

# Papel de la NAD(P)H Oxidasa y el Anión Superóxido en la respuesta cardiovascular al estrés

## Role of NAD(P)H Oxidase and Superoxide in the cardiovascular response to stress

IRAIMA MEDINA<sup>1</sup> E ANITA ISRAEL<sup>2</sup>

### Resumen

La angiotensina II (Ang II) facilita la transmisión noradrenérgica, y participa en la respuesta cardiovascular inducida por el estrés. Este efecto es mediado por el receptor AT<sub>1</sub> ya que el tratamiento con losartan inhiben la respuesta simpática al estrés. La evidencia indica la participación de las especies reactivas de oxígeno (ERO), en especial el O<sub>2</sub><sup>-</sup> como importantes mensajeros intracelulares, en las acciones excitatorias de la Ang II. Es por ello que se evaluó el papel del receptor AT<sub>1</sub> presináptico, la NAD(P)H oxidasa y las especies reactivas de oxígeno en la respuesta cardiovascular a la estimulación simpatoadrenal inducida por el estrés agudo como lo es el estímulo eléctrico plantar (EEP) y la inmovilización forzada (IMO). Para ello, se emplearon ratas macho Sprague-Dawley (180-200g) las cuales fueron sometidas a dos modelos experimentales de estrés: el estímulo eléctrico plantar (EEP) y la inmovilización forzada (IMO). Se determinó la presión arterial (PAM) y frecuencia cardíaca (FC), mediante el uso del pletismógrafo digital de cola (LETICA®). Los animales se dividieron en los siguientes grupos experimentales: C: control-vehículo, EPRO: eprosartan, un inhibidor del receptor AT<sub>1</sub> presináptico (120 mg, p.o.), APO: Apocinina, un inhibidor de la NAD(P)H oxidasa (5 mg/kg, i.p.) y Tempol, un superóxido dismutasa mimético (20 mg/kg, i.p.). El EEP y la IMO, incrementaron significativamente la PAM y la FC. El pretratamiento con el EPO, la apocinina y el tempol bloquearon el incremento de la PAM inducido por ambos tipos de estrés, y desenmascararon una respuesta vasodepresora significativa. Nuestros resultados apoyan el papel de la vía de señalización de los receptores AT<sub>1</sub> presinápticos- la NAD(P)H oxidasa- O<sub>2</sub><sup>-</sup> en la respuesta cardiovascular frente al estrés agudo.

**Palabras clave:** Estrés, NAD(P)H oxidasa, tempol, angiotensina II, inmovilización forzada, estímulo eléctrico plantar.

### Abstract

It was suggested that AngII is involved in the regulation of sympathetic nervous system and could have a facilitatory role in stress-induced cardiovascular responses, possibly through the stimulation of prejunctional AT<sub>1</sub> receptor. It is becoming increasingly evident that reactive oxygen species (ROS) specially O<sub>2</sub><sup>-</sup> participate in the AT<sub>1</sub> receptor signaling transduction pathways, that are important in maintaining cellular homeostasis in the neurons. We assessed the role of prejunctional AT<sub>1</sub> receptor, NAD(P)H oxidase and superoxide in the cardiovascular response in acute stress, which is known to increase arterial pressure and heart rate, such as footshocks (FS) and forced immobilization applied to rats. Male Sprague-Dawley rats, 180-200 g, were placed in a Plexiglas chamber with a copper rod floor where they received mild FS (2Hz/100V/5msec/5min, delivered by a Grass stimulator and mean arterial pressure (MAP) and heart rate (HR) were recorded daily, before and after FS, using tail-cuff plethysmograph. FS and IMO increased MAP and HR. Pretreatment with EPRO significantly reduced the pressor response to FS and IMO, while no changes were observed in heart rate response. Inhibition of NAD(P)H oxidase with apocynin and with the superoxide mimetic agent, tempol, blunted the pressor response to FS and IMO and induced a significant vasodepressor response. Our results demonstrate that prejunctional AT<sub>1</sub> receptor, NAD(P)H oxidase and O<sub>2</sub><sup>-</sup> signaling pathway play a role in the cardiovascular response to acute stress.

**Key words:** Stress, NAD(P)H oxidase, tempol, angiotensin II, forced immobilization, footshock.

<sup>1</sup> Universidad Centroccidental «Lisandro Alvarado», Barquisimeto; Decanato de Cs Veterinarias.

<sup>2</sup> Unidad de Neuropeptidos, Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.  
Correspondencia: Dra. Anita Stern Israel. Apartado Postal 50176. Sabana Grande 1050A, Caracas, Venezuela.  
E-mail: [astern60@hotmail.com](mailto:astern60@hotmail.com)

## Introducción

El estrés, en sus diferentes formas, es capaz de desencadenar eventos cardiovasculares agudos, tales como la isquemia del miocardio, arritmias y accidentes cerebrovasculares (Esler, 1998; Rozanski y col., 1999; Kario y col., 2003). La respuesta exacerbada de sistema nervioso simpático frente al estrés ejerce un papel crítico en los efectos deletéreos del sistema cardiovascular (Esler y col., 1995; Goldstein, 1995; Rozanski y col., 1999), los cuales se manifiestan en la periferia por un aumento de la presión arterial (PA) y la frecuencia cardíaca (FC), y que en general son conocidos como reactividad cardiovascular. La regulación de la reactividad cardiovascular es un fenómeno complejo que involucra múltiples vías y neurotransmisores en el sistema nervioso (Carrasco y Van de Kar, 2003; Lovallo y Gerin, 2003; McDougall y col., 2005).

Se ha propuesto a la angiotensina II (Ang II) como una de las hormonas reguladoras importante en el estrés. Se sabe que el estrés agudo, a través de la activación de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos, incrementa la formación de la renina, y por tanto la síntesis y liberación de la Ang II periférica (Yang y col., 1996). A su vez, los niveles incrementados de la Ang II circulante, al estimular los receptores localizados en la glándula pituitaria anterior y la glándula suprarrenal, contribuyen con la formación y liberación de la ACTH, los glucocorticoides y la aldosterona durante el estrés (Saavedra, 1992; Aguilera, 1993). Igualmente, la Ang II circulante media la liberación de catecolaminas desde los terminales nerviosos simpáticos y de la glándula suprarrenal, característicos del estrés (Keller-Wood y col., 1983; Livett y col., 1990). Aunado a sus efectos periféricos, se sabe que la Ang II circulante es capaz de estimular vías localizadas en el sistema nervioso central, gracias a su acción sobre de los receptores localizados en las estructuras circunventriculares tales como el órgano subfornical (OSF), y cuyas conexiones con el núcleo paraventricular (NPV) son cruciales en la respuesta del eje hipotálamo-pituitaria-suprarrenal durante el estrés (Saavedra, 1992). Se ha demostrado que los efectos de la Ang II circulante durante el estrés se encuentran asociados con incrementos de la producción local de Ang II y de los receptores  $AT_1$ , en áreas del sistema nervioso central (SNC) como el NPV del hipotálamo y OSF (Saavedra, 1992; Yang y col., 1996; Aguilera y col., 1995), sugiriéndose la existencia de una coordinación entre los sistemas renina angiotensina (SRA) periférico y central en la respuesta al estrés.

Se ha demostrado que para que la respuesta simpática frente al estrés se manifieste en toda su magni-

tud, se requiere de la integridad y participación del sistema renina angiotensina, a través de su péptido activo la Ang II y la estimulación del receptor  $AT_1$ . Así, la administración central de Ang II produce respuestas similares al estrés en modelos animales (Yang y col., 1996; Watanabe y col., 1998). La administración periférica o intracerebroventricular del antagonista del receptor  $AT_1$  atenúa la respuesta presora y simpatoadrenal frente a diferentes tipos de estrés en ratas, tales como la agitación, la inmovilización, el producido por una corriente de aire en la cara de la rata (*air-jet*), (Hirasawa y col., 1990; Huang y Leenen, 1996; Cierco e Israel, 1994; Saiki y col., 1997; Jezova y col., 1998; Watanabe y col., 1998). En un modelo experimental de estrés agudo inducido por el estímulo eléctrico plantar (EEP) en rata, el cual se sabe que se activa el eje simpático-adrenal e incrementa la presión arterial y la frecuencia cardíaca, se demostró que el losartan y el captopril inhiben selectivamente la respuesta vasopresora frente al EEP (Cierco e Israel, 1994; Israel y col., 1994; Israel y Sosa, 2002). Efectos similares se observaron en ratas conscientes, donde el tratamiento a largo plazo con candesartan previno la respuesta simpatoadrenal y hormonal así como el incremento de las catecolaminas urinarias inducidas por el estrés agudo (Armando y col., 2001) y en ratas hipertensas en las cuales el SRA se encuentra activado (Seltzer y col., 2004). Aunmas, se ha reportado que la disrupción genética dirigida de la expresión del angiotensinógeno cerebral disminuye la respuesta cardiovascular frente al estrés por inmovilización en ratas (Baltatu y col., 2004), y la microinyección de antagonistas selectivos del receptor  $AT_1$  en regiones pre-simpáticas cerebrales reduce o abole la respuesta presora del estrés por inmovilización o el producido por una corriente de aire en la cara de la rata (*air-jet*) en ratas y conejos (Kubo y col., 2001; Mayorov y Head, 2003; De Matteo y col., 2006a). Estos hallazgos apoyan el concepto que la respuesta hormonal y cardiovascular frente al estrés se encuentra mediada por el sistema renina-angiotensina, a través de la estimulación del receptor  $AT_1$ .

Existen una variedad de vías de señalización asociadas al receptor  $AT_1$  neuronal (Richards y col., 1999; Sumners y col., 2002), sin embargo no se ha establecido con precisión el mecanismo molecular que involucra la acción de la angiotensina II durante situaciones de estrés tales como la inmovilización forzada y el estímulo eléctrico plantar. La evidencia creciente indica que las especies reactivas de oxígeno (ERO), y el particular el anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) y el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) constituyen mensajeros intracelulares importantes que median la acción de la Ang II (Griendling y Ushio-Fukai, 2000;

Zimmerman y col., 2002). 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 órgano subfornical (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  $AT_1$ , 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, 2004). Así, los cambios que induce la administración intracerebroventricular (ICV) de Ang II sobre la presión arterial media y la frecuencia cardíaca puede ser abolida mediante la sobre-expresión 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).

Con el fin de evaluar la hipótesis que la producción local ERO podría estar involucrada, al menos en parte, en las acciones excitatorias de la Ang II endógena liberada durante el estrés, evaluamos el papel del receptor  $AT_1$  presináptico, la NAD(P)H oxidasa y el  $O_2^{\cdot-}$  en la respuesta cardiovascular producida durante la aplicación de dos modelos experimentales de estrés agudo en ratas: el estímulo eléctrico plantar y la inmovilización forzada; ambos estímulos ocasionan la activación del eje simpático-suprarrenal y el consecuente incremento de la presión arterial y la frecuencia cardíaca (Lee y col., 1989), y la excreción urinaria de catecolaminas (Israel y col., 1994, Medina e Israel, 2004).

## Materiales y Métodos

### ANIMALES

Se emplearon ratas macho, de la cepa Sprague-Dawley, con un peso corporal de 180–200 g, procedente del Bioterio del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel", Caracas. Las ratas fueron mantenidas bajo condiciones controladas de luz y temperatura y con libre acceso al agua y a la 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.

sados y aprobados por la Comisión de Bioterio de la Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.

El registro de los parámetros cardiovasculares, presión arterial sistólica y diastólica (PAS Y PAD) y la frecuencia cardíaca (FC) expresada en latidos por minuto (l.p.m.) fueron realizados en ratas conscientes por un método no invasivo, durante tres días consecutivos, mediante el uso de un plestimógrafo digital de cola (LE 5000, LETICA Scientific Instruments).

### PROTOCOLO DE ESTRÉS

El día del experimento se determinó la presión arterial y frecuencia cardíaca basal (basal-1) y seguidamente los animales fueron divididos en cuatro grupos experimentales:

1. Grupo control: animales que sólo se les administró el vehículo por vía oral (intragástrica) o por vía intraperitoneal, según el caso.

2. Grupo tratamiento (Epro): animales que se les administró eprosartan, a una dosis única de 120 mg por vía intragástrica. Debido a su baja absorción gastrointestinal (30%) y a su interacción con los alimentos, doce horas previas al experimento a todos los animales se les restringió la alimentación a fin de garantizar la absorción del fármaco eprosartan por vía oral.

3. Grupo tratamiento (Apo): animales que se les administró apocinina, a una de 5 mg/kg por vía intraperitoneal.

4. Grupo tratamiento (Tem): animales que se les administró tempol, a una dosis 20 mg/kg por vía intraperitoneal.

Una hora después se determinó la PAS, PAD, PAM y la FC (basal 2), luego se procedió a la aplicación del modelo experimental de estrés correspondiente:

**Estímulo eléctrico plantar:** las ratas fueron transferidas a una cámara de plexiglás, con piso de alambre de cobre, donde recibieron la descarga eléctrica (1 Hz, 100 V, 10 mseg, durante 5 minutos) mediante el uso de un estimulador Grass (Modelo S48). Al terminar la estimulación eléctrica se determinó inmediatamente los parámetros cardiovasculares, PA y FC.

**Inmovilización forzada:** las ratas fueron inmovilizadas en posición dorsal, fijando sus extremidades a una base metálica plana, y manteniendo inmóvil la cabeza con cinta adhesiva. El estrés fue inducido entre las 9:00 y las 11:00 horas, durante dos horas. Una vez finalizado este período se determinó inmediatamente los parámetros cardiovasculares (Kvetnansky y Mikulaj, 1970).

Los datos fueron expresados como la media  $\pm$  E.E.M de la PAS, PAD y presión arterial media (PAM), esta última calculada como la suma de la presión diastólica y un tercio de la presión diferencial. Las diferencias entre los grupos se evaluaron mediante el análisis de varianza de una vía (ANOVA). Se consideró como significativo un valor  $p < 0,05$ .

## Resultados

El estímulo eléctrico plantar a (1Hz) y la inmovilización forzada por dos horas, incrementaron significativamente la presión arterial media (figuras 1 y 2) y la frecuencia cardíaca (no se muestra). El incremento sobre el basal de la presión arterial media inducido por el estímulo eléctrico plantar de 1 Hz tuvo un rango que va desde valores de  $24,42 \pm 2,42$  hasta  $42,7 \pm 3,17$  mmHg y para la inmovilización forzada fue de desde  $30,83 \pm 3,60$  hasta  $40,67 \pm 9,98$  mmHg. La administración oral intragástrica de eprosartan, no alteró significativamente la presión basal. Sin embargo, el eprosartán bloqueó la respuesta presora al estrés eléctrico plantar ( $N=25-28$  por grupo) y a la inmovilización forzada ( $N=4-5$  por grupo) (figuras 1 y 2) ( $p < 0,01$ ). En ningún caso se alteró la respuesta de la frecuencia cardíaca (no se muestra). En el caso de la IMO, además se observó una respuesta vasodepresora significativa en los animales tratados y sometidos al estrés ( $-15,13 \pm 8,04$ ;  $p < 0,001$ ).

Por otra parte, la administración intraperitoneal de la apocinina, un inhibidor de la NAD(P)H oxidasa, y el tempol, un superóxido dismutasa mimético, no solo inhibió completamente la respuesta cardiovascular frente al EEP y la IMO, sino que desenmascaró una respuesta vasodepresora significativa de valores de mmHg que oscila entre  $-7,04 \pm 6,79$  hasta  $-43 \pm 19,65$  ( $N= 4-8$  por grupo) (figuras 1 y 2).

## Discusión

La activación del receptor  $AT_1$  mediada por la Ang II, está asociada con una gran variedad de vías de señalización a nivel del tejido neuronal (Richards y col., 1999; Sumners y col., 2002). Se ha sugerido que la NAD(P)H oxidasa y la producción de superóxido, podrían participar en el mecanismo molecular que media mucha de las acciones centrales y periféricas de la Ang II, entre ellas la regulación de la respuesta simpática. Las principales fuentes de producción de  $O_2^{\cdot-}$  incluyen a la NAD(P)H oxidasa, la xantina oxidasa, la respiración mitocondrial y la óxido nítrico sintasa 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

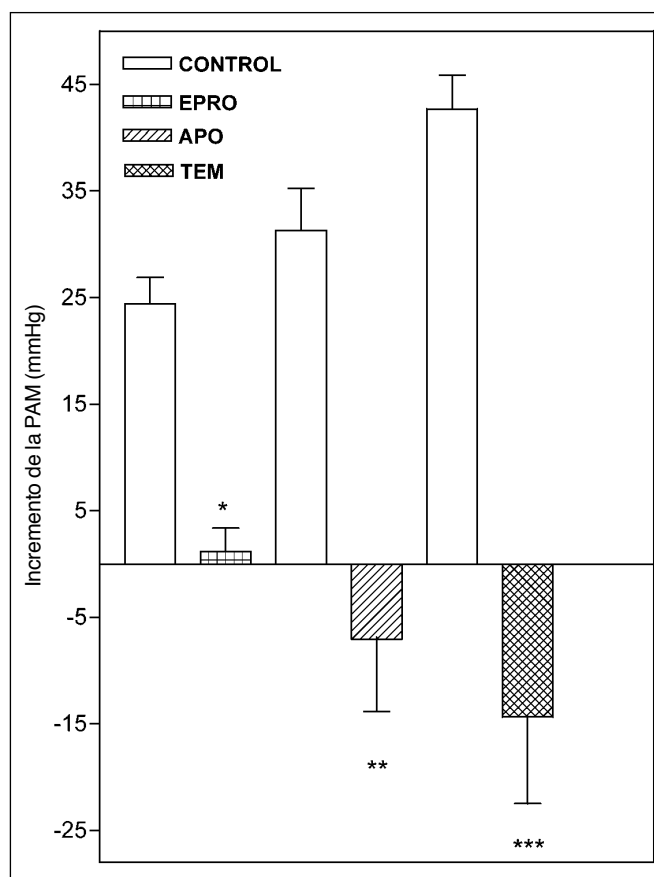


Figura 1. Efecto del eprosartan, la apocinina y el tempol en la respuesta presora inducida por el estímulo eléctrico plantar. \* $p < 0,01$ ; \*\* $p < 0,001$  y \*\*\* $p < 0,0001$ . ( $N=4-28$ , por grupo).

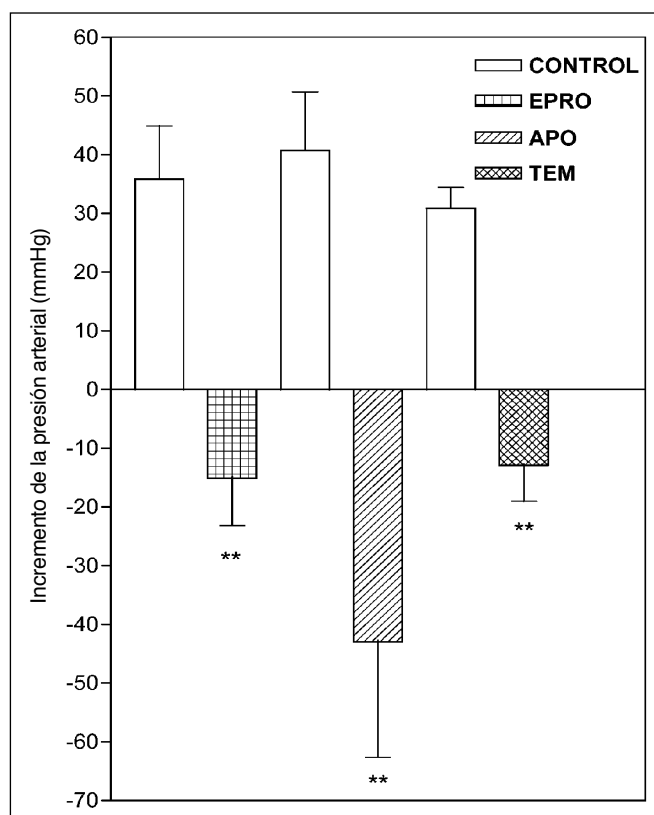


Figura 2. Efecto del eprosartan, la apocinina y el tempol en la respuesta presora inducida por la inmovilización forzada en ratas. \*\* $p < 0,001$ . ( $N=4-6$ , por grupo).

co 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 reguladora P47<sup>phox</sup> (Landmesser y col., 2002).

La evidencia apoya el concepto que las ERO generadas localmente, bien en los terminales simpáticos o en el SNC, podrían participar en las acciones simpato-excitatorias de la Ang II que ocurren durante el estrés. Al respecto, se ha demostrado que la administración intravenosa de un SOD mimético, el tempol, disminuye en forma aguda la presión arterial en ratas normotensas (Xu y col., 2001) e hipertensas (Xu y col., 2002; Meng y col., 2003), así como la presión arterial y la actividad nerviosa simpática renal en ratas hipertensas DOCA-sal (Xu y col., 2004), lo que sugiere una participación del O<sup>•-</sup> de la vasculatura, del sistema nervioso simpático, y quizá de ambos tejidos en las acciones vasopresoras y simpato-excitatorias de la Ang II.

Parte de estas acciones podrían estar mediadas centralmente. Así por ejemplo, se ha involucrado la activación del receptor AT<sub>1</sub> en el área rostro ventral del tallo cerebral (RVLM) y el hipotálamo en la expresión completa de la respuesta cardiovascular frente al estrés emocional (Kubo y col., 2001; Mayorov y Head, 2003). Aun más, se ha demostrado que la administración de inhibidores de la NAD(P)H oxidasa, como el difenileneiodonio (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 gp91ds-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 AngII en neuronas (Zimmerman y col., 2005).

Nuestros presentes resultados apoyan la posibilidad de la participación de las ERO en la acción facilitatoria de la Ang II en la respuesta simpática frente al estrés. En efecto, en dos modelos experimentales de

estrés agudo que activan el eje simpatoadrenal, como lo son el estímulo eléctrico plantar y la inmovilización forzada, en los que se produce un aumento de la presión arterial, la frecuencia cardíaca, y las catecolaminas urinarias (Israel y col., 1994, Medina e Israel, 2004), demostramos que la administración intraperitoneal del inhibidor de la NAD(P)H oxidasa, la apocinina y del mimético de la superóxido dismutasa, el tempol, no solo inhiben la respuesta presora inducida por el estrés, sino mas bien desenmascaron una respuesta vasodepresora significativa. Este efecto sugiere que el tempol y la apocinina, al reducir los niveles de O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, generarían un desbalance entre la producción de ERO y de NO inducida por la Ang II endógena liberada durante el estrés, lo cual favorecería a la vasodilatación. Nuestros hallazgos son confirmados por los experimentos de Mayorov y col. (2004), quienes demostraron que la microinyección bilateral de apocinina, tempol o tiron directamente en el RVLM en conejos conscientes, reduce marcadamente la respuesta presora, taquicárdica y simpato-excitatoria renal inducida por el estrés producido por una corriente de aire en la cara de la rata (air-jet), sin alterar los parámetros basales. Igualmente, la administración de tempol o tiron en la región dorsomedial del hipotálamo (DMH) reduce marcadamente el efecto cardiovascular del estrés producido por una corriente de aire en la cara de la rata (air-jet) (De Matteo y col., 2006b). En conjunto, estos hallazgos indican que la producción local de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> inducida por la Ang II endógena, liberada durante el estrés agudo, podría por una parte alterar la respuesta facilitadora del receptor AT<sub>1</sub> presináptico y/o de las neuronas vasomotoras del RVLM y de otros núcleos implicados en la respuesta cardiovascular frente al estrés.

En apoyo a que las acciones de la Ang II endógena liberada durante el estrés facilitan la transmisión noradrenérgica a través del receptor AT<sub>1</sub>, están nuestros hallazgos previos en los que se demuestra que la administración del losartan, antagonista selectivo del receptor AT<sub>1</sub>, atenuó significativamente la respuesta presora ante la estimulación simpática (Cierco e Israel, 1994). Nuestros resultados presentes amplían nuestras observaciones previas y confirman que este efecto es un mecanismo general que ocurre en el estrés agudo, ya que la administración oral de eprosartan no sólo inhibió la respuesta frente al EEP, sino que fue capaz también de bloquear la respuesta cardiovascular al estrés por inmovilización forzada, resultando en una respuesta vasodepresora profunda. Desde que el eprosartan es un compuesto que actúa preferentemente a nivel del receptor AT<sub>1</sub> presináptico (Pinheiro y col., 2002), se puede inferir que la acción de la Ang II y la producción de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> en el sistema

nervioso, ocurre principalmente a nivel de los receptores AT<sub>1</sub> localizados en los terminales nervioso simpáticos, sitio en donde se ejerce la acción facilitatoria de la Ang II endógena (Cierco y Israel, 1994). Estos hallazgos ocurren también en el SNC, tal y como lo reportan Mayorov y Head, (2003), quienes demostraron que el bloqueo de los receptores AT<sub>1</sub> en el RVLM abole la respuesta presora inducida por el estrés producido por una corriente de aire en la cara de la rata (*air-jet*) y la microinyección de candesartan en DMH atenúa la respuesta presora y taquicardica inducida por el estrés producido por una corriente de aire en la cara de la rata (*air-jet*) y en conejos (De Matteo y col., 2006a).

En resumen, los resultados indican que la producción de O<sub>2</sub><sup>-</sup> inducida por el estrés no es un fenómeno general causado por la excitación neuronal *per se*, sino mas bien está relacionado intrínsecamente a la vía de señalización del receptor AT<sub>1</sub>, que es sensible a la oxidación-reducción. Nuestros resultados son de relevancia clínica ya que sugieren que la inhibición dirigida a la vía de señalización receptor AT<sub>1</sub>-NAD(P)H oxidasa-O<sub>2</sub><sup>-</sup> podría reducir selectivamente la reactividad cardiovascular frente a los estresores emocionales negativos, y por lo tanto disminuir los riesgos de hipertensión y enfermedad cardíaca.

## Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por proyectos del Instituto de Investigaciones Farmacéuticas de la Facultad de Farmacia, IIF-04-2008 y del Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico CDCH PI-06-7348-2008.

## Referencias bibliográficas

- Aguilera G. 1993. Factors controlling steroid biosynthesis in the zona glomerulosa of the adrenal. *J Steroid Biochem Mol Biol* 45: 147-151.
- Aguilera G, Kiss A, Luo X. 1995. Increased expression of type I angiotensin II receptors in the hypothalamic paraventricular nucleus following stress and glucocorticoid administration. *J Neuroendocrinol.* 7: 775-783.
- Armando I, Carranza A, Nishimura Y, Hoe KL, Barontini M, Terrón JA, Falcón-Neri A, Ito T, Juorio AV, Saavedra JM. 2001. Peripheral administration of an angiotensin II AT<sub>1</sub> receptor antagonist decreases the hypothalamic-pituitary-adrenal response to isolation stress. *Endocrinology* 142:3880-3889.
- Atlante A, Calissano P, Bobba A, Giannattasio S, Marra E, Passarella S. 2001. Glutamate neurotoxicity, oxidative stress and mitochondria. *FEBS Lett* 497: 1-5.
- Baltatu O, Campos LA, Bader M. 2004. Genetic targeting of the brain renin-angiotensin system in transgenic rats: impact on stress-induced renin release. *Acta Physiol Scand* 181: 579-584.
- Campese VM, Shaohua Y, Huiquin Z. 2005. Oxidative stress mediates angiotensin II-dependent stimulation of sympathetic nerve activity. *Hypertension* 46:533-539.
- Carrasco GA, Van de Kar LD. 2003. Neuroendocrine pharmacology of stress. *Eur J Pharmacol* 463: 235-272.
- 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.
- Cierco M, Israel A. 1994. Role of angiotensin AT<sub>1</sub> receptor in the cardiovascular response to footshock. *Eur J Pharmacol* 251: 103-106.
- De Matteo R, Head GA, Mayorov DN. 2006a. Angiotensin II in dorsomedial hypothalamus modulates cardiovascular arousal caused by stress but not feeding in rabbits. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 290:R257-R264.
- De Matteo R, Head GA, Mayorov DN. 2006b. Tempol in the dorsomedial hypothalamus attenuates the hypertensive response to stress in rabbits. *Am J Hypertens* 19: 396-402.
- 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.
- Esler M. 1998. Stress, stressors and cardiovascular disease. In *Repatriation Medical Authority Consensus Conference on Stress and Challenge – Health and Disease*, ed. Morris P, Raphael B & Bordujenko A, pp. 198–206. Australian Government Repatriation Medical Authority Publications, Brisbane, Australia.
- Esler MD, Thompson JM, Kaye DM, Turner AG, Jennings GL, Cox HS, Lambert GW, Seals DR. 1995. Effects of aging on the responsiveness of the human cardiac sympathetic nerves to stressors. *Circulation* 91: 351-358.
- Gao L, Wang W, Li YL, Schultz HD, Liu D, Cornish KG, Zucker IH. 2005. Sympatho-excitation by central Ang II: The roles for AT<sub>1</sub> receptor upregulation and NAD(P)H oxidase in the RVLM. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288: H2271-H2279.
- Goldstein DS. 1995. Clinical assessment of sympathetic responses to stress. *Ann N Y Acad Sci* 771: 570-593.
- Griendling KK, Ushio-Fukai M. 2000. Reactive oxygen species as mediators of angiotensin II signaling. *Regul Pept* 91:21-27.
- Hirasawa R, Hashimoto K, Ota Z. 1990. Role of central angiotensinergic mechanism in shaking stress-induced ACTH and catecholamine secretion. *Brain Res* 533: 1-5.

- Huang BS, Leenen FH. 1996. Brain 'ouabain' and angiotensin II in salt-sensitive hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 28:1005-1012.
- Israel A, Cierco M, Barbella Y. 1994. Role of angiotensin II receptor subtypes, AT<sub>1</sub> and AT<sub>2</sub>, on fluid and electrolyte metabolism and on the cardiovascular response to footshock. *Progress in Pharmacology and Clinical Pharmacology*, Eds. Velasco, M. and Israel, A., Gustav Fischer Verlag-Stuttgart-Jena-N.Y. 10:1-12.
- Israel A, Sosa B. 2002. Angiotensin II supports sympathetically mediated vasopressor response to footshock-stress. *J. Human Hypertension* 16 Suppl 1: S84-S88.
- Jezova D, Ochedalski T, Kiss A, Aguilera G. 1998. Brain angiotensin II modulates sympathoadrenal and hypothalamic pituitary adrenocortical activation during stress. *J Neuroendocrinol* 10:67-72.
- Kario K, McEwen BS, Pickering TG. 2003. Disasters and the heart: a review of the effects of earthquake-induced stress on cardiovascular disease. *Hypertens Res* 26:355-367.
- Keller-Wood, ME, Shinsako J, Dallman MF. 1983. Inhibition of the adrenocorticotropin and corticosteroid responses to hypoglycemia after prior stress. *Endocrinology* 113: 491-496.
- Kubo T, Numakura H, Endo S, Hagiwara Y, Fukumori R. 2001. Angiotensin receptor blockade in the anterior hypothalamic area inhibits stress-induced pressor responses in rats. *Brain Res Bull* 56: 569-574.
- Kvetnansky R, Mikulaj L. 1970. Adrenal and urinary catecholamines in rats during adaptation to repeated immobilization. *Endocrinology* 87:738-743.
- 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.
- Lee J, Konarska M, McCarty R. 1989. Physiological responses to acute stress in alloxan and streptozotocin diabetic rats. *Physiol. Behav.* 45: 483-489.
- Livett BG, Marley PD, Wan DC, Zhou XF. 1990. Peptide regulation of adrenal medullary function. *J. Neural Transm Suppl.* 29: 77-89.
- Lovullo WR, Gerin W. 2003. Psychophysiological reactivity: mechanisms and pathways to cardiovascular disease. *Psychosom Med* 65: 36-45.
- 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.
- McDougall SJ, Widdop RE, Lawrence AJ. 2005. Central autonomic integration of psychological stressors: focus on cardiovascular modulation. *Auton Neurosci* 123: 1-11.
- Mayorov DN, Head GA. 2003. AT<sub>1</sub>-receptors in the RVLM mediate pressor responses to emotional stress in rabbits. *Hypertension* 41: 1168-1173.
- Mayorov DN, Head GA, De Matteo R. 2004. Tempol attenuates excitatory actions of angiotensin II in the rostral ventrolateral medulla during emotional stress. *Hypertension* 44:101-106.
- Medina I e Israel A. 2004. Efecto del eprosartan, un antagonista selectivo del receptor AT<sub>1</sub>, sobre la respuesta cardiovascular inducida por el estrés en ratas. *Revista de la Facultad de Farmacia* 67 (1-2): 18-24.
- Meng S, Cason GW, Gannon AW, Racusen LC, Manning RD. 2003. Oxidative stress in Dahl salt-sensitive hypertension. *Hypertension*. 41: 1346-1352.
- Pinheiro H, Moura D, Afcino-Teixeira A, Alves Ñ, Tories L, Guimaraes S. 2002. A comparison of AT(1) angiotensin II antagonists at pre and postjunctional angiotensin II receptors of the rat tail artery. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 366:537-542.
- 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 I receptor-modulated signaling pathways in neurons. *Mol Neurobiol* 19:25-41.
- Rozanski A, Blumenthal JA, Kaplan J. 1999. Impact of psychological factors on the pathogenesis of cardiovascular disease and implications for therapy. *Circulation* 99:2192-2217.
- Saavedra JM. 1992. Brain and pituitary angiotensin. *Endocrinol. Rev.* 13: 329-380.
- Saavedra JM, Ando H, Armando I, Baiardi G, Bregonzio C, Jezova M, Zhou J. 2004. Brain angiotensin II, an important stress hormone: regulatory sites and therapeutic opportunities. *Ann N Y Acad Sci* 1018: 76-84.
- Saiki Y, Watanabe T, Tan N, Matsuzaki M, Nakamura S. 1997. Role of central ANG II receptors in stress-induced cardiovascular and hyperthermic responses in rats. *Am J Physiol* 272:R26-R33.
- 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.
- Sumners C, Fleegal MA, Zhu MY. 2002. Angiotensin AT-1 receptor signalling pathways in neurons. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 29: 483-490.
- 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.
- 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.

- Watanabe T, Fujioka T, Hashimoto M, Nakamura S. 1998. Stress and brain angiotensin II receptors. *Crit Rev Neurobiol* 12: 305-317.
- Yang G, Wan Y, Zhu Y. 1996. Angiotensin II – an important stress hormone. *Biol Signals* 5:1-8.
- Xu H, Fink GD, Chen A, Watts S, Galligan JJ. 2001. Nitric oxide-independent effects of tempol on sympathetic nerve activity and blood pressure in normotensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281: H975-H980.
- Xu H, Fink GD, Galligan JJ. 2002. Nitric oxide-independent effects of tempol on sympathetic nerve activity and blood pressure in DOCA-salt rats. *Am J Physiol* 23: H885-H892.
- Xu H, Fink GD, Galligan JJ. 2004. Tempol lowers blood pressure and sympathetic nerve activity but not vascular  $O_2^-$  in DOCA-salt rats. *Hypertension* 43: 329-338.
- 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. *Circ 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* 41: 1-7.