

# Papel del receptor AT<sub>1</sub> en la activación de las enzimas antioxidantes por la angiotensina II en el hipotálamo de la rata

## Role of AT<sub>1</sub> receptor on angiotensin II-stimulated antioxidant enzymes activity in the rat hypothalamus

JOSÉ SILVA, MARIELLA PASTORELLO, MARÍA GABRIELA MATOS, MAIDER VARELA, SARA DE JESÚS, MARÍA DEL ROSARIO GARRIDO Y ANITA ISRAEL\*

### Resumen

Existe evidencia que apoya la participación de las especies reactivas de oxígeno en las cascadas de señalización y transducción intracelular en el mantenimiento de la homeostasis neuronal. La angiotensina II (ANG II) regula la presión arterial gracias a su capacidad de estimular a la NAD(P)H oxidasa con la subsiguiente producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) tal como el anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), el cual es metabolizado secuencialmente por las enzimas antioxidantes, como la superóxido dismutasa, la catalasa y la glutatión peroxidasa. A su vez, las ERO son capaces de activar a la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK), las cuales se encuentran asociadas al crecimiento y la diferenciación celular. Con el fin de establecer la posible participación de las ERO en el mecanismo de señalización intracelular mediado por el receptor AT<sub>1</sub> (AT<sub>1</sub>R), evaluamos el papel de la NAD(P)H oxidasa y la proteína quinasa C (PKC) en la activación de las enzimas antioxidantes y las MAPKs *in vitro*, inducida por ANG II, en el hipotálamo de la rata, área importante en el control central del sistema cardiovascular. Se emplearon ratas macho de la cepa Sprague-Dawley, las cuales fueron sacrificadas por decapitación y los cerebros fueron extraídos por microdissección bajo control esteromicroscópico. La actividad de las enzimas superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa fue determinada espectrofotométricamente; mientras que la activación de la MAPK fue cuantificada mediante el análisis por Western blot. En el hipotálamo, la ANG II incrementó la actividad de las tres enzimas antioxidantes evaluadas. Maniobras como el bloqueo del receptor AT<sub>1</sub> (AT<sub>1</sub>R) con losartán (LOS), la interferencia del ensamblaje de la NAD(P)H oxidasa con apocinina, y la inhibición de la PKC con chelitrina, bloquearon completamente el efecto que produce la ANG II sobre las enzimas antioxidantes. Igualmente, la activación de la MAPK inducida por la ANG II fue disminuida o reducida por la apocinina y el losartán. Nuestros resultados indican que en el hipotálamo de la rata, las especies reactivas de oxígeno participan en la señalización intracelular de la ANG II, vía el receptor AT<sub>1</sub>.

**Palabras clave:** Angiotensina II, estrés oxidativo, catalasa, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, apocinina, chelitrina.

### Abstract

It is becoming increasingly evident that reactive oxygen species (ROS) participate in signaling transduction pathways that are important in maintaining cellular homeostasis in the neurons. Angiotensin II (ANG II) influences blood pressure via its ability to stimulate the NAD(P)H oxidase and produce ROS such as superoxide (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), which is sequentially metabolized by the enzymes superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase. ROS in turn, can activate the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway that is associated with growth and cellular differentiation. In order to establish the possible intracellular mechanism by which ROS mediates neuronal ANG II actions in cardiovascular regulation, we assessed *in vitro* the role of angiotensin AT<sub>1</sub> receptor (AT<sub>1</sub>R), NAD(P)H oxidase and protein kinase C (PKC) in the angiotensin II-induced activation of antioxidant enzymes and MAPK, in the hypothalamus, an area related with cardiovascular control. Male Sprague-Dawley rats were sacrificed by decapitation and tissues were microdissected under stereomicroscopic control. Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activity was determined spectrophotometrically and MAPK activation by Western blot analysis. In hypothalamus, ANG II increased

the activities of the three antioxidant enzymes. Blockade of AT<sub>1</sub>R with losartan (LOS), or interference with the NAD(P)H oxidase assembling with apocynin, or inhibiting PKC with chelerythrine, blunted ANG II effects on the antioxidant enzyme activities. Likewise, ANG II-induced activation of MAPKs was diminished by apocynin and losartan. Our results indicate that AT<sub>1</sub> receptor and redox signaling are involved in ANG II actions in the rat hypothalamus.

**Key words:** Angiotensin II, oxidative stress, catalase, superoxide dismutase, glutathione peroxidase, apocynin, chelerythrine.

## Introducción

El sistema renina-angiotensina ejerce un papel importante en la regulación de la actividad del sistema nervioso simpático, la presión arterial y el balance hidromineral (Averill and Diz, 2000; Seltzer y col., 2004). La administración intracerebroventricular (ICV) de la ANG II incrementa la presión arterial, el eflujo simpático, la ingesta de agua, la excreción de sodio y la liberación de vasopresina; y disminuye la concentración plasmática de sodio y el volumen urinario (Veltmar y col., 1992; Severs y col., 1970; Fitzsimons 1980; Sterling y col., 1980; Brooks and Malvin 1982, Barbella y col., 1993). Estas acciones se encuentran mediadas por el receptor de tipo I de la angiotensina II (AT<sub>1</sub>R) (Saavedra y col., 2006). En el sistema nervioso central el receptor AT<sub>1</sub> se expresa predominantemente en áreas relacionadas con el control cardiovascular e hidromineral, tales como el núcleo de la lámina terminal, el núcleo paraventricular del hipotálamo, el órgano subfornical, el área ventrolateral del bulbo raquídeo (RVLM) y el núcleo del tracto solitario (Allen y col., 2000).

La evidencia indica que la producción de anión superóxido inducida por la ANG II en el sistema nervioso central (SNC) se debe principalmente a la NAD(P)H oxidasa, de forma similar al producido en el tejido vascular (Griendling y col., 1994, 2000b). Las principales fuentes de producción de O<sub>2</sub><sup>-</sup> en el cerebro incluyen a la NAD(P)H oxidasa, la xantina oxidasa, la respiración mitocondrial y la óxido-nítrico-sintasa (NOS) desacoplada (Pou y col., 1992, Atlante y col., 2001; Wang y col., 2004; Gao y col., 2005). La NAD(P)H oxidasa está constituida por un complejo multi-enzimático de dos subunidades unidas a la membrana plasmática (gp91<sup>phox</sup>+p22<sup>phox</sup>) y tres subunidades citoplasmáticas (p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup> y Rac1). La activación de la NAD(P)H oxidasa típica tanto en células fagocíticas como no fagocíticas, es dependiente del ensamblaje de las tres subunidades citoplasmáticas, el cual requiere de la fosforilación de la subunidad regulatoria P47<sup>phox</sup> (Landmesser y col., 2002). La NAD(P)H oxidasa cataliza la reducción del oxígeno

molecular a superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), el cual es convertido a peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) por la familia de la enzima superóxido dismutasa (SOD). El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a su vez es convertido en agua por acción de la enzima catalasa o por la glutatión peroxidasa (Babior, 1999). La activación del receptor AT<sub>1</sub> está asociado con una gran variedad de vías de señalización a nivel del tejido neuronal (Richards y col., 1999; Sumners y col., 2002), por lo que se postula que la NAD(P)H oxidasa podría participar en el mecanismo molecular que media muchas de las acciones centrales de la ANG II. En efecto, se ha demostrado que la administración de inhibidores de la NAD(P)H oxidasa, como el difenilenedionio (DPI) y la apocinina, en el RVLM o en los ventrículos cerebrales atenúa la respuesta presora de la ANG II en ratas (Chan y col., 2005; Erdős y col., 2006); y la microinyección de DPI o el oligonucleótido antisentido de la subunidad p22<sup>phox</sup> o p47<sup>phox</sup> de la NAD(P)H oxidasa dentro de RVLM, previene parcialmente la producción local de O<sub>2</sub><sup>-</sup> inducida por ANG II (Chan y col., 2005). Aún más, la aplicación extracelular del inhibidor de la NAD(P)H, el gp91 ds-tat, disminuye a la mitad el incremento de la actividad neuronal inducida por la ANG II en cultivos primarios de hipotálamo y tallo cerebral (Sun y col., 2005); y la expresión mediada por adenovirus de la isoforma dominante-negativa Rac1, un componente crítico en la activación de la NAD(P)H oxidasa y la producción de O<sub>2</sub><sup>-</sup>, inhibe el influjo del calcio extracelular inducido por la ANG II en neuronas (Zimmerman y col., 2005).

Está bien establecido que las ERO son capaces de influenciar múltiples eventos de la señalización intracelular, mediante la activación de los receptores de tirosinas kinasas y no tirosinas kinasas, inhibiendo fosfatasa de tirosinas, regulando factores de transcripción sensibles al aumento de ERO y regulando la homeostasis del calcio intracelular (Gelband y col., 1997; Griendling y col., 2000a). En particular, las ERO han sido implicadas en mecanismos de señalización intracelular que involucran, en parte, la activación de las MAPK, incluyendo a las kinasas reguladas por señales extracelulares (ERK<sub>1</sub>/ERK<sub>2</sub> o p42/44), las

quinasas c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal (JNK), y la p38 MAPK (Griendling y col., 2000a,b; Kim e Iwao, 2000; Yoshizumi y col., 2001; Kyaw y col., 2001). Se ha demostrado además, que las MAPK son activadas en la hipertensión experimental (Nishiyama y col., 2004) y en la diabetes (Awazu y col., 1999). En el cerebro, la microinyección de ANG II dentro del RVLM resulta en la fosforilación (activación), dependiente del receptor AT<sub>1</sub> de la p38 MAPK y la p42/44 MAPK, a través de un mecanismo sensible al estado redox, dependiente de la NAD(P)H oxidasa (Chan y col., 2005). Aun más, la inhibición de la MAPKs anula el efecto estimulador de la ANG II sobre la recaptación de noradrenalina en cultivos neuronales de hipotálamo y tallo cerebral (Yang y Raizada, 1998), y atenúa marcadamente el efecto presor de la ANG II en el RVLM de la rata (Seyedabadi y col., 2001; Chan y col., 2005). Estos hallazgos sugieren un papel funcional relevante de las MAPKs en la regulación de la respuesta cardiovascular y de un papel preponderante de la ANG II cerebral y del O<sub>2</sub><sup>-</sup> en la activación de las MAPKs.

Debido a que los sistemas generadores de superóxido en el SNC (Lindenau y col., 2000), así como la señalización mediante ERO se encuentran ampliamente relacionados con los procesos celulares regulados por la ANG II, nosotros nos propusimos evaluar *in vitro* el papel del receptor AT<sub>1</sub>, de la NAD(P)H oxidasa y de la PKC en la activación inducida por ANG II de tres enzimas antioxidantes: la catalasa, la superóxido dismutasa y la glutatión peroxidasa; así como la activación de las MAPKs, en el hipotálamo de la rata.

## Materiales y métodos

Se emplearon ratas macho adultas de la cepa Sprague-Dawley, de pesos comprendidos entre 200-250 g, provenientes del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel", Caracas, las cuales fueron mantenidas en condiciones controladas y con acceso al alimento (Ratarina®) *ad libitum*. Todos los métodos y protocolos fueron revisados y aprobados por la Comisión de Bioterio de la Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela. Las ratas fueron sacrificadas por decapitación, los cerebros extraídos y el hipotálamo fue disecado mediante microdissección bajo control estereomicroscópico y mantenido en Buffer Krebs-Ringer (KRB) hasta la determinación respectiva.

### Determinación de la actividad enzimática de la catalasa

La actividad de la catalasa fue determinada empleando una modificación del método de Aebi

(1984). La actividad catalasa fue cuantificada como la velocidad de descomposición enzimática del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, y monitoreada a una longitud de onda de 240 nm, a 25 °C. La mezcla de incubación contenía 10 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en un buffer fosfato 10 mM a pH 7 y 25 μL de proteínas obtenidas a partir del homogenato de hipotálamo, para un volumen final de 750 μL. Los resultados fueron expresados en k/mg proteína (k= constante de reacción).

### Determinación de la actividad de la enzima superóxido dismutasa

La actividad de SOD se determinó mediante una modificación del método de Oberley y col. (1984), el cual mide la capacidad SOD presente en la muestra para inhibir la reducción del azul de nitrotetrazolio (NBT) por el anión superóxido generado a través del sistema de la xantina-xantina oxidasa presente en la mezcla de reacción. Los resultados fueron expresados como U/mg proteína. Una U de actividad SOD se define como la cantidad de enzima requerida para inhibir en un 50% la formación de los cristales de formazán.

### Actividad de la Glutatión peroxidasa (GPx)

La actividad de la glutatión peroxidasa (GPx) fue determinada de forma indirecta de acuerdo con el método descrito por Flohé (1984), mediante una reacción acoplada con la glutatión reductasa. El glutatión reducido es empleado por la GPx para reducir el peróxido de hidrógeno, el cual es regenerado por la glutatión reductasa a partir de glutatión oxidado y NAD(P)H. Los resultados fueron expresados como actividad enzimática en U/mg proteína ( $\epsilon = 6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Una U de GPx representa un mmol NAD (P)H oxidado/min por mg proteína.

### Determinación de las proteínas tisulares

Las proteínas tisulares totales se determinaron por el método de Lowry y col. (1951), utilizando albúmina sérica de bovino como patrón.

### Análisis mediante Western Blot

El tejido hipotalámico fue incubado a 37 °C con ANG II (10<sup>-7</sup> M), en presencia o ausencia de los antagonistas respectivos. Una vez finalizada la incubación, el tejido fue homogenizado en el buffer de lisis (50 mM Tris base, 5 mM EDTA, 1 mM NaF, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, mezcla de inhibidores de proteasas y Tritón X-100 al 1%, pH 7.4). Para el análisis de Western blot, las muestras de hipotálamo (50 μg de proteína/muestra)

fueron separadas en geles de 10% SDS-poliacrilamida y transferidas a una membrana de nitrocelulosa. Después del bloqueo con leche descremada al 10%, las membranas fueron incubadas con anti-pERK/ERK de conejo (Cell Signaling Technology) (1:1000) durante toda la noche a 4 °C, lavadas y posteriormente incubadas con el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con peroxidasa de rábano (Cell Signaling Technology) (1:10.000), durante una hora. Las proteínas fueron visualizadas con un kit de quimioluminiscencia (SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate) y posteriormente cuantificadas mediante el análisis densitométrico (Quantity One 1-D®-Bio-Rad Software).

### Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como la media ± E.E.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.

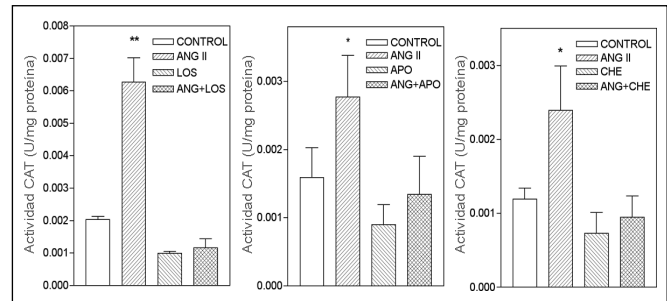
### Resultados

*Efecto del inhibidor de la NAD(P)H oxidasa, de la PKC y del bloqueante del receptor AT<sub>1</sub> sobre la actividad CAT, SOD y GPX estimulada por la ANG II en el hipotálamo de la rata.*

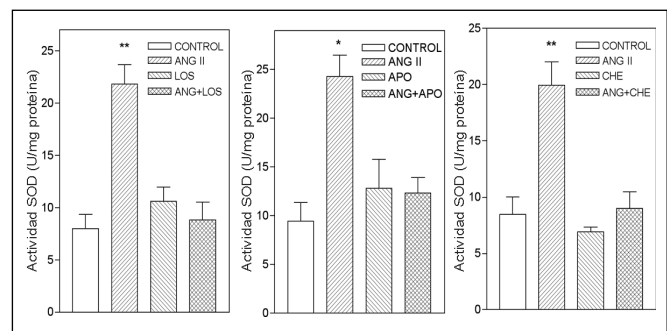
Como se muestra en las figuras 1, 2 y 3, la incubación del tejido hipotalámico con angiotensina II ( $10^{-7}$  M) incrementa significativamente la actividad de la catalasa (2,0084 ± 0,12 veces comparada con el control) (figura 1), la superóxido dismutasa (2,358 ± 0,11 veces comparada con el control) (figura 2) y la glutatión peroxidasa (3,7304 ± 0,2 veces comparada con el control) (figura 3). Éstos efectos fueron completamente inhibidos por la adición al medio de incubación de cheleritrina (CHE, 6,5 µM), apocinina (APO,  $10^{-4}$  M) y losartán (LOS,  $10^{-6}$  M), respectivamente. N=6-9 experimentos individuales. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  comparado con el control.

*Efecto de la apocinina y el losartán sobre la expresión y activación inducida por la ANG II de las ERK 1/2 en el hipotálamo de la rata*

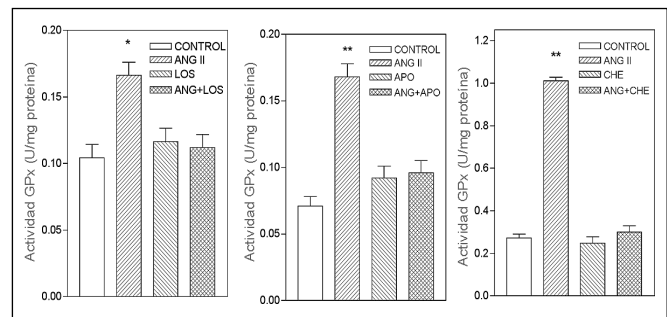
El panel superior de la figura 4 muestra los resultados de los análisis de los inmunoblots hipotalámicos incubados con anticuerpos contra p-ERK y ERK. Las barras muestran los resultados del análisis densitométrico de los datos reunidos de cuatro experimentos individuales y expresados como la relación p-ERK/ERK. El tratamiento del tejido hipotalámico con ANG II  $10^{-7}$  M produjo activación mediante fosforilación de las ERK (1,29 ± 0,1 veces comparado con



**Figura 1.** Efecto del LOS ( $10^{-6}$  M), la APO ( $10^{-4}$  M) y la CHE (6,5 µM) sobre la actividad de la catalasa (CAT) estimulada por la ANG II ( $10^{-7}$  M) en el hipotálamo de la rata. Los tejidos fueron incubados con o sin ANG II ( $10^{-7}$  M) durante 10 min. Cada barra representa la media ± E.E.M. de N=6-9 experimentos individuales. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  comparado con el control.

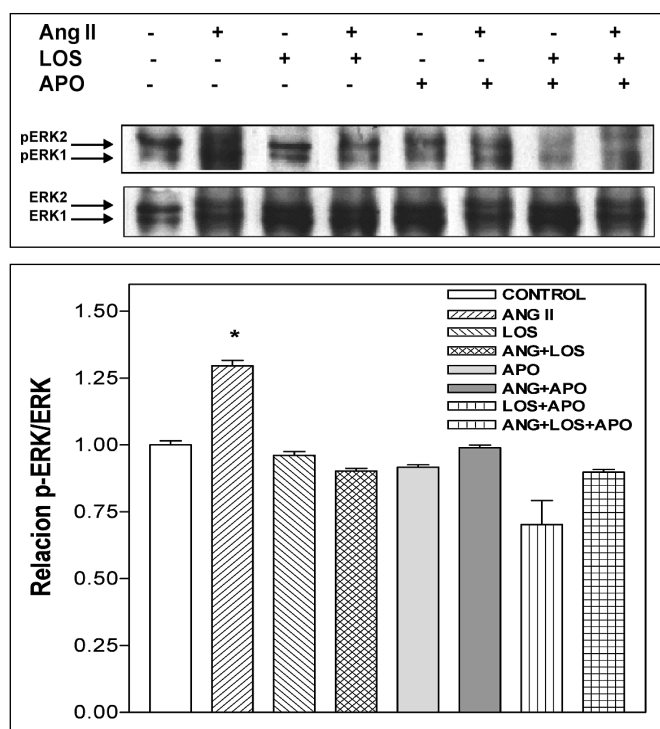


**Figura 2.** Efecto del LOS ( $10^{-6}$  M), la APO ( $10^{-4}$  M) y la CHE (6,5 µM) sobre la actividad de la superóxido dismutasa (SOD) estimulada por la ANG II ( $10^{-7}$  M) en el hipotálamo de la rata. Los tejidos fueron incubados con o sin ANG II ( $10^{-7}$  M) durante 5 min. Cada barra representa la media ± E.E.M. de N=6-9 experimentos individuales. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  comparado con el control.



**Figura 3.** Efecto del LOS ( $10^{-6}$  M), la APO ( $10^{-4}$  M) y la CHE (6,5 µM) sobre la actividad de la glutatión peroxidasa (GPX) estimulada por la ANG II ( $10^{-7}$  M) en el hipotálamo de la rata. Los tejidos fueron incubados con o sin ANG II ( $10^{-7}$  M) durante 5 min. Cada barra representa la media ± E.E.M. de N=6-9 experimentos individuales. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  comparado con el control.

el control). La preincubación del hipotálamo con LOS ( $10^{-6}$  M), un antagonista selectivo del receptor AT<sub>1</sub>, inhibió completamente la fosforilación de las ERK1/2 inducida por la ANG II. El pretratamiento con APO ( $10^{-6}$  M), un inhibidor de la NAD(P)H oxidasa, previno completamente la fosforilación de la enzima inducida por la ANG II, si se compara con el control).



**Figura 4.** Efecto del LOS ( $10^{-6}$  M) y la APO ( $10^{-7}$  M) sobre la expresión y activación de ERK 1/2 inducida por la ANG II ( $10^{-7}$  M), en el hipotálamo de la rata. El panel superior muestra los resultados de los *immunoblot* analizados e incubados con anticuerpos contra p-ERK y ERK. El grafico de barras muestra los resultados de los análisis densitométricos de datos (N=4) y expresados con la relación p-ERK/ERK ratio. \* $p < 0,05$  comparado con el control.

Los resultados del Western blot se expresan como la media  $\pm$  E.E.M., normalizado con el control (\* $p < 0,05$  versus control, # $p < 0,05$  versus ANG II).

## Discusión

Aun cuando se reconoce el papel fundamental del sistema renina-angiotensina en la regulación cardiovascular, el mecanismo de señalización preciso involucrado en la acción central de la ANG II, está por determinarse. Se ha establecido que las ERO actúan como segundos mensajeros de gran importancia en muchas de las acciones fisiológicas y fisiopatológicas de la ANG II circulante (Griendling y Ushio-Fukai, 2000). En el cerebro, las ERO se encuentran implicadas principalmente en la patogénesis de enfermedades degenerativas primarias, tales como la esclerosis lateral amiotrófica (Deng y col., 2005) y la enfermedad de Alzheimer (Smith y col., 1997). La evidencia también apoya que las ERO se encuentran implicadas en la acción excitatoria de la ANG II cerebral. En efecto, la ANG II incrementa la producción de  $O_2^{\cdot-}$  y la frecuencia de disparo de las neuronas en cultivo, en estructuras circunventriculares como el OSF (Zimmerman y col., 2002; Sun y col., 2005), el hipotálamo y el tallo cerebral (Erdős y col., 2006), y en

neuronas aisladas del núcleo dorsomedial del tracto solitario (Wang y col., 2004). Estas acciones se encuentran mediadas por el receptor AT<sub>1</sub>, ya que son prevenidas por el pretratamiento con el losartán (Zimmerman y col., 2002; Sun y col., 2005). Aún más, los hallazgos demuestran que el anión superóxido actúa como una molécula de señalización intracelular en el efecto que produce la ANG II sobre la presión arterial (Erdős y col., 2006; Schnackenberg y col., 1998; Zimmerman y col., 2002, 2004a). Así, los cambios que induce la administración ICV de ANG II sobre la presión arterial media y la frecuencia cardíaca pueden ser abolidas mediante la sobreexpresión mediada por un vector de la superóxido dismutasa (Zimmerman y col., 2002). Así mismo, la administración ICV de un mimético de la SOD, el 4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametilpiperidina 1-oxil (tempol), reduce el incremento de la actividad simpática inducida por la ANG II central, en conejos y ratas con insuficiencia cardíaca crónica, e inhibe la secreción de noradrenalina desde el hipotálamo posterior en ratas normotensas (Gao y col., 2005; Campese y col., 2005; Lu y col., 2004).

Estos hallazgos permiten sugerir que en el cerebro, la ANG II media sus acciones a través de la estimulación de la NAD(P)H oxidasa. Desde que se conoce que la NAD(P)H oxidasa cataliza la reducción del oxígeno molecular a superóxido, el cual es convertido a  $H_2O_2$  por la familia de la enzima superóxido dismutasa (SOD); y a su vez este último convertido en agua por acción de la enzima catalasa o por la glutatión peroxidasa (Babior, 1999), es plausible proponer que la cascada de la NAD(P)H oxidasa está involucrada en la señalización del receptor AT<sub>1</sub> en las neuronas (Richards y col., 1999; Sumners y col., 2002), lo que explicaría el incremento de la actividad de las enzimas antioxidantes como la CAT, SOD y la GPX. Nuestros resultados en experimentos *in vitro* apoyan esta posibilidad, ya que la preincubación del tejido hipotalámico con un desacoplante del ensamblaje de la NAD(P)H oxidasa como es la apocinina, inhibe completamente el efecto estimulador de la ANG II sobre la actividad de las enzimas antioxidantes: CAT, SOD y GPX. Estos resultados concuerdan con los reportados por Mayorov (2007), quien demostró que la inyección bilateral de tempol en RVLM reduce marcadamente la respuesta presora y la taquicardia producida por el estrés emocional, sin alterar los parámetros hemodinámicos basales en el conejo. Aún más, se ha reportado que el incremento gradual de la presión arterial se correlaciona con la marcada elevación de los niveles de  $O_2^{\cdot-}$  y este efecto es inhibido por la SOD citoplasmática introducida mediante adenovirus en el OSF (Zimmerman y col., 2004).

Wang y col. (2004), usando la técnica de *patch clamp* en neuronas disociadas del núcleo del tracto solitario marcadas de modo anterógrado a través del nervio vago, demostraron que la ANG II es capaz de potenciar las corrientes de los canales de calcio tipo L, efecto que es mediado por el receptor AT<sub>1</sub> y es abolido por la apocinina y el inhibidor peptídico de la secuencia del *docking* de la subunidad gp91<sup>phox</sup> de la NAD(P)H oxidasa. Estos resultados y los reportados por nosotros permiten especular que las regiones neuroanatómicas relacionadas con el estrés oxidativo y la ANG II se encuentran localizadas en estructuras como el órgano subfornical, el RVLN y el hipotálamo, estructuras relacionadas con la regulación de la presión arterial y el control hidromineral.

En los tejidos periféricos, existe evidencia que la actividad de la NAD(P)H oxidasa es regulada por la PKC (Griendling y col., 2000a,b; Lassegue y Clempus, 2003), enzima que también es activada por la ANG II en las neuronas (Sumners y Fleegal, 2002). Se ha demostrado que las ERO ejercen un efecto modulador de la liberación de Ca<sup>+2</sup> (Volk y col., 1997) y que existe relación entre la NAD(P)H oxidasa y el metabolismo de los fosfoinosítidos de membrana (Bravo y col., 2001). Adicionalmente, se sabe que las ERO son capaces de alterar la función de los canales de potasio en las células del músculo liso vascular (Armstead, 2001) y que en el SNC la angiotensina II también es capaz de inhibir las corrientes de K<sup>+</sup> en las neuronas, aumentando la tasa de descarga (Sun y col., 2005). En efecto, en cultivos de neuronas hipotálamicas y del tallo cerebral provenientes de ratas recién nacidas, la administración de ANG II produce un efecto cronotrópico positivo a través de la estimulación del receptor AT<sub>1</sub> (Sun y col., 2002; Wang y col., 1997a), el incremento de las corrientes de calcio (I<sub>Ca</sub>), la disminución de las corrientes de potasio-voltaje dependiente (I<sub>Kv</sub>) y las corrientes de potasio del tipo-A (I<sub>A</sub>) K<sup>+</sup> (Wang y col., 1997b), todo ello asociado a un incremento en la actividad neuronal (Sumners y col., 1996; Wang y col., 1997a,b). Se ha demostrado que la estimulación del receptor AT<sub>1</sub> neuronal por la ANG II activa la proteína quinasa C (PKC) y la proteína quinasa dependiente de calcio-calmodulina, y que ambas proteínas 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). Se ha implicado a estas dos kinasas en la producción de las ERO en muchos tipos de células incluyendo a las neuronas (Lassegue y Clempus, 2003); así, la inhibición de estas kinasas es un requisito fundamental para la atenuación de la actividad neuronal y de la corriente de potasio (Sumners y col., 2002). Nuestros resultados presentes apoyan aún más la posibilidad

de la participación de una PKC en la señalización asociada a la cascada de la NAD(P)H del receptor AT<sub>1</sub> en el cerebro. Así, la preincubación del tejido hipotalámico con chelitrina, un inhibidor de la PKC, o con losartán, produjo la completa inhibición del incremento de la actividad de las enzimas antioxidantes CAT, SOD y GPX inducida por la ANG II *in vitro*. En apoyo a estas acciones *in vitro*, la evidencia *in vivo* indica que el inhibidor específico de la PKC- $\alpha$ , el Go-6976, atenúan la respuesta dipsogénica de la ANG-ICV (Fleegal y Sumners, 2003) y que la chelitrina, bloquea completamente la acción natriurética y kaliurética de la ANG II administrada centralmente (Israel y col., 2009). Estos hallazgos permiten inferir que en el SNC, específicamente en el hipotálamo de la rata, la activación de los receptores AT<sub>1</sub>, acoplados a proteínas G, conlleva la estimulación de la proteína quinasa C- $\alpha$  y la modulación de los canales de potasio y el disparo neuronal; o bien a la hidrólisis de fosfoinosítidos y a la movilización de calcio. Adicionalmente, el anión superóxido producido en respuesta a la estimulación de la NAD(P)H oxidasa por la ANG II, podría ejercer un efecto secuestrador del óxido nítrico, reduciendo su biodisponibilidad y generando simpatoexcitación (Krukoff, 1999; Zanzinger, 2002).

Se ha reportado que las ERK1/ERK2 pueden ser activadas por el estrés oxidativo y por la ANG II en una variedad de tipos celulares (Ushio-Fukai y col., 1998). Sin embargo, el mecanismo exacto que involucra esta activación en el SNC no ha sido establecido completamente. En el presente estudio demostramos que el inhibidor de la NAD(P)H oxidasa, la apocinina, y el bloqueante del receptor AT<sub>1</sub>, el losartán, no sólo inhiben la activación de las enzimas antioxidantes estimuladas por la ANG II, sino que bloquean la activación de las ERK 1/2 por la ANG II. Estos datos sugieren que las ERO producidas por la NAD(P)H oxidasa y la estimulación del receptor AT<sub>1</sub> contribuyen a la activación de las ERK en el hipotálamo de forma similar a lo reportado en el músculo liso vascular. En efecto, se ha demostrado que la inhibición de la NAD(P)H oxidasa con difenileneiodonio (DPI) efectivamente abole la producción de ERO inducida por la ANG II, así como la fosforilación de las ERK y la hipertrofia del músculo liso vascular (Gerald y col., 2000). Al respecto, se ha propuesto al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como el posible mediador de la estimulación de las ERK, ya que se ha demostrado que en células NIH 3T3, las ERK representan las principales MAPK sensibles a las reacciones redox (Guyton y col., 1996) y que en las células HeLa, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> estimula en una forma dependiente de tiempo y concentración a las MEK 1/2, el activador corriente arriba de las ERK (Chen y col., 1995).

En conclusión, nuestros resultados demuestran que en el hipotálamo de la rata, la ANG II incrementa la actividad de las enzimas antioxidantes CAT, SOD y GPX, a través de la estimulación del receptor AT<sub>1</sub> y la producción de superóxido dependiente de la NAD (P)H-oxidasa y la PKC.

## Agradecimientos

Este trabajo fue subvencionado por el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico, CDCH PI-06-00-6283-2006 y CDCH PI-06-00-6212-2006, Universidad Central de Venezuela.

## Referencias bibliográficas

- Aebi H. 1984. Catalase. In: L. Packer (Ed), *Methods in Enzymology*, Academic Press, Orlando, 105: 121-126.
- Allen AM, Zhuo J, Mendelsohn F. 2000. The physiological role of AT<sub>1</sub> receptors. *Am J Hypertens* 13:31S-38S.
- Armstead WM. 2001. Vasopressin-induced protein kinase C-dependent superoxide generation contributes to ATP-sensitive potassium channel brain injury. *Stroke* 32:1408-1414.
- Atlante A, Calissano P, Bobba A, Giannattasio S, Marra E, Passarella S. 2001. Glutamate neurotoxicity, oxidative stress and mitochondria. *FEBS Lett* 497:1-5.
- 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.
- Awazu M, Ishikura K, Hida M, Hoshiya M. 1999. Mechanisms of mitogen-activated protein kinase activation in experimental diabetes. *J Am Soc Nephrol* 10: 738-745.
- Babior BM. 1999. NADPH oxidase: an update. *Blood* 93: 1464-1476.
- Barbella Y, Cierco, M, Israel A. 1993. Effects of losartan, a nonpeptide angiotensin II receptor antagonist, on drinking behavior and renal actions of central administered renin. *Proc Soc Exp Biol Med* 202:401-406.
- Bravo J, Karathanassis D, Pacold CM, Pacold ME, Ellson 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.
- Brooks V, Malvin R. 1982. Intracerebroventricular infusions of angiotensin II increases sodium excretion. *Proc Soc Exp Biol Med* 169:532-537.
- Campese VM, Shaohua Y, Huiquin Z. 2005. Oxidative stress mediates angiotensin II-dependent stimulation of sympathetic nerve activity. *Hypertension* 46:533-539.
- 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* 97:772-780.
- Chen Q, Olashaw N, Wu J. 1995. Participation of reactive oxygen species in the lysophosphatidic acid-stimulated mitogen-activated protein kinase activation pathway. *J Biol Chem* 270:28499-28502.
- Deng WX, Henati A, Tanier JA. 2005. Amyotrophic lateral sclerosis and structural defects in Cu, Zn superoxide dismutase. *Science* 261:1047-1051.
- Erdős B, Broxson CS, King MA, Scarpace PJ, 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 Hypertens* 24:109-116.
- Fitzsimons JT. 1980. Angiotensin stimulation on the central nervous system. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 87:117-67.
- Fleegal M A, Sumners C. 2003. Drinking behavior elicited by central injection of angiotensin II: roles for protein kinase C and Ca<sup>2+</sup>/calmodulin dependent protein kinase II. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 285:632-640.
- Flohé L and Günzler WA. 1984. *Methods in Enzymology* 105, 114.
- Gao L, Wang W, Li YL, Schultz HD, Liu D, Cornish KG, Zucker IH. 2005. Sympatho-excitation by central Ang II: The roles for AT1 receptor upregulation and NAD (P)H oxidase in the RVLM. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288:H2271-H2279.
- Gelband CH, Sumners C, Lu D, Raizada MK. 1997. Angiotensin receptors and norepinephrine neuromodulation: implications of functional coupling. *Regul Pept* 72:139-45.
- Gerald DFS, Eguchi S, Yamakawa T, Tanaka S, Inagami T, Motley ED. 2000. Involvement of Reactive Oxygen Species in the Activation of Tyrosine Kinase and Extracellular Signal-Regulated Kinase by Angiotensin II. *Endocrinology* 141: 3120-3126.
- Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW. 1994. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 74:1141-1148.
- Griendling KK, Ushio-Fukai M. 2000a. Reactive oxygen species as mediators of angiotensin II signaling. *Regul Pept* 91:21-27.
- Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. 2000b. NAD(P)H oxidase: Role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* 86: 494-501.
- Guyton KZ, Liu Y, Gorospe M, Xu Q, Holbrook NJ. 1996. Activation of mitogen-activated protein kinase by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Role in cell survival following oxidant injury. *J Biol Chem* 271:4138-4142.
- Israel A, Arzola J, De Jesús S, Varela M. 2009. Role of oxidative stress in the natriuresis induced by central administration of angiotensin II. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 10:9-14.
- Kim S, Iwao H. 2000. Molecular and cellular mechanisms of angiotensin II-mediated cardiovascular and renal diseases. *Pharmacol Rev* 52: 11-34.
- Krukoff TL. 1999. Central actions of nitric oxide in regulation of autonomic functions. *Brain Res Rev* 30: 52-65.
- Kyaw M, Yoshizumi M, Tsuchiya K, Kirima K, Tamaki T. 2001. Antioxidants inhibit JNK and p38 MAPK activation but not ERK 1/2 activation by angiotensin II in rat aortic smooth muscle cells. *Hypertens Res* 24: 251-261.

- Landmesser U, Cai H, Dikalov S, McCann L, Hwang J, Jo H, Holland SM, Harrison DG. 2002. Role of p47(phox) in vascular oxidative stress and hypertension caused by angiotensin II. *Hypertension* 40:511-515.
- 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.
- Lindenau J, Noack H, Pospel H, Asayarna K, Wolf G. 2000. Cellular distribution of superoxide dismutases in the rat CNS. *Glia* 29:25-34.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr al, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-75.
- Lu N, Helwig BG, Fels RJ, Parimi S, Kenney MJ. 2004. Central Tempol alters basal sympathetic nerve discharge and attenuates sympathetic excitation to central Ang II. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287: H2626-H2633.
- Mayorov DN. 2007. Brain superoxide as a key regulator of the cardiovascular response to emotional stress in rabbits. *Exp Physiol* 92:471-479.
- Nishiyama A, Yoshizumi Y, Rahman M, Kobori H, Seth DM, Miyatake A, Zhang G-X, Yao L, Hitomi H, Shokoji T, Kiyomoto H, Kimura S, Tamaki T, Kohno M, Abe Y. 2004. Effects of AT<sub>1</sub> receptor blockade on renal injury and mitogen-activated protein activity in Dahl salt-sensitive rats. *Kidney Int.* 65:972-81.
- Oberley LW, Spitz DR. 1984. Assay of superoxide dismutase activity in tumor tissue. *Meth Enzymol* 105:457-464.
- Pou S, Pou WS, Bredt DS, Snyder SH, Rosen GM. 1992. Generation of superoxide by purified brain nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 267:24173-24176.
- Richards EM, Raizada MK, Gelband CH, Sumners C. 1999. Angiotensin II type 1 receptor-modulated signaling pathways in neurons. *Mol Neurobiol* 19:25-41.
- Saavedra JM, Benicky J, Zhou J. 2006. Angiotensin II: multitasking in the brain. *J Hypertens Suppl* 24:S131-S137.
- 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*:9-18.
- Severs W, Summy-Long J, Taylor J, Connor J. 1970. A central effect of angiotensin: release of pituitary pressor material. *J Pharmacol Exp Ther* 74:27-34.
- Syedabadi M, Goodchild AK, Pilowsky PM. 2001. Differential role of kinases in brain stem of hypertensive and normotensive rats. *Hypertension* 38:1087-1092.
- Smith MA, Richey-Harris PL, Sayre LM, Beckman JS, Perry G. 1997. Widespread peroxynitrite-mediated damage in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 17:653-2657.
- Sterling GH, Chee O, Riggs RV, Keil LC. 1980. Effect of chronic intracerebroventricular angiotensin II infusion on vasopressin release in rats. *Neuroendocrinol* 31: 182-188.
- Sumners C, Fleegal MA, Zhu MY. 2002. Angiotensin AT-I receptor signalling pathways in neurons. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 29:483-490.
- Sumners C, Zhu M, Gelband CH, Posner P. 1996. Angiotensin II type 1 receptor modulation of neuronal K<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> currents: intracellular mechanisms. *Am J Physiol Cell Physiol* 271:C154-C163.
- Sun C, Sellers KW, Sumners C, Raizada MK. 2005. NAD(P)H oxidase inhibition attenuates neuronal chronotropic actions of angiotensin II. *Circ Res* 96:659-666.
- Sun C, Sumners C, Raizada MK. 2002. Chronotropic action of angiotensin II in neurons via protein kinase C and CaMKII. *Hypertension* 39: 562-566.
- Ushio-Fukai M, Alexander RW, Akers M, Griendling K K. 1998. p38 mitogenactivated protein kinase is a critical component of the redox-sensitive signaling pathways activated by angiotensin II. Role in vascular smooth muscle cell hypertrophy. *J Biol Chem* 273:15022-15029.
- Veltmar A, Culman J, Qadri F, Rascher W, Unger T. 1992. Involvement of adrenergic and angiotensinergic receptors in the paraventricular nucleus in the angiotensin II-induced vasopressin release. *J Pharmacol Exp Ther* 263:1253-60.
- 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.
- Wang G, Anrather J, Huang J, Speth RC, Pickel VM, Iadecola C. 2004. NADPH oxidase contributes to angiotensin II signaling in the nucleus tractus solitarius. *J Neurosci* 24: 5516-5524.
- Wang D, Gelband CH, Sumners C, Posner P. 1997a. Mechanisms underlying the chronotropic effect of angiotensin II on cultured neurons from rat hypothalamus and brain stem. *J Neurophysiol* 78: 1013-1020.
- Wang D, Sumners C, Posner P, Gelband CH. 1997b. A-type K<sup>+</sup> current in neurons cultured from neonatal rat hypothalamus and brain stem: modulation by angiotensin II. *J Neurophysiol* 78:1021-1029.
- Yang H, Raizada MK. 1998. MAP kinase-independent signaling in angiotensin II regulation of neuromodulation in SHR neurons. *Hypertension* 32:473-81.
- Yoshizumi M, Tsuchiya K, Tamaki T. 2001. Signal transduction of reactive oxygen species and mitogen-activated protein kinases in cardiovascular disease. *J Med Invest* 48: 11-24.
- Zanzinger J. 2002. Mechanisms of action of nitric oxide in the brain stem: role of oxidative stress. *Auton Neurosci* 98:24-27.
- Zimmerman MC, Lazartigues E, Lang JA, Sinnayah P, Ahmad IM, Spitz DR, Davisson RL. 2002. Superoxide mediates the actions of angiotensin II in the central nervous system. *Cir Res* 91:1038-1045.
- Zimmerman MC, Lazartigues E, Sharma RV, Davisson RL. 2004a. Hypertension caused by angiotensin II infusion involves increased superoxide production in the central nervous system. *Circ Res* 95: 210-216.
- Zimmerman MC, Sharma RV, Davisson RL. 2005. Superoxide mediates angiotensin II-induced influx of extracellular calcium in neural cells. *Hypertension* 45: 717-723.

Recibido: 27 de abril de 2009  
Aceptado: 29 de mayo de 2009