4, provocan la hiperfosforilación, desensibilización e intercalación del receptor D1, al tiempo que aumentan la expresión del receptor AT1 (Felder y Jose, 2006). El incremento en los niveles de ROS también ha demostrado participar en la inactivación del receptor D1 y la activación del receptor AT1 (Gildea, 2009). La sobreexpresión del receptor AT1 observada en los ratones AT2KO y el aumento de los niveles y de la actividad de la NOX/SO/ROS pueden explicar la desregulación de D1. Recientemente, también se han informado mecanismos de transregulación directa entre los receptores D1/AT2, ya que la activación de GαS del receptor D1 estimula el enzima adenilil-ciclasa e induce el reclutamiento de AT2 en la membrana plasmática apical (Gildea *et al.*, 2019). Curiosamente, se ha observado que la DA, a través de la señalización del receptor D1, previene la neuroinflamación dependiente del inflammasoma NLRP3 (Yan *et al.*, 2015), lo que también es consistente con los cambios pro-inflamatorios observados en los ratones AT2KO y la disminución de los marcadores inflamatorios inducida por los receptores AT2 en cultivos celulares. Además, en otros estudios, se han demostrado diferentes cambios conductuales en los ratones AT2KO, como la reducción de la capacidad exploratoria, el aumento del miedo o la hipoalgesia (Ichiki *et al.*, 1995), y la desregulación de la neurotransmisión en otras áreas cerebrales que también pueden estar implicadas en la disminución observada en la actividad motora espontánea.

5.2.2. Receptores AT2 y degeneración dopaminérgica

Los resultados presentados muestran que la interacción de los receptores AT1/AT2 microgliales desempeña un papel importante en la respuesta inflamatoria microglial. La activación de los receptores AT2 con CGP-42112A condujo a una marcada inhibición del aumento de los marcadores pro-inflamatorios inducidos por el tratamiento de LPS. La activación de los receptores AT2 microgliales también bloqueó el

aumento, inducido por LPS, de la expresión del ARNm del receptor AT1, mientras que el bloqueo de los receptores AT1 con ZD-7155 inhibió el aumento, inducido por LPS, de los marcadores pro-inflamatorios. Curiosamente, el LPS indujo una disminución de la expresión de ARNm del receptor AT2 y un marcado aumento de la expresión de ARNm y proteína de AT1 en las células microgliales. En consonancia con esto, observamos que la microglía de los ratones AT2KO mostraba una mayor expresión de ARNm AT1, tanto en los cultivos microgliales primarios como en la microglía obtenida de cerebros adultos. Por lo tanto, parece que, en condiciones basales, los receptores microgliales AT2 pueden estar regulando a la baja la expresión del receptor microglial AT1, lo que explica por qué varios autores informaron de niveles bajos o de una expresión de AT1 indetectable en la microglía en reposo (Miyoshi *et al.*, 2008). Sin embargo, estímulos pro-inflamatorios, como el LPS, pueden regular a la baja los receptores AT2 y desencadenar el aumento de la expresión de AT1 y, junto con otros mecanismos, también aumentar la respuesta inflamatoria.

Los resultados presentados revelan un papel importante de los receptores AT2 microgliales en la regulación de la expresión del receptor AT1 y sus efectos pro-inflamatorios. Además, se ha demostrado que la señalización AT2/NO/GMPc interviene en la regulación de la expresión del ARNm del receptor AT1 a través de la regulación a la baja de la actividad del factor de transcripción Sp1 (Figura 50) pero no de Sp3 en las células microgliales. En células periféricas, la activación del receptor AT2 también induce un aumento de los niveles de NO y GMPc a través de vías dependientes o independientes de la bradicinina (Yan *et al.*, 2003; Zhao *et al.*, 2005; Padia y Carey, 2013). Se ha demostrado que Sp1 y Sp3, miembros de la familia de factores de transcripción Sp, desempeñan un papel importante en la regulación de la actividad del promotor génico del receptor AT1 en células periféricas (Zhao *et al.*, 2001; Elton y Martin, 2007), aunque Sp3 puede estar especialmente implicado en la regulación de la expresión del AT1 humano (Elton y Martin, 2007). Además, se ha observado que el NO disminuye la unión de Sp1 a varios genes (Sellak *et al.*, 2002).

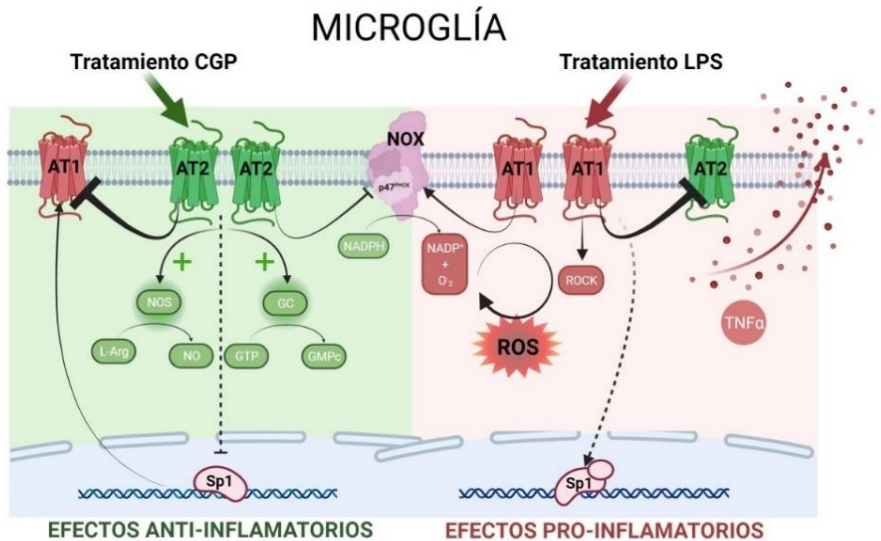


Figura 50. Representación esquemática de las rutas moleculares que participan en la regulación de los receptores AT1 y AT2 en células microgliales. A la izquierda, se ilustra cómo el tratamiento del agonista del receptor AT2, CGP, aumenta la regulación positiva mediada por AT2 en las enzimas antioxidantes NOS y GC, así como la regulación negativa del factor de transcripción de Sp1 y el complejo enzimático NOX. Estos mecanismos conducen a una regulación de la expresión positiva para el receptor AT2 y negativa para el receptor AT1 (mediante el factor de transcripción Sp1), así como un aumento de las señales anti-inflamatorias. A la derecha, el tratamiento con LPS (inflamación aguda) produce una regulación de la expresión negativa para receptores AT2 y positiva para los receptores AT1, los cuales aumentan la actividad de NOX, de ROCK y del factor de transcripción Sp1, lo que genera un círculo de retroalimentación positiva en la generación de ROS y liberación de citoquinas pro-inflamatorias, como TNF α y un aumento en la expresión del receptor AT1. Abreviaturas: AT1, receptor de angiotensina tipo 1; AT2, receptor de angiotensina tipo 2; NOX, NADPH-oxidasas; ROS, especies reactivas de oxígeno; TNF- α : factor de necrosis tumoral; NOS, óxido nítrico sintetasa; NO, óxido nítrico; GC, guanilato ciclasa; GTP, guanosín trifosfato; GMPc, guanosín monofosfato cíclico; L-Arg, L-arginina. Esquema de elaboración propia por www.biorender.com

Curiosamente, en el presente trabajo se ha observado que la interacción entre los receptores AT2 y Mas está implicada en la regulación de la expresión de AT1 por parte de los receptores AT2 microgliales. Sin embargo, las interacciones AT1/AT2 probablemente sean más complejas. Además de los mecanismos presentados en este trabajo, se han implicado otras vías en la señalización del receptor AT2 en distintos tipos de células, como la activación de varias proteínas de

actividad fosfatasa y la estimulación de la fosfolipasa A2, que conduce a la liberación de ácido araquidónico (Nouet y Nahmias, 2000; Steckelings *et al.*, 2005). El NO también puede inhibir la actividad de NOX mediante la nitrosilación de su subunidad p47phox (Selemidis *et al.*, 2007), y un exceso de SO derivado del NADPH puede reducir los niveles de NO (Herbert *et al.*, 2008). Además, los heterodímeros del receptor AT1/AT2, que se han observado en varios tipos de células y condiciones experimentales, también pueden regular los efectos del receptor AT1 (AbdAlla *et al.*, 2001; Patel y Hussain, 2018; Rivas-Santisteban *et al.*, 2020). Sin embargo, actualmente sigue sin conocerse si estos mecanismos mencionados también están implicados en las interacciones de los receptores AT1/AT2 de las células microgliales. Además, varios estudios han informado de la existencia de interacciones recíprocas entre los receptores Toll like receptor de tipo 4 (TLR-4) y AT1, posiblemente como resultado de presentar vías de transducción de señales comunes (Wolf *et al.*, 2006; Biancardi *et al.*, 2016). Sin embargo, aún no se ha investigado el posible papel de los receptores AT2 en estas interacciones. Por ello, los resultados que se presentan en este trabajo pueden explicar diversos resultados controvertidos sobre las interacciones de los receptores de Ang II y la diversidad de sus efectos en función del tipo celular y las condiciones experimentales.

5.2.3. Receptores AT2 en células microgliales. Neuroinflamación. Dimorfismo sexual

Los resultados presentados confirman la expresión de los receptores AT2 en microglía aislada de cerebros de ratón adultos sanos, aunque la expresión es mucho menor en machos que en hembras, y la ovariectomía no cambió significativamente esta diferencia. En las secciones de tejido, también se confirmó la presencia de receptores AT2 en la microglía de cerebros sanos utilizando la técnica de hibridación *in situ* de RNAscope, lo que es consistente con estudios previos utilizando inmunohistoquímica (Joglar *et al.*, 2009; Garrido-Gil *et al.*, 2013). Sin embargo, otros estudios no encontraron los receptores AT2 en la microglía de ratón (de Kloet *et al.*, 2016), o se sugirió que eran indetectables en microglía sana y que estaban regulados al alza en

procesos neuroinflamatorios (Jackson *et al.*, 2018). Estas discrepancias se deben, probablemente, al uso de diferentes modelos animales, de roedores machos (donde la expresión del receptor es muy baja) y de métodos experimentales empleados que presentan diferente sensibilidad de detección del receptor AT2. En el presente trabajo se demuestra la expresión del receptor AT2 en células microgliales con el uso de una técnica de hibridación *in situ* con RNAscope, que utiliza un diseño de sondas altamente específicas y con un sistema de amplificación implementado diseñado para la detección de transcritos de muy baja expresión, convirtiéndola en una técnica altamente sensible y específica.

Estudios previos han demostrado que las células microgliales presentan diferencias de sexo e, inicialmente, estas diferencias se relacionaron con los efectos de las hormonas gonadales circulantes sobre la microglía, en particular, sobre el inflammasoma microglial (Habib y Beyer, 2015). Las células microgliales responden a tratamientos *in vitro* con esteroides gonadales y se observaron cambios en las respuestas neuroinflamatorias o neurodegenerativas después de las ovariectomías (Rodríguez-Perez *et al.*, 2011, 2012; Acosta-Martinez, 2020). Sin embargo, una serie de estudios recientes han revelado que otros factores, más difíciles de identificar en los estudios clásicos *in vitro*, también pueden determinar una microglía sexualmente dimórfica. Así, se ha demostrado que la microglía puede mantener una diferencia de expresión génica relacionada con el sexo y en ausencia de esteroides sexuales circulantes (Villa *et al.*, 2018). Inicialmente, se ha sugerido que las hormonas pueden actuar durante etapas muy tempranas del desarrollo del cerebro, lo que lleva a cambios permanentes relacionados con el sexo en la microglía (Hanamsagar *et al.*, 2017; Villa *et al.*, 2016). Sin embargo, un número cada vez mayor de estudios recientes se centra en la acción primaria de genes ubicados en los cromosomas sexuales, por lo que las hormonas pueden considerarse como el factor secundario más importante después de los efectos primarios de los cromosomas sexuales (Arnold, 2020). La inactivación del cromosoma X es una característica epigenética principal en el sexo femenino. Sin embargo, la inactivación incompleta del cromosoma X puede dar lugar a una doble expresión de algunos genes y mosaicismos

femeninos (es decir, aproximadamente la mitad de las células activan el X materno y la mitad el X paterno, lo que conduce a una mayor plasticidad y adaptabilidad en las respuestas) (Tukiainen *et al.*, 2017; Syrett y Anguera, 2019). La mayoría de estos genes se encuentran en la región Xq, que es la región evolutiva más antigua del cromosoma (Ross *et al.* 2005). Curiosamente, el gen del receptor AT2 se encuentra en el cromosoma X, y particularmente en el Región Xq23 (de Gasparo *et al.* 2000). Estudios previos han demostrado que el AT2 se encuentra sobreexpresado en varios tejidos en ratones hembra (Rodríguez-Pérez *et al.* 2011; Garrido-Gil *et al.*, 2021) pero este aumento no había sido estudiado en células de microglía *in vivo*.

También se observó que la expresión microglial de la citoquina anti-inflamatoria IL-10 y de las citoquinas pro-inflamatorias IL-1 β e IL-6 es diferente en la microglía de machos y hembras, independiente de las hormonas gonadales femeninas circulantes. Sin embargo, estas diferencias desaparecieron en ratones AT2KO, revelando el papel de las diferencias relacionadas con el sexo en la expresión de AT2 (baja expresión en machos y mayor expresión en hembras) en los niveles de expresión microglial de IL-10, IL-1 β e IL-6. IL-10 es una citoquina anti-inflamatoria clave, que inhibe la liberación de citoquinas pro-inflamatorias y estimula las respuestas anti-inflamatorias que conducen a la neuroprotección (Lobo-Silva *et al.*, 2016; Fouda *et al.*, 2017; Khoroshi *et al.*, 2020). La IL-10 se ha considerado un factor clave para equilibrar la respuesta inmune en el cerebro (Lobo-Silva *et al.*, 2016). En diferentes tipos de células, la activación del receptor AT2 induce la producción de IL-10, que aparece ser la citoquina dominante que media la respuesta anti-inflamatoria inducida por AT2 y la disminución de las citoquinas pro-inflamatorias (Dhande *et al.*, 2015; Khoroshi *et al.*, 2020). IL-10 inhibe la producción de IL-1 β e IL-6 a través de varios mecanismos, incluida la inhibición de la expresión de pro-IL-1 β y de los componentes del inflammasoma NLRP3 (Greenhill *et al.*, 2014). Sin embargo, otros mecanismos independientes del aumento de IL-10 también pueden determinar la asociación observada entre un aumento en la expresión microglial de AT2 y una disminución en la expresión de IL-1 β e IL-6.

En conclusión, los resultados confirman que el sexo del paciente no puede ser ignorado al tomar decisiones terapéuticas con los tratamientos que regulan el SRA, ya que puede afectar el resultado de los procesos asociados a la neuroinflamación. Las diferencias de sexo en las respuestas neuroinflamatorias pueden ser moduladas sinérgicamente por factores hormonales y ambientales. Sin embargo, se sabe que un número considerable de genes relacionados con el sistema inmunitario se encuentran en el cromosoma X, lo que también puede influir en las diferencias de sexo en la respuesta neuroinflamatoria, como se observa para el receptor AT2 en el presente estudio.

5.3. RECEPTORES DE ANGIOTENSINA EN INFLAMACIÓN PERIFÉRICA CRÓNICA DEL SÍNDROME METABÓLICO (METS). IMPLICACIÓN EN LA NEURODEGENERACIÓN DOPAMINÉRGICA

5.3.1. Activación del eje pro-inflamatorio mediado por receptores AT1 en la sustancia nigra de animales con MetS. Vulnerabilidad a degeneración dopaminérgica en MetS

Los resultados de la presente tesis muestran que la inflamación periférica crónica inducida por MetS aumenta significativamente la vulnerabilidad de las neuronas dopaminérgicas a la degeneración. El modelo de MetS promueve una regulación al alza de las expresión de componentes y receptores del eje pro-inflamatorio del SRA cerebral que, a su vez, aumenta el estrés oxidativo y la neuroinflamación, e incrementa la muerte neuronal dopaminérgica. Todo ello puede inhibirse mediante el tratamiento con el antagonista del receptor AT1, candesartán, lo que destaca la importancia del receptor AT1 en el efecto del MetS sobre la neurodegeneración.

Un importante número de estudios experimentales y clínicos han relacionado el MetS (Zhang y Tian, 2014; Leehey *et al.*, 2017; Nam *et al.*, 2018; Park *et al.*, 2021) y/o cada uno de los componentes que lo definen, como la obesidad (Hu *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2014), la diabetes (Labandeira *et al.*, 2021), la hipercolesterolemia (Hu *et al.*, 2008) y la hipertensión (Chen *et al.*, 2019) con un mayor riesgo de EP. Aunque también se han encontrado hallazgos controvertidos en esta

relación patológica (Saaksjarvi *et al.*, 2015), nuestros resultados demuestran que animales con MetS presentan un aumento en la vulnerabilidad dopaminérgica, en la que se encuentran implicados los componentes y receptores cerebrales del SRA. Curiosamente, un estudio muy reciente revela que la expresión del gen del receptor AT1 es un marcador de la vulnerabilidad de las neuronas dopaminérgicas afectadas en la EP (Kamath *et al.*, 2022; Labandeira-Garcia y Parga, 2022). En consonancia con esto, estudios recientes también han observado una disminución del riesgo de EP en pacientes tratados con antagonistas de los receptores AT1 (Jo *et al.*, 2022; Lin *et al.*, 2022). De esta manera, la sobreactivación de los receptores AT1 puede ser una de las explicaciones de la implicación del MetS en la vulnerabilidad dopaminérgica.

5.3.2. Aumento de citoquinas circulantes, 27-OHC y autoanticuerpos (AA) frente a receptores del SRA en un modelo animal de MetS

La inflamación periférica crónica del MetS también provocó el aumento de los niveles circulantes de LIGHT y otras citocinas pro-inflamatorias importantes (IL-17, IL-6, IL-1 β , TNF- α), junto con un aumento de los niveles de 27-OHC. Además, las ratas con MetS mostraron un aumento significativo en los niveles séricos de AT1-AA y ACE2-AA, que se correlacionaron con los niveles de varios parámetros de factores que definen el MetS como el colesterol, la glucosa y los triglicéridos, y con los niveles séricos de varias de las principales citocinas pro-inflamatorias y 27-OHC.

También se encontraron niveles elevados de AT1-AA y ACE2-AA en el LCR de ratas MetS respecto al grupo control, lo que sugiere que (1) los autoanticuerpos circulantes pueden atravesar la BHE o (2) que las células B activadas pueden atravesar la BHE, migrar al compartimento intratecal y mediar una expansión clonal que conduce a la síntesis intratecal de los autoanticuerpos. El aumento en la permeabilidad de la BHE, que puede permitir el paso de los autoanticuerpos y/o células B, se confirmó con la medición de la extravasación del colorante Evans Blue, y es consistente con estudios previos que muestran que la activación de los receptores AT1 de las

células endoteliales de la BHE (en este caso mediada por los AT1-AA) constituye un paso inicial y clave para la disrupción de la misma (Fleegal-DeMotta *et al.*, 2009; Setiadi *et al.*, 2018) (Figura 51).

Aunque los mecanismos responsables de la generación de AT1-AA no están claros, el aumento de los niveles séricos de citoquinas en MetS pueden estar involucrados. La infusión de citoquinas pro-inflamatorias como IL-6 o TNF- α provocó un aumento en los niveles de AT1-AA en modelos animales, lo que sugiere que algunas de las citoquinas relacionadas con la inflamación pueden estar involucradas a la generación de autoanticuerpos (Irani *et al.*, 2010; LaMarca *et al.*, 2011). Además, el aumento de los niveles de LIGHT también se ha visto implicado en la generación de AT1-AA. Este mecanismo implica al enzima transglutaminasa tisular 2 (TG2), la cual es capaz de modificar a los receptores AT1 (Liu *et al.*, 2015). Los receptores AT1 modificados pueden actuar como neoantígenos e inducir la producción de AT1-AA (Liu *et al.*, 2017a). De acuerdo con esto, observamos una correlación positiva entre los niveles de LIGHT y AT1-AA en ratas con MetS. Además, se sabe que LIGHT induce respuestas pro-inflamatorias y promueve la producción de otras citoquinas estableciéndose una retroalimentación positiva (Herro y Croft, 2016). También se ha sugerido que la producción de AT1-AA se potencia en procesos que aumentan la muerte de las células generando desechos con abundantes receptores AT1 modificados, que pueden actuar como autoantígenos para las células B (Ludwig *et al.*, 2017; Cabral-Marques *et al.*, 2019) y esto también puede ocurrir con células de diferentes tejidos en MetS (Eguchi y Feldstein, 2014; Gautheron *et al.*, 2020).

Los mecanismos responsables de la producción de ACE2-AA son menos conocidos que los de AT1-AA. De hecho, hasta ahora, solo unos pocos estudios han informado sobre la regulación positiva de ACE2-AA en suero de pacientes con enfermedades inflamatorias periféricas (Takahashi *et al.*, 2010; Miziolek *et al.*, 2021). Se ha sugerido que, un aumento de la proteína ECA2 soluble puede potenciar la generación de neoantígenos para la producción de ACE2-AA (Townsend, 2020; McMillan *et al.*, 2021; Rodriguez-Perez *et al.*, 2021) (Figura 51). Además, como en el caso de los AT1-AA y otros receptores acoplados

a proteínas G, los neoantígenos se pueden formar a partir de restos celulares que contienen ECA2 (Negi y Das, 2020; Sun *et al.*, 2020). Sin embargo, los niveles incrementados de ECA2 soluble pueden deberse al desprendimiento de la proteína de su forma transmembrana. El desprendimiento de ECA2 es producido por las proteasas ADAM17 y TMPRSS2, actualmente muy estudiadas en los mecanismos relacionados con la infección por SARS-CoV-2 (Hoffmann *et al.*, 2020). Curiosamente, diversos estudios han demostrado que la estimulación del receptor AT1 aumenta la actividad de ADAM17 y TMPRSS2, lo que conduce a un aumento del desprendimiento de la proteína ECA2 (Deshotels *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2017) y, posiblemente, a una consecuente generación de ACE2-AA. Consistente con esta hipótesis, los resultados presentados en este trabajo demuestran una correlación entre los niveles de AT1-AA y ACE2-AA en ratas con MetS ($r = 0,670$, $P = 0,0171$). Sin embargo, son necesarios estudios más específicos sobre los mecanismos responsables de la producción de ACE2-AA.

Por otro lado, en el modelo animal de inflamación periférica crónica inducida por el MetS se observó una correlación positiva y significativa entre los niveles de AT1-AA y ACE2-AA con el colesterol sérico y con su metabolito 27-OHC. Se ha sugerido que los efectos nocivos de la hipercolesterolemia sobre la disfunción cognitiva y la neurodegeneración pueden estar mediados por un aumento del flujo del 27-OHC a través de la BHE (Bjorkhem *et al.*, 2009; Loera-Valencia *et al.*, 2019). Sin embargo, el flujo a través de la BHE es dependiente de su permeabilidad y disrupción, por lo que un factor circulatorio desconocido y correlacionado con los niveles de 27-OHC circulantes puede estar aumentando la permeabilidad de la BHE (Parrado-Fernandez *et al.*, 2021). Los resultados de la presente tesis sugieren que los AT1-AA circulantes pueden constituir el factor aún desconocido que aumenta la permeabilidad de la BHE, ya que se observó una fuerte correlación de los niveles de autoanticuerpos con los de colesterol y 27-OHC en ratas con MetS. Además, estudios previos han sugerido que el SRA cerebral puede mediar los efectos nocivos del 27-OHC (Mateos *et al.*, 2011).

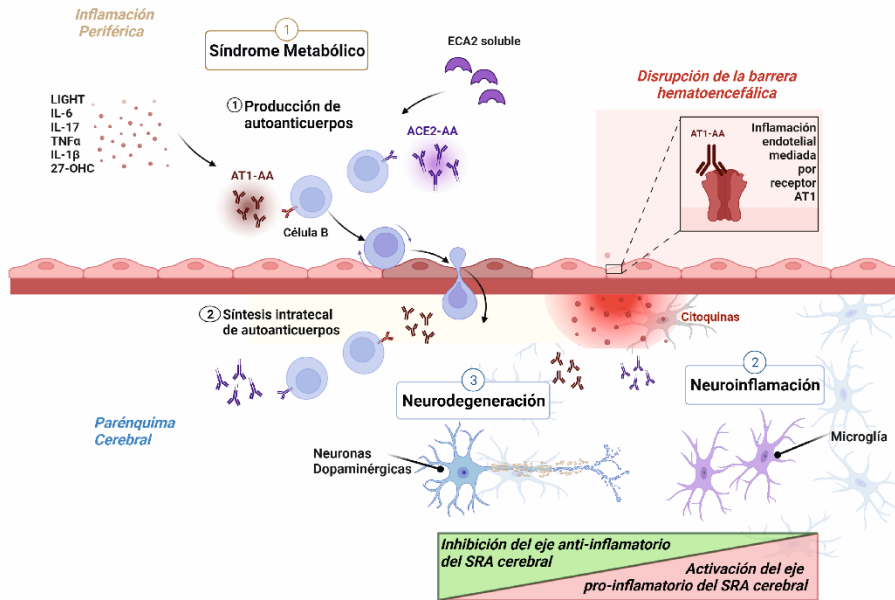


Figura 51. Representación esquemática del efecto de la inflamación periférica crónica por MetS en los receptores del SRA y su implicación en neuroinflamación y neurodegeneración dopaminérgica. La inflamación periférica mediada por MetS, provoca un aumento de citoquinas pro-inflamatorias, que pueden activar la producción de AT1-AA, y un aumento de ECA2 soluble, que puede activar la producción de ACE2-AA. Los AT1-AA circulantes pueden activar los receptores AT1 de las células endoteliales de la BHE y provocar estrés oxidativo e inflamación, que desemboca en la disrupción de la BHE y un aumento de su permeabilidad. Este aumento permite el paso de células B activadas que pueden producir síntesis intratecal de autoanticuerpos, así como el paso de autoanticuerpos circulantes y de mediadores pro-inflamatorios, que aumentan la expresión de receptores pro-inflamatorios y disminuye la expresión de receptores anti-inflamatorios del SRA cerebral, desembocando en neuroinflamación y, finalmente, en neurodegeneración dopaminérgica. Abreviaturas: AT1-AA, autoanticuerpos agonistas del receptor de angiotensina tipo 1; ACE2-AA, autoanticuerpos frente al enzima convertora de angiotensina II; AT1, receptor de angiotensina tipo 1; ECA2, enzima convertora de angiotensina II; LIGHT, miembro 14 de la superfamilia del factor de necrosis tumoral; TNF- α , factor de necrosis tumoral; IL-1 β , interleucina 1 β ; IL-17, interleucina 17; IL-6, interleucina 6; 27-OHC, 27-hidroxicolesterol. Esquema de elaboración propia con www.biorender.com

5.3.3. Efectos de la infusión intraperitoneal crónica de AT1-AA sobre el SRA cerebral y la vulnerabilidad dopaminérgica

Los posibles efectos de los autoanticuerpos circulantes sobre la degeneración dopaminérgica se confirmaron mediante la infusión intraperitoneal crónica de AT1-AA, que indujo un aumento en la expresión de receptores pro-inflamatorios del SRA en la sustancia negra, un aumento en la respuesta inflamatoria microglial y un aumento significativo de la muerte de las neuronas dopaminérgicas en un modelo animal de EP basado en la sobreexpresión de α -syn-A53T.

Además del efecto agonista de los AT1-AA sobre el receptor AT1, también se ha demostrado que estabilizan al receptor en su forma activa y aumenta su expresión al bloquear su internalización celular, lo que provoca una mayor activación del eje pro-inflamatorio del SRA (Liu *et al.*, 2015, 2019).

Niveles séricos incrementados de AT1-AA se han relacionado previamente con varias enfermedades como la preeclampsia (Wallukat *et al.*, 1999), rechazo del injerto renal (Dragun *et al.*, 2005) y en otras enfermedades periféricas relacionadas con la inflamación, como la hipertensión maligna (Fu *et al.*, 2000), el aldosteronismo primario (Meyer *et al.*, 2020) y esclerosis múltiple (Gunther *et al.*, 2014).

Los niveles incrementados de AT1-AA observados en procesos inflamatorios crónicos periféricos, como el MetS, pueden actuar sobre los receptores AT1 endoteliales de la BHE, provocando su disrupción y permitiendo su paso hacia el parénquima cerebral, donde activarían los receptores AT1 de las células microgliales y dopaminérgicas, provocando un aumento en la hiperactivación del eje pro-inflamatorio del SRA, y los consecuentes mecanismos de neuroinflamación y neurodegeneración como muestran los resultados de la presente tesis. Además, estos mecanismos pueden ser inhibidos por los antagonistas de del receptor AT1.

5.4. RECEPTORES DE ANGIOTENSINA EN LA INFLAMACIÓN PERIFÉRICA AGUDA DEL COVID-19

5.4.1. Efecto de tratamientos moduladores del SRA sobre receptores de angiotensina en el tejido pulmonar de ratas adultas jóvenes

En la inflamación periférica aguda desencadenada por la infección de SARS-CoV-2, también está implicado el SRA, y se generó un debate sobre el uso, perjudicial o beneficioso, de determinados tratamientos como ARAII, IECAs y otros tratamientos que modulan el SRA y sus receptores (como el ibuprofeno), sobretodo en pacientes de mayor vulnerabilidad a la gravedad por COVID-19 (envejecimiento y MetS). El uso de tratamientos moduladores del SRA, así como condiciones de inflamación periférica aguda, podrían ocasionar cambios importantes en la expresión de ECA2 pulmonar, y en otros receptores del SRA. Por un lado, un aumento de la expresión de ECA2 en la superficie celular podría dar lugar a una regulación positiva hacia el eje anti-inflamatorio del SRA, pero, por otro lado, podría facilitar la entrada de SARS-CoV-2 (Yan *et al.*, 2020; Wu *et al.*, 2021; Labandeira-Garcia *et al.*, 2022).

Así, hasta la fecha, diversos estudios habían demostrado que los tratamientos que modulan el SRA, como los ARAII y los IECAs, regulaban la expresión de ECA2 pulmonar. Sin embargo, no se había dilucidado si aumentaban o disminuían sus niveles de expresión (Ferrario *et al.*, 2005, Mancina *et al.*, 2020; Sommerstein *et al.*, 2020; Su *et al.*, 2020). Otros estudios habían demostrado que los tratamientos con AINEs, como el ibuprofeno, tenían un efecto en la expresión de diversos componentes y receptores del SRA, incluido el ECA2 (Moore *et al.*, 2020). Concretamente, se había considerado que la influencia del ibuprofeno sobre el SRA ocurría mediante el enzima COX-2 en diversos tejidos (Wu *et al.*, 2005). Sin embargo, aún no se había descrito esta relación en el tejido pulmonar y, por tanto, cómo podría afectar a la infección de SARS-CoV-2.

Los resultados obtenidos en los experimentos realizados *in vivo* durante el transcurso del presente trabajo muestran que un ARAII, candesartán, un IECA, captopril, y un anti-inflamatorio no esteroideo,

ibuprofeno, regulan al alza la expresión de ECA2 en tejido pulmonar de ratas jóvenes control, junto con la regulación al alza de otros receptores principales del eje anti-inflamatorio y antioxidante del SRA, como los receptores AT2 y Mas. Además, el tratamiento con ibuprofeno inhibió el eje pro-inflamatorio del SRA, disminuyendo la expresión del receptor AT1. Todo ello sugiere que, el uso de estos tratamientos potencia la expresión de componentes y receptores del eje anti-inflamatorio del SRA pulmonar promoviendo así, respuestas anti-inflamatorias, antifibróticas y antitrombóticas que pueden contribuir a una evolución más favorable del paciente que padece COVID-19.

5.4.2. Efecto de tratamientos moduladores del SRA sobre receptores de angiotensina en tejido pulmonar de modelos animales de inflamación crónica especialmente vulnerables a COVID-19: MetS y envejecimiento.

En los resultados presentados en apartados anteriores se observa que la expresión y actividad de los receptores del SRA cerebral sufren cambios relevantes en condiciones de inflamación crónica, como son el MetS y el envejecimiento, y de inflamación aguda, por LPS. En base a esto, es probable que la expresión y actividad de los receptores del SRA pulmonar también presente cambios durante procesos inflamatorios agudos como la infección por SARS-CoV-2 y que el efecto de los tratamientos como los ARAII, IECA o AINEs, sea diferente a los observados en modelos sin inflamación. Además, el efecto de estos tratamientos en la infección por SARS-CoV-2 es especialmente relevante en los grupos de pacientes que son más vulnerables a la COVID-19: personas de edad avanzada, hipertensas, diabéticas y/u obesas (Wang *et al.*, 2008b; Guan *et al.*, 2020; Labandeira-Garcia *et al.*, 2022), muchas de las cuales toman tratamientos moduladores del SRA, como los ARAII y los IECAs.

Todo lo expuesto pone de manifiesto la importancia de demostrar los mecanismos a través de los cuales estos tratamientos modulan la expresión y actividad de receptores del SRA en el tejido pulmonar. Los resultados obtenidos muestran que el efecto de estos tratamientos era más pronunciado en ratas con MetS (obesidad, hiperglucemia y aumento de la presión arterial) y en ratas envejecidas. Estos modelos,

que representan a una población de pacientes más vulnerables a la infección por COVID-19, presentaron una disminución significativa de los niveles de expresión de ECA2 pulmonar junto con una disminución de la expresión de los receptores del eje anti-inflamatorio (receptores AT2 en las ratas con MetS y receptores AT2 y Mas en las ratas envejecidas), y un aumento significativo en la expresión de los receptores AT1, lo que reveló un claro desequilibrio hacia el eje pro-inflamatorio del SRA pulmonar.

Curiosamente, el tratamiento con candesartán, captopril o ibuprofeno provocó un desplazamiento hacia el eje anti-inflamatorio del SRA pulmonar al inducir un aumento significativo en la expresión de ECA2, AT2 y MasR, y una disminución de la expresión del receptor AT1. La expresión de los receptores del eje pro-inflamatorio (AT1) se redujo a los niveles de los controles jóvenes sanos, mientras que la expresión de los receptores del eje anti-inflamatorio, como los receptores AT2 y, en particular los receptores Mas, aumentó a niveles superiores de las ratas jóvenes (no tratadas). En el tejido pulmonar de animales con MetS también se observó un aumento en los niveles de Ang II y una disminución de los niveles de Ang(1-7). Estos resultados están en consonancia con el aumento de los receptores AT1 y una disminución de ECA2, respectivamente. Curiosamente, el tratamiento con ibuprofeno produjo una disminución de los niveles de Ang II y un aumento de los niveles de Ang(1-7) con respecto a animales control (no tratados). Estos resultados están en consonancia con estudios previos que mostraron que el enzima COX-2 aumentaba la liberación de renina y la formación de Ang II, provocando un aumento de la presión arterial (Quadri *et al.*, 2016).

En conjunto, los resultados obtenidos sugieren que, en clínica, el tratamiento con estos fármacos puede reducir la vulnerabilidad de los pacientes de edad avanzada y de los pacientes con MetS, incluso por debajo de los niveles de pacientes sanos, al menos en lo relacionado con la desregulación de los receptores del SRA en el tejido pulmonar.

Es importante destacar que, con frecuencia, se asume que los cambios en los niveles de ECA2 son responsables del desequilibrio entre los dos ejes del SRA, lo que podría provocar grandes

consecuencias en la progresión de la gravedad de la COVID-19 (Labandeira-Garcia *et al.*, 2022). En el caso del envejecimiento y el MetS, la disminución de los niveles de ECA2 pulmonar puede ser la causa o, probablemente, la consecuencia de la desregulación de otros componentes y receptores del SRA. Por ejemplo, en los cerebros de ratas envejecidas la desregulación de los receptores del SRA puede estar relacionada con la desregulación inicial de otros factores como las sirtuinas o el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1) (Rodríguez-Perez *et al.*, 2016; Muñoz *et al.*, 2018), tal y como se ha discutido en apartados anteriores. En la enfermedad por COVID-19, la desregulación observada en el envejecimiento y en el MetS se ve incrementada (y, probablemente, más difícilmente compensada) por la unión de SARS-CoV-2 a ECA2. En cualquier caso, los resultados presentados indican que la desregulación puede ser contrarrestada por el tratamiento con candesartán, captopril o ibuprofeno. Sin embargo, esta regulación puede verse afectada cuando se produce la unión del SARS-CoV-2 al ECA2. A fin de dilucidar esta cuestión, se realizaron diferentes experimentos *in vitro*, discutidos en el siguiente apartado.

5.4.3. Efecto de tratamientos moduladores del SRA sobre receptores de angiotensina en modelos *in vitro* de infección pulmonar por SARS-CoV-2.

Los experimentos *in vivo* demuestran que el tratamiento con candesartán, captopril e ibuprofeno aumentan la expresión de ECA2 y otros componentes anti-inflamatorios del SRA en el tejido pulmonar. Sin embargo, este efecto puede no ser beneficioso cuando existe una infección por SARS-CoV-2. Es por ello que, estudios recientes han considerado al ECA2 como un arma de doble filo (South *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2020; Yan *et al.*, 2020). Sin embargo, los resultados presentados en este trabajo, obtenidos de los experimentos *in vitro*, sugieren que estos tratamientos pueden, incluso, disminuir la entrada viral a pesar de incrementar la expresión de ECA2.

Después de que el SARS-CoV-2 se una al ECA2, el virus entra en la célula huésped utilizando dos posibles mecanismos: endocitosis y fusión de la membrana celular. El primero es uno de los principales mecanismos de entrada del virus (Wang *et al.*, 2008a; Inoue *et al.*, 2007;

Wang *et al.*, 2008b; Bian y Li, 2021) y se produce tras la unión de la proteína Spike al ECA2 transmembrana. Esta unión desencadena el proceso de endocitosis y se produce la traslocación tanto de ECA2 como de la proteína Spike desde la superficie celular a la vía endosomal (Wang *et al.*, 2008a; Wang *et al.*, 2008b; Bian y Li, 2021). Estos mecanismos se observaron en experimentos que utilizaron la proteína Spike y en otros en los que utilizaron pseudovirus de la proteína Spike (Wang *et al.*, 2008a), lo que sugiere que, el tratamiento de las células sólo con proteína Spike es un modelo fiable para estudiar los efectos de los fármacos en los mecanismos de entrada del SARS-CoV-2.

En consonancia con lo observado en los experimentos *in vivo*, el tratamiento de los cultivos de neumocitos tipo II con candesartán, captopril o ibuprofeno inducía una regulación al alza de la expresión de ECA2 transmembrana. El tratamiento con la proteína Spike inducía una disminución de los niveles celulares de la ECA2 de longitud completa (es decir, transmembrana), que era inhibida por el pre-tratamiento con los fármacos mencionados. El resultado obtenido puede ser explicado por la regulación positiva de la expresión de ECA2 inducida por los fármacos, tal y como se demuestra en los resultados presentados de los experimentos *in vivo* e *in vitro*. Otros estudios también han demostrado la existencia de diversos mecanismos implicados en el aumento de ECA2 transmembrana por inducción de los fármacos aquí estudiados. Así, se ha sugerido que el ECA2 y los receptores AT1 pueden formar heterodímeros en la membrana plasmática, y que, los niveles elevados de Ang II disminuyen la actividad de la ECA2 a través de la internalización, dependiente de AT1, de dicha enzima. Es por ello que, este mecanismo puede ser regulado por el tratamiento con ARAII (Deshotels *et al.*, 2014; Portales *et al.*, 2022). El tratamiento con candesartán reduce los niveles de Ang II, que conduce a la reducción de la internalización de ECA2 transmembrana y, por tanto, de la proteína Spike (Figura 52).

Sin embargo, los resultados obtenidos sugieren que también están implicados otros mecanismos de interacción entre el SARS-CoV-2/proteína Spike y el SRA pulmonar. Se observó que el tratamiento con la proteína Spike inducía un aumento de los niveles de ECA2 soluble

en el medio de cultivo. Este resultado es consistente con estudios anteriores que muestran que la unión del virus o la proteína Spike al ECA2 de la superficie celular induce el desprendimiento del ectodominio del receptor, disminuyendo los niveles de ECA2 en la superficie celular y promoviendo la internalización del virus/proteína Spike (Lambert *et al.*, 2005; Haga *et al.*, 2008, 2010; Jia *et al.*, 2009). Otros estudios han demostrado que, en condiciones no patológicas, los niveles de ECA2 circulantes son bajos en comparación con los niveles de ECA2 de membrana (Rice *et al.* 2006). Curiosamente, en los resultados obtenidos también se detectó un aumento, inducido por el tratamiento de la proteína Spike, en los niveles celulares de un polipéptido corto de ECA2 (60 kDa), que puede corresponder a un polipéptido glicosilado internalizado en el citoplasma.

La dinámica celular del enzima ECA2 está regulada por diversos tipos de proteasas. ADAM17 es una metaloproteasa y desintegrina localizada en la membrana celular que puede escindir un amplio número de sustratos y que está implicada en varios trastornos cardiovasculares y neurológicos (Xu *et al.*, 2016). Curiosamente, ADAM17 también desempeña un papel importante en el mecanismo de entrada de varios virus (Kononchik *et al.*, 2018; Mikulicic *et al.*, 2019) y, en particular, de los virus SARS-CoV. El mecanismo utilizado por ADAM17 para facilitar la entrada del SARS-CoV no ha sido totalmente aclarado; sin embargo, se sabe que la activación de ADAM17 desempeña un papel importante en el desprendimiento de ECA2 (Jia *et al.*, 2009; Lambert *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2020). Se ha demostrado que la activación de la proteína Spike por ADAM17 depende del dominio citoplasmático de ECA2 y que éste está positivamente implicado en la entrada viral (Haga *et al.*, 2008; 2010; Liu *et al.*, 2020). En consonancia con esto, los inhibidores de ADAM17 atenuaron la entrada, tanto de los pseudovirus portadores de la proteína Spike, como de las cepas infecciosas del SARS-CoV, e, incluso, se han sugerido como compuestos antivirales (Haga *et al.*, 2010). Curiosamente, los resultados obtenidos en el presente trabajo demuestran que, tanto el candesartán como el captopril y el ibuprofeno, actúan como inhibidores de la actividad de ADAM17. Los tratamientos mencionados reducen los niveles de ECA2 soluble en el medio de

cultivo de células del endotelio pulmonar, lo que sugiere una reducción de la liberación de ECA2, una reducción de los niveles de la forma intracelular de corta longitud de ECA2 y una reducción de la internalización de la proteína Spike mediada por ECA2 (Figura 52). Estos resultados están en consonancia con la disminución de la actividad de ADAM17 inducida por los tratamientos observada en cultivos celulares de A549. Estudios previos han observado que el tratamiento con Ang II aumenta la actividad de ADAM17 a través de la activación del eje AT1/NOX y la generación de ROS, en cultivos de cardiomiocitos y neuronas (Patel *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2017).

Además de ADAM17, se ha demostrado la implicación de otras proteasas en la infección por SARS-CoV-2. Por ejemplo, TMPRSS2 está implicada en la entrada del virus al citoplasma de la célula huésped. Esta proteasa participa en la activación de la proteína Spike y facilita la entrada viral tras la unión con el receptor ECA2 (Millet y Whittaker, 2015). Los resultados presentados demuestran que el tratamiento con la proteína Spike aumenta la actividad de TMPRSS2, y que, este aumento disminuye con el tratamiento de ibuprofeno. Estudios previos han demostrado la disminución de la actividad de TMPRSS2 inducida por el ibuprofeno (Kashiwagi *et al.*, 2014).

Los resultados obtenidos con imágenes de microscopía confocal demostraron que los cambios inducidos por candesartán, captopril e ibuprofeno, efectivamente promovían una disminución en la internalización de la proteína Spike en células A549.

El mecanismo beneficioso hacia el eje anti-inflamatorio Ang(1-7)/ECA2/MasR, promovido por el ibuprofeno, también puede producirse de forma indirecta por sus efectos inhibidores de los mediadores pro-inflamatorios. Sin embargo, la liberación de citoquinas pro-inflamatorias también disminuyó tras el tratamiento de candesartán y de captopril, demostrándose los efectos anti-inflamatorios, en el tejido pulmonar, del tratamiento con ARAII e IECA.

La participación de las citoquinas pro-inflamatorias en COVID-19 ha sido previamente demostrada en estudios anteriores (Cheung *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2010) y se considera que la gravedad de la infección

por SARS-CoV-2 se encuentra acompañada por una respuesta inflamatoria sistémica aguda conocida como tormenta de citoquinas (Portales *et al.*, 2022). En diversos estudios se observó un aumento, inducido por la proteína Spike, de la liberación de las principales citoquinas pro-inflamatorias al medio de cultivo. El aumento de estas citoquinas también se ha encontrado en suero de pacientes infectados por el SARS-CoV (Jiang *et al.*, 2005). Específicamente, TNF- α (Robinson *et al.*, 2020) e IL-6 (Patra *et al.*, 2020; Aziz *et al.*, 2020) han sido identificados como los principales inductores de la respuesta inflamatoria del SARS-CoV-2. Por otro lado, CCL2 se considera una quimioquina asociada a la fibrosis, que interviene en varios trastornos inflamatorios pulmonares, como el SARS, el asma y la fibrosis pulmonar. Los niveles de CCL2 están incrementados en el suero de pacientes con SARS-CoV y en el sobrenadante de células infectadas con SARS-CoV en experimentos *in vitro* (Cheung *et al.*, 2005; Jiang *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2010; Coperchini *et al.*, 2020).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo demuestran que el tratamiento con un ARAII, candesartán, un IECA, captopril y un AINEs, ibuprofeno, disminuyen la liberación de citoquinas pro-inflamatorias inducida por la proteína Spike. Este resultado puede deberse a la implicación de varios mecanismos.

En primer lugar, se observó una regulación a la baja del eje anti-inflamatorio del SRA y una regulación al alza del eje pro-inflamatorio AT1/NOX, lo que puede conducir a un aumento de la liberación de citoquinas (Zhong *et al.*, 2010, 2011; Patra *et al.*, 2020) mediado por el eje NOX/ROS (Shang *et al.*, 2012; Patel *et al.*, 2014). Se ha sugerido que la acumulación de Ang II debida a la reducción de ECA2 transmembrana, durante la infección por SARS-CoV-2, contribuye a un estado pro-inflamatorio (Tikellis *et al.*, 2011; Cardoso *et al.*, 2018) y estos efectos perjudiciales pueden ser evitados con el uso de ARAII (Gurwitz, 2020) o IECA (Figura 52). Así, el aumento en la expresión de los componentes del eje Ang II/AT1, demuestra que la hipertensión puede ser un factor de riesgo en la progresión de la COVID-19, tal y como se ha sugerido en diversos estudios (Yang *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2020a).

En segundo lugar, ADAM17 no sólo participa en el desprendimiento de ECA2 (Lambert *et al.*, 2005; Jia *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2016), sino también en la liberación de varias citoquinas pro-inflamatorias (de Queiroz *et al.*, 2020). Por ejemplo, ADAM17 libera TNF- α de las células (Black *et al.*, 1997) y promueve la liberación de IL-6/receptor soluble de IL-6 (Hartl *et al.*, 2008). Además, ADAM17 puede inducir la liberación de CCL2 a través de un mecanismo indirecto en el que está implicada la quitinasa ácida de mamíferos (Hartl *et al.*, 2008).

En resumen, los experimentos *in vitro* realizados en el presente trabajo, demuestran tanto el aumento de expresión y actividad de componentes y receptores del eje anti-inflamatorio (junto con la inhibición del brazo pro-inflamatorio) del SRA, como la disminución de la actividad de ADAM17, provocados por los tratamientos bloqueantes del receptor AT1, ARAII, inhibidores del enzima ECA, IECAs, y AINEs. Estos mecanismos pueden explicar la disminución de la liberación de citoquinas pro-inflamatorias inducida por la proteína Spike tras el tratamiento de candesartán, captopril e ibuprofeno.

Todos estos resultados muestran que el candesartán, un ARAII, el captopril, un IECA y el ibuprofeno, un AINE, regulan positivamente la expresión de ECA2 y la actividad anti-inflamatoria del SRA pulmonar, disminuyendo, por tanto, las respuestas inflamatorias, fibróticas y trombóticas. Además, la regulación de ECA2, se contrarresta mediante mecanismos inducidos por dichos fármacos, reduciendo la entrada de la proteína Spike del SARS-CoV-2, mediante la inhibición de la actividad de proteasas, como ADAM17 y TMPRSS2 (Figura 52).

Los resultados obtenidos en estudios clínicos aún presentan resultados controvertidos, pero muchos de ellos apoyan los resultados obtenidos en el presente trabajo. Por ejemplo, en un estudio reciente observaron que el tratamiento con ARAII e IECA no se asoció con un aumento de la infección por SARS-CoV-2, e incluso dieron lugar a una disminución de la mortalidad (Zhang *et al.*, 2020b; Mehta *et al.*, 2020), mientras que el tratamiento con ibuprofeno y otros AINEs no tuvieron efectos perjudiciales, e incluso podrían tener efectos positivos, en la

respuesta a la infección por SARS-CoV-2 (Rinott *et al.*, 2020; Abu Esba *et al.*, 2021).

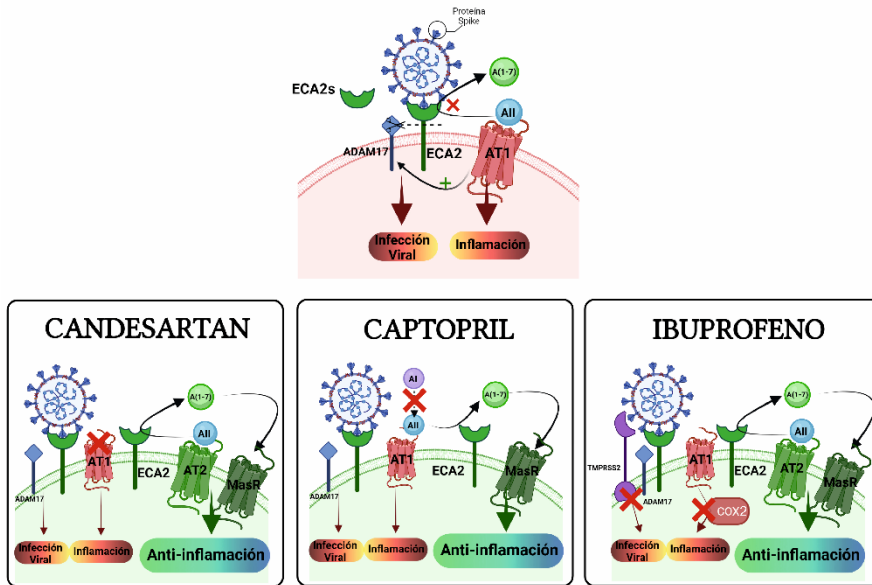


Figura 52. Representación gráfica del efecto de tratamientos que modulan la expresión y actividad de los receptores del SRA en la expresión de ECA2 y en la infección por SARS-CoV-2. ECA2 es el receptor funcional de entrada para SARS-CoV-2 mediante la unión de la proteína Spike. ECA2 se encarga de transformar la Ang II (componente pro-inflamatorio) a Ang(1-7) (componente anti-inflamatorio), sin embargo esta transformación disminuye cuando la proteína Spike se une al ECA2, lo que mantiene niveles elevados de Ang II que, mediante su unión al receptor AT1, provoca inflamación y estrés oxidativo pulmonar. Así mismo, el receptor AT1 activa la proteasa ADAM17 que se encarga del desprendimiento del ECA2 de membrana. El tratamiento con el bloqueante del receptor AT1, candesartán, permite que la Ang II se unan a los receptores AT2, o que sea transformada a Ang(1-7), cuyo receptor, MasR al igual que el AT2, presenta efectos anti-inflamatorios. El tratamiento con el inhibidor de la ECA, captopril, disminuye los niveles de Ang II y, por tanto, el eje pro-inflamatorio mediado por el receptor AT1. El tratamiento con el ibuprofeno disminuye el efecto pro-inflamatorio del receptor AT1, mediante la inhibición de COX-2. Abreviaturas: ECA2, enzima convertora de angiotensina II; AT1, receptor de angiotensina tipo 1; AT2, receptor de angiotensina tipo 2; ADAM17, dominio 17 de la desintegrina y metalopeptidasa; TMPRSS2: proteasa transmembrana serina 2; COX-2, ciclooxigenasa tipo 2; AI, angiotensina I, AII, angiotensina II; Ang(1-7), angiotensina (1-7). Esquema de elaboración propia con www.biorender.com

Todos los resultados observados en la presente tesis doctoral demuestran el importante papel de los receptores de angiotensina en inflamación y neuroinflamación, así como el efecto de los cambios de expresión de los diferentes receptores del SRA en la neurodegeneración dopaminérgica que cursa en la EP y en la inflamación aguda por la infección de SARS-CoV-2. Esta alteración de la expresión de sus principales receptores puede ser ocasionada por inflamación periférica crónica (envejecimiento o MetS) y puede ser restaurada por tratamientos que modulan el SRA y sus receptores.

Las cuestiones futuras del presente estudio pueden dirigirse hacia la implicación de la infección por SARS-CoV-2 en la progresión de pacientes con EP, y el efecto de los fármacos que modulan el SRA y sus receptores.

La relación entre COVID-19 y EP ha sido ampliamente cuestionada en los últimos meses. Por un lado, el acceso directo del SARS-CoV-2 al SNC a través del nervio olfatorio (Behl *et al.*, 2021) y la expresión del receptor de entrada ECA2 en regiones nigroestriatales (Costa-Besada *et al.*, 2018), se podrían vincular con diversos efectos patológicos de la EP, por ejemplo, la agregación de proteínas citotóxicas como la α -syn (Tulisiak *et al.*, 2019; Philippens *et al.*, 2021), neuroinflamación y muerte neuronal dopaminérgica (Joglar *et al.*, 2009; Sulzer *et al.*, 2020). Por otro lado, las condiciones hiper-inflamatorias generadas por la infección de SARS-CoV-2, así como las comorbilidades más vulnerables a dicha infección (envejecimiento y MetS) fomentan la alteración de la BHE (Chowdhury *et al.*, 2021; Chen *et al.*, 2022) promoviendo la infiltración de células B y componentes del sistema inmune, así como la inflamación microglial (Sulzer *et al.*, 2020). Incluso, nuevos estudios han demostrado la capacidad de la proteína Spike para atravesar la BHE en modelos experimentales (Petrovski *et al.*, 2022). Por lo tanto, es esencial realizar estudios adicionales que complementen la relación entre EP y COVID-19, así como el efecto de los tratamientos que regulan la expresión de componentes y receptores del SRA.

6. CONCLUSIONES

1. La inyección estereotáxica de los vectores AAV9- α -syn-WT y AAV9- α -syn-A53T, con promotor neuroespecífico, permite obtener un modelo animal de enfermedad de Parkinson caracterizado por: a) una sobreexpresión de la proteína α -syn humana en neuronas dopaminérgicas, que conduce a una pérdida de las mismas; b) un aumento en la expresión de componentes y receptores del eje pro-inflamatorio del Sistema Renina-Angiotensina (SRA), exacerbación de la respuesta inflamatoria microglial, y aumento de marcadores de estrés oxidativo, y c) una desregulación del sistema dopaminérgico estriatal, que se manifiesta en un deterioro del comportamiento motor.
2. La inhibición de la respuesta inflamatoria microglial es un mecanismo principal implicado en el efecto neuroprotector de antagonistas del receptor AT1 (ARAII), candesartán y telmisartán, sobre la muerte neuronal dopaminérgica inducida por la sobreexpresión de α -sinucleína humana en el modelo animal de enfermedad de Parkinson generado, lo que sugiere un reposicionamiento de dichos tratamientos como terapia neuroprotectora.
3. En condiciones basales, los receptores AT2 regulan a la baja la expresión de los receptores del eje pro-inflamatorio del SRA en células microgliales. Sin embargo, en condiciones de inflamación periférica crónica (envejecimiento) y aguda (LPS), se reduce la expresión de receptores AT2, lo que conduce a un incremento en la expresión de los receptores AT1, promoviendo así fenómenos de neuroinflamación, que pueden ser revertidos mediante el empleo de antagonistas del receptor AT1.

4. Se confirma la expresión del receptor AT2 en microglía adulta de ratón sano. La microglía aislada de cerebros de ratón hembra presenta mayor expresión del receptor AT2 que la microglía de machos, independientemente de las hormonas femeninas circulantes y posiblemente relacionado con la localización de su gen en el cromosoma X. La expresión del receptor AT2 media respuestas anti-inflamatorias a través de (1) un incremento en la expresión de IL-10, y (2) una disminución en la expresión de IL-1 β e IL-6.
5. En ratas, la inflamación periférica crónica con la que cursa el síndrome metabólico provoca un aumento en la expresión de los receptores del eje pro-inflamatorio del SRA cerebral y una disminución en los receptores del eje anti-inflamatorio, así como un incremento en los niveles séricos y en líquido cefalorraquídeo de autoanticuerpos agonistas del receptor AT1 (AT1-AA) y frente al enzima ECA2 (ACE2-AA), que se correlacionan positivamente con marcadores de los factores que definen el síndrome metabólico y con mediadores pro-inflamatorios.
6. Los cambios de expresión de los receptores del SRA cerebral ocasionados por (1) la inflamación periférica crónica asociada al síndrome metabólico o (2) la infusión intraperitoneal crónica de autoanticuerpos agonistas del receptor AT1 (AT1-AA), provocan un incremento de la muerte neuronal dopaminérgica y de la respuesta inflamatoria microglial en modelos animales de enfermedad de Parkinson, que son revertidos por el tratamiento con el antagonista del receptor AT1, candesartán.
7. El tratamiento *in vivo* con antagonistas del receptor AT1 (ARAI, como el candesartán), con inhibidores del enzima ECA (IECA, como captopril) o con moduladores indirectos de los receptores del SRA, anti-inflamatorios AINEs (como el ibuprofeno) produce un incremento en la expresión de ECA2 y

receptores del eje anti-inflamatorio del SRA y una disminución de los receptores del eje pro-inflamatorio en tejido pulmonar de rata sana adulta.

8. La inflamación periférica crónica, mediada por el envejecimiento o por el síndrome metabólico, produce una disminución de ECA2 y receptores anti-inflamatorios del SRA pulmonar de rata y un aumento de los receptores pro-inflamatorios, que son revertidos por el uso de tratamientos moduladores del SRA y sus receptores (candesartán, captopril e ibuprofeno).
9. El tratamiento *in vitro* con la proteína viral Spike induce una disminución en los niveles de expresión de ECA2 transmembrana, así como una disminución de la actividad catalítica de ECA2 y un aumento en los niveles de ECA2 soluble, que fueron revertidos por el pre-tratamiento con moduladores del SRA y sus receptores (candesartán, captopril, ibuprofeno) en cultivos de neumocitos humanos tipo II.
10. El tratamiento *in vitro* con antagonistas del receptor AT1 (ARAII, como el candesartán), con inhibidores del enzima ECA (IECA, como captopril) o con moduladores indirectos de los receptores del SRA, anti-inflamatorios AINEs (ibuprofeno) producen (1) una disminución en la internalización de la proteína viral del SARS-CoV-2 (Spike), mediante la inhibición de la actividad de proteasas (ADAM17 y TMPRSS2), y (2) un descenso en la liberación de citoquinas pro-inflamatorias en cultivos de neumocitos humanos tipo II.

7. CONCLUSIONS

1. Stereotaxic injection of AAV9- α -syn-WT and AAV9- α -syn-A53T vectors, with a neurospecific promoter, produces an animal model of Parkinson's disease characterized by: a) an overexpression of human α -synuclein protein in dopaminergic neurons, which leads to their cell death; b) an increase in the expression of the brain Renin-Angiotensin System (RAS) pro-inflammatory components and receptors, exacerbation of the microglial inflammatory response, and increase in oxidative stress markers, and c) a dysregulation of striatal dopaminergic system, which is manifested in motor behavior impairment.
2. Inhibition of the microglial inflammatory response is a main mechanism involved in the neuroprotective effect of AT1 receptor antagonists, candesartan and telmisartan, on dopaminergic neuronal death induced by overexpression of human α -synuclein protein in the animal model of Parkinson's disease generated. Therefore, a repurposing of treatments that modulate the brain RAS and its receptors is suggested as neuroprotective therapy.
3. In basal conditions, AT2 receptors downregulate the expression of RAS pro-inflammatory receptors in microglial cells. However, in conditions of chronic (aging) and acute (LPS) peripheral inflammation, the expression of AT2 receptors is reduced, which leads to an increase in the expression of AT1 receptors, thus promoting neuroinflammation processes. Therefore, these events can be reversed by the use of AT1 receptor antagonists.

CONCLUSIONS

4. AT2 receptor expression in adult microglia of healthy mice is confirmed. Microglia isolated from female mouse brains exhibits higher AT2 receptor expression than microglia from males, independent of circulating female hormones and possibly related to the location of AT2 receptor gene on the X chromosome. AT2 receptor expression mediates anti-inflammatory responses through (1) an increase in the expression of IL-10, and (2) a decrease in the expression of IL-1 β and IL-6.
5. In rats, the chronic peripheral inflammation associated with metabolic syndrome causes an increase in the expression of brain RAS pro-inflammatory receptors and a decrease in the anti-inflammatory receptors, as well as an increase in serum and cerebrospinal fluid levels of AT1 receptor agonistic autoantibodies (AT1-AA) and autoantibodies against the ACE2 enzyme (ACE2-AA), which correlate positively with markers of the factors that define the metabolic syndrome and with pro-inflammatory markers.
6. Changes in the expression of brain RAS receptors caused by (1) chronic peripheral inflammation associated with metabolic syndrome or (2) chronic intraperitoneal infusion of AT1 receptor agonistic autoantibodies (AT1-AA), cause an increase in dopaminergic neuronal death and microglial inflammatory responses induced in animal models of Parkinson's disease, which are reversed by the AT1 receptor antagonist candesartan.
7. *In vivo* treatment with AT1 receptor antagonists (such as candesartan), with ACE enzyme inhibitors (such as captopril) or with indirect modulators of RAS receptors (such as ibuprofen) produces an increase in ACE2 and RAS anti-inflammatory receptors and a decrease in RAS pro-inflammatory receptors in lung tissue of healthy adult rats.

8. Chronic peripheral inflammation, induced by aging or metabolic syndrome, produces a decrease in pulmonary ACE2 and RAS anti-inflammatory receptors and an increase in pro-inflammatory receptors, which are reversed by RAS-modulating treatments (candesartan, captopril and ibuprofen).
9. *In vitro* treatment with viral protein (Spike) induces a decrease in transmembrane ACE2 expression levels, a decrease in the ACE2 catalytic activity and an increase in soluble ACE2 levels, which are reversed by the pre-treatment with RAS modulators (candesartan, captopril, ibuprofen) in cultures of type II human pneumocytes.
10. *In vitro* treatment with AT1 receptor antagonists (such as candesartan), with ACE enzyme inhibitors (such as captopril) or with indirect modulators of the RAS receptors (ibuprofen) produce (1) a decrease in SARS-CoV-2 viral protein (Spike) internalization, by inhibiting the proteases activity (ADAM17 and TMPRSS2), and (2) a decrease in the pro-inflammatory cytokines release in cultures of type II human pneumocytes.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Abadir, P. M. (2011) The frail renin-angiotensin system. *Clin Geriatr Med* **27**, 53-65, doi:10.1016/j.cger.2010.08.004
- AbdAlla, S., Langer, A., Fu, X. & Quitterer, U. (2013) ACE inhibition with captopril retards the development of signs of neurodegeneration in an animal model of Alzheimer's disease. *Int J Mol Sci* **14**, 16917-16942, doi:10.3390/ijms140816917
- AbdAlla, S., Lothar, H., Abdel-tawab, A. M. & Quitterer, U. (2001) The angiotensin II AT2 receptor is an AT1 receptor antagonist. *J Biol Chem* **276**, 39721-39726, doi:10.1074/jbc.M105253200
- Abdel-Wahab, B. A., Metwally, M. E., El-khawanki, M. M. & Hashim, A. M. (2014) Protective effect of captopril against clozapine-induced myocarditis in rats: role of oxidative stress, proinflammatory cytokines and DNA damage. *Chem Biol Interact* **216**, 43-52, doi:10.1016/j.cbi.2014.03.012
- Abu Esba, L. C., Alqahtani, R. A., Thomas, A., Shamas, N., Alswaidan, L. & Mardawi, G. (2021) Ibuprofen and NSAID Use in COVID-19 Infected Patients Is Not Associated with Worse Outcomes: A Prospective Cohort Study. *Infect Dis Ther* **10**, 253-268, doi:10.1007/s40121-020-00363-w
- Acosta-Martinez, M. (2020) Shaping Microglial Phenotypes Through Estrogen Receptors: Relevance to Sex-Specific Neuroinflammatory Responses to Brain Injury and Disease. *J Pharmacol Exp Ther* **375**, 223-236, doi:10.1124/jpet.119.264598
- Alberti, K. G., Eckel, R. H., Grundy, S. M., Zimmet, P. Z., Cleeman, J. I., Donato, K. A., Fruchart, J. C., James, W. P., Loria, C. M., Smith, S. C., Jr., International Diabetes Federation Task Force on, E., Prevention, National Heart, L., Blood, I., American Heart, A., World Heart, F., International Atherosclerosis, S. & International Association for the Study of, O. (2009) Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation* **120**, 1640-1645, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.109.192644
- Albin, R. L., Young, A. B. & Penney, J. B. (1989) The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci* **12**, 366-375, doi:10.1016/0166-2236(89)90074-x
- Allen, A. M., MacGregor, D. P., Chai, S. Y., Donnan, G. A., Kaczmarczyk, S., Richardson, K., Kalnins, R., Ireton, J. & Mendelsohn, F. A. (1992) Angiotensin II receptor binding associated with nigrostriatal dopaminergic neurons in human basal ganglia. *Ann Neurol* **32**, 339-344, doi:10.1002/ana.410320306

- Ansari, A., Rahman, M. S., Saha, S. K., Saikot, F. K., Deep, A. & Kim, K. H. (2017) Function of the SIRT3 mitochondrial deacetylase in cellular physiology, cancer, and neurodegenerative disease. *Aging Cell* **16**, 4-16, doi:10.1111/accel.12538
- Arai, S., Maehara, N., Iwamura, Y., Honda, S., Nakashima, K., Kai, T., Ogishi, M., Morita, K., Kurokawa, J., Mori, M., Motoi, Y., Miyake, K., Matsushashi, N., Yamamura, K., Ohara, O., Shibuya, A., Wakeland, E. K., Li, Q. Z. & Miyazaki, T. (2013) Obesity-associated autoantibody production requires AIM to retain the immunoglobulin M immune complex on follicular dendritic cells. *Cell Rep* **3**, 1187-1198, doi:10.1016/j.celrep.2013.03.006
- Armstrong, M. J. & Okun, M. S. (2020) Diagnosis and Treatment of Parkinson Disease: A Review. *JAMA* **323**, 548-560, doi:10.1001/jama.2019.22360
- Arnold, A. P. (2020) Sexual differentiation of brain and other tissues: Five questions for the next 50 years. *Horm Behav* **120**, 104691, doi:10.1016/j.yhbeh.2020.104691
- Arreola, R., Alvarez-Herrera, S., Perez-Sanchez, G., Becerril-Villanueva, E., Cruz-Fuentes, C., Flores-Gutierrez, E. O., Garces-Alvarez, M. E., de la Cruz-Aguilera, D. L., Medina-Rivero, E., Hurtado-Alvarado, G., Quintero-Fabian, S. & Pavon, L. (2016) Immunomodulatory Effects Mediated by Dopamine. *J Immunol Res* **2016**, 3160486, doi:10.1155/2016/3160486
- Arumugam, S., Thandavarayan, R. A., Palaniyandi, S. S., Giridharan, V. V., Arozal, W., Sari, F. R., Soetikno, V., Harima, M., Suzuki, K., Kodama, M. & Watanabe, K. (2012) Candesartan cilexetil protects from cardiac myosin induced cardiotoxicity via reduction of endoplasmic reticulum stress and apoptosis in rats: involvement of ACE2-Ang (1-7)-mas axis. *Toxicology* **291**, 139-145, doi:10.1016/j.tox.2011.11.008
- Asraf, K., Torika, N., Apte, R. N. & Fleisher-Berkovich, S. (2018) Microglial Activation Is Modulated by Captopril: in Vitro and in Vivo Studies. *Front Cell Neurosci* **12**, 116, doi:10.3389/fncel.2018.00116
- Aziz, M., Fatima, R. & Assaly, R. (2020) Elevated interleukin-6 and severe COVID-19: A meta-analysis. *J Med Virol* **92**, 2283-2285, doi:10.1002/jmv.25948
- Barkholt, P., Sanchez-Guajardo, V., Kirik, D. & Romero-Ramos, M. (2012) Long-term polarization of microglia upon alpha-synuclein overexpression in nonhuman primates. *Neuroscience* **208**, 85-96, doi:10.1016/j.neuroscience.2012.02.004
- Barnes, J. M., Barnes, N. M., Costall, B., Coughlan, J., Kelly, M. E., Naylor, R. J., Tomkins, D. M. & Williams, T. J. (1992) Angiotensin-converting enzyme inhibition, angiotensin, and cognition. *J Cardiovasc Pharmacol* **19 Suppl 6**, S63-71, doi:10.1097/00005344-199219006-00011
- Becker, C., Jick, S. S. & Meier, C. R. (2008) Use of antihypertensives and the risk of Parkinson disease. *Neurology* **70**, 1438-1444, doi:10.1212/01.wnl.0000303818.38960.44
- Behl, T., Kumar, S., Sehgal, A., Singh, S., Sharma, N., Chirgurupati, S., Aldubayan, M., Alhowail, A., Bhatia, S. & Bungau, S. (2021) Linking COVID-19 and Parkinson's disease: Targeting the role of Vitamin-D. *Biochem Biophys Res Commun* **583**, 14-21, doi:10.1016/j.bbrc.2021.10.042
- Beldent, V., Michaud, A., Wei, L., Chauvet, M. T. & Corvol, P. (1993) Proteolytic release of human angiotensin-converting enzyme. Localization of the cleavage site. *J Biol Chem* **268**, 26428-26434
- Bell, P. D., Lapointe, J. Y., Sabirov, R., Hayashi, S., Peti-Peterdi, J., Manabe, K., Kovacs, G. & Okada, Y. (2003) Macula densa cell signaling involves ATP release through a maxi anion channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 4322-4327, doi:10.1073/pnas.0736323100

- Bey, K., Deniaud, J., Dubreil, L., Joussemet, B., Cristini, J., Ciron, C., Hordeaux, J., Le Boulc'h, M., Marche, K., Maquigneau, M., Guilbaud, M., Moreau, R., Larcher, T., Deschamps, J. Y., Fusellier, M., Blouin, V., Sevin, C., Cartier, N., Adjali, O., Aubourg, P., Moullier, P. & Colle, M. A. (2020) Intra-CSF AAV9 and AAVrh10 Administration in Nonhuman Primates: Promising Routes and Vectors for Which Neurological Diseases? *Mol Ther Methods Clin Dev* **17**, 771-784, doi:10.1016/j.omtm.2020.04.001
- Bezard, E., Yue, Z., Kirik, D. & Spillantini, M. G. (2013) Animal models of Parkinson's disease: limits and relevance to neuroprotection studies. *Mov Disord* **28**, 61-70, doi:10.1002/mds.25108
- Bhat, S. A., Goel, R., Shukla, R. & Hanif, K. (2016) Angiotensin Receptor Blockade Modulates NFkappaB and STAT3 Signaling and Inhibits Glial Activation and Neuroinflammation Better than Angiotensin-Converting Enzyme Inhibition. *Mol Neurobiol* **53**, 6950-6967, doi:10.1007/s12035-015-9584-5
- Bian, J. & Li, Z. (2021) Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2): SARS-CoV-2 receptor and RAS modulator. *Acta Pharm Sin B* **11**, 1-12, doi:10.1016/j.apsb.2020.10.006
- Biancardi, V. C., Stranahan, A. M., Krause, E. G., de Kloet, A. D. & Stern, J. E. (2016) Cross talk between AT1 receptors and Toll-like receptor 4 in microglia contributes to angiotensin II-derived ROS production in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **310**, H404-415, doi:10.1152/ajpheart.00247.2015
- Birkmayer, W. & Hornykiewicz, O. (1998) The effect of 1-3,4-dihydroxyphenylalanine (=DOPA) on akinesia in parkinsonism. *Parkinsonism Relat Disord* **4**, 59-60, doi:10.1016/s1353-8020(98)00013-3
- Bjorkhem, I., Cedazo-Minguez, A., Leoni, V. & Meaney, S. (2009) Oxysterols and neurodegenerative diseases. *Mol Aspects Med* **30**, 171-179, doi:10.1016/j.mam.2009.02.001
- Black, R. A., Rauch, C. T., Kozlosky, C. J., Peschon, J. J., Slack, J. L., Wolfson, M. F., Castner, B. J., Stocking, K. L., Reddy, P., Srinivasan, S., Nelson, N., Boiani, N., Schooley, K. A., Gerhart, M., Davis, R., Fitzner, J. N., Johnson, R. S., Paxton, R. J., March, C. J. & Cerretti, D. P. (1997) A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature* **385**, 729-733, doi:10.1038/385729a0
- Blandini, F., Armentero, M. T. & Martignoni, E. (2008) The 6-hydroxydopamine model: news from the past. *Parkinsonism Relat Disord* **14 Suppl 2**, S124-129, doi:10.1016/j.parkreldis.2008.04.015
- Blesa, J., Phani, S., Jackson-Lewis, V. & Przedborski, S. (2012) Classic and new animal models of Parkinson's disease. *J Biomed Biotechnol* **2012**, 845618, doi:10.1155/2012/845618
- Borrajo, A., Rodriguez-Perez, A. I., Diaz-Ruiz, C., Guerra, M. J. & Labandeira-Garcia, J. L. (2014a) Microglial TNF-alpha mediates enhancement of dopaminergic degeneration by brain angiotensin. *Glia* **62**, 145-157, doi:10.1002/glia.22595
- Borrajo, A., Rodriguez-Perez, A. I., Villar-Cheda, B., Guerra, M. J. & Labandeira-Garcia, J. L. (2014b) 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, doi:10.1016/j.neuropharm.2014.05.021
- Boyd, R.J., Avramopoulos, D., Jantzie, L.L. & McCallion, A.S. (2022) Neuroinflammation represents a common theme amongst genetic and environmental risk factors for Alzheimer and Parkinson diseases. *J Neuroinflammation* **19**, 223, doi:10.1186/s12974-022-02584-x

- Breydo, L., Wu, J. W. & Uversky, V. N. (2012) Alpha-synuclein misfolding and Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta* **1822**, 261-285, doi:10.1016/j.bbadis.2011.10.002
- Brosnihan, K. B. & Chappell, M. C. (2017) Measurement of Angiotensin Peptides: HPLC-RIA. *Methods Mol Biol* **1527**, 81-99, doi:10.1007/978-1-4939-6625-7_7
- Brown, D. C., Steward, L. J., Ge, J. & Barnes, N. M. (1996) Ability of angiotensin II to modulate striatal dopamine release via the AT1 receptor in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol* **118**, 414-420, doi:10.1111/j.1476-5381.1996.tb15418.x
- Brown, K., Xie, S., Qiu, X., Mohrin, M., Shin, J., Liu, Y., Zhang, D., Scadden, D. T. & Chen, D. (2013) SIRT3 reverses aging-associated degeneration. *Cell Rep* **3**, 319-327, doi:10.1016/j.celrep.2013.01.005
- Burchill, L. J., Velkoska, E., Dean, R. G., Griggs, K., Patel, S. K. & Burrell, L. M. (2012) Combination renin-angiotensin system blockade and angiotensin-converting enzyme 2 in experimental myocardial infarction: implications for future therapeutic directions. *Clin Sci (Lond)* **123**, 649-658, doi:10.1042/CS20120162
- Burre, J. (2015) The Synaptic Function of alpha-Synuclein. *J Parkinsons Dis* **5**, 699-713, doi:10.3233/JPD-150642
- Cabral-Marques, O., Carvalho-Marques, A. H., Schimke, L. F., Heidecke, H. & Riemekasten, G. (2019) Loss of balance in normal GPCR-mediated cell trafficking. *Front Biosci (Landmark Ed)* **24**, 18-34, doi:10.2741/4707
- Calabresi, P., Picconi, B., Tozzi, A., Ghiglieri, V. & Di Filippo, M. (2014) Direct and indirect pathways of basal ganglia: a critical reappraisal. *Nat Neurosci* **17**, 1022-1030, doi:10.1038/nn.3743
- Capettini, L. S., Montecucco, F., Mach, F., Stergiopoulos, N., Santos, R. A. & da Silva, R. F. (2012) Role of renin-angiotensin system in inflammation, immunity and aging. *Curr Pharm Des* **18**, 963-970, doi:10.2174/138161212799436593
- Cardoso, V. G., Goncalves, G. L., Costa-Pessoa, J. M., Thieme, K., Lins, B. B., Casare, F. A. M., de Ponte, M. C., Camara, N. O. S. & Oliveira-Souza, M. (2018) Angiotensin II-induced podocyte apoptosis is mediated by endoplasmic reticulum stress/PKC-delta/p38 MAPK pathway activation and trough increased Na(+)/H(+) exchanger isoform 1 activity. *BMC Nephrol* **19**, 179, doi:10.1186/s12882-018-0968-4
- Carlsson, A., Lindqvist, M. & Magnusson, T. (1957) 3,4-Dihydroxyphenylalanine and 5-hydroxytryptophan as reserpine antagonists. *Nature* **180**, 1200, doi:10.1038/1801200a0
- Chan, P., DeLanney, L. E., Irwin, I., Langston, J. W. & Di Monte, D. (1991) Rapid ATP loss caused by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in mouse brain. *J Neurochem* **57**, 348-351, doi:10.1111/j.1471-4159.1991.tb02134.x
- Chappell, M. C. (2007) Emerging evidence for a functional angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin-(1-7)-MAS receptor axis: more than regulation of blood pressure? *Hypertension* **50**, 596-599, doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.106.076216
- Chavarria, C., Ivagnes, R. & Souza, J. M. (2022) Extracellular Alpha-Synuclein: Mechanisms for Glial Cell Internalization and Activation. *Biomolecules* **12**, doi:10.3390/biom12050655
- Chen, I. Y., Chang, S. C., Wu, H. Y., Yu, T. C., Wei, W. C., Lin, S., Chien, C. L. & Chang, M. F. (2010) Upregulation of the chemokine (C-C motif) ligand 2 via a severe acute respiratory syndrome coronavirus spike-ACE2 signaling pathway. *J Virol* **84**, 7703-7712, doi:10.1128/JVI.02560-09
- Chen, J., Guan, Z., Wang, L., Song, G., Ma, B. & Wang, Y. (2014) Meta-analysis: overweight, obesity, and Parkinson's disease. *Int J Endocrinol* **2014**, 203930, doi:10.1155/2014/203930

- Chen, J., Jiang, Q., Xia, X., Liu, K., Yu, Z., Tao, W., Gong, W. & Han, J. J. (2020) Individual variation of the SARS-CoV-2 receptor ACE2 gene expression and regulation. *Aging Cell* **19**, doi:10.1111/accel.13168
- Chen, J., Zhang, C., Wu, Y. & Zhang, D. (2019) Association between Hypertension and the Risk of Parkinson's Disease: A Meta-Analysis of Analytical Studies. *Neuroepidemiology* **52**, 181-192, doi:10.1159/000496977
- Chen, Y., Yang, W., Chen, F. & Cui, L. (2022) COVID-19 and cognitive impairment: neuroinvasive and bloodbrain barrier dysfunction. *J Neuroinflammation* **19**, 222, doi:10.1186/s12974-022-02579-8
- Cheung, C. Y., Poon, L. L., Ng, I. H., Luk, W., Sia, S. F., Wu, M. H., Chan, K. H., Yuen, K. Y., Gordon, S., Guan, Y. & Peiris, J. S. (2005) Cytokine responses in severe acute respiratory syndrome coronavirus-infected macrophages in vitro: possible relevance to pathogenesis. *J Virol* **79**, 7819-7826, doi:10.1128/JVI.79.12.7819-7826.2005
- Chia, S. J., Tan, E. K. & Chao, Y. X. (2020) Historical Perspective: Models of Parkinson's Disease. *Int J Mol Sci* **21**, doi:10.3390/ijms21072464
- Chowdhury, B., Sharma, A., Satarker, S., Mudgal, J. & Nampoothiri, M. (2021) Dialogue between Neuroinflammation and Neurodegenerative Diseases in COVID-19. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* **40**, 37-49, doi:10.1615/JEnvironPatholToxicolOncol.2021038365
- Coperchini, F., Chiovato, L., Croce, L., Magri, F. & Rotondi, M. (2020) The cytokine storm in COVID-19: An overview of the involvement of the chemokine/chemokine-receptor system. *Cytokine Growth Factor Rev* **53**, 25-32, doi:10.1016/j.cytogfr.2020.05.003
- Cora, M. C., Kooistra, L. & Travlos, G. (2015) Vaginal Cytology of the Laboratory Rat and Mouse: Review and Criteria for the Staging of the Estrous Cycle Using Stained Vaginal Smears. *Toxicol Pathol* **43**, 776-793, doi:10.1177/0192623315570339
- Cosarderelioglu, C., Nidadavolu, L. S., George, C. J., Oh, E. S., Bennett, D. A., Walston, J. D. & Abadir, P. M. (2020) Brain Renin-Angiotensin System at the Intersect of Physical and Cognitive Frailty. *Front Neurosci* **14**, 586314, doi:10.3389/fnins.2020.586314
- Costa-Besada, M. A., Valenzuela, R., Gautheron, P., Villar-Cheda, B., Parga, J. A., Lanciego, J. L. & Labandeira-Garcia, J. L. (2018) Paracrine and Intracrine Angiotensin 1-7/Mas Receptor Axis in the Substantia Nigra of Rodents, Monkeys, and Humans. *Mol Neurobiol* **55**, 5847-5867, doi:10.1007/s12035-017-0805-y
- Coutinho, D. C., Foureaux, G., Rodrigues, K. D., Salles, R. L., Moraes, P. L., Murca, T. M., De Maria, M. L., Gomes, E. R., Santos, R. A., Guatimosim, S. & Ferreira, A. J. (2014) Cardiovascular effects of angiotensin A: a novel peptide of the renin-angiotensin system. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* **15**, 480-486, doi:10.1177/1470320312474856
- Crackower, M. A., Sarao, R., Oudit, G. Y., Yagil, C., Kozieradzki, I., Scanga, S. E., Oliveirados-Santos, A. J., da Costa, J., Zhang, L., Pei, Y., Scholey, J., Ferrario, C. M., Manoukian, A. S., Chappell, M. C., Backx, P. H., Yagil, Y. & Penninger, J. M. (2002) Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. *Nature* **417**, 822-828, doi:10.1038/nature00786
- Cunningham, M. W., Jr., Williams, J. M., Amaral, L., Usry, N., Wallukat, G., Dechend, R. & LaMarca, B. (2016) Agonistic Autoantibodies to the Angiotensin II Type 1 Receptor Enhance Angiotensin II-Induced Renal Vascular Sensitivity and Reduce Renal Function During Pregnancy. *Hypertension* **68**, 1308-1313, doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.07971

- Czlonkowska, A., Kurkowska-Jastrzebska, I., Czlonkowski, A., Peter, D. & Stefano, G. B. (2002) Immune processes in the pathogenesis of Parkinson's disease - a potential role for microglia and nitric oxide. *Med Sci Monit* **8**, RA165-177
- Daniele, S. G., Beraud, D., Davenport, C., Cheng, K., Yin, H. & Maguire-Zeiss, K. A. (2015) Activation of MyD88-dependent TLR1/2 signaling by misfolded alpha-synuclein, a protein linked to neurodegenerative disorders. *Sci Signal* **8**, ra45, doi:10.1126/scisignal.2005965
- Danielyan, L., Klein, R., Hanson, L. R., Buadze, M., Schwab, M., Gleiter, C. H. & Frey, W. H. (2010) Protective effects of intranasal losartan in the APP/PS1 transgenic mouse model of Alzheimer disease. *Rejuvenation Res* **13**, 195-201, doi:10.1089/rej.2009.0944
- Danilczyk, U., Sarao, R., Remy, C., Benabbas, C., Stange, G., Richter, A., Arya, S., Pospisilik, J. A., Singer, D., Camargo, S. M., Makrides, V., Ramadan, T., Verrey, F., Wagner, C. A. & Penninger, J. M. (2006) Essential role for collectrin in renal amino acid transport. *Nature* **444**, 1088-1091, doi:10.1038/nature05475
- David, S. & Kroner, A. (2011) Repertoire of microglial and macrophage responses after spinal cord injury. *Nat Rev Neurosci* **12**, 388-399, doi:10.1038/nrn3053
- de Gasparo, M., Catt, K. J., Inagami, T., Wright, J. W. & Unger, T. (2000) International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev* **52**, 415-472
- de Kloet, A. D., Krause, E. G. & Woods, S. C. (2010) The renin angiotensin system and the metabolic syndrome. *Physiol Behav* **100**, 525-534, doi:10.1016/j.physbeh.2010.03.018
- de Kloet, A. D., Wang, L., Ludin, J. A., Smith, J. A., Pioquinto, D. J., Hiller, H., Steckelings, U. M., Scheuer, D. A., Sumners, C. & Krause, E. G. (2016) Reporter mouse strain provides a novel look at angiotensin type-2 receptor distribution in the central nervous system. *Brain Struct Funct* **221**, 891-912, doi:10.1007/s00429-014-0943-1
- de Morais, S. D. B., Shanks, J. & Zucker, I. H. (2018) Integrative Physiological Aspects of Brain RAS in Hypertension. *Curr Hypertens Rep* **20**, 10, doi:10.1007/s11906-018-0810-1
- de Queiroz, T. M., Lakkappa, N. & Lazartigues, E. (2020) ADAM17-Mediated Shedding of Inflammatory Cytokines in Hypertension. *Front Pharmacol* **11**, 1154, doi:10.3389/fphar.2020.01154
- Dechend, R., Viedt, C., Muller, D. N., Ugele, B., Brandes, R. P., Wallukat, G., Park, J. K., Janke, J., Barta, P., Theuer, J., Fiebeler, A., Homuth, V., Dietz, R., Haller, H., Kreuzer, J. & Luft, F. C. (2003) AT1 receptor agonistic antibodies from preeclamptic patients stimulate NADPH oxidase. *Circulation* **107**, 1632-1639, doi:10.1161/01.CIR.0000058200.90059.B1
- Decressac, M., Mattsson, B., Lundblad, M., Weikop, P. & Bjorklund, A. (2012) Progressive neurodegenerative and behavioural changes induced by AAV-mediated overexpression of alpha-synuclein in midbrain dopamine neurons. *Neurobiol Dis* **45**, 939-953, doi:10.1016/j.nbd.2011.12.013
- 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**, 12535-12544, doi:10.1523/JNEUROSCI.1920-10.2010
- Depino, A. M., Earl, C., Kaczmarczyk, E., Ferrari, C., Besedovsky, H., del Rey, A., Pitossi, F. J. & Oertel, W. H. (2003) Microglial activation with atypical proinflammatory cytokine expression in a rat model of Parkinson's disease. *Eur J Neurosci* **18**, 2731-2742, doi:10.1111/j.1460-9568.2003.03014.x

- Deshotel, M. R., Xia, H., Sriramula, S., Lazartigues, E. & Filipeanu, C. M. (2014) Angiotensin II mediates angiotensin converting enzyme type 2 internalization and degradation through an angiotensin II type I receptor-dependent mechanism. *Hypertension* **64**, 1368-1375, doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.03743
- Devi, L., Raghavendran, V., Prabhu, B. M., Avadhani, N. G. & Anandatheerthavarada, H. K. (2008) Mitochondrial import and accumulation of alpha-synuclein impair complex I in human dopaminergic neuronal cultures and Parkinson disease brain. *J Biol Chem* **283**, 9089-9100, doi:10.1074/jbc.M710012200
- Dhande, I., Ma, W. & Hussain, T. (2015) Angiotensin AT2 receptor stimulation is anti-inflammatory in lipopolysaccharide-activated THP-1 macrophages via increased interleukin-10 production. *Hypertens Res* **38**, 21-29, doi:10.1038/hr.2014.132
- Dhillion, P., Wallace, K., Herse, F., Scott, J., Wallukat, G., Heath, J., Mosely, J., Martin, J. N., Jr., Dechend, R. & LaMarca, B. (2012) IL-17-mediated oxidative stress is an important stimulator of AT1-AA and hypertension during pregnancy. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **303**, R353-358, doi:10.1152/ajpregu.00051.2012
- Diaz-Ruiz, C., Rodriguez-Perez, A. I., Beiroa, D., Rodriguez-Pallares, J. & Labandeira-Garcia, J. L. (2015) Reciprocal regulation between sirtuin-1 and angiotensin-II in the substantia nigra: implications for aging and neurodegeneration. *Oncotarget* **6**, 26675-26689, doi:10.18632/oncotarget.5596
- Diaz-Ruiz, C., Villar-Cheda, B., Dominguez-Mejjide, A., Garrido-Gil, P., Guerra, M. J. & Labandeira-Garcia, J. L. (2020) Aging-Related Overactivity of the Angiotensin/AT1 Axis Decreases Sirtuin 3 Levels in the Substantia Nigra, Which Induces Vulnerability to Oxidative Stress and Neurodegeneration. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **75**, 416-424, doi:10.1093/gerona/gly259
- Dominguez-Mejjide, A., Rodriguez-Perez, A. I., Diaz-Ruiz, C., Guerra, M. J. & Labandeira-Garcia, J. L. (2017) Dopamine modulates astroglial and microglial activity via glial renin-angiotensin system in cultures. *Brain Behav Immun* **62**, 277-290, doi:10.1016/j.bbi.2017.02.013
- Dominguez-Mejjide, A., Villar-Cheda, B., Garrido-Gil, P., Sierra-Paredes, G., Guerra, M. J. & Labandeira-Garcia, J. L. (2014) Effect of chronic treatment with angiotensin type 1 receptor antagonists on striatal dopamine levels in normal rats and in a rat model of Parkinson's disease treated with L-DOPA. *Neuropharmacology* **76 Pt A**, 156-168, doi:10.1016/j.neuropharm.2013.07.016
- Dong, J., Cui, Y., Li, S. & Le, W. (2016) Current Pharmaceutical Treatments and Alternative Therapies of Parkinson's Disease. *Curr Neuropharmacol* **14**, 339-355, doi:10.2174/1570159x14666151120123025
- Dragun, D., Muller, D. N., Brasen, J. H., Fritsche, L., Nieminen-Kelha, M., Dechend, R., Kintscher, U., Rudolph, B., Hoebeke, J., Eckert, D., Mazak, I., Plehm, R., Schonemann, C., Unger, T., Budde, K., Neumayer, H. H., Luft, F. C. & Wallukat, G. (2005) Angiotensin II type 1-receptor activating antibodies in renal-allograft rejection. *N Engl J Med* **352**, 558-569, doi:10.1056/NEJMoa035717
- Eguchi, A. & Feldstein, A. E. (2014) Adipocyte cell death, fatty liver disease and associated metabolic disorders. *Dig Dis* **32**, 579-585, doi:10.1159/000360509
- Elabi, O. F., Cunha, J., Gaceb, A., Fex, M. & Paul, G. (2021) High-fat diet-induced diabetes leads to vascular alterations, pericyte reduction, and perivascular depletion of microglia in a 6-OHDA toxin model of Parkinson disease. *J Neuroinflammation* **18**, 175, doi:10.1186/s12974-021-02218-8

- Elton, T. S. & Martin, M. M. (2007) Angiotensin II type 1 receptor gene regulation: transcriptional and posttranscriptional mechanisms. *Hypertension* **49**, 953-961, doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.106.070565
- Esser, N., Legrand-Poels, S., Piette, J., Scheen, A. J. & Paquot, N. (2014) Inflammation as a link between obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* **105**, 141-150, doi:10.1016/j.diabres.2014.04.006
- Fajardo-Serrano, A., Rico, A. J., Roda, E., Honrubia, A., Arrieta, S., Ariznabarreta, G., Chocarro, J., Lorenzo-Ramos, E., Pejenaute, A., Vazquez, A. & Lanciego, J. L. (2021) Adeno-Associated Viral Vectors as Versatile Tools for Parkinson's Research, Both for Disease Modeling Purposes and for Therapeutic Uses. *Int J Mol Sci* **22**, doi:10.3390/ijms22126389
- Falkenburger, B. H., Saridaki, T. & Dinter, E. (2016) Cellular models for Parkinson's disease. *J Neurochem* **139 Suppl 1**, 121-130, doi:10.1111/jnc.13618
- Felder, R. A. & Jose, P. A. (2006) Mechanisms of disease: the role of GRK4 in the etiology of essential hypertension and salt sensitivity. *Nat Clin Pract Nephrol* **2**, 637-650, doi:10.1038/ncpneph0301
- Fellner, L., Irschick, R., Schanda, K., Reindl, M., Klimaschewski, L., Poewe, W., Wenning, G. K. & Stefanova, N. (2013) Toll-like receptor 4 is required for alpha-synuclein dependent activation of microglia and astroglia. *Glia* **61**, 349-360, doi:10.1002/glia.22437
- Ferrario, C. M., Jessup, J., Chappell, M. C., Averill, D. B., Brosnihan, K. B., Tallant, E. A., Diz, D. I. & Gallagher, P. E. (2005) Effect of angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin II receptor blockers on cardiac angiotensin-converting enzyme. *Circulation* **111**, 2605-2610, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.104.510461
- Ferrario, C. M., VonCannon, J., Ahmad, S., Wright, K. N., Roberts, D. J., Wang, H., Yamashita, T., Groban, L., Cheng, C. P., Collawn, J. F., Dell'Italia, L. J. & Varagic, J. (2019) Activation of the Human Angiotensin-(1-12)-Chymase Pathway in Rats With Human Angiotensinogen Gene Transcripts. *Front Cardiovasc Med* **6**, 163, doi:10.3389/fcvm.2019.00163
- Fleegal-DeMotta, M. A., Doghu, S. & Banks, W. A. (2009) Angiotensin II modulates BBB permeability via activation of the AT(1) receptor in brain endothelial cells. *J Cereb Blood Flow Metab* **29**, 640-647, doi:10.1038/jcbfm.2008.158
- Forrester, S. J., Booz, G. W., Sigmund, C. D., Coffman, T. M., Kawai, T., Rizzo, V., Scalia, R. & Eguchi, S. (2018) Angiotensin II Signal Transduction: An Update on Mechanisms of Physiology and Pathophysiology. *Physiol Rev* **98**, 1627-1738, doi:10.1152/physrev.00038.2017
- Fouda, A. Y., Pillai, B., Dhandapani, K. M., Ergul, A. & Fagan, S. C. (2017) Role of interleukin-10 in the neuroprotective effect of the Angiotensin Type 2 Receptor agonist, compound 21, after ischemia/reperfusion injury. *Eur J Pharmacol* **799**, 128-134, doi:10.1016/j.ejphar.2017.02.016
- Franco, R., Lillo, A., Rivas-Santisteban, R., Rodriguez-Perez, A. I., Reyes-Resina, I., Labandeira-Garcia, J. L. & Navarro, G. (2020) Functional Complexes of Angiotensin-Converting Enzyme 2 and Renin-Angiotensin System Receptors: Expression in Adult but Not Fetal Lung Tissue. *Int J Mol Sci* **21**, doi:10.3390/ijms21249602
- Fu, M. L., Herlitz, H., Schulze, W., Wallukat, G., Micke, P., Eftekhari, P., Sjogren, K. G., Hjalmarson, A., Muller-Esterl, W. & Hoebeke, J. (2000) Autoantibodies against the

- angiotensin receptor (AT1) in patients with hypertension. *J Hypertens* **18**, 945-953, doi:10.1097/00004872-200018070-00017
- Gandhi, C. K., Holmes, R., Gewolb, I. H. & Uhal, B. D. (2019) Degradation of Lung Protective Angiotensin Converting Enzyme-2 by Meconium in Human Alveolar Epithelial Cells: A Potential Pathogenic Mechanism in Meconium Aspiration Syndrome. *Lung* **197**, 227-233, doi:10.1007/s00408-019-00201-y
- Gao, Q., Ou, Z., Jiang, T., Tian, Y. Y., Zhou, J. S., Wu, L., Shi, J. Q. & Zhang, Y. D. (2017) Azilsartan ameliorates apoptosis of dopaminergic neurons and rescues characteristic parkinsonian behaviors in a rat model of Parkinson's disease. *Oncotarget* **8**, 24099-24109, doi:10.18632/oncotarget.15732
- Garrido-Gil, P., Joglar, B., Rodriguez-Perez, A. I., Guerra, M. J. & Labandeira-Garcia, J. L. (2012) Involvement of PPAR-gamma in the neuroprotective and anti-inflammatory effects of angiotensin type 1 receptor inhibition: effects of the receptor antagonist telmisartan and receptor deletion in a mouse MPTP model of Parkinson's disease. *J Neuroinflammation* **9**, 38, doi:10.1186/1742-2094-9-38
- Garrido-Gil, P., Rodriguez-Perez, A. I., Dominguez-Meijide, A., Guerra, M. J. & Labandeira-Garcia, J. L. (2018) Bidirectional Neural Interaction Between Central Dopaminergic and Gut Lesions in Parkinson's Disease Models. *Mol Neurobiol* **55**, 7297-7316, doi:10.1007/s12035-018-0937-8
- Garrido-Gil, P., Rodriguez-Perez, A. I., Fernandez-Rodriguez, P., Lanciego, J. L. & Labandeira-Garcia, J. L. (2017) Expression of angiotensinogen and receptors for angiotensin and prorenin in the rat and monkey striatal neurons and glial cells. *Brain Struct Funct* **222**, 2559-2571, doi:10.1007/s00429-016-1357-z
- Garrido-Gil, P., Rodriguez-Perez, A. I., Lage, L. & Labandeira-Garcia, J. L. (2021) Estrogen Deficiency and Colonic Function: Surgical Menopause and Sex Differences in Angiotensin and Dopamine Receptor Interaction. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **76**, 1533-1541, doi:10.1093/gerona/glaa244
- Garrido-Gil, P., Valenzuela, R., Villar-Cheda, B., Lanciego, J. L. & Labandeira-Garcia, J. L. (2013) Expression of angiotensinogen and receptors for angiotensin and prorenin in the monkey and human substantia nigra: an intracellular renin-angiotensin system in the nigra. *Brain Struct Funct* **218**, 373-388, doi:10.1007/s00429-012-0402-9
- Gautheron, J., Gores, G. J. & Rodrigues, C. M. P. (2020) Lytic cell death in metabolic liver disease. *J Hepatol* **73**, 394-408, doi:10.1016/j.jhep.2020.04.001
- Gembardt, F., Sterner-Kock, A., Imboden, H., Spalteholz, M., Reibitz, F., Schultheiss, H. P., Siems, W. E. & Walther, T. (2005) Organ-specific distribution of ACE2 mRNA and correlating peptidase activity in rodents. *Peptides* **26**, 1270-1277, doi:10.1016/j.peptides.2005.01.009
- Gheblawi, M., Wang, K., Viveiros, A., Nguyen, Q., Zhong, J. C., Turner, A. J., Raizada, M. K., Grant, M. B. & Oudit, G. Y. (2020) Angiotensin-Converting Enzyme 2: SARS-CoV-2 Receptor and Regulator of the Renin-Angiotensin System: Celebrating the 20th Anniversary of the Discovery of ACE2. *Circ Res* **126**, 1456-1474, doi:10.1161/CIRCRESAHA.120.317015
- Ghosh, M., Xu, Y. & Pearce, D. D. (2016) Cyclic AMP is a key regulator of M1 to M2a phenotypic conversion of microglia in the presence of Th2 cytokines. *J Neuroinflammation* **13**, 9, doi:10.1186/s12974-015-0463-9
- Gildea, J. J. (2009) Dopamine and angiotensin as renal counterregulatory systems controlling sodium balance. *Curr Opin Nephrol Hypertens* **18**, 28-32, doi:10.1097/MNH.0b013e32831a9e0b

- Gildea, J. J., Xu, P., Kemp, B. A., Carey, R. M., Jose, P. A. & Felder, R. A. (2019) The Dopamine D1 Receptor and Angiotensin II Type-2 Receptor are Required for Inhibition of Sodium Transport Through a Protein Phosphatase 2A Pathway. *Hypertension* **73**, 1258-1265, doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.119.12705
- Gohlke, P., Von Kugelgen, S., Jurgensen, T., Kox, T., Rascher, W., Culman, J. & Unger, T. (2002) Effects of orally applied candesartan cilexetil on central responses to angiotensin II in conscious rats. *J Hypertens* **20**, 909-918, doi:10.1097/00004872-200205000-00026
- Grammatopoulos, T. N., Jones, S. M., Ahmadi, F. A., Hoover, B. R., Snell, L. D., Skoch, J., Jhaveri, V. V., Poczubutt, A. M., Weyhenmeyer, J. A. & Zawada, W. M. (2007) Angiotensin type 1 receptor antagonist losartan, reduces MPTP-induced degeneration of dopaminergic neurons in substantia nigra. *Mol Neurodegener* **2**, 1, doi:10.1186/1750-1326-2-1
- Gray, M. T. & Woulfe, J. M. (2015) Striatal blood-brain barrier permeability in Parkinson's disease. *J Cereb Blood Flow Metab* **35**, 747-750, doi:10.1038/jcbfm.2015.32
- Greenhill, C. J., Jones, G. W., Nowell, M. A., Newton, Z., Harvey, A. K., Moideen, A. N., Collins, F. L., Bloom, A. C., Coll, R. C., Robertson, A. A., Cooper, M. A., Rosas, M., Taylor, P. R., O'Neill, L. A., Humphreys, I. R., Williams, A. S. & Jones, S. A. (2014) Interleukin-10 regulates the inflammasome-driven augmentation of inflammatory arthritis and joint destruction. *Arthritis Res Ther* **16**, 419, doi:10.1186/s13075-014-0419-y
- Griendling, K. K., Sorescu, D. & Ushio-Fukai, M. (2000) NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* **86**, 494-501, doi:10.1161/01.res.86.5.494
- Grobe, J. L., Xu, D. & Sigmund, C. D. (2008) An intracellular renin-angiotensin system in neurons: fact, hypothesis, or fantasy. *Physiology (Bethesda)* **23**, 187-193, doi:10.1152/physiol.00002.2008
- Guan, W. J., Liang, W. H., Zhao, Y., Liang, H. R., Chen, Z. S., Li, Y. M., Liu, X. Q., Chen, R. C., Tang, C. L., Wang, T., Ou, C. Q., Li, L., Chen, P. Y., Sang, L., Wang, W., Li, J. F., Li, C. C., Ou, L. M., Cheng, B., Xiong, S., Ni, Z. Y., Xiang, J., Hu, Y., Liu, L., Shan, H., Lei, C. L., Peng, Y. X., Wei, L., Liu, Y., Hu, Y. H., Peng, P., Wang, J. M., Liu, J. Y., Chen, Z., Li, G., Zheng, Z. J., Qiu, S. Q., Luo, J., Ye, C. J., Zhu, S. Y., Cheng, L. L., Ye, F., Li, S. Y., Zheng, J. P., Zhang, N. F., Zhong, N. S., He, J. X. & China Medical Treatment Expert Group for, C. (2020) Comorbidity and its impact on 1590 patients with COVID-19 in China: a nationwide analysis. *Eur Respir J* **55**, doi:10.1183/13993003.00547-2020
- Gundersen, H. J., Bendtsen, T. F., Korbo, L., Marcussen, N., Moller, A., Nielsen, K., Nyengaard, J. R., Pakkenberg, B., Sorensen, F. B., Vesterby, A. & et al. (1988) Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS* **96**, 379-394, doi:10.1111/j.1699-0463.1988.tb05320.x
- Gunther, J., Kill, A., Becker, M. O., Heidecke, H., Rademacher, J., Siegert, E., Radic, M., Burmester, G. R., Dragun, D. & Riemekasten, G. (2014) Angiotensin receptor type 1 and endothelin receptor type A on immune cells mediate migration and the expression of IL-8 and CCL18 when stimulated by autoantibodies from systemic sclerosis patients. *Arthritis Res Ther* **16**, R65, doi:10.1186/ar4503
- Guo, Y. R., Cao, Q. D., Hong, Z. S., Tan, Y. Y., Chen, S. D., Jin, H. J., Tan, K. S., Wang, D. Y. & Yan, Y. (2020) The origin, transmission and clinical therapies on coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak - an update on the status. *Mil Med Res* **7**, 11, doi:10.1186/s40779-020-00240-0

- Gurwitz, D. (2020) Angiotensin receptor blockers as tentative SARS-CoV-2 therapeutics. *Drug Dev Res* **81**, 537-540, doi:10.1002/ddr.21656
- Habib, P. & Beyer, C. (2015) Regulation of brain microglia by female gonadal steroids. *J Steroid Biochem Mol Biol* **146**, 3-14, doi:10.1016/j.jsbmb.2014.02.018
- Haga, S., Nagata, N., Okamura, T., Yamamoto, N., Sata, T., Yamamoto, N., Sasazuki, T. & Ishizaka, Y. (2010) TACE antagonists blocking ACE2 shedding caused by the spike protein of SARS-CoV are candidate antiviral compounds. *Antiviral Res* **85**, 551-555, doi:10.1016/j.antiviral.2009.12.001
- Haga, S., Yamamoto, N., Nakai-Murakami, C., Osawa, Y., Tokunaga, K., Sata, T., Yamamoto, N., Sasazuki, T. & Ishizaka, Y. (2008) Modulation of TNF-alpha-converting enzyme by the spike protein of SARS-CoV and ACE2 induces TNF-alpha production and facilitates viral entry. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 7809-7814, doi:10.1073/pnas.0711241105
- Hamel, E., Royea, J., Ongali, B. & Tong, X. K. (2016) Neurovascular and Cognitive failure in Alzheimer's Disease: Benefits of Cardiovascular Therapy. *Cell Mol Neurobiol* **36**, 219-232, doi:10.1007/s10571-015-0285-4
- Hamming, I., Timens, W., Bulthuis, M. L., Lely, A. T., Navis, G. & van Goor, H. (2004) Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis. *J Pathol* **203**, 631-637, doi:10.1002/path.1570
- Han, J., Fan, Y., Zhou, K., Blomgren, K. & Harris, R. A. (2021) Uncovering sex differences of rodent microglia. *J Neuroinflammation* **18**, 74, doi:10.1186/s12974-021-02124-z
- Hanamsagar, R., Alter, M. D., Block, C. S., Sullivan, H., Bolton, J. L. & Bilbo, S. D. (2017) Generation of a microglial developmental index in mice and in humans reveals a sex difference in maturation and immune reactivity. *Glia* **65**, 1504-1520, doi:10.1002/glia.23176
- Hansen, C. & Li, J. Y. (2012) Beyond alpha-synuclein transfer: pathology propagation in Parkinson's disease. *Trends Mol Med* **18**, 248-255, doi:10.1016/j.molmed.2012.03.002
- Haraguchi, T., Iwasaki, K., Takasaki, K., Uchida, K., Naito, T., Nogami, A., Kubota, K., Shindo, T., Uchida, N., Katsurabayashi, S., Mishima, K., Nishimura, R. & Fujiwara, M. (2010) Telmisartan, a partial agonist of peroxisome proliferator-activated receptor gamma, improves impairment of spatial memory and hippocampal apoptosis in rats treated with repeated cerebral ischemia. *Brain Res* **1353**, 125-132, doi:10.1016/j.brainres.2010.07.017
- Harlid, S., Myte, R. & Van Guelpen, B. (2017) The Metabolic Syndrome, Inflammation, and Colorectal Cancer Risk: An Evaluation of Large Panels of Plasma Protein Markers Using Repeated, Prediagnostic Samples. *Mediators Inflamm* **2017**, 4803156, doi:10.1155/2017/4803156
- Harmer, D., Gilbert, M., Borman, R. & Clark, K. L. (2002) Quantitative mRNA expression profiling of ACE 2, a novel homologue of angiotensin converting enzyme. *FEBS Lett* **532**, 107-110, doi:10.1016/s0014-5793(02)03640-2
- Harms, A. S., Cao, S., Rowse, A. L., Thome, A. D., Li, X., Mangieri, L. R., Cron, R. Q., Shacka, J. J., Raman, C. & Standaert, D. G. (2013) MHCII is required for alpha-synuclein-induced activation of microglia, CD4 T cell proliferation, and dopaminergic neurodegeneration. *J Neurosci* **33**, 9592-9600, doi:10.1523/JNEUROSCI.5610-12.2013

- Harms, A. S., Ferreira, S. A. & Romero-Ramos, M. (2021) Periphery and brain, innate and adaptive immunity in Parkinson's disease. *Acta Neuropathol* **141**, 527-545, doi:10.1007/s00401-021-02268-5
- Harry, G. J. & Kraft, A. D. (2008) Neuroinflammation and microglia: considerations and approaches for neurotoxicity assessment. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **4**, 1265-1277, doi:10.1517/17425255.4.10.1265
- Hartl, D., He, C. H., Koller, B., Da Silva, C. A., Homer, R., Lee, C. G. & Elias, J. A. (2008) Acidic mammalian chitinase is secreted via an ADAM17/epidermal growth factor receptor-dependent pathway and stimulates chemokine production by pulmonary epithelial cells. *J Biol Chem* **283**, 33472-33482, doi:10.1074/jbc.M805574200
- Hein, L., Barsh, G. S., Pratt, R. E., Dzau, V. J. & Kobilka, B. K. (1995) Behavioural and cardiovascular effects of disrupting the angiotensin II type-2 receptor in mice. *Nature* **377**, 744-747, doi:10.1038/377744a0
- Herbert, K. E., Mistry, Y., Hastings, R., Poolman, T., Niklason, L. & Williams, B. (2008) Angiotensin II-mediated oxidative DNA damage accelerates cellular senescence in cultured human vascular smooth muscle cells via telomere-dependent and independent pathways. *Circ Res* **102**, 201-208, doi:10.1161/CIRCRESAHA.107.158626
- Herichova, I. & Szantooova, K. (2013) Renin-angiotensin system: upgrade of recent knowledge and perspectives. *Endocr Regul* **47**, 39-52, doi:10.4149/endo_2013_01_39
- Herro, R. & Croft, M. (2016) The control of tissue fibrosis by the inflammatory molecule LIGHT (TNF Superfamily member 14). *Pharmacol Res* **104**, 151-155, doi:10.1016/j.phrs.2015.12.018
- Hirawa, N., Uehara, Y., Kawabata, Y., Numabe, A., Gomi, T., Ikeda, T., Suzuki, T., Goto, A., Toyooka, T. & Omata, M. (1999) Long-term inhibition of renin-angiotensin system sustains memory function in aged Dahl rats. *Hypertension* **34**, 496-502, doi:10.1161/01.hyp.34.3.496
- Hoenen, C., Gustin, A., Birck, C., Kirchmeyer, M., Beaume, N., Felten, P., Grandbarbe, L., Heuschling, P. & Heurtaux, T. (2016) Alpha-Synuclein Proteins Promote Pro-Inflammatory Cascades in Microglia: Stronger Effects of the A53T Mutant. *PLoS One* **11**, e0162717, doi:10.1371/journal.pone.0162717
- Hoffmann, M., Kleine-Weber, H., Schroeder, S., Kruger, N., Herrler, T., Erichsen, S., Schiergens, T. S., Herrler, G., Wu, N. H., Nitsche, A., Muller, M. A., Drosten, C. & Pohlmann, S. (2020) SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell* **181**, 271-280 e278, doi:10.1016/j.cell.2020.02.052
- Hong, H., Zeng, J. S., Kreulen, D. L., Kaufman, D. I. & Chen, A. F. (2006) Atorvastatin protects against cerebral infarction via inhibition of NADPH oxidase-derived superoxide in ischemic stroke. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **291**, H2210-2215, doi:10.1152/ajpheart.01270.2005
- Hong, S., Xin, Y., HaiQin, W., GuiLian, Z., Ru, Z., ShuQin, Z., HuQing, W., Li, Y. & Yun, D. (2012) The PPARgamma agonist rosiglitazone prevents cognitive impairment by inhibiting astrocyte activation and oxidative stress following pilocarpine-induced status epilepticus. *Neurol Sci* **33**, 559-566, doi:10.1007/s10072-011-0774-2
- Horvath, R. J., Nutile-McMenemy, N., Alkaitis, M. S. & Deleo, J. A. (2008) Differential migration, LPS-induced cytokine, chemokine, and NO expression in immortalized BV-2 and HAPI cell lines and primary microglial cultures. *J Neurochem* **107**, 557-569, doi:10.1111/j.1471-4159.2008.05633.x

- Hu, G., Antikainen, R., Jousilahti, P., Kivipelto, M. & Tuomilehto, J. (2008) Total cholesterol and the risk of Parkinson disease. *Neurology* **70**, 1972-1979, doi:10.1212/01.wnl.0000312511.62699.a8
- Hu, G., Jousilahti, P., Nissinen, A., Antikainen, R., Kivipelto, M. & Tuomilehto, J. (2006) Body mass index and the risk of Parkinson disease. *Neurology* **67**, 1955-1959, doi:10.1212/01.wnl.0000247052.18422.e5
- Huang, M. L., Li, X., Meng, Y., Xiao, B., Ma, Q., Ying, S. S., Wu, P. S. & Zhang, Z. S. (2010) Upregulation of angiotensin-converting enzyme (ACE) 2 in hepatic fibrosis by ACE inhibitors. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **37**, e1-6, doi:10.1111/j.1440-1681.2009.05302.x
- Hubel, C. A., Wallukat, G., Wolf, M., Herse, F., Rajakumar, A., Roberts, J. M., Markovic, N., Thadhani, R., Luft, F. C. & Dechend, R. (2007) Agonistic angiotensin II type 1 receptor autoantibodies in postpartum women with a history of preeclampsia. *Hypertension* **49**, 612-617, doi:10.1161/01.HYP.0000256565.20983.d4
- Hussain, M. & Awan, F. R. (2018) Hypertension regulating angiotensin peptides in the pathobiology of cardiovascular disease. *Clin Exp Hypertens* **40**, 344-352, doi:10.1080/10641963.2017.1377218
- Ichiki, T., Kambayashi, Y. & Inagami, T. (1995) Multiple growth factors modulate mRNA expression of angiotensin II type-2 receptor in R3T3 cells. *Circ Res* **77**, 1070-1076, doi:10.1161/01.res.77.6.1070
- Inada, Y., Ojima, M., Kanagawa, R., Misumi, Y., Nishikawa, K. & Naka, T. (1999) Pharmacologic properties of candesartan cilexetil--possible mechanisms of long-acting antihypertensive action. *J Hum Hypertens* **13 Suppl 1**, S75-80, doi:10.1038/sj.jhh.1000749
- Inoue, Y., Tanaka, N., Tanaka, Y., Inoue, S., Morita, K., Zhuang, M., Hattori, T. & Sugamura, K. (2007) Clathrin-dependent entry of severe acute respiratory syndrome coronavirus into target cells expressing ACE2 with the cytoplasmic tail deleted. *J Virol* **81**, 8722-8729, doi:10.1128/JVI.00253-07
- Iovino, L., Tremblay, M. E. & Civiero, L. (2020) Glutamate-induced excitotoxicity in Parkinson's disease: The role of glial cells. *J Pharmacol Sci* **144**, 151-164, doi:10.1016/j.jphs.2020.07.011
- Irani, R. A., Zhang, Y., Zhou, C. C., Blackwell, S. C., Hicks, M. J., Ramin, S. M., Kellems, R. E. & Xia, Y. (2010) Autoantibody-mediated angiotensin receptor activation contributes to preeclampsia through tumor necrosis factor-alpha signaling. *Hypertension* **55**, 1246-1253, doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.150540
- Iwai, N. & Inagami, T. (1992) Identification of two subtypes in the rat type I angiotensin II receptor. *FEBS Lett* **298**, 257-260, doi:10.1016/0014-5793(92)80071-n
- Iwanami, J., Mogi, M., Tsukuda, K., Min, L. J., Sakata, A., Jing, F., Iwai, M. & Horiuchi, M. (2010) Low dose of telmisartan prevents ischemic brain damage with peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activation in diabetic mice. *J Hypertens* **28**, 1730-1737, doi:10.1097/HJH.0b013e32833a551a
- Izco, M., Blesa, J., Verona, G., Cooper, J. M. & Alvarez-Erviti, L. (2021) Glial activation precedes alpha-synuclein pathology in a mouse model of Parkinson's disease. *Neurosci Res* **170**, 330-340, doi:10.1016/j.neures.2020.11.004
- Jackson, L., Eldahshan, W., Fagan, S. C. & Ergul, A. (2018) Within the Brain: The Renin Angiotensin System. *Int J Mol Sci* **19**, doi:10.3390/ijms19030876
- Jackson-Lewis, V., Blesa, J. & Przedborski, S. (2012) Animal models of Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* **18 Suppl 1**, S183-185, doi:10.1016/S1353-8020(11)70057-8

- Jessup, J. A., Gallagher, P. E., Averill, D. B., Brosnihan, K. B., Tallant, E. A., Chappell, M. C. & Ferrario, C. M. (2006) Effect of angiotensin II blockade on a new congenic model of hypertension derived from transgenic Ren-2 rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **291**, H2166-2172, doi:10.1152/ajpheart.00061.2006
- Jia, C., Keasey, M. P., Malone, H. M., Lovins, C. & Hagg, T. (2020) Vitronectin mitigates stroke-increased neurogenesis only in female mice and through FAK-regulated IL-6. *Exp Neurol* **323**, 113088, doi:10.1016/j.expneurol.2019.113088
- Jia, H. P., Look, D. C., Tan, P., Shi, L., Hickey, M., Gakhar, L., Chappell, M. C., Wohlford-Lenane, C. & McCray, P. B., Jr. (2009) Ectodomain shedding of angiotensin converting enzyme 2 in human airway epithelia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **297**, L84-96, doi:10.1152/ajplung.00071.2009
- Jiang, T., Gao, L., Lu, J. & Zhang, Y. D. (2013) ACE2-Ang-(1-7)-Mas Axis in Brain: A Potential Target for Prevention and Treatment of Ischemic Stroke. *Curr Neuropharmacol* **11**, 209-217, doi:10.2174/1570159X11311020007
- Jiang, T., Hoekstra, J., Heng, X., Kang, W., Ding, J., Liu, J., Chen, S. & Zhang, J. (2015) P2X7 receptor is critical in alpha-synuclein--mediated microglial NADPH oxidase activation. *Neurobiol Aging* **36**, 2304-2318, doi:10.1016/j.neurobiolaging.2015.03.015
- Jiang, Y., Xu, J., Zhou, C., Wu, Z., Zhong, S., Liu, J., Luo, W., Chen, T., Qin, Q. & Deng, P. (2005) Characterization of cytokine/chemokine profiles of severe acute respiratory syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* **171**, 850-857, doi:10.1164/rccm.200407-857OC
- Jo, Y., Kim, S., Ye, B. S., Lee, E. & Yu, Y. M. (2022) Protective Effect of Renin-Angiotensin System Inhibitors on Parkinson's Disease: A Nationwide Cohort Study. *Front Pharmacol* **13**, 837890, doi:10.3389/fphar.2022.837890
- Joers, V., Tansey, M. G., Mulas, G. & Carta, A. R. (2017) Microglial phenotypes in Parkinson's disease and animal models of the disease. *Prog Neurobiol* **155**, 57-75, doi:10.1016/j.pneurobio.2016.04.006
- Joglar, B., Rodriguez-Pallares, J., Rodriguez-Perez, A. I., Rey, P., Guerra, M. J. & Labandeira-Garcia, J. L. (2009) The inflammatory response in the MPTP model of Parkinson's disease is mediated by brain angiotensin: relevance to progression of the disease. *J Neurochem* **109**, 656-669, doi:10.1111/j.1471-4159.2009.05999.x
- Kamath, T., Abdulraouf, A., Burris, S. J., Langlieb, J., Gazestani, V., Nadaf, N. M., Balderrama, K., Vanderburg, C. & Macosko, E. Z. (2022) Single-cell genomic profiling of human dopamine neurons identifies a population that selectively degenerates in Parkinson's disease. *Nat Neurosci* **25**, 588-595, doi:10.1038/s41593-022-01061-1
- Karnik, S. S., Singh, K. D., Tirupula, K. & Unal, H. (2017) Significance of angiotensin 1-7 coupling with MAS1 receptor and other GPCRs to the renin-angiotensin system: IUPHAR Review 22. *Br J Pharmacol* **174**, 737-753, doi:10.1111/bph.13742
- Kashiwagi, E., Shiota, M., Yokomizo, A., Inokuchi, J., Uchiumi, T. & Naito, S. (2014) EP2 signaling mediates suppressive effects of celecoxib on androgen receptor expression and cell proliferation in prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis* **17**, 10-17, doi:10.1038/pcan.2013.53
- Keidar, S., Gamliel-Lazarovich, A., Kaplan, M., Pavlotzky, E., Hamoud, S., Hayek, T., Karry, R. & Abassi, Z. (2005) Mineralocorticoid receptor blocker increases angiotensin-converting enzyme 2 activity in congestive heart failure patients. *Circ Res* **97**, 946-953, doi:10.1161/01.RES.0000187500.24964.7A
- Kemp, B. A., Howell, N. L., Keller, S. R., Gildea, J. J., Shao, W., Navar, L. G. & Carey, R. M. (2019) Defective Renal Angiotensin III and AT2 Receptor Signaling in

- Prehypertensive Spontaneously Hypertensive Rats. *J Am Heart Assoc* **8**, e012016, doi:10.1161/JAHA.119.012016
- Kempuraj, D., Thangavel, R., Natteru, P. A., Selvakumar, G. P., Saeed, D., Zahoor, H., Zaheer, S., Iyer, S. S. & Zaheer, A. (2016) Neuroinflammation Induces Neurodegeneration. *J Neurol Neurosurg Spine* **1**
- Kerr, N., Dietrich, D. W., Bramlett, H. M. & Raval, A. P. (2019) Sexually dimorphic microglia and ischemic stroke. *CNS Neurosci Ther* **25**, 1308-1317, doi:10.1111/cns.13267
- Khorooshi, R., Tofte-Hansen, E. U., Tygesen, C., Montanana-Rosell, R., Limburg, H. L., Marczyńska, J., Asgari, N., Steckelings, U. M. & Owens, T. (2020) Angiotensin AT2 receptor-induced interleukin-10 attenuates neuromyelitis optica spectrum disorder-like pathology. *Mult Scler* **26**, 1187-1196, doi:10.1177/1352458519860327
- Kim, C. & Lee, S. J. (2008) Controlling the mass action of alpha-synuclein in Parkinson's disease. *J Neurochem* **107**, 303-316, doi:10.1111/j.1471-4159.2008.05612.x
- Kim, G. J., Mo, H., Liu, H., Wu, Z., Chen, S., Zheng, J., Zhao, X., Nucleum, D., Shortland, J., Peng, L., Elepano, M., Tang, B., Olson, S., Paras, N., Li, H., Renslo, A. R., Arkin, M. R., Huang, B., Lu, B., Sirota, M. & Guo, S. (2021) A zebrafish screen reveals Renin-angiotensin system inhibitors as neuroprotective via mitochondrial restoration in dopamine neurons. *Elife* **10**, doi:10.7554/eLife.69795
- King, S. J. & Oparil, S. (1992) Converting-enzyme inhibitors increase converting-enzyme mRNA and activity in endothelial cells. *Am J Physiol* **263**, C743-749, doi:10.1152/ajpcell.1992.263.4.C743
- Kishi, T., Hirooka, Y. & Sunagawa, K. (2012) Telmisartan protects against cognitive decline via up-regulation of brain-derived neurotrophic factor/tropomyosin-related kinase B in hippocampus of hypertensive rats. *J Cardiol* **60**, 489-494, doi:10.1016/j.jjcc.2012.08.004
- Klein, N., Gembardt, F., Supe, S., Kaestle, S. M., Nickles, H., Erfinanda, L., Lei, X., Yin, J., Wang, L., Mertens, M., Szaszi, K., Walther, T. & Kuebler, W. M. (2013) Angiotensin-(1-7) protects from experimental acute lung injury. *Crit Care Med* **41**, e334-343, doi:10.1097/CCM.0b013e31828a6688
- Kononchik, J., Ireland, J., Zou, Z., Segura, J., Holzapfel, G., Chastain, A., Wang, R., Spencer, M., He, B., Stutzman, N., Kano, D., Arthos, J., Fischer, E., Chun, T. W., Moir, S. & Sun, P. (2018) HIV-1 targets L-selectin for adhesion and induces its shedding for viral release. *Nat Commun* **9**, 2825, doi:10.1038/s41467-018-05197-2
- Koprich, J. B., Kalia, L. V. & Brotchie, J. M. (2017) Animal models of alpha-synucleinopathy for Parkinson disease drug development. *Nat Rev Neurosci* **18**, 515-529, doi:10.1038/nrn.2017.75
- Koprich, J. B., Reske-Nielsen, C., Mithal, P. & Isacson, O. (2008) Neuroinflammation mediated by IL-1beta increases susceptibility of dopamine neurons to degeneration in an animal model of Parkinson's disease. *J Neuroinflammation* **5**, 8, doi:10.1186/1742-2094-5-8
- Koren, G., Norton, G., Radinsky, K. & Shalev, V. (2019) Chronic Use of beta-Blockers and the Risk of Parkinson's Disease. *Clin Drug Investig* **39**, 463-468, doi:10.1007/s40261-019-00771-y
- Kuba, K., Imai, Y. & Penninger, J. M. (2013) Multiple functions of angiotensin-converting enzyme 2 and its relevance in cardiovascular diseases. *Circ J* **77**, 301-308, doi:10.1253/circj.cj-12-1544
- Labandeira, C. M., Fraga-Bau, A., Arias Ron, D., Munoz, A., Alonso-Losada, G., Koukoulis, A., Romero-Lopez, J. & Rodriguez-Perez, A. I. (2021) Diabetes, insulin and new therapeutic strategies for Parkinson's disease: Focus on glucagon-like peptide-1

- receptor agonists. *Front Neuroendocrinol* **62**, 100914, doi:10.1016/j.yfrne.2021.100914
- Labandeira-Garcia, J. L., Labandeira, C. M., Valenzuela, R., Pedrosa, M. A., Quijano, A. & Rodriguez-Perez, A. I. (2022) Drugs Modulating Renin-Angiotensin System in COVID-19 Treatment. *Biomedicines* **10**, doi:10.3390/biomedicines10020502
- Labandeira-Garcia, J. L. & Parga, J. A. (2022) Nigral Neurons Degenerating in Parkinson's Disease Express the Angiotensin Receptor Type 1 Gene. *Mov Disord*, doi:10.1002/mds.29137
- Labandeira-Garcia, J. L., Rodriguez-Pallares, J., Dominguez-Meijide, A., Valenzuela, R., Villar-Cheda, B. & Rodriguez-Perez, A. I. (2013) Dopamine-angiotensin interactions in the basal ganglia and their relevance for Parkinson's disease. *Mov Disord* **28**, 1337-1342, doi:10.1002/mds.25614
- Labandeira-Garcia, J. L., Rodriguez-Pallares, J., Villar-Cheda, B., Rodriguez-Perez, A. I., Garrido-Gil, P. & Guerra, M. J. (2011) Aging, Angiotensin system and dopaminergic degeneration in the substantia nigra. *Aging Dis* **2**, 257-274
- Labandeira-Garcia, J. L., Rodriguez-Perez, A. I., Garrido-Gil, P., Rodriguez-Pallares, J., Lanciego, J. L. & Guerra, M. J. (2017) Brain Renin-Angiotensin System and Microglial Polarization: Implications for Aging and Neurodegeneration. *Front Aging Neurosci* **9**, 129, doi:10.3389/fnagi.2017.00129
- Labandeira-Garcia, J. L., Rodriguez-Perez, A. I., Valenzuela, R., Costa-Besada, M. A. & Guerra, M. J. (2016) Menopause and Parkinson's disease. Interaction between estrogens and brain renin-angiotensin system in dopaminergic degeneration. *Front Neuroendocrinol* **43**, 44-59, doi:10.1016/j.yfrne.2016.09.003
- Labandeira-Garcia, J. L., Valenzuela, R., Costa-Besada, M. A., Villar-Cheda, B. & Rodriguez-Perez, A. I. (2021) The intracellular renin-angiotensin system: Friend or foe. Some light from the dopaminergic neurons. *Prog Neurobiol* **199**, 101919, doi:10.1016/j.pneurobio.2020.101919
- LaMarca, B., Parrish, M., Ray, L. F., Murphy, S. R., Roberts, L., Glover, P., Wallukat, G., Wenzel, K., Cockrell, K., Martin, J. N., Jr., Ryan, M. J. & Dechend, R. (2009) Hypertension in response to autoantibodies to the angiotensin II type I receptor (AT1-AA) in pregnant rats: role of endothelin-1. *Hypertension* **54**, 905-909, doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.137935
- LaMarca, B., Wallace, K. & Granger, J. (2011) Role of angiotensin II type I receptor agonistic autoantibodies (AT1-AA) in preeclampsia. *Curr Opin Pharmacol* **11**, 175-179, doi:10.1016/j.coph.2011.01.003
- LaMarca, B., Wallukat, G., Llinas, M., Herse, F., Dechend, R. & Granger, J. P. (2008) Autoantibodies to the angiotensin type I receptor in response to placental ischemia and tumor necrosis factor alpha in pregnant rats. *Hypertension* **52**, 1168-1172, doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.108.120576
- Lambert, D. W., Yarski, M., Warner, F. J., Thornhill, P., Parkin, E. T., Smith, A. I., Hooper, N. M. & Turner, A. J. (2005) Tumor necrosis factor-alpha convertase (ADAM17) mediates regulated ectodomain shedding of the severe-acute respiratory syndrome-coronavirus (SARS-CoV) receptor, angiotensin-converting enzyme-2 (ACE2). *J Biol Chem* **280**, 30113-30119, doi:10.1074/jbc.M505111200
- Lanfranco, M. F., Mucchetti, I., Burns, M. P. & Villapol, S. (2017) Glial- and Neuronal-Specific Expression of CCL5 mRNA in the Rat Brain. *Front Neuroanat* **11**, 137, doi:10.3389/fnana.2017.00137
- Larson, P. S. (2014) Deep brain stimulation for movement disorders. *Neurotherapeutics* **11**, 465-474, doi:10.1007/s13311-014-0274-1

- Laudisio, A., Lo Monaco, M. R., Silveri, M. C., Bentivoglio, A. R., Vetrano, D. L., Pisciotta, M. S., Brandi, V., Bernabei, R. & Zuccala, G. (2017) Use of ACE-inhibitors and falls in patients with Parkinson's disease. *Gait Posture* **54**, 39-44, doi:10.1016/j.gaitpost.2017.02.007
- Lautner, R. Q., Villela, D. C., Fraga-Silva, R. A., Silva, N., Verano-Braga, T., Costa-Fraga, F., Jankowski, J., Jankowski, V., Sousa, F., Alzamora, A., Soares, E., Barbosa, C., Kjeldsen, F., Oliveira, A., Braga, J., Savergnini, S., Maia, G., Peluso, A. B., Passos-Silva, D., Ferreira, A., Alves, F., Martins, A., Raizada, M., Paula, R., Motta-Santos, D., Klempin, F., Pimenta, A., Alenina, N., Sinisterra, R., Bader, M., Campagnole-Santos, M. J. & Santos, R. A. (2013) Discovery and characterization of alamandine: a novel component of the renin-angiotensin system. *Circ Res* **112**, 1104-1111, doi:10.1161/CIRCRESAHA.113.301077
- Lee, E. J., Woo, M. S., Moon, P. G., Baek, M. C., Choi, I. Y., Kim, W. K., Junn, E. & Kim, H. S. (2010) Alpha-synuclein activates microglia by inducing the expressions of matrix metalloproteinases and the subsequent activation of protease-activated receptor-1. *J Immunol* **185**, 615-623, doi:10.4049/jimmunol.0903480
- Lee, J. K., Tran, T. & Tansey, M. G. (2009) Neuroinflammation in Parkinson's disease. *J Neuroimmune Pharmacol* **4**, 419-429, doi:10.1007/s11481-009-9176-0
- Lee, J. W., Chun, W., Lee, H. J., Kim, S. M., Min, J. H., Kim, D. Y., Kim, M. O., Ryu, H. W. & Lee, S. U. (2021) The Role of Microglia in the Development of Neurodegenerative Diseases. *Biomedicines* **9**, doi:10.3390/biomedicines9101449
- Lee, Y. C., Lin, C. H., Wu, R. M., Lin, J. W., Chang, C. H. & Lai, M. S. (2014) Antihypertensive agents and risk of Parkinson's disease: a nationwide cohort study. *PLoS One* **9**, e98961, doi:10.1371/journal.pone.0098961
- Leehey, M., Luo, S., Sharma, S., Wills, A. A., Bainbridge, J. L., Wong, P. S., Simon, D. K., Schneider, J., Zhang, Y., Perez, A., Dhall, R., Christine, C. W., Singer, C., Cambi, F. & Boyd, J. T. (2017) Association of metabolic syndrome and change in Unified Parkinson's Disease Rating Scale scores. *Neurology* **89**, 1789-1794, doi:10.1212/WNL.0000000000004572
- Li, H., Horke, S. & Forstermann, U. (2013) Oxidative stress in vascular disease and its pharmacological prevention. *Trends Pharmacol Sci* **34**, 313-319, doi:10.1016/j.tips.2013.03.007
- Lin, H. C., Tseng, Y. F., Shen, A. L., Chao, J. C., Hsu, C. Y. & Lin, H. L. (2022) Association of Angiotensin Receptor Blockers with Incident Parkinson Disease in Patients with Hypertension: A Retrospective Cohort Study. *Am J Med*, doi:10.1016/j.amjmed.2022.04.029
- Liu, C., Kellems, R. E. & Xia, Y. (2017a) Inflammation, Autoimmunity, and Hypertension: The Essential Role of Tissue Transglutaminase. *Am J Hypertens* **30**, 756-764, doi:10.1093/ajh/hpx027
- Liu, C., Luo, R., Elliott, S. E., Wang, W., Parchim, N. F., Iriyama, T., Daugherty, P. S., Blackwell, S. C., Sibai, B. M., Kellems, R. E. & Xia, Y. (2015) Elevated Transglutaminase Activity Triggers Angiotensin Receptor Activating Autoantibody Production and Pathophysiology of Preeclampsia. *J Am Heart Assoc* **4**, doi:10.1161/JAHA.115.002323
- Liu, C., Luo, R., Wang, W., Peng, Z., Johnson, G. V. W., Kellems, R. E. & Xia, Y. (2019) Tissue Transglutaminase-Mediated AT1 Receptor Sensitization Underlies Pro-inflammatory Cytokine LIGHT-Induced Hypertension. *Am J Hypertens* **32**, 476-485, doi:10.1093/ajh/hpz018

- Liu, Q., Du, J., Yu, X., Xu, J., Huang, F., Li, X., Zhang, C., Li, X., Chang, J., Shang, D., Zhao, Y., Tian, M., Lu, H., Xu, J., Li, C., Zhu, H., Jin, N. & Jiang, C. (2017b) miRNA-200c-3p is crucial in acute respiratory distress syndrome. *Cell Discov* **3**, 17021, doi:10.1038/celldisc.2017.21
- Liu, Y., Yang, Y., Zhang, C., Huang, F., Wang, F., Yuan, J., Wang, Z., Li, J., Li, J., Feng, C., Zhang, Z., Wang, L., Peng, L., Chen, L., Qin, Y., Zhao, D., Tan, S., Yin, L., Xu, J., Zhou, C., Jiang, C. & Liu, L. (2020) Clinical and biochemical indexes from 2019-nCoV infected patients linked to viral loads and lung injury. *Sci China Life Sci* **63**, 364-374, doi:10.1007/s11427-020-1643-8
- Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**, 402-408, doi:10.1006/meth.2001.1262
- Lobo-Silva, D., Carriche, G. M., Castro, A. G., Roque, S. & Saraiva, M. (2016) Balancing the immune response in the brain: IL-10 and its regulation. *J Neuroinflammation* **13**, 297, doi:10.1186/s12974-016-0763-8
- Loera-Valencia, R., Goikolea, J., Parrado-Fernandez, C., Merino-Serrais, P. & Maioli, S. (2019) Alterations in cholesterol metabolism as a risk factor for developing Alzheimer's disease: Potential novel targets for treatment. *J Steroid Biochem Mol Biol* **190**, 104-114, doi:10.1016/j.jsbmb.2019.03.003
- Lopes, F. M., Bristot, I. J., da Motta, L. L., Parsons, R. B. & Klamt, F. (2017) Mimicking Parkinson's Disease in a Dish: Merits and Pitfalls of the Most Commonly used Dopaminergic In Vitro Models. *Neuromolecular Med* **19**, 241-255, doi:10.1007/s12017-017-8454-x
- Lopez-Lopez, A., Villar-Cheda, B., Quijano, A., Garrido-Gil, P., Garcia-Garrote, M., Diaz-Ruiz, C., Munoz, A. & Labandeira-Garcia, J. L. (2021) NADPH-Oxidase, Rho-Kinase and Autophagy Mediate the (Pro)renin-Induced Pro-Inflammatory Microglial Response and Enhancement of Dopaminergic Neuron Death. *Antioxidants (Basel)* **10**, doi:10.3390/antiox10091340
- Lopez-Real, A., Rey, P., Soto-Otero, R., Mendez-Alvarez, E. & Labandeira-Garcia, J. L. (2005) Angiotensin-converting enzyme inhibition reduces oxidative stress and protects dopaminergic neurons in a 6-hydroxydopamine rat model of Parkinsonism. *J Neurosci Res* **81**, 865-873, doi:10.1002/jnr.20598
- Lorenz, J. N., Weihprecht, H., He, X. R., Skott, O., Briggs, J. P. & Schnermann, J. (1993) Effects of adenosine and angiotensin on macula densa-stimulated renin secretion. *Am J Physiol* **265**, F187-194, doi:10.1152/ajprenal.1993.265.2.F187
- Lu, J., Sun, F., Ma, H., Qing, H. & Deng, Y. (2015) Comparison between alpha-synuclein wild-type and A53T mutation in a progressive Parkinson's disease model. *Biochem Biophys Res Commun* **464**, 988-993, doi:10.1016/j.bbrc.2015.07.007
- Lu, Y., Liu, D. X. & Tam, J. P. (2008) Lipid rafts are involved in SARS-CoV entry into Vero E6 cells. *Biochem Biophys Res Commun* **369**, 344-349, doi:10.1016/j.bbrc.2008.02.023
- Ludwig, R. J., Vanhoorelbeke, K., Leypoldt, F., Kaya, Z., Bieber, K., McLachlan, S. M., Komorowski, L., Luo, J., Cabral-Marques, O., Hammers, C. M., Lindstrom, J. M., Lamprecht, P., Fischer, A., Riemekasten, G., Tersteeg, C., Sondermann, P., Rapoport, B., Wandinger, K. P., Probst, C., El Beidaq, A., Schmidt, E., Verkman, A., Manz, R. A. & Nimmerjahn, F. (2017) Mechanisms of Autoantibody-Induced Pathology. *Front Immunol* **8**, 603, doi:10.3389/fimmu.2017.00603

- Lundblad, M., Vaudano, E. & Cenci, M. A. (2003) Cellular and behavioural effects of the adenosine A2a receptor antagonist KW-6002 in a rat model of l-DOPA-induced dyskinesia. *J Neurochem* **84**, 1398-1410, doi:10.1046/j.1471-4159.2003.01632.x
- Luo, H., Wang, X., Wang, J., Chen, C., Wang, N., Xu, Z., Chen, S. & Zeng, C. (2015) Chronic NF-kappaB blockade improves renal angiotensin II type 1 receptor functions and reduces blood pressure in Zucker diabetic rats. *Cardiovasc Diabetol* **14**, 76, doi:10.1186/s12933-015-0239-7
- Luo, R., Liu, C., Elliott, S. E., Wang, W., Parchim, N., Iriyama, T., Daugherty, P. S., Tao, L., Eltzschig, H. K., Blackwell, S. C., Sibai, B. M., Kellems, R. E. & Xia, Y. (2016) Transglutaminase is a Critical Link Between Inflammation and Hypertension. *J Am Heart Assoc* **5**, doi:10.1161/JAHA.116.003730
- Magen, I. & Chesselet, M. F. (2010) Genetic mouse models of Parkinson's disease The state of the art. *Prog Brain Res* **184**, 53-87, doi:10.1016/S0079-6123(10)84004-X
- Mancia, G., Rea, F., Ludergnani, M., Apolone, G. & Corrao, G. (2020) Renin-Angiotensin-Aldosterone System Blockers and the Risk of Covid-19. *N Engl J Med* **382**, 2431-2440, doi:10.1056/NEJMoa2006923
- Manschot, S. M., Biessels, G. J., Cameron, N. E., Cotter, M. A., Kamal, A., Kappelle, L. J. & Gispen, W. H. (2003) Angiotensin converting enzyme inhibition partially prevents deficits in water maze performance, hippocampal synaptic plasticity and cerebral blood flow in streptozotocin-diabetic rats. *Brain Res* **966**, 274-282, doi:10.1016/s0006-8993(02)04211-7
- Marino, B. L. B., de Souza, L. R., Sousa, K. P. A., Ferreira, J. V., Padilha, E. C., da Silva, C., Taft, C. A. & Hage-Melim, L. I. S. (2020) Parkinson's Disease: A Review from Pathophysiology to Treatment. *Mini Rev Med Chem* **20**, 754-767, doi:10.2174/1389557519666191104110908
- Marshall, R. P. (2003) The pulmonary renin-angiotensin system. *Curr Pharm Des* **9**, 715-722, doi:10.2174/1381612033455431
- Mascolo, A., Scavone, C., Rafaniello, C., De Angelis, A., Urbanek, K., di Mauro, G., Cappetta, D., Berrino, L., Rossi, F. & Capuano, A. (2021) The Role of Renin-Angiotensin-Aldosterone System in the Heart and Lung: Focus on COVID-19. *Front Pharmacol* **12**, 667254, doi:10.3389/fphar.2021.667254
- Mateos, L., Ismail, M. A., Gil-Bea, F. J., Leoni, V., Winblad, B., Bjorkhem, I. & Cedazo-Minguez, A. (2011) Upregulation of brain renin angiotensin system by 27-hydroxycholesterol in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* **24**, 669-679, doi:10.3233/JAD-2011-101512
- McMillan, P., Dexheimer, T., Neubig, R. R. & Uhal, B. D. (2021) COVID-19-A Theory of Autoimmunity Against ACE-2 Explained. *Front Immunol* **12**, 582166, doi:10.3389/fimmu.2021.582166
- Mehta, N., Kalra, A., Nowacki, A. S., Anjewierden, S., Han, Z., Bhat, P., Carmona-Rubio, A. E., Jacob, M., Procop, G. W., Harrington, S., Milinovich, A., Svensson, L. G., Jehi, L., Young, J. B. & Chung, M. K. (2020) Association of Use of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors and Angiotensin II Receptor Blockers With Testing Positive for Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *JAMA Cardiol* **5**, 1020-1026, doi:10.1001/jamacardio.2020.1855
- Melchior, B., Puntambekar, S. S. & Carson, M. J. (2006) Microglia and the control of autoreactive T cell responses. *Neurochem Int* **49**, 145-153, doi:10.1016/j.neuint.2006.04.002

- Melki, R. (2015) Role of Different Alpha-Synuclein Strains in Synucleinopathies, Similarities with other Neurodegenerative Diseases. *J Parkinsons Dis* **5**, 217-227, doi:10.3233/JPD-150543
- Mendelsohn, F. A., Jenkins, T. A. & Berkovic, S. F. (1993) Effects of angiotensin II on dopamine and serotonin turnover in the striatum of conscious rats. *Brain Res* **613**, 221-229, doi:10.1016/0006-8993(93)90902-y
- Mertens, B., Varcin, M., Michotte, Y. & Sarre, S. (2011) The neuroprotective action of candesartan is related to interference with the early stages of 6-hydroxydopamine-induced dopaminergic cell death. *Eur J Neurosci* **34**, 1141-1148, doi:10.1111/j.1460-9568.2011.07840.x
- Meyer, L. S., Gong, S., Reincke, M. & Williams, T. A. (2020) Angiotensin II Type 1 Receptor Autoantibodies in Primary Aldosteronism. *Horm Metab Res* **52**, 379-385, doi:10.1055/a-1120-8647
- Mikulicic, S., Finke, J., Boukhallouk, F., Wustenhagen, E., Sons, D., Homsy, Y., Reiss, K., Lang, T. & Florin, L. (2019) ADAM17-dependent signaling is required for oncogenic human papillomavirus entry platform assembly. *Elife* **8**, doi:10.7554/eLife.44345
- Millet, J. K. & Whittaker, G. R. (2015) Host cell proteases: Critical determinants of coronavirus tropism and pathogenesis. *Virus Res* **202**, 120-134, doi:10.1016/j.virusres.2014.11.021
- Min, L. J., Mogi, M., Shudou, M., Jing, F., Tsukuda, K., Ohshima, K., Iwanami, J. & Horiuchi, M. (2012) Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activation with angiotensin II type 1 receptor blockade is pivotal for the prevention of blood-brain barrier impairment and cognitive decline in type 2 diabetic mice. *Hypertension* **59**, 1079-1088, doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.112.192401
- Mistry, P. & Kaplan, M. J. (2017) Cell death in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus and lupus nephritis. *Clin Immunol* **185**, 59-73, doi:10.1016/j.clim.2016.08.010
- Miyoshi, M., Miyano, K., Moriyama, N., Taniguchi, M. & Watanabe, T. (2008) Angiotensin type 1 receptor antagonist inhibits lipopolysaccharide-induced stimulation of rat microglial cells by suppressing nuclear factor kappaB and activator protein-1 activation. *Eur J Neurosci* **27**, 343-351, doi:10.1111/j.1460-9568.2007.06014.x
- Miziolek, B., Sienczyk, M., Grzywa, R., Lupicka-Slowik, A., Kucharz, E., Kotyla, P. & Bergler-Czop, B. (2021) The prevalence and role of functional autoantibodies to angiotensin-converting-enzyme-2 in patients with systemic sclerosis. *Autoimmunity* **54**, 181-186, doi:10.1080/08916934.2021.1916915
- Moore, N., Carleton, B., Blin, P., Bosco-Levy, P. & Droz, C. (2020) Does Ibuprofen Worsen COVID-19? *Drug Saf* **43**, 611-614, doi:10.1007/s40264-020-00953-0
- Muñoz, A., Correa, C. L., Lopez-Lopez, A., Costa-Besada, M. A., Diaz-Ruiz, C. & Labandeira-Garcia, J. L. (2018) Physical Exercise Improves Aging-Related Changes in Angiotensin, IGF-1, SIRT1, SIRT3, and VEGF in the Substantia Nigra. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **73**, 1594-1601, doi:10.1093/gerona/gly072
- Muñoz, A., Rey, P., Guerra, M. J., Mendez-Alvarez, E., Soto-Otero, R. & Labandeira-Garcia, J. L. (2006) Reduction of dopaminergic degeneration and oxidative stress by inhibition of angiotensin converting enzyme in a MPTP model of parkinsonism. *Neuropharmacology* **51**, 112-120, doi:10.1016/j.neuropharm.2006.03.004
- Nam, G. E., Kim, S. M., Han, K., Kim, N. H., Chung, H. S., Kim, J. W., Han, B., Cho, S. J., Yu, J. H., Park, Y. G. & Choi, K. M. (2018) Metabolic syndrome and risk of Parkinson disease: A nationwide cohort study. *PLoS Med* **15**, e1002640, doi:10.1371/journal.pmed.1002640

- Negi, N. & Das, B. K. (2020) Decoding intrathecal immunoglobulins and B cells in the CNS: their synthesis, function, and regulation. *Int Rev Immunol* **39**, 67-79, doi:10.1080/08830185.2019.1711073
- Nguyen, G. (2010) The (pro)renin receptor in health and disease. *Ann Med* **42**, 13-18
- Nguyen, G., Delarue, F., Burckle, C., Bouzahir, L., Giller, T. & Sraer, J. D. (2002) Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin. *J Clin Invest* **109**, 1417-1427, doi:10.1172/JCI14276
- Nimmervoll, B., Svoboda, N., Sacha, B. & Kerschbaum, H. H. (2009) Sustained elevation of cyclic guanosine monophosphate induces apoptosis in microglia. *Brain Res Bull* **80**, 428-432, doi:10.1016/j.brainresbull.2009.08.002
- Nouet, S. & Nahmias, C. (2000) Signal transduction from the angiotensin II AT2 receptor. *Trends Endocrinol Metab* **11**, 1-6, doi:10.1016/s1043-2760(99)00205-2
- Obeso, J. A. & Lanciego, J. L. (2011) Past, present, and future of the pathophysiological model of the Basal Ganglia. *Front Neuroanat* **5**, 39, doi:10.3389/fnana.2011.00039
- Obeso, J. A., Marin, C., Rodriguez-Oroz, C., Blesa, J., Benitez-Temino, B., Mena-Segovia, J., Rodriguez, M. & Olanow, C. W. (2008) The basal ganglia in Parkinson's disease: current concepts and unexplained observations. *Ann Neurol* **64 Suppl 2**, S30-46, doi:10.1002/ana.21481
- Ocaranza, M. P., Godoy, I., Jalil, J. E., 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**, 572-578, doi:10.1161/01.HYP.0000237862.94083.45
- Ola, M. S., Ahmed, M. M., Abuohashish, H. M., Al-Rejaie, S. S. & Alhomida, A. S. (2013) Telmisartan ameliorates neurotrophic support and oxidative stress in the retina of streptozotocin-induced diabetic rats. *Neurochem Res* **38**, 1572-1579, doi:10.1007/s11064-013-1058-4
- Olanow, C. W. (2007) The pathogenesis of cell death in Parkinson's disease--2007. *Mov Disord* **22 Suppl 17**, S335-342, doi:10.1002/mds.21675
- Ongali, B., Nicolakakis, N., Tong, X. K., Aboukassim, T., Papadopoulos, P., Rosa-Neto, P., Lecrux, C., Imboden, H. & Hamel, E. (2014) Angiotensin II type 1 receptor blocker losartan prevents and rescues cerebrovascular, neuropathological and cognitive deficits in an Alzheimer's disease model. *Neurobiol Dis* **68**, 126-136, doi:10.1016/j.nbd.2014.04.018
- Padia, S. H. & Carey, R. M. (2013) AT2 receptors: beneficial counter-regulatory role in cardiovascular and renal function. *Pflugers Arch* **465**, 99-110, doi:10.1007/s00424-012-1146-3
- Park, S. H., Nam, G. E., Han, K., Huh, Y., Kim, W., Lee, M. K., Koh, E. S., Kim, E. S., Kim, M. K., Kwon, H. S., Kim, S. M., Cho, K. H. & Park, Y. G. (2021) Association of Dynamic Changes in Metabolic Syndrome Status with the Risk of Parkinson's Disease: A Nationwide Cohort Study. *J Parkinsons Dis* **11**, 1751-1759, doi:10.3233/JPD-212589
- Parrado-Fernandez, C., Leoni, V., Saeed, A., Rodriguez-Rodriguez, P., Sandebring-Matton, A., Cordoba-Beldad, C. M., Bueno, P., Gali, C. C., Panzenboeck, U., Cedazo-Minguez, A. & Bjorkhem, I. (2021) Sex difference in flux of 27-hydroxycholesterol into the brain. *Br J Pharmacol* **178**, 3194-3204, doi:10.1111/bph.15353
- Parrish, M. R., Murphy, S. R., Rutland, S., Wallace, K., Wenzel, K., Wallukat, G., Keiser, S., Ray, L. F., Dechend, R., Martin, J. N., Granger, J. P. & LaMarca, B. (2010) The effect of immune factors, tumor necrosis factor-alpha, and agonistic autoantibodies to the

- angiotensin II type I receptor on soluble fms-like tyrosine-1 and soluble endoglin production in response to hypertension during pregnancy. *Am J Hypertens* **23**, 911-916, doi:10.1038/ajh.2010.70
- Patel, S. & Hussain, T. (2018) Dimerization of AT2 and Mas Receptors in Control of Blood Pressure. *Curr Hypertens Rep* **20**, 41, doi:10.1007/s11906-018-0845-3
- Patel, V. B., Clarke, N., Wang, Z., Fan, D., Parajuli, N., Basu, R., Putko, B., Kassiri, Z., Turner, A. J. & Oudit, G. Y. (2014) Angiotensin II induced proteolytic cleavage of myocardial ACE2 is mediated by TACE/ADAM-17: a positive feedback mechanism in the RAS. *J Mol Cell Cardiol* **66**, 167-176, doi:10.1016/j.yjmcc.2013.11.017
- Patra, T., Meyer, K., Geerling, L., Isbell, T. S., Hoft, D. F., Brien, J., Pinto, A. K., Ray, R. B. & Ray, R. (2020) SARS-CoV-2 spike protein promotes IL-6 trans-signaling by activation of angiotensin II receptor signaling in epithelial cells. *PLoS Pathog* **16**, e1009128, doi:10.1371/journal.ppat.1009128
- Paxinos G. & Watson C. (1986). The rat brain in stereotaxic coordinates. 2nd ed. New York: Academic Press.
- Payne, B. A. & Chinnery, P. F. (2015) Mitochondrial dysfunction in aging: Much progress but many unresolved questions. *Biochim Biophys Acta* **1847**, 1347-1353, doi:10.1016/j.bbabi.2015.05.022
- Pegg, C. C., He, C., Stroink, A. R., Kattner, K. A. & Wang, C. X. (2010) Technique for collection of cerebrospinal fluid from the cisterna magna in rat. *J Neurosci Methods* **187**, 8-12, doi:10.1016/j.jneumeth.2009.12.002
- Perez-Lloret, S., Otero-Losada, M., Toblli, J. E. & Capani, F. (2017) Renin-angiotensin system as a potential target for new therapeutic approaches in Parkinson's disease. *Expert Opin Investig Drugs* **26**, 1163-1173, doi:10.1080/13543784.2017.1371133
- Petrovszki, D., Walter, F. R., Vigh, J. P., Kocsis, A., Valkai, S., Deli, M. A. & Der, A. (2022) Penetration of the SARS-CoV-2 Spike Protein across the Blood-Brain Barrier, as Revealed by a Combination of a Human Cell Culture Model System and Optical Biosensing. *Biomedicines* **10**, doi:10.3390/biomedicines10010188
- Pfaffl, M. W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**, e45, doi:10.1093/nar/29.9.e45
- Philippens, I.H., Boszormenyi, K.P., Wubben, J.A., Fagrouch, Z.C., van Driel, N., Mayenburg, A.Q., Lozovaglia, D., Roos, E., Schurink, B., Bugiani, M. (2021). SARS-CoV-2 causes brain inflammation and induces Lewy body formation in macaques. bioRxiv, doi: 10.1101/2021.02.23.432474.
- Picca, A., Guerra, F., Calvani, R., Romano, R., Coelho-Junior, H. J., Bucci, C. & Marzetti, E. (2021) Mitochondrial Dysfunction, Protein Misfolding and Neuroinflammation in Parkinson's Disease: Roads to Biomarker Discovery. *Biomolecules* **11**, doi:10.3390/biom11101508
- Pignataro, D., Sucunza, D., Rico, A. J., Dopeso-Reyes, I. G., Roda, E., Rodriguez-Perez, A. I., Labandeira-Garcia, J. L., Broccoli, V., Kato, S., Kobayashi, K. & Lanciego, J. L. (2018) Gene therapy approaches in the non-human primate model of Parkinson's disease. *J Neural Transm (Vienna)* **125**, 575-589, doi:10.1007/s00702-017-1681-3
- Pisani, V., Stefani, A., Pierantozzi, M., Natoli, S., Stanzione, P., Franciotta, D. & Pisani, A. (2012) Increased blood-cerebrospinal fluid transfer of albumin in advanced Parkinson's disease. *J Neuroinflammation* **9**, 188, doi:10.1186/1742-2094-9-188

- Poewe, W., Seppi, K., Tanner, C. M., Halliday, G. M., Brundin, P., Volkman, J., Schrag, A. E. & Lang, A. E. (2017) Parkinson disease. *Nat Rev Dis Primers* **3**, 17013, doi:10.1038/nrdp.2017.13
- Portales, A. E., Mustafa, E. R., McCarthy, C. I., Cornejo, M. P., Couto, P. M., Gironacci, M. M., Caramelo, J. J., Perello, M. & Raingo, J. (2022) ACE2 internalization induced by a SARS-CoV-2 recombinant protein is modulated by angiotensin II type 1 and bradykinin 2 receptors. *Life Sci*, 120284, doi:10.1016/j.lfs.2021.120284
- Prathab Balaji, S., Vijay Chand, C., Justin, A. & Ramanathan, M. (2015) Telmisartan mediates anti-inflammatory and not cognitive function through PPAR-gamma agonism via SARM and MyD88 signaling. *Pharmacol Biochem Behav* **137**, 60-68, doi:10.1016/j.pbb.2015.08.007
- Preux, P. M., Condet, A., Anglade, C., Druet-Cabanac, M., Debrock, C., Macharia, W., Couratier, P., Boutros-Toni, F. & Dumas, M. (2000) Parkinson's disease and environmental factors. Matched case-control study in the Limousin region, France. *Neuroepidemiology* **19**, 333-337, doi:10.1159/000026273
- Qian, L. & Flood, P. M. (2008) Microglial cells and Parkinson's disease. *Immunol Res* **41**, 155-164, doi:10.1007/s12026-008-8018-0
- Qiao, W., Wang, C., Chen, B., Zhang, F., Liu, Y., Lu, Q., Guo, H., Yan, C., Sun, H., Hu, G. & Yin, X. (2015) Ibuprofen attenuates cardiac fibrosis in streptozotocin-induced diabetic rats. *Cardiology* **131**, 97-106, doi:10.1159/000375362
- Quadri, S. S., Culver, S. A., Li, C. & Siragy, H. M. (2016) Interaction of the renin angiotensin and cox systems in the kidney. *Front Biosci (Schol Ed)* **8**, 215-226, doi:10.2741/s459
- Ramkumar, N. & Kohan, D. E. (2019) The (pro)renin receptor: an emerging player in hypertension and metabolic syndrome. *Kidney Int* **95**, 1041-1052, doi:10.1016/j.kint.2018.10.042
- Ransohoff, R. M. & Perry, V. H. (2009) Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. *Annu Rev Immunol* **27**, 119-145, doi:10.1146/annurev.immunol.021908.132528
- Reale, M., Iarlori, C., Thomas, A., Gambi, D., Perfetti, B., Di Nicola, M. & Onofrij, M. (2009) Peripheral cytokines profile in Parkinson's disease. *Brain Behav Immun* **23**, 55-63, doi:10.1016/j.bbi.2008.07.003
- Reardon, K. A., Mendelsohn, F. A., Chai, S. Y. & Horne, M. K. (2000) The angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitor, perindopril, modifies the clinical features of Parkinson's disease. *Aust N Z J Med* **30**, 48-53, doi:10.1111/j.1445-5994.2000.tb01054.x
- Regenhardt, R. W., Desland, F., Mecca, A. P., Pioquinto, D. J., Afzal, A., Mocco, J. & Summers, C. (2013) Anti-inflammatory effects of angiotensin-(1-7) in ischemic stroke. *Neuropharmacology* **71**, 154-163, doi:10.1016/j.neuropharm.2013.03.025
- Rey, P., Lopez-Real, A., Sanchez-Iglesias, S., Munoz, A., Soto-Otero, R. & Labandeira-Garcia, J. L. (2007) Angiotensin type-1-receptor antagonists reduce 6-hydroxydopamine toxicity for dopaminergic neurons. *Neurobiol Aging* **28**, 555-567, doi:10.1016/j.neurobiolaging.2006.02.018
- Reynolds, A. D., Glanzer, J. G., Kadiu, I., Ricardo-Dukelow, M., Chaudhuri, A., Ciborowski, P., Cerny, R., Gelman, B., Thomas, M. P., Mosley, R. L. & Gendelman, H. E. (2008) Nitrated alpha-synuclein-activated microglial profiling for Parkinson's disease. *J Neurochem* **104**, 1504-1525, doi:10.1111/j.1471-4159.2007.05087.x
- Rice, G. I., Jones, A. L., Grant, P. J., Carter, A. M., Turner, A. J. & Hooper, N. M. (2006) Circulating activities of angiotensin-converting enzyme, its homolog, angiotensin-

- converting enzyme 2, and neprilysin in a family study. *Hypertension* **48**, 914-920, doi:10.1161/01.HYP.0000244543.91937.79
- Rinott, E., Kozer, E., Shapira, Y., Bar-Haim, A. & Youngster, I. (2020) Ibuprofen use and clinical outcomes in COVID-19 patients. *Clin Microbiol Infect* **26**, 1259 e1255-1259 e1257, doi:10.1016/j.cmi.2020.06.003
- Rivas-Santisteban, R., Rodriguez-Perez, A. I., Munoz, A., Reyes-Resina, I., Labandeira-Garcia, J. L., Navarro, G. & Franco, R. (2020) Angiotensin AT1 and AT2 receptor heteromer expression in the hemilesioned rat model of Parkinson's disease that increases with levodopa-induced dyskinesia. *J Neuroinflammation* **17**, 243, doi:10.1186/s12974-020-01908-z
- Robinson, P. C., Liew, D. F. L., Liew, J. W., Monaco, C., Richards, D., Shivakumar, S., Tanner, H. L. & Feldmann, M. (2020) The Potential for Repurposing Anti-TNF as a Therapy for the Treatment of COVID-19. *Med (N Y)* **1**, 90-102, doi:10.1016/j.medj.2020.11.005
- Rocha, N. P., de Miranda, A. S. & Teixeira, A. L. (2015) Insights into Neuroinflammation in Parkinson's Disease: From Biomarkers to Anti-Inflammatory Based Therapies. *Biomed Res Int* **2015**, 628192, doi:10.1155/2015/628192
- Rockx, B., Baas, T., Zornetzer, G. A., Haagmans, B., Sheahan, T., Frieman, M., Dyer, M. D., Teal, T. H., Proll, S., van den Brand, J., Baric, R. & Katze, M. G. (2009) Early upregulation of acute respiratory distress syndrome-associated cytokines promotes lethal disease in an aged-mouse model of severe acute respiratory syndrome coronavirus infection. *J Virol* **83**, 7062-7074, doi:10.1128/JVI.00127-09
- Rodriguez-Pallares, J., Parga, J. A., Munoz, A., Rey, P., Guerra, M. J. & Labandeira-Garcia, J. L. (2007) Mechanism of 6-hydroxydopamine neurotoxicity: the role of NADPH oxidase and microglial activation in 6-hydroxydopamine-induced degeneration of dopaminergic neurons. *J Neurochem* **103**, 145-156, doi:10.1111/j.1471-4159.2007.04699.x
- Rodriguez-Pallares, J., Quiroz, C. R., Parga, J. A., Guerra, M. J. & Labandeira-Garcia, J. L. (2004) Angiotensin II increases differentiation of dopaminergic neurons from mesencephalic precursors via angiotensin type 2 receptors. *Eur J Neurosci* **20**, 1489-1498, doi:10.1111/j.1460-9568.2004.03621.x
- Rodriguez-Pallares, J., Rey, P., Parga, J. A., Munoz, A., Guerra, M. J. & Labandeira-Garcia, J. L. (2008) Brain angiotensin enhances dopaminergic cell death via microglial activation and NADPH-derived ROS. *Neurobiol Dis* **31**, 58-73, doi:10.1016/j.nbd.2008.03.003
- Rodriguez-Perez, A. I., Borrajo, A., Diaz-Ruiz, C., Garrido-Gil, P. & Labandeira-Garcia, J. L. (2016) Crosstalk between insulin-like growth factor-1 and angiotensin-II in dopaminergic neurons and glial cells: role in neuroinflammation and aging. *Oncotarget* **7**, 30049-30067, doi:10.18632/oncotarget.9174
- Rodriguez-Perez, A. I., Borrajo, A., Rodriguez-Pallares, J., Guerra, M. J. & Labandeira-Garcia, J. L. (2015) Interaction between NADPH-oxidase and Rho-kinase in angiotensin II-induced microglial activation. *Glia* **63**, 466-482, doi:10.1002/glia.22765
- Rodriguez-Perez, A. I., Dominguez-Mejide, A., Lanciego, J. L., Guerra, M. J. & Labandeira-Garcia, J. L. (2013) Dopaminergic degeneration is enhanced by chronic brain hypoperfusion and inhibited by angiotensin receptor blockage. *Age (Dordr)* **35**, 1675-1690, doi:10.1007/s11357-012-9470-2
- Rodriguez-Perez, A. I., Labandeira, C. M., Pedrosa, M. A., Valenzuela, R., Suarez-Quintanilla, J. A., Cortes-Ayaso, M., Mayan-Conesa, P. & Labandeira-Garcia, J. L. (2021)

- Autoantibodies against ACE2 and angiotensin type-1 receptors increase severity of COVID-19. *J Autoimmun* **122**, 102683, doi:10.1016/j.jaut.2021.102683
- Rodriguez-Perez, A. I., Valenzuela, R., Joglar, B., Garrido-Gil, P., Guerra, M. J. & Labandeira-Garcia, J. L. (2011) Renin angiotensin system and gender differences in dopaminergic degeneration. *Mol Neurodegener* **6**, 58, doi:10.1186/1750-1326-6-58
- Rodriguez-Perez, A. I., Valenzuela, R., Villar-Cheda, B., Guerra, M. J. & Labandeira-Garcia, J. L. (2012) Dopaminergic neuroprotection of hormonal replacement therapy in young and aged menopausal rats: role of the brain angiotensin system. *Brain* **135**, 124-138, doi:10.1093/brain/awr320
- Rodriguez-Perez, A. I., Valenzuela, R., Villar-Cheda, B., Guerra, M. J., Lanciego, J. L. & Labandeira-Garcia, J. L. (2010) Estrogen and angiotensin interaction in the substantia nigra. Relevance to postmenopausal Parkinson's disease. *Exp Neurol* **224**, 517-526, doi:10.1016/j.expneurol.2010.05.015
- Roodveldt, C., Labrador-Garrido, A., Gonzalez-Rey, E., Lachaud, C. C., Guilliams, T., Fernandez-Montesinos, R., Benitez-Rondan, A., Robledo, G., Hmadcha, A., Delgado, M., Dobson, C. M. & Pozo, D. (2013) Preconditioning of microglia by alpha-synuclein strongly affects the response induced by toll-like receptor (TLR) stimulation. *PLoS One* **8**, e79160, doi:10.1371/journal.pone.0079160
- Ross, M. T., Grafham, D. V., Coffey, A. J., Scherer, S., McLay, K., Muzny, D., Platzer, M., Howell, G. R., Burrows, C., Bird, C. P., Frankish, A., Lovell, F. L., Howe, K. L., Ashurst, J. L., Fulton, R. S., Sudbrak, R., Wen, G., Jones, M. C., Hurles, M. E., Andrews, T. D., Scott, C. E., Searle, S., Ramser, J., Whittaker, A., Deadman, R., Carter, N. P., Hunt, S. E., Chen, R., Cree, A., Gunaratne, P., Havlak, P., Hodgson, A., Metzker, M. L., Richards, S., Scott, G., Steffen, D., Sodergren, E., Wheeler, D. A., Worley, K. C., Ainscough, R., Ambrose, K. D., Ansari-Lari, M. A., Aradhya, S., Ashwell, R. I., Babbage, A. K., Bagguley, C. L., Ballabio, A., Banerjee, R., Barker, G. E., Barlow, K. F., Barrett, I. P., Bates, K. N., Beare, D. M., Beasley, H., Beasley, O., Beck, A., Bethel, G., Blechschmidt, K., Brady, N., Bray-Allen, S., Bridgeman, A. M., Brown, A. J., Brown, M. J., Bonnin, D., Bruford, E. A., Buhay, C., Burch, P., Burford, D., Burgess, J., Burrill, W., Burton, J., Bye, J. M., Carder, C., Carrel, L., Chako, J., Chapman, J. C., Chavez, D., Chen, E., Chen, G., Chen, Y., Chen, Z., Chinault, C., Ciccodicola, A., Clark, S. Y., Clarke, G., Clee, C. M., Clegg, S., Clerc-Blankenburg, K., Clifford, K., Cobley, V., Cole, C. G., Conquer, J. S., Corby, N., Connor, R. E., David, R., Davies, J., Davis, C., Davis, J., Delgado, O., Deshazo, D., Dhami, P., Ding, Y., Dinh, H., Dodsworth, S., Draper, H., Dugan-Rocha, S., Dunham, A., Dunn, M., Durbin, K. J., Dutta, I., Eades, T., Ellwood, M., Emery-Cohen, A., Errington, H., Evans, K. L., Faulkner, L., Francis, F., Frankland, J., Fraser, A. E., Galgoczy, P., Gilbert, J., Gill, R., Glockner, G., Gregory, S. G., Gribble, S., Griffiths, C., Grocock, R., Gu, Y., Gwilliam, R., Hamilton, C., Hart, E. A., Hawes, A., Heath, P. D., Heitmann, K., Hennig, S., Hernandez, J., Hinzmann, B., Ho, S., Hoffs, M., Howden, P. J., Huckle, E. J., Hume, J., Hunt, P. J., Hunt, A. R., Isherwood, J., Jacob, L., Johnson, D., Jones, S., de Jong, P. J., Joseph, S. S., Keenan, S., Kelly, S., Kershaw, J. K., Khan, Z., Kioschis, P., Klages, S., Knights, A. J., Kosiura, A., Kovar-Smith, C., Laird, G. K., Langford, C., Lawlor, S., Leversha, M., Lewis, L., Liu, W., Lloyd, C., Lloyd, D. M., Loulseged, H., Loveland, J. E., Lovell, J. D., Lozado, R., Lu, J., Lyne, R., Ma, J., Maheshwari, M., Matthews, L. H., McDowall, J., McLaren, S., McMurray, A., Meidl, P., Meitinger, T., Milne, S., Miner, G., Mistry, S. L., Morgan, M., Morris, S., Muller, I., Mullikin, J. C., Nguyen, N., Nordsiek, G., Nyakatura, G., O'Dell, C. N., Okwuonu, G., Palmer, S., Pandian, R., Parker, D., Parrish, J.,

- Pasternak, S., Patel, D., Pearce, A. V., Pearson, D. M., Pelan, S. E., Perez, L., Porter, K. M., Ramsey, Y., Reichwald, K., Rhodes, S., Ridler, K. A., Schlessinger, D., Schueler, M. G., Sehra, H. K., Shaw-Smith, C., Shen, H., Sheridan, E. M., Shownkeen, R., Skuce, C. D., Smith, M. L., Sotheran, E. C., Steingruber, H. E., Steward, C. A., Storey, R., Swann, R. M., Swarbreck, D., Tabor, P. E., Taudien, S., Taylor, T., Teague, B., Thomas, K., Thorpe, A., Timms, K., Tracey, A., Trevanion, S., Tromans, A. C., d'Urso, M., Verduzco, D., Villasana, D., Waldron, L., Wall, M., Wang, Q., Warren, J., Warry, G. L., Wei, X., West, A., Whitehead, S. L., Whiteley, M. N., Wilkinson, J. E., Willey, D. L., Williams, G., Williams, L., Williamson, A., Williamson, H., Wilming, L., Woodmansey, R. L., Wray, P. W., Yen, J., Zhang, J., Zhou, J., Zoghbi, H., Zorilla, S., Buck, D., Reinhardt, R., Poustka, A., Rosenthal, A., Lehrach, H., Meindl, A., Minx, P. J., Hillier, L. W., Willard, H. F., Wilson, R. K., Waterston, R. H., Rice, C. M., Vaudin, M., Coulson, A., Nelson, D. L., Weinstock, G., Sulston, J. E., Durbin, R., Hubbard, T., Gibbs, R. A., Beck, S., Rogers, J. & Bentley, D. R. (2005) The DNA sequence of the human X chromosome. *Nature* **434**, 325-337, doi:10.1038/nature03440
- Rozas, G., Guerra, M. J. & Labandeira-Garcia, J. L. (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**, 75-84, doi:10.1016/s1385-299x(97)00034-2
- Rozas, G., Liste, I., Lopez-Martin, E., Guerra, M. J., Kokaia, M. & Labandeira-Garcia, J. L. (1996) Intrathalamic implants of GABA-releasing polymer matrices reduce motor impairments in rats with excitotoxically lesioned striata. *Exp Neurol* **142**, 323-330, doi:10.1006/exnr.1996.0201
- Saaksjarvi, K., Knekt, P., Mannisto, S., Lyytinen, J. & Heliovaara, M. (2015) Prospective study on the components of metabolic syndrome and the incidence of Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* **21**, 1148-1155, doi:10.1016/j.parkreldis.2015.07.017
- Sanchez-Guajardo, V., Febbraro, F., Kirik, D. & Romero-Ramos, M. (2010) Microglia acquire distinct activation profiles depending on the degree of alpha-synuclein neuropathology in a rAAV based model of Parkinson's disease. *PLoS One* **5**, e8784, doi:10.1371/journal.pone.0008784
- Santos, R. A. S., Oudit, G. Y., Verano-Braga, T., Canta, G., Steckelings, U. M. & Bader, M. (2019) The renin-angiotensin system: going beyond the classical paradigms. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **316**, H958-H970, doi:10.1152/ajpheart.00723.2018
- Santos, R. A. S., Sampaio, W. O., Alzamora, A. C., Motta-Santos, D., Alenina, N., Bader, M. & Campagnole-Santos, M. J. (2018) The ACE2/Angiotensin-(1-7)/MAS Axis of the Renin-Angiotensin System: Focus on Angiotensin-(1-7). *Physiol Rev* **98**, 505-553, doi:10.1152/physrev.00023.2016
- Sarkar, S., Raymick, J. & Imam, S. (2016) Neuroprotective and Therapeutic Strategies against Parkinson's Disease: Recent Perspectives. *Int J Mol Sci* **17**, doi:10.3390/ijms17060904
- Sarzani, R., Giulietti, F., Di Pentima, C., Giordano, P. & Spannella, F. (2020) Disequilibrium between the classic renin-angiotensin system and its opposing arm in SARS-CoV-2-related lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **319**, L325-L336, doi:10.1152/ajplung.00189.2020
- Sasamura, H., Hein, L., Krieger, J. E., Pratt, R. E., Kobilka, B. K. & Dzau, V. J. (1992) Cloning, characterization, and expression of two angiotensin receptor (AT-1) isoforms from the mouse genome. *Biochem Biophys Res Commun* **185**, 253-259, doi:10.1016/s0006-291x(05)80983-0

- Sathiya, S., Ranju, V., Kalaivani, P., Priya, R. J., Sumathy, H., Sunil, A. G. & Babu, C. S. (2013) Telmisartan attenuates MPTP induced dopaminergic degeneration and motor dysfunction through regulation of alpha-synuclein and neurotrophic factors (BDNF and GDNF) expression in C57BL/6J mice. *Neuropharmacology* **73**, 98-110, doi:10.1016/j.neuropharm.2013.05.025
- Satou, R., Penrose, H. & Navar, L. G. (2018) Inflammation as a Regulator of the Renin-Angiotensin System and Blood Pressure. *Curr Hypertens Rep* **20**, 100, doi:10.1007/s11906-018-0900-0
- Schallert, T., Kozlowski, D. A., Humm, J. L. & Cocke, R. R. (1997) Use-dependent structural events in recovery of function. *Adv Neurol* **73**, 229-238
- Schutten, M. T., Houben, A. J., de Leeuw, P. W. & Stehouwer, C. D. (2017) The Link Between Adipose Tissue Renin-Angiotensin-Aldosterone System Signaling and Obesity-Associated Hypertension. *Physiology (Bethesda)* **32**, 197-209, doi:10.1152/physiol.00037.2016
- Schwab, A. D., Thurston, M. J., Machhi, J., Olson, K. E., Namminga, K. L., Gendelman, H. E. & Mosley, R. L. (2020) Immunotherapy for Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* **137**, 104760, doi:10.1016/j.nbd.2020.104760
- Scott, A. J., O'Dea, K. P., O'Callaghan, D., Williams, L., Dokpesi, J. O., Tatton, L., Handy, J. M., Hogg, P. J. & Takata, M. (2011) Reactive oxygen species and p38 mitogen-activated protein kinase mediate tumor necrosis factor alpha-converting enzyme (TACE/ADAM-17) activation in primary human monocytes. *J Biol Chem* **286**, 35466-35476, doi:10.1074/jbc.M111.277434
- Sekar, S., Mani, S., Rajamani, B., Manivasagam, T., Thenmozhi, A. J., Bhat, A., Ray, B., Essa, M. M., Guillemin, G. J. & Chidambaram, S. B. (2018) Telmisartan Ameliorates Astroglial and Dopaminergic Functions in a Mouse Model of Chronic Parkinsonism. *Neurotox Res* **34**, 597-612, doi:10.1007/s12640-018-9921-3
- Selemidis, S., Dusting, G. J., Peshavariya, H., Kemp-Harper, B. K. & Drummond, G. R. (2007) Nitric oxide suppresses NADPH oxidase-dependent superoxide production by S-nitrosylation in human endothelial cells. *Cardiovasc Res* **75**, 349-358, doi:10.1016/j.cardiores.2007.03.030
- Sellak, H., Yang, X., Cao, X., Cornwell, T., Soff, G. A. & Lincoln, T. (2002) Sp1 transcription factor as a molecular target for nitric oxide-- and cyclic nucleotide--mediated suppression of cGMP-dependent protein kinase-Ialpha expression in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* **90**, 405-412, doi:10.1161/hh0402.105898
- Setiadi, A., Korim, W. S., Elsaafien, K. & Yao, S. T. (2018) The role of the blood-brain barrier in hypertension. *Exp Physiol* **103**, 337-342, doi:10.1113/EP086434
- Seva Pessoa, B., van der Lubbe, N., Verdonk, K., Roks, A. J., Hoorn, E. J. & Danser, A. H. (2013) Key developments in renin-angiotensin-aldosterone system inhibition. *Nat Rev Nephrol* **9**, 26-36, doi:10.1038/nrneph.2012.249
- Shaltout, H. A., Westwood, B. M., Averill, D. B., Ferrario, C. M., Figueroa, J. P., Diz, D. I., Rose, J. C. & Chappell, M. C. (2007) Angiotensin metabolism in renal proximal tubules, urine, and serum of sheep: evidence for ACE2-dependent processing of angiotensin II. *Am J Physiol Renal Physiol* **292**, F82-91, doi:10.1152/ajprenal.00139.2006
- Shang, F., Wang, J., Liu, X., Li, J., Zheng, Q., Xue, Y. & Zhao, L. (2012) Involvement of reactive oxygen species and JNK in increased expression of MCP-1 and infiltration of inflammatory cells in pressure-overloaded rat hearts. *Mol Med Rep* **5**, 1491-1496, doi:10.3892/mmr.2012.852

- Sharma, S. & Taliyan, R. (2018) High fat diet feeding induced insulin resistance exacerbates 6-OHDA mediated neurotoxicity and behavioral abnormalities in rats. *Behav Brain Res* **351**, 17-23, doi:10.1016/j.bbr.2018.05.025
- Sigmund, C. D., Diz, D. I. & Chappell, M. C. (2017) No Brain Renin-Angiotensin System: Deja vu All Over Again? *Hypertension* **69**, 1007-1010, doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.117.09167
- Simoes e Silva, A. C., Silveira, K. D., Ferreira, A. J. & Teixeira, M. M. (2013) ACE2, angiotensin-(1-7) and Mas receptor axis in inflammation and fibrosis. *Br J Pharmacol* **169**, 477-492, doi:10.1111/bph.12159
- Smart, L., Fawkes, N., Goggin, P., Pennick, G., Rainsford, K. D., Charlesworth, B. & Shah, N. (2020) A narrative review of the potential pharmacological influence and safety of ibuprofen on coronavirus disease 19 (COVID-19), ACE2, and the immune system: a dichotomy of expectation and reality. *Inflammopharmacology* **28**, 1141-1152, doi:10.1007/s10787-020-00745-z
- Soldner, F., Stelzer, Y., Shivalila, C. S., Abraham, B. J., Latourelle, J. C., Barrasa, M. I., Goldmann, J., Myers, R. H., Young, R. A. & Jaenisch, R. (2016) Parkinson-associated risk variant in distal enhancer of alpha-synuclein modulates target gene expression. *Nature* **533**, 95-99, doi:10.1038/nature17939
- Sommerstein, R., Kochen, M. M., Messlerli, F. H. & Grani, C. (2020) Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): Do Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors/Angiotensin Receptor Blockers Have a Biphasic Effect? *J Am Heart Assoc* **9**, e016509, doi:10.1161/JAHA.120.016509
- Soni, R. & Shah, J. (2022) Deciphering Intertwined Molecular Pathways Underlying Metabolic Syndrome Leading to Parkinson's Disease. *ACS Chem Neurosci* **13**, 2240-2251, doi:10.1021/acchemneuro.2c00165
- Sonsalla, P. K., Coleman, C., Wong, L. Y., Harris, S. L., Richardson, J. R., Gadad, B. S., Li, W. & German, D. C. (2013) The angiotensin converting enzyme inhibitor captopril protects nigrostriatal dopamine neurons in animal models of parkinsonism. *Exp Neurol* **250**, 376-383, doi:10.1016/j.expneurol.2013.10.014
- South, A. M., Tomlinson, L., Edmonston, D., Hiremath, S. & Sparks, M. A. (2020) Controversies of renin-angiotensin system inhibition during the COVID-19 pandemic. *Nat Rev Nephrol* **16**, 305-307, doi:10.1038/s41581-020-0279-4
- Souza, V. R., Mendes, E., Casaro, M., Antiorio, A., Oliveira, F. A. & Ferreira, C. M. (2019) Description of Ovariectomy Protocol in Mice. *Methods Mol Biol* **1916**, 303-309, doi:10.1007/978-1-4939-8994-2_29
- Sparks, M. A., Crowley, S. D., Gurley, S. B., Mirotsov, M. & Coffman, T. M. (2014) Classical Renin-Angiotensin system in kidney physiology. *Compr Physiol* **4**, 1201-1228, doi:10.1002/cphy.c130040
- Steckelings, U. M., Kaschina, E. & Unger, T. (2005) The AT2 receptor--a matter of love and hate. *Peptides* **26**, 1401-1409, doi:10.1016/j.peptides.2005.03.010
- Stegbauer, J., Lee, D. H., Seubert, S., Ellrichmann, G., Manzel, A., Kvakana, H., Muller, D. N., Gaupp, S., Rump, L. C., Gold, R. & Linker, R. A. (2009) Role of the renin-angiotensin system in autoimmune inflammation of the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 14942-14947, doi:10.1073/pnas.0903602106
- Su, H., Yang, M., Wan, C., Yi, L. X., Tang, F., Zhu, H. Y., Yi, F., Yang, H. C., Fogo, A. B., Nie, X. & Zhang, C. (2020) Renal histopathological analysis of 26 postmortem findings of patients with COVID-19 in China. *Kidney Int* **98**, 219-227, doi:10.1016/j.kint.2020.04.003

- Su, X., Maguire-Zeiss, K. A., Giuliano, R., Prifti, L., Venkatesh, K. & Federoff, H. J. (2008) Synuclein activates microglia in a model of Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* **29**, 1690-1701, doi:10.1016/j.neurobiolaging.2007.04.006
- Sucunza, D., Rico, A. J., Roda, E., Collantes, M., Gonzalez-Aseguinolaza, G., Rodriguez-Perez, A. I., Penuelas, I., Vazquez, A., Labandeira-Garcia, J. L., Broccoli, V. & Lanciego, J. L. (2021) Glucocerebrosidase Gene Therapy Induces Alpha-Synuclein Clearance and Neuroprotection of Midbrain Dopaminergic Neurons in Mice and Macaques. *Int J Mol Sci* **22**, doi:10.3390/ijms22094825
- Sulzer, D., Antonini, A., Leta, V., Nordvig, A., Smeyne, R. J., Goldman, J. E., Al-Dalahmah, O., Zecca, L., Sette, A., Bubacco, L., Meucci, O., Moro, E., Harms, A. S., Xu, Y., Fahn, S. & Ray Chaudhuri, K. (2020) COVID-19 and possible links with Parkinson's disease and parkinsonism: from bench to bedside. *NPJ Parkinsons Dis* **6**, 18, doi:10.1038/s41531-020-00123-0
- Sun, B., Ramberger, M., O'Connor, K. C., Bashford-Rogers, R. J. M. & Irani, S. R. (2020) The B cell immunobiology that underlies CNS autoantibody-mediated diseases. *Nat Rev Neurol* **16**, 481-492, doi:10.1038/s41582-020-0381-z
- Sun, Y. X., Zhang, H. Y., Wei, Y. M., Zhu, F., Wang, M. & Liao, Y. H. (2008) The mechanism of signal transduction during vascular smooth muscle cell proliferation induced by autoantibodies against angiotensin AT1 receptor from hypertension. *Chin Med J (Engl)* **121**, 43-48
- Suzuki, Y., Ruiz-Ortega, M., Lorenzo, O., Ruperez, M., Esteban, V. & Egido, J. (2003) Inflammation and angiotensin II. *Int J Biochem Cell Biol* **35**, 881-900, doi:10.1016/s1357-2725(02)00271-6
- Syrett, C. M. & Anguera, M. C. (2019) When the balance is broken: X-linked gene dosage from two X chromosomes and female-biased autoimmunity. *J Leukoc Biol* **106**, 919-932, doi:10.1002/JLB.6RI0319-094R
- Takahashi, Y., Haga, S., Ishizaka, Y. & Mimori, A. (2010) Autoantibodies to angiotensin-converting enzyme 2 in patients with connective tissue diseases. *Arthritis Res Ther* **12**, R85, doi:10.1186/ar3012
- Takeda, S., Sato, N., Takeuchi, D., Kurinami, H., Shinohara, M., Niisato, K., Kano, M., Ogihara, T., Rakugi, H. & Morishita, R. (2009) Angiotensin receptor blocker prevented beta-amyloid-induced cognitive impairment associated with recovery of neurovascular coupling. *Hypertension* **54**, 1345-1352, doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.138586
- Tan, W. S. D., Liao, W., Zhou, S., Mei, D. & Wong, W. F. (2018) Targeting the renin-angiotensin system as novel therapeutic strategy for pulmonary diseases. *Curr Opin Pharmacol* **40**, 9-17, doi:10.1016/j.coph.2017.12.002
- Tanaka, M., Tsuchida, S., Imai, T., Fujii, N., Miyazaki, H., Ichiki, T., Naruse, M. & Inagami, T. (1999) Vascular response to angiotensin II is exaggerated through an upregulation of AT1 receptor in AT2 knockout mice. *Biochem Biophys Res Commun* **258**, 194-198, doi:10.1006/bbrc.1999.0500
- Tang, Y. & Le, W. (2016) Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Mol Neurobiol* **53**, 1181-1194, doi:10.1007/s12035-014-9070-5
- Tian, M., Zhu, D., Xie, W. & Shi, J. (2012) Central angiotensin II-induced Alzheimer-like tau phosphorylation in normal rat brains. *FEBS Lett* **586**, 3737-3745, doi:10.1016/j.febslet.2012.09.004
- Tikellis, C., Bernardi, S. & Burns, W. C. (2011) Angiotensin-converting enzyme 2 is a key modulator of the renin-angiotensin system in cardiovascular and renal disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens* **20**, 62-68, doi:10.1097/MNH.0b013e328341164a

- Timmerman, R., Burm, S. M. & Bajramovic, J. J. (2018) An Overview of in vitro Methods to Study Microglia. *Front Cell Neurosci* **12**, 242, doi:10.3389/fncel.2018.00242
- Tipton, K. F. & Singer, T. P. (1993) Advances in our understanding of the mechanisms of the neurotoxicity of MPTP and related compounds. *J Neurochem* **61**, 1191-1206, doi:10.1111/j.1471-4159.1993.tb13610.x
- Tong, Q., Wu, L., Jiang, T., Ou, Z., Zhang, Y. & Zhu, D. (2016) Inhibition of endoplasmic reticulum stress-activated IRE1alpha-TRAF2-caspase-12 apoptotic pathway is involved in the neuroprotective effects of telmisartan in the rotenone rat model of Parkinson's disease. *Eur J Pharmacol* **776**, 106-115, doi:10.1016/j.ejphar.2016.02.042
- Torika, N., Asraf, K., Danon, A., Apte, R. N. & Fleisher-Berkovich, S. (2016) Telmisartan Modulates Glial Activation: In Vitro and In Vivo Studies. *PLoS One* **11**, e0155823, doi:10.1371/journal.pone.0155823
- Townsend, A. (2020) Autoimmunity to ACE2 as a possible cause of tissue inflammation in Covid-19. *Med Hypotheses* **144**, 110043, doi:10.1016/j.mehy.2020.110043
- Tracy, H. A., Jr., Wayner, M. J. & Armstrong, D. L. (1997) Losartan improves the performance of ethanol-intoxicated rats in an eight-arm radial maze. *Alcohol* **14**, 511-517, doi:10.1016/s0741-8329(97)00041-4
- Tukiainen, T., Villani, A. C., Yen, A., Rivas, M. A., Marshall, J. L., Satija, R., Aguirre, M., Gauthier, L., Fleharty, M., Kirby, A., Cummings, B. B., Castel, S. E., Karczewski, K. J., Aguet, F., Byrnes, A., Consortium, G. T., Laboratory, D. A., Coordinating Center -Analysis Working, G., Statistical Methods groups-Analysis Working, G., Enhancing, G. g., Fund, N. I. H. C., Nih/Nci, Nih/Nhgri, Nih/Nimh, Nih/Nida, Biospecimen Collection Source Site, N., Biospecimen Collection Source Site, R., Biospecimen Core Resource, V., Brain Bank Repository-University of Miami Brain Endowment, B., Leidos Biomedical-Project, M., Study, E., Genome Browser Data, I., Visualization, E. B. I., Genome Browser Data, I., Visualization-Ucsc Genomics Institute, U. o. C. S. C., Lappalainen, T., Regev, A., Ardlie, K. G., Hacohen, N. & MacArthur, D. G. (2017) Landscape of X chromosome inactivation across human tissues. *Nature* **550**, 244-248, doi:10.1038/nature24265
- Tulisiak, C. T., Mercado, G., Peelaerts, W., Brundin, L. & Brundin, P. (2019) Can infections trigger alpha-synucleinopathies? *Prog Mol Biol Transl Sci* **168**, 299-322, doi:10.1016/bs.pmbts.2019.06.002
- Uhal, B. D., Gidea, C., Bargout, R., Bifero, A., Ibarra-Sunga, O., Papp, M., Flynn, K. & Filippatos, G. (1998) Captopril inhibits apoptosis in human lung epithelial cells: a potential antifibrotic mechanism. *Am J Physiol* **275**, L1013-1017, doi:10.1152/ajplung.1998.275.5.L1013
- Unger, T. (2003) Inhibiting angiotensin receptors in the brain: possible therapeutic implications. *Curr Med Res Opin* **19**, 449-451, doi:10.1185/030079903125001974
- Unger, T., Chung, O., Csikos, T., Culman, J., Gallinat, S., Gohlke, P., Hohle, S., Meffert, S., Stoll, M., Stroth, U. & Zhu, Y. Z. (1996) Angiotensin receptors. *J Hypertens Suppl* **14**, S95-103
- Valdes, P. & Schneider, B. L. (2016) Gene Therapy: A Promising Approach for Neuroprotection in Parkinson's Disease? *Front Neuroanat* **10**, 123, doi:10.3389/fnana.2016.00123
- Valenzuela, R., Barroso-Chinea, P., Villar-Cheda, B., Joglar, B., Munoz, A., Lanciego, J. L. & Labandeira-Garcia, J. L. (2010) Location of prorenin receptors in primate substantia nigra: effects on dopaminergic cell death. *J Neuropathol Exp Neurol* **69**, 1130-1142, doi:10.1097/NEN.0b013e3181fa0308

- Valenzuela, R., Costa-Besada, M. A., Iglesias-Gonzalez, J., Perez-Costas, E., Villar-Cheda, B., Garrido-Gil, P., Melendez-Ferro, M., Soto-Otero, R., Lanciego, J. L., Henrion, D., Franco, R. & Labandeira-Garcia, J. L. (2016) Mitochondrial angiotensin receptors in dopaminergic neurons. Role in cell protection and aging-related vulnerability to neurodegeneration. *Cell Death Dis* **7**, e2427, doi:10.1038/cddis.2016.327
- Valenzuela, R., Rodriguez-Perez, A. I., Costa-Besada, M. A., Rivas-Santisteban, R., Garrido-Gil, P., Lopez-Lopez, A., Navarro, G., Lanciego, J. L., Franco, R. & Labandeira-Garcia, J. L. (2021) An ACE2/Mas-related receptor MrgE axis in dopaminergic neuron mitochondria. *Redox Biol* **46**, 102078, doi:10.1016/j.redox.2021.102078
- Van der Perren, A., Toelen, J., Casteels, C., Macchi, F., Van Rompuy, A. S., Sarre, S., Casadei, N., Nuber, S., Himmelreich, U., Osorio Garcia, M. I., Michotte, Y., D'Hooge, R., Bormans, G., Van Laere, K., Gijsbers, R., Van den Haute, C., Debyser, Z. & Baekelandt, V. (2015) Longitudinal follow-up and characterization of a robust rat model for Parkinson's disease based on overexpression of alpha-synuclein with adeno-associated viral vectors. *Neurobiol Aging* **36**, 1543-1558, doi:10.1016/j.neurobiolaging.2014.11.015
- Van Dyken, P. & Lacoste, B. (2018) Impact of Metabolic Syndrome on Neuroinflammation and the Blood-Brain Barrier. *Front Neurosci* **12**, 930, doi:10.3389/fnins.2018.00930
- Varatharaj, A. & Galea, I. (2017) The blood-brain barrier in systemic inflammation. *Brain Behav Immun* **60**, 1-12, doi:10.1016/j.bbi.2016.03.010
- Vegeto, E., Benedusi, V. & Maggi, A. (2008) Estrogen anti-inflammatory activity in brain: a therapeutic opportunity for menopause and neurodegenerative diseases. *Front Neuroendocrinol* **29**, 507-519, doi:10.1016/j.yfrne.2008.04.001
- Verdonk, K., Danser, A. H. & van Esch, J. H. (2012) Angiotensin II type 2 receptor agonists: where should they be applied? *Expert Opin Investig Drugs* **21**, 501-513, doi:10.1517/13543784.2012.664131
- Villa, A., Gelosa, P., Castiglioni, L., Cimino, M., Rizzi, N., Pepe, G., Lolli, F., Marcello, E., Sironi, L., Vegeto, E. & Maggi, A. (2018) Sex-Specific Features of Microglia from Adult Mice. *Cell Rep* **23**, 3501-3511, doi:10.1016/j.celrep.2018.05.048
- Villa, A., Vegeto, E., Poletti, A. & Maggi, A. (2016) Estrogens, Neuroinflammation, and Neurodegeneration. *Endocr Rev* **37**, 372-402, doi:10.1210/er.2016-1007
- Villapol, S., Loane, D. J. & Burns, M. P. (2017) Sexual dimorphism in the inflammatory response to traumatic brain injury. *Glia* **65**, 1423-1438, doi:10.1002/glia.23171
- Villar-Cheda, B., Costa-Besada, M. A., Valenzuela, R., Perez-Costas, E., Melendez-Ferro, M. & Labandeira-Garcia, J. L. (2017) The intracellular angiotensin system buffers deleterious effects of the extracellular paracrine system. *Cell Death Dis* **8**, e3044, doi:10.1038/cddis.2017.439
- Villar-Cheda, B., Dominguez-Mejide, A., Valenzuela, R., Granado, N., Moratalla, R. & Labandeira-Garcia, J. L. (2014) Aging-related dysregulation of dopamine and angiotensin receptor interaction. *Neurobiol Aging* **35**, 1726-1738, doi:10.1016/j.neurobiolaging.2014.01.017
- Villar-Cheda, B., Rodriguez-Pallares, J., Valenzuela, R., Munoz, A., Guerra, M. J., Baltatu, O. C. & Labandeira-Garcia, J. L. (2010) Nigral and striatal regulation of angiotensin receptor expression by dopamine and angiotensin in rodents: implications for progression of Parkinson's disease. *Eur J Neurosci* **32**, 1695-1706, doi:10.1111/j.1460-9568.2010.07448.x
- Villar-Cheda, B., Sousa-Ribeiro, D., Rodriguez-Pallares, J., Rodriguez-Perez, A. I., Guerra, M. J. & Labandeira-Garcia, J. L. (2009) Aging and sedentarism decrease vascularization

- and VEGF levels in the rat substantia nigra. Implications for Parkinson's disease. *J Cereb Blood Flow Metab* **29**, 230-234, doi:10.1038/jcbfm.2008.127
- Villar-Cheda, B., Valenzuela, R., Rodriguez-Perez, A. I., Guerra, M. J. & Labandeira-Garcia, J. L. (2012) Aging-related changes in the nigral angiotensin system enhances proinflammatory and pro-oxidative markers and 6-OHDA-induced dopaminergic degeneration. *Neurobiol Aging* **33**, 204 e201-211, doi:10.1016/j.neurobiolaging.2010.08.006
- Visanji, N. P., Brotchie, J. M., Kalia, L. V., Koprach, J. B., Tandon, A., Watts, J. C. & Lang, A. E. (2016) alpha-Synuclein-Based Animal Models of Parkinson's Disease: Challenges and Opportunities in a New Era. *Trends Neurosci* **39**, 750-762, doi:10.1016/j.tins.2016.09.003
- Visanji, N. P., Madan, P., Lacoste, A. M. B., Buleje, I., Han, Y., Spangler, S., Kalia, L. V., Hensley Alford, S. & Marras, C. (2021) Using artificial intelligence to identify anti-hypertensives as possible disease modifying agents in Parkinson's disease. *Pharmacoepidemiol Drug Saf* **30**, 201-209, doi:10.1002/pds.5176
- Volpicelli-Daley, L. A. (2017) Effects of alpha-synuclein on axonal transport. *Neurobiol Dis* **105**, 321-327, doi:10.1016/j.nbd.2016.12.008
- Wallukat, G., Homuth, V., Fischer, T., Lindschau, C., Horstkamp, B., Jupner, A., Baur, E., Nissen, E., Vetter, K., Neichel, D., Dudenhausen, J. W., Haller, H. & Luft, F. C. (1999) Patients with preeclampsia develop agonistic autoantibodies against the angiotensin AT1 receptor. *J Clin Invest* **103**, 945-952, doi:10.1172/JCI4106
- Wan, Y., Shang, J., Graham, R., Baric, R. S. & Li, F. (2020) Receptor Recognition by the Novel Coronavirus from Wuhan: an Analysis Based on Decade-Long Structural Studies of SARS Coronavirus. *J Virol* **94**, doi:10.1128/JVI.00127-20
- Wang, B., Rao, Y. H., Inoue, M., Hao, R., Lai, C. H., Chen, D., McDonald, S. L., Choi, M. C., Wang, Q., Shinohara, M. L. & Yao, T. P. (2014a) Microtubule acetylation amplifies p38 kinase signalling and anti-inflammatory IL-10 production. *Nat Commun* **5**, 3479, doi:10.1038/ncomms4479
- Wang, H., Yang, P., Liu, K., Guo, F., Zhang, Y., Zhang, G. & Jiang, C. (2008a) SARS coronavirus entry into host cells through a novel clathrin- and caveolae-independent endocytic pathway. *Cell Res* **18**, 290-301, doi:10.1038/cr.2008.15
- Wang, H. L. & Lai, T. W. (2014) Optimization of Evans blue quantitation in limited rat tissue samples. *Sci Rep* **4**, 6588, doi:10.1038/srep06588
- Wang, J., Ho, L., Chen, L., Zhao, Z., Zhao, W., Qian, X., Humala, N., Seror, I., Bartholomew, S., Rosendorff, C. & Pasinetti, G. M. (2007) Valsartan lowers brain beta-amyloid protein levels and improves spatial learning in a mouse model of Alzheimer disease. *J Clin Invest* **117**, 3393-3402, doi:10.1172/JCI31547
- Wang, J., Pang, T., Hafko, R., Benicky, J., Sanchez-Lemus, E. & Saavedra, J. M. (2014b) Telmisartan ameliorates glutamate-induced neurotoxicity: roles of AT(1) receptor blockade and PPARgamma activation. *Neuropharmacology* **79**, 249-261, doi:10.1016/j.neuropharm.2013.11.022
- Wang, K., Gheblawi, M. & Oudit, G. Y. (2020) Angiotensin Converting Enzyme 2: A Double-Edged Sword. *Circulation* **142**, 426-428, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.120.047049
- Wang, Q., Liu, Y. & Zhou, J. (2015a) Neuroinflammation in Parkinson's disease and its potential as therapeutic target. *Transl Neurodegener* **4**, 19, doi:10.1186/s40035-015-0042-0
- Wang, S., Chu, C. H., Stewart, T., Gingham, C., Wang, Y., Nie, H., Guo, M., Wilson, B., Hong, J. S. & Zhang, J. (2015b) alpha-Synuclein, a chemoattractant, directs microglial

- migration via H₂O₂-dependent Lyn phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, E1926-1935, doi:10.1073/pnas.1417883112
- Wang, S., Guo, F., Liu, K., Wang, H., Rao, S., Yang, P. & Jiang, C. (2008b) Endocytosis of the receptor-binding domain of SARS-CoV spike protein together with virus receptor ACE2. *Virus Res* **136**, 8-15, doi:10.1016/j.virusres.2008.03.004
- Wang, Z. C., Qi, J., Liu, L. M., Li, J., Xu, H. Y., Liang, B. & Li, B. (2017) Valsartan reduces AT1-AA-induced apoptosis through suppression oxidative stress mediated ER stress in endothelial progenitor cells. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* **21**, 1159-1168
- Wenzel, K., Rajakumar, A., Haase, H., Geusens, N., Hubner, N., Schulz, H., Brewer, J., Roberts, L., Hubel, C. A., Herse, F., Hering, L., Qadri, F., Lindschau, C., Wallukat, G., Pijnenborg, R., Heidecke, H., Riemekasten, G., Luft, F. C., Muller, D. N., Lamarca, B. & Dechend, R. (2011) Angiotensin II type 1 receptor antibodies and increased angiotensin II sensitivity in pregnant rats. *Hypertension* **58**, 77-84, doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.171348
- Whitton, P. S. (2007) Inflammation as a causative factor in the aetiology of Parkinson's disease. *Br J Pharmacol* **150**, 963-976, doi:10.1038/sj.bjp.0707167
- Wincewicz, D. & Braszko, J. J. (2014) Telmisartan attenuates cognitive impairment caused by chronic stress in rats. *Pharmacol Rep* **66**, 436-441, doi:10.1016/j.pharep.2013.11.002
- Wincewicz, D. & Braszko, J. J. (2015) Angiotensin II AT1 receptor blockade by telmisartan reduces impairment of spatial maze performance induced by both acute and chronic stress. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* **16**, 495-505, doi:10.1177/1470320314526269
- Wolf, G., Bohlender, J., Bondeva, T., Roger, T., Thaiss, F. & Wenzel, U. O. (2006) Angiotensin II upregulates toll-like receptor 4 on mesangial cells. *J Am Soc Nephrol* **17**, 1585-1593, doi:10.1681/ASN.2005070699
- Wong, C. H., Siah, K. W. & Lo, A. W. (2019) Estimation of clinical trial success rates and related parameters. *Biostatistics* **20**, 273-286, doi:10.1093/biostatistics/kxx069
- Wright, J. W., Mizutani, S. & Harding, J. W. (2012) Focus on Brain Angiotensin III and Aminopeptidase A in the Control of Hypertension. *Int J Hypertens* **2012**, 124758, doi:10.1155/2012/124758
- Wu, J., Deng, W., Li, S. & Yang, X. (2021) Advances in research on ACE2 as a receptor for 2019-nCoV. *Cell Mol Life Sci* **78**, 531-544, doi:10.1007/s00018-020-03611-x
- Wu, L., Tian, Y. Y., Shi, J. P., Xie, W., Shi, J. Q., Lu, J. & Zhang, Y. D. (2013) Inhibition of endoplasmic reticulum stress is involved in the neuroprotective effects of candesartan cilexetil in the rotenone rat model of Parkinson's disease. *Neurosci Lett* **548**, 50-55, doi:10.1016/j.neulet.2013.06.008
- Wu, R., Laplante, M. A. & de Champlain, J. (2005) Cyclooxygenase-2 inhibitors attenuate angiotensin II-induced oxidative stress, hypertension, and cardiac hypertrophy in rats. *Hypertension* **45**, 1139-1144, doi:10.1161/01.HYP.0000164572.92049.29
- Xu, J., Mukerjee, S., Silva-Alves, C. R., Carvalho-Galvao, A., Cruz, J. C., Balarini, C. M., Braga, V. A., Lazartigues, E. & Franca-Silva, M. S. (2016) A Disintegrin and Metalloprotease 17 in the Cardiovascular and Central Nervous Systems. *Front Physiol* **7**, 469, doi:10.3389/fphys.2016.00469
- Xu, J., Sriramula, S., Xia, H., Moreno-Walton, L., Culicchia, F., Domenig, O., Poglitsch, M. & Lazartigues, E. (2017) Clinical Relevance and Role of Neuronal AT1 Receptors in ADAM17-Mediated ACE2 Shedding in Neurogenic Hypertension. *Circ Res* **121**, 43-55, doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.310509
- Xu, X., Chen, P., Wang, J., Feng, J., Zhou, H., Li, X., Zhong, W. & Hao, P. (2020) Evolution of the novel coronavirus from the ongoing Wuhan outbreak and modeling of its spike

- protein for risk of human transmission. *Sci China Life Sci* **63**, 457-460, doi:10.1007/s11427-020-1637-5
- Xu, Y., Xu, Y., Wang, Y., Wang, Y., He, L., Jiang, Z., Huang, Z., Liao, H., Li, J., Saavedra, J. M., Zhang, L. & Pang, T. (2015) Telmisartan prevention of LPS-induced microglia activation involves M2 microglia polarization via CaMKKbeta-dependent AMPK activation. *Brain Behav Immun* **50**, 298-313, doi:10.1016/j.bbi.2015.07.015
- Yamada, K. & Iwatsubo, T. (2018) Extracellular alpha-synuclein levels are regulated by neuronal activity. *Mol Neurodegener* **13**, 9, doi:10.1186/s13024-018-0241-0
- Yamada, T., Kawamata, T., Walker, D. G. & McGeer, P. L. (1992) Vimentin immunoreactivity in normal and pathological human brain tissue. *Acta Neuropathol* **84**, 157-162, doi:10.1007/BF00311389
- Yan, C., Kim, D., Aizawa, T. & Berk, B. C. (2003) Functional interplay between angiotensin II and nitric oxide: cyclic GMP as a key mediator. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **23**, 26-36, doi:10.1161/01.atv.0000046231.17365.9d
- Yan, T., Xiao, R. & Lin, G. (2020) Angiotensin-converting enzyme 2 in severe acute respiratory syndrome coronavirus and SARS-CoV-2: A double-edged sword? *FASEB J* **34**, 6017-6026, doi:10.1096/fj.202000782
- Yan, Y., Jiang, W., Liu, L., Wang, X., Ding, C., Tian, Z. & Zhou, R. (2015) Dopamine controls systemic inflammation through inhibition of NLRP3 inflammasome. *Cell* **160**, 62-73, doi:10.1016/j.cell.2014.11.047
- Yang, J., Zheng, Y., Gou, X., Pu, K., Chen, Z., Guo, Q., Ji, R., Wang, H., Wang, Y. & Zhou, Y. (2020) Prevalence of comorbidities and its effects in patients infected with SARS-CoV-2: a systematic review and meta-analysis. *Int J Infect Dis* **94**, 91-95, doi:10.1016/j.ijid.2020.03.017
- Yugandhar, V. G. & Clark, M. A. (2013) Angiotensin III: a physiological relevant peptide of the renin angiotensin system. *Peptides* **46**, 26-32, doi:10.1016/j.peptides.2013.04.014
- Zalba, G., San Jose, G., Moreno, M. U., Fortuno, M. A., Fortuno, A., Beaumont, F. J. & Diez, J. (2001) Oxidative stress in arterial hypertension: role of NAD(P)H oxidase. *Hypertension* **38**, 1395-1399, doi:10.1161/hy1201.099611
- Zaman, M. A., Oparil, S. & Calhoun, D. A. (2002) Drugs targeting the renin-angiotensin-aldosterone system. *Nat Rev Drug Discov* **1**, 621-636, doi:10.1038/nrd873
- Zawada, W. M., Banninger, G. P., Thornton, J., Marriott, B., Cantu, D., Rachubinski, A. L., Das, M., Griffin, W. S. & Jones, S. M. (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, doi:10.1186/1742-2094-8-129
- Zhang, J., Wu, J., Sun, X., Xue, H., Shao, J., Cai, W., Jing, Y., Yue, M. & Dong, C. (2020a) Association of hypertension with the severity and fatality of SARS-CoV-2 infection: A meta-analysis. *Epidemiol Infect* **148**, e106, doi:10.1017/S095026882000117X
- Zhang, P. & Tian, B. (2014) Metabolic syndrome: an important risk factor for Parkinson's disease. *Oxid Med Cell Longev* **2014**, 729194, doi:10.1155/2014/729194
- Zhang, P., Zhu, L., Cai, J., Lei, F., Qin, J. J., Xie, J., Liu, Y. M., Zhao, Y. C., Huang, X., Lin, L., Xia, M., Chen, M. M., Cheng, X., Zhang, X., Guo, D., Peng, Y., Ji, Y. X., Chen, J., She, Z. G., Wang, Y., Xu, Q., Tan, R., Wang, H., Lin, J., Luo, P., Fu, S., Cai, H., Ye, P., Xiao, B., Mao, W., Liu, L., Yan, Y., Liu, M., Chen, M., Zhang, X. J., Wang, X., Touyz, R. M., Xia, J., Zhang, B. H., Huang, X., Yuan, Y., Loomba, R., Liu, P. P. & Li, H. (2020b) Association of Inpatient Use of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors and Angiotensin II Receptor Blockers With Mortality Among Patients

- With Hypertension Hospitalized With COVID-19. *Circ Res* **126**, 1671-1681, doi:10.1161/CIRCRESAHA.120.317134
- Zhang, Q. S., Heng, Y., Yuan, Y. H. & Chen, N. H. (2017) Pathological alpha-synuclein exacerbates the progression of Parkinson's disease through microglial activation. *Toxicol Lett* **265**, 30-37, doi:10.1016/j.toxlet.2016.11.002
- Zhang, S. L., Du, Y. H., Wang, J., Yang, L. H., Yang, X. L., Zheng, R. H., Wu, Y., Wang, K., Zhang, M. S. & Liu, H. R. (2010) Endothelial dysfunction induced by antibodies against angiotensin AT1 receptor in immunized rats. *Acta Pharmacol Sin* **31**, 1381-1388, doi:10.1038/aps.2010.144
- Zhang, W., Dallas, S., Zhang, D., Guo, J. P., Pang, H., Wilson, B., Miller, D. S., Chen, B., Zhang, W., McGeer, P. L., Hong, J. S. & Zhang, J. (2007) Microglial PHOX and Mac-1 are essential to the enhanced dopaminergic neurodegeneration elicited by A30P and A53T mutant alpha-synuclein. *Glia* **55**, 1178-1188, doi:10.1002/glia.20532
- Zhang, W., Wang, T., Pei, Z., Miller, D. S., Wu, X., Block, M. L., Wilson, B., Zhang, W., Zhou, Y., Hong, J. S. & Zhang, J. (2005) Aggregated alpha-synuclein activates microglia: a process leading to disease progression in Parkinson's disease. *FASEB J* **19**, 533-542, doi:10.1096/fj.04-2751com
- Zhao, X., Li, X., Trusa, S. & Olson, S. C. (2005) Angiotensin type 1 receptor is linked to inhibition of nitric oxide production in pulmonary endothelial cells. *Regul Pept* **132**, 113-122, doi:10.1016/j.regpep.2005.09.010
- Zhao, X., Martin, M. M. & Elton, T. S. (2001) The transcription factors Sp1 and Sp3 are required for human angiotensin II type 1 receptor gene expression in H295-R cells. *Biochim Biophys Acta* **1522**, 195-206, doi:10.1016/s0167-4781(01)00341-4
- Zhong, J., Basu, R., Guo, D., Chow, F. L., Byrns, S., Schuster, M., Loibner, H., Wang, X. H., Penninger, J. M., Kassiri, Z. & Oudit, G. Y. (2010) Angiotensin-converting enzyme 2 suppresses pathological hypertrophy, myocardial fibrosis, and cardiac dysfunction. *Circulation* **122**, 717-728, p following 728, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.110.955369
- Zhong, J., Guo, D., Chen, C. B., Wang, W., Schuster, M., Loibner, H., Penninger, J. M., Scholey, J. W., Kassiri, Z. & Oudit, G. Y. (2011) Prevention of angiotensin II-mediated renal oxidative stress, inflammation, and fibrosis by angiotensin-converting enzyme 2. *Hypertension* **57**, 314-322, doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.164244
- Zhou, C. C., Zhang, Y., Irani, R. A., Zhang, H., Mi, T., Popek, E. J., Hicks, M. J., Ramin, S. M., Kellems, R. E. & Xia, Y. (2008) Angiotensin receptor agonistic autoantibodies induce pre-eclampsia in pregnant mice. *Nat Med* **14**, 855-862, doi:10.1038/nm.1856
- Zhu, B., Sun, Y., Sievers, R. E., Browne, A. E., Pulukurthy, S., Sudhir, K., Lee, R. J., Chou, T. M., Chatterjee, K. & Parmley, W. W. (2000) Comparative effects of pretreatment with captopril and losartan on cardiovascular protection in a rat model of ischemia-reperfusion. *J Am Coll Cardiol* **35**, 787-795, doi:10.1016/s0735-1097(99)00592-6
- Zhu, N., Zhang, D., Wang, W., Li, X., Yang, B., Song, J., Zhao, X., Huang, B., Shi, W., Lu, R., Niu, P., Zhan, F., Ma, X., Wang, D., Xu, W., Wu, G., Gao, G. F., Tan, W., China Novel Coronavirus, I. & Research, T. (2020) A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med* **382**, 727-733, doi:10.1056/NEJMoa2001017
- Zimpelmann, J. & Burns, K. D. (2009) Angiotensin-(1-7) activates growth-stimulatory pathways in human mesangial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* **296**, F337-346, doi:10.1152/ajprenal.90437.2008

Zou, X., Chen, K., Zou, J., Han, P., Hao, J. & Han, Z. (2020) Single-cell RNA-seq data analysis on the receptor ACE2 expression reveals the potential risk of different human organs vulnerable to 2019-nCoV infection. *Front Med* **14**, 185-192, doi:10.1007/s11684-020-0754-0

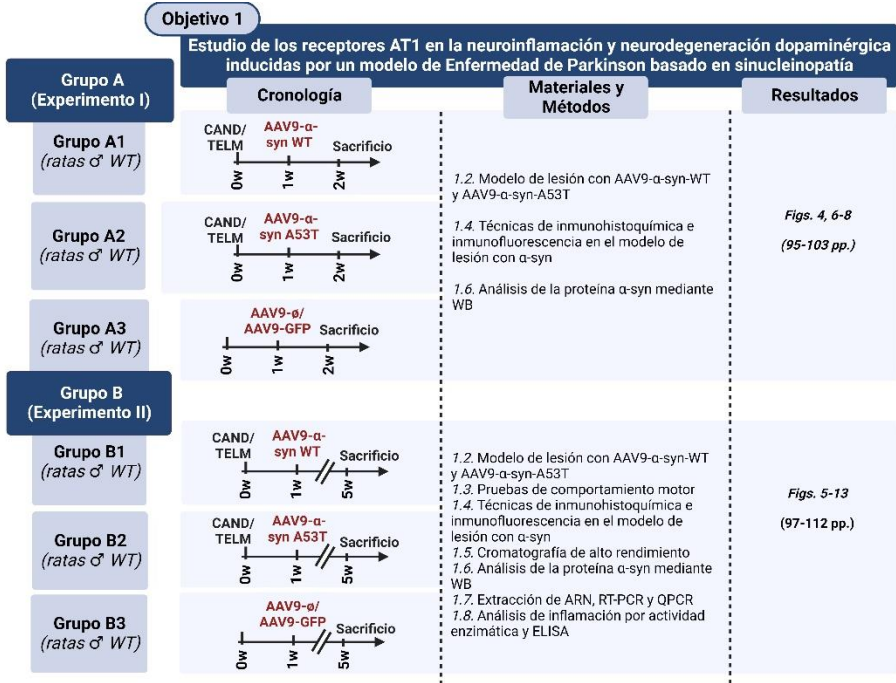


Tabla I. Representación esquemática del diseño experimental perteneciente al Objetivo 1. En la tabla figuran los animales utilizados en los diferentes grupos experimentales, la cronología de los experimentos, los materiales y métodos utilizados y las figuras y páginas que contienen los resultados. Abreviaturas: AT1, receptor de angiotensina tipo 1; WT, forma salvaje; CAND, candesartán; TELM, telmisartán; AAV9, vectores virales serotipo 9; α -syn, α -sinucleína; GFP, proteína verde fluorescente; w, semana del inglés *week*.

Objetivo 2			
Estudiar la implicación del receptor AT2 cerebral en la inflamación			
Grupo	Cronología	Materiales y Métodos	Resultados
Grupo 1 (Experimento III)			
Grupo 1A (Ratones ♂ WT y AT2KO)	Jóvenes → Mediana Edad → Viejos 2m ————— 12m ————— 18m	2.2. Pruebas de comportamiento motor 2.4. Cromatografía de alto rendimiento 2.6. Aislamiento de mitocondrias y análisis de Citocromo oxidasa 2.7. Análisis de proteínas mediante WB 2.8. Extracción de ARN, RT-QPCR y Q-PCR	Figs. 14-17E (112-122 pp.)
Grupo 1B (Ratones ♂ WT)	LPS → Sacrificio 2m ————— 24h	2.8. Extracción de ARN, RT-QPCR y Q-PCR	Fig. 15F (116-118 pp.)
Grupo 1C (Ratones ♂ WT y AT2KO)	Jóvenes → Sacrificio 2m ————— 24h	2.3. Inmunohistoquímica de TH y análisis estereológico	Fig. 16G (119-121 pp.)
Grupo 1D (Ratones ♂ WT y AT2KO; Ratas ♂ WT)	Ratones/Ratas Jóvenes → Ratas Viejas 2m ————— 18m	2.5. Microdissección por captura láser 2.13. Aislamiento de microglía adulta	Fig. 23 (129-130 pp.)
Grupo 2 (Experimento IV)			
Grupo 2A (Microglia primaria; Línea microglial N9)	CG/ZD → LPS → Células/Medio celular 30min // 24h	2.7. Análisis de proteínas mediante WB 2.8. Extracción de ARN, RT-QPCR y Q-PCR 2.10. Análisis de inflamación: actividad enzimática NOX y ROCK, y TNF-α	Figs. 17-19 (121-124 pp.)
Grupo 2B (Microglia primaria; Línea microglial N9)	NOS/L-NAME/ODQ/MMA/AT779/CG → LPS → Células/Medio celular 30min // 24h	2.8. Extracción de ARN, RT-QPCR y Q-PCR 2.11. Análisis de factores de transcripción	Figs. 20-22 (124-129 pp.)
Grupo 3 (Experimentos V)			
Grupo 3A (Ratones WT ♂, ♀)	WT ♀ → OVX → Aislamiento microglía 4w	2.12. Modelo de supresión de hormonas sexuales 2.13. Aislamiento microglía adulta 2.14. Técnica de hibridación <i>in situ</i> RNAscope 2.8. Extracción de ARN, RT-QPCR y Q-PCR	Figs. 24, 25 (131-134 pp.)
Grupo 3B (Ratones AT2KO ♂, ♀)	AT2KO ♀ → OVX → Aislamiento microglía 4w	2.12. Modelo de supresión de hormonas sexuales 2.13. Aislamiento microglía adulta 2.8. Extracción de ARN, RT-QPCR y Q-PCR	Fig. 26 (133-136 pp.)
Grupo 3C (Ratones WT ♀ y AT2KO ♀)	LPS → Aislamiento microglía 24h	2.13. Aislamiento microglía adulta 2.8. Extracción de ARN, RT-QPCR y Q-PCR	Fig. 27a, b (136-138 pp.)
Grupo 3D (Ratones WT ♂, ♀)	WT ♂ → ORQ → Aislamiento microglía 2w	2.12. Modelo de supresión de hormonas sexuales y modelo de masculinización cerebral 2.13. Aislamiento microglía adulta 2.8. Extracción de ARN, RT-QPCR y Q-PCR	Fig. 27c, d (136-138 pp.)
	WT ♂/♀ → 17β-Estradiol → Aislamiento microglía 8w		

Tabla II. Representación esquemática del diseño experimental perteneciente al Objetivo 2. En la tabla figuran los animales utilizados en los diferentes grupos experimentales, la cronología de los experimentos, los materiales y métodos utilizados y las figuras y páginas que

contienen los resultados. Abreviaturas: AT2, receptor de angiotensina tipo 2; WT, forma salvaje; AT2KO, silenciamiento génico, del inglés *Knock-Out*, para el receptor AT2; LPS, lipopolisacárido; OVX, ovariectomía; ORQ, orquiectomía; CG, CGP-42112A; ODQ, 1H-[1,2,4]-oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one; MMA, Mitramicina A; L-NAME: N ω -Nitro-L-arginina metil éster clorhidrato; h, hora; w, semana del inglés *week*; m, mes.

Objetivo 3 Estudiar los receptores de angiotensina en inflamación periférica crónica (Síndrome Metabólico) y su implicación en la neurodegeneración dopaminérgica			
Grupo	Cronología	Materiales y Métodos	Resultados
Grupo A (Experimentos VI)			
Grupo A1 (ratas ♂ WT MetS)	HFD // 18w → Sacrificio	3.2. Desarrollo de un modelo de MetS 3.6. Extracción de LCR y sangre 3.7. Determinación de autoanticuerpos en LCR y suero por ELISA 3.11. Análisis de inflamación y estrés oxidativo por actividad enzimática y ELISA	Figs. 28, 31-34 (138, 139, 143-148 pp.)
Grupo A2 (ratas ♂ WT MetS)	HFD // 18w → CAND → 19w → Sacrificio	3.8. Análisis de permeabilidad de la BHE 3.10. Análisis de expresión de los componentes y receptores del SRA cerebral 3.11. Análisis de inflamación y estrés oxidativo por actividad enzimática y ELISA	Figs. 29, 31H (139-141, 144, 147-148 pp.)
Grupo A3 (ratas ♂ WT MetS)	HFD // 18w → CAND → 6-OHDA → 23w → Sacrificio	3.3. Modelo de lesión con 6-OHDA en MetS 3.9. Análisis inmunohistoquímico de TH y OX6	Fig. 30 (141-142 pp.)
Grupo B (Experimentos VII)			
Grupo B1 (ratas ♂ WT)	AT1-AA // 0w → 1w → Sacrificios → 2w	3.4. Modelo de infusión sistémica de AT1-AA humanos en rata 3.6. Extracción de LCR y sangre 3.7. Determinación de autoanticuerpos en LCR y suero por ELISA	Fig. 35 (148-149 pp.)
Grupo B2 (ratas ♂ WT)	CAND // 0w → AT1-AA → 1w → Sacrificio → 3w	3.10. Análisis de expresión de los componentes y receptores del SRA cerebral	Fig. 36 (149-151 pp.)
Grupo B3 (ratas ♂ WT)	CAND // 0w → AT1-AA → 1w → AAV9- α -syn-A53T → 3w → Sacrificio → 7w	3.4. Modelo de lesión con AAV9- α -synA53T en ratas con infusión de AT1-AA humanos 3.9. Análisis inmunohistoquímico de TH y OX6	Fig. 37 (150, 152-153 pp.)

Tabla III. Representación esquemática del diseño experimental perteneciente al Objetivo 3. En la tabla figuran los animales utilizados en los diferentes grupos experimentales, la cronología de los experimentos, los materiales y métodos utilizados y las figuras y páginas que contienen los resultados. Abreviaturas: WT, forma salvaje; MetS, síndrome metabólico; HFD, dieta alta en grasa, del inglés *high fat diet*; 6-OHDA, 6-hidroxi-dopamina; CAND, candesartán; AT1-AA, autoanticuerpos agonistas del receptor de angiotensina tipo 1; AAV9, vectores virales serotipo 9; α -syn, α -sinucleína; w, semana, del inglés *week*.

Objetivo 4

Estudiar el papel de los receptores de angiotensina en la inflamación periférica aguda del COVID-19

Grupo 1 (Experimentos VIII)	Cronología	Materiales y Métodos	Resultados
<p>Grupo 1A (Ratas ♂ jóvenes; Ratas ♂ viejas; Ratas ♂ con MetS)</p>		<p>3.2. Desarrollo de un modelo de MetS 4.4. Análisis de expresión de los componentes y receptores del SRA pulmonar (WB y Q-PCR) 4.6. Análisis de actividad enzimática de ECA2</p>	<p><i>Figs. 38, 39, 41, 42</i> (153-162 pp.)</p>
<p>Grupo 1B (Línea celular de neumocitos alveolares humanos tipo II, A549)</p>		<p>4.3. Análisis de internalización de la proteína Spike 4.4. Análisis de expresión de los componentes y receptores del SRA pulmonar (WB y Q-PCR) 4.6. Análisis de actividad enzimática para la dinámica celular de ECA2 4.7. Análisis de mediadores inflamatorios mediante ELISA</p>	<p><i>Figs. 44, 45, 47, 49</i> (164-172 pp.)</p>
<p>Grupo 2 (Experimento IX)</p>			
<p>Grupo 2A (Ratas ♂ jóvenes; Ratas ♂ con MetS)</p>		<p>3.2. Desarrollo de un modelo de MetS 4.4. Análisis de expresión de los componentes y receptores del SRA pulmonar (WB y QPCR) 4.5. Cromatografía de alto rendimiento para los niveles de angiotensina pulmonar 4.6. Análisis de actividad enzimática de ECA2</p>	<p><i>Figs. 40, 43</i> (153-154, 157-158, 163-164 pp.)</p>
<p>Grupo 2B (Línea celular de neumocitos alveolares humanos tipo II, A549)</p>		<p>4.3. Análisis de internalización de la proteína Spike 4.4. Análisis de expresión de los componentes y receptores del SRA pulmonar (WB y Q-PCR) 4.6. Análisis de actividad enzimática para la dinámica celular de ECA2 4.7. Análisis de mediadores inflamatorios mediante ELISA</p>	<p><i>Figs. 46, 48</i> (164-168, 170-171 pp.)</p>

Tabla IV. Representación esquemática del diseño experimental perteneciente al Objetivo 4. En la tabla figuran los animales utilizados en los diferentes grupos experimentales, la cronología de los experimentos, los materiales y métodos utilizados y las figuras y páginas que contienen los resultados. Abreviaturas: MetS, síndrome metabólico; CAND, candesartán; CAPT, captopril; IBUP, ibuprofeno; HFD, dieta alta en grasa del inglés *High fat diet*; ECA2, enzima convertora de angiotensina II; GFP, proteína verde fluorescente; h, horas; w, semanas, del inglés, *week*; m, meses.

ANEXO II

DECLARACIÓN DE CONFLICTOS DE INTERÉS.

La doctoranda, María A Pedrosa Sánchez, declara no tener ningún conflicto de interés en relación con la presente tesis doctoral.

FINANCIACIÓN

- ♦ Ministerio de Sanidad (PI20/00345; PI17/00828, RD16/0011/0016, Centro de Investigación Biomédica en Red Enfermedades Neurodegenerativas, CIBERNED).
- ♦ Ministerio de Economía y Competitividad (BFU2015-70523; BFU2017-82407-R; RTI2018-098830-B-I00; RTI2018-094204-B-I00).
- ♦ Gobierno de Galicia (Xunta de Galicia, Consejería de Educación; GRC2014/002; ED431C 2018/10; ED431G/05; IN845D 2020/20). Centro de Investigación en Medicina Molecular y Enfermedades Crónicas, CIMUS (2016-PG013; ED431G/05). Ayudas de apoyo a la etapa predoctoral (ED481A-2017).
- ♦ Gobierno de Navarra (Departamento de Salud; 046-2017).
- ♦ Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER).



XUNTA DE GALICIA

DELEGACIÓN TERRITORIAL
DA CORUÑA

Xefatura Territorial da Consellería do
Medio Rural e do Mar

Edificio Administrativo Monelos
Vicente Ferrer, 2
15071 A Coruña

galicia

REGISTRO XERAL DA XUNTA DE GALICIA
REGISTRO DO EDIFICIO ADMINISTRATIVO DA CORUÑA
A CORUÑA

SAÍDA 108582 / RX 1039888

Data 01/09/2015 09:00:34



José Manuel Cifuentes
Departamento de Anatomía
Facultade de Veterinaria
Campus Universitario
27002 Lugo

NOTIFICACIÓN DE RESOLUCIÓN DE AUTORIZACIÓN DE PROXECTOS DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL

Expediente núm.: 15005/15/002

Data de inicio: 21.7.2015

Interesado: José Luis Labandeira García

Forma de inicio: solicitude do interesado

Procedemento: resolución de autorización

Notifícolle que con data 29 de xullo de 2015, o xefe territorial da Consellería do Medio Rural e do Mar emitiu unha resolución de autorización do proxecto de experimentación animal, cuxo texto íntegro é o seguinte:

ANTECEDENTES

A interesada, como representante do centro da Facultade de Medicina (Universidade de Santiago de Compostela), presentou con data 3.7.2015 e rexistro de entrada 79260 RX 1272914, unha solicitude para a realización do proxecto de experimentación animal, cuxos datos se detallan a continuación:

Denominación do proxecto: Estudio de novas terapias en modelos de Parkinson e outras enfermidades neurodexenerativas

Nome do centro usuario: Facultade de Medicina (USC)

Persoa responsable do proxecto: José Luis Labandeira García

Establecemento onde se realizarán os procedementos do proxecto (ou lugar xeográfico no caso de traballos de campo): Laboratorio de Neuroloxía Experimental e Neuroanatomía da Facultade de Medicina

Clasificación do proxecto: Tipo I Tipo II Tipo III

CONSIDERACIÓNS LEGAIS E TÉCNICAS

1. O Real decreto 53/2013, de 1 de febreiro (BOE núm. 34, do 8 de febreiro), polo que se establecen as normas básicas aplicables para a protección dos animais utilizados en experimentación e outros fins científicos, incluíndo a docencia, establece no seu artigo 33 as condicións de autorizacións dos proxectos con animais de experimentación.
2. O artigo 89 da Lei 30/1992, de 26 de novembro, do réxime xurídico das administracións públicas e do procedemento administrativo común (BOE núm. 285, 27 de novembro de 1992), modificada pola Lei 4/1999, de 14 de xaneiro, establece que a resolución que poña fin o procedemento decidirá todas as cuestións expostas polos interesados e aquelas outras derivadas deste.





XUNTA DE GALICIA

DELEGACIÓN TERRITORIAL
DA CORUÑA

Xefatura Territorial da Consellería do
Medio Rural e do Mar

Edificio Administrativo Monelos
Vicente Furrus, 2
15071 A Coruña

galicia

3. O Servizo de Gandaría da Coruña revisou a documentación achegada na solicitude e o resultado favorable da avaliación do proxecto, realizada polo órgano habilitado Sección de Experimentación animal do Comité de Bioética da Universidade de Santiago de Compostela.

Esta xefatura territorial é competente para ditar unha resolución, de conformidade co artigo 11 do Decreto 245/2009 de 3 de abril, polo que se regulan as delegacións territoriais da Xunta de Galicia e o Decreto 46/2012, de 19 de xaneiro, polo que establece a estrutura orgánica da Consellería do Medio Rural e do Mar e do Fondo Galego de Garantía Agraria.

De acordo con todo o indicado, RESOLVO:

1. Autorizar o proxecto solicitado.
2. Notificarlle esta resolución ao interesado.

O mencionado proxecto non deberá someterse a unha avaliación retrospectiva.

A autorización deste proxecto terá unha duración de 5 anos, transcorridos os cales, deberá ser renovada esta autorización.

A citada autorización é unicamente válida nas condicións que figuran no expediente. Ante calquera cambio significativo no proxecto que poida ter efectos negativos sobre o benestar dos animais, deberá solicitar a confirmación da autorización ao Servizo Provincial de Gandaría.

Esta autorización poderá ser suspendida, no caso de que o proxecto non se leve a cabo de acordo coas condicións de autorización e retirada, previo expediente tramitado ao que se lle dará audiencia.

Contra a presente resolución, que non pon fin á vía administrativa, poderá interpor recurso de alzada ante a conselleira de Medio Rural e do Mar da Xunta de Galicia no prazo dun mes contado a partir da recepción da notificación da presente resolución, conforme coa Lei 30/1992, do 26 de novembro, (BOE núm.: 285, 27 de novembro de 1992), de réxime xurídico das administracións públicas e do procedemento administrativo común na súa redacción dada pola Lei 4/1999, do 13 de xaneiro.

A Coruña, 31 de xullo de 2015

O xefe do Servizo de Gandaría

Eugenio Romero Senande





RESOLUCIÓN DE AUTORIZACIÓN DE PROXECTO DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL

Expediente núm.: 15012/2021/012

Persoa solicitante: Anxo Vidal Figueroa

Forma de inicio: solicitude da persoa interesada

Data de inicio do expediente: 16.4.2021

Procedemento: resolución de autorización

ANTECEDENTES

A persoa solicitante presentou con data 16.4.2021 unha solicitude para a realización do proxecto de experimentación animal (entrada no Rexistro electrónico da Xunta de Galicia 2021/880369), cuxos datos se detallan a continuación:

Denominación do proxecto: Estudos de novas terapias en modelos de enfermidade de Parkinson e outras enfermidades neurodexenerativas

Nome do centro usuario: Centro de Biomedicina Experimental (CEBEGA) da Universidade de Santiago de Compostela

Persoa responsable do proxecto: José Luis Labandeira García

Establecemento onde se realizarán os procedementos do proxecto (ou lugar xeográfico no caso de traballos de campo): Centro de Biomedicina Experimental (CEBEGA)

Clasificación do proxecto : Tipo I Tipo II Tipo III

CONSIDERACIÓNS LEGAIS E TÉCNICAS

1 O Real decreto 53/2013, de 1 de febreiro (BOE 34, do 8 de febreiro), polo que se establecen as normas básicas aplicables para a protección dos animais utilizados en experimentación e outros fins científicos, incluíndo a docencia, establece no seu artigo 33 as condicións de autorizacións dos proxectos con animais de experimentación.

2 O artigo 88 da Lei 39/2015, de 1 de outubro, do procedemento administrativo común das administracións públicas (BOE 236, do 2 de outubro de 2015) establece que a resolución que poña fin o procedemento decidirá todas as cuestións expostas polos interesados e aquelas outras derivadas deste.





3 O Servizo de Gandaría da Coruña revisou a documentación achegada na solicitude e o resultado favorable da avaliación do proxecto realizada polo órgano habilitado, a Sección de Experimentación Animal do Comité de Bioética da Universidade de Santiago de Compostela.

Esta xefatura territorial é competente para ditar unha resolución, de conformidade co Decreto 149/2018, do 5 de decembro, polo que se establece a estrutura orgánica da Consellería do Medio Rural e se modifica parcialmente o Decreto 177/2016, do 15 de decembro, polo que se fixa a estrutura orgánica da Vicepresidencia e das consellerías da Xunta de Galicia (DOG 235, do 11 de novembro).

De acordo con todo o indicado, RESOLVO:

1 Autorizar o proxecto solicitado.

2 O proxecto non precisa someterse a unha avaliación retrospectiva.

3 A autorización deste proxecto terá unha duración de cinco anos e unha vez transcorrido este tempo, deberá ser renovada.

A citada autorización é unicamente válida nas condicións que figuran no expediente. Ante calquera cambio significativo no proxecto que poida ter efectos negativos sobre o benestar dos animais, deberá solicitar a confirmación da autorización ao Servizo Provincial de Gandaría.

Esta autorización poderá ser suspendida no caso de que o proxecto non se leve a cabo de acordo coas condicións de autorización e retirada, previo expediente tramitado ao que se lle dará audiencia.

Contra a presente resolución, que non pon fin á vía administrativa, poderá interpoñer un recurso de alzada ante o conselleiro de Medio Rural. O prazo comezará a contar dende o día seguinte ao da recepción desta resolución. Todo isto, segundo o disposto nos artigos 121 e 122 da citada Lei 39/2015.

Mediante este escrito notifícase a Anxo Vidal Figueroa esta resolución segundo o esixido no artigo 40.1 da antedita Lei 39/2015.





DICTAMEN DEL COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN DE SANTIAGO-LUGO

Guillermo José Prada Ramallal, Secretario del Comité de Ética de la Investigación de Santiago-Lugo,

CERTIFICA:

Que este Comité evaluó en su reunión del día 18 de enero de 2018 el estudio:

Título: Obtención, purificación y concentración de Autoanticuerpos frente al receptor de Angiotensina tipo 1 a partir de muestras sanguíneas de pacientes con preeclampsia

Promotor: Ana Isabel Rodríguez Pérez

Tipo de estudio: Outros

Versión: versión nº2 de 3 de enero de 2018

Código del Promotor: AIRPRV-AAAT1-2018-01

Código de Registro: 2017/618

Y, tomando en consideración las siguientes cuestiones:

- La pertinencia del estudio, teniendo en cuenta el conocimiento disponible, así como los requisitos legales aplicables, y en particular la Ley 14/2007, de investigación biomédica, el Real Decreto 1716/2011, de 18 de noviembre, por el que se establecen los requisitos básicos de autorización y funcionamiento de los biobancos con fines de investigación biomédica y del tratamiento de las muestras biológicas de origen humana, y se regula el funcionamiento y organización del Registro Nacional de Biobancos para investigación biomédica, la ORDEN SAS/3470/2009, de 16 de diciembre, por la que se publican las Directrices sobre estudios Postautorización de Tipo Observacional para medicamentos de uso humano, y la Circular nº 07/2004, de investigaciones clínicas con productos sanitarios.
- La idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio, justificación de los riesgos y molestias previsibles para el sujeto, así como los beneficios esperados.
- Los principios éticos da Declaración de Helsinki vigente.
- Los Procedimientos Normalizados de Trabajo del Comité.

Emite un dictamen **FAVORABLE** para la realización del estudio **por el/la investigador/a del centro:**

Centros	Investigadores Principales
CIMUS. Universidade de Santiago de Compostela (USC)	Ana Isabel Rodríguez Pérez

En Santiago de Compostela, a 23 de enero 2018.

El Secretario del Comité Territorial de Ética de la Investigación de Santiago Lugo,



guillermo.jose.prada.ramallal@sergas.es

2018-01-24 11:11:26 +02'00'

Guillermo José Prada Ramallal



Guillermo José Prada Ramallal, Secretario del Comité de Ética de la Investigación de Santiago-Lugo,

HACE CONSTAR QUE:

1.- El Comité Territorial de Ética de la Investigación de Santiago-Lugo cumple tanto en su composición como en sus PNTs los requisitos legales vigentes (RD 1090/2015 de ensayos clínicos, y la Ley 14/2007 de Investigación Biomédica).

2.- La composición actual del Comité Territorial de Ética de la Investigación de Santiago-Lugo es:

- **Juan Manuel Vázquez Lago (Presidente)**. Médico especialista en Medicina Preventiva y Salud Pública. Área de Gestión Integrada de Santiago.
- **Pilar Rodríguez Ledo (Vicepresidenta)**. Médico especialista en Medicina Familiar y Comunitaria. Área de Gestión Integrada de Lugo.
- **Guillermo José Prada Ramallal (Secretario)**. Médico especialista en Farmacología Clínica. Área de Gestión Integrada de Santiago. Fundación Ramón Domínguez.
- **Lorenzo Armenteros del Olmo (Vicesecretario)**. Médico especialista en Medicina Familiar y Comunitaria. Área de Gestión Integrada de Lugo.
- **Francisco Campos Pérez**. Biólogo. Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela.
- **Rosana Castelo Domínguez**. Farmacéutica de Atención Primaria. Área de Gestión Integrada de Santiago.
- **Ricardo García Martínez**. Licenciado en Derecho. Área de Gestión Integrada de Lugo.
- **Jaime Gulín Dávila**. Farmacéutico especialista en Farmacia Hospitalaria. Área de Gestión Integrada de Lugo.
- **Victor Herrán Carreira**. Paciente. ADIL-Asociación de Diabéticos Lucense.
- **María Jesús Lamas Díaz**. Farmacéutica especialista en Farmacia Hospitalaria. Área de Gestión Integrada de Santiago.
- **Carlos Rodríguez Moreno**. Médico especialista en Farmacología Clínica. Área de Gestión Integrada de Santiago.
- **Rafael Carlos Vidal Pérez**. Médico especialista en Cardiología. Área de Gestión Integrada de Lugo.
- **María Jesús Wandosell Picatoste**. Enfermera. Área de Gestión Integrada de Santiago.

Para que conste donde proceda, y a petición del promotor/investigador, en Santiago de Compostela, a 23 de enero de 2018.

El Secretario del Comité Territorial de Ética de la Investigación de Santiago Lugo,



guillermo.jose.prada.ramallal@sergas.es

2018.01.24 11:11:28 +02'00'

Guillermo José Prada Ramallal



La presente tesis doctoral estudia la implicación de la inflamación periférica crónica (envejecimiento o síndrome metabólico) y aguda (infección por SARS-CoV-2) en la expresión de los receptores de angiotensina. Se estudia la implicación del receptor AT1 cerebral en la respuesta microglial inflamatoria y en la degeneración dopaminérgica en un modelo de Parkinson basado en sinucleinopatía y el efecto neuroprotector de los antagonistas del receptor AT1, la regulación en la expresión de receptores de angiotensina en células microgliales y la implicación de la inflamación periférica crónica en la degeneración dopaminérgica. Además, se estudia el papel de los receptores de angiotensina en la inflamación periférica aguda del COVID-19 y el efecto protector de tratamientos moduladores del Sistema Renina-Angiotensina.