

Universidad de Sonora

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Departamento de Ciencias Químico Biológicas

Expresión de receptores a angiotensina II y ciclooxygenasa-2 en
cultivos celulares primarios del lóbulo frontal de la rata
hiperglicémica

TESIS PROFESIONAL PRÁCTICA

Que para obtener el Título de

QUÍMICO BIÓLOGO CLÍNICO

Presenta:

Jorge Luis Amavizca Cerón

Hermosillo, Sonora

Junio de 2018

Repositorio Institucional UNISON



"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

VOTOS APROBATORIOS

Los miembros del jurado calificador del examen profesional de Jorge Luis Amavizca Cerón hemos revisado detenidamente su trabajo escrito titulado “Expresión de los receptores para angiotensina II y ciclooxigenasa 2 en cultivos celulares primarios del lóbulo frontal de la rata hiperglicémica” y encontramos que cumple con los requisitos para la presentación de su examen profesional. Por tal motivo recomendamos se acepte dicho trabajo como requisito parcial para la obtención de título de Químico Biólogo Clínico.

Atentamente:

Dr. Marcelino Montiel Herrera

Dr. Carlos Arturo Velázquez Contreras

M.C María Lucila Rascón Durán

Dr. Humberto Astiazarán García

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIAS

Primero que nada, gracias a la Universidad de Sonora por ser mi alma mater, por ser mi casa durante cinco años, así como a cada uno de los maestros que me impartieron clase y que me dejaron conocimiento para el ámbito escolar, personal y profesional. Además, se agradece el apoyo económico al programa de Retención No. 262682 de CONACYT.

¡Gracias infinitas al Dr. Marcelino Montiel Herrera! Por su amabilidad y disposición desde el primer encuentro que tuvimos acerca del proyecto hasta el final de sus días, por aceptarme y darme la oportunidad para emprender este camino hacia la investigación. Gracias por transmitirme su conocimiento hacia mí durante todo el camino de la tesis, por sus consejos al momento de realizar las cosas, por tenerme paciencia y darme apoyo moral cuando los experimentos eran fallidos, cuando el asunto se ponía oscuro. Gracias por su disposición y tiempo sin importar el día de la semana, por aquellos días que tuvimos que venir en fin de semana, por las ocasiones donde me acompañó cuando tenía que salir bastante tarde del laboratorio. Gracias por tomarse el tiempo cada vez que ocupaba su ayuda, gracias por ser tan paciente y buena persona todo el tiempo sin molestar en ningún momento (o quizá ocultaba la molestia). Gracias por poner el anuncio en QB donde pedía alumnos, gracias por todo, espero que la relación alumno-maestro no acabe aquí, y muchas gracias por su interés y sus ganas de apoyarme en el posgrado. No sólo fueron conocimientos a nivel profesional, también su experiencia con los diferentes sucesos de la vida en este ámbito de investigación me han enseñado mucho, he aprendido mucho de usted. Gracias, muchas gracias.

¡Un agradecimiento a cada uno de mis sinodales por sus consejos y tiempo para mejorar este escrito! Recibí excelentes comentarios y respuestas de cada uno de ustedes, gracias por su tiempo para explicarme algunas cosas que no entendía. Gracias al Dr. Carlos Arturo Velazquez Contreras, Dr. Humberto Astiazaran y un agradecimiento especial a la maestra Lucila Rascón porque ser siempre muy amable, paciente y por ayudarme en la muestra estudiantil del 2016, muchísimas gracias.

Gracias al apoyo técnico de Karla Alejandra Monge Villegas, Miriam Denisse García Villa, Ana Mata Pineda, Marlenne Rendón Álvarez y Davisela Guadalupe Sierras Canchola que sin su ayuda este trabajo no hubiera salido adelante. ¡Especial agradecimiento a Karla y Denisse por su simpatía, cariño, por ser tan divertidas, alivianadas y alechugadas! Y por siempre responder mis dudas existenciales acerca de reactivos del laboratorio, gracias por ser tan amables, que sigan siendo igual de alegres porque lo contagian, o por lo menos, así lo siento yo.

Gracias también a cada uno de los estudiantes que me encontré en el laboratorio durante el transcurso de los experimentales, gracias a los dos alumnos suizos (no recuerdo sus nombres), a Luiza (la brasileña) y la chica ucraniana que me ayudaron en la inducción de hiperglicemia a las ratas, gracias por su labor. Ojalá que les este yendo bien a cada uno de ustedes donde quiera que estén. Un especial agradecimiento a dos alumnos que me encontré ahí y que tuvieron la suerte de pasar de ser compañeros a ser mis homies, gracias por hacer mis momentos más agradables y graciosos, gracias al Juan y a la Viridiana por andar de vez en cuando en el laboratorio.

Es muy fácil agradecer a cada uno de las personas, es difícil recordar los nombres, pero cuando pasas experiencias con cada uno de ellos, cuando pasas tiempo de sufrimiento y frustración, compartiendo el dolor, las pocas horas de sueño, el estrés, también por aquellos momentos de sacar la cura, de fiesta, de sólo hacer la estancia más agradable... así es más fácil recordar los nombres. Durante el inicio de este camino la gente que estuvo a mi lado ahorita ya no está, personas se han ido para ya no regresar, con otras nos topamos por alguna etapa, otras regresaron, y cada una de esas personas con las cuales me he topado han dejado un poco de su esencia en mí, sin saber me han dejado enseñanzas, con otras se han creado lazos que espero sigan perdurando por muchos años más. Gracias a todas las personas que conocí durante estos años y que le pusieron ese toque de diversión a la Universidad Siria, Rocio, Sifuentes, Adriana, Oscar, Abigail, Osara, Melissa, Erick, Jonathan, Mara, Rosa, Ubaldo, Daniel, Tavo, Norman, todo el Atlético FC, Minerva, Lucía, Vidal, Rene, Chenoweth, Karla la torunda, al Manu, Jazmin Poca, los que han estado desde primer semestre Max, Bryan, Miguel, Alejandra, Ramón. Eva Vidal que después de graduarnos, nos hicimos de verdad amigos, haz sido un apoyo desde entonces y hemos pasado aventuras muy interesantes, gracias. Noraly, que en poco tiempo te has convertido en una muy buena amiga, la amistad está en el interés que uno le pone a las personas, gracias morrita. Y podría seguir... muchas gracias por todo a todos y a los que me faltaron nombrar, gracias por las platicas, por estudiar, por las salidas, me toco convivir con una gran generación.

Y un agradecimiento con todo mi corazón, cariño, amor, alma, sinceridad a las siguientes personas que pese a cualquier situación, cualquier inconveniente que nos puso la vida, siguieron conmigo y que hemos estado en una relación simbiótica de amistad, amor, de apoyo, salidas, risas, de descubrimiento y la verdad yo los amo a cada uno de ustedes Ely Castro, Elisabeth Bravo, María Guadalupe, Reyna Moreno, Lucio Naranjo, Marlen Licerio, Kassandra Durazo y que la vida les otorgue mucha vida, que cumplan todo lo que quieran, que vivan felices y que juntos

o no, superemos todos los obstáculos, así que les dedicaré una oración a cada uno para hacer esto más largo. Un amigo es una luz que brilla en la oscuridad.

- Ely Castro: No olvidaré como nos conocimos, juntos desde el inicio, tenemos un desorden mental parecido y a pesar de que nos separamos, aquí estamos como si nada hubiera cambiado. Seremos vecinos, recuérdalo, adipocito :p
- Elisabeth Bravo: ¿Cómo no quererte tanto? Eres una persona llena de amor, me enseñaste que mostrarle el cariño a tus amigos no está de más, gracias por darme la oportunidad de verte crecer como persona. Fueron dos años, pero eso nos unió más, enana.
- María Guadalupe: Gracias por siempre tenerme confianza, espero sigas siendo así de alegre, así de buena persona, así con esa sonrisa bonita que tienes. Gracias por seguir aquí.
- Marlen Licerio: Nos reencontramos en una etapa parecida, me alegro mucho que haya pasado eso. Y desde momento nuestro lazo se forjó de verdad, hemos compartido muchos momentos desde ahí, y así seguirá. Ya verás que todo tendrá su por qué más adelante, no dejes de esforzarte y todo mejorará para ti.
- Reyna Moreno: Hemos estado para cada uno en nuestros momentos de más crisis existencial, siempre en las buenas y en las malas. Ni el tiempo ni distancia nos separara, porque contigo conocí lo que en verdad es una amiga. Y no te rindas nunca, cuando termines y con tu talento de tu lado, conseguirás lo que mucho desees.
- Lucio Naranjo: ¿Quién hubiera pensado que un día jure el odio a los médicos y que la vida me mando a tu humanidad? En poco tiempo te hiciste un compa de verdad, pumita.
- Kassandra Durazo: ¿Qué te he dicho que no sepas ya a esta altura? Gracias por todo, has estado siempre desde que te conozco, nunca me has dado la espalda. Agradezco totalmente que sigamos siendo amigos, que compartamos palabras, momentos, estar en el mismo tiempo y espacio. Y tu tienes la capacidad para ser la mejor, si así tu lo quieres, sin duda alguna, en lo que sea <3

Y mi familia, mis hermanos Isabel y Daniel Amavizca que junto con mi mamá Tere Ceron me han dado todo, me han apoyado de una manera inmanejable durante estos años en la carrera, han puesto su paciencia, dinero, sacrificado por mi, son lo mejor en mi vida. Espero

regresarles todo lo que me han dado, y ojalá que la vida se los multiplique por mucho más, que les de, que les regrese todo.

Madre, espero un día ser como tu lo eres, tan fuerte, con esa capacidad infinita de salir adelante pese a cualquier cosa, de no rendirse, de levantarse sin importar la circunstancia, por ti soy tan amable y ayudo mucho a las personas, es algo que se me ha quedado de ti. Te voy a regresar todo lo que haz hecho por mi, te amo junto a mis hermanos, los amo mucho, gracias por dejarnos aceptar a la Luna en nuestro hogar, esa perrita que nos alegra los días.

Gracias totales a todos ustedes, los amo, siempre estarán en mi corazón y se merecen una vida extra.

Contenido

VOTOS APROBATORIOS	2
Atentamente:.....	3
AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIAS.....	4
LISTA DE TABLAS.....	10
LISTA DE FIGURAS.....	11
RESUMEN	12
INTRODUCCIÓN	13
OBJETIVOS	14
ANTECEDENTES	15
SISTEMA NERVIOSO.....	15
Sistema Nervioso Central	15
Sistema Nervioso Periférico.....	21
CÉLULAS: NEURONAS Y GLÍAS	22
Neuronas: Excitabilidad y Metabolismo.....	22
Neuroglía: Astrocitos y Funciones Homeostáticas	24
NEUROTRANSMISIÓN Y RECEPTORES DE MEMBRANA	28
Mecanismos de Señalización Ionotrópicos y Metabotrópicos.....	28
Angiotensina II: Receptores AT ₁ y AT ₂	29
Receptor AT ₁	33
Receptor AT ₂	34
Ciclooxigenasas 1 y 2: Prostanoides.....	35
MECANISMOS FISIOLÓGICOS PARA EL CONTROL GLICÉMICO.....	39
Hipotálamo y Centros Nerviosos Que Modulan La Alimentación.....	39
Control Glicémico a Nivel Periférico.....	41
Diabetes Mellitus Tipo I y II.....	42

JUSTIFICACIÓN	44
MATERIALES Y MÉTODOS	45
Inducción de Hiperglicemia con Estreptozotocina	45
Cultivos Celulares Primarios del Lóbulo Frontal de la Rata.....	45
Biología Molecular: Retrotranscripción-Reacción de Polimerasa en Cadena (RT-PCR)	
.....	46
RESULTADOS	48
DISCUSIÓN	51
CONCLUSIONES.....	55
Referencias bibliográficas:	56
ANEXOS	63
Anexo 1	63
Anexo 2	63
Anexo 3	63
Anexo 4	63
Anexo 5	64
Anexo 6	64
Anexo 7	65

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Características de los oligonucleótidos experimentales	47
---	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Vista lateral del sistema vascular cerebral.....	17
Figura 2. Constitución del polígono de Willis	18
Figura 3. Transporte de moléculas a través de la barrera hematoencefálica	19
Figura 4. Regulación metabólica y de neurotransmisores por astrocitos	26
Figura 5. Control del flujo sanguíneo cerebral a través de la unidad neurovascular.....	27
Figura 6. Vía clásica de formación de Ang II.....	30
Figura 7. Vías enzimáticas para la conversión de angiotensinogeno en Ang II y otros péptidos.....	31
Figura 8. Vía de biosíntesis de prostaglandinas	37
Figura 9. Regulación del metabolismo de glicemia.....	42
Figura 10. Células en cultivo del lóbulo frontal normoglicémico (A) e hiperglicémico (B). Las flechas en la figura B señalan a células cerebrales. Barra de calibración 10 y 4 μm , respectivamente.	48
Figura 11. Expresión de los amplicones de AT ₁ , AT ₂ y COX-2 de cultivos celulares primarios normoglicémicos (A) (n = 4) y estimulados con 10 μM Ang II/ 30 min (n = 6)(B).....	49
Figura 12. Expresión de los amplicones de AT ₁ , AT ₂ y COX-2 de astrocitos del lóbulo frontal (n = 2)	49
Figura 13. Expresión de los amplicones de AT ₁ , AT ₂ y COX-2 de cultivos celulares primarios hiperglicémicos (n = 4).	50

RESUMEN

La comunicación neurovascular en el lóbulo frontal es responsable de regular el suministro de oxígeno y nutrientes a través de procesos de dilatación y contracción vascular. La angiotensina II (Ang II) regula la presión arterial a través de receptores AT_1 y AT_2 , y se ha observado que en patologías como la diabetes existe una sobreactivación de estos receptores. La ciclooxigenasa 2 (COX-2) aumenta la síntesis de prostanoïdes en estados de hiperglicemia crónica incrementando los procesos de inflamación. Los cerebros hiperglicémicos muestran señales de inflamación crónica y aumento del estrés oxidativo que dañan a las células, lo que sugiere una desregulación neurovascular. Por lo tanto, es importante investigar la participación de la enzima COX-2 y receptores a Ang II en estos procesos.

En este sentido, se realizaron cultivos celulares primarios de células de lóbulo frontal de la rata posnatal normoglicémica e hiperglicémica (inducida por inyección intraperitoneal de 60 mg de estreptozotocina /kg de peso; nivel de glucosa >300 mg/dL de sangre) para estudiar la expresión de receptores para Ang II y COX-2. En promedio, se encontró un tamaño mayor en el soma de los cultivos celulares primarios del lóbulo frontal normoglicémico en comparación con los hiperglicémicos ($9.5 \pm 0.25 \mu\text{m}$ vs 4.9 ± 0.18 de diámetro respectivamente, $n = 58$). Adicionalmente, utilizando la técnica de RT-PCR, se encontró que las células cultivadas del lóbulo frontal hiperglicémico expresan el transcrito para el receptor AT_2 . Mientras que en cultivos celulares primarios del lóbulo frontal normoglicémico estimulados con Ang II durante 30 minutos aumentó ~23% en la expresión de COX-2 en comparación con el control. Finalmente, en cultivos primarios de astrocitos del lóbulo frontal se obtuvo la expresión del receptor AT_2 .

En conjunto, los resultados indican que la hiperglicemia crónica aumentó la expresión del receptor AT_2 en las células cerebrales, mientras que la estimulación con Ang II aumentó la expresión de COX-2 y que los astrocitos normoglicémicos expresaron el transcrito para el receptor AT_2 .

INTRODUCCIÓN

El sistema nervioso central está conformado principalmente por neuronas y células gliales (astrocitos, oligodendrocitos, pericitos y microglia) (Kandel et al. 2014). Las neuronas, astrocitos y células endoteliales forman la unidad neurovascular que es responsable de regular el suministro de oxígeno y nutrientes a las células a través de procesos de dilatación y contracción vascular (Ruhrberg y Bautch 2013).

La Angiotensina II (Ang II) es un octapéptido formado a partir del sistema renina angiotensina (RAS) que se encarga de regular la presión arterial y la homeostasis de electrolitos a través de sus receptores AT₁ y AT₂ (Singh y Karnik 2016). En los últimos años se ha encontrado que RAS está ampliamente distribuido en el cerebro y participa en la regulación del flujo sanguíneo cerebral y funciones de protección cerebral. Cabe mencionar que la concentración de Ang II incrementa en condiciones patológicas como diabetes (Lenkei et al. 1997; Saavedra 2005; Wright y Harding 2013).

En un estado de hiperglicemia crónica, hay incremento de procesos inflamatorios mediados por la ciclooxigenasa 2 y la Ang II genera un aumento de las especies reactivas de oxígeno, ambos procesos potencialmente pueden inducir apoptosis en el tejido neural (Estate et al. 2013; Wright y Harding 2013).

Tomando en cuenta lo anterior, los cerebros hiperglicémicos podrían desarrollar patologías vasculares que provoquen desregulación neurovascular. Por ello, es importante conocer cómo dicha desregulación podría afectar a las diferentes estructuras cerebrales. Por lo tanto, en este trabajo se decidió investigar la expresión de ciclooxigenasa 2 y de receptores para Ang II en cultivos celulares primarios del lóbulo frontal de ratas normo e hiperglicémicas utilizando la técnica de RT-PCR.

OBJETIVOS

Objetivo general

- Evaluar la expresión de la ciclooxigenasa 2 y de los receptores de angiotensina II del tipo AT₁ y AT₂ en cultivos celulares primarios del lóbulo frontal de la rata hiperglicémica.

Objetivos específicos

- Estandarizar un modelo murino hiperglicémico inducido por estreptozotocina.
- Realizar cultivos celulares primarios del lóbulo frontal de ratas posnatales normo- e hiperglicémicas.
- Generar cultivos primarios de astrocitos del lóbulo frontal utilizando el factor de crecimiento G5.
- Evaluar la expresión de los transcritos COX-2, AT₁ y AT₂.

ANTECEDENTES

SISTEMA NERVIOSO

El sistema nervioso (SN) regula, coordina e integra todas las actividades del cuerpo humano a partir de interacciones neuronales complejas, acoplando la percepción sensoriomotora con el medio externo, desencadenando procesos neuronales asociados con la inteligencia, la memoria, la coordinación motora, los pensamientos y el lenguaje, entre otras funciones (Haines 2013). El SN está compuesto principalmente por dos tipos de células: neuronas que son las encargadas de generar impulsos electroquímicos al responder a estímulos físicos o químicos externos; y las neuroglías, que están encargadas de diferentes funciones fisiológicas como la mielinización de los axones y la modulación de las sinapsis (Fox 2014).

El SN está compuesto por el sistema central y el sistema periférico. El sistema nervioso central (SNC) está formado por el encéfalo y la médula espinal, mientras que el segundo está formado por los tejidos nerviosos que están fuera del SNC, y su función principal es conectarlo con los órganos y miembros del cuerpo (Fox 2014; Haines 2013).

Sistema Nervioso Central

El SNC se divide en dos subsistemas: médula espinal y el encéfalo. El encéfalo se divide en seis regiones funcionales: bulbo raquídeo, protuberancia, cerebelo, mesencéfalo, diencéfalo y los hemisferios cerebrales (Kandel et al. 2014). El lóbulo frontal (neocorteza) es una estructura reciente en la evolución del ser humano y es considerado como la parte del cerebro que está involucrado en los procesos cognoscitivos superiores, como el control del comportamiento, toma de decisiones, motivación, memoria y atención, entre otros (Bahlmann et al. 2015; Rakic 2009; Talk et al. 2016). Teorías acerca de la función del lóbulo frontal consideran que la corteza prefrontal está involucrada en la organización del comportamiento en tiempo y contexto, como por el ejemplo el comportamiento social en los mamíferos (Kolb et al. 2012). La porción más anterior del lóbulo frontal está ocupada por la corteza prefrontal en su superficie medial, lateral y orbital. El lóbulo frontal está vinculado con partes distantes a través de sus interconexiones con la amígdala, hipotálamo, mesencéfalo y la protuberancia. Las funciones consideradas de orden superiores pueden ser integradas por las interconexiones de la corteza prefrontal (Siddiqui et al. 2008).

El encéfalo se protege del medio externo a través del cráneo, meninges, líquido cefalorraquídeo (LCR) y la barrera hematoencefálica (BHE) (Fox 2014). Las meninges cubren al SNC y protegen al cerebro de daños físicos, sirven como entrada para arterias y venas, además encierran una cavidad llena de LCR el cual es vital para el funcionamiento normal del cerebro (Haines 2013; Russi y Brown 2015).

Las meninges, desde la capa más externa a la más interna, se divide en tres compartimientos vasculares: duramadre que lleva los senos venosos; aracnoides que permite la entrada de las principales venas y arterias; y piamadre que es continua con tejido conectivo de los vasos sanguíneos del SNC (Russi y Brown 2015).

La duramadre es la más resistente de las tres meninges, está adherida a la superficie del cráneo, formada de células fibroelásticas, y grandes cantidades de colágeno extracelular que tienen como función entrelazar las capas y proporciona resistencia. Esta capa contiene los vasos sanguíneos y terminales nerviosas (Adeeb et al. 2012; Russi y Brown 2015). Después continúa la aracnoides, compuesta de tejido fibroso avascular y está en contacto directo con la duramadre, solamente separadas por el espacio subdural. Las uniones ocluyentes que presentan las células de esta capa meníngea, eliminan cualquier espacio extracelular y de esta manera, crean una barrera contra el paso de sustancias, y además cubre los vasos sanguíneos y nervios, que pasan a través del espacio subaracnoideo al entrar al cráneo (Adeeb et al. 2013a; Haines 2013). Posteriormente continúa la piamadre que es la capa más interna del SNC, está altamente vascularizada y adherida al SNC, permitiendo que se introduzca en todas las fisuras y surcos cerebrales. Además, la piamadre se constituye por capas de fibroblastos aplanados, capilares y microfibrillas de colágeno, y está separada de la aracnoides por el espacio subaracnoideo; éste contiene LCR y contiene las principales arterias del cerebro (Waxman 2011). La piamadre junto con el espacio subaracnoideo, acompaña a los vasos que entran al encéfalo (Adeeb et al. 2013b; Haines 2013; Krstic 2013).

El sistema nervioso requiere para su funcionamiento de una gran cantidad de sustratos energéticos debido a su actividad permanente, y las neuronas informan de su funcionamiento a las arteriolas y capilares sanguíneos próximos, y de esta manera incrementan el flujo sanguíneo cerebral en las áreas activadas.

La vascularización cerebral comienza desde el arco aórtico donde se originan tres arterias; la arteria carótida común izquierda, arteria subclavia izquierda y la arteria del tronco braquiocefálico, donde nace la carótida común derecha y la arteria subclavia derecha (Figura 1). El cerebro está compuesto por dos sistemas encargados del suministro de sangre, el primero de ellos conformado por las arterias carótidas internas, que irrigan el 70% del flujo sanguíneo

cerebral (FSC). El segundo sistema está conformado por las arterias vertebrales que suministran el 30% del FSC. Asimismo, estos dos sistemas convergen en el polígono de Willis, un anillo vascular por donde se ramifican las arterias principales cerebrales; las arterias anteriores que están unidas a través de la arteria comunicante anterior y las arterias comunicantes posteriores unidas a las arterias cerebrales posteriores, originadas a partir de la carótida (Figura 2). Su función principal es realizar suplencias vasculares entre ambos sistemas de arterias para asegurar la irrigación del cerebro (Sahagún y de la Escalera 2004; Yang et al. 2017b).

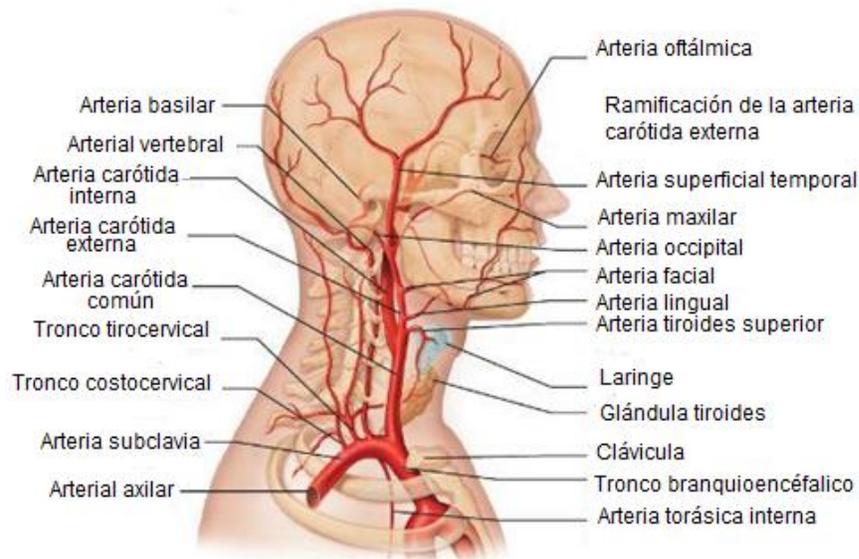


Figura 1. Vista lateral del sistema vascular cerebral (Purves et al. 2001).

Una característica importante de los vasos cerebrales es su participación en la regulación del flujo sanguíneo cerebral que es realizado por las células del músculo liso vascular en la pared de las arterias, éstas células tienen receptores que inician cascadas de señalización en respuesta a estímulos mecánicos, químicos y celulares, y liberan moléculas de señalización como el óxido nítrico, endotelinas y prostanoïdes (Iadecola 2010). Existen tres mecanismos principales que regulan el flujo sanguíneo cerebral. El primero de ellos es la autorregulación cerebral que se encarga de mantener la presión arterial con un flujo constante, el tono vascular está controlado por el SNC y SNP, y además la regulación metabólica mantiene un balance de la demanda energética comandada por la unidad neurovascular (Smolinski y Czlonkowska 2016; Yang et al. 2017b).

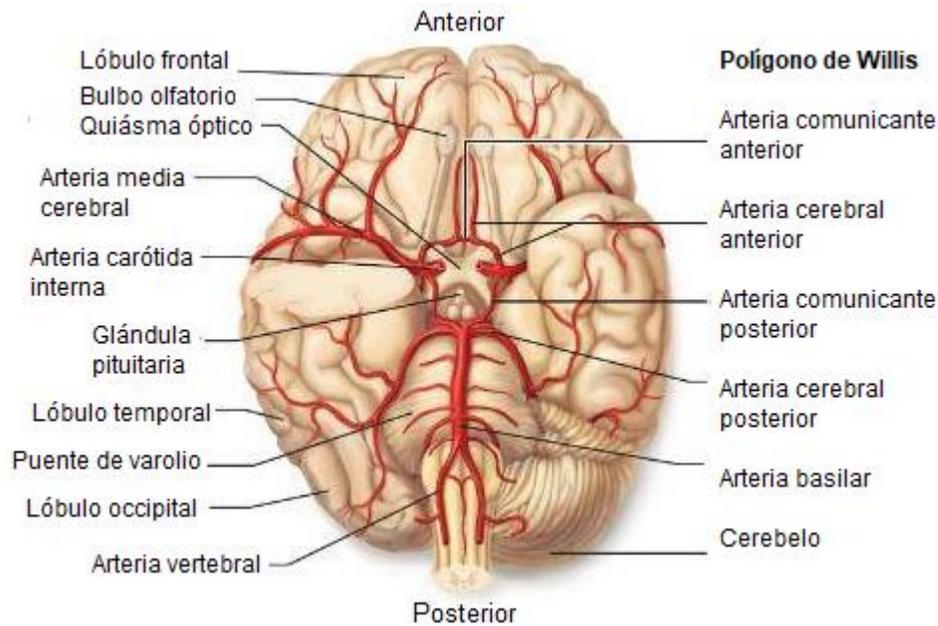


Figura 2. Constitución del polígono de Willis (modificada de Purves et al. 2001).

La composición del líquido extracelular en el SNC es importante para un funcionamiento adecuado de las células, y para no comprometer su funcionalidad por la exposición de compuestos tóxicos, se protege a través de la barrera hematoencefálica (BHE, formada por las células de endotelio). Una característica esencial de la BHE es la expresión de transportadores, receptores y enzimas que proveen nutrientes a las células, se encarga de desechar los productos del metabolismo y del intercambio de moléculas de señalización y iones entre la sangre y el cerebro, y asimismo impide la entrada a distintos solutos que puedan dañar al tejido cerebral (Redzic 2011). Los transportadores específicos regulan el paso de moléculas pequeñas, por ejemplo el transportador para glucosa (GLUT), EAAT2, CAT1 para aminoácidos y para diferentes moléculas como nucleósidos, aniones y cationes orgánicos (Figura 3) mientras que moléculas de alto peso molecular como proteínas y péptidos son transportados por endocitosis (Wong et al. 2013).

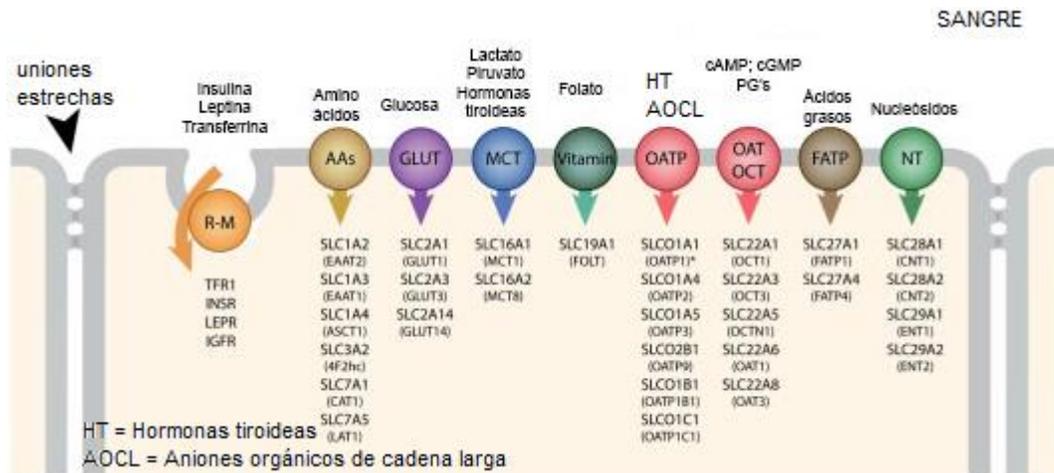


Figura 3. Transporte de moléculas a través de la barrera hematoencefálica (modificada de Saunders et al. 2016).

El sistema vascular es crucial para la función normal del cerebro debido a que se encarga de suministrar los nutrientes necesarios para las células. Se ha visto que daños en este sistema están asociados a enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson, enfermedades cerebrovasculares, epilepsia, infecciones en el cerebro (como VIH) o en las meninges, estrés mental, hipertensión e hiperglicemia (Wong et al. 2013). Además, una dieta alta en grasas y un estilo de vida sedentario son factores de riesgo para el desarrollo de enfermedades cerebrovasculares. Las combinaciones de estos factores provocan disminución y daño en la membrana de los vasos sanguíneos, provocan un inadecuado flujo sanguíneo (Santos et al. 2017), oxigenación y además, provocan cambios en la expresión en las proteínas de las zonas ocluyentes, principalmente en las ocludinas de la BHE (Srivastava et al. 2013) permitiendo la acumulación de productos tóxicos, desbalance iónico que causa alteración en la sinapsis, y finalmente, la muerte neuronal (Santos et al. 2017; Wong et al. 2013).

La diabetes es un factor de riesgo importante para el desarrollo de enfermedades cerebrovasculares debido a un deterioro en la vascularización cerebral. Este deterioro puede ser generado por diferentes vías metabólicas. Por ejemplo, bajo esta condición glicémica se ha observado una disminución del glutatión y aumento en las especies reactivas del carbonilo principalmente del metilgloxal, un metabolito precursor de productos finales de glicación avanzada, que afectan a la ocludina provocando deterioro de la BHE (Li et al. 2015). No sólo por esa vía se ocasiona daño vascular, ya que la hiperglicemia crónica también provoca un incremento en las especies reactivas de oxígeno (ERO's), en los productos finales de glicación avanzada, activación de vías de señalización pro-inflamatorias y daño en el DNA así como en las proteínas por la vía de la proteína cinasa-C (Prasad et al. 2015).

La hiperglicemia crónica es la causa principal de daño y muerte neuronal, conduciendo a la neurodegeneración en el SNC; se ha observado que en pacientes con retinopatía diabética hay una disminución en la regeneración de los axones, sugiriendo que la hiperglicemia es un factor de riesgo asociado a desórdenes del SNC. Además, en ratas resistentes a la insulina se encontró un aumento en el estrés oxidativo cerebral ocasionando disfunción mitocondrial y una disminución en la plasticidad sináptica como en la densidad dendrítica en la región CA1 del hipocampo (Sa-Nguanmoo et al. 2016). En modelos de ratas diabéticas se han encontrado cambios neurodegenerativos en la corteza prefrontal debido a una disminución en las enzimas antioxidantes (catalasa, superóxido dismutasa y glutatión) (Akinola et al. 2015). Los astrocitos tienen efectos perjudiciales en condiciones diabéticas debido a que liberan moléculas proinflamatorias que pueden generar daño y muerte neuronal (Yang et al. 2017a).

El sistema renina angiotensina (RAS) cerebral regula principalmente, a través de la Angiotensina II (Ang II) el flujo sanguíneo cerebral, además tiene implicaciones en la protección del cerebro, estrés, depresión, consolidación de la memoria y mantiene relación con la enfermedad de Alzheimer, Parkinson, diabetes mellitus, y su sobreactivación ocasiona daños a al lecho vascular cerebral (Wright y Harding 2013). La Ang II actúa a través de los receptores AT₁ y AT₂ (Saavedra 2005), además se ha visto que los astrocitos expresan preferentemente AT₁ mientras que las neuronas AT₂ (Sumners et al. 1991). Dentro del SNC hay expresión de dichos receptores en hipotálamo, cuerpo caloso, cerebelo, corteza, órgano subfornical y médula espinal, entre otros (Lenkei et al. 1997; Montiel-Herrera et al. 2006; Saavedra 2005). En enfermedades como la diabetes e hipertensión se ha observado que hay una sobreactivación del sistema renina angiotensina ocasionando estrés oxidativo y daño al tejido endotelial, provocando una desregularización de la microcirculación cerebral (Estate et al. 2013).

En este sentido, los cerebros hiperglicémicos son propensos a desarrollar patologías vasculares y muestran signos de deterioro por procesos inflamatorios y estrés oxidativo que afectan a la unidad neurovascular. Además, de que es importante conocer cómo esta desregulación afecta a las diferentes zonas del cerebro. Por ello, es importante investigar la participación de los receptores a Ang II en el lóbulo frontal.

Sistema Nervioso Periférico

El sistema nervioso periférico (SNP) está conformado por los nervios espinales, nervios periféricos y uniones neuromusculares. Además, hay 31 pares de nervios espinales y están agrupados en ocho cervicales, doce torácicos, cinco lumbares y un sacro-coccígeo (Fox 2014).

El SNP se divide en somático, autónomo y entérico. El primero comprende las neuronas sensitivas que están en piel, músculos y articulaciones. El sistema nervioso autónomo se encarga de regular los procesos involuntarios como respiración y procesos metabólicos, entre otros. Asimismo, el sistema nervioso autónomo se subdivide en el sistema simpático, capaz de aumentar la tasa de actividad de los procesos involuntarios; y el sistema parasimpático que usualmente antagoniza al simpático, es decir disminuye la tasa de actividad de los mismos procesos (Fox 2014).

CÉLULAS: NEURONAS Y GLÍAS

Dentro del SNC se encuentran dos grandes grupos de células: 1) las neuronas capaces de generar potenciales de acción debido a estímulos eléctricos o químicos, los cuales se propagan a través del axón para comunicarse con otras células; y 2) las células gliales que son las más abundantes del SNC, no son excitables (comúnmente) y existen diferentes tipos: microglia, oligodendrocitos, pericitos y los astrocitos, que forman la unidad neurovascular junto con la neurona y las células vasculares y endoteliales (Kandel et al. 2014).

Neuronas: Excitabilidad y Metabolismo

Las neuronas se componen de un soma celular, varias dendritas y un axón. Estas células son capaces de generar potenciales de acción debido a estímulos eléctricos o químicos, que se propagan a través del axón para comunicarse con otras células (Kandel et al. 2014). Adicionalmente, estas células tienen la capacidad de ajustar la excitabilidad de la membrana para generar potenciales de acción a una velocidad adecuada dentro de un rango óptimo. Las neuronas pueden reducir o aumentar la excitabilidad de la membrana a través de sus canales iónicos (Misonou 2010).

Las neuronas poseen una variedad de canales de potasio que regulan la excitabilidad de la membrana debido a su capacidad de estabilizar el potencial de membrana. Entre los principales canales se encuentran los canales de K^+ de rectificación entrante (Kir), los canales de K^+ sensibles a Ca^{2+} intracelular y los canales de K^+ de rectificación tardía, todos ellos voltaje-dependientes (Misonou 2010). Aunque, existen múltiples canales iónicos y distintos canales de potasio que mantienen la homeostasis de la excitabilidad de la membrana a través de diferentes vías de señalización (Misonou 2010).

La comunicación neuronal es esencial para la propagación de la información en el cerebro y la transmisión sináptica es el mecanismo mediante el cual las neuronas se comunican entre sí (Huang y Thathiah 2015). La homeostasis del gradiente electroquímico se debe realizar después de un proceso de neurotransmisión o potencial de acción, así como la captación de neurotransmisores, sin embargo, realizar estas acciones contribuye a las altas necesidades energéticas del cerebro (Belanger et al. 2011; Felipe et al. 2012). La unidad neurovascular permite acoplar la demanda y suministro de energía controlando el flujo sanguíneo cerebral en áreas donde la actividad cerebral es elevada, y de esta manera, permite el funcionamiento fisiológico

adecuado del cerebro (Belanger et al. 2011). El acoplamiento neurovascular mejora el neurometabolismo permitiendo que las células obtengan glucosa de la circulación sanguínea. Los astrocitos poseen GLUT1 para la captación de glucosa que posteriormente, metabolizan a lactato y lo liberan al espacio extracelular para la captación neuronal, mientras que las neuronas poseen GLUT3, que tiene una tasa de transporte más alta que GLUT1, permitiendo que la neurona capte más fácilmente glucosa. La capacidad que tienen ambos transportadores GLUT1 y 3 excede la demanda de glucosa, permitiendo que las neuronas tengan suministro suficiente en diferentes estados de actividad (Mergenthaler 2013).

Las neuronas tienen una comunicación activa con la vascularización cerebral, un daño permanente afecta a las funciones cerebrales. Además, son sensibles a los cambios en la circulación sanguínea (Ergul et al. 2015), así que una falla en la comunicación celular conllevará a pérdidas en la producción de energía que afecta a la neurotransmisión y, por lo tanto, a la sobrevivencia neuronal (Felipe et al. 2012).

La desregulación en el funcionamiento neurovascular puede ser debido al incremento de daño oxidativo, procesos inflamatorios que se generan en enfermedades como síndrome metabólico, Alzheimer, diabetes (Ergul et al. 2015; Felipe et al. 2012). Hay evidencia que demuestra que la diabetes altera la homeostasis de calcio intracelular que conduce a daño celular, debido a que hay afectación en la mitocondria, la liberación de neurotransmisores, y el balance energético (Gaspar et al. 2016).

La acción de la insulina en el cerebro modula la sobrevivencia neuronal, mejora la función sináptica y forma nuevos circuitos neuronales, además regula el neurotransmisor dopamina. En desórdenes metabólicos como la resistencia a la insulina causa degeneración en las neuronas dopaminérgicas incrementando la fisiopatología de la enfermedad de Parkinson y en el lóbulo frontal hay disminución en la señalización dopaminérgica (Song y Kim 2016). Además, en ratas obesas se ha encontrado un decremento del receptor D2 para dopamina. El daño ocasionado a las neuronas dopaminérgicas es debido a procesos inflamatorios y estrés oxidativo que causa daño intracelular en las neuronas. Estudios recientes han encontrado que cuando el sistema RAS está hipereactivado incrementa los procesos neuroinflamatorios y provoca degeneración en neuronas dopaminérgicas (Song y Kim 2016).

La hiperglicemia crónica en el cerebro genera especies reactivas de oxígeno y nitrógeno que comprometen la función mitocondrial ocasionando daño sináptico. Los ERO's provocan peroxidación de lípidos que daña a la membrana celular y la función celular (Yi et al. 2011). En pacientes con diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) se ha observado que la proteína mitocondrial Drp1 es nitrosilada y esto provoca disminución en la producción de energía, llevando a pérdidas y

alteraciones sinápticas (Akhtar et al. 2016). En esta condición, hay aumento de la proteína β -amiloide y se ha observado un sinergismo con altos niveles de glucosa para inducir especies reactivas de nitrógeno dependientes del receptor N-metil-D-aspartato (NMDA), induciendo incremento en la concentración del calcio intracelular, y finalmente, apoptosis de neuronas que llevan a neurodegeneración (Akhtar et al. 2016).

Estudios realizados en pacientes con diabetes mellitus tipo 1 (DMT1) han encontrado los niveles aumentados de glucosa y glutamato en regiones prefrontales del cerebro, provocando daño neuronal a través del neurotransmisor glutamato. Asimismo, cambios en los metabolitos cerebrales como mio-inositol y n-acetil-aspartato provocan aumento de glutamato en la materia blanca, lóbulo frontal y tálamo (Kawamura et al. 2012).

En el hipocampo de animales diabéticos la expresión de mediadores pro inflamatorios como el factor de necrosis tumoral (TNF), interleucina-1 β , IL-2 e IL5 están incrementados y reducida la expresión de BDNF, deteriorando la memoria por procesos inflamatorios. Diferentes estudios han reportado que la hiperglicemia crónica causa muerte neuronal en las áreas CA1 y CA2 del hipocampo, así como alteraciones en la neurogénesis en las dendritas neuronales (Gaspar et al. 2016).

En condiciones de hiperglicemia crónica, las vesículas sinápticas sufren cambios en el contenido de proteínas, así como un incremento en la expresión de la proteína PSD-95, involucrada en el control de receptores AMPA, en terminales postsinápticas. Esto indica que la diabetes está afectando la liberación de neurotransmisores que conlleva a las deficiencias cognitivas observadas en animales diabéticos; la dopamina se incrementa en diferentes áreas del cerebro, también se observa una disminución en los niveles basales de serotonina, dopamina, GABA y glutamato en el hipocampo. Sin embargo, los receptores GABA se ven regulados por la hiperglicemia crónica, creando un desbalance entre los neurotransmisores excitadores e inhibidores que desencadenan neurodegeneración y cambios en los procesos cognoscitivos (Gaspar et al. 2016).

Neuroglía: Astrocitos y Funciones Homeostáticas

Los astrocitos realizan funciones homeostáticas dentro del SNC, entre ellas está la regulación de neurotransmisores en las sinápsis químicas; además, a través de su amplio repertorio de canales de potasio mantienen una concentración 2-3 mM K⁺ extracelular. Los astrocitos también participan en la regulación del flujo sanguíneo cerebral coordinándolo con la

actividad neuronal y apoyan a las funciones metabólicas de las neuronas (Kettenmann y Ransom 2013).

La regulación de la neurotransmisión por los astrocitos está basada, en gran parte por calcio intracelular y la activación receptores metabotrópicos y ionotrópicos. El glutamato liberado de la neurotransmisión es co-transportado con Na^{1+} hacia los astrocitos por el transportador GLT-1, la bomba de $\text{Na}^{1+}/\text{K}^{1+}$ recupera el gradiente de sodio a través del consumo de ATP. Para recuperar las pérdidas de este proceso, se incrementa la glucólisis para la producción de lactato, y éste es transportado junto a la glutamina hacia la neurona (Figura 4) (Escartin y Rouach 2013).

Los astrocitos toman glucosa de la circulación cerebral a través de los transportadores de glucosa localizados en sus podocitos que mantienen contacto con los capilares sanguíneos. La glucosa es metabolizada a lactato y lo transportan hacia la neurona por receptores específicos o almacenada limitadamente en glucógeno. La liberación de K^{1+} durante la neurotransmisión es un inductor de la exportación de lactato. El suministro de glucosa es modulado a través del flujo sanguíneo por vasodilatación o vasoconstricción. Este proceso es importante debido a que en el SNC la reserva de energía es escasa, y la actividad neuronal debe estar coordinada con el suministro de glucosa a través de la sangre (Escartin y Rouach 2013).

Los astrocitos expresan una variedad de receptores, enzimas para metabolizar, almacenar y transferir substratos metabólicos en respuesta a la actividad neuronal. Además, expresan un alto nivel de conexinas, uniones comunicantes que son poco selectivas y permiten el intercambio citoplasmático de moléculas pequeñas (hasta 1.5 kDa), iones (K^{1+} , Ca^{2+} , Na^{1+}), segundos mensajeros como monofosfato de adenosina cíclico (cAMP), 1,4,5-trisfosfato de inositol (IP3), neurotransmisores (glutamato) y metabolitos energéticos (glucosa, lactato) (Escartin y Rouach 2013).

Los astrocitos mantienen una comunicación entre la actividad neuronal y las redes vasculares, estos tres tipos celulares conforman la unidad neurovascular. Por ejemplo, el glutamato liberado durante la neurotransmisión activa receptores metabotrópicos en los astrocitos, induciendo un aumento de Ca^{2+} intracelular que lleva a la activación de fosfolipasa A_2 , y por consiguiente, la movilización de ácido araquidónico. El ácido araquidónico puede ser metabolizado por ciclooxigenasas (COX) y generar prostaglandina E_2 , que provoca vasodilatación en el músculo liso vascular o por el citocromo P450 generando ácidos epoxieicosatrienoicos (EETs) que tienen efectos vasodilatadores, o bien ácidos hidroxieicosatetraenoicos (HETEs) que causan vasoconstricción (Figura 5) (Howarth 2014; Koehler et al. 2009).

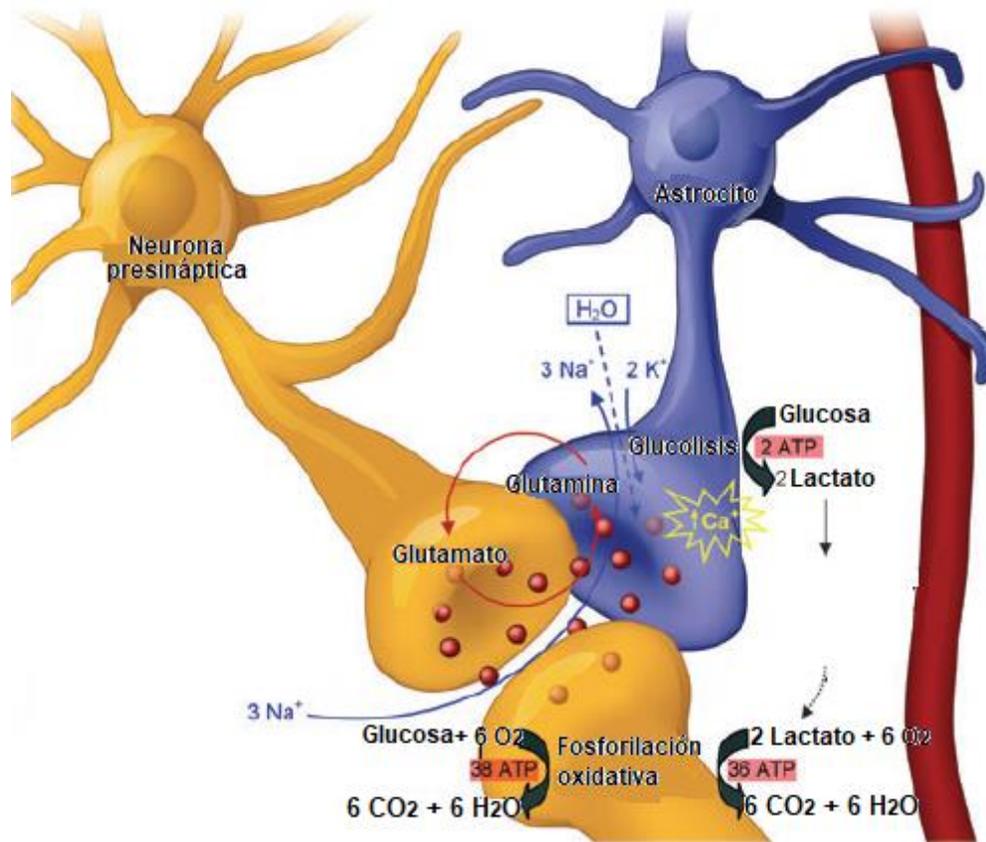


Figura 4. Regulación metabólica y de neurotransmisores por astrocitos, modificada de (Figley y Stroman 2011).

Sin embargo, existen otros mecanismos que acoplan la actividad neurovascular para regular el FSC. La activación de receptores metabotrópicos por la captación de glutamato incrementa Ca^{2+} y esto activa canales de K^{1+} sensibles a Ca^{2+} (K_{Ca}) en los podocitos. La liberación de K^{1+} activa a los canales K_{ir} expresados en las células del músculo liso vascular, provocando vasodilatación (Koehler et al. 2009).

Los receptores para Ang II se han reportado tanto en neuronas y en glías. La activación de los receptores de Ang II desencadena movilización de calcio intracelular, y aumenta la liberación de prostaglandina y prostaciclina en astrocitos (Jaiswal et al. 1991). Además, en astrocitos del tronco encefálico y del cerebro se encontró la presencia del receptor AT_1 en ratas normotensivas (Morimoto et al. 2002). Estudios de biología molecular demostraron que en astrocitos de ratas adultas la producción de Ang II estimula los receptores AT_1 para elevar la presión sanguínea (Haspula y Clark 2016). Sin embargo, la Ang II también participa en la patogénesis de diversas enfermedades y diferentes estudios han reportado que participa en la disfunción de la unidad neurovascular por procesos inflamatorios (Mogi et al. 2012).

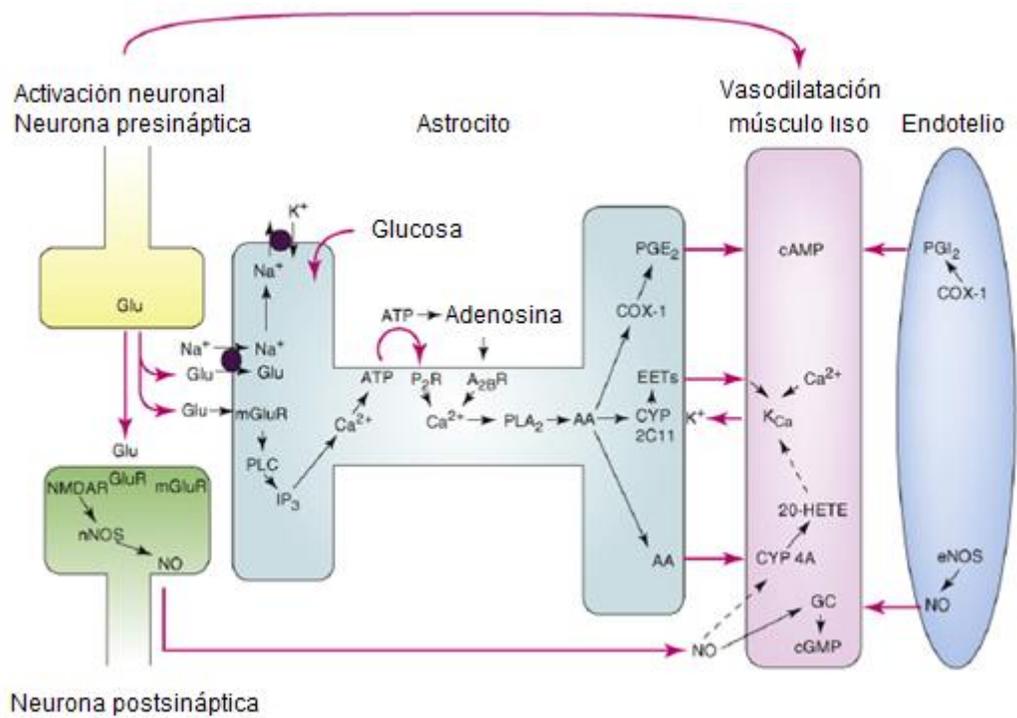


Figura 5. Control del flujo sanguíneo cerebral a través de la unidad neurovascular (modificada de Koehler et al. 2009).

NEUROTRANSMISIÓN Y RECEPTORES DE MEMBRANA

La transmisión sináptica pueden ser eléctrica o química, sin embargo, dentro del cerebro la mayoría es química (Fox 2014; Kandel et al. 2014). En las sinápsis químicas, cuando el potencial de acción alcanza la terminación de la neurona presináptica, se libera un neurotransmisor mediante exocitosis que se une a receptores específicos a dicho neurotransmisor (ionotrópicos y metabotrópicos) en la neurona postsináptica. La señal postsináptica de excitación o inhibición depende del tipo del receptor con el cual se une el neurotransmisor (Kandel et al. 2014).

Mecanismos de Señalización Ionotrópicos y Metabotrópicos

Los receptores ionotrópicos pueden reconocer diferentes clases de neurotransmisores como GABA, glicina, serotonina, glutamato y ATP que tienen la capacidad de despolarizar o hiperpolarizar la membrana por la entrada de iones como Na^{1+} y Cl^{1-} (Dorostkar y Boehm 2008; Purves et al. 2001). El incremento de iones en el citoplasma tiene como consecuencia la activación de genes de transcripción, cambios en el citoesqueleto, degradación, transporte y síntesis de proteínas (Li et al. 2014).

Los receptores metabotrópicos están acoplados a proteínas G y entre los subtipos que tiene esta familia, se encuentra G_o que es la más abundante en el SNC e inducen diferentes vías de señalización que involucran segundos mensajeros como Ca^{2+} , cAMP, cGMP, IP3, diacilglicerol (DAG) resultando en la activación de genes, fosfolipasas, adenilato ciclasa, fosforilación de proteínas, activación de factores de transcripción, modulación de la actividad sináptica, y cierre o apertura de canales iónicos (Evans et al. 2001; Jiang y Bajpayee 2009; Michael-Titus et al. 2010; Tuteja 2009). Estos receptores participan en la modulación de varias funciones celulares como la percepción sensorial, quimiotaxis, neurotransmisión, comunicación celular, y a través de su unión a proteínas G pueden interactuar con diferentes moléculas como Ang II, serotonina, dopamina, GABA, opioides, glutamato, nucleótidos, péptidos, fotones, Ca^{2+} , entre otros (Singh y Karnik 2016; Tuteja 2009).

En las células piramidales del hipocampo, la proteína G_o media la señalización de los receptores de serotonina y GABA en la activación de los canales de potasio y cloruro (Jiang y Bajpayee 2009). La sobreexpresión de la proteína $G_{o\alpha}$ en neuronas resulta en la activación de Rap1 que aumenta la expresión de Src y Stat3 para promover el crecimiento neuronal y a través de quinasas Rho y PI4 controlan la reorganización de actina. Además, participa en el desarrollo

neuronal debido a que la proteína GAP-43, con alta expresión en el desarrollo y regeneración axonal, mejora la unión del GTP a la proteína Go (Jiang y Bajpayee 2009).

En las células gliales, hay mayor expresión de receptores metabotrópicos que desencadenan señales de Ca^{2+} en el citosol, pero con experimentos in situ se ha demostrado la expresión de receptores ionotrópicos para glutamato, ATP, GABA y glicina que pueden ser activados por la liberación de neurotransmisores o gliotransmisores (Lalo et al. 2011).

En cultivos celulares del hipocampo y del cerebelo se ha encontrado que la liberación de glutamato debido a la actividad sináptica propaga ondas de Ca^{2+} en astrocitos. En experimentos similares, pero realizados en rebanadas del hipocampo se encontró que acetilcolina también desencadena señalización de Ca^{2+} por receptores metabotrópicos. Sin embargo, dicha señalización en neuronas y astrocitos se propaga a diferentes tiempos. Por ejemplo, las sinapsis eléctricas o químicas son más eficaces en la amplitud de su señalización mientras que las ondas de Ca^{2+} son lentas (Lalo et al. 2011).

Los astrocitos mantienen contacto directo en los sitios de liberación de neurotransmisores en las terminaciones neuronales, y presentan los mismos gradientes de transmisores que la membrana postsináptica, esto tiene como resultado que los receptores ionotrópicos y/o metabotrópicos sean activados por la transmisión sináptica. Esto indica que neuronas y glía están en constante comunicación a través de estos receptores, lo que sugiere que un déficit en los mismos conlleva a una pérdida de comunicación celular (Lalo et al. 2011).

Angiotensina II: Receptores AT_1 y AT_2

El sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAAS) regula en el ser humano el balance de agua, la sed y la presión sanguínea, entre otras respuestas conductuales (Wright y Harding 2013). La Ang II es un octapéptido que activa sistémicamente receptores de membrana celular denominados AT_1 y AT_2 . Estos receptores están acoplados a proteínas G y, por ejemplo, la activación del receptor AT_1 conduce a respuestas de vasoconstricción y a la homeostasis de electrolitos (Bloch et al. 2015; McKinley et al. 2003; Wright y Harding 2013).

La Ang II se forma a partir del angiotensinógeno generado en el hígado por vía enzimática (Figura 6). A nivel periférico, la hormona renina circulante se genera por las células granuales del aparato yuxtaglomerular renal ante una caída de la presión arterial. La renina hidroliza al angiotensinógeno circulante para formar el decapeptido angiotensina I que sirve como sustrato para la enzima convertidora de angiotensina (ECA) la cual hidroliza el carboxilo terminal de histidina-leucina para formar la Ang II (Wright y Harding 2013). A partir de aquí se pueden seguir

diferentes vías enzimáticas para convertir la Ang II en otros péptidos como angiotensina III, angiotensina (1-7), angiotensina IV a través de aminopeptidasas A o N, carboxipeptidasas P y endopeptidasas neutras (Figura 7) (Wright y Harding 2013) que su función/actividad aun so poco estudiadas.

Dentro del SNC, las enzimas para la formación de Ang II se encuentran en diferentes células y zonas del cerebro. Por ejemplo, la renina es sintetizada por neuronas y se ha encontrado en grandes concentraciones en las terminaciones nerviosas. Por otro lado, la ECA mantiene concentraciones altas en el hipotálamo y órganos circunventriculares mientras que el ARNm del angiotensinógeno se ha encontrado en astrocitos y la Ang II se ha encontrado dentro de vesículas sinápticas (Wright y Harding 2013).

En este sentido, el sistema renina angiotensina en el cerebro se ha demostrado en años recientes y se ha implicado en la regulación del flujo sanguíneo cerebral y asimismo, a la Ang II se le han atribuido funciones de protección cerebral, participación en mecanismos cerebrales de estrés, depresión, consolidación de la memoria y en enfermedades como el Alzheimer, Parkinson y diabetes (Wright y Harding 2013).

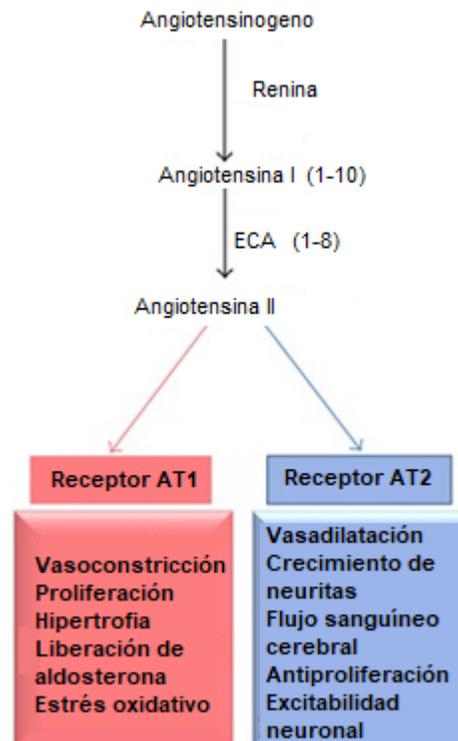


Figura 6. Vía clásica de formación de Ang II (modificada de Guimond y Gallo-Payet 2012).

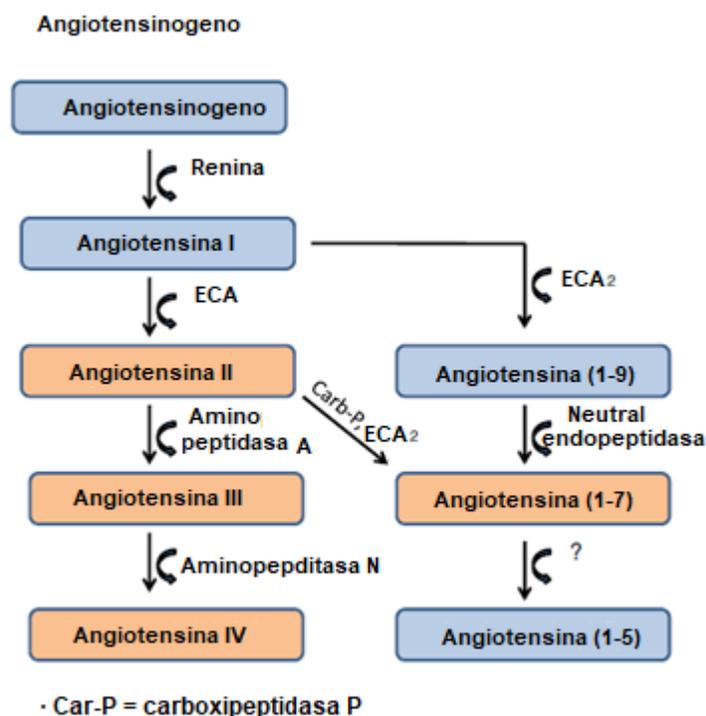


Figura 7. Vías enzimáticas para la conversión de angiotensinogeno en Ang II y otros péptidos (modificada de Wright y Harding 2013).

Los receptores para Ang II que se encuentran en los órganos circunventriculares responden a la Ang II periférica, mientras que los receptores dentro de la BHE responden a la que se sintetiza en el cerebro (Saavedra 2005), debido a que la Ang II sistémica no puede atravesar la BHE, aunque aún no es claro si en los órganos circunventriculares podría atravesar Ang II o sus derivados. Entre las regiones cerebrales que poseen receptores de Ang II están el rombencéfalo, la sustancia negra, el hipocampo, el bulbo olfatorio y el cuerpo calloso, entre otros (McKinley et al. 2003).

El receptor AT_1 señala a través de cascadas intracelulares provocados por la activación de proteínas G, elevación de Ca^{2+} y activación de la proteína cinasa C. También se realizan reacciones de fosforilación que incrementan la expresión de factores de transcripción como c-Fos y c-Jun, involucrados en la proliferación celular. Por otro lado, la señalización del receptor AT_2 involucra la inhibición de la vía MAPK, fosforilación y alteración en los niveles intracelulares de cGMP y en la regulación de eventos pro/anti apoptóticos, entre otros (Culman et al. 2002).

Dentro de la circulación cerebral, la Ang II estimula la producción de ERO's afectando el tono vascular, generando inflamación y cambios en la estructura vascular, modificando el flujo sanguíneo cerebral asociado al desarrollo de hipertensión (Bloch et al. 2015; De Silva y Faraci

2012). Por ejemplo, el estrés oxidativo ha sido asociado a la patogénesis de diferentes enfermedades que afectan al cerebro y a su circulación sanguínea, ya que puede dañar proteínas, ADN, lípidos, y altera la señalización del óxido nítrico, disminuyendo su biodisponibilidad y generando especies reactivas de nitrógeno como el peroxinitrito (ONOO⁻) (De Silva y Faraci 2012). Aunque la formación de este radical ocurre principalmente dentro de las células endoteliales, se difunde a las células gliales adyacentes de las unidades neurovasculares, induciendo daño celular, inhibiendo la síntesis del vasodilatador PGI₂ y de la actividad de canales de potasio (De Silva y Faraci 2012). Además, el aumento de radicales libres debido a la producción de Ang II inhibe las corrientes rectificantes de potasio, esto quiere decir que afecta a la actividad neuronal y la unidad neurovascular (Garrido y Griendling 2009).

En ratas diabéticas se observó un incremento de Ang II, en el cerebro y cerebelo, junto con un aumento en los ERO's y en la expresión de diferentes moléculas pro inflamatorias como ICAM-1, LFA-1, CD8, sugiriendo que el octapéptido participa en el reclutamiento de células del sistema inmune como linfocitos y macrófagos (Tota et al. 2012; Vargas et al. 2012). Además, la administración de LPS en la corteza prefrontal, amígdala y el hipocampo aumentó la expresión del ARN mensajero del receptor AT₁, sugiriendo que participa en la activación de la respuesta inflamatoria (Saavedra 2012). Por otro lado, antagonistas del receptor AT₁, como candesartan, redujeron los efectos anti-inflamatorios en la microvasculatura cerebral y neuronas del cerebelo de ratas hipertensas a través de la disminución en la expresión de diferentes vías como la normalización del óxido nítrico sintasa, TNF- α , IL-1 β , IL-6, ICAM-1, COX-2, inducción de c-fos y NF- κ B, disminuyendo la infiltración de macrófagos al cerebro y la activación de la microglia (Chrysant 2007; Saavedra 2012). Estos datos sugieren que la unidad neurovascular se ve afectada por el aumento de Ang II en condiciones patológicas (Saavedra 2012).

Diversos estudios han demostrado que existe una relación entre la sobreactivación de RAS con el desarrollo de diferentes enfermedades como diabetes, síndrome metabólico, desórdenes neurodegenerativos como enfermedad de Alzheimer, Parkinson, enfermedades cerebrovasculares, hipertensión, isquemia cerebral, estrés, ansiedad, entre otros (Saavedra 2012). Por ejemplo, la inducción de diabetes por estreptozotocina está asociado con un incremento en la expresión del ARN mensajero y actividad de la ECA, sugiriendo que su incremento puede ser debido a la hiperglicemia. Apoyando este dato, en retinas de sujetos diabéticos se encontró mayores niveles de Ang II y aumento en la expresión de los receptores AT₁ y AT₂ (Senanayake et al. 2007; Tota et al. 2012). Esta activación de RAS contribuye a la pérdida de neuronas debido a que Ang II genera apoptosis por vía de las caspasas 3 y 9 y

disminuye la expresión de las proteínas anti apoptóticas Bcl-2 y C-IAP-1 en el hipocampo (Chen et al. 2015).

La administración de antagonistas del receptor AT₁ o inhibidores de ECA, previene el aumento de peso en modelos de obesidad en roedores. Además, incrementa la absorción de glucosa y en pacientes se ha visto que disminuyen el riesgo de desarrollar diabetes (de Kloet et al. 2010; Saavedra 2012). Además, utilizando perindopril (inhibidor de ECA) se redujo el daño neuronal en el hipocampo y corteza cerebral, se mejora el flujo sanguíneo cerebral, y la función colinérgica (Tota et al. 2012). De igual forma, se han propuesto diferentes mecanismos por los cuales la Ang II reduce la sensibilidad a la insulina y estos incluyen disminución de adiponectina, adipogénesis, inhibición de la translocación del GLUT4, aumento de procesos inflamatorios (de Kloet et al. 2010). Por lo tanto, hay una relación entre las vías de señalización de la insulina y Ang II, sugiriendo que bloquear este sistema podría mejorar la sensibilidad a la insulina (de Kloet et al. 2010; Saavedra 2012).

Estos datos demuestran que el RAS está envuelto en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas y en la etiología de enfermedades metabólicas (Tota et al. 2012). En este sentido, es importante conocer los efectos de este sistema en condiciones patológicas en regiones del cerebro donde no se ha estudiado como el lóbulo frontal.

Receptor AT₁

Dentro del SNC, los astrocitos poseen una mayor densidad de receptores AT₁. En roedores existen tres isoformas de este receptor AT_{1A}, AT_{1B} y AT_{1C}. En el cerebro de rata, la mayoría pertenecen al subtipo AT_{1A}, y no se encuentran diferencias en las afinidades que muestran este receptor y el subtipo AT_{1B} por la Ang II (McKinley et al. 2003; Saavedra 2005). Además, muestran 95% de homología entre ellos, y la secuencia del ADN del receptor AT₁ muestra que está compuesto por 359 aminoácidos en ratas, ratones y humanos, además presenta 95% de homología entre ratas y humanos, indicando que es un receptor conservado entre las especies. Mientras que el receptor AT_{1C} muestra homología del 90% y 82% con los subtipos AT_{1A} y AT_{1B}, respectivamente (Balakumar y Jagadeesh 2014; Berry et al. 2001).

La señalización del receptor AT₁ se realiza a través de las proteínas Gq, Gi, G_{11/13}. Las funciones fisiológicas sistémicas inducidas por la activación del receptor AT₁ son contracción cardiovascular, síntesis de proteínas, reorganización del citoesqueleto, migración celular, cambios en la morfología celular, efectos trópicos por activación de tirosinas y expresión genética, y también participa en eventos fisiopatológicos como inflamación, hipertrofia, fibrosis, disfunción

endotelial, estrés oxidativo, depósito de matriz extracelular, resistencia a la insulina, angiogénesis y activa factores de transcripción como ERK1/2, MAPK, PyK2, la familia de cinasas c-Src, NFκB, JAK/STAT, entre otros (Balakumar y Jagadeesh 2014; Berry et al. 2001; Singh y Karnik 2016). La regulación de este receptor puede variar dependiendo del estado fisiológico del animal como deshidratación, hipertensión, estrés pueden influenciar la expresión del receptor AT₁ (McKinley et al. 2003).

Receptor AT₂

El receptor AT₂ tiene mayor expresión en períodos fetales y va disminuyendo con el tiempo, aunque su expresión se mantiene alta en el bulbo raquídeo, tálamo, colículos superiores, así como en el núcleo subtalámico y en el cerebelo (Gendron et al. 2003). Además, también está expresado junto con el receptor AT₁ en áreas involucradas en funciones cardiovasculares y aprendizaje. Se ha demostrado que también está expresado en la vasculatura cerebral, donde actúa regulando el flujo sanguíneo cerebral (Guimond y Gallo-Payet 2012b).

El receptor AT₂ se encuentra localizado en neuronas y en astrocitos. Las funciones de este receptor son contrarias a las realizadas por el receptor AT₁, esto quiere decir que promueve la vasodilatación, incrementa la expresión de citocinas antiinflamatorias, tanto en el cerebro como en el sistema cardiovascular (Gallo-Payet et al. 2011), además el receptor AT₂ está asociado a las isoformas de la proteína G_{αi}, principalmente a G_{αi2} y G_{αi3}. Entre las respuestas inducidas por la activación de estas proteínas G está la expresión de la fosfatasa MAP cinasa fosfatasa 1 (MKP-1), activación de canales de potasio y producción de cGMP durante la diferenciación neuronal (Gendron et al. 2003).

En estudios en líneas celulares, la activación del receptor AT₂ está relacionada con la proliferación celular, apoptosis, diferenciación celular, elongación de axones, migración neuronal y mantiene las conexiones sinápticas. Por ejemplo, en la línea celular NG108-15 se observó que un tratamiento con Ang II incrementó el número y longitud de dendritas, y axones (Gendron et al. 2003).

En cultivos celulares cerebrales la Ang II a través del receptor AT₂ incrementa la expresión de tubulina-βIII, proteína tau y MAP, indicando que la activación del receptor está asociada con rearrreglos en el citoesqueleto. Además, activando el receptor con el agonista CGP42112 en cultivos celulares provocó que las neuronas migraran hacia las células gliales. Este efecto también se logró observar en procesos de regeneración en la retina (Gendron et al. 2003). Las funciones de sobrevivencia, migración y elongación son controladas por diferentes vías de

señalización activados por factores neurotrópicos, hormonas y por Ang II a través del receptor AT₂ (Gendron et al. 2003).

La expresión del AT₂ se incrementa después de daño celular en infarto al miocardio o en lesiones del SN. En cultivos celulares de explantes de retina de rata posnatal se utilizó el agonista CGP42112 produciendo regeneración axonal e fibras nerviosos en el sitio de lesión (Gendron et al. 2003; Lucius et al. 1998). Asimismo, la actividad del receptor AT₂ incrementa la plasticidad sináptica modulando la actividad de canales iónicos, influye en la organización de microtúbulos, provoca vasodilatación debido al incremento en la producción de óxido nítrico-cGMP, y disminuye la producción de superóxidos por parte de la NAPDH oxidasa, activa fosfatasa e incrementa la síntesis de ETT's disminuyendo TNF- α , NF- κ B, IL-6, teniendo como consecuencia la disminución de procesos inflamatorios (Gallo-Payet et al. 2011; Saavedra 2005).

En desórdenes neurológicos como la enfermedad de Parkinson y Alzheimer la expresión del receptor AT₂ se ve disminuida. En este sentido se puede hipotetizar que carencia de la actividad del receptor AT₂, aumenta los efectos patológicos de estas enfermedades (Gallo-Payet et al. 2011; Gendron et al. 2003).

En experimentos realizados en ratas en las cuales se ha borrado el gen AGTR2 se encontró que éstas empeoraban su fisiología cardiovascular y después de un proceso isquémico presentaban mayor daño cerebral (Guimond y Gallo-Payet 2012b). Por otro lado, mutaciones en este gen generan una disminución en la inteligencia. Por ejemplo, en estudios clínicos se ha relacionado con manifestaciones de autismo. Además, disminuye el comportamiento exploratorio y la memoria espacial en animales de laboratorio. Estos datos sugieren que el receptor AT₂ es fundamental para las funciones cognitivas y para el flujo sanguíneo cerebral (Guimond y Gallo-Payet 2012b).

Ciclooxigenasas 1 y 2: Prostanoides

El ácido araquidónico (AA) es producto de la actividad de la fosfolipasa C y A₂ en los fosfolípidos de las membranas celulares. El AA es metabolizado por diferentes enzimas como ciclooxigenasas, lipooxigenasas y familias de citocromo P-450 (Minghetti 2004) que sintetizan prostanoides, como las prostaglandinas (PGs), prostaciclina y tromboxanos (TXs). Estas moléculas en el SNC participan en el metabolismo celular y se relacionan con funciones de diferenciación, protección y reparación de células del SNC (Bazan 2005; Tilley et al. 2001).

La síntesis de prostanoides se da principalmente por la vía de las ciclooxigenasas, la COX-1 que tiene expresión constitutiva en la mayoría de las células y está localizado en el cromosoma

9, y la COX-2 es una enzima inducible por citocinas, factores de crecimiento, endotoxinas, hormonas y su gen se encuentra en el cromosoma 1. Sin embargo, en algunas regiones del cerebro como la corteza y el hipocampo tiene una expresión constitutiva en neuronas, principalmente en las dendritas y región perinuclear, donde incluso puede elevar su expresión debido a la actividad sináptica de los receptores NMDA (Bazan 2005; Minghetti 2004; Sang y Chen 2006). Ambas enzimas ancladas en la membrana celular presentan una estructura y actividad catalítica similar, tienen el mismo peso molecular y comparten el 61% de su secuencia de aminoácidos. Existe una tercera isoforma COX-3, aunque es una variante de COX-1 (Bazan 2005).

Para la producción de prostanoideos, el primer paso de esta vía de síntesis se cataliza la unión de oxígeno dentro del AA para formar PGG₂, un intermediario endoperóxido inestable, y posteriormente por la actividad peroxidasa de las ciclooxigenasas se convierte en PGH₂. Éste, por diferentes enzimas sintasas es metabolizado para generar los diversos prostanoideos: PGE₂, PDG₂, PGF_{2a}, prostaciclina PGI₂ y tromboxano (Figura 8) (Palumbo y Bosetti 2013; Ricciotti y FitzGerald 2011; Sang y Chen 2006). A pesar de que ambas enzimas son capaces de generar todas las prostaglandinas, se ha observado que COX-1 suele estar acoplado a las enzimas tromboxano sintasa, prostaglandina F sintasa, prostaglandina citosólica E sintasa, mientras que COX-2 lo está con prostaglandina I sintasa y la isoenzima microsomal PGE₂ (Ricciotti y FitzGerald 2011).

De los diferentes prostanoideos sintetizados a partir de las ciclooxigenasas, en el SNC la PGE₂ incrementa la excitabilidad de la membrana, inhibe la liberación de glicina a través de los receptores EP₂ en la membrana postsináptica, modula la neurotransmisión adrenérgica, noradrenérgica, glutaminérgica, reorganiza la actina del citoesqueleto y participa en la formación de dendritas, entre otros (Chen y Bazan 2005; Minghetti 2004). Además, las PGs están involucradas en acoplar la plasticidad sináptica con el flujo sanguíneo cerebral y los estudios demuestran que pueden actuar de manera paracrina en la membrana sináptica y en la membrana de astrocitos, o autocrina en los receptores postsinápticos (Chen y Bazan 2005; Minghetti 2004).

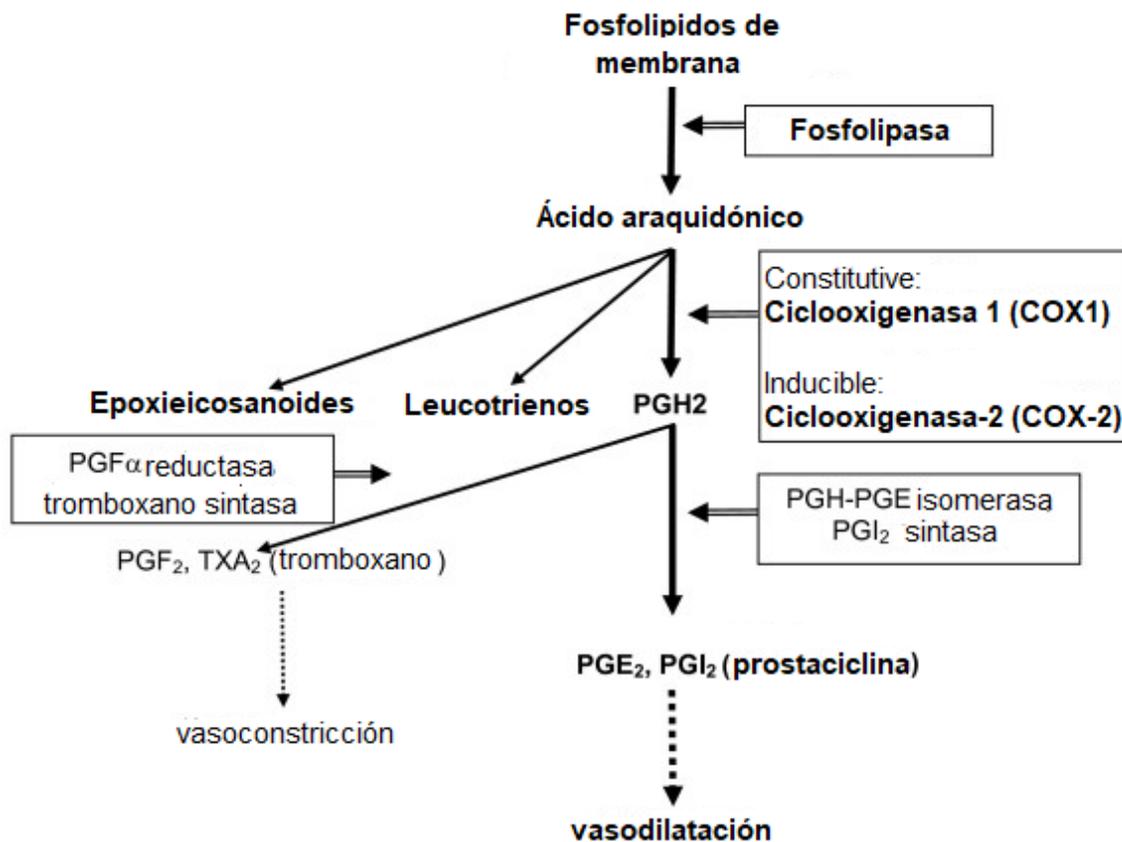


Figura 8. Vía de biosíntesis de prostaglandinas (Valdes et al. 2009).

En roedores, las PGs tienen un papel importante en la unidad neurovascular debido a sus efectos vasodilatadores. En la corteza cerebral, PGE₂ y PGI₂ son las principales prostaglandinas encargadas de relajar las células del músculo liso vascular y a los pericitos a través de la activación de los receptores EP₂, EP₄ e IP. Cada tipo celular de la unidad neurovascular tiene su propia maquinaria de enzimas para producir PGs, aunque estudios *in vivo* y *ex vivo* encontraron que COX-2 junto con los receptores EP₂ y EP₄ son esenciales para la respuesta de la unidad neurovascular en la corteza cerebral (Lacroix et al. 2015).

La neuroinflamación es una respuesta inmune a varios estímulos exógenos o endógenos en el SNC y cuando se vuelve crónica puede llevar a disfunción en los circuitos neuronales (Yang y Chen 2008). Los estudios indican que las enzimas COXs pueden contribuir al proceso inflamatorio, aunque el tipo de estímulo o los niveles de cada isoforma en un tejido en específico puede determinar que enzima participa más (Ricciotti y FitzGerald 2011). Además, una clave en la inflamación es el rol de los mecanismos de la ciclooxygenasas en estos procesos y es importante entender los mecanismos fisiológicos y patológicos de esta enzima en las funciones del cerebro (Yang y Chen 2008).

En procesos neuroinflamatorios, se libera aún más AA debido a citocinas o señalización glutaminérgica que aumentan la expresión de COX-2, lo que provoca sobreexpresión de síntesis de prostanoïdes. Además, diversos estímulos como daño a la membrana, estrés celular, desencadenan la expresión del gen de COX-2 (Rapoport 2008). Sin embargo, una liberación excesiva de glutamato provoca daño a las neuronas, esto quiere decir que en un proceso de inflamación crónica puede generar neurodegeneración debido a la toxicidad por glutamato (Yang y Chen 2008).

Experimentos realizados con inhibidores de COX-2 demostraron que hay afectación en la adquisición, consolidación y en la retención espacial de la memoria, sugiriendo que esta enzima tiene un papel importante en la plasticidad sináptica y cognición, esto es debido a que encuentra colocalizada con la proteína PSD-95, marcador postsináptico y de menor forma, con sinaptofisina, un marcador presináptico (Chen y Bazan 2005).

En un estado hiperglicémico y en procesos inflamatorios, los niveles de Ang II aumentan y tiene la capacidad para estimular la fosfolipasa A₂ a través del receptor AT₁, aumentando la síntesis de prostaglandinas, además en células del músculo liso se observó que incrementa los niveles del ARN mensajero de COX-2 (Green et al. 2012; Hu et al. 2002). Existen estudios que demuestran que existe una asociación entre el RAS y la expresión de COX-2, por ejemplo, la sobreexpresión del receptor pro-renina aumenta la expresión de COX-2 (Green et al. 2012). Las ERO's generadas en un estado hiperglicémico crónico incrementan la expresión de COX-2 en células endoteliales, afectando el proceso de dilatación y mejorando la contracción (Green et al. 2012; Hu et al. 2002; Retailleau et al. 2010). Los derivados prostanoïdes junto con los niveles altos de Ang II, contribuyen a lesiones en la vasculatura. Además, inhibiendo COX-2 con celecoxib se disminuyeron los marcadores de estrés oxidativo generados por la estimulación de Ang II (Pialoux et al. 2017). Estos datos indican que existe una relación entre COX-2 y Ang II debido a que incrementa la síntesis de prostanoïdes, generando procesos inflamatorios y aumento de ERO's, afectando a la circulación por daño a las células endoteliales, provocando deterioro en la unidad neurovascular.

MECANISMOS FISIOLÓGICOS PARA EL CONTROL GLICÉMICO

La homeostasis energética hace referencia a los diferentes procesos fisiológicos que gestionan la ingesta, almacenamiento y uso de energía para mantener niveles estables dentro del organismo. La molécula más utilizada es la glucosa, y existen diferentes elementos hormonales como neuronales que regulan su producción, así como su uso adecuado con el fin de mantener un balance en el SNC (Grayson et al. 2013).

Hipotálamo y Centros Nerviosos Que Modulan La Alimentación

El SNC es el encargado de mantener la homeostasis de la energía del cuerpo, y aunque todas las células del cuerpo requieren glucosa para su metabolismo, el cerebro es el órgano responsable en la regulación adecuada del mismo. En la regulación de la ingesta de alimentos, están involucradas tres áreas: el tronco encefálico, hipotálamo, y partes de la corteza cerebral (lóbulo frontal, el sistema límbico, entre otros). De estas áreas, el hipotálamo es el principal regulador de la alimentación y el metabolismo, debido a que recibe las señales provenientes del intestino como del tronco encefálico para modular la alimentación y gasto de energía. El hipotálamo se divide en cinco áreas que incluyen los núcleos arcuato (ARC), paraventricular (PVN), ventromedial (VMN), dorsomedial (DMN) y el área hipotalámica lateral (LHA), todos interconectados entre sí (Lenard y Berthoud 2008; Meek et al. 2016; Simpson et al. 2009; Timper y Bruning 2017).

El ARC es crítico en la regulación del metabolismo, debido a que se encuentra en una zona pobre en BHE, lo que le permite integrar las señales hormonales y metabólicas provenientes de la circulación periférica, y generar una respuesta de retroalimentación a través de las neuronas centrales y periféricas (Timper y Bruning 2017). Hay dos poblaciones de neuronas implicadas en la regulación de la alimentación, una de ellas incrementa la ingesta de alimentos y co-expresan el neuropéptido Y, además de la proteína AgRP. El segundo tipo de neuronas co-expresan el transcrito relacionado con la cocaína y anfetaminas (CART) y proopiomelanocortina (POMC), y su función es inhibir la ingesta de alimentos (Montiel-Herrera M et al., 2018). Los dos grupos de neuronas están en comunicación con las otras áreas hipotalámicas PVN, DMN, LHA relacionadas con la regulación del apetito (Simpson et al. 2009). La actividad de estas células reside en el cambio de energía constante que tiene el cuerpo y, por lo tanto, deben coordinar la liberación de hormonas, tasa de metabolismo, ingesta de alimentos, actividad locomotora, para que el cerebro mantenga concentraciones adecuadas de glucosa (Burdakov et al. 2005).

Estudios electrofisiológicos realizados en las áreas LHA y VMH demostraron que las neuronas presentan una alta sensibilidad a los cambios en la concentración de glucosa. Se encontró que presentaban alteraciones en la tasa de activación neuronal y en las concentraciones de Na^{1+} , K^{1+} y Ca^{2+} debido a variaciones de concentración (0.2 mM) de glucosa (Silver y Erecinska 1998). Aunque no todas las células presentan el mismo grado de sensibilidad, tienen la capacidad de responder a los cambios de glucosa en el cuerpo y por lo tanto, ser parte integral de la homeostasis del metabolismo (Silver y Erecinska 1998).

Todas las áreas del hipotálamo permanecen en estrecha comunicación para regular adecuadamente la ingesta de alimentos. Las neuronas del ARC se comunican con las del PVN que contienen la hormona liberadora de tirotrópina, implicada en el control del balance energético, contribuyendo en la ingesta de alimentos, así como en el gasto de energía. El PVN contiene neuronas sensibles a glucosa y recibe proyecciones del ARC. Las neuronas POMP del ARC activan a las del PVN a través del factor neutrófico derivado del cerebro para disminuir la ingesta de alimentos (Simpson et al. 2009).

Las neuronas dentro del LHA que reciben señales del ARC contienen varios neuropéptidos reguladores de alimentos que incluyen orexina, hormona de concentración de melanina, CART, neurotensina, histamina, además expresan receptores de leptina, y recibe información de las áreas cerebrales asociadas con la recompensa, la motivación, el aprendizaje, la memoria, y de las áreas del tronco cerebral (Simpson et al. 2009).

Las neuronas del ARC (POMC/CART) también se proyectan a una variedad de áreas adicionales. Por ejemplo, las neuronas POMC sensibles a la leptina se comunican con áreas del tronco encefálico asociadas con la respuesta a señales de saciedad (Lenard y Berthoud 2008; Simpson et al. 2009). Además, modelos animales knockout de los receptores de insulina y leptina en las neuronas POMC, deterioran la homeostasis de la glucosa y genera resistencia a la insulina (Timper y Bruning 2017).

Las señales homeostáticas del hipotálamo se integran con las provenientes de alimentación de circuitos mesolímbicos y señales de centros de toma de decisiones superiores como la amígdala, el hipocampo y la corteza prefrontal, así como del núcleo accumbens para regular la homeostasis energética (Lenard y Berthoud 2008; Simpson et al. 2009). Esto es importante debido a que el SNC tiene daño irreversible cuando es privado de glucosa, así que tiene sentido que el cerebro regule el metabolismo, comportamiento y garantice una concentración de glucosa adecuada para las neuronas (Burdakov et al. 2005).

Control Glicémico a Nivel Periférico

El páncreas participa en la regulación de la homeostasis del metabolismo por la liberación de diversas enzimas y hormonas. Además, conserva una concentración de glucosa de 4-6 mM en sangre principalmente a través de la secreción de insulina y glucagon (Figura 9)(Fox 2014; Grayson et al. 2013; Roder et al. 2016). La secreción de estas dos hormonas es regulada por el SN autónomo (Fox 2014; Roder et al. 2016).

Cuando hay una ingesta de alimentos, el intestino libera dos estimuladores de insulina antes de que se incremente la glucosa en sangre (hiperglicemia), el primero es el polipéptido tipo glucagon I (GLP-1) y el polipéptido insulínico dependiente de glucosa (GIP) (Fox 2014). Estas dos moléculas se unen a los receptores en las células β del páncreas para incrementar la secreción de insulina, por lo tanto, se inhibe la secreción de glucagon (Roder et al. 2016).

La insulina aumenta la síntesis de glucógeno, y cuando los depósitos se saturan, comienza la síntesis de grasa. Sin embargo, la insulina también puede actuar sobre el ARC del hipotálamo para inhibir la estimulación del nervio vago, y por lo tanto, la liberación de glucosa en el hígado. Además, GLP-1 suprime la glucogenólisis, secreción de glucagon y el apetito (Roder et al. 2016).

Por otro lado, durante el ayuno se reduce la secreción de insulina y aumenta la de glucagon. Este cambio en la secreción de hormonas tiene como resultado un incremento en la liberación de glucosa desde el hígado, debido a la glucogenólisis. Bajo esta condición fisiológica, se incrementa la estimulación de lipólisis y cetogénesis, lo que genera sustratos de energía diferentes para los distintos órganos, teniendo como consecuencia el uso de glucosa sólo por parte del cerebro (Fox 2014; Grayson et al. 2013; Roder et al. 2016).

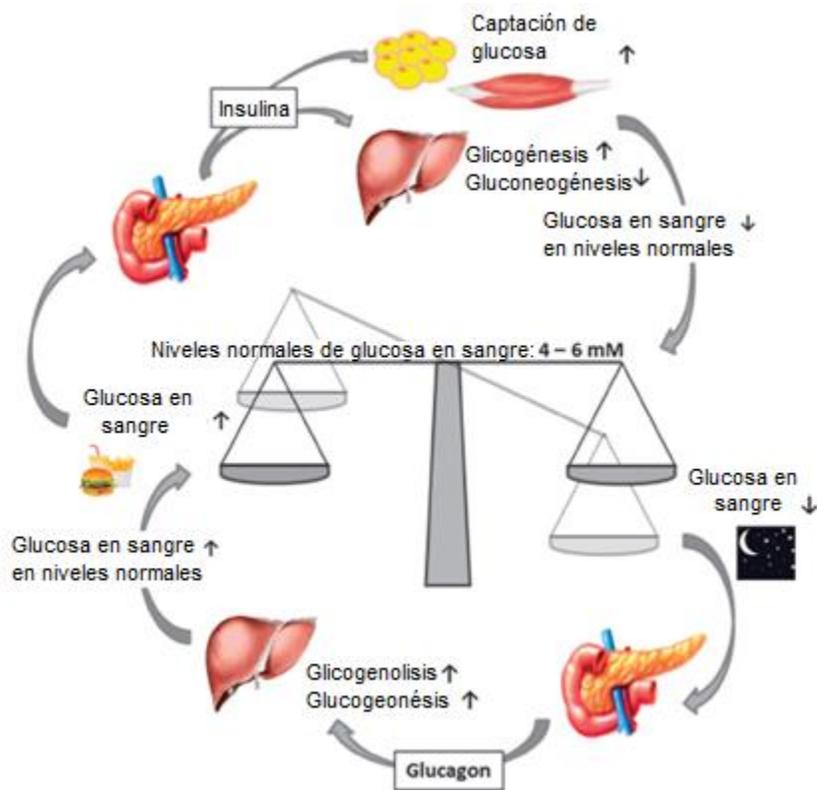


Figura 9. Regulación del metabolismo de glicemia (modificada de Roder et al. 2016).

Diabetes Mellitus Tipo I y II

La diabetes mellitus es una enfermedad crónico-degenerativa no transmisible que afecta anualmente a 382 millones de personas en el mundo y es una de las principales causas de muerte en México. En particular, en México se registran 11.9 millones de personas *diagnosticadas* con diabetes (9.4% de la población total) y en Sonora el 7.7% de la población tiene diabetes (ENSANUT, 2016).

La diabetes mellitus tipo 1 (DMT1) es una enfermedad autoinmune que surge a través de una interacción compleja de factores genéticos e inmunológicos. La producción de insulina está comprometida como resultado de una destrucción por el sistema inmune de las células β pancreáticas (Morran et al. 2015; van Belle et al. 2011). El comienzo de la enfermedad clínica representa la destrucción de casi todas las células (Morran et al. 2015; van Belle et al. 2011).

Hay tres tipos de anticuerpos conocidos que provocan la destrucción de las células β pancreáticas. Los primeros se llaman anticuerpos citoplasmáticos de células de islote que están presente en el 90% de los casos, anticuerpos superficiales de células de islotes dirigidos contra

antígenos de superficie y otro específico contra el ácido glutámico descarboxilasa, ambos descritos en los 80% de los casos (Ozougwu et al. 2013).

Los análisis genéticos de DMT1 han asociado al complejo HLA, principalmente los alelos de clase II, a la susceptibilidad de esta enfermedad (Morran et al. 2015; Ozougwu et al. 2013; van Belle et al. 2011). Se ha reportado que el gen AIRE (regulador autoinmune) proporciona protección contra trastornos autoinmunes, incluyendo DMT1, a través de su influencia en los mecanismos implicados en la tolerancia central de células T (Morran et al. 2015). La activación de las células T CD4+ parece ser un requisito previo absoluto para el desarrollo de la diabetes en todos los modelos animales de DMT1. Los clones de células T específicos de islotes CD4+ derivados de ratones diabéticos, cuando se inyectan en ratones pre diabéticos o no diabéticos, inducen destrucción de las células β , lo que conduce a la enfermedad. Las células T CD4+ son suficientes para inducir la destrucción de las células β , mientras que las células T CD8+ contribuyen a la gravedad del daño (Ozougwu et al. 2013).

La diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) es un síndrome caracterizado por hiperglicemia crónica resultado de la secreción insuficiente de insulina por las células β de los islotes pancreáticos, o por la incapacidad de la insulina secretada para estimular la captación glucosa (resistencia a la insulina), o ambas. La DMT2 puede ocasionar complicaciones como cetoacidosis, falla del riñón, enfermedades cardiovasculares, ceguera (van Belle et al. 2011). Además, es resultado de la interacción de la composición genética del sujeto y factores ambientales como obesidad, exceso de alimentación, falta de ejercicio, estrés y envejecimiento, entre otros (Leahy 2005). Estos factores afectan la función de las células β y la sensibilidad del músculo, hígado, páncreas y tejido adiposo a la insulina (Kohei 2010; Leahy 2005).

Existen varias causas de la resistencia a la insulina, por ejemplo, obesidad/sobrepeso, exceso de glucocorticoides, exceso de hormona del crecimiento, embarazo (diabetes gestacional), lipodistrofia, auto-anticuerpos para el receptor de insulina, mutaciones del receptor de insulina, entre otros (Fox 2014; Morran et al. 2015; Ozougwu et al. 2013). Además, se han encontrado anomalías genéticas que están implicadas en la patogénesis, incluidos genes mitocondriales, genes para el receptor de insulina y del metabolismo de la glucosa (Kohei 2010).

JUSTIFICACIÓN

La comunicación neurovascular es responsable de regular el suministro de oxígeno y nutrientes a todas sus células cerebrales a través de procesos de dilatación y contracción vascular, y existen pocos estudios de cómo un estadio de hiperglicemia crónica afecta a estas funciones. Adicionalmente, se ha observado que el sistema renina angiotensina incrementa su actividad en condiciones patológicas, además la literatura indica que este sistema participa en la fisiopatología de enfermedades como diabetes, y considerando que en México el 11% de la población padece esta enfermedad, es importante conocer la función de los receptores AT₁ y AT₂ en condiciones de hiperglicémicas y como afecta a la unidad neurovascular. Aunque en diversas áreas del sistema nervioso se han localizado los receptores AT₁ y AT₂ para Ang II, hay pocos estudios, acerca de la expresión de ambos receptores en el lóbulo frontal. El estudio de la expresión de receptores a Ang II en células cerebrales, en un estado diabético, generará nuevo conocimiento que podría ayudar a comprender mejor los efectos fisiopatológicos que genera la diabetes mellitus en el sistema nervioso central.

MATERIALES Y MÉTODOS

Todos los experimentos se realizaron de acuerdo con las normas oficiales nacionales para el buen uso y manejo de animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999) de acuerdo al dictamen favorable DMCS/CBIDMC/D-92 otorgado por el Comité de Bioética en Investigación del Departamento de Medicina y Ciencias de la Salud. Los experimentos se realizaron en los laboratorios de investigación del Departamento de Medicina y Ciencias de la Salud, localizados en la planta baja del edificio 7D de la Universidad de Sonora. Se utilizaron ratas de la cepa Wistar de 0 a 14 días de edad del Bioterio del Departamento de Medicina y Ciencias de la Salud ubicado en la planta alta del edificio 7D de la Universidad de Sonora. Los animales estuvieron sujetos a ciclos de luz-oscuridad de 12 h y alimentados *ad libitum*.

Inducción de Hiperglicemia con Estreptozotocina

Para inducir la hiperglicemia (HG>300 mg de glucosa/dL de sangre) en nuestro modelo animal, se siguió el protocolo descrito por Nagayach et al. 2014. Brevemente, un grupo de 10 ratas (P4-P5) se dejó en ayuno por 12 h. De acuerdo a su peso registrado, de manera intraperitoneal y en oscuridad, individualmente se les administraron 60 mg de estreptozotocina (STZ) por kg de peso disuelta en 0.9% NaCl. Finalmente, se dejó que la STZ se metabolizara 1 h y los animales se regresaron al Bioterio con su madre biológica. Cuatro días después de la inyección de STZ, utilizando un glucómetro (Accu-Chek) se registró la concentración de glucosa en sangre a través de la colecta de una muestra de sangre de la cola de la rata. Las ratas que registraban >300 mg de glucosa/dL de sangre se consideraron hiperglicémicas (Graham et al. 2011). Adicionalmente, las ratas que indicaban una concentración <300 mg de glucosa/dL, se les suministró otra dosis igual a la anterior de STZ. Tres días después de la segunda inyección de STZ, se volvió a registrar la concentración de glucosa en sangre y aquellos animales considerados hiperglicémicos se utilizaron para realizar cultivos celulares primarios de lóbulo frontal. Todo aquel animal que registró valores <300 mg de glucosa/dL de sangre quedó descartado para futuros experimentos.

Cultivos Celulares Primarios del Lóbulo Frontal de la Rata

Para realizar los cultivos celulares primarios se utilizaron ratas de la cepa Wistar posnatal 0-3 días (P0-P3) y P10-14 para cultivos normoglicémicos e hiperglicémicos, respectivamente. Los

animales se eutanizaron, inyectándoles pentobarbital sódico intraperitoneal (120 mg/kg) para después decapitarlos. Inmediatamente, a cada animal se le extrajo el cerebro (<1 min) con material de disección, se colectó el lóbulo frontal para colocarlo en una caja Petri de vidrio con solución Ringer fría (4-8°C). A continuación, dentro de una campana de flujo laminar (LABCONCO) previamente esterilizada y utilizando jeringas de insulina, en un tubo de 1.6 mL se cortaron trozos pequeños de tejido para facilitar su disociación mecánica inmersos en 1 mL de medio Neurobasal (NB). Utilizando una pipeta Pasteur de vidrio (previamente tratada con sigmacote) suavemente se succionaron y se arrojaron los trozos de tejido al menos 20 veces para maximizar su disociación. La solución se dejó sedimentar durante 10 min y en seguida, se depositaron cinco gotas de ésta en la superficie de un cubreobjetos de vidrio (tratado con poli-L-ornitina) colocado dentro de una caja Petri de 35 mm estéril. Finalmente, después de 5 min de sedimentación, se agregaron 2 mL de medio de cultivo NB-SFB de la siguiente composición: 8.9 mL de NB, 1 mL de suero fetal bovino (SFB), 100 µL de antibióticos (penicilina-estreptomicina). El cultivo celular se colocó en una incubadora (New Brunswick, Eppendorf Company, Galaxy 48S) a 37°C y 5% CO₂ en atmosfera húmeda. El medio de cultivo se cambió cada primer y tercer día, hasta su utilización para los experimentos.

Con el fin de conocer si la estimulación directa con Ang II incrementaba la expresión de los receptores AT₁ y AT₂, se agregó Ang II 10 µM (disuelta en solución Ringer temperada) durante 30 minutos a cultivos celulares primarios del lóbulo frontal. Posteriormente, se le extrajo el RNA total (ver más adelante).

Con la fin de conocer que receptores para Ang II expresaban los astrocitos del lóbulo frontal, se procedió a estimular con el factor de crecimiento G5 a cultivos primarios del lóbulo frontal normoglicémico.

Biología Molecular: Retrotranscripción-Reacción de Polimerasa en Cadena (RT-PCR)

El ARN total se extrajo de los cultivos celulares primarios del lóbulo frontal de la rata de acuerdo al procedimiento descrito por el proveedor (Direct-zol RNA MiniPrep R5020) (Anexo 5). Para la síntesis del DNA complementario se utilizaron oligonucleótidos aleatorios con la retrotranscriptasa del virus de leucemia murina (RT-M-MLV) (Anexo 6). Posteriormente, haciendo uso de la reacción en cadena de la polimerasa se amplificó el cDNA por 35 ciclos en un termociclador C1000 (Bio-Rad) usando secuencias de oligonucleótidos de interés (Tabla 1) y usando SYBR DNA Gel Stain se detectaron los productos de PCR en electroforesis de agarosa

2% con una tensión de 90 V durante 40 min. Finalmente, el gel se colocó dentro del equipo WiseDoc WGD-30 (Wisd) acoplada a una cámara digital y utilizando el software Wise Capture II se fotodocumentaron los resultados que representan al menos 2 repeticiones experimentales. Para semicuantificar la concentración del amplicón obtenido, utilizando el programa de libre acceso Fiji-ImageJ (<https://fiji.sc>), se registró como referencia la intensidad de la banda de 500 pares de bases de concentración conocida, se comparó con la intensidad del amplicón de interés, y se reporta como porcentaje (%) de acuerdo a la siguiente relación matemática: donde $I_{\text{amplicón}} =$ intensidad del amplicón de interés $I_{500 \text{ pb}}$, intensidad de la banda de 500 pares de base (Anexo 7).

Tabla 1. Características de los oligonucleótidos experimentales

Nombre	Secuencia ID	Secuencias (S, sentido; AS, antisentido) en dirección 5'-3'	Pares de bases
COX-2	NM_017232.3	S: CCCTGCTGGTGGAAAAGCCTCGTCC AS: TACTGTAGGGTTAATGTCATCTAG	263
AT ₁	NM_031009.2	S: ATGCCAGTGTGTTTCTGCTC AS: AACTCAACACTCCCCATTGG	244
AT ₂	NM_012494.3	S: CAGTGGTCTGCTGGGATTGC AS: CCATCCAGGTCAGAGCATCC	238

RESULTADOS

Cultivos Celulares Primarios del Lóbulo Frontal de la Rata Normo e Hiperglicémica

Los cultivos celulares primarios del lóbulo frontal normoglicémico se realizaron con ratas posnatales de 0-3 días de edad (P0-P3). Después del primer día de cultivo, las células mostraron al menos una proyección del soma celular. Las células en cultivo presentaron $9.5 \pm 0.25 \mu\text{m}$ de diámetro ($n = 58$), diferentes morfologías ovoides y un incremento en las proyecciones del soma celular hacia las células adyacentes (Figura 10A). Sin embargo, los cultivos celulares primarios del lóbulo frontal hiperglicémico presentaron un soma celular más pequeño ($4.9 \pm 0.18 \mu\text{m}$; $n = 58$) y un menor número de proyecciones celulares (Figura 10B).

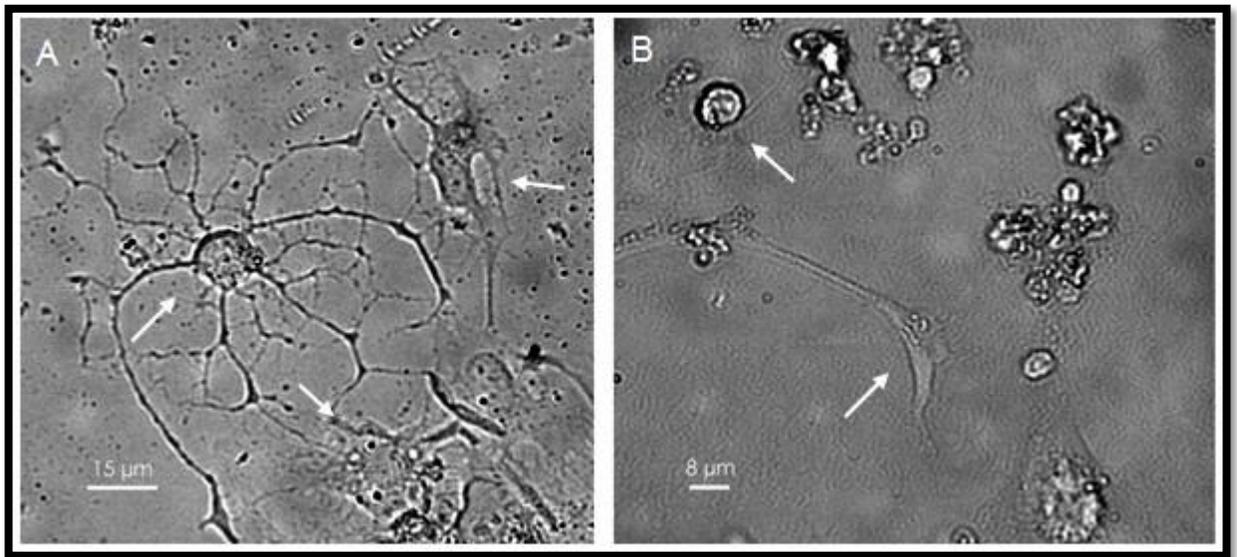


Figura 10. Células en cultivo del lóbulo frontal normoglicémico (A) e hiperglicémico (B). Las flechas señalan los somas celulares. Barra de calibración 15 y 8 μm , respectivamente.

Expresión de los Transcritos COX-2 y de Receptores AT₁ y AT₂ en Cultivos Celulares Primarios del Lóbulo Frontal de la Rata Normo e Hiperglicémica

Las células cultivadas del lóbulo frontal expresaron transcritos para COX-2 en condiciones normoglicémicas y asimismo, los cultivos celulares primarios estimulados por 30 min con $10 \mu\text{M}$ de Ang II. Sin embargo, las células estimuladas con Ang II expresaron $\sim 23\%$ más transcritos de

COX-2. Los cultivos celulares primarios normoglicémicos y estimulados con Ang II no expresaron transcritos de los receptores AT₁ y AT₂ (Figura 11).

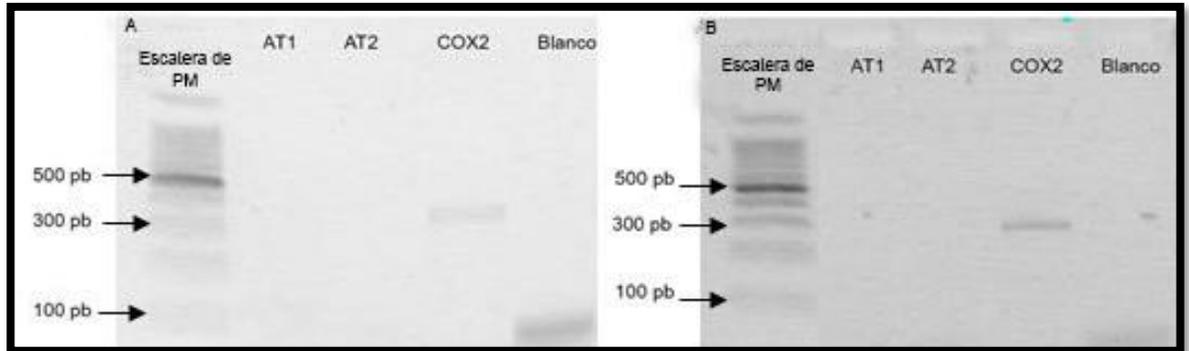


Figura 11. Expresión de los amplicones de AT₁, AT₂ y COX-2 de cultivos celulares primarios (A) normoglicémicos (n = 4) y (B) estimulados con 10 μ M Ang II/ 30 min (n = 6) . PM = Peso molecular.

Expresión de los Transcritos COX-2 y de Receptores AT₁ y AT₂ en Cultivos Celulares Primarios del Lóbulo Frontal de la Rata Normoglicémica Estimulados con Factor de Crecimiento G5

Inicialmente, los cultivos celulares primarios de tejido normoglicémico se dejaron desarrollar por 3-5 días de cultivo. Posteriormente se cambió el medio de cultivo por medio suplementado con el factor de crecimiento G5, para la proliferación específica de astrocitos (Michler-Stuke et al. 1984; Montiel-Herrera et al. 2006). Los cultivos celulares primarios de astrocitos del lóbulo frontal expresaron transcritos únicamente para el receptor AT₂ (Figura 12).

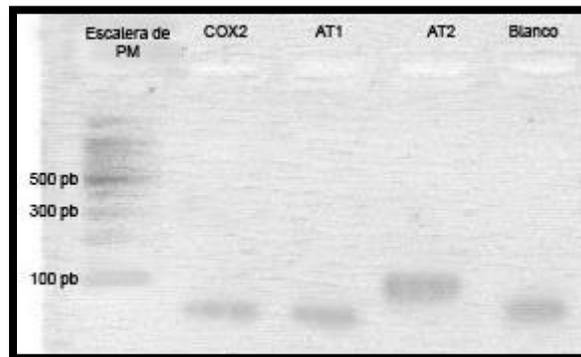


Figura 12. Expresión de los amplicones de AT₁, AT₂ y COX-2 de astrocitos del lóbulo frontal (n = 2). PM = Peso molecular.

En cambio, los cultivos celulares primarios del lóbulo frontal hiperglicémico expresaron transcritos para COX-2 y para el receptor AT₂ (Figura 13), sugiriendo que los niveles de glucosa en sangre afectan en la expresión del receptor AT₂. Comparando los resultados anteriores normo/hiperglicémicos, se observó una disminución de la expresión de COX-2 de ~15% en las células cultivadas del tejido hiperglicémico.

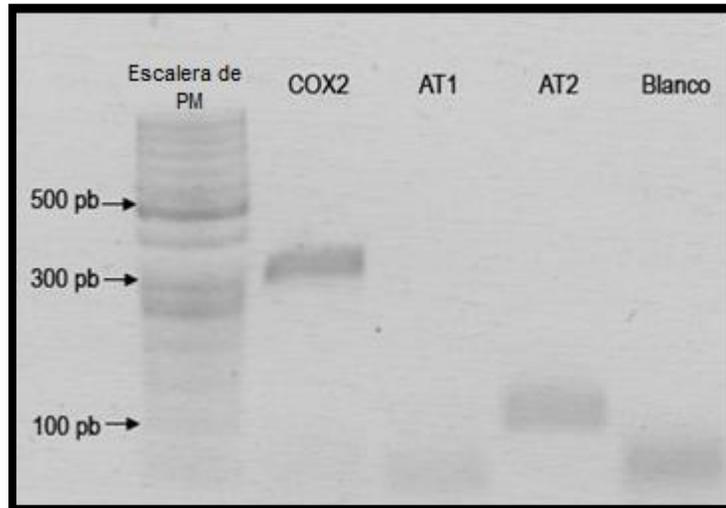


Figura 13. Expresión de los amplicones de AT₁, AT₂ y COX-2 de cultivos celulares primarios hiperglicémicos (n = 4). PM = Peso molecular.

DISCUSIÓN

Los cultivos celulares primarios del lóbulo frontal normoglicémicos presentaron, inicialmente, una o dos proyecciones del soma celular desde los primeros días, principalmente desde el día uno o dos de cultivo. La morfología macroscópica de cultivos primarios de neuronas corticales y de hipocampo, también presentan características morfológicas similares desde los primeros días de cultivo (Kriegstein y Dichter 1983). Además, se encontró que después de los 10 días de cultivo, las células presentaron proyecciones celulares con morfologías diversas y patrones de orientación hacia células vecinas, sugiriendo una comunicación celular activa como se ha evidenciado en estudios de ondas de calcio registradas en cultivos celulares (Dotti et al. 1988; Kettenmann y Ransom 2013; Ray et al. 2009).

Las células cultivadas del lóbulo frontal hiperglicémico mostraron una disminución en el soma celular y en la cantidad de proyecciones, en comparación con las células normoglicémicas. Estos datos concuerdan con experimentos realizados con neuronas corticales, las cuales presentan un menor tamaño físico (medido a través la relación ADN/peso húmedo del cerebro y cantidad de proteína/DNA) (Malone et al. 2008; Malone et al. 2006b). Cabe señalar, que existen estudios que indican que las células con el soma disminuido presentan una cantidad de proteína, ácidos nucleicos y colesterol bajos (Malone et al. 2006a). Adicionalmente, otros estudios realizados en cultivos celulares del hipocampo, en donde las células se expusieron a distintas concentraciones de glucosa, se registró una disminución en la viabilidad celular, en el número de dendritas y sinapsis (Liu et al. 2014), lo cual sugiere un déficit en la comunicación celular. En particular se conoce que estos tipos de alteraciones generan cambios en la plasticidad sináptica que conduce a la pérdida de diversas funciones celulares (Malone et al. 2008). Por ejemplo, estudios inmunohistoquímicos realizados en tejido de hipocampo de ratas hiperglicémicas (inyectadas con estreptozotocina (Nagayach et al. 2014) se incrementó la muerte neuronal en las regiones CA1, CA2, CA3 y DG mediado por la activación de caspasa-3.

La hiperglicemia crónica desencadena diferentes vías bioquímicas que inducen disfunción celular como la pérdida de dendritas que afecta a la plasticidad sináptica, reducción del soma y eventualmente la muerte celular. Adicionalmente, la deficiencia de insulina en el modelo animal con estreptozotocina genera daños en el cerebro, como resultado de la falta de insulina provocando cambios en la composición del citoesqueleto y pérdida de neuronas mediado por vías de señalización de MAPK y fosfatidilinositol-3 cinasa (PI3K) (Gaspar et al. 2016). Además, en animales inyectados con estreptozotocina se ha descrito que se reduce la densidad y la longitud

de dendritas en el hipocampo generado por estrés oxidativo, principalmente por ERO's y especies reactivas de nitrógeno (Gaspar et al. 2016).

Los resultados obtenidos en este trabajo podrían ser derivados de mecanismos celulares apoptóticos desencadenados por el alto nivel de glucosa en sangre como se ha reportado en cultivos celulares primarios de lóbulo frontal (Nagayach et al. 2014).

La expresión basal de COX-2 se ha encontrado en la corteza cerebral, hipocampo y cerebelo, sugiriendo que tiene expresión constitutiva en esas regiones cerebrales, pero no en glía o células endoteliales, donde su expresión es inducible (Strauss 2008). Considerando este dato, la expresión de COX-2 en cultivos celulares primarios del lóbulo frontal de la rata pudiera ser debida, principalmente, a la presencia de neuronas.

La Ang II estimula la activación de la fosfolipasa A₂ a través del receptor AT₁, aumentando la síntesis de prostaglandinas, además en células del músculo liso incrementa los niveles del ARN mensajero de COX-2 (Green et al. 2012; Hu et al. 2002). Además hay estudios que demuestran que hay una asociación entre RAS y la expresión de COX-2 (Green et al. 2012). Sin embargo, es posible que los niveles de expresión del receptor AT₁ hayan sido indetectables por esta técnica, y por otro lado, la catálisis de Ang II a otras angiotensinas que interactúan con COX-2 podrían explicar el ligero incremento. Por ejemplo, se ha encontrado que el cerebro contiene todos los componentes de la vía ECA2/Angiotensina-(1-7)/Receptor Mas (Bennion et al. 2015; Xia y Lazartiques 2008). La angiotensina-(1-7) promueve la liberación de prostanoides cuando se une a su receptor Mas en neuronas, células endoteliales y células del músculo liso (Albrecht 2007; Muthalif et al. 1998; Santos et al. 2000; Santos et al. 2013). La unión al receptor Mas provoca la liberación de ácido araquidónico por la activación de la CaM cinasa II que a través de la vía MAPK mejora la actividad de la fosfolipasa A₂ (Albrecht 2007; Muthalif et al. 1998; Singh y Karnik 2016), que posteriormente es metabolizado por COX-2. Además, la angiotensina-(1-7) incrementa los niveles de COX-2 cuando hay actividad neuronal (Albrecht 2007). Estos datos sugieren que la síntesis de angiotensina-(1-7) puede inducir aumentos en la expresión de COX-2 y podría ser un mecanismo celular que explique los hallazgos encontrados en este estudio.

La expresión de RAS no está limitado a las áreas que controlan las funciones cardiovasculares. Los receptores para Ang II se han detectado en diversas areas como la corteza cerebral, hipocampo, nervio óptico, cerebelo, núcleo olfatorio y cuerpo calloso (Fogarty y Matute 2001). La mayoría de los efectos fisiológicos de Ang II en el cerebro han sido estudiados en neuronas. Sin embargo, hay estudios que han demostrado la presencia de los receptores de Ang II en astrocitos (Fogarty y Matute 2001; Montiel-Herrera et al. 2006).

Los astrocitos son la principal fuente de angiotensinogeno en el cerebro, además expresan ambos receptores para Ang II. Esto sugiere que tiene implicación en las funciones de RAS (Fogarty y Matute 2001; Kandalam et al. 2012). En distintas áreas del cerebro se ha encontrado diversidad en cuanto a la expresión de los receptores para Ang II, por ejemplo, en el tronco encefálico y cerebelo hay mayor expresión del receptor AT_1 (Clark y Gonzalez 2007; Kandalam et al. 2012); en la materia blanca de ratas adultas se encontraron ambos receptores (Fogarty y Matute 2001); en el cuerpo estriado de ratas y monos existe mayor expresión del receptor AT_1 que de AT_2 (Garrido-Gil et al. 2017). Los cultivos primarios de astrocitos del lóbulo frontal presentaron los transcritos para el receptor AT_2 (Figura 13), dato que concuerda con cultivos celulares de astrocitos humanos (Jaiswal et al. 1991) y de ratones P1-P3 de la corteza cerebral, aunque en ambos casos, se encontró la expresión de AT_1 y AT_2 (Park et al. 2013).

La expresión del receptor AT_2 puede sugerir diversas funciones en los cultivos celulares. Los astrocitos liberan diferentes neurotrofinas, quimiocinas, citocinas bajo diferentes condiciones fisiológicas que promueven proliferación, diferenciación y migración de neuronas (Luo et al. 2017). En neuronas y células gliales del cerebelo, la activación del receptor AT_2 induce el crecimiento de neuritas y la migración celular (Cote et al. 1999; Guimond y Gallo-Payet 2012a). En microexplantes de retina se encontró que la activación del receptor promueve la regeneración y migración celular (Guimond y Gallo-Payet 2012a; Lucius et al. 1998). Debido a que el receptor AT_2 puede regular el crecimiento de diferentes tipos celulares, incluidos astrocitos, y considerando que estas últimas células poseen los componentes de RAS, es posible que Ang II sirva de manera autocrina o paracrina, promoviendo el adecuado desarrollo de las células del cerebro (Fogarty y Matute 2001).

Existen pocos estudios a nivel cerebral que demuestran que la hiperglicemia crónica aumenta la expresión de receptores para Ang II. En ratas diabéticas se encontró un aumento en la síntesis de Ang II en el cerebro y cerebelo (Tota et al. 2012; Vargas et al. 2012), mientras que en retinas de sujetos diabéticos hay aumentos en la expresión de los receptores AT_1 y AT_2 junto con niveles aumentados de Ang II (Senanayake et al. 2007). En ratas tratadas con estreptozotocina se encontró un incremento en la actividad y ARNm de ECA y renina, sugiriendo que la concentración elevada de Ang II es debido a este fenómeno (Giacchetti et al. 2005; Tota et al. 2012).

En este sentido, este trabajo amplió el conocimiento acerca de como la hiperglicemia crónica aumenta la expresión de los receptores a Ang II en una región del cerebro que no había sido estudiada previamente. Sin embargo, se necesitan realizar estudios a nivel fisiológico para

comprender como esta patología influye en la expresión de los receptores AT_1 y AT_2 para Ang II tanto en astrocitos como en neuronas.

CONCLUSIONES

- Se generó un modelo murino hiperglicémico por inyección de estreptozotocina.
- Los cultivos celulares primarios del lóbulo frontal ratas hiperglicémicas fueron viables.
- La hiperglicemia crónica generó en los cultivos celulares primarios del lóbulo frontal la expresión del receptor AT₂.
- Los cultivos primarios de astrocitos del lóbulo frontal expresaron transcritos para el receptor AT₂.

Referencias bibliográficas:

- Adeeb N, Deep A, Griessenauer CJ, Mortazavi MM, Watanabe K, Loukas M, Tubbs RS, Cohen-Gadol AA. 2013a. The intracranial arachnoid mater : A comprehensive review of its history, anatomy, imaging, y pathology. *Childs Nerv Syst.* 29(1):17-33.
- Adeeb N, Mortazavi MM, Deep A, Griessenauer CJ, Watanabe K, Shoja MM, Loukas M, Tubbs RS. 2013b. The pia mater: A comprehensive review of literature. *Childs Nerv Syst.* 29(10):1803-1810.
- Adeeb N, Mortazavi MM, Tubbs RS, Cohen-Gadol AA. 2012. The cranial dura mater: A review of its history, embryology, y anatomy. *Childs Nerv Syst.* 28(6):827-837.
- Akhtar MW, Sanz-Blasco S, Dolatabadi N, Parker J, Chon K, Lee MS, Soussou W, McKercher SR, Ambasadhan R, Nakamura T et al. 2016. Elevated glucose y oligomeric beta-amyloid disrupt synapses via a common pathway of aberrant protein s-nitrosylation. *Nat Commun.* 7:10242.
- Akinola OB, Biliaminu SA, Adediran RA, Adeniyi KA, Abdulquadir FC. 2015. Characterization of prefrontal cortex microstructure y antioxidant status in a rat model of neurodegeneration induced by aluminium chloride y multiple low-dose streptozotocin. *Metab brain dis. United States.* p. 1531-1536.
- Albrecht D. 2007. Angiotensin-(1-7)-induced plasticity changes in the lateral amygdala are mediated by cox-2 y no. *Learn Mem.* 14(3):177-184.
- Bahlmann J, Aarts E, D'Esposito M. 2015. Influence of motivation on control hierarchy in the human frontal cortex. *The Journal of Neuroscience.* 35(7):3207-3217.
- Balakumar P, Jagadeesh G. 2014. Structural determinants for binding, activation, y functional selectivity of the angiotensin at1 receptor. *J mol endocrinol. England: 2014 Society for Endocrinology.* p. R71-92.
- Bazan NG. 2005. Lipid signaling in neural plasticity, brain repair, y neuroprotection. *Mol Neurobiol.* 32(1):89-103.
- Belanger M, Allaman I, Magistretti PJ. 2011. Brain energy metabolism: Focus on astrocyte-neuron metabolic cooperation. *Cell Metab.* 14(6):724-738.
- Bennion DM, Haltigan E, Regenhardt RW, Steckelings UM, Sumners C. 2015. Neuroprotective mechanisms of the ace2-angiotensin-(1-7)-mas axis in stroke. *Curr Hypertens Rep.* 17(2):3.
- Berry C, Touyz R, Dominiczak AF, Webb RC, Johns DG. 2001. Angiotensin receptors: Signaling, vascular pathophysiology, y interactions with ceramide. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 281(6):H2337-2365.
- Bloch S, Obari D, Girouard H. 2015. Angiotensin y neurovascular coupling: Beyond hypertension. *Microcirculation.* 22(3):159-167.
- Burdakov D, Luckman SM, Verkhratsky A. 2005. Glucose-sensing neurons of the hypothalamus. *Philos trans r soc lond b biol sci. London.* p. 2227-2235.
- Chen C, Bazan NG. 2005. Lipid signaling: Sleep, synaptic plasticity, y neuroprotection. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 77(1-4):65-76.
- Chen J, Chen W, Zhu M, Zhu Y, Xu P, Miao C. 2015. Angiotensin ii-induced mouse hippocampal neuronal ht22 cell apoptosis was inhibited by propofol: Role of neuronal nitric oxide synthase y metallothionein-3. *Neuroscience.* 305:117-127.
- Chrysant SG. 2007. The pathophysiologic role of the brain renin-angiotensin system in stroke protection: Clinical implications. *J Clin Hypertens (Greenwich).* 9(6):454-459.
- Clark MA, Gonzalez N. 2007. Angiotensin ii stimulates rat astrocyte mitogen-activated protein kinase activity y growth through egf y pdgf receptor transactivation. *Regul Pept.* 144(1-3):115-122.

- Cote F, Do TH, Laflamme L, Gallo JM, Gallo-Payet N. 1999. Activation of the at(2) receptor of angiotensin ii induces neurite outgrowth y cell migration in microexplant cultures of the cerebellum. *J Biol Chem.* 274(44):31686-31692.
- Culman J, Blume A, Gohlke P, Unger T. 2002. The renin-angiotensin system in the brain: Possible therapeutic implications for at(1)-receptor blockers. *J Hum Hypertens.* 16 Suppl 3:S64-70.
- de Kloet AD, Krause EG, Woods SC. 2010. The renin angiotensin system y the metabolic syndrome. *Physiol Behav.* 100(5):525-534.
- De Silva TM, Faraci FM. 2012. Effects of angiotensin ii on the cerebral circulation: Role of oxidative stress. *Front Physiol.* 3.
- Dorostkar MM, Boehm S. 2008. Presynaptic Ionotropic receptors. In: Südhof TC, Starke K, editors. *Pharmacology of neurotransmitter release.* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. p. 479-527.
- Dotti CG, Sullivan CA, Banker GA. 1988. The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *J Neurosci.* 8(4):1454-1468.
- Ergul A, Valenzuela JP, Fouda AY, Fagan SC. 2015. Cellular connections, microenvironment y brain angiogenesis in diabetes: Lost communication signals in the post-stroke period. *Brain Res.* 1623:81-96.
- Escartin C, Rouach N. 2013. Astroglial networking contributes to neurometabolic coupling. *Frontiers in Neuroenergetics.* 5(4).
- Estato V, Obadia N, Carvalho-Tavares J, Freitas FS, Reis P, Castro-Faria Neto H, Lessa MA, Tibirica E. 2013. Blockade of the renin-angiotensin system improves cerebral microcirculatory perfusion in diabetic hypertensive rats. *Microvasc res.* United States: 2013 Elsevier Inc. p. 41-49.
- Evans J, Summers C, Gelband CH. 2001. Receptor transduction mechanisms.
- Felipe B, Aníbal A, Paz MM, Maite C. 2012. Brain energy metabolism in health y disease. In: InTeach, editor. *Neuroscience - dealing with frontiers.*
- Fogarty DJ, Matute C. 2001. Angiotensin receptor-like immunoreactivity in adult brain white matter astrocytes y oligodendrocytes. *Glia.* 35(2):131-146.
- Fox SI. 2014. *Fisiología humana (13a. Ed.).* McGraw Hill Mexico.
- Gallo-Payet N, Guimond MO, Bilodeau L, Wallinder C, Alterman M, Hallberg A. 2011. Angiotensin ii, a neuropeptide at the frontier between endocrinology y neuroscience: Is there a link between the angiotensin ii type 2 receptor y alzheimer's disease? *Front Endocrinol (Lausanne).* 2:17.
- Garrido AM, Griendling KK. 2009. NADPH oxidases y angiotensin ii receptor signaling. *Mol Cell Endocrinol.* 302(2):148-158.
- Garrido-Gil P, Rodriguez-Perez AI, Fernandez-Rodriguez P, Lanciego JL, Labandeira-Garcia JL. 2017. Expression of angiotensinogen y receptors for angiotensin y prorenin in the rat y monkey striatal neurons y glial cells. *Brain Struct Funct.* 222(6):2559-2571.
- Gaspar JM, Baptista FI, Macedo MP, Ambrosio AF. 2016. Inside the diabetic brain: Role of different players involved in cognitive decline. *ACS Chem Neurosci.* 7(2):131-142.
- Gendron L, Payet MD, Gallo-Payet N. 2003. The angiotensin type 2 receptor of angiotensin ii y neuronal differentiation: From observations to mechanisms. *J Mol Endocrinol.* 31(3):359-372.
- Giacchetti G, Sechi LA, Rilli S, Carey RM. 2005. The renin-angiotensin-aldosterone system, glucose metabolism y diabetes. *Trends Endocrinol Metab.* 16(3):120-126.
- Graham ML, Janecek JL, Kittredge JA, Hering BJ, Schuurman HJ. 2011. The streptozotocin-induced diabetic nude mouse model: Differences between animals from different sources. *Comp med.* p. 356-360.
- Grayson BE, Seeley RJ, Sandoval DA. 2013. Wired on sugar: The role of the CNS in the regulation of glucose homeostasis. *Nat Rev Neurosci.* 14(1):24-37.
- Green T, Gonzalez AA, Mitchell KD, Navar LG. 2012. The complex interplay between cyclooxygenase-2 y angiotensin ii in regulating kidney function. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 21(1):7-14.

- Guimond M-O, Gallo-Payet N. 2012a. How does angiotensin at2 receptor activation help neuronal differentiation y improve neuronal pathological situations? *Frontiers in Endocrinology*. 3(164).
- Guimond MO, Gallo-Payet N. 2012b. The angiotensin ii type 2 receptor in brain functions: An update. *Int J Hypertens*. 2012:351758.
- Haines DE. 2013. *Principios de neurociencia: Aplicaciones básicas y clínicas*. Elsevier Health Sciences Spain.
- Haspula D, Clark MA. 2016. Heterologous regulation of the cannabinoid type 1 receptor by angiotensin ii in astrocytes of spontaneously hypertensive rats. *J Neurochem*. 139(4):523-536.
- Howarth C. 2014. The contribution of astrocytes to the regulation of cerebral blood flow. *Frontiers in Neuroscience*. 8(103).
- Hu ZW, Kerb R, Shi XY, Wei-Lavery T, Hoffman BB. 2002. Angiotensin ii increases expression of cyclooxygenase-2: Implications for the function of vascular smooth muscle cells. *J Pharmacol Exp Ther*. 303(2):563-573.
- Huang Y, Thathiah A. 2015. Regulation of neuronal communication by g protein-coupled receptors. *FEBS Lett*. 589(14):1607-1619.
- Iadecola C. 2010. The overlap between neurodegenerative y vascular factors in the pathogenesis of dementia. *Acta Neuropathol*. 120(3):287-296.
- Jaiswal N, Tallant EA, Diz DI, Khosla MC, Ferrario CM. 1991. Subtype 2 angiotensin receptors mediate prostaglandin synthesis in human astrocytes. *Hypertension*. 17(6 Pt 2):1115-1120.
- Jiang M, Bajpayee NS. 2009. Molecular mechanisms of go signaling. *Neurosignals*. Allschwilerstrasse 10, P.O. Box · Postfach · Case postale, CH-4009, Basel, Switzerland · Schweiz · Suisse, Phone: +41 61 306 11 11, Fax: +41 61 306 12 34, karger@karger.ch. p. 23-41.
- Kandalam U, Palanisamy M, Clark MA. 2012. Angiotensin ii induces cell growth y il-6 mrna expression through the jak2-stat3 pathway in rat cerebellar astrocytes. *Jakstat*. p. 83-89.
- Kandel E, Schwartz J, Jessell T, Siegelbaum S, Hudspeth AJ. 2014. *Principios de neurociências - 5.Ed.* AMGH Editora.
- Kawamura T, Umemura T, Hotta N. 2012. Cognitive impairment in diabetic patients: Can diabetic control prevent cognitive decline? *J diabetes investig*. p. 413-423.
- Kettenmann H, Ransom BR. 2013. *Neuroglia*. OUP USA.
- Koehler RC, Roman RJ, Harder DR. 2009. Astrocytes y the regulation of cerebral blood flow. *Trends Neurosci*. 32(3):160-169.
- Kolb B, Mychasiuk R, Muhammad A, Li Y, Frost DO, Gibb R. 2012. Experience y the developing prefrontal cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 109(Suppl 2):17186-17193.
- Kriegstein AR, Dichter MA. 1983. Morphological classification of rat cortical neurons in cell culture. *J Neurosci*. 3(8):1634-1647.
- Krstic RV. 2013. *Human microscopic anatomy: An atlas for students of medicine y biology*. Springer Berlin Heidelberg.
- Lacroix A, Toussay X, Anenberg E, Lecrux C, Ferreiros N, Karagiannis A, Plaisier F, Chausson P, Jarlier F, Burgess SA et al. 2015. Cox-2-derived prostaglandin e2 produced by pyramidal neurons contributes to neurovascular coupling in the rodent cerebral cortex. *J Neurosci*. 35(34):11791-11810.
- Lalo U, Pankratov Y, Parpura V, Verkhratsky A. 2011. Ionotropic receptors in neuronal-astroglial signalling: What is the role of "Excitable" Molecules in non-excitable cells. *Biochim Biophys Acta*. 1813(5):992-1002.
- Lenard NR, Berthoud HR. 2008. Central y peripheral regulation of food intake y physical activity: Pathways y genes. *Obesity (Silver Spring)*. 16 Suppl 3:S11-22.
- Lenkei Z, Palkovits M, Corvol P, Llorens-Cortes C. 1997. Expression of angiotensin type-1 (at1) y type-2 (at2) receptor mrnas in the adult rat brain: A functional neuroanatomical review. *Front Neuroendocrinol*. 18(4):383-439.

- Li S, Wong AHC, Liu F. 2014. Ligand-gated ion channel interacting proteins y their role in neuroprotection. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 8(125).
- Li W, Maloney RE, Aw TY. 2015. High glucose, glucose fluctuation y carbonyl stress enhance brain microvascular endothelial barrier dysfunction: Implications for diabetic cerebral microvasculature. *Redox Biol*. 5:80-90.
- Liu D, Zhang H, Gu W, Zhang M. 2014. Effects of exposure to high glucose on primary cultured hippocampal neurons: Involvement of intracellular ros accumulation. *Neurol Sci*. 35(6):831-837.
- Lucius R, Gallinat S, Rosenstiel P, Herdegen T, Sievers J, Unger T. 1998. The angiotensin ii type 2 (at(2)) receptor promotes axonal regeneration in the optic nerve of adult rats. *J Exp Med*. 188(4):661-670.
- Luo L, Guo K, Fan W, Lu Y, Chen L, Wang Y, Shao Y, Wu G, Xu J, Lü L. 2017. Niche astrocytes promote the survival, proliferation y neuronal differentiation of co-transplanted neural stem cells following ischemic stroke in rats. *Exp ther med*. p. 645-650.
- Malone JI, Hanna S, Saporta S, Mervis RF, Park CR, Chong L, Diamond DM. 2008. Hyperglycemia not hypoglycemia alters neuronal dendrites y impairs spatial memory. *Pediatric Diabetes*. 9(6):531-539.
- Malone JI, Hanna SK, Saporta S. 2006a. Hyperglycemic brain injury in the rat. *Brain Res*. 1076(1):9-15.
- Malone JI, Hanna SK, Saporta S. 2006b. Hyperglycemic brain injury in the rat. *Brain Research*. 1076:9-15.
- McKinley MJ, Albiston AL, Allen AM, Mathai ML, May CN, McAllen RM, Oldfield BJ, Mendelsohn FA, Chai SY. 2003. The brain renin-angiotensin system: Location y physiological roles. *Int J Biochem Cell Biol*. 35(6):901-918.
- Meek TH, Nelson JT, Matsen ME, Dorfman MD, Guyenet SJ, Damian V, Allison MB, Scarlett JM, Nguyen HT, Thaler JP et al. 2016. Functional identification of a neurocircuit regulating blood glucose. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 113(14):E2073-2082.
- Mergenthaler P. 2013. Sugar for the brain: The role of glucose in physiological y pathological brain function. *36(10):587-597*.
- Michael-Titus A, Revest P, Shortland P. 2010. 2 - elements of cellular y molecular neuroscience. The nervous system (second edition). Churchill Livingstone. p. 31-46.
- Michler-Stuke A, Wolff JR, Bottenstein JE. 1984. Factors influencing astrocyte growth y development in defined media. *Int J Dev Neurosci*. 2(6):575-584.
- Minghetti L. 2004. Cyclooxygenase-2 (cox-2) in inflammatory y degenerative brain diseases. *J Neuropathol Exp Neurol*. 63(9):901-910.
- Misonou H. 2010. Homeostatic regulation of neuronal excitability by k(+) channels in normal y diseased brains. *Neuroscientist*. 16(1):51-64.
- Mogi M, Iwanami J, Horiuchi M. 2012. Roles of brain angiotensin ii in cognitive function y dementia. *Int J Hypertens*. 2012:169649.
- Montiel-Herrera M, Miledi R, Garcia-Colunga J. 2006. Membrane currents elicited by angiotensin ii in astrocytes from the rat corpus callosum. *Glia*. 53(4):366-371.
- Montiel-Herrera M. 2018. Algunos aspectos fisiológicos sobre la ingesta de alimentos y sus componentes dietarios. En: Aprovechamiento de subproductos para el desarrollo de alimentos funcionales y nutraceuticos: Validación de sus propiedades funcionales. CRC Express
- Morimoto S, Cassell MD, Sigmund CD. 2002. Glia- y neuron-specific expression of the renin-angiotensin system in brain alters blood pressure, water intake, y salt preference. *J Biol Chem*. 277(36):33235-33241.
- Morran MP, Vonberg A, Khadra A, Pietropaolo M. 2015. Immunogenetics of type 1 diabetes mellitus. *Mol Aspects Med*. 42:42-60.

- Muthalif MM, Benter IF, Uddin MR, Harper JL, Malik KU. 1998. Signal transduction mechanisms involved in angiotensin-(1-7)-stimulated arachidonic acid release y prostanoid synthesis in rabbit aortic smooth muscle cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 284(1):388-398.
- Nagayach A, Patro N, Patro I. 2014. Astrocytic y microglial response in experimentally induced diabetic rat brain. *Metab Brain Dis.* 29(3):747-761.
- Ozougwu J, Obimba K, Belonwu C, Unakalamba C. 2013. The pathogenesis y pathophysiology of type 1 y type 2 diabetes mellitus. *Journal of Physiology y Pathophysiology* 4(4):46-57.
- Palumbo S, Bosetti F. 2013. Alterations of brain eicosanoid synthetic pathway in multiple sclerosis y in animal models of demyelination: Role of cyclooxygenase-2. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 89(5):273-278.
- Pang T, Wang J, Benicky J, Sánchez-Lemus E, Saavedra JM. 2012. Telmisartan directly ameliorates the neuronal inflammatory response to il-1 β partly through the jnk/c-jun y nadph oxidase pathways. *J neuroinflammation.* p. 102.
- Park MH, Kim HN, Lim JS, Ahn JS, Koh JY. 2013. Angiotensin ii potentiates zinc-induced cortical neuronal death by acting on angiotensin ii type 2 receptor. *Mol brain.* p. 50.
- Pialoux V, Poulin MJ, Hemmelgarn BR, Muruve DA, Chirico EN, Faes C, Sola DY, Ahmed SB. 2017. Cyclooxygenase-2 inhibition limits angiotensin ii-induced dna oxidation y protein nitration in humans. *Front Physiol.* 8.
- Prasad S, Sajja RK, Park JH, Naik P, Kaiser MA, Cucullo L. 2015. Impact of cigarette smoke extract y hyperglycemic conditions on blood–brain barrier endothelial cells. *Fluids Barriers CNS.* 12.
- Purves D, Fitzpatrick D, Katz LC, Lamantia AS, McNamara JO, Williams SM, Augustine GJ. 2001. *Neuroscience.* Sinauer Associates.
- Rakic P. 2009. Evolution of the neocortex: Perspective from developmental biology. *Nat Rev Neurosci.* 10(10):724-735.
- Rapoport SI. 2008. Arachidonic acid y the brain. *J nutr.* p. 2515-2520.
- Ray B, Bailey JA, Sarkar S, Lahiri DK. 2009. Molecular y immunocytochemical characterization of primary neuronal cultures from adult rat brain: Differential expression of neuronal y glial protein markers. *J Neurosci Methods.* 184(2):294-302.
- Redzic Z. 2011. Molecular biology of the blood-brain y the blood-cerebrospinal fluid barriers: Similarities y differences. *Fluids y Barriers of the CNS.* 8(1):3.
- Retailleau K, Belin de Chantemele EJ, Chanoine S, Guihot AL, Vessieres E, Toutain B, Faure S, Bagi Z, Loufrani L, Henrion D. 2010. Reactive oxygen species y cyclooxygenase 2-derived thromboxane a2 reduce angiotensin ii type 2 receptor vasorelaxation in diabetic rat resistance arteries. *Hypertension.* 55(2):339-344.
- Ricciotti E, FitzGerald GA. 2011. Prostaglandins y inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 31(5):986-1000.
- Roder PV, Wu B, Liu Y, Han W. 2016. Pancreatic regulation of glucose homeostasis. *Exp Mol Med.* 48:e219.
- Ruhrberg C, Bautch VL. 2013. Neurovascular development y links to disease. *Cell Mol Life Sci.* 70(10):1675-1684.
- Russi AE, Brown MA. 2015. The meninges: New therapeutic targets for multiple sclerosis. *Transl Res.* 165(2):255-269.
- Sa-Nguanmoo P, Tanajak P, Kerdphoo S, Satjaritanun P, Wang X, Liang G, Li X, Jiang C, Pratchayasakul W, Chattipakorn N et al. 2016. Fgf21 improves cognition by restored synaptic plasticity, dendritic spine density, brain mitochondrial function y cell apoptosis in obese-insulin resistant male rats. *Horm behav.* United States: 2016 Elsevier Inc. p. 86-95.
- Saavedra JM. 2005. Brain angiotensin ii: New developments, unanswered questions y therapeutic opportunities. *Cell Mol Neurobiol.* 25(3-4):485-512.

- Saavedra JM. 2012. Angiotensin ii at(1) receptor blockers ameliorate inflammatory stress: A beneficial effect for the treatment of brain disorders. *Cell Mol Neurobiol.* 32(5):667-681.
- Sahagún JLO, de la Escalera JMI. 2004. *Neuroanatomía humana: Aspectos funcionales y clínicos.* Masson.
- Sang N, Chen C. 2006. Lipid signaling y synaptic plasticity. *Neuroscientist.* 12(5):425-434.
- Santos CY, Snyder PJ, Wu WC, Zhang M, Echeverria A, Alber J. 2017. Pathophysiologic relationship between alzheimer's disease, cerebrovascular disease, y cardiovascular risk: A review y synthesis. *Alzheimers Dement (Amst).* 7:69-87.
- Santos RA, Campagnole-Santos MJ, Andrade SP. 2000. Angiotensin-(1-7): An update. *Regul Pept.* 91(1-3):45-62.
- Santos RA, Ferreira AJ, Verano-Braga T, Bader M. 2013. Angiotensin-converting enzyme 2, angiotensin-(1-7) y mas: New players of the renin-angiotensin system. *J Endocrinol.* 216(2):R1-r17.
- Senanayake P, Drazba J, Shadrach K, Milsted A, Rungger-Brandle E, Nishiyama K, Miura S, Karnik S, Sears JE, Hollyfield JG. 2007. Angiotensin ii y its receptor subtypes in the human retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 48(7):3301-3311.
- Siddiqui SV, Chatterjee U, Kumar D, Siddiqui A, Goyal N. 2008. Neuropsychology of prefrontal cortex. *Indian J Psychiatry.* 50(3):202-208.
- Silver IA, Erecinska M. 1998. Glucose-induced intracellular ion changes in sugar-sensitive hypothalamic neurons. *J Neurophysiol.* 79(4):1733-1745.
- Simpson KA, Martin NM, Bloom SR. 2009. Hypothalamic regulation of food intake y clinical therapeutic applications. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 53(2):120-128.
- Singh KD, Karnik SS. 2016. Angiotensin receptors: Structure, function, signaling y clinical applications. *J Cell Signal.* 1(2).
- Smolinski L, Czlonkowska A. 2016. Cerebral vasomotor reactivity in neurodegenerative diseases. *Neurol neurochir pol.* Poland: 2016 Polish Neurological Society. Published by Elsevier Urban & Partner Sp. z o.o. p. 455-462.
- Song J, Kim J. 2016. Degeneration of dopaminergic neurons due to metabolic alterations y parkinson's disease. *Front Aging Neurosci.* 8:65.
- Srivastava K, Shao B, Bayraktutan U. 2013. Pkc- β exacerbates in vitro brain barrier damage in hyperglycemic settings via regulation of rhoa/rho-kinase/mlc2 pathway. *J Cereb Blood Flow Metab.* 33(12):1928-1936.
- Strauss KI. 2008. Antiinflammatory y neuroprotective actions of cox2 inhibitors in the injured brain. *Brain Behav Immun.* 22(3):285-298.
- Summers C, Tang W, Zelezna B, Raizada MK. 1991. Angiotensin ii receptor subtypes are coupled with distinct signal-transduction mechanisms in neurons y astrocytes from rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88(17):7567-7571.
- Talk AC, Grasby KL, Rawson T, Ebejer JL. 2016. Preconditioning of spatial y auditory cues: Roles of the hippocampus, frontal cortex, y cue-directed attention. *Brain Sci.* 6(4).
- Tilley SL, Coffman TM, Koller BH. 2001. Mixed messages: Modulation of inflammation y immune responses by prostaglandins y thromboxanes. *J clin invest.* p. 15-23.
- Timper K, Bruning JC. 2017. Hypothalamic circuits regulating appetite y energy homeostasis: Pathways to obesity. *Dis Model Mech.* 10(6):679-689.
- Tota S, Kamat PK, Saxena G, Hanif K, Najmi AK, Nath C. 2012. Central angiotensin converting enzyme facilitates memory impairment in intracerebroventricular streptozotocin treated rats. *Behav Brain Res.* 226(1):317-330.
- Tuteja N. 2009. Signaling through g protein coupled receptors. *Plant signal behav.* p. 942-947.
- Valdes G, Kaufmann P, Corthorn J, Erices R, Brosnihan KB, Joyner-Grantham JN. 2009. Vasodilator factors in the systemic y local adaptations to pregnancy. *Reprod biol endocrinol.* p. 79.

- van Belle TL, Coppieters KT, von Herrath MG. 2011. Type 1 diabetes: Etiology, immunology, y therapeutic strategies. *Physiol Rev.* 91(1):79-118.
- Vargas R, Rincón J, Pedrañez A, Viera N, Hernández-Fonseca JP, Peña C, Mosquera J. 2012. Role of angiotensin ii in the brain inflammatory events during experimental diabetes in rats. *BRES Brain Research.* 1453:64-76.
- Waxman SG. 2011. *Neuroanatomía clínica* (26a. Ed.).
- Wong AD, Ye M, Levy AF, Rothstein JD, Bergles DE, Searson PC. 2013. The blood-brain barrier: An engineering perspective. *Front Neuroeng.* 6.
- Wright JW, Harding JW. 2013. The brain renin-angiotensin system: A diversity of functions y implications for cns diseases. *Pflugers Arch.* 465(1):133-151.
- Xia H, Lazartigues E. 2008. Angiotensin-converting enzyme 2 in the brain: Properties y future directions. *J Neurochem.* 107(6):1482-1494.
- Yang CM, Lin CC, Hsieh HL. 2017a. High-glucose-derived oxidative stress-dependent heme oxygenase-1 expression from astrocytes contributes to the neuronal apoptosis. *Mol neurobiol.* United States. p. 470-483.
- Yang H, Chen C. 2008. Cyclooxygenase-2 in synaptic signaling. *Curr Pharm Des.* 14(14):1443-1451.
- Yang T, Sun Y, Lu Z, Leak RK, Zhang F. 2017b. The impact of cerebrovascular aging on vascular cognitive impairment y dementia. *Ageing Res Rev.* 34:15-29.
- Yi SS, Hwang IK, Kim DW, Shin JH, Nam SM, Choi JH, Lee CH, Won MH, Seong JK, Yoon YS. 2011. The chronological characteristics of sod1 activity y inflammatory response in the hippocampi of stz-induced type 1 diabetic rats. *Neurochem Res.* 36(1):117-128.

ANEXOS

Anexo 1:

Los reactivos utilizados para realizar los experimentos fueron: NaCl (Fermont), NaHCO₃ (Productos Químicos Monterrey), KCl (Fermont), NaH₂PO₄·H₂O (Fisher Scientific), Glucosa (Sigma), MgCl₂ (Productos Químicos Monterrey), CaCl₂ (Baker), ácido bórico (Fermont), trizma base (Sigma), EDTA (sigma), medio Neurobasal (Gibco), suplemento G5 (Gibco), suero fetal bovino (Sigma), penicilina/estreptomicina (Sigma), sigmacote (Sigma), poli-L-ornitina (Sigma), estreptozotocina, los reactivos del kit comercial Direct-zol RNA MiniPrep 2050 (Zymo Research), TRIzol (Invitrogen), etanol al 70% y TBE 1X.

Anexo 2:

Las reacciones de retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa se realizaron con los reactivos (Progema): oligonucleótidos aleatorios, agua libre de RNasas, Buffer-5x para virus de la leucemia murina, ditiotreitól, mezcla de desoxinucleótidos trifosfatados, RNasina recombinada (AAA63448.1) retrotranscriptasa del virus de leucemia murina (AAA66622.1), solución amortiguadora para la enzima Taq polimerasa, MgCl₂, oligonucleótidos específicos (sentido y antisentido; Tabla 1) para la ciclooxigenasa-2 (COX-2), los receptores para angiotensina II del tipo 1 y tipo 2, Taq polimerasa (AAA27507.1), escalera molecular DNA de 100 pares de bases, colorante Azul/Naranja 6X y SYBR Green (Invitrogen), y finalmente agarosa de grado molecular (Promega).

Anexo 3:

Para la disección de los cerebros se preparó 1 L de solución Ringer fría disolviendo (en mM): 125 NaCl, 25 NaHCO₃, 3 KCl, 1.25 NaH₂PO₄·H₂O, 25 Glucosa, 1 MgCl₂, 2 CaCl₂ y se ajustó a pH 7.2.

Anexo 4:

Para la preparación de geles al 2% de agarosa se elaboró un concentrado de solución amortiguadora de la siguiente forma: 500 mL de solución tris-borato-EDTA compuesta por 27 g de tris base, 13.75 g de ácido bórico y 10 mL de EDTA 0.5 M ajustada a pH 8.0.

Anexo 5:

El ARN total se extrajo de los cultivos celulares primarios del lóbulo frontal de la rata de acuerdo al procedimiento descrito por el proveedor (Direct-zol RNA MiniPrep R5020). Primero, se retiró el medio de cultivo NB-SFB de la caja Petri y se adicionaron 300 µL del reactivo TRIzol (TRIzol Reagent, Invitrogen) directamente a las células sembradas en un cubreobjetos. Segundo, las células se lisaron mecánicamente con la succión repetida del reactivo TRIzol. A continuación, la suspensión (300 µL) obtenida dentro de la caja Petri se colocó en un microtubo de 1.6 mL. Luego, se centrifugó la muestra para remover los detritos celulares en una microcentrifuga (Micromax fr) a 12,000 rpm durante 1 min. Al tubo contenedor de la muestra, se le agregaron 300 µL de etanol (grado reactivo, 95-100%), y se agitó vigorosamente en un vortex (Vortex Gene 2). La solución se transfirió a una columna Zymo-Spin II C colocada en un tubo colector y se centrifugó de nuevo a 12,000 rpm por 1 min. El sobrenadante obtenido en el tubo colector se descartó. Después se agregaron 400 µL de Direct-zol RNA PreWash a la columna y se centrifugó nuevamente. Este procedimiento se realizó dos veces. Después, se agregaron 700 µL de RNA Wash Buffer a la columna de separación para centrifugarla a 12,000 rpm durante 2 min. La columna se transfirió a un tubo libre de RNasas y el ARN se eluyó de ésta con 25 µL de agua libre de DNasa/RNasas, centrifugándola bajo las mismas condiciones que en el paso anterior. Finalmente, el RNA total se almacenó a -70°C en un ultracongelador (Thermo Scientific) hasta su uso. El RNA total, extraído de las diferentes muestras, se cuantificó obteniendo en promedio 30 ng/µL. Los RNA totales extraídos se cuantificaron en un sistema Nanodrop 2000 (Thermo Scientific) y se registraron las concentraciones.

Anexo 6:

La reacción de retrotranscripción reversa se realizó de acuerdo a lo descrito por (Pang et al. 2012). En condiciones estériles, se prepararon los siguientes reactivos en dos tubos de 200 µL. Inicialmente se preparó un concentrado (tubo 1) con 5.5 µL de agua libre de DNasa/RNasas, 1 µL de oligonucleótidos aleatorios y 5 µL de RNA total (muestra de interés experimental). Esta solución se agitó sutilmente por 30 s en un vortex (Vortex Gene 2). En otro tubo estéril (tubo 2), se preparó la solución reguladora de pH de la mezcla de reacción de la siguiente manera: 4 µL de solución reguladora-5X retrotranscriptasa del virus de leucemia murina (RT-M-MLV), 2 µL de 0.1 ditioneitol (DTT), 1 µL de mezcla de desoxinucleótidos trifosfatados (dNTP's mix) y 0.5 µL RNasina (RNasin recombinada). Una vez preparadas las soluciones anteriores en los tubos 1 y 2, el tubo 1 se calentó a 65°C por 3 min en un termociclador C1000 (Bio-Rad). Transcurrido el tiempo, a 25°C se agregó la solución contenida en el tubo 2. Consecuentemente, la mezcla se

calentó a 42°C por 1 min para agregar 1 µL de la enzima retrotranscriptasa del virus de la leucemia murina. La reacción se dejó a 42°C por 2 h, para después calentarla a 65°C por 25 min. Finalmente, el producto de la reacción se enfrió a 4°C y se almacenó a -20°C hasta su uso.

Anexo 7:

La reacción en cadena de la polimerasa se realizó de acuerdo a lo descrito por (Pang et al. 2012). En condiciones estériles, en tubos Eppendorf de 600 µL se preparó un stock de mezcla de reacción de la siguiente composición: 14.1 µL de agua libre de DNAsas/RNAsas (Promega), 2 µL de buffer para Taq polimerasa, 1.2 µL de MgCl₂, 0.2 µL de mezcla de dNTP y 0.1 µL de Taq polimerasa. Después de agitarse vigorosamente, la solución resultante (70.4 µL) se separó en cuatro partes iguales (17.6 µL) en tubos identificados de 200 µL. Posteriormente, a cada tubo se le agregaron 0.2 µL del oligonucleótido de interés (sentido y antisentido; ver secuencias en Tabla 1) y 4 µL ADN complementario (producto de la reacción de la retrotranscripción). Las mezclas de reacción se colocaron en un termociclador C1000 (Bio-rad) y se sometieron a 35 ciclos de acuerdo a las siguientes condiciones: 94°C por 2 min, 94°C durante 40 s, 60°C por 1 min y 72°C por 40 s. Finalmente, las reacciones se calentaron a 72°C durante 15 s para inactivar la enzima y se dejaron enfriar a 4°C hasta su uso. Para identificar los productos de la reacción de la PCR se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2% de la siguiente manera: se diluyó 1 g de agarosa en 50 mL de solución TBE1X (ver soluciones), se calentó en agitación constante hasta que se disolvió. Rápidamente se agregaron 15 µL de SYBR-Green (Invitrogen) y se homogenizó para que gelificara en un molde para electroforesis. Después, ya colocado el gel en la cámara para electroforesis (BIO-RAD), se colocaron en cada pozo 8 µL del producto de la PCR. Se utilizó de referencia una escalera de peso molecular 100 pares de bases de acuerdo a lo descrito por el proveedor (Promega). Se utilizó una tensión de 90 V durante 40 min. Finalmente, el gel se colocó dentro del equipo WiseDoc WGD-30 (Wisd) acoplada a una cámara digital y utilizando el software Wise Capture II se fotodocumentaron los resultados que representan al menos 2 repeticiones experimentales. La semicuantificación de los geles se realizó utilizando el programa Fiji.