



## Máster Universitario en Neurociencia

# **SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA NUCLEAR: IMPLICACIONES EN LA DEGENERACIÓN DOPAMINÉRGICA**

**TRABAJO FIN DE MASTER PRESENTADO POR:**

**Jorge Rendón**

**Universidad de A Coruña**



**SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA NUCLEAR:  
IMPLICACIONES EN LA DEGENERACIÓN  
DOPAMINÉRGICA**

**TRABAJO FIN DE MASTER PRESENTADO POR:**

**Jorge Rendón**

**TUTORES:**

**José Luis Labandeira García**

Catedrático de Anatomía y Embriología Humana

**Begoña Villar Cheda**

Profesora interina

Dpto Ciencias Morfológicas

Facultad de Medicina

Universidad de Santiago de Compostela

D. JOSE LUIS LABANDEIRA GARCÍA, Catedrático de Anatomía y Embriología Humana, y D<sup>a</sup>. BEGOÑA VILLAR CHEDA, Profesora Interina del Departamento de Ciencias Morfológicas de la facultad de Medicina de la Universidad de Santiago de Compostela

HACEN CONSTAR QUE:

D. JORGE RENDÓN HINESTROZA ha realizado, bajo nuestra tutela, su trabajo fin de máster titulado: Sistema renina angiotensina nuclear: implicaciones en la degeneración dopaminérgica, y que dicho trabajo reúne todas las condiciones necesarias para ser presentado y valorado por la comisión correspondiente.

En Santiago de Compostela, 8 de Julio 2014

Fdo: José Luis Labandeira García  
Catedrático de Anatomía y Embriología  
Dpto Ciencias Morfológicas

Fdo: Begoña Villar Cheda  
Profesora interina  
Dpto Ciencias Morfológicas

Jorge Rendón Hinestroza  
Alumno del máster de neurociencias

# ÍNDICE

---

<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>1 SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA (SRA)</b>	<b>2</b>
1.1 COMPONENTES DEL SRA	2
1.2. SRA LOCAL O TISULAR	5
1.3 SRA INTRACELULAR O INTRACRINO	5
1.4 SRA EN EL SISTEMA NERVIOS CENTRAL	6
1.5 SRA CEREBRAL Y LA ENFERMEDAD	7
<b>2. ENFERMEDAD DE PARKINSON</b>	<b>7</b>
<b>3. SRA Y EL SISTEMA DOPAMINÉRGICO</b>	<b>9</b>
<hr/> <b>JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS</b>	<hr/> <b>11</b>
<hr/> <b>MATERIAL Y METODOS</b>	<hr/> <b>13</b>
1 ANIMALES	14
2 OBTENCIÓN DE NÚCLEOS AISLADOS	14
3 CUANTIFICACIÓN DE PROTEINAS Y WESTERN BLOT	15
4 ANALISIS DE LA TRANSCRIPCION EN NUCLEOS AISLADOS	16
<hr/> <b>RESULTADOS</b>	<hr/> <b>18</b>
1. CARACTERIZACIÓN DE LOS NUCLEOS AISLADOS	19
2 PRESENCIA DE RECEPTORES AT1 Y AT2 EN LA FRACCION NUCLEAR	20
3 ANALISIS DE LA EXPRESION GENICA POR PCR	21
<hr/> <b>DISCUSIÓN</b>	<hr/> <b>22</b>
1. PRESENCIA DE RECEPTORES DE AII EN LA FRACCION NUCLEAR	23
2. PAPEL DE LA AII A NIVEL NUCLEAR.	23
3. SRA NUCLEAR Y SU RELACIÓN CON LA DEGENERACIÓN DOPAMINÉRGICA	24
<hr/> <b>CONCLUSIONES</b>	<hr/> <b>26</b>
<hr/> <b>BIBLIOGRAFIA</b>	<hr/> <b>28</b>
<hr/> <b>ABREVIATURAS</b>	<hr/> <b>38</b>

# **INTRODUCCIÓN**

# **1. EL SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA**

El sistema renina angiotensina (SRA) es filogenéticamente uno de los sistemas hormonales más antiguos, siendo la renina una de las primeras sustancias que mostró efectos fisiológicos. En 1898 Tigersted y Bergman observaron que la inyección de extractos renales ejercía profundos efectos en la presión sanguínea. La hormona angiotensina II (AII), es el péptido efector más importante del sistema y se forma por la acción secuencial de dos enzimas, la renina y la enzima convertidor de angiotensina (ECA) sobre los precursores angiotensinógeno (AGT) y angiotensina I (AI) respectivamente.

Durante años, el SRA clásico fue considerado como un sistema humoral circulante cuya función principal es la regulación de la presión sanguínea y la homeostasis del sodio y agua. El SRA induce vasoconstricción por el aumento en la liberación de norepinefrina desde las terminales simpáticas, también activa la liberación de aldosterona desde el cortex adrenal y la hormona antidiurética desde la neurohipófisis, por lo cual el SRA, parece haber jugado un papel importante en la supervivencia de mamíferos y en la evolución humana (Lev-Ran y Porta, 2005).

## **1.1 COMPONENTES DEL SRA**

Los componentes más importantes del sistema, representados en la Figura 1, son:

### **Angiotensinógeno y AII**

El AGT es una glucoproteína de peso molecular entre 58 y 61 KDa, aunque se produce principalmente en el hígado está presente, como un péptido biológicamente inactivo, en otros tejidos como el corazón, riñones y tejido adiposo. Por medio de la acción de la renina, el angiotensinógeno es convertido en AI (10 aminoácidos), el cual constituye el péptido precursor del SRA (Zaman y cols., 2002).

La AII, es un octapéptido con diversos efectos en diferentes tejidos (Weyhenmeyer y Phillips, 1982), participando activamente en los procesos de inflamación tisular (Liu y cols., 2008).

### **Renina y (pro)renina**

La renina es una glucoproteína con un peso molecular de entre 35 y 45 KDa, es producida fundamentalmente por las células del aparato yuxtaglomerular del riñón siendo un enzima clave en la generación de AII debido a la naturaleza limitante de su actividad hidrolítica sobre el AGT (Zaman y cols., 2002).

La renina se sintetiza a partir del precursor (pre-prorenina) que contiene un péptido señal, que es eliminado rápidamente en el retículo endoplásmico, dando lugar a la (prorenina), esta puede ser empaquetada en gránulos de almacenamiento donde se lleva a cabo la maduración postraduccional, lo cual incluye la activación de la pro-renina a renina mediante rotura proteolítica y glicosilación, procesos todavía poco conocidos (Dinh y cols., 2001).

### **Enzima convertidor de angiotensina**

La ECA es una enzima que cataliza el paso enzimático final en la producción de AII a partir de AI (Yoshida y cols., 1998), es una glucoproteína de 170 KDa que se encuentra en varios tejidos como los vasos sanguíneos, los riñones, el corazón y el cerebro.

Además de actuar en la conversión de AI a AII (un potente vasoconstrictor) la ECA también interviene en la inactivación de la angiotensina 1-7 que tiene efectos vasodilatadores al actuar sobre el receptor MAS (Deddish y cols., 1998).

Hace unos años se descubrió un nuevo enzima convertidor de angiotensina que fue llamado ECA2, homóloga en un 42% con la ECA, pero con actividades bioquímicas diferentes (Donoghue y cols., 2000; Tipnis y cols., 2000). Por una parte la ECA2 genera angiotensina 1-9 al hidrolizar la AI, constituyendo una vía indirecta para generar AII y por otra parte ECA2 actúa sobre la AII formando la angiotensina 1-7 que tiene propiedades vasodilatadoras (Donoghue y cols., 2000; Tipnis y cols., 2000) (Figura 1).

### **Receptor de AII tipo 1**

El receptor de AII tipo 1 (AT1) es un glucoproteína de 41 KDa, que pertenece a la superfamilia de los receptores acoplados a proteína G (Oparil y cols., 2004; Ji y cols., 1991; Sanberg, 1994). En humanos es codificado por un único gen, mientras que en los murinos se conocen 2 genes que dan origen a dos formas del receptor conocidas como receptor AT1a y receptor AT1b respectivamente y que presentan más de 95% de homología (Kaschina y Unger, 2003).

El receptor AT1 se localiza principalmente en las glándulas suprarrenales, el músculo liso vascular, el riñón y el corazón, aunque también ha sido descrito en el cerebro, fundamentalmente en las áreas implicadas en el control de la presión arterial (de Gasparo y cols., 1994).

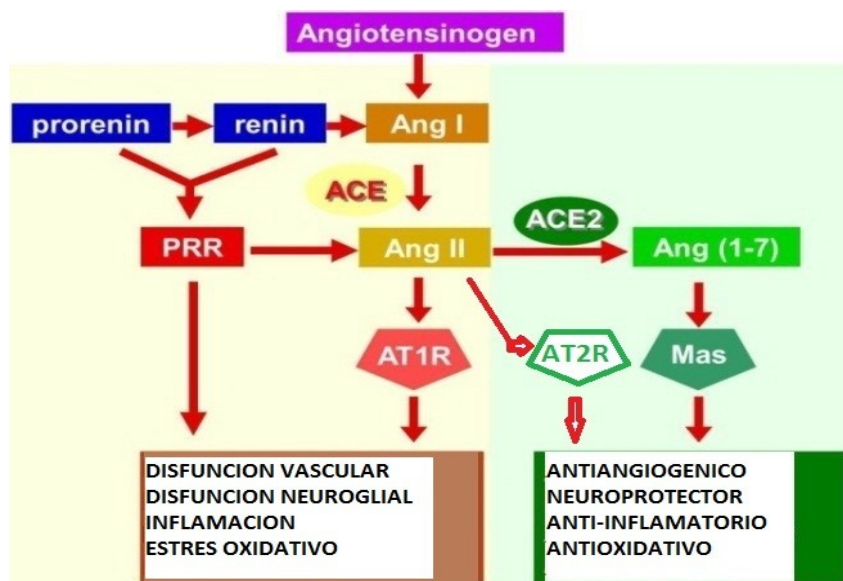
La función de la AII vía receptores AT1 inicia una serie de efectos sistémicos, actuando de dos formas:

- 1). Como hormona circulante: produciendo vasoconstricción y estimulación de la síntesis de aldosterona y vasopresina.
- 2). Efecto local (autocrino y paracrino): estimulando la proliferación celular, la formación de colágeno o induciendo la apoptosis (Watanabe y cols., 2005).

### Receptor de AII tipo 2

El receptor de AII de tipo 2 (AT2), pertenece, al igual que el AT1, a la superfamilia de los receptores acoplados a proteína G. Tiene un peso molecular de 40 KDa aproximadamente (de Gasparo y cols., 2000) y es codificado por un único gen. (Touyz y Schiffrin, 2000). El receptor AT2 se expresa de manera predominante durante la etapa fetal, disminuyendo su expresión de manera considerable en el momento del nacimiento, aunque se sigue detectando en niveles bajos en varios tejidos como el nervioso, cardíaco, y renal (Kaschina y Unger, 2003). En la etapa adulta los niveles de expresión de este receptor se incrementan bajo condiciones de estrés o de daño tisular (Escobar y cols., 2004) como después de una lesión vascular, infarto de miocardio, insuficiencia cardiaca, cardiomiopatía dilatada, cicatrización de heridas y lesión de nervios periféricos (Gallinat y cols., 1997).

Los efectos fisiológicos del receptor AT2 son, en general, contrarios a los del receptor AT1, participa en la vasodilatación, en la inhibición de la proliferación celular, en el desarrollo fetal y en la diferenciación tisular (Escobar y cols., 2004).



**Figura 1.** Esquema representativo del Sistema Renina Angiotensina, modificado de Qihong y cols 2013.



## 1.2 SRA LOCAL O TISULAR

Uno de los avances más significativos en las últimas dos décadas es el descubrimiento de la existencia de SRA locales (SRAI) o tisulares (Re, 2004). Un SRAI se caracteriza por:

- 1) la presencia a nivel tisular de los componentes del sistema (AGT, enzimas de conversión, y receptores),
- 2) la síntesis local de AII y otros péptidos derivados de la Angiotensina, y
- 3) la unión de la AII a receptores específicos con el resultado de una respuesta fisiológica local (Paul y cols, 2006).

Los sistemas locales están regulados independientemente del SRA sistémico, pero puede interactuar con él (Danser, 2003). Se han identificado SRAI en el corazón (Danser, 2003), el riñón (Haller y cols., 2006), el cerebro (Sakai y cols., 2005), el páncreas (Leung y cols., 2005), el aparato reproductor (Paul y cols., 2006), el sistema linfático (Paul y cols., 2006), y el tejido adiposo (Thatcher y cols., 2009).

Las funciones del SRAI son variadas, entre ellas están el crecimiento y el remodelado del corazón, la regulación de la presión arterial (Bader y Ganten, 2008), la estimulación del apetito y la secreción hormonal pancreática entre otras (Lago y cols., 2011).

## 1.3 SRA INTRACELULAR O INTRACRINO

Recientemente se ha postulado la existencia de una SRA intracelular (SRAi), en el que tanto la síntesis de AII, como sus efectos biológicos tienen lugar en una localización intracelular (Kumar y cols., 2007).

Diferentes hechos apoyan la hipótesis de la presencia del SRA a nivel intracelular (Kumar y cols., 2007): La existencia de diferentes formas glucosiladas de AGT (Sherrod y cols., 2005), diferentes formas de renina como consecuencia de “*splicing*” alternativo (Clausmeyer y cols., 2000), formas secretadas de ECA intracelular, (Camargo y cols., 2006), enzimas alternativas para la síntesis de AII como las catepsinas y la quimasa (Belova, 2000) y, finalmente, la detección de esos componentes intracelularmente (Camargo y cols., 2006).

Por otra parte la renina puede tener efectos intracelulares (Re, 2003) a través del receptor de prorenina (PRR) que se acopla a un sistema de transducción de señales con claros efectos a nivel celular (Scheffé y cols., 2006).

El SRAi se ha estudiado principalmente en el sistema cardiovascular donde se ha comprobado que existe una activación selectiva de la generación de AII intracelular bajo determinadas condiciones fisiopatológicas, como la hiperglucemia (Singh y cols., 2007). Se desconoce por el momento si el SRAi es un sistema extendido en todos los tipos celulares o, si está restringido a ciertas células, sistemas, o tejidos específicos sometidos a ciertas condiciones fisiopatológicas. El hecho de que se hayan comprobado efectos de la AII intracelular en una amplia variedad de tipos celulares como las células cardíacas (Baker y cols., 2004), renales (Zhuo y cols., 2006), hepáticas (Cook y cols., 2001) o vasculares (Cook y cols., 2006) es indicativo de que se trata de un sistema muy relevante (Kumar y cols., 2007).

#### **1.4 SRA EN EL SISTEMA NERVIOS CENTRAL**

El cerebro como otros órganos, tiene su propio SRAi que es independiente del SRA circulante (Allen y cols., 1992; Mendelsohn y cols., 1984; Saavedra, 2005; Phillips y de Oliveira, 2008), los primeros indicios de esto surgieron cuando se vio que el AGT, la AI y AII, presentes en el cerebro, no podían atravesar la barrera hematoencefálica (Martin y cols., 2006). Cabe destacar que el SRA del cerebro no es totalmente independiente del sistema periférico, ya que la AII periférica puede interactuar con el SRAi en regiones que carecen de una barrera hematoencefálica normal, concretamente, a nivel de los órganos circunventriculares (Li y cols., 2004).

Los distintos componentes del SRA, (como AGT, receptores, o enzimas) han sido identificados en el cerebro y mientras que algunos tienen una amplia distribución otros presentan una localización más restringida (Davisson, 2003). La mayoría del AGT sintetizado en el cerebro es producido por astrocitos y es constantemente secretado al espacio intersticial y en el fluido cerebro espinal (Carey y Siragy, 2003; Regitz-Zagrosek y cols., 1996).

En general se acepta que el paso limitante en la producción de AII y todos los péptidos relacionados, es la escisión enzimática del AGT por la renina, por lo tanto, un SRA local solamente podría existir en el cerebro si la renina también está presente (Re, 2003). Aunque la actividad enzimática de la renina fue demostrada en el cerebro, los niveles son muy bajos, y no explican la biosíntesis de la AII en el cerebro, lo que sugiere que la AII y los péptidos derivados deben ser formados a través de mecanismos independientes de renina (Grobe y cols., 2008).

Los receptores AT1 presentan una amplia distribución por todo el cerebro (Grobe y cols., 2008), que es consistente en los distintos mamíferos estudiados como: ratas, ratones, hámster,

perros, monos y humanos (Chai y cols., 2000; Wright y Harding 1995, 1997, 2004;) este receptor parece ser el responsable de las funciones clásicas asociadas con el SRA en el cerebro (Saavedra, 1999; Thomas y cols., 2003).

Los receptores AT2 también están presentes en el cerebro (Grobe y cols., 2008) fundamentalmente durante el desarrollo embrionario y fetal, teniendo una distribución más restringida en el adulto (Kaschina y Unger, 2003).

Aunque se desconocen algunas de las funciones específicas del SRA en el cerebro, se sabe que actúa regulando numerosos procesos fisiológicos llegándose a sugerir que los péptidos de angiotensina podrían actuar como neurotransmisores, (Grobe., y cols., 2008).

### **1.5 EL SRA CEREBRAL Y LA ENFERMEDAD**

Aunque el SRA cerebral fue inicialmente asociado con el control de la presión sanguínea y el equilibrio hidrosalino (Saavedra, 2005; Cuadra y cols., 2010), estudios más recientes relacionan al SRA cerebral con funciones cerebrales adicionales implicando a este sistema en desordenes tales como ansiedad, estrés (Peng y cols., 2002), depresión (Saab y cols., 2007) o ingesta de alcohol (Maul y cols., 2005).

Muchos estudios han demostrado que el bloqueo de los receptores AT1 y los tratamientos con inhibidores de ECA tienen efectos beneficiosos previniendo la aparición del accidente cerebrovascular (Stier y cols., 1993), o reduciendo el daño cerebral debido a la reducción de la respuesta inflamatoria (Li y cols., 2005; Lou y cols., 2004).

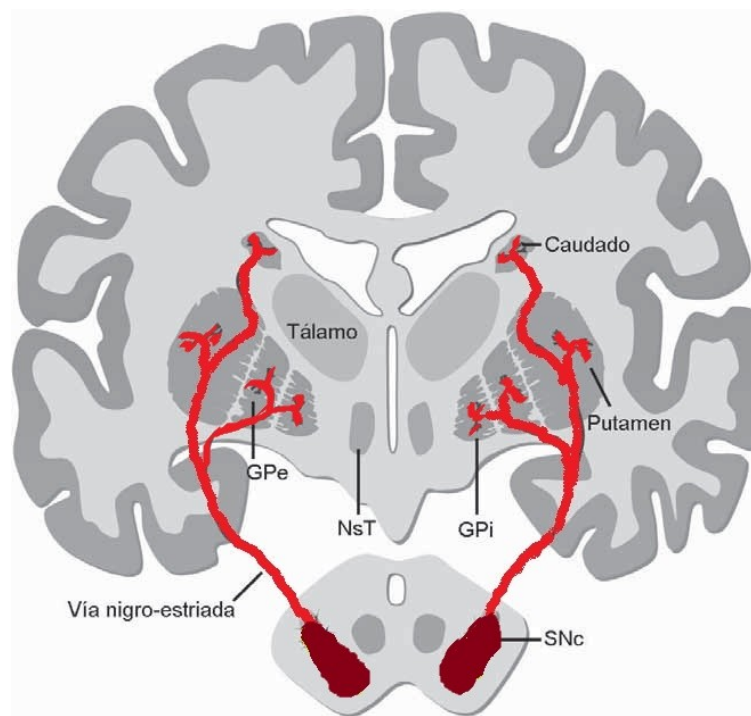
Muchos estudios, tanto clínicos como moleculares, y/o genéticos revelan la implicación del SRA en la modulación del estrés oxidativo, el envejecimiento y la neurodegeneración relacionando al SRA con patologías neurodegenerativas como la esclerosis múltiple (Kleiman y cols., 2010; Stegbauer y cols., 2009), la enfermedad de Alzheimer (Savaskan, 2005) y la enfermedad de Parkinson (Labandeira-García y cols., 2011).

## **2. ENFERMEDAD DE PARKINSON**

La enfermedad de Parkinson (EP) es una enfermedad neurodegenerativa progresiva de curso prolongado y etiología incierta. Descrita en 1817 por James Parkinson, quien la describió como "parálisis temblorosa", la EP forma parte de las alteraciones en el sistema motor. Se manifiesta por una combinación variable de temblor, rigidez, bradicinesia y una alteración característica de la marcha y la postura (Aminoff, 1998). Los pacientes con la EP, además de

los síntomas motores clásicos, tienen síntomas no motores (Chaudhuri y cols., 2007) como depresión, alucinaciones, ansiedad o psicosis. A pesar de que estas condiciones son frecuentes en la EP y que reducen la calidad de vida, siguen subdiagnosticadas y, por ello, sin tratamiento (Schneider y cols., 2008).

La causa de esta enfermedad es la degeneración progresiva de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra pars compacta (SNc), una población de neuronas del mesencéfalo ventral que proyectan hacia el estriado, principalmente al núcleo caudado y el putamen, por lo que su muerte representa un déficit de dopamina en estas estructuras (Figura 2) (Hornykiewicz, 2001; Arias-Carrion, 2008). Una de las principales características es la presencia, en las neuronas que sobreviven, de inclusiones proteicas intracitoplasmáticas llamadas cuerpos de Lewy, formados por ubiquitina y  $\alpha$ -sinucleína (Hornykiewicz, 2001; Arias-Carrion, 2008). Actualmente se reconoce a la EP como una enfermedad neurodegenerativa multisistémica que afecta a diversas vías neuronales y sistemas de neurotransmisores (Hodaie y Lozano, 2007).



**Figura 2.** Estructuras que integran a los ganglios basales en el cerebro humano. Las proyecciones de la sustancia nigra llegan al estriado, principalmente al núcleo caudado y putamen. GPe: segmento externo del globo pálido; GPi: segmento interno del globo pálido; SNc: zona compacta de la sustancia nigra; NST: núcleo subtálmico. Modificada de Arias-Carrion , 2008

La EP se manifiesta cuando la pérdida de las neuronas dopaminérgicas excede el umbral crítico: 70-80% de las terminales dopaminérgicas en el estriado y 50-60% de los somas neuronales en la SNc ya que existen mecanismos compensatorios que retrasan la aparición de los síntomas. Una vez que aparecen los primeros síntomas, la muerte neuronal continua y los trastornos motores progresan lentamente (Hornykiewicz, 2001; Arias-Carrion, 2008).

Aunque la degeneración y muerte de las neuronas dopaminérgicas de la SNc, es uno de los principales problemas, esta degeneración se extiende a otros núcleos del tallo cerebral y otras áreas del cerebro que presentan células dopaminérgicas (Hornykiewicz, 2001; Arias-Carrion, 2008), por lo que además del déficit de dopamina en el estriado, se presentan alteraciones de otros neurotransmisores como noradrenalina, serotonina, acetilcolina y ácido gamma-aminobutírico (Hornykiewicz, 2001; Arias-Carrion, 2008).

Actualmente, se desconocen las causas que generan la mayor parte de los casos de EP y se postula que el estrés oxidativo, la disfunción mitocondrial, toxinas exógenas, acumulación intracelular de metabolitos tóxicos, infecciones virales, excitotoxicidad y deficiencias en el sistema inmune, pueden ser factores que favorecen la aparición de la EP (Hornykiewicz, 2001).

Tanto las anormalidades genéticas que causan la patología, como la exposición a toxinas ambientales favorecen el estrés oxidativo, lo que puede dañar específicamente a las neuronas dopaminérgicas. La eliminación de antioxidantes como la vitamina E en la dieta induce la pérdida del 33% de neuronas dopaminérgicas en la sustancia nigra de ratas, mientras que otras regiones cerebrales permanecen sin alteraciones (Dexter, 1994). El alto potencial de oxidación del propio metabolismo de la noradrenalina y la serotonina aumentan el estrés oxidativo en los pacientes afectados por la EP, lo que explica el daño encontrado en el locus coeruleus y los núcleos del rafe, regiones en donde se sintetizan ambos neurotransmisores, respectivamente (Dexter, 1994).

### **3. SRA Y EL SISTEMA DOPAMINÉRGICO**

Diversos estudios ponen de manifiesto la presencia de un SRAI en los ganglios basales, así altas concentraciones de ECA han sido observadas en el estriado y la sustancia nigra de mamíferos (Quinlan y Phillips, 1981; Allen y cols., 1992) y recientemente se ha demostrado la presencia de los receptores AT1 y AT2 en las neuronas dopaminérgicas y las células gliales

(como astrocitos y microglía) de la sustancia nigra (Rodríguez-Pallares y cols., 2008; Joglar y cols., 2009; Garrido-Gil y cols., 2013).

Varios trabajos muestran una relación importante entre el SRA y la dopamina en los ganglios basales (Rodríguez-Perez y cols., 2010, 2012; Labandeira-García y cols., 2012). El SRA a través del receptor AT1 potencia el estrés oxidativo, un factor muy importante en el desarrollo y evolución de todas las formas de la EP, aunque se discute si es un evento primario o una consecuencia de otros factores patogénicos. En cualquier caso, la degeneración dopaminérgica está incuestionablemente mediada por la sobreproducción de especies oxigenadas reactivas (EROs) y especies reactivas de nitrógeno (ERN) (Simonnet y cols., 1981; Rodríguez-Pallares y cols., 2007, 2008;).

Los tratamientos con candesartan (un antagonista del receptor AT1) consiguen disminuir la muerte neuronal dopaminérgica ya que disminuye el EO y la inflamación (Villar-Cheda y cols., 2012). En situaciones de riesgo, como el envejecimiento, existe un desajuste en la interacción de estos dos sistemas, por una parte el SRA está hiperactivo, mientras que hay una disminución de la dopamina y sus receptores. Este desajuste va acompañado de un aumento en el EO e inflamación así como de una mayor vulnerabilidad de las neuronas dopaminérgicas a la degeneración (Villar-Cheda y cols 2012; Dominguez-Meijide y cols., 2014).

# **JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS**

El SRA es uno de los sistemas hormonales más importantes del organismo ya que está relacionado con el control de la presión arterial y la homeostasis de fluidos. Aunque en un principio se lo consideró exclusivo del sistema cardiovascular y renal existen estudios que demuestran la presencia de un SRA en el SNC y más concretamente en los ganglios basales (Quinlan y Phillips., 1981; Allen et al., 1992, Valenzuela y cols 2010, Garrido-Gil y cols 2013).

Por otra parte numerosos estudios revelan la implicación del SRA en la modulación del EO, envejecimiento y neurodegeneración, involucrando a este sistema en patologías neurodegenerativas como la EP (Jenkins y cols., 1999; Rodriguez-Pallares y cols., 2004, 2005, Lopez-Real y cols., 2005; Muñoz y cols., 2006; Rey y cols., 2007; Villar-Cheda y cols. 2012, 2014)

Observaciones recientes, en varios tipos celulares, sugieren que la AII podría sintetizarse y actuar en el interior de la célula (Baker y cols., 2004) como parte de un SRAi y aunque se desconoce cuál es la función exacta de este sistema intracrino varios estudios sugieren que la AII podría actuar regulando la función nuclear (Eggena y cols., 1996).

El SRAi podría estar también presente, y ser funcional, en las neuronas dopaminérgicas lo que abriría una nueva perspectiva al estudio de este complejo sistema y su implicación con la EP. Aunque son muy escasos, hay algunos datos que muestran la presencia a nivel intracelular de algunos componentes del SRA (Garrido-Gil y cols. 2013), lo que nos hace pensar que el SRA podría estar presente y desempeñar un papel funcional a nivel nuclear.

Con base en lo expuesto anteriormente, en este trabajo nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Aislar, a partir de cerebro de rata, la fracción celular enriquecida en núcleos que conserven sus características morfológicas y funcionales.
2. Demostrar la existencia de un SRAi en los núcleos aislados del cerebro
3. Determinar si el SRAi regula la función nuclear.



# **MATERIAL Y METODOS**

## **1. ANIMALES**

En la elaboración de este trabajo se emplearon ejemplares de rata macho jóvenes de la cepa *Sprague-dawley*. Todos los experimentos se llevaron a cabo conforme a las directrices de la unión europea 2010/63/EU y 86/609/CEE y han sido aprobados por el comité de ética de la Universidad de Santiago de Compostela.

## **2. OBTENCIÓN DE NÚCLEOS AISLADOS**

Las ratas fueron sedadas y sacrificadas por decapitación, el cerebro fue rápidamente extraído y lavado con tampón A (320mM de sacarosa, 3mM MgCl<sub>2</sub> y 20mM de Tris a pH 7.4). Todos los pasos del protocolo de aislamiento se realizan en hielo.

El cerebro se disecciona en pequeños fragmentos que se colocan en tubos con 1.5ml de tampón A y 20μl de Tritón al 10%, hasta un total de 4mg de tejido por tubo, posteriormente se mantienen en hielo 15 minutos.

El tejido se homogeniza suavemente mediante un homogeneizador de Cristal (Kontes) con el fin de mantener la integridad de la envoltura nuclear. El homogenado es transferido a un tubo y se completa con tampón A hasta 2ml, posteriormente se centrifugan a 4°C durante 15 minutos a 1000g. (Coulter Microfuge 22R; BECKMAN).

El sobrenadante se descarta y el precipitado se resuspende despacio en 4ml de tampón B (2.2M de sacarosa, 1mM de MgCl<sub>2</sub> y 10mM de Tris a pH 7.4), y la muestra se centrifuga a 4°C durante 60 minutos a 60.000g en una ultracentrífuga (Coulter JXT 09H14, Avanti J-26XPI; Beckman) usando un rotor basculante (SW-60; Beckman).

El precipitado, que contiene los núcleos, se resuspende cuidadosamente en 2ml de tampón A y se lavan los núcleos por centrifugación a 4°C durante 10 minutos a 1000g. Tras esta última centrifugación vaciamos el sobrenadante y resuspendemos los núcleos en aproximadamente 100μl de tampón A.

Para confirmar la pureza e integridad de los núcleos aislados estos fueron teñidos con el colorante Hoechst (Sigma), y examinados al microscopio (ECLIPSE TE 300; Nikon) utilizando un filtro de fluorescencia para ultravioleta.

### 3. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS Y WESTERN BLOT

La concentración de proteína presente en los núcleos aislados fue determinada mediante el método del ácido bicinconínico de Pierce (Thermo Scientific) capaz de monitorizar el  $\text{Cu}^{1+}$  producido por la reducción alcalina de  $\text{Cu}^{2+}$  en presencia de proteína (reacción de Biuret).



La concentración de proteína presente en los núcleos aislados se referencia a una recta patrón de la proteína albúmina sérica bovina que abarca el rango de 125 a 1500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (Hung, y cols., 1984)

La cuantificación de proteínas se realizó en placas de 96 pocillos, cargando 25 $\mu\text{l}$  de muestra o patrón y añadiendo 200 $\mu\text{l}$  del reactivo de trabajo, preparado a partir de las soluciones A y B del kit comercial en una proporción 50:1 respectivamente. Tras incubar 30 minutos a 37°C se lee la absorbancia a 562 nm en un espectrofotómetro (OPTIC ivymen SYSTEM 2100-C)

Las proteínas de las distintas fracciones obtenidas en el proceso de aislamiento de los núcleos fueron analizadas mediante la técnica del Western-blot.

Se diluyen las muestras de proteínas en tampón RIPA (de inglés “*Radio-Immunoprecipitation Assay*”) y se añade tampón de carga (Tris-Glicina, Metanol, Agua destilada) y se desnaturalizaron las proteínas mediante la incubación a 95°C durante 5 min en un baño térmico (ACCU BLOCK Digital Dry Bath Labnet).

Posteriormente las proteínas son separadas en un gel del 5-10% Acrilamida-Bis acrilamida, SDS-PAGE, utilizando el sistema de electroforesis (Mini PROTEN Tetra System; Bio-Rad). Se cargaron las mismas concentraciones de proteína por pocillo (18-25  $\mu\text{g}$ ) y se dejaron migrar en el gel durante 2 horas a 90V, y a 0.07Amperios.

Posteriormente las proteínas fueron transferidas a unas membranas de nitrocelulosa utilizando el sistema de transferencia húmeda de Bio-Rad con tampón de transferencia, durante 2 horas a 90V, y a 0.45A.

Para comprobar la correcta transferencia se realizó una tinción de las membranas con el colorante rojo Ponceau (Sigma) y posteriormente fueron lavadas con PBS-T (PBS Tween 20 al 1%), y bloqueadas durante 1 hora con PBS-T conteniendo 10% de leche.

Tras el bloqueo las membranas fueron incubadas toda la noche con los anticuerpos primarios: cabra anti-AT1 (1:200), conejo anti-AT2 (1:200) ratón anti-HDAC2 (1:200) de Santa Cruz

Biotechnology y ratón anti-Tubulina (Sigma Aldrich; 1:25000), todos ellos diluidos en PBS-T con 5% leche.

A continuación se lavan las membranas con PBS-T y se incuban durante 1 hora con los anticuerpo secundarios anti-ratón, anti-cabra ambos de Santa Cruz Biotechnology o con proteína A (GE Healthcare UK Limited) todos conjugados con peroxidasa de rabano. La inmunoreactividad fue detectada con un kit de quimioluminiscencia (Milipore) y fotografiado con el sistema de detección (Molecular Imager Chemidoc XRS System, Bio-Rad).

#### **4. ANALISIS DE LA TRANSCRIPCION EN NUCLEOS AISLADOS**

Para analizar el papel del SRAi a nivel nuclear, los núcleos aislados se tratan con AII a una concentración de 100nM o 10nM durante 30 minutos a 37°C. Posteriormente se incuban durante una hora a 37 °C en un sistema de transcripción “in vitro”.que contiene tampón, nucleótidos dNTP (Promega) e inhibidor de ARNasas, (Promega), para que pueda tener lugar la transcripción *de novo* ARN.

El ARN de los núcleos fue extraído con Trizol (Invitrogen) siguiendo el protocolo del fabricante para fluidos biológicos. Tras la homogeneización de los núcleos con trizol se añadió cloroformo y se centrifugó a 11000rpm, durante 10 minutos a 4°C.

Tras la centrifugación, se pasó a otro tubo la fase acuosa (que es la que contiene el ARN) y se añadió isopropanol para precipitar el ARN. Las muestras se centrifugaron a 12000rpm durante 20 minutos y se lavó el pellet con etanol al 75% mediante centrifugación.

Para obtener un ARN de calidad este se precipitó con guanidina isotiocianato (Sigma) y etanol al 100%, se lavó nuevamente el pellet con etanol al 75% mediante centrifugación y finalmente se resuspendió en agua DEPC (del inglés “*Diethylpyrocarbonate*”). El ARN se calentó a 65°C durante 5 minutos para desnaturalizar e inmediatamente se midió la absorbancia utilizando el lector de placas TECAN (Salzburg Austria) los que nos da la concentración de ARN total.

La síntesis del ADN complementario (ADNc) se realizó partiendo de 1,5 µg de ARN total utilizando como transcriptasa inversa la M-MVL (del inglés “*Molony murine leukemia virus*”; Invitrogen) y añadiendo a la reacción una mezcla de nucleótidos, cebadores hexámeros (Invitrogen), y un inhibidor de ARNasa (*RNAse-out*, invitrogen).

El protocolo de retrotranscripción consistió en una primera fase de desnaturalización a 70°C durante 10 minutos y una segunda fase de reacción a 37°C durante una hora utilizando para ello el termociclador (Labnet Multigene).

Para cuantificar los niveles relativos del ARNm se empleo la técnica de PCR en tiempo real, esta técnica se basa en la utilización de un fluoróforo que se une al ADN de doble hebra, lo que permite la cuantificación del producto generado en la reacción de amplificación, en la elaboración de este trabajo utilizamos SYBR® como fluoróforo.

Para la PCR a tiempo real, se preparó un mezcla para cada uno de los genes que queremos amplificar que son: ANG, AT1, AT2, y GAPDH (de inglés *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*). Esta mezcla (Pmix) contiene cebadores específicos y la mezcla de reacción “iQSYBR® Green super Mix” (Bio-Rad) que incluye el tampón, MgCl<sub>2</sub>, los nucleótidos y la polimerasa (*Taq DNA polimerase*).

Las secuencias de los cebadores (F del inglés “*Forward*”) y (R del inglés “*Reverse*”) son:

AT1: F-5’TTCAACCTCTACGCCAGTGTG y R-5’GCCAAGCCAGCCATCAGC,

AT2: F-5’AACATCTGAAGACCAATAG y R-5’AGAAGGTCAGAACATGGAAGG,

ANG: F-5’GAGTGAGGCAAGAGGTGTA y R-5’TCCAACGATCCAAGGTAGAA

GAPDH: F-5’GCAAGTTCAACGGCACAGTCAAG y

R-5’ACATACTCAGCACCAGCATCACC

Cada muestra contiene 4µL de ADNc y 40 µL Pmix, que se cargan en la placa de 96 pocillos por duplicado. Tras cubrir la placa con el adhesivo *microseal* (Bio-Rad) se llevó al termociclador (MyiQ; Bio-Rad). El protocolo de PCR consiste en:

1. Desnaturalización inicial de 3 minutos a 95°C, que también sirve para activar la polimerasa.
2. 40 ciclos compuestos por una primera fase desnaturalización a 95°C, una segunda fase de hibridación a 59°C y una fase de elongación a 72°C.
3. Finalizar bajando a 4°C hasta terminar.

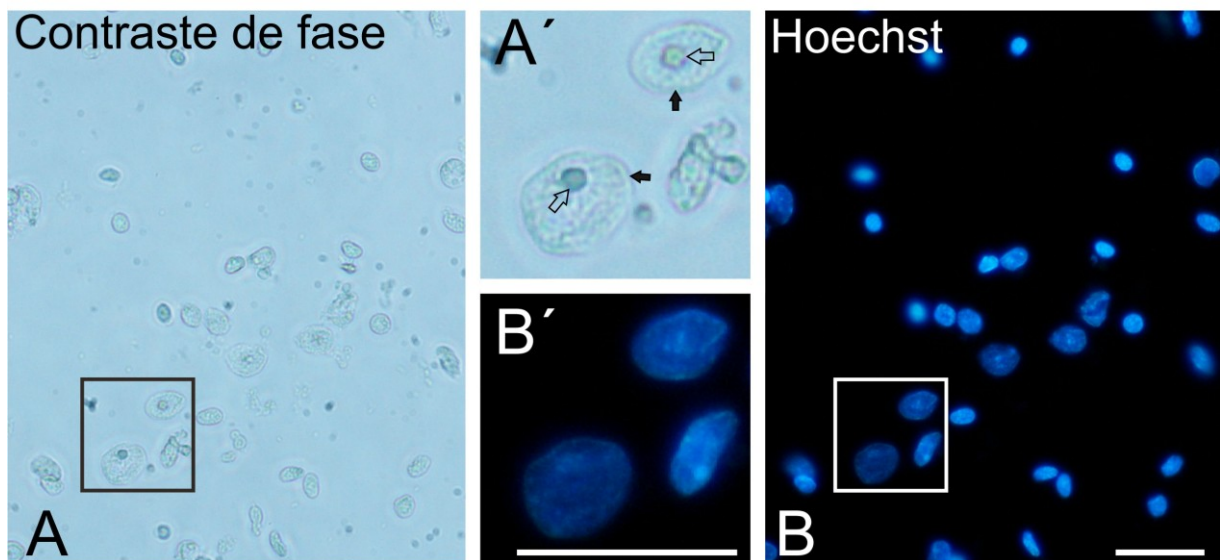
Los resultados del experimento de PCR en tiempo real se cuantificaron mediante la técnica de  $2\Delta\Delta CT$ . El análisis estadístico se hizo usando el software SigmaPlot, representando los datos como media y error estándar (ANOVA de una vía).

# **RESULTADOS**

## 1. CARACTERIZACIÓN DE LOS NUCLEOS AISLADOS

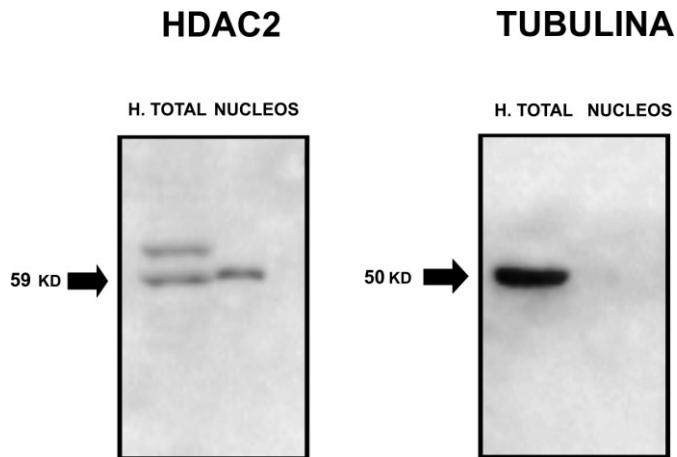
Una vez finalizado el proceso de aislamiento de núcleos analizamos su integridad mediante un microscopio de contraste de fase (Fig. 3A) o utilizando el colorante fluorescente Hoechst que se une específicamente a la cromatina (Fig. 3B).

En la figura 3 podemos observar que los núcleos conservan su estructura intacta, pudiendo apreciarse la envoltura nuclear y el nucléolo (Fig. 3A'). Con el marcador Hoechst (Fig. 3B') se puede observar que cuanto más pequeño es el núcleo mayor es su intensidad. La diferencia de tamaño es esperada ya que partimos del homogenado de cerebro donde existen distintos tipos de células.



**Figura 3.** Núcleos aislados observados con microscopía de contraste de fase (A), o tras su tinción con el colorante fluorescente Hoechst (B). Nótese la integridad de los núcleos que muestran intacta su envoltura nuclear (flechas negras). El nucléolo está indicado por flechas transparentes. Barra de calibrado 50  $\mu\text{m}$

Mediante Western blot comprobamos la pureza de los núcleos aislados (figura 4). La proteína HDAC2, un marcador de núcleos, está presente, tanto en la fracción nuclear, como en el homogenado total, en el cual se observa la presencia de dos bandas. En cuanto a la tubulina, un marcador citoplasmático, podemos ver una banda muy intensa en el homogenado total mientras que es indetectable en la fracción nuclear indicando que no hay contaminaciones citoplasmáticas.



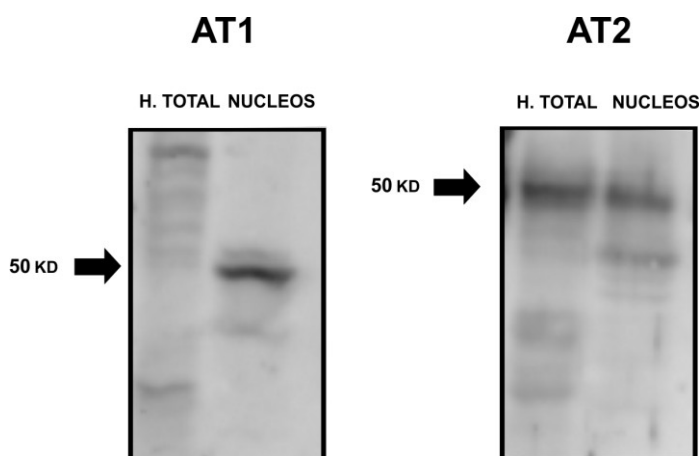
**Figura 4.** WB tras el aislamiento de núcleos. El marcados nuclear HDAC2 está presente tanto en el homogenado total como en núcleos, mientras que la

## 2. PRESENCIA DE RECEPTORES AT1 Y AT2 EN LA FRACCION NUCLEAR

Una vez que tenemos una fracción nuclear sin contaminaciones citoplasmáticas analizamos, mediante western blot, la presencia de los receptores AT1 Y AT2 en los núcleos (Figura 5).

El receptor AT1 está presente en ambas fracciones, en el homogenado total podemos observar varias bandas, dos de ellas más intensas, y otra un poco más tenue que corresponde con la banda presente en la fracción nuclear, donde aparece claramente y de mayor intensidad.

En cuanto al receptor AT2 la banda principal aparece muy marcada en las dos fracciones analizadas, aunque en los núcleos aislados se puede observar una segunda banda de intensidad moderada.



**Figura 5.** WB de los núcleos aislados que muestra la presencia de los receptores AT1 y AT2 en la fracción nuclear.

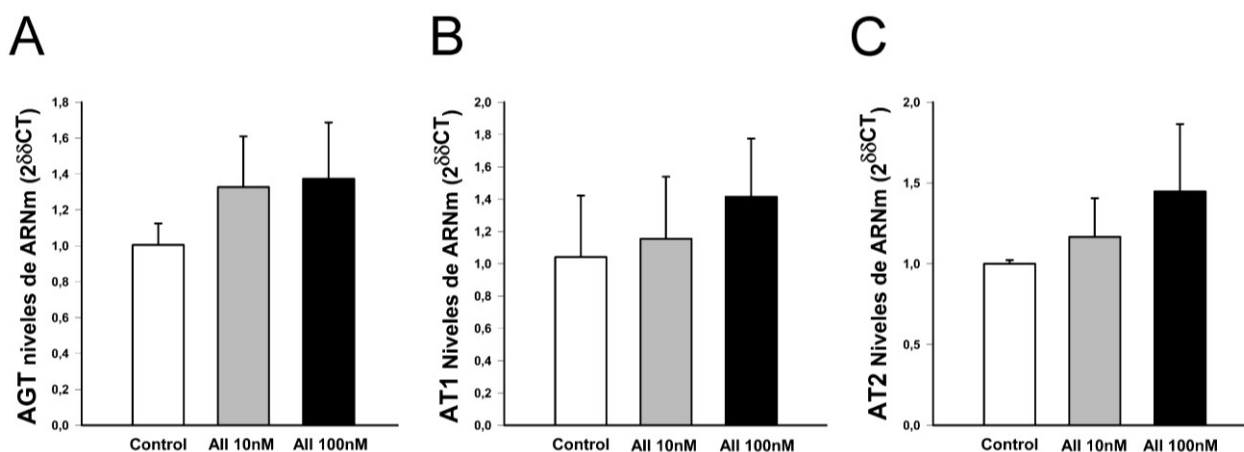


### 3. ANALISIS DE LA EXPRESIÓN GENICA POR PCR

Una vez confirmada la presencia de receptores para AII en los núcleos aislados investigamos si estos podrían actuar regulando la expresión génica. Para ello analizamos la expresión de algunos genes del SRA tras la estimulación con AII.

Cuando incubamos los núcleos en presencia de AII (10nM o 100nM) podemos ver una tendencia a aumentar la expresión de los genes del precursor AGT y de los receptores AT1 y AT2 (Figura 6).

Esta tendencia es mayor al aumentar la dosis de AII llegando a un incremento en los niveles de ARNm, de aproximadamente el 40% para AT1, 45% para AT2 y 40 % para ANG cuando se trata con AII 100nM.



**Figura 6.** Niveles relativos de ARNm medidos por PCR a tiempo real de, AGT (A) y de los receptores AT1 (B) y AT2 (C) en cerebro de rata. Los niveles de ARNm se midieron con relación al gen control GAPDH. Los datos se representa como media y error estándar (ANOVA de una vía).

## **DISCUSIÓN**

## **1. PRESENCIA DE RECEPTORES AT1 Y AT2 EN LA FRACCION NUCLEAR**

Los resultados de este estudio demuestran, mediante la técnica de Western Blot, la presencia de receptores para AII en los núcleos de cerebro de rata lo que es indicativo de la existencia de un SRAi en el cerebro, corroborando así las investigaciones previas realizadas por el grupo de investigación que describen mediante técnicas inmunohistoquímicas, la presencia de estos receptores no solamente en la superficie celular, si no también, en el citoplasma y el núcleo de neuronas de la SNc de monos y humanos (Garrido-Gil y cols., 2013).

Nuestros resultados concuerdan con diversos trabajos en los que se describe la presencia de estos receptores a nivel nuclear mediante el uso de diversas técnicas, como Wertern Blot (Egenna y cols; 1993), o inmunofluorescencia, (Tadevosyan y cols., 2010). La transfección de células del musculo liso vascular con un plásmido que expresa el receptor AT1 unido a la proteína amarilla fluorescente también confirma la localización nuclear de este receptor (Cook y cols., 2007).

## **2. PAPEL DE LA AII A NIVEL NUCLEAR.**

Con el tratamiento de AII observamos, una tendencia a aumentar la expresión de los genes de los receptores de AII y del AGT, en la misma línea, otros trabajos parecen indicar que la AII intracelular es capaz de incrementar la tasa de transcripción de genes vía uniones nucleares en distintos tipos celulares como células hepáticas (Egenna, y cols 1993) renales (Li y Zhuo, 2008) o cardiacas (Baker, y cols., 2004).

Nuestros datos indican que la AII intracelular podría estar regulando la trascricpción de genes del propio sistema como parte de un proceso de autorregulación. Aunque nuestros datos no son significativos, quizás debido al pequeño tamaño de los grupos analizados, estudios anteriores indican que la AII incrementa la transcripción de AGT y renina en respuesta a este péptido, mientras que no estimula la transcripción de genes control (Egenna, y cols 1993).

En otras investigaciones se encontró que los receptores nucleares de la AII median la síntesis *de novo* ARN, regulando la expresión de genes implicados en procesos inflamatorios como el NFκ-β (del inglés *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) (Tadevosyan, y cols., 2010), TGF-β1 (del inglés *Transforming growth factor beta 1*), y la citoquina proinflamatoria MPC-1 (del inglés “*monocyte chemoattractant protein 1*”) (Li y Zhuo., 2008). Estos receptores nucleares también regulan la recaptacion de Na<sup>+</sup>, aumentando

la expresión del gen NHE-3 (del inglés “*sodium and hydrogen exchanger-3*”) en células renales (Li y Zhuo., 2008).

La existencia de receptores nucleares no es exclusiva del SRA, así el sistema el  $\beta$ -adrenérgico que regula entre otras cosas la presión sanguínea, la tasa cardiaca o la contractilidad del miocardio (Brodde., 1990; Sanders., 1995), presenta a nivel nuclear receptores acoplados a proteína G que actúan estimulan la actividad transcripcional (Boivin y cols., 2006). Otro ejemplo son los receptores de estrógenos que forman parte de la superfamilia de los receptores nucleares y que actúan como factores de transcripción regulando la expresión génica de manera dependiente de su unión al ligando y en respuesta específica a las señales fisiológicas y patológicas (Aranda, y Pascual., 2001., Krishnan y cols., 2001).

### **3. SRA NUCLEAR Y SU RELACIÓN CON LA DEGENERACIÓN DOPAMINÉRGICA.**

Son cada vez más numerosos los estudios que relacionan al SRA con la degeneración dopaminérgica (Muñoz, y cols., 2006; Rey, y cols., 2007; Labandeira-Garcia, y cols., 2012). La AII, vía receptores AT1, provoca estrés oxidativo (activación de NADPH oxidasa) y la subsecuente activación de quimioquinas, citoquinas y moléculas de adhesión lo que desencadena una migración de células inflamatorias (Ruiz-Ortega, y cols., 2001).

A nivel nigroestriatal el aumento del EO e inflamación se consideran procesos tempranos de la muerte celular dopaminérgica que junto con otros factores desencadenarían la EP (Labandeira-Garcia, y cols., 2012). En el cerebro la respuesta inflamatoria es llevada a cabo por las células gliales, en especial por la microglía, y se produce por cualquier deterioro del tejido nervioso, ya sea en situaciones de lesión neuronal, enfermedad e incluso envejecimiento (Gao y cols., 2003; Lull y Block, 2010).

Dado que la AII actúa promoviendo el EO y la inflamación (Joglar, y cols., 2009) y a nivel intracelular es capaz de regular la expresión de genes implicados en estos procesos (Tadevosyan, y cols., 2010; Li y Zhuo., 2008) es de particular interés el estudio de este SRAi en la sustancia nigra, una región cerebral especialmente vulnerable a la degeneración.

Aunque a nivel tisular el bloqueo de la ECA y de los receptores AT1 han demostrado ser beneficiosos, disminuyendo el EO e inflamación lo que a su vez disminuye la muerte celular dopaminérgica (Lopez, y cols., 2005; Rey, y cols., 2007; Rodriguez, y cols., 2008; Joglar, y cols., 2009) todavía se desconocen los efectos de estos fármacos a nivel intracelular.

Este trabajo, junto con datos de otros investigadores, constituyen un punto de partida para una mejor comprensión del SRAi y su posible implicación en la EP, proporcionando un nuevo enfoque que puede tener importantes implicaciones clínicas y terapéuticas.

# **CONCLUSIONES**

En este trabajo hemos llegado a las siguientes conclusiones:

1. La técnica de fraccionamiento celular empleada nos permite obtener núcleos puros e intactos que conservan sus características morfológicas y funcionales.
2. Con las condiciones experimentales utilizadas en éste trabajo, se demostró la presencia de receptores AT1 y AT2 en los núcleos aislados, indicativo de la existencia de un SRAi.
3. El SRA nuclear parece actuar regulando la expresión de algunos genes del propio sistema.

## **BIBLIOGRAFIA**



- Allen AM, MacGregor DP, Chai SY, Donnan GA, Kaczmarzyk S, Richardson K, Kalnins R, Ireton J, Mendelsohn FAO (1992). Angiotensin II receptor binding associated with nigrostriatal dopaminergic neurons in human basal ganglia. *Ann. Neurol*, 32:339-344.
- Aminoff MJ (1998). Enfermedad de Parkinson y otros trastornos piramidales. *Principios de Medicina Interna* ed. Mc Graw Hill Interamericana Vol. 17, No. 1:25-33.
- Aranda A y Pascual A. Nuclear hormone receptor and gen expression (2001). *Physiological Review*. 81:1269-1304.
- Arias-Carrión O (2008). Basic mechanisms of rTMS: Implications in Parkinson's disease. *Int Arch Med*. 1-2:1755-7682.
- Bader M, Ganten D (2008). Update on tissue renin-angiotensin systems. *J Mol Med (Berl)*. 6(6): 615-21.
- Baker KM, Chernin MI, Schreiber T, Sanghi S, Haiderzaidi S, Booz GW, Dostal DE, Kumar R (2004). Evidence of a novel intracrine mechanism in angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. *Regul Pept*; 120:5-13.
- Belova, L.A. (2000) Angiotensin II-generating enzymes. *Biochemistry (Mosc.)* 65:1337–1345.
- Berk BC (2003). Angiotensin type 2 receptor (AT2R): a challenging twin. *Science STKE*; 181:PE16.
- Boivin B, Lavoie C, Vaniotis G, Baragli A, Villeneuve LR, Ethier N, Trieu P, Allen BG & Hebert TE (2006). Functional  $\beta$ -adrenergic receptor signalling on nuclear membranes in adult rat and mouse ventricular cardiomyocytes. *Cardiovasc Res* 71, 69–78.
- Brodde OE (1990). Physiology and pharmacology of cardiovascular catecholamine receptors: implications for treatment of chronic heart failure. *Am Heart J*. (6 Pt 2):1565-72.
- Chaudhuri K Ray, D Grosset, L Taurah, D J Burn, D MacMahon, A Forbes, K Turner, A Bowron, R Walker, L Findley, O Foster, K Patel, C Clough, B Castleton, S Smith, G Carey, T Murphy, J Hill, U Brechany, P McGee, S Reading, G Brand, L Kelly, K Breen, S Ford, M Baker, A Williams, J Hearne, N Qizilbash (2007). A multicentre longitudinal observational study of changes in self-reported health status in people with Parkinson's disease left untreated at diagnosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 78:465–469.
- Camargo de Andrade MC, Di Marco GS, de Paulo Castro Teixeira V, Mortara RA, Sabatini RA, Pesquero JB, Boim MA, Carmona AK, Schor N, Casarini DE (2006). Expression and localization of N-domain ANG I-converting enzymes in mesangial cells in culture from spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Renal Physiol*. 290:F364-75.

- Carey, R.M. and Siragy, H.M. (2003). The intrarenal renin-angiotensin system and diabetic nephropathy. *Trends Endocrinol. Metab.* 14:274– 281.
- Chai SY, Bastias MA, Clune EF, Matsacos DJ, Mustafa T, Lee JH, McDowall SG, Paxinos G, Mendelsohn FA, Albiston AL (2000). Distribution of angiotensin IV binding sites (AT4 receptor) in the human forebrain, midbrain and pons as visualised by in vitro receptor autoradiography. *J Chem Neuroanat.* 20:339-48.
- Chappell MC (2007). Emerging evidence for a functional angiotensin-convertingenzyme 2-angiotensin-(1–7)-Mas receptor axis: more than regulation of blood pressure? *Hypertension* 50:596–599.
- Chappell MC, Modrall JG, Diz DI, Ferrario CM (2004). Novel aspects of the renal reninangiotensin system: angiotensin-(1-7), ACE2 and blood pressure regulation. *Contrib. Nephrol.* 143:77–89.
- Kleiman RJ, Kimmel LH, Bove SE, Lanz TA, Harms JF, Romegialli A, Miller KS, Willis A, des Etages S, Kuhn M, Schmidt CJ (2011). Chronic suppression of phosphodiesterase 10A alters striatal expression of genes responsible for neurotransmitter synthesis, neurotransmission, and signaling pathways implicated in Huntington's disease. *J Pharmacol Exp Ther.* 336:64-76.
- Cook JL, Zhang Z, Re RN (2001). In vitro evidence for an intracellular site of angiotensin action. *Circ. Res.*, 89:1138–1146.
- Cook JL, Mills SJ, Naquin R, Alam J, Re RN (2006). Nuclear accumulation of the AT1 receptor in a rat vascular smooth muscle cell line: effects upon signal transduction and cellular proliferation. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 40:696–707.
- Cook JL, Mills SJ, Naquin RT, Alam J, Re RN (2007). Cleavage of the angiotensin II type 1 receptor and nuclear accumulation of the cytoplasmic carboxy-terminal fragment. *Am J Physiol Cell Physiol.* 292(4):1313-22.
- Clausmeyer S, Reinecke A, Farrenkopf R, Unger T, Peters J (2000). Tissue-specific expression of a rat renin transcript lacking the coding sequence for the prefragment and its stimulation by myocardial infarction. *Endocrinology.* 141(8):2963-70.
- Cuadra AE, Shan Z, Sumners C, Raizada MK (2010). A current view of brain renin-angiotensin system: Is the (pro)renin receptor the missing link? *Pharmacol Ther.* 125:27-38.
- Danser AH. Local renin-angiotensin systems:the unanswered questions (2003). *Int J Biochem Cell Biol.* 35:759-68.

- Davisson, R. L. (2003). Physiological genomic analysis of the brain renin-angiotensin system. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 285(3):498-511.
- Deddish PA, Marcic B, Jackman HL, Wang HZ, Skidgel RA, Erdös EG (1998). N-domain-specific substrate and C-domain inhibitors of angiotensin-converting enzyme: angiotensin-(1-7) and keto-ACE. *Hypertension*. 31(4):912-7.
- de Gasparo M, Bottari S, Levens NR, Laragh JH, Brenner BM (1994). Characteristics of angiotensin II receptors and their role in cell and organ physiology. In: *Hypertension: Physiology, diagnosis, and management*. New York, Raven. 1695-1720.
- 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.
- Dexter DT (1994). Nigral dopaminergic cell loss in vitamin E deficient rats. *Neuroreport* 5:1773-6.
- Dinh, D.T., Grauman, A.G., Johnston, C.I., Fabiani, M.E. (2001). Angiotensin receptors: distribution, signaling and function. *Clin. Sci.* 100:481–492.
- Dominguez-Meijide A, Villar-Cheda B, Garrido-Gil P, Sierra-Paredes G, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL (2014). Effect of chronic treatment with angiotensin type 1 receptor antagonists on striatal dopamine levels in normal rats and in a rat model of Parkinson's disease treated with L-DOPA. *Neuropharmacology*. 76 Pt A: 156-68.
- Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, Donovan M, Woolf B, Robison K, Jeyaseelan R, Breitbart RE, Acton S (2000). A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ Res*. 87(5):E1-9.
- Escobar E, Rodríguez-Reyna TS, Arrieta O, Sotelo J (2004). Angiotensin II, cell proliferation and angiogenesis regulator: biologic and therapeutic implications in cancer. *Curr Vasc Pharmacol*. 2(4):385-99.
- Eggena P, Zhu JH, Clegg K, Barrett JD (1993). Nuclear angiotensin receptors induce transcription of renin and angiotensinogen mRNA. *Hypertension*. 22(4):496-501.
- Gao HM, Liu B, Zhang W, Hong JS. Critical role of microglial NADPH oxidase-derived free radicals in the in vitro MPTP model of Parkinson's disease. *FASEB J*. 2003; 17:1954–1956.
- Gallinat S, Csikos T, Meffert S, Herdegen T, Stoll M, Unger T (1997). The angiotensin AT2 receptor down-regulates neurofilament M in PC12W cells. *Neurosci Lett.*; 227(1):29-32.

- Garrido-Gil P, Valenzuela R, Villar-Cheda B, Lanciego JL, Labandeira-Garcia JL (2013). Expression of angiotensinogen and receptors for angiotensin and prorenin in the monkey and human substantia nigra: an intracellular renin-angiotensin system in the nigra. *Brain Struct Funct.* 218(2):373-88.
- Grobe JL, Xu D, Sigmund CD (2008). An intracellular renin-angiotensin system in neurons: fact, hypothesis, or fantasy. *Physiology (Bethesda).* 23:187-93.
- Haller H, Park JK, Lindschau C, Meyer M, Menne J (2006). Renin Academy. Spotlight on renin: intrarenal renin-angiotensin system-important player of the local milieu. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 7:122-5.
- Hornykiewicz O (2001). Chemical neuroanatomy of the basal ganglia--normal and in Parkinson's disease. *J Chem Neuroanat.* 22(1-2):3-12.
- Hodaie M, Neimat JS, Lozano AM (2007) The dopaminergic nigrostriatal system and parkinson's disease: Molecular events in development, disease, and cell death, and new therapeutic strategies. *Neurosurgery* 60:17-30.
- Hung, N. D., M. Vas, E. Cheke y S. Z. A. Bolcsi, (1984). Relative tryptic digestion rates of food proteins. *Journal of Food Science*, 49: 1535-1542.
- Jenkins, T.A., Wong, J.Y., Howells, D.W., Mendelsohn, F.A., Chai, S.Y., (1999). Effect of chronic angiotensin-converting enzyme inhibition on striatal dopamine content in the MPTP-treated mouse. *J. Neurochem.* 73:214–219.
- Ji H, Sandberg K, Catt KJ (1991). Novel angiotensin II antagonists distinguish amphibian from mammalian angiotensin II receptors expressed in xenopus laevis oocytes. *Mol Pharmacol* 39:120-123.
- Joglar B, Rodriguez-Pallares J, Rodríguez-Perez AI, Rey P, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL (2009). The inflammatory response in the MPTP model of Parkinson's disease is mediated by brain angiotensin: relevance to progression of the disease. *J Neurochem*, 109:656-669.
- Kaschina E, Unger T (2003). Angiotensin AT1/AT2 receptors: regulation, signalling and function. *Blood Press.* 12(2):70-88.
- Kumar R, Singh VP, Baker KM (2007). The intracellular renin-angiotensin system: a new paradigm. *Trends Endocrinol Metab* 18:208-214.
- Kumar R, Singh VP, Baker KM (2009). The intracellular renin-angiotensin system in the heart. *Curr Hypertens Rep* 11:104-110.
- Krishnan V, Heath H y Bryan UH (2001). Mechanism of action of estrogen and selective estrogen receptors modulators. *Vitamins and hormones* 60:123-147.

- Labandeira-Garcia JL, Rodriguez-Pallares J, Villar-Cheda B, Rodríguez-Perez AI, Garrido-Gil P, Guerra MJ (2011). Aging, Angiotensin system and dopaminergic degeneration in the substantia nigra. *Aging Dis.* 2(3):257-74.
- Labandeira-Garcia JL, Rodriguez-Pallares J, Rodríguez-Perez AI, Garrido-Gil P, Villar-Cheda B, Valenzuela R, Guerra MJ (2012). Brain angiotensin and dopaminergic degeneration: relevance to Parkinson's disease. *Am J Neurodegener Dis.* 1(3):226-44.
- Lago F, Gómez R, Conde J, Scotece M, Gómez-Reino JJ, Gualillo O (2011). Cardiometabolic comorbidities and rheumatic diseases: focus on the role of fat mass and adipokines. *Arthritis Care Res (Hoboken).* 63(8):1083-90.
- Leung PS, Carlsson PO (2005). Pancreatic islet renin angiotensin system: Its novel roles in islet function and in diabetes mellitus. *Pancreas.* 30:293-8.
- Lev-Ran A and Porta M (2005). Salt and hypertension: a phylogenetic perspective. *Diabetes Metab Res Rev.* 21(2):118-31.
- Liu D, Gao L, Roy SK, Cornish KG, Zucker IH (2008): The Role of Oxidant Stress on AT1 Receptor Expression in Neurons of Rabbits With Heart Failure and in Cultured Neurons. *Circ Res* :103-10.
- Li XC, Zhuo JL (2008). In vivo regulation of AT1a receptor-mediated intracellular uptake of [125I] Val5-ANG II in the kidneys and adrenals of AT1a receptor-deficient mice. *Am J Physiol Renal Physiol.* 294(2):293-302.
- Li J, Culman J, Hortnagl H, Zhao Y, Gerova N, Timm M, Blume A, Zimmermann M, Seidel K, Dirnagl U, Unger T (2005). Angiotensin AT2 receptor protects against cerebral ischemia-induced neuronal injury. *FASEB J,* 19:617-619.
- Li, Y. C., Qiao, G., Uskokovic, M., Xiang, W., Zheng, W., & Kong, J. (2004). Vitamin D: a negative endocrine regulator of the renin–angiotensin system and blood pressure. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology,* 89:387-392.
- 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.
- Lou M, Blume A, Zhao Y, Gohlke P, Deuschl G, Herdegen T, Culman J (2004). Sustained blockade of brain AT1 receptors before and after focal cerebral ischemia alleviates neurologic deficits and reduces neuronal injury, apoptosis, and inflammatory responses in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab,* 24:536-547.

- Lull, Melinda E. Block Michelle L (2010). Microglial activation and chronic neurodegeneration *Neurotherapeutics*. 7, 4, 354-365
- Maul B, Krause W, Panlow K, Becker M, Gemhardt F, Alenina N, Walther T, Bader M, Siems WE (2005). Central angiotensin II controls alcohol consumption via its AT1 receptor. *FASEB J*, 19(11):1474-81.
- Martin P, Binkowski-Machut C, Hapiot F, Cecchelli R, Monflier E (2006). How cyclodextrins can mask their toxic effect on the blood-brain barrier. *Bioorg Med Chem Lett* 16(7):1784-7.
- Mendelsohn FA, Quirion R, Saavedra JM, Aguilera G, Catt KJ (1984) Autoradiographic localization of angiotensin II receptors in rat brain. *Proc Nat Acad Sci U S A* 81:1575–1579.
- Muñoz, A., Rey, P., Guerra, M.J. (2006). Reduction of dopaminergic degeneration and oxidative stress by inhibition of angiotensin converting enzyme in a MPTP model of Parkinsonism. *Neuropharmacology* 51:112–120.
- Mikhiela Sherrod, Xuebo Liu, Xiaoji Zhang, Curt D. Sigmund (2005). Nuclear localization of angiotensinogen in astrocytes *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* Vol. 288no. 539-546.
- Oparil S, Weber AM (2004). *Hipertensión «El Riñón, de Brenner y Rector»*. Ed: McGraw-Hill Interamericana 1-4:77-94.
- Paul M, Poyan Mehr A, Kreutz R. *Physiology of local renin-angiotensin systems* (2006). *Physiol Rev*. 86(3):747-803.
- Peng J, Kimura B, Phillips MI (2002). The predominant role of brain angiotensinogen and angiotensin in environmentally induced hypertension. *Regul Pept*, 110(1):25-32.
- Phillips M I y de Oliveira E M. Brain renin angiotensin in disease (2008). *J Mol Med* 86:715–722.
- Quinlan JT, Phillips MI (1981). Immunoreactivity for angiotensin II-like peptide in the human brain. *Brain Res*, 205:212-218.
- Re R, Parab M (1984). Effect of angiotensin II on RNA synthesis by isolated nuclei. *Life Sci*. 34(7):647-51.
- Re RN. (2003) Intracellular renin and the nature of intracrine enzymes. *Hypertension*. 42(2):117-22.
- Re RN (2004). Mechanisms of disease: local renin-angiotensin-aldosterone systems and the pathogenesis and treatment of cardiovascular disease. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 1:42-7.

- Regitz-Zagrosek V, Neuss M, Warnecke C, Holzmeister J, Hildebrandt AG, Fleck E (1996). Subtype 2 and atypical angiotensin receptors in the human heart. *Basic Res. Cardiol* 91:73–77.
- Rey, P., Lopez-Real, A., Sanchez-Iglesias, S., Munoz, A., Soto-Otero, R., Lavandería Garcia, J.L (2007). Angiotensin type-1-receptor antagonists reduce 6-hydroxydopamine toxicity for dopaminergic neurons. *Neurobiol. Aging* 28:555–567.
- Rodriguez-Pallares J, Quiroz CR, Parga JA, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL (2004). Angiotensin II increases differentiation of dopaminergic neurons from mesencephalic precursors via angiotensin type 2 receptors. *Eur J Neurosci*, 20:1489-1498.
- Rodriguez-Pallares J, Parga JA, Muñoz A, Rey P, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL (2007). Mechanism of 6-hydroxydopamine neurotoxicity: the role of NADPH oxidase and microglial activation in 6-hydroxydopamine-induced degeneration of dopaminergic neurons. *J Neurochem*; 103:145-156.
- Rodriguez-Pallares, J., Rey, P., Parga, J.A., Munoz, A., Guerra, M.J., Labandeira-Garcia, J.L., (2008). Brain angiotensin enhances dopaminergic cell death via microglial activation and NADPH-derived ROS. *Neurobiol.* 31:58–73.
- Rodriguez-Perez AI, Valenzuela R, Villar-Cheda B, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL (2012). Dopaminergic neuroprotection of hormonal replacement therapy in young and aged menopausal rats: role of the brain angiotensin system. *Brain.* 135(Pt 1):124-38.
- Rodriguez-Perez AI, Valenzuela R, Villar-Cheda B, Guerra MJ, Lanciego JL, Labandeira-Garcia JL (2010). Estrogen and angiotensin interaction in the substantia nigra. Relevance to postmenopausal Parkinson's disease. *Exp Neurol.* 224(2):517-26.
- Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Rupérez M, Esteban V, Mezzano S, Egido J (2001). Renin-angiotensin system and renal damage: emerging data on angiotensin II as a proinflammatory mediator. *Contrib Nephrol.* (135):123-37.
- Saab YB, Gard PR, Yeoman MS, Mfarrej B, El-Moalem H, Ingram MJ (2007). Renin-angiotensin-system gene polymorphisms and depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 31(5):1113-8.
- Saavedra JM (1999). Emerging features of brain angiotensin receptors. *Regul Pept.* 85:31-45.
- Saavedra JM (2005). Brain angiotensin II: new developments, unanswered questions and therapeutic opportunities. *Cell Mol Neurobiol.* 25:485–512.
- Sakai K, Sigmund CD (2005). Molecular evidence of tissue renin-angiotensin systems: a focus on the brain. *Curr Hypertens Rep.* 7:135-40.

- Sanberg K (1994). Structural analysis and regulation of angiotensin II receptors. *Trends Endocrinol Metab* 5:28-35.
- Sanders L, Lynham JA, Bond B, del Monte F, Harding SE, Kaumann AJ (1995). Sensitization of human atrial 5-HT<sub>4</sub> receptors by chronic beta-blocker treatment. *Circulation*. 92:2526-39.
- Savaskan E (2005). The role of the brain renin-angiotensin system in neurodegenerative disorders. *Curr Alzheimer Res*, 2(1): 29-35.
- Schefe JH, Menk M, Reinemund J, Effertz K, Hobbs RM, Pandolfi PP, Ruiz P, Unger T, Funke-Kaiser H (2006). A novel signal transduction cascade involving direct physical interaction of the renin/prorenin receptor with the transcription factor promyelocytic zinc finger protein. *Circ Res*, 99:1355-66.
- Schneider F, Althaus A, Backes V, Dodel R (2008). Psychiatric symptoms in Parkinson's disease. *Eur Arch Psychiatry Clin Neuroscience* 258:55-9.
- Sherrod M, Liu X, Zhang X, Sigmund CD (2005). Nuclear localization of angiotensinogen in astrocytes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 288:R539-46.
- Simonnet G, Giorguieff-Chesselet MF, Carayon A, Bioulac B, Cesselin F, Glowinski J, Vincent JD (1981). Angiotensin II and the nigrostriatal system. *J Physiol*, 77:71-79.
- Singh VP, Le B, Bhat VB, Baker KM, Kumar R (2007). High-glucose-induced regulation of intracellular ANG II synthesis and nuclear redistribution in cardiac myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 293:939-48.
- Stier CT Jr, Adler LA, Levine S, Chander PN (1993). Stroke prevention by losartan in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens Suppl*, 11:37-42.
- Tadevosyan A, Maguy A, Villeneuve LR, Babin J, Bonnefoy A, Allen BG, Nattel S (2010). Nuclear-delimited angiotensin receptor-mediated signaling regulates cardiomyocyte gene expression. *J Biol Chem*. 285:22338-49.
- Thatcher S, Yiannikouris F, Gupte M, Cassis L (2009). The adipose renin-angiotensin system: role on cardiovascular diseases. *Mol Cell Endocrinol*. 302:111-7.
- Thomas MA, Hauptfleisch S, Fleissner G, Lemmer B (2003). Localization of angiotensin II (AT<sub>1</sub>)-receptor-immunoreactive fibres in the hypothalamus of rats: angiotensin II-sensitive tanycytes in the ependyma of the third ventricle? *Brain Res*. 967:281-4.
- Touyz RM, Schiffrin EL (2000). Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacol Rev*. 52:639-72.



- Tipnis SR, Hooper NM, Hyde R, Karran E, Christie G, Turner AJ (2000). A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *J Biol Chem.* 275:33238-43.
- Tigerstedt R, Bergman P. Niere und Kreislauf (1898). *Skand Arch Physiol* 8:223-271.
- Valenzuela R, Barroso-Chinea P, Muñoz A, Joglar B, Villar-Cheda B, Lanciego JL, Labandeira-Garcia JL (2010). Location of prorenin receptors in primate substantia nigra. Effects on dopaminergic cell death. *J Neuropathol Exp Neurol*, 69:1130-42.
- Vidotti, D.B (2004). High glucose concentration stimulates intracellular renin activity and angiotensin II generation in rat mesangial cells. *Am. J. Physiol. Renal Physiol* 286:1039–1045.
- Villar-Cheda B, Rodríguez-Pallares J, Valenzuela R, Muñoz A, Guerra MJ, Baltatu OC, Labandeira-Garcia JL (2010). Nigral and striatal regulation of angiotensin receptor expression by dopamine and angiotensin in rodents: implications for progression of Parkinson's disease. *Eur J Neurosci.* 32(10):1695-706.
- Villar-Cheda B, Valenzuela R, Rodriguez-Perez AI, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL (2012). Aging-related changes in the nigral angiotensin system enhances proinflammatory and pro-oxidative markers and 6-OHDA-induced dopaminergic degeneration. *Neurobiol Aging.* 33(1):204.e1-11.
- Watanabe T, Barker TA, Berk BC (2005). Angiotensin II and the endothelium diverse signals and effects. *Hypertension* 45:163-169.
- Weyhenmeyer JA, Phillips MI (1982). Angiotensin-like immunoreactivity in the brain of the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension* 4(4):514–523.
- Wright JW, Harding JW (1995). Brain angiotensin receptor subtypes AT1, AT2, and AT4 and their functions. *Regul Pept.* 59:269-95.
- Wright, J.W., Harding, J.W (1997). Important roles for angiotensin III and IV in the brain renin-angiotensin system. *Brain Res. Rev.* 25:96–124.
- Wright, J.W., Harding, J.W (2004). The brain angiotensin system and extracellular matrix molecules in neural plasticity, learning, and memory. *Prog. Neurobiol.* 72:263–293.
- Zaman MA, Oparil S, Calhoun DA (2002). Drugs targeting the renin-angiotensin aldosterone system. *Nature* 1:621-636.
- Zhuo JL, Li XC, Garvin JL, Navar LG, Carretero OA (2006). Intracellular angiotensin II induces cytosolic Ca<sup>2+</sup> mobilization by stimulating intracellular AT1 receptors in proximal tubule cells. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 290:1382–1390.

# ABREVIATURAS

**(AI)** Angiotensina I

**(AII)** Angiotensina II

**(AGT)** Angiotensinógeno

**(AT1)** Receptor de angiotensina II tipo 1

**(AT2)** Receptor de angiotensina II tipo 2

**(EP)** Enfermedad de Parkinson

**(EO)** estrés oxidativo

**(ECA)** Enzima convertidor de angiotensina

**(ECA2)** Enzima convertidor de angiotensina 2

**(HDAC)** histona deacetilasa

**(PRR)** Receptor de prorenina

**(SRA)** Sistema renina angiotensina

**(SRAI)** Sistema renina angiotensina local

**(SRAi)** Sistema renina angiotensina intracelular

**(SNc)** Sustancia nigra pars compacta

**(SNC)** Sistema nervioso central