

# Efecto de la Hipoxia Intermitente Crónica sobre la Nitración y la Fosforilación de las Kinasas reguladas por señales extracelulares en la Corteza Primaria del Cerebro de la Rata

DANIELA URRECHEAGA<sup>1,2</sup>, ALFREDO CSIBI<sup>2</sup>, PATRICK LEVY<sup>2</sup>,  
SERGE BOTTARI<sup>2</sup> Y ANITA ISRAEL<sup>1\*</sup>

## Resumen

La hipoxia intermitente crónica (HIC) emerge como un problema de salud pública de alta prevalencia y constituye una de las principales causas de las alteraciones sustanciales de tipo neuroconductual y cardiovasculares en pacientes adultos y en desarrollo. En el presente trabajo evaluamos el efecto que ejerce la HIC sobre la señalización de las kinasas reguladas por señales extracelulares (ERK 1/2) en la corteza cerebral de la rata. Demostramos, por primera vez, que la HIC induce nitración y activación de las ERK 1/2 en la corteza cerebral de la rata. El pretratamiento *in vivo* con candesartan inhibió la nitración y la fosforilación de las ERK1/2 inducidas por la HIC en la corteza cerebral. Nuestros hallazgos apuntan hacia un papel de la nitración en la vía de señalización de las MAPK cerebrales durante la HIC, e indican que estos efectos están mediados a través de la estimulación del receptor AT<sub>1</sub> de la angiotensina II.

**Palabras clave:** Hipoxia intermitente crónica, ERK1/2, angiotensina II, nitración, fosforilación.

## Abstract

Chronic intermittent hypoxia (CIH) has emerged as a significant and highly prevalent public health problem that imposes substantial neurobehavioral and cardiovascular morbidities in both adult and developing patients. We evaluated the effect of CIH on the extracellular signal-regulated kinase (ERK 1/2) signaling in rat brain cortex. Our present results demonstrate, for the first time, that CIH induces nitration and activation of ERK 1/2. ERK 1/2 nitration and phosphorylation was inhibited by candesartan *in vivo* pre-treatment. Our results support a role of nitration in brain MAPK signaling pathway during CIH and they indicate that brain AT<sub>1</sub> receptor are involved in ERK 1/2 activation.

**Key words:** Chronic intermittent hypoxia, ERK1/2, angiotensin II, nitration, phosphorylation.

## Introducción

El síndrome de apnea obstructiva del sueño es una condición clínica que se manifiesta por la ocurrencia de episodios repetidos de obstrucción del flujo de aire en las vías aéreas superiores, de forma parcial o completa, durante el sueño (Yamauchi y col., 2005). Este síndrome afecta entre el 2 y 4% de la población adulta, encontrándose implicado en la patogénesis de varias enfermedades cardiovasculares incluyendo la hipertensión sistémica y pulmonar, la insuficiencia cardíaca congestiva, las arritmias car-

díacas y la aterosclerosis (Yamauchi y col., 2005). Los pacientes que sufren de este síndrome presentan hipoxia intermitente, hipercapnea intermitente, cambios en la presión intratorácica, activación del sistema simpático y fragmentación del sueño durante la noche. De manera que la hipoxia intermitente crónica (HIC) es un síndrome que causa situaciones fisiopatológicas serias y podría considerarse como uno de los principales mecanismos que causa alteraciones cardiovasculares y neurocognitivas en estos pacientes.

1 Laboratorio de Neuropeptidos, Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.

2 Laboratoire d'Hypoxie: Physiopathologies-Respiratoires et Cardio-vasculaires Faculté de Médecine, Université Joseph Fourier, Grenoble, Francia.

Correspondencia a: Anita Israel. Apartado Postal 50176, Sabana Grande 1050A. Caracas Venezuela. e-mail: [astern88@hotmail.com](mailto:astern88@hotmail.com)

Se ha demostrado que la hipertensión arterial causada por la hipoxia en pacientes que sufren de apnea obstructiva del sueño se debe principalmente a un incremento de la actividad del sistema simpático, a la generación de estrés oxidativo y a un incremento de la actividad del sistema renina angiotensina (SRA) (Nanduri y col., 2001; Manukhina y col., 2006; Sica y col., 2000; Fletcher, 2001; Yuan y col., 2004). Existe una asociación entre la hipoxia intermitente crónica y la estimulación de los quimiorreceptores periféricos. Aún más, en ratas carentes de quimiorreceptores periféricos por la desnervación de los cuerpos carotídeos, se ha observado una inhibición del incremento de la actividad simpática y de la presión arterial inducida por la HIC (Fletcher y col., 1992).

Aunado a la activación del sistema simpático, se ha sugerido que la HIC induce la facilitación de la liberación de renina, a través de la estimulación de los receptores  $\alpha$ -adrenérgicos renales. Estos hallazgos apoyan el concepto de que la HIC induce el aumento de la actividad del sistema renina-angiotensina. Así, se ha demostrado que la elevación de la presión arterial inducida por la HIC es inhibida por la administración de antagonistas del receptor  $AT_1$  de angiotensina II (Fletcher y col., 2002).

Existe evidencia que demuestra que la HIC causa daño de la región cortico-hipocámpal, lo cual se asocia a alteraciones neurocognitivas, respiratorias y cardiovasculares. Así, se ha demostrado pérdida de sustancia gris en regiones cerebrales relevantes en la función cognitiva en humanos (Macey y col., 2002); y en modelos animales se ha demostrado un incremento de la muerte de las neuronas corticales cerebrales asociadas a la HIC (Xu y col., 2004). Estas acciones deletéreas podrían estar relacionadas a las acciones de la HIC en el sistema nervioso central, como lo son el deterioro del metabolismo lipídico cerebral, cambios en la actividad de enzimas metabólicas (Wasicko y col., 1990), de los niveles endógenos de angiotensina II (ANG) (Maktabi y col., 1995); generación de especies reactivas de oxígeno así como alteraciones del sistema de neurotransmisores en diferentes áreas del cerebro (Neubauer, 2001). El hipocampo, la corteza cerebral y el hipotálamo son particularmente susceptibles a la hipoxia (Morrell y col., 2003; Macey y col., 2002; Bartlett y col., 2004), especialmente desde que la exposición a HIC resulta en la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en dichas áreas cerebrales, tanto en ratas como en ratones (Ramanathan y col., 2005; Turko y Murad, 2002).

Las especies reactivas de oxígeno han emergido como moléculas críticas en la señalización (Turko y Murad, 2002). El término especies reactivas de oxí-

geno (ROS) engloba un gran rango de moléculas que incluyen el anión superóxido ( $O_2^-$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el radical hidroxilo ( $HO^\bullet$ ), entre otros. El anión superóxido reacciona con el óxido nítrico para formar peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), el cual es un agente nitrante de los residuos de tirosina de las proteínas. La nitración de los residuos de tirosina de las proteínas es una modificación postranslacional que puede afectar la estructura y función de la misma (Turko y Murad, 2002; Ischiropoulos, 2003). Se ha observado que la nitración de los residuos de tirosina puede prevenir la subsecuente fosforilación de los mismos, o también puede estimular su posterior fosforilación (Ischiropoulos, 2003).

Varios sistemas enzimáticos producen ROS, incluyendo la cadena de transporte de electrones de la mitocondria, el citocromo P-450, la lipooxigenasa, la ciclooxigenasa, la NAD(P)H oxidasa, la xantina oxidasa y los peroxisomas; y su producción es regulada por varias citoquinas y factores de crecimiento, incluyendo la angiotensina II (Fruehauf y Meyskens, 2007). La angiotensina II incrementa la producción del anión superóxido por activación de la NAD(P)H oxidasa; este incremento de las ROS ha sido implicado en la hipertensión inducida por la angiotensina II (Laplante y Champlain, 2006). El mecanismo mediante el cual el estrés oxidativo produce hipertensión parece estar asociado con los efectos mitogénicos de ROS, los cuales son mediados en parte, vía la activación de la familia de kinasas reguladas por señales extracelulares: ERK1/2, y p38 y JN Kinasas. De igual forma, la producción de las ROS y la propagación del estrés oxidativo constituye uno de los mecanismos implicados en la apoptosis neuronal cortical y la disfunción neurocognitiva inducida por la HIC (Xu y col., 2004).

Ahora bien, desde que se ha reportado que en las células del músculo liso vascular de la rata la angiotensina II induce nitración y activación de las ERK1/2 (Pinzar y col., 2005), en el presente trabajo quisimos determinar si en la corteza del cerebro de la rata, la hipoxia intermitente crónica es capaz de inducir nitración de las ERK 1/2 y por ende su activación. Igualmente, evaluamos el papel de los receptores  $AT_1$  en la nitración y activación de las ERK1/2 inducida por la HIC, mediante el uso del antagonista selectivo, el candesartan.

## Materiales y métodos

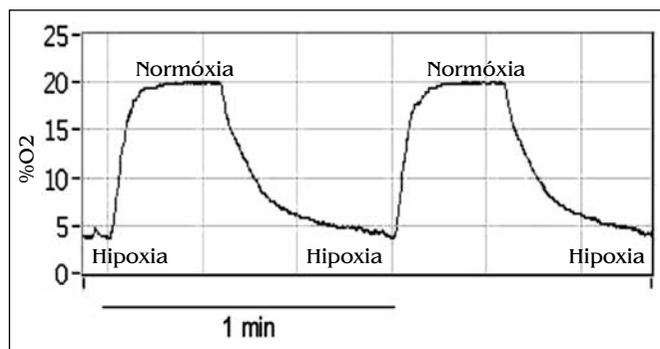
### ANIMALES

Los experimentos de hipoxia intermitente crónica fueron realizados con ratas machos de la cepa

Wistar, con un peso comprendido entre 330 y 400g, con acceso libre al agua y la comida. Los protocolos experimentales fueron revisados y aprobados por la Dirección de Servicios Veterinarios del Isère, Francia, conforme con las normativas francesas y del Comité de Ética local para la investigación animal.

#### PROTOCOLO DE HIPOXIA INTERMITENTE CRÓNICA

Las ratas fueron expuestas a hipoxia intermitente (HI), como previamente ha sido descrito (Beguin, 2005). Las ratas fueron colocadas en un aparato de hipoxia el cual está compuesto por varias cajas cilíndricas de plexiglás idénticas (28 cm de largo, 10 cm de diámetro y un volumen de 2.2 litros). Estas cajas fueron conectadas a una válvula de selenio que permite la distribución de nitrógeno puro a un flujo que fue ajustado para reducir la fracción de oxígeno inspirado ( $F_{I_{O_2}}$ ) en el ambiente a un 5% durante 40 segundos. Seguido de la entrada de aire comprimido, para retornar gradualmente a un ambiente de aire con una  $F_{I_{O_2}}$  de 21% (normoxia) durante 20 segundos, las ratas sometidas a este protocolo son las hipoxicas. Estos animales fueron expuestos a un 5% de oxígeno porque se corresponde con la desaturación de oxígeno observada en los pacientes con síndrome de apnea obstructiva del sueño. Este ciclo de un minuto fue repartido durante ocho horas diarias por 14 días (ver figura). Paralelo a la entrada de nitrógeno a las cajas hipoxicas, fue distribuido sólo aire comprimido a la misma tasa de flujo del nitrógeno en las cajas normoxicas (21% de  $F_{I_{O_2}}$ ). El nivel de oxígeno en cada una de las cajas durante el protocolo de HI fue controlado con un analizador de gas (modelo ML206, AD Instruments).



Variación de la proporción de  $O_2$  en el interior de las cajas (21 a 5%) durante ciclos de un minuto de hipoxia intermitente.

Para determinar el efecto del candesartan en la nitración y fosforilación de las proteínas ERK 1/2 en la corteza cerebral de las ratas, éstas fueron divididas en los siguientes grupos experimentales: 1. ratas normoxicas (N); 2. ratas expuestas a hipoxia

intermitente (HI) tratadas con vehículo, por vía oral una hora antes de la exposición a la normoxia y a la hipoxia durante 14 días (N=2 por grupo); 3. ratas normoxicas (Nc) tratadas con candesartan-celextetil (1 mg/kg/día, p.o.); y 4. ratas expuestas a hipoxia intermitente (HIC), tratadas con candesartan-celextetil (1 mg/kg/día, p.o.) una hora antes de la exposición a la normoxia y a la hipoxia durante 14 días (N=2 por grupo).

#### EXTRACCIÓN DE LOS TEJIDOS

Finalizado el protocolo de hipoxia intermitente crónica se procedió a la extracción de los tejidos; para ello los animales fueron anestesiados con isoflurano y sacrificados por decapitación. Se extrajo la corteza primaria del cerebro, y disecó bajo microscopía quirúrgica, en frío. Los tejidos fueron homogeneizados en hielo con 100 a 300  $\mu$ l de buffer de lisis (50  $\mu$ M Trisma base, 5 mM EDTA, 1  $\mu$ M NaF, 1  $\mu$ M  $Na_3VO_4$ , mezcla de inhibidores de proteasas compuesto por pepstatina A, AEBSF, aprotinina, leupeptina, bestatina y E-64, a pH 7.4, Tritón X-100 al 1%), usando un homogeneizador de tejido. Posteriormente se centrifugaron a 4 °C, 10.000 rpm por 10 minutos, para obtener el sobrenadante. Las proteínas fueron determinadas mediante el método de Biuret en medio alcalino con utilización del BCA (ácido bicinónico), Protein Assay Reagent Kit de Pierce®.

#### ANÁLISIS MEDIANTE WESTERN BLOT

Para el análisis de Western blot, las muestras de corteza primaria (100  $\mu$ g de proteína/muestra) fueron separadas en geles de 10% SDS-poliacrilamida y transferidas a una membrana de PVDF (polifluoruro de vinilideno). Posteriormente se procedió a bloquear las membranas con una solución de TBS/Tween 0,1% + 5% de leche descremada durante 1 hora a temperatura ambiente. Los inmunoblots se realizaron mediante la incubación de las membranas con los anticuerpos primarios antifosfo-p44/42-MAPK, y anti-MAPK durante toda la noche a 4 °C, seguido de la incubación con los anticuerpos secundarios correspondientes anti-IgG conjugados con sustrato HRP (*horseradish peroxidase*), durante una hora a temperatura ambiente. El revelado de las membranas se realizó utilizando el kit de revelador SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate y el análisis desintométrico con Scion Image Software.

#### PROTOCOLO DE INMUNOPRECIPITACIÓN

Para la inmunoprecipitación, 2  $\mu$ g de anticuerpo anti-nitrotirosina fueron unidos a la proteína A-agarosa e incubados con 100  $\mu$ g de proteínas totales de

las muestras homogenizadas de corteza primaria, durante toda la noche a 4 °C con agitación constante. Luego de la incubación las muestras inmunoprecipitadas fueron lavadas 5 veces con 1 ml de buffer de fosfato de sodio 0,1 M a pH=7, para ser sometidas al protocolo de Western blot antes descrito.

**ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los resultados se expresaron como la media ± E.S.M. La significancia de los resultados fue analizada mediante el análisis de varianza de una vía (ANOVA). Un valor de P<0,05 fue considerado significativo.

**Resultados**

**1. EVIDENCIA DE NITRACIÓN DE PROTEÍNAS EN LA CORTEZA CEREBRAL DE LA RATA**

El análisis de Western blot para las proteínas nitradas en la corteza cerebral de la rata inmunoprecipitada con el anticuerpo anti-nitrotirosina muestra varias bandas de proteínas en el rango del peso molecular correspondiente a 37-50 KDa, tanto en el grupo de ratas expuesta a normoxia como a hipoxia intermitente (figura 1). En el peso molecular de 44 y 42 KDa se observan dos bandas de proteínas nitradas en ambos grupos de ratas, éstas parecen pertenecer a las proteínas ERK-1 y ERK-2.

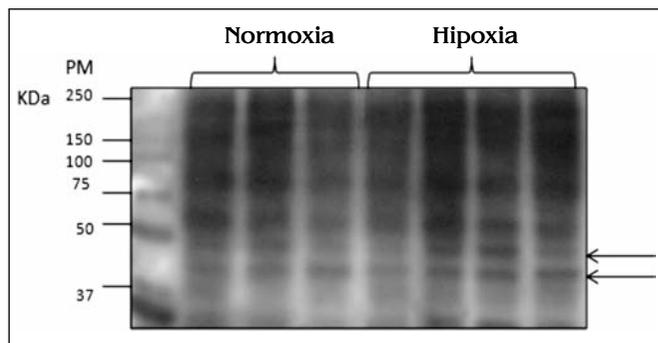


Figura 1

Inmunoprecipitación de las proteínas nitradas de homogeneizado de la corteza primaria del cerebro de la rata expuesta a normoxia y a hipoxia intermitente crónica. Las proteínas fueron inmunoprecipitadas con el anticuerpo anti-nitrotirosina, separadas por SDS-PAGE, transferidas a las membranas e incubadas con el anticuerpo anti-nitrotirosina. Las flechas indican las bandas de proteínas en el rango del peso molecular de las proteínas ERK 1 y ERK 2, respectivamente. N= 3 para el grupo de ratas normóxicas y N= 4 para el grupo de ratas hipóxicas.

**2. EFECTO DE LA HIPOXIA INTERMITENTE CRÓNICA SOBRE LA FOSFORILACIÓN DE LA PROTEÍNA ERK1/2 EN LA CORTEZA DEL CEREBRO DE LA RATA**

El análisis de Western blot muestra que las proteínas ERK1 y ERK2, así como las proteínas fosforila-

das se expresan en la corteza cerebral de las ratas controles (ratas normóxicas) y en las expuestas a hipoxia intermitente crónica. En la figura 2B se puede observar que la cantidad de proteínas totales ERK 1/2 no difieren entre el grupo de ratas hipóxicas y el grupo normóxico, mientras que con respecto a la cantidad de proteína fosforilada ERK 1/2, se observa un incremento en la densidad óptica de las bandas de las muestras provenientes de las ratas hipóxicas, al compararlas con las ratas normóxicas (figura 2A). La cuantificación densitométrica indica un incremento significativo de la fosforilación de las proteínas ERK1/2 en las ratas expuestas a hipoxia intermitente crónica con respecto a la fosforilación observada en las ratas normóxicas, expresadas como la relación fosfo-ERK/ERK (figura 2C).

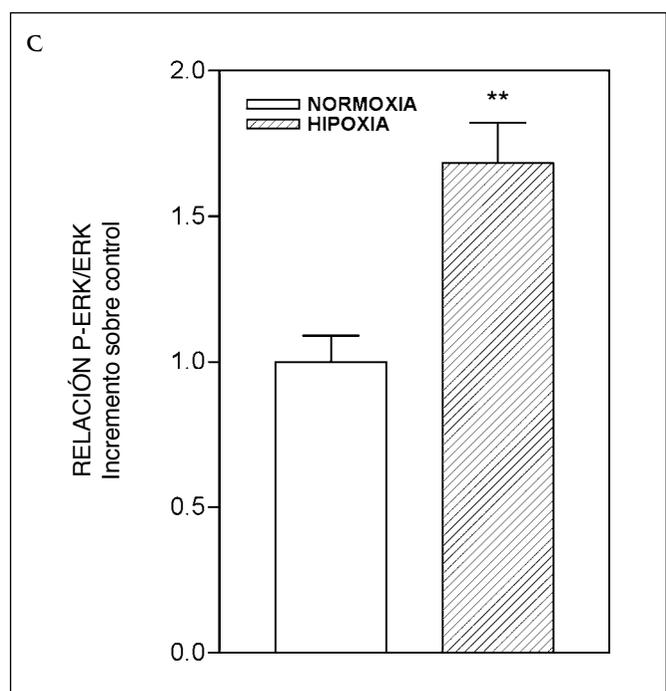
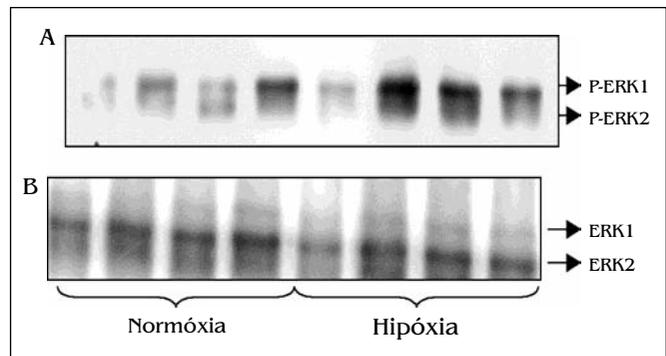


Figura 2

Western blot de las proteínas fosforiladas ERK 1/2 (A) y las proteínas totales ERK 1/2 (B) en homogeneizado de la corteza cerebral de las ratas expuestas a hipoxia intermitente crónica y a normoxia. (C) El nivel relativo de activación de ERK 1/2 fue determinado por escaneo densitométrico de las bandas de fosfo-ERK y normalizado con las bandas de ERK. N=4 ratas por cada grupo de exposición. \*\*p<0.01.

**3. EFECTO DE LA HIPOXIA INTERMITENTE CRÓNICA SOBRE LA NITRACIÓN DE LAS ERK1/2 EN LA CORTEZA DEL CEREBRO DE LA RATA**

Las muestras de corteza cerebral de las ratas expuestas a hipoxia intermitente crónica y a normoxia, fueron inmunoprecipitadas con el anticuerpo anti-nitrotirosina, separadas por SDS-PAGE y transferidas a la membrana e incubadas con el anticuerpo primario anti-ERK 1/2 (anti-MAPK). En el análisis de Western blot se pueden observar dos bandas de proteínas nitradas en el peso molecular de 44 y 42 KDa que pertenecen a las proteínas ERK-1 y ERK-2 respectivamente, y confirma los resultados obtenidos en la figura 1. En la figura 3A y 3B se observa que la hipoxia produce un incremento de la nitración de las proteínas ERK de forma significativa con respecto a las ratas expuestas a normoxia.

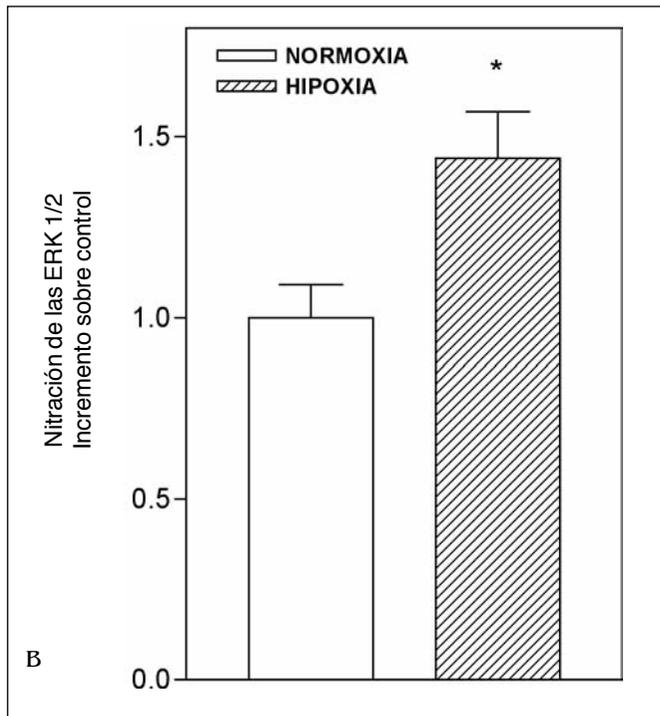
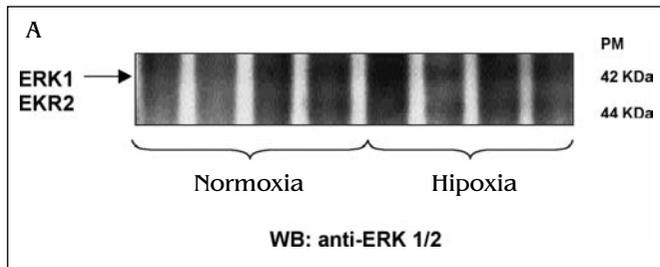


Figura 3

Inmunoprecipitación de las proteínas nitradas de homogenizado de la corteza primaria del cerebro de la rata, expuesta a normoxia y a hipoxia intermitente crónica. Se observan las bandas en el peso molecular de 44 y 42 KDa que pertenecen a las proteínas ERK-1 y ERK-2, respectivamente (A). La cuantificación fue realizada por análisis densitométrico de las bandas de ERK 1/2 (B). N=4 ratas por cada grupo de exposición. \* $p < 0.05$ .

**4. EFECTO DEL BLOQUEO *IN VIVO* DE LOS RECEPTORES AT<sub>1</sub> CON CANDESARTAN SOBRE LA FOSFORILACIÓN DE LAS PROTEÍNAS ERK1/2 INDUCIDA POR LA HIC, EN LA CORTEZA DEL CEREBRO DE LA RATA**

En la figura 4B se puede observar la cantidad de proteínas totales ERK 1/2, las cuales son similares en densidad en el grupo de ratas hipóxicas y normóxicas tratadas con candesartan y el grupo de ratas hipóxicas y normóxicas no tratadas (control). Por otra parte, en la figura 4A se observa un incremento de la densidad óptica con respecto a la cantidad de proteínas fosforiladas ERK 1/2 en las ratas sometidas a HIC y este incremento es inhibido por el candesartan. La cuantificación de los resultados expresados como relación fosfo-ERK/ERK (figura 4C) demuestra clara-

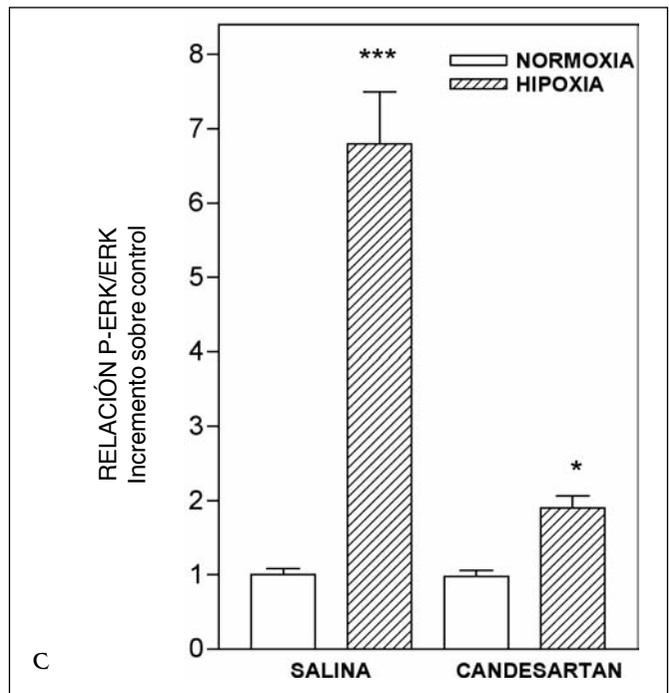
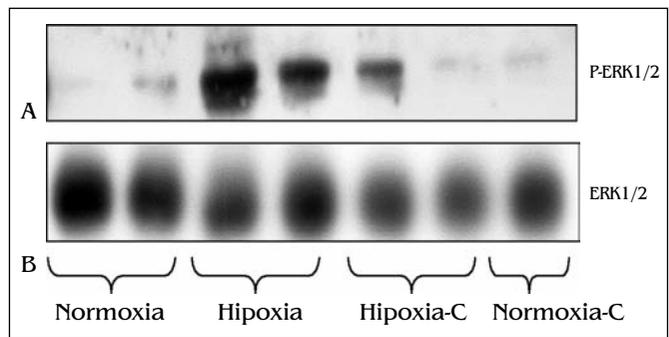


Figura 4

Western blot de las proteínas fosforiladas ERK 1/2 (A) y las proteínas totales ERK 1/2 (B) en muestras de la corteza primaria homogeneizada proveniente de ratas normoxicas o expuestas a hipoxia intermitente crónica tratadas, o no, con candesartan. Análisis densitométrico de la activación de ERK 1/2 (C). El nivel relativo de activación de ERK fue determinado por escaneo densitométrico de las bandas de fosfo-ERK y normalizado con las bandas de ERK. N=2 ratas por cada grupo de exposición. \*\*\* $p < 0.001$ ; \* $p < 0.05$ .

mente que la HIC incrementa la fosforilación de las ERK1/2 y que el candesartan inhibe de forma significativa la activación de las proteínas ERK 1/2 en las ratas expuestas a hipoxia intermitente crónica. El candesartan no afectó por sí mismo la fosforilación de ERK en las ratas normóxicas.

##### 5. EFECTO DEL CANDESARTAN *IN VIVO* SOBRE LA NITRACIÓN DE LAS ERK1/2 INDUCIDA POR LA HIPOXIA INTERMITENTE CRÓNICA EN LA CORTEZA DEL CEREBRO DE LA RATA

Las muestras de corteza cerebral de las ratas expuestas a hipoxia intermitente crónica y a normoxia, tratadas o no con candesartan, fueron inmunoprecipitadas con el anticuerpo anti-nitrotirosina, separadas por SDS-PAGE y transferidas a la membrana e

incubadas con el anticuerpo primario anti-ERK 1/2 (anti-MAPK). En la figura 5A se observa que la hipoxia produce un incremento de la nitración de las proteínas ERK 1/2 de forma significativa con respecto a las ratas expuesta a normoxia y este incremento es inhibido por el candesartan. La cuantificación de los resultados expresados como nitración de ERK1/2 (figura 5B) demuestra claramente que la HIC incrementa la nitración de las ERK1/2 y que el candesartan inhibe de forma significativa la nitración de las proteínas ERK 1/2 en las ratas expuestas a hipoxia intermitente crónica y también en las ratas normoxicas.

### Discusión

El posible mecanismo mediante el cual la apnea del sueño contribuye al incremento de la presión arterial no ha sido totalmente esclarecido, sin embargo, la evidencia apunta hacia un papel fundamental del sistema nervioso simpático y del sistema renina-angiotensina (Fletcher y col., 1992 y 1999). En modelos animales de HIC, el aumento de la actividad simpática es requisito primordial para el desarrollo de la elevación de la presión arterial sostenida (Greenberg y col., 1999; Fletcher y col., 1992). De igual forma, existe evidencia que indica que el sistema SRA circulante y el tisular se encuentran activados durante la hipoxia crónica (Fletcher y col., 1999).

Ahora bien, los efectos deletéreos de la HIC podrían estar mediados por el sistema nervioso central. Al respecto se ha demostrado un incremento, dependiente del tiempo, de la apoptosis en el área hipocámpal CA1 y el neocórtex, en ratas sometidas a HIC en magnitud similar a la experimentada en los pacientes con apnea del sueño (Gozal y col., 2001). De igual manera, en un modelo de apnea del sueño en ratones se ha demostrado apoptosis neuronal cortical y disfunción neurocognitiva inducida por la HIC (Xu y col., 2004).

Se ha propuesto que los daños neuronales inducidos por la hipoxia podrían ser el resultado del estrés oxidativo, el cual se asocia con una producción aumentada de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y de iones superóxido ( $O_2^-$ ). En efecto, mediante técnicas de detección de fluorescencia se ha demostrado incrementos significativos de la producción de ROS en la corteza cerebral y en las neuronas corticales de ratones expuestos a HIC. Igualmente, mediante técnicas de inmunohistoquímica se ha demostrado aumentos de los marcadores de la respuesta al estrés oxidativo, c-Fos, c-Jun y la NK-kB (Xu y col., 2004). Debido a que estos radicales son extremadamente reactivos, los mismos han sido implicados en la regulación de una gran variedad de actividades enzimáticas.

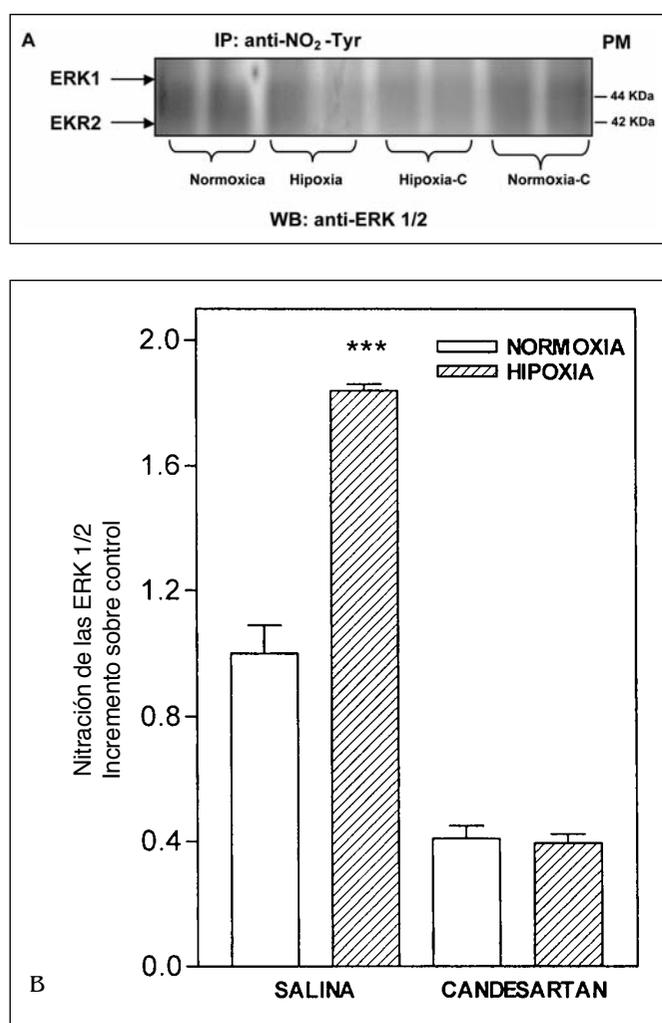


Figura 5

Immunoprecipitación de proteínas nitradas de homogeneizado de la corteza primaria del cerebro de las ratas expuestas a normoxia o a hipoxia intermitente crónica y tratadas, o no, con candesartan. En el Western blot se pueden observar unas bandas en el peso molecular de 44 y 42 KDa que pertenecen a las proteínas ERK-1 y ERK-2 respectivamente (A). La cuantificación fue realizada por análisis densitométrico de las bandas de ERK 1/2 (B). N=2 ratas por cada grupo de exposición. \* $p < 0.05$ .

Adicionalmente se ha demostrado que el óxido nítrico, un conocido neurotransmisor, participa en la regulación de la homeostasis cardiovascular y la respuesta cardiorrespiratoria a la hipoxia, actuando tanto a nivel central como periférico (Li y col., 2002; Gozal y col., 1996). Varias líneas de evidencia indican que la biosíntesis del NO podría constituir un factor clave en la respuesta fisiopatológica del cerebro durante la hipoxia. Así, se sabe que la HIC incrementa la expresión del ARNm y de la proteína de la iNOS, así como la actividad NOS, la formación de residuos de nitrotirosina y la producción de nitratos y nitritos (Li y col., 2004). Igualmente, se ha demostrado que la hipoxia hipobárica aguda aumenta la expresión de la nNOS en la corteza cerebral (Castro-Blanco y col., 2003), así como en los núcleos supraóptico y paraventricular del hipotálamo (Luo y col., 2000).

Debido a que el SRA se encuentra activado durante la HIC, la angiotensina II como hormona multifuncional resulta la candidata ideal para mediar las acciones centrales de este síndrome. La ANG es capaz de activar a diferentes niveles a la vía de las MAPK (Touyz y Schiffrin, 2000; Bottari y col., 1993). La ANG induce la fosforilación de las principales familias de MAPKs: la ERK1/2, JNK, y p38 en células de músculo liso vascular en cultivo y en el SNC (Touyz y Schiffrin, 2000; Bottari y col., 1993; Griendling y col., 2000, Chan y col., 2005). La ANG aumenta el estrés oxidativo a través de la activación de la enzima NAD(P)H oxidasa que produce  $O_2^-$ . Estos iones superóxido producen probablemente la activación de los MAPK (Griendling y col., 2000). Recientemente se ha demostrado que la ANG induce la activación de las MAPK a través de la generación de ONOO<sup>-</sup> y su nitración (Pinzar y col., 2005).

La nitración de los residuos de tirosina también ocurre en áreas del cerebro posterior a la isquemia y otras condiciones patológicas (Wang y Zweier, 1996), tales como en el cerebro de pacientes con enfermedad de Alzheimer (Smith y col., 1997). La nitración de los residuos de tirosina en el SNC podría alterar la señalización dependiente de la fosforilación de la tirosina, bien sea en forma positiva como negativa (Turko y Murad, 2002). Al respecto, nuestros resultados demuestran por primera vez, que la hipoxia intermitente crónica induce la nitración, así como la fosforilación de las ERK1/2 en la corteza cerebral de la rata.

Existe evidencia que indica que la nitración de las ERK1/2 se asocia con su activación. Así, en varias líneas celulares la nitración de las ERK producida por el ONOO<sup>-</sup> parece que activa directamente a la enzima o indirectamente a través de la fosforilación

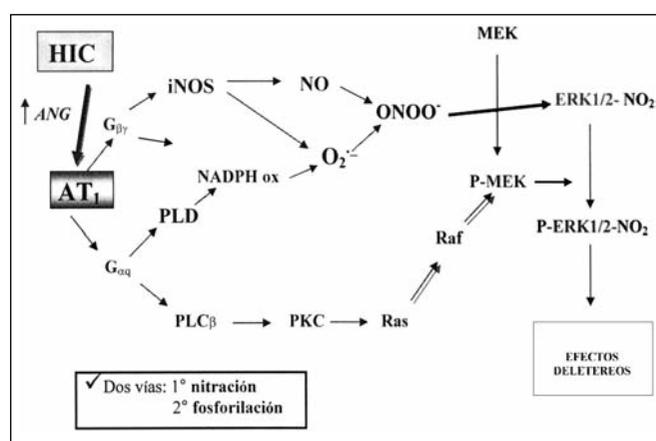


Figura 6  
Representación de las posibles vías de señalización que se activan durante la hipoxia intermitente crónica.

de la EGFR, o de la activación directa de las Raf y MEK (Schieke y col., 1999; Nabeyrat y col., 2003; Zhang y col., 2000) (figura 6). En efecto, se ha demostrado en células del músculo liso vascular, que la ANG induce *in vitro* la nitración y fosforilación de las ERK 1/2 a través de la producción de las ROS y la activación de la vía Raf-MEK-ERK (figura 6) (Pinzar y col., 2006).

Es posible que la HIC, a través de la liberación de ANG, produzca la activación de las ERK en respuesta a un mecanismo que implica la estimulación del receptor AT<sub>1</sub> localizado en neuronas cuyos terminales nerviosos se proyectan hacia la corteza cerebral. En apoyo al papel del receptor AT<sub>1</sub> se encuentran los resultados reportados en la región rostro ventrolateral del bulbo raquídeo (RVLM) (Chan y col., 2005). En los mismo se demuestra que la angiotensina II produce una respuesta presora a través de la activación de la vía de señalización de las MAPK, mediante la fosforilación de la p38 MAPK y ERK1/2, y este efecto es dependiente del receptor AT<sub>1</sub> y la NAD(P)H oxidasa (Chan y col., 2005). Nuestros resultados muestran claramente que el pretratamiento *in vivo* con candesartan, un antagonista selectivo del receptor AT<sub>1</sub>, inhibe tanto la fosforilación como la nitración de la ERK1/2 inducida por la HIC en la corteza primaria cerebral estos hallazgos demuestran la mediación del receptor AT<sub>1</sub> en la activación de las ERK 1/2 durante la HIC, aportan evidencia acerca de la participación del SRA cerebral en este síndrome.

En resumen, nuestros resultados sugieren que la activación del SRA cerebral inducido por la hipoxia intermitente crónica, a través de la estimulación del receptor AT<sub>1</sub>, desencadena mecanismos de señalización que implican la producción de NO y ONOO<sup>-</sup>, la nitración de las ERK1/2 y la activación directa o indirecta de las ERK1/2 (figura 6). Esta secuencia de eventos podría ser la responsable del incremento

de la presión arterial y las manifestaciones fisiopatológicas asociadas a la hipoxia intermitente crónica como los desórdenes neurocognitivos. Sin embargo, son aún necesarios estudios adicionales para establecer con certeza el efecto de la nitración sobre la regulación de las kinasas "aguas arriba" en la cascada de señalización de las MAPK activadas durante la HIC.

## Referencias Bibliográficas

- BARTLETT DJ, RAE C, THOMPSON CH, BYTH K, JOFFE DA, ENRIGHT T, GRUNSTEIN RR. 2004. Hippocampal area metabolites relate to severity and cognitive function in obstructive sleep apnea. *Sleep Med.* 6: 593-596.
- BEGUIN PC, JOYEUX-FAURE M, GODIN-RIBUOT D, LEVY P, RIBUOT C. 2005. Acute intermittent hypoxia improves rat myocardium tolerance to ischemia. *J Appl Physiol.* 99: 1064-1069.
- BOTTARI SP, DE GASPARO M, STECKELINGS U, LEVENS N. 1993. Angiotensin II receptor subtypes: characterisation, signalling mechanism, and possible physiological implications. *Front Neuroendocrinol.* 4:123-171.
- CASTRO-BLANCO S, ENCINAS JM, SERRANO J, ALONSO D, GÓMEZ MB, SÁNCHEZ J, RÍOS-TEJADA F, FERNÁNDEZ-VIZARRA P, FERNÁNDEZ AP, MARTÍNEZ-MURILLO R, RODRIGO J. 2003. Expression of nitric oxide synthase and protein nitration in adult rat brains submitted to acute hypobaric hypoxia. *Nitric Oxide.* 8:182-201.
- CHAN SH, HSU KS, HUANG CC, WANG LL, OU CC, CHAN JY. 2005. NADPH oxidase-derived superoxide anion mediates angiotensin II-induced pressor effect via activation of p38 mitogen-activated protein kinase in the rostral ventrolateral medulla. *Circ Res.* 14:772-780.
- FLETCHER EC, LESSKE J, CULMAN J, MILLER CC, and UNGER T. 1992. Sympathetic denervation blocks blood pressure elevation episodic hypoxia. *Hypertension.* 20:612-619.
- FLETCHER EC, LI R, BAO G. 1999. Renin activity and blood pressure in response to chronic episodic hypoxia. *Hypertension.* 34:309-314.
- FLETCHER EC, OROFINOVA N, BADER M. 2002. Blood pressure response to chronic episodic hypoxia: the renin-angiotensin system. *J Appl Physiol.* 92: 627-633.
- FLETCHER EC. 2001. Physiological consequences of intermittent hypoxia: systemic blood pressure. *J Appl Physiol.* 90: 1600-1605.
- FRUEHAUF JP, MEYSKENS F. 2007. Reactive Oxygen Species: A Breath of Life or Death. *Clin Cancer Res.* 13: 789-794.
- GREENBERG HE, SICA A, BATSON D, SCHARF SM. (1999). Chronic intermittent hypoxia increases sympathetic responsiveness to hypoxia and hypercapnia. *J Appl Physiol.* 86:298-305.
- GRIENGLING KK, SORESKU D, LASSEGUE B, USHIO-FUKAI M. 2000. Modulation of protein kinase activity and gene expression by ROS and their role in vascular physiology and pathophysiology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 20: 2175-2183.
- GOZAL D, TORRES JE, GOZAL YM, LITWIN SM. 1996. Effect of nitric oxide synthase inhibition on cardiorespiratory responses in the conscious rat. *J Appl Physiol.* 81: 2068-2077.
- GOZAL D, DANIEL JM, DOHANICH GP. 2001. Behavioral and anatomical correlates of chronic episodic hypoxia during sleep in the rat. *J Neurosci.* 21:2442-2450.
- ISCHIROPOULOS H. 2003. Biological selectivity and functional aspects of protein tyrosine nitration. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 305: 776-783.
- LAPLANTE MA, CHAMPLAIN J. 2006. The interrelation of the angiotensin and endothelin systems on the modulation of NAD(P)H oxidase. *Can J Physiol Pharmacol.* 84:21-28.
- LI YF, ROY SK, CHANNON KM, ZUCKER IH, PATEL KP. 2002. Effect of in vivo gene transfer of nNOS in the PVN on renal nerve discharge in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 282:H594-H601.
- LI R, ROW BW, KHEIRANDISH L, BRITTIAN KR, GOZAL E, GUO SZ, SACHLEBEN LR JR, GOZAL D. 2004. Nitric oxide synthase and intermittent hypoxia-induced spatial learning deficits in the rat. *Neurobiol Dis* 17: 44-53.
- LUO Y, KAUR C, LING EA. 2000. Hypobaric hypoxia induces fos and neuronal nitric oxide synthase expression in the paraventricular and supraoptic nucleus in rats. *Neurosci Lett.* 22:145-148.
- MACEY P, HENDERSON L, MACEY K, ALGER J. 2002. Brain Morphology Associated With Obstructive Sleep Apnea. *Am J Respir Crit Care Med.* 166: 1382-1387.
- MAKTABI MA, TODD M, STACHOVIC G. 1995. Angiotensin II Contributes to Cerebral Vasodilatation During Hypoxia in the Rabbit. *Stroke.* 26: 1871-1976.
- MANUKHINA EB, DOWNEY F, MALLET R. 2006. Role of Nitric in Cardiovascular Adaptation to Intermittent Hypoxia. *Exp Biol Med.* 231: 343-365.
- MORRELL M, McROBBIE D, QUEST RA, CUMMIN A, GHIASSI R, CORFIELD DR. 2003. Change in brain morphology associated with obstructive sleep apnea. *Sleep Medicine.* 4: 451-454.
- NABEYRAT E, JONES GE, FENWICK PS, BARNES PJ, DONNELLY LE. 2003. Mitogen-activated protein kinases mediate peroxynitrite-induced cell death in human bronchial epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 284: L1112-L1120.
- NANDURI RP. 2001. Physiological and Genomic Consequences of Intermittent Hypoxia Invited Review: Oxygen sensing during intermittent hypoxia: cellular and molecular mechanisms. *J Appl Physiol.* 90: 1986-1994.
- NANDURI RP, FIELDS DR, BAKER T, FLETCHER EC. 2001. Intermittent hypoxia: cell to system. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 281: L524-L528.

- NEUBAUER JA. 2001. Physiological and Genomic Consequences of Intermittent Hypoxia Invited Review: Physiological and pathophysiological responses to intermittent hypoxia. *J Appl Physiol.* 90: 1593-1599.
- PINZAR E, WANG T, GARRIDO M R, XU W, LEVY P, BOTTARI SP. 2005. Angiotensin II induces tyrosine nitration and activation of ERK1/2 in vascular smooth muscle cells. *FEBS Letters.* 579: 5100-5104.
- RAMANATHAN L, GOZAL D, SIEGEL JM. 2005. Antioxidant responses to chronic hypoxia in the rat cerebellum and pons. *J Neurochem.* 93: 47-52.
- SCHIEKE, BRIVIBA K, KLOTZ LO, SIES H. 1999. Activation pattern of mitogen-activated protein kinase elicited by peroxynitrite: attenuation by selenite supplementation, *FEBS Lett.* 448: 301-303.
- SICA AL, GREENBERG HE, RUGGIERO DA, SCHARF SM. 2000. Chronic-intermittent hypoxia: a model of sympathetic activation in the rat. *Resp Physiol.* 121:173-184.
- SMITH MA, RICHEY HARRIS PL, SAYRE LM, BECKMAN JS, PERRY G. 1997. Widespread peroxynitrite-mediated damage in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 17: 2653-2657.
- TOUYZ RM, SCHIFFRIN EL. 2000. Signal transduction mechanism mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharm Rev.* 52:639-672.
- TURKO IV, MURAD F. 2002. Protein nitration in cardiocascular diseases, *Pharm. Rev.* 54:619-634.
- WANG P, ZWEIER JL. 1996. Measurement of nitric oxide and peroxynitrite generation in the postischemic heart. Evidence for peroxynitrite-mediated reperfusion injury. *J Biol Chem* 271: 29223-29230.
- XU W, CHI L, ROW BW, XU R, KE Y, XU B, LUO C, KHEIRANDISH L, GOZAL D, LIU R. 2004. Increased oxidative stress is associated with chronic intermittent hypoxia-mediated brain cortical neuronal cell apoptosis in a mouse model of sleep apnea. *Neurosci* 126: 313-323.
- WASICKO MJ, MELTON JE, NEUBAUER JA, KRAWCIW N and EDELMAN NH. 1990. Cervical sympathetic and phrenic nerve responses to progressive brain hypoxia. *J Appl Physiol.* 68: 53-58.
- YAMAUCHI M, NAKANO H, MAEKAWA J, OKAMOTO Y, OHNISHI Y, SUGI T, KIMURA H. 2005. Oxidative Stress in Obstructive Sleep Apnea. *CHEST.* 127:1674-1679.
- YUAN ZM, CHEN BY, WANG PX, LI SY, CHEN YL AND DONG LX. 2004. Changes of angiotensin II and its receptor during the development of chronic intermittent hypoxia-induced hypertension in rats. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi.* 27: 577-580.
- ZHANG P, WANG YZ, KAGAN YZ, BONNER JC. 2000. Peroxynitrite targets the epidermal growth factor receptor, Raf-1, and MEK independently to activate MAPK. *J Biol Chem.* 275: 22479-22486.