

# Regulación del equilibrio hidromineral por el sistema renina angiotensina cerebral: papel de las especies reactivas de oxígeno

## Renin angiotensin system in the regulation hydromineral metabolism: role of the reactive oxygen species

MAIDER VARELA, JORGE ARZOLA, SARA DE JESÚS Y ANITA ISRAEL

### Resumen

La administración central de angiotensina II (ANG II) aumenta la excreción urinaria de sodio y potasio y disminuye el volumen urinario. Se ha reportado que las especies reactivas de oxígeno (EROs), producto de la estimulación de la NAD(P)H oxidasa, median las acciones periféricas de la ANG II y forman parte de la fisiopatología de las enfermedades neurodegenerativas, sin embargo se conoce poco acerca de su participación en la regulación del balance hidromineral mediada por la ANG II en el sistema nervioso central (SNC). Con el fin de estudiar el papel de las EROs en el metabolismo hidromineral mediado por la ANG II cerebral, se diseñaron experimentos en los que se interrumpe la cascada de señalización de la NAD(P)H oxidasa mediante el uso de antagonistas selectivos. La administración intracerebroventricular (ICV) de ANG II en ratas produjo una disminución del volumen urinario a la hora, y un aumento en la excreción urinaria de sodio y potasio durante el período de las seis horas de recolección. La administración de un inhibidor de la NAD(P)H oxidasa, la apocinina (APO), de un mimético de la superóxido dismutasa, el tempol (TEM), y de un inhibidor de la proteína quinasa C, la cheleritrina (CHE), revirtieron el efecto natriurético y kaliurético de la ANG II-ICV y no afectaron significativamente la antiuresis. Estos resultados proporcionan evidencia que apoya el concepto de la participación de las EROs en la señalización de la ANG II en la función de la regulación del balance hidromineral central.

**Palabras clave:** Angiotensina II, natriuresis, apocinina, cheleritrina, tempol.

### Abstract

Central administration of angiotensin II (Ang II) is known to reduce urinary volume and to increase sodium and potassium excretion. Recently, a novel signaling mechanism for Ang II in the periphery has been shown to involve NAD(P)H oxidase-derived reactive oxygen species (ROS), which are important intracellular messengers of many physiological and pathological effects of circulating Ang II, and are best known for their role in the pathogenesis of primary neurodegenerative diseases. However, the precise pathways and signaling mechanisms used by Ang II in the brain are incompletely understood. In order to establish the involvement of ROS in central Ang II-dependent antiuresis, natriuresis and kaliuresis, we examined the effect of a selective NAD(P)H oxidase inhibitor, apocynin, the SOD mimetic, tempol, and the protein kinase C (PKC) inhibitor, chelerythrine. Intracerebroventricular administration of Ang II to conscious hydrated rats resulted in a significant decrease in urinary volume; and an increased sodium and potassium excretion during the 6-hour period of urine collection. Interference with the NAD(P)H oxidase signaling by central administration of apocynin, tempol or chelerythrine, blunted the natriuretic and kaliuretic effect induced by central administration of Ang II, without affecting its antidiuretic action. These studies demonstrate that increases of urinary sodium and potassium excretion elicited by IVT-Ang II are mediated by NAD(P)H-oxidase-dependent production of superoxide and PKC activation.

**Key words:** Angiotensin II, natriuresis, apocynin, chelerythrine, tempol.

## Introducción

El sistema renina-angiotensina (SRA) ejerce un papel importante en la regulación de la actividad simpática, la presión arterial y el balance hidromineral (Averill y col., 2000; Seltzer y col., 2004). La administración central de angiotensina II (ANG II) produce aumento de la presión arterial, de la liberación de vasopresina, de la ingesta de agua y sal, de la excreción urinaria de sodio y potasio, y disminuye el volumen urinario y los niveles plasmáticos de sodio.

El mecanismo de señalización de la ANG II en el cerebro no ha sido esclarecido hasta el presente; sin embargo se sabe que las especies reactivas de oxígeno (EROs) son mediadores celulares importantes en muchos de sus efectos fisiológicos y patológicos. Las EROs, tales como el superóxido y el peróxido de hidrógeno, son moléculas derivadas de la reducción del oxígeno que, en oportunidades, actúan como segundos mensajeros en diversos tipos celulares, entre las que se encuentran las células cardiovasculares. Las EROs tienen varios orígenes, aparte de la síntesis mitocondrial, son producidas por enzimas tales como la xantina oxidasa, la lipooxigenasa, la ciclooxigenasa, la sintasa del óxido nítrico y la NAD(P)H oxidasa.

El metabolismo de las EROs está coordinado por diversas enzimas antioxidantes tales como la superóxido dismutasa que, mediante la dismutación de dos moléculas de superóxido, produce peróxido de hidrógeno, una ERO más estable, y que a su vez es convertido en agua por la acción de la catalasa y la glutatión peroxidasa.

Las EROs son producidas como respuesta a múltiples estímulos tales como hormonas, citokinas, cambios en la osmolaridad, factores de crecimiento, entre otros, mediante la estimulación de diversos receptores de membrana capaces de activar quinasas intracelulares promoviendo respuestas como la inflamación, la diferenciación y el crecimiento. Siendo consideradas mensajeros intracelulares, activan factores de transcripción que tienen múltiples funciones en la fisiología y fisiopatología de las células vasculares.

La evidencia reciente establece una relación entre la ANG II y la producción de EROs en diferentes patologías de tipo cardiovascular. Así, estudios en células de aorta aisladas de ratas Sprague-Dawley revelan que las EROs provenientes de la NAD(P)H oxidasa median la hipertrofia del músculo liso vascular y la hipertensión arterial inducida por ANG II. De igual forma, la infusión de ANG II causa disfunción endotelial, por el incremento de la actividad de la NAD(P)H oxidasa y con el consiguiente aumento de la producción del anión superóxido. El mecanismo

por el cual la ANG II ejerce estos efectos no se encuentra claro, sin embargo se sabe que la activación de la proteína quinasa C, de la tirosina quinasa y la producción de fosfatidilinositol-3-quinasa se encuentran involucradas. Igualmente, se ha demostrado que la ANG II produce un aumento de la expresión de las subunidades que integran a la NAD(P)H oxidasa como lo son la p22phox, nox1, nox4, y gp91phox, así como un incremento significativo de la actividad de la proteína quinasa C (PKC) (Mollnau y col., 2002).

Existe evidencia que indica la presencia de los componentes de la NAD(P)H oxidasa en el sistema nervioso central (SNC), específicamente se ha reportado en células en cultivo del SNC (Suzukawa y col., 2000), y algunas de las subunidades han sido localizadas en el cerebro de roedores (Serrano y col., 2003). Aún más, se ha descrito actividad de la NAD(P)H oxidasa en áreas selectas del SNC que participan en la regulación de la función cardiovascular, el eflujo simpático, el equilibrio hidromineral y la función neuroendocrina como lo son el órgano subfornical (OSF), el núcleo del tracto solitario, la región ventrolateral rostral del bulbo y el hipotálamo (Chan y col., 2005; Erdős y col., 2006; Wang y col., 2004; Zimmerman y col., 2004).

Se ha sugerido que el superóxido derivado de la NAD(P)H oxidasa en el SNC cumple un papel en la apoptosis neuronal, en la isquemia por accidente cerebrovascular y en las enfermedades degenerativas como el Parkinson y el Alzheimer (Tammariello y col., 2000; Walter y col., 1997; Floyd, 1999). Sin embargo, además de su papel en los procesos fisiopatológicos, las EROs producidas a bajas concentraciones se encuentran implicadas en los procesos fisiológicos del SNC, especialmente en las funciones mediadas por la angiotensina II, como son la regulación cardiovascular, la ingesta de agua y la estimulación simpatoexcitatoria (Leiter y col., 2005; Erdős y col., 2006; Gao y col., 2004; Zimmermann y col., 2004).

Así, se sabe que ciertas acciones centrales de la ANG II producen la liberación de norepinefrina desde neuronas catecolaminérgicas por un incremento de la actividad eléctrica. Se ha sugerido la participación del anión superóxido como una molécula señalizadora a nivel intracelular en la modulación de la actividad nerviosa simpática por parte de la ANG II. En efecto, se demostró que la transfección de un adenovirus codificado para la Cu/Zn superóxido dismutasa reduce la simpatoexcitación en ratones con infarto al miocardio crónico, indicando que la estimulación del receptor AT<sub>1</sub> con la ANG II activa el eflujo simpático por estimulación de la NAD(P)H oxidasa y la producción de las EROs (Lindley y col.,

2004). De igual forma, se demostró que la administración intracerebroventricular de ANG II incrementa la actividad simpática renal en conejos sanos y en mayor proporción, en los que se les ha inducido infarto al miocardio experimental e insuficiencia cardíaca crónica. Este incremento del eflujo simpático estuvo asociado con un aumento de la producción de EROs en el área rostro-ventrolateral del bulbo y ambos efectos fueron bloqueados con el tratamiento ICV con un antagonista del receptor  $AT_1$  como el losartan, un SOD mimético como el tempol y un bloqueante de la NAD(P)H oxidasa, la apocinina (Gao y col., 2004). Estos hallazgos indican que el eflujo simpático y la simpatoexcitación en la insuficiencia cardíaca crónica se encuentran mediados por la ANG II, el receptor  $AT_1$  y las EROs.

La evidencia reciente muestra que el incremento de la presión arterial y la disminución de la frecuencia cardíaca inducida por la administración central de ANG II, son bloqueados cuando se sobre-expresa la superóxido dismutasa o se administra por vía intracerebroventricular (ICV) un inhibidor de la NAD(P)H oxidasa (Erdős y col., 2006). Aún más, Lindley y col. (2004) han sugerido que las EROs median la señalización de la ANG II en el cerebro, y establecen la relación entre dicha cascada y el desarrollo de insuficiencia cardíaca por infarto al miocardio. Efectivamente, mediante técnicas inmunohistoquímicas para detectar la inducción de la familia de c-fos, FosB, Fra1 y Fra2, se demostró que las neuronas de los núcleos paraventricular y supraóptico son crónicamente activadas durante el desarrollo de la insuficiencia cardíaca, siendo el anión superóxido el que conduce la cascada señalizadora (Lindley y col., 2004). Adicionalmente, se ha demostrado que el incremento de la presión arterial inducido por la infusión crónica de ANG II se asocia con la elevación de los niveles del anión superóxido en el OSF, una estructura circunventricular localizada fuera de la barrera hematoencefálica y rica en receptores  $AT_1$ . La transfección viral selectiva de la superóxido dismutasa al OSF previno el desarrollo de la hipertensión y de la elevación de la producción del anión superóxido, lo que demuestra que el incremento de la producción intracelular del anión superóxido en el OSF es crítico en el desarrollo de la hipertensión inducida por ANG II (Zimmerman y col., 2004).

Esta evidencia experimental proporciona una base para la comprensión del papel de las EROs como segundos mensajeros en los procesos fisiológicos del cerebro y en la regulación de la función cardiovascular; sin embargo se conoce muy poco sobre el papel de los mecanismos redox en el metabolismo hidromineral mediado por el sistema renina-

angiotensina central. Por esta razón examinamos el papel de la cascada de señalización dependiente de la NAD(P)H oxidasa en la respuesta natriurética, kaliurética y antidiurética inducida por la administración central de ANG II, utilizando para ello un inhibidor selectivo de la NAD(P)H oxidasa, la apocinina, un mimético de la superóxido dismutasa, el 4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametilpiperidina 1-oxil (tempol), y un inhibidor de la proteína quinasa C (PKC), la cheleritrina.

## Materiales y métodos

### ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Se utilizaron ratas machos de la cepa Sprague-Dawley, de 200 a 250 gramos de peso corporal procedentes del Bioterio del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel", las cuales fueron mantenidas con agua y alimento estándar para animales de laboratorio (Ratarina®) *ad libitum*. Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité de Bioterio de la Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela.

### CANULACIÓN INTRACEREBROVENTRICULAR (ICV)

Los animales fueron canulados, bajo anestesia con pentobarbital sódico (40 mg/kg, i.p.), mediante el uso de un aparato estereotáxico (David Kopf Instruments®), para lo cual se colocó una aguja hipodérmica de 20 GA, de 4 mm de longitud en el ventrículo lateral izquierdo, a 1 mm caudal a la sutura coronal y a 1,5 mm lateral a la sutura sagital. La administración ICV de los diferentes tratamientos se realizó mediante el uso de una inyectora Hamilton, acondicionada para permitir su adecuada penetración a través de la cánula. En todos los casos, se confirmó la canulación postmortem mediante administración de 5  $\mu$ l de solución colorante Fast Green (Sigma Chemicals Co., MO, USA), incluyendo, sólo aquellos animales en los que se observó una distribución uniforme del colorante en los ventrículos cerebrales (Severs y col., 1970).

Los animales de experimentación fueron divididos al azar en cuatro grupos experimentales para la administración de los tratamientos a seguir:

I. *Bloqueo de la NAD(P)H-oxidasa con apocinina*: 1. Solución fisiológica (NaCl 0,9%, 5  $\mu$ l ICV); 2. Angiotensina II (50 pmol/5 $\mu$ l); 3. Antagonista de NAD(P)H-oxidasa: apocinina (33  $\mu$ g/kg/5  $\mu$ l, ICV, 15 minutos antes del inicio del experimento); 4. Apocinina+ANG II.

II. *Administración de un SOD mimético: el tempol*: 1. Solución fisiológica (NaCl 0,9%, 5  $\mu$ l ICV); 2. Angiotensina II (50 pmol/5 $\mu$ l); 3. Tempol (100  $\mu$ g/5 $\mu$ l,

ICV, 15 minutos antes del inicio del experimento); 4. Tempol+ANG II.

III. Bloqueo de la proteína kinasa C (PKC) con cloruro de cheleritrina (CH): 1. Solución fisiológica (NaCl 0,9%, 5  $\mu$ l ICV); 2. Angiotensina II (50 pmol/5 $\mu$ l); 3. Antagonista de PKC (CH) (50  $\mu$ M/5 $\mu$ l ICV, 15 minutos antes del inicio del experimento); 4. CH+ANG II.

Inmediatamente después de cada uno de los tratamientos los animales recibieron una carga oral de agua (20 ml/kg, p.c.) y fueron colocados en jaulas metabólicas individuales sin acceso a agua ni alimento. Se recolectaron muestras de orina a las 1, 3 y 6 h. Se determinó la excreción urinaria de sodio y potasio.

#### DETERMINACIÓN DE NA<sup>+</sup> Y K<sup>+</sup> URINARIO

La cantidad de sodio y potasio en las muestras de orina recolectadas se determinó por fotometría de llama (Corning® 405 de Corning Medical Instruments, UK). Los resultados se expresaron en  $\mu$ Eq/100 g, p.c.

#### ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los resultados se expresaron como la media, más o menos el error estándar de la media ( $X \pm E.E.M$ ). La significancia estadística fue determinada usando la prueba de «t» de Student o el análisis de varianza de dos vías (ANOVA), y por el rango estadístico de Student-Newman-Keul. Se consideró como estadísticamente significativos los valores de  $p$  menores de 0,05 ( $p < 0,05$ ).

## Resultados

### Efecto de la administración central de la apocinina sobre la acción renal de la ANG II-ICV

En la figura 1 se muestra el efecto de la apocinina sobre la acción urinaria de la ANG II administrada centralmente. El análisis de varianza de dos vías y la prueba de Newman-Keul revelaron que en este grupo experimental, la ANG II reduce significativamente el volumen urinario a la primera hora, efecto que es revertido a las 3 y 6 horas. El efecto de la ANG II sobre el volumen urinario estuvo asociado con un incremento de la excreción de sodio y potasio urinario a los períodos de recolección de orina de 3 y 6 hrs. El pretratamiento central con el inhibidor de la NAD(P)H oxidasa, la apocinina, no alteró significativamente la acción de la ANG II sobre el volumen urinario, sin embargo bloqueó su efecto natriurético y kaliurético (N= 12-30 por grupo). (Vol: V-ANG II<V-S=APO-ANG II>APO-S; ANOVA  $p < 0,01$ ). (Excreción de sodio: APO-S=APO-ANG II=V S<V-ANG II, ANOVA  $p < 0,01$ ).

### Efecto de la administración central del tempol, un SOD mimético, sobre la acción renal de la ANG II-ICV

En la figura 2 se muestra que la ANG II-ICV reduce significativamente el volumen urinario a la hora, efecto que se revierte a las 3 y 6 HRS. De igual forma, la acción de la ANG II estuvo asociada a un

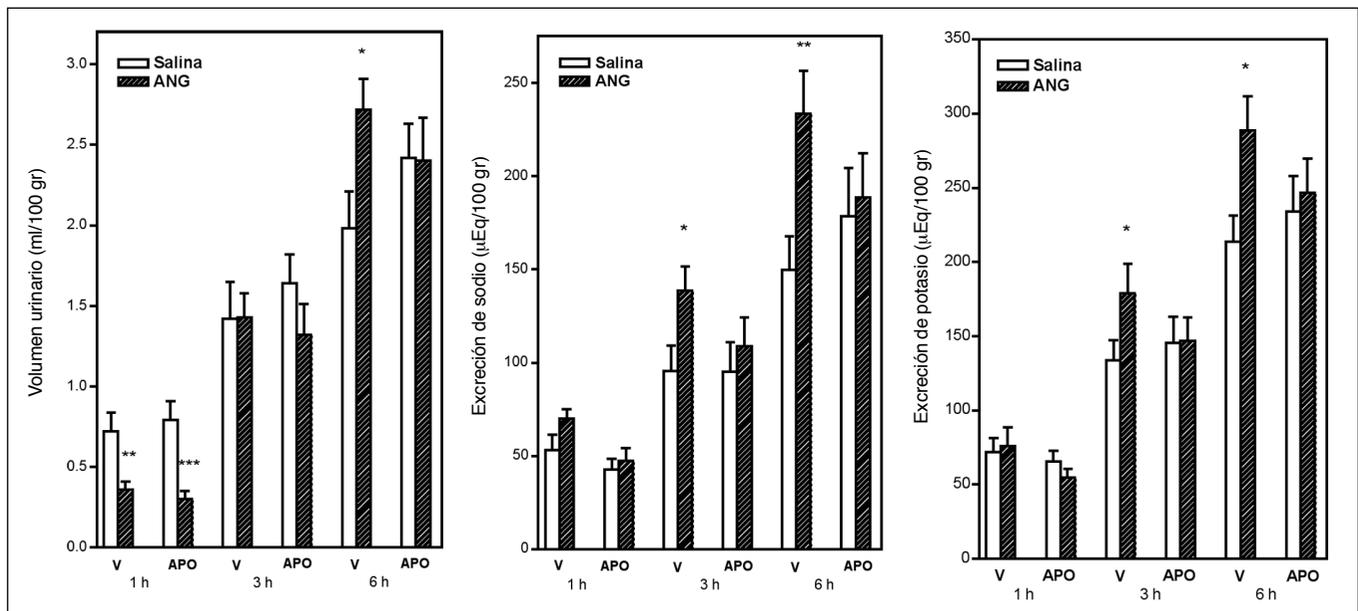


Figura 1. EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN CENTRAL DEL INHIBIDOR ESPECÍFICO DE LA NAD(P)H OXIDASA, LA APOCININA, SOBRE EL VOLUMEN URINARIO, LA EXCRECIÓN DE SODIO Y POTASIO EN RATAS TRATADAS CON ANGIOTENSINA II. Los grupos recibieron solución fisiológica (NaCl 0,9%), 5  $\mu$ l ICV o angiotensina II (50 pmol/5 $\mu$ l) o el antagonista de NAD(P)H-oxidasa: apocinina (33  $\mu$ g/kg/5  $\mu$ l, ICV, 15 minutos antes del inicio del experimento) o APO+ANG II. (N= 12-30 por grupo). \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  comparado con su control.

aumento de la excreción urinaria de sodio y potasio a las 1, 3 y 6 horas. El pretratamiento con el tempol, un superóxido dismutasa mimético, no alteró el efecto antidiurético de la ANG II-ICV, pero bloqueó su acción natriurética y kaliurética a las 1, 3 y 6 hrs (N= 12-24 por grupo). (Vol: V-ANG II<V S=APO-ANG II>APO-S; ANOVA,  $p<0,01$ ). (Excreción de sodio: APO-S=APO-ANG II=V-S<V-ANG II, ANOVA:  $p<0,01$ ).

### **Efecto de la administración central del inhibidor de la PKC, la cheleritrina, sobre la acción renal de la ANG II-ICV**

En la figura 3 se muestra el volumen urinario y la excreción de sodio y potasio en ratas hidratadas tratadas con cheleritrina. El análisis de varianza de dos vías y la prueba de Newman-Keul demostraron que la ANG II-ICV reduce significativamente el volumen urinario a la hora, e incrementa la excreción urinaria de sodio y potasio a las 3 y 6 horas. El inhibidor selectivo de la PKC, la cheleritrina, administrado centralmente no alteró el efecto antidiurético de la ANG II-ICV, sin embargo bloqueó completamente las acciones natriuréticas y kaliuréticas a las 3 y 6 horas (N= 12-26 por grupo). (Vol: V-ANG II<V S=APO-ANG II>APO-S; ANOVA  $p<0,01$ ). (Excreción de sodio: APO-S=APO-ANG II=V-S<V-ANG II, ANOVA  $p<0,01$ ).

## **Discusión**

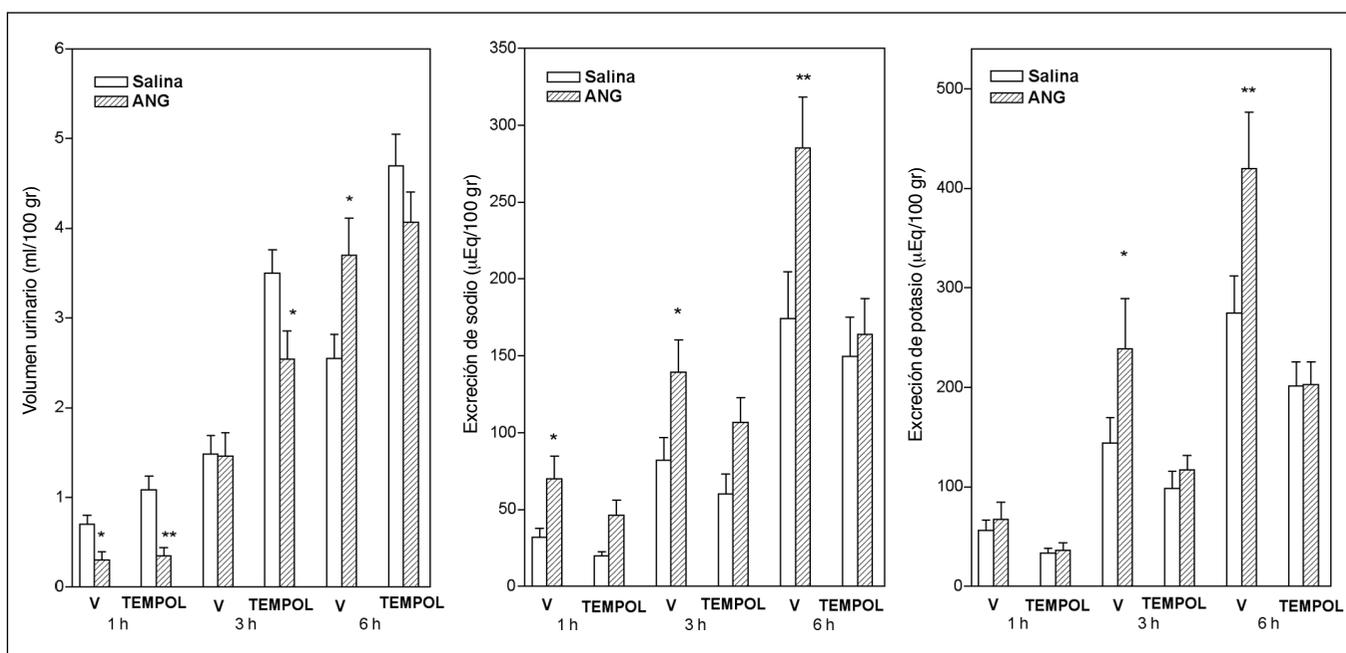
La estabilidad del medio interno requiere de mecanismos fisiológicos complejos capaces de man-

tener las concentraciones de electrolitos dentro de límites adecuados para la supervivencia del organismo. Todos esos procesos son debidamente regulados e integrados de manera que conforman una unidad global en el ser vivo. En los animales superiores, uno de esos mecanismos que han evolucionado en el tiempo como regulador del medio interno es el sistema renina-angiotensina (SRA). A nivel periférico, el SRA constituye uno de los más importantes sistemas que participan en el control de los niveles de agua y sodio en el organismo, así como en la regulación de la presión arterial.

La evidencia demuestra que existe en el cerebro un sistema renina-angiotensina activo, el cual participa en el control homeostático y cardiovascular. En efecto, todos los componentes del SRA, así como sus ARNm, han sido detectados en diferentes áreas del sistema nervioso central (Zini y col., 1996).

La administración central de ANG II o renina produce aumento de la presión arterial, dipsogenia, aumento del apetito por la sal, antidiuresis y, contrariamente a lo que produce periféricamente, incrementa la excreción urinaria de sodio (Itoh y col., 1988; Wright y Harding, 1997; Unger y col., 1996; Barbella y col., 1993). El mecanismo y los posibles efectores involucrados en la natriuresis inducida por la ANG II, no están aún bien establecidos.

Se conoce que las acciones fisiológicas que media la ANG II en el sistema nervioso central se encuentran relacionadas con las EROs y la estimulación



**Figura 2. EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN CENTRAL DEL SOD MIMÉTICO, EL TEMPOL, SOBRE EL VOLUMEN URINARIO, LA EXCRECIÓN DE SODIO Y POTASIO EN RATAS TRATADAS CON ANGIOTENSINA II. Los grupos recibieron solución fisiológica (NaCl 0,9%), 5 μl ICV o angiotensina II (50 pmol/5μl) o tempol (100 μg/5 μl, ICV, 15 minutos antes del inicio del experimento) o tempol+ANG II. (N= 12-24 por grupo). \* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$  comparado con su control.**

de la NAD(P)H oxidasa (Sun y col., 2005; Zimmerman y col., 2004; Gao y col., 2005). En efecto, se ha demostrado que la sobre-expresión de la isoforma de la proteína Rac1 dominante-negativa (carente) en el ratón bloquea la respuesta presora, bradicárdica y dipsogénica inducida por la ANG II mientras que la sobre-expresión de la Rac1 la incrementa (Zimmerman y col., 2002). La respuesta presora y dipsogénica es también abolida por la administración ICV de gp91ds-tat, un inhibidor de la NAD(P)H oxidasa (Sun y col., 2005). Adicionalmente, se ha demostrado que la ANG II incrementa la producción de superóxido dependiente de la NAD(P)H oxidasa, así como la tasa de disparo de las neuronas en cultivos neuronales de hipotálamo y tallo cerebral, efecto que es atenuado por la gp91ds-tat (Sun y col., 2005). Aún más, la respuesta presora y bradicardizante inducida por la administración central de ANG II es abolida por la administración central de la apocinina, un compuesto que inhibe el ensamblaje de la subunidad p47phox de la NAD(P)H con el complejo de la enzima unido a la membrana (Erdős y col., 2006).

Nuestros resultados muestran que el incremento en la excreción urinaria de sodio y potasio inducidos por la ANG II-ICV es inhibido completamente con el pretratamiento con la apocinina, lo cual indica, de forma inequívoca, que la producción de superóxido dependiente de la NAD(P)H oxidasa media la natriuresis y kaliuresis inducida por la administración central de angiotensina II en ratas conscientes.

Con el fin de establecer el papel del superóxido como molécula señalizadora en la acción central de la ANG II sobre el metabolismo hidromineral, empleamos el tempol, una molécula atrapadora de superóxido (Mok y col., 1998) capaz de normalizar la presión arterial y la producción de superóxido en modelos animales de hipertensión (Schnackenberg y col., 1998; Noshiyama y col., 2001). Los efectos natriurético y kaliurético de la ANG II son bloqueados completamente, *in vivo*, por el tempol, lo cual indica la participación del anión superóxido en el mecanismo de regulación del balance hidromineral mediado por la ANG II en el sistema nervioso central.

Hay que hacer notar que el efecto antidiurético de la ANG II fue resistente al bloqueo de la señalización de la vía de la NAD(P)H oxidasa, lo que sugiere que bajo nuestras condiciones experimentales, la secreción de vasopresina inducida por la ANG II es independiente de la producción de las EROs.

Se ha demostrado que la estimulación del receptor AT<sub>1</sub> neuronal por la ANG II activa a la PKC y a la quinaasa dependiente de calcio-calmodulina, las cuales tienen un papel crítico en la regulación de la actividad nerviosa y de la corriente de potasio (I<sub>kv</sub>) neuronal (Sumners y col., 2002). Hay evidencia experimental que establece una relación entre estas dos quinasas y la producción de las EROs en muchos tipos de células, incluyendo a las neuronas (Lassegue y Clempus, 2003). Fleegal y Sumners (2003) demostraron que la ANG II estimula la actividad de ambas quinasas en el

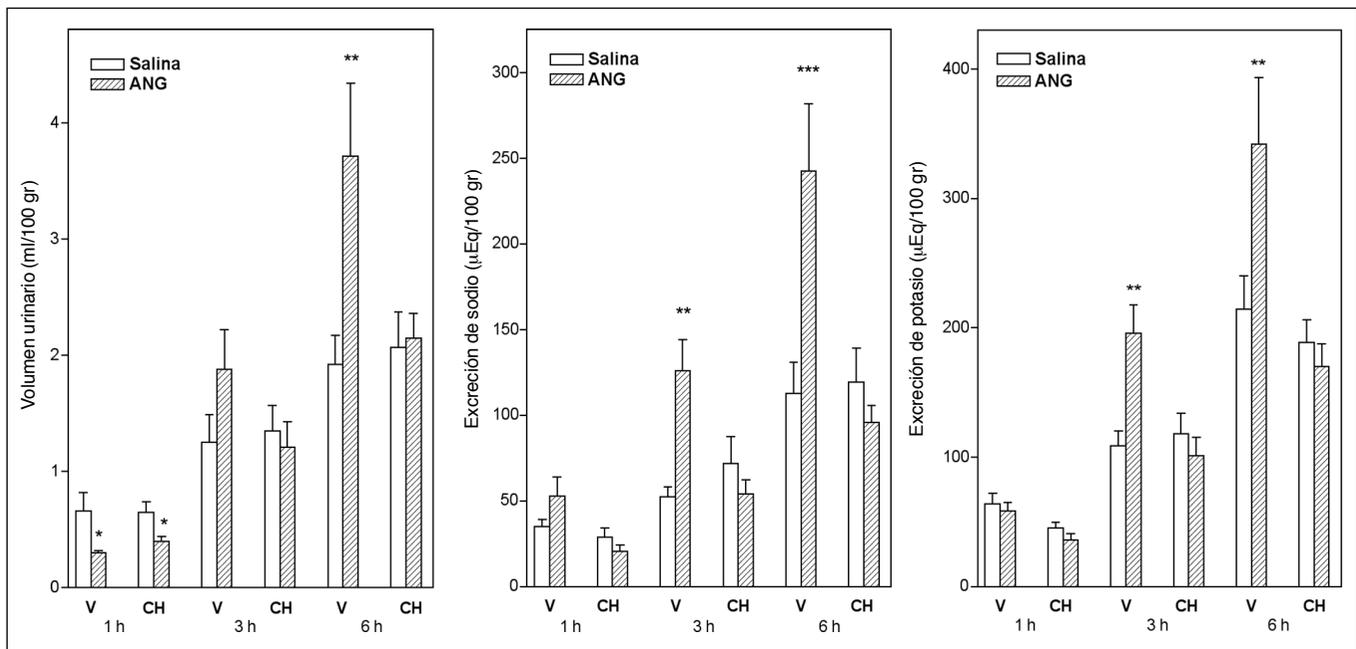


Figura 3. EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN CENTRAL DEL INHIBIDOR ESPECÍFICO DE LA PKC, LA CHELITRINA, SOBRE EL VOLUMEN URINARIO, LA EXCRECIÓN DE SODIO Y POTASIO EN RATAS TRATADAS CON ANGIOTENSINA II. Los grupos recibieron solución fisiológica (NaCl 0,9%), 5  $\mu$ l ICV o angiotensina II (50 pmol/5 $\mu$ l) o inhibidor de la PKC (CH) (50  $\mu$ M/5 $\mu$ l ICV, 15 minutos antes del inicio del experimento) o CH+ANG II. (N= 12-26 por grupo). \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 comparado con su control.

hipotálamo y que su inhibición atenúa la acción dipsogénica de la ANG II-ICV. Estos resultados, y los obtenidos en nuestro laboratorio utilizando un inhibidor de la PKC, la cheleritrina, en donde se evidencia un bloqueo completo de la excreción urinaria de sodio y potasio inducida por la ANG II, apoyan la posibilidad de que la estimulación de la PKC forma parte del mecanismo mediante el cual la ANG II ejerce su efecto sobre la regulación hidroelectrolítica del medio interno.

El mecanismo intracelular mediante el cual la NAD(P)H oxidasa podría estar implicada en la acción central de la angiotensina II no está claro aún. En los tejidos periféricos, existe evidencia de que la actividad de la NAD(P)H oxidasa es regulada por la PKC (Griendling y col., 2000; Lassegue y Clempus, 2003), enzima que también es activada por la ANG II en neuronas (Sumners y Fleegal, 2002). Adicionalmente, el anión superóxido producido en respuesta a la estimulación de la NAD(P)H oxidasa por la ANG II, secuestra el óxido nítrico, el cual se sabe que inhibe la actividad del sistema nervioso simpático (Krukoff, 1999; Zanzinger, 2002); por lo que la reducción de la biodisponibilidad del óxido nítrico generaría simpatoexcitación. Se ha demostrado, también, que las EROs ejercen un efecto modulador de la liberación de  $Ca^{+2}$  (Volk y col., 1997) y que existe relación entre la NAD(P)H oxidasa y el metabolismo de los fosfoinosítidos (Bravo y col., 2001). Finalmente, se sabe que las EROs son capaces de alterar la función de los canales de potasio en células del músculo liso vascular (Armstead, 2001), y que en el SNC la angiotensina II también es capaz de inhibir las corrientes de  $K^{+}$  en neuronas aumentando la tasa de descarga (Sun y col., 2005).

Estos hallazgos nos permiten inferir que la activación de los receptores  $AT_1$ , acoplados a proteínas G, conlleva a la estimulación de la proteína quinasa C y a la modulación de los canales de potasio y el disparo neuronal; o bien a la hidrólisis de fosfoinosítidos y a la movilización de calcio. Estas rutas de señalización podrían ser las responsables de la acción presora, dipsogénica y natriurética de la ANG II en el SNC.

## Referencias bibliográficas

- Armstead WM. 2001. Vasopressin-induced protein kinase C-dependent superoxide generation contributes to ATP-sensitive potassium channel brain injury. *Stroke* 32:1408-1414.
- Averill DB, Diz DI. 2000. Angiotensin peptides and baroreflex control of sympathetic outflow: pathways and mechanisms of the medulla oblongata. *Brain Res Bull* 51:119-128.
- Barbella Y, Cierco M, Israel A. 1993. Effect of losartan a non peptide angiotensin II receptor antagonist on drinking behavior and renal actions of centrally administered renin. *P.S.E.B.M.* 202: 401-406.
- Bravo J, Karathanassis D, Pacold CM, Pacold ME, Ellison CD, Anderson KE, Butler PJG, Lavenir I, Perisic O, Hawkins PT, Stephens L, Willimans RL. 2001. The crystal structure of the PX domain from, p40(phox) bound to phosphatidylinositol 3 phosphate. *Mol Cell* 8:829-839.
- Bobik A. 2003. Intracellular signaling pathways regulating vascular NAD(P)H oxidase and hypertension: an opportunity for development of novel antihypertensive agents?. *J Hypertension* 21: 859-861.
- Chan S, Hsu K, Huang Ch, Wang L, Ou Ch, Chan J. 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.* 97:772-780.
- Erdős B, Broxson Ch, King M, Scarpace P, Tümer N. 2006. Acute pressor effect of central angiotensin II is mediated by NAD(P)H-oxidase-dependent production of superoxide in the hypothalamic cardiovascular regulatory nuclei. *J Hypertension* 24:109-116.
- Fleegal M, Sumners C. 2003. Drinking behavior elicited by central injection of angiotensin II: roles for protein kinase C and  $Ca^{+2}$ /Calmodulin-dependent protein kinase II. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 285:R632-R640.
- Floyd RA. 1999. Antioxidants, oxidative stress, and degenerative neurological disorders. *Proc Soc Exp Biol Med* 222:236-245.
- Gao L, Wang W, Li Y, Schultz H, Liu D, Cornish K, Zucker I. 2005. Sympathoexcitation by central ANG II: roles for  $AT_1$  receptor upregulation and NAD(P)H oxidase in RLVM. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288: H2271-H2279.
- Gao L, Wang W, Li Y, Schultz H, Liu D, Cornish K, Zucker I. 2004. Superoxide mediates sympathoexcitation in heart failure, roles of angiotensin II and NAD(P)H oxidase. *Circ Res* 95:937-944.
- Griendling KK, Ushio-Fukai M. 2000. Reactive oxygen species as mediators of angiotensin II signaling. *Regul Pept* 91:21-27.
- Itoh H, Nakao K, Yamada T, Morji N, Shiono S, Sugawara A, Saito Y, Mukoyama M, Arai H, Imura H. 1988. Central interaction of brain atrial natriuretic polypeptide (ANP) system and the brain renin-angiotensin system in ANP secretion from the heart: evidence for possible brain-heart axis. *Can J Physiol Pharmacol* 66:255-261.
- Kazama K, Anrather J, Zhou P, Girouard H, Frys K, Milner T, Iadecola C. 2004. Angiotensin II impairs neurovascular coupling in neocortex through NAD(P)H oxidase-derived radicals. *Circ Res.* 95:1019-1026.
- Krukoff TL. 1999. Central actions of nitric oxide in regulation of autonomic functions. *Brain Res Brain Res Rev* 30: 52-65.
- Lassegue B, Clempus RE. 2003. Vascular NAD(P)H oxidase: specific features, expression, and regulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 285:R277-R297.

- Leiter LA, Lewanczu KRZ. 2005. Of the renin-angiotensin system and reactive oxygen species type 2 diabetes and angiotensin II inhibition. *Am J Hypertens* 18:121-128.
- Lindley T, Doobay M, Sharma R, Davisson R. 2004. Superoxide is involved in the central nervous system activation and sympathoexcitation of myocardial infarction-induced heart failure. *Circ Res* 94:402-409.
- Mollnau H, Wendt M, Szöcs K, Lassègue B, Schulz E, Oelze M, Li H, Bodenschatz M, August M, Kleschyov A, Tsilimingas N, Walter U, Förstermann U, Meinertz T, Griendling K, Münzel T. 2002. Effects of angiotensin II infusion on the expression and function of NAD(P)H oxidase and components of nitric oxide/cGMP signaling. *Circ Res* 90:e58-e65.
- Mok JS, Paisley K, Martin W. 1998. Inhibition of nitroergic neurotransmission in the bovine retractor penis muscle by an oxidant stress: effects of superoxide dismutase mimetic. *Br J Pharmacol* 124: 111-118.
- Nishiyama A, Fukui T, Fujisawa Y, Rahman M, Tian RX, Kimura S, Abe Y. 2001. Systemic and regional hemodynamic responses to tempol in angiotensin II-infused hypertensive rats. *Hypertension* 37:77-83.
- Ohtsu H, Frank G, Utsunomiya H, Eguchi S. 2005. Redox-dependent protein kinase regulation by angiotensin II: mechanistic insights and its pathophysiology. *Antioxid Redox Signal* 7:1315-1326.
- Schnackenberg CG, Welch WJ, Wilcox CS. 1998. Normalization of blood pressure and renal vascular resistance in SHR with a membrane-permeable superoxide dismutase mimetic: role of nitric oxide. *Hypertension* 32: 59-64.
- Seltzer A, Bregonzio C, Armando I, Baiardi G, Saavedra JM. 2004. Oral administration of an AT<sub>1</sub> receptor antagonist prevents the central effects of angiotensin II in spontaneously hypertensive rats. *Brain Res* 1028:9-18.
- Serrano F, Kolluri NS, Wientjes FB, Card JP, Klann E. 2003. NAD(P)H oxidase immunoreactivity in the mouse brain. *Brain Res* 988:193-198.
- Seshiah P, Weber D, Rocic P, Valppu L, Taniyama Y, Griendling K. 2002. Angiotensin II stimulation of NAD(P)H. *Circ Res* 91:406-413.
- Severs WB, Summy-Long J, Taylor J, Connor JA. 1970. Central effect of angiotensin: release of pituitary pressor material. *J Pharmacol Exp Ther* 74: 27-34.
- Suzukawa K, Miura K, Mitsushita J, Resau J, Hirose K, Crystal R, Kamata T. 2000. Nerve growth factor-induced neuronal differentiation requires generation of Rac1-regulated reactive oxygen species. *J Biol Chem* 275:13175-13178.
- Sun C, Sellers KW, Sumners C, Raizada MK. 2005. NAD(P)H oxidase inhibition attenuates neuronal chronotropic actions of angiotensin II. *Circ Res* 95:532-539.
- Sumners C, Fleegal MA, Zhu M. 2002. Angiotensin AT<sub>1</sub> receptor signalling pathway in neurons. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 29:483-490.
- Tammariello SP, Quinn MT, Estus S. 2000. NADPH oxidase contributes directly to oxidative stress and apoptosis in nerve growth factor-deprived sympathetic neurons. *J Neurosci* 20:RC53.
- Unger T, Chung O, Csikos T, Culman J, Gallinat S, Gohlke P, Höle S, Meffert S, Stoll M, Stroth U, Zhu YZ. 1996. Angiotensin receptors. *J Hypertens* 14 (Suppl. 5): S95-S103.
- Volk T, Hensel M, Kox WJ. 1997. Transient Ca<sup>2+</sup> changes in endothelial cells induced by low doses of reactive oxygen species: role of hydrogen peroxide. *Mol Cell Biochem* 171:11-21.
- Walter J, Grünberg J, Capell A, Pesold B, Schindzielorz A, Citron M, Mendla K, George-Hyslop PS, Multhaup G, Selkoe DJ, Haass C. 1997. Proteolytic processing of the Alzheimer disease-associated presenilin-1 generates an in vivo substrate for protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci USA*. 13; 94:5349-5354.
- Wang G, Anrather J, Huang J, Speth R, Pickel V, Iadecola C. 2004. NADPH Oxidase contributes to angiotensin II signaling in the nucleus tractus solitarius. *Journal Neurosci* 24:5516-5524.
- Wright JW, Harding JW. 1997. Brain angiotensin receptor subtypes in the control of physiological and behavioral responses. *Neurosci Behav Rev* 18: 21-53.
- Zanzinger J. 2002. Mechanisms of action of nitric oxide in the brain stem: role of oxidative stress. *Auton Neurosci* 98:24-27.
- Zimmerman M, Dunlay R, Lazartigues E, Zhang Y, Sharma R, Engelhardt J, Davisson R. 2004. Requirement for Rac1-Dependent NADPH oxidase in the cardiovascular and dipsogenic actions of angiotensin II in the brain. *Circ Res*. 95:532-539.
- Zimmerman M, Lazartigues E, Lang J, Sinnayah P, Ahmad I, Spitz D, Davisson R. 2002. Superoxide mediates the actions of angiotensin II in the central nervous system. *Circ Res* 91:1038-1045.
- Zini S, Fournie-Zaluski MC, Chauvel E, Roques B, Corvol P, Llorens-Cortes C. 1996. Identification of metabolic pathways of brain angiotensin II and III using specific aminopeptidase inhibitors: Predominant role of angiotensin III in the control of vasopressin release. *Proc Natl Acad Sci USA*, 232: 11968-11973.

## Agradecimientos

Los autores agradecen el financiamiento otorgado a través del Proyecto IIF-10-2005 del Instituto de Investigaciones Farmacéuticas de la Facultad de Farmacia y el Proyecto CDCH N° PG-06-30-5203-2006 del Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la UCV.

## Addendum

Este trabajo ha sido galardonado con el Premio a la Investigación del Estudiante de Pregrado en su primera edición, del año 2008, otorgado por el Instituto de Investigaciones Farmacéuticas de la Facultad de Farmacia de la UCV.

**Recibido:** 15 de septiembre de 2008

**Aceptado:** 14 de diciembre de 2008