

# Papel del receptor AT<sub>2</sub> en la activación de las enzimas antioxidantes en la médula suprarrenal de la rata

## Role of AT<sub>2</sub> receptor in the activation of antioxidant enzymes activity in rat Adrenal Medulla

JOSÉ SILVA, SARA DE JESÚS, MARÍA DEL ROSARIO GARRIDO y ANITA ISRAEL\*

### Resumen

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. Con el fin de establecer la posible participación de las ERO en el mecanismo de señalización intracelular mediado por los subtipos de receptores de angiotensina II, AT<sub>1</sub> y AT<sub>2</sub>, evaluamos el papel de la NAD(P)H oxidasa y la proteína quinasa C (PKC) en la activación de las enzimas antioxidantes inducida por ANG II, en la médula suprarrenal de la rata. Se emplearon ratas macho de la cepa Sprague-Dawley, las cuales fueron sacrificadas por decapitación y las médulas suprarrenales fueron extraídas por microdissección bajo control esteromicroscópico. La actividad de las enzimas superóxido dismutasa y catalasa fue determinada espectrofotométricamente. En la médula suprarrenal, la ANG II incrementó la actividad de las dos enzimas antioxidantes evaluadas. Maniobras como el bloqueo del receptor AT<sub>2</sub> con PD 123319, la interferencia del ensamblaje de la NAD(P)H oxidasa con apocinina, y la inhibición de la PKC con cheleritrina, bloquearon completamente el efecto que produce la ANG II sobre las enzimas antioxidantes. Por el contrario, el bloqueo del receptor AT<sub>1</sub> potenció el efecto estimulante de la ANG II. Nuestros resultados indican, por primera vez, que en la médula suprarrenal de la rata, las especies reactivas de oxígeno participan en la señalización intracelular de la ANG II, vía el receptor AT<sub>2</sub>.

**Palabras clave:** Angiotensina II, estrés oxidativo, catalasa, superóxido dismutasa, apocinina, cheleritrina.

### Abstract

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. In order to establish the possible intracellular mechanism by which ROS mediates neuronal ANG II actions in adrenomedullary regulation, we assessed *in vitro* the role of angiotensin AT<sub>1</sub> and AT<sub>2</sub> receptors, NAD(P)H oxidase and protein kinase C (PKC) in the angiotensin II-induced activation of antioxidant enzymes. Male Sprague-Dawley rats were sacrificed by decapitation and adrenal medulla was microdissected under stereomicroscopic control. Superoxide dismutase and catalase activity was determined spectrophotometrically. In adrenal medulla, ANG II increased the activities of two of the antioxidant enzymes. Blockade of AT<sub>2</sub> receptor 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. On the contrary, this effect was potentiated by losartan. Our results demonstrate, for the first time, that AT<sub>2</sub> receptor and redox signaling are involved in ANG II actions in the rat adrenal medulla.

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

\* Facultad de Farmacia, Unidad de Neuropeptidos, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.  
E-mail: astern60@hotmail.com

## Introducción

El sistema renina angiotensina (SRA), a través de su octapéptido activo la angiotensina II (ANG II) o de fragmentos menores, ejerce una gran variedad de efectos fisiológicos y fisiopatológicos sobre diversos sistemas tales como el cardiovascular, el renal, el endocrino y el sistema nervioso central (Saavedra y col., 2006).

La evidencia indica que la ANG II y sus fragmentos se producen y actúan localmente sobre diferentes órganos blanco, constituyendo así el SRA tisular. El SRA tisular ha adquirido gran relevancia fisiológica en la medida que se ha demostrado la expresión local de los componentes del sistema como el angiotensinógeno, la renina, la enzima convertidora de angiotensina (ECA) y de las angiotensinas en diferentes tipos celulares, en tejidos aislados de órganos extra-renales que contienen renina y en tumores (Naruse y col., 1984, 1985).

En la glándula suprarrenal el SRA tisular ha adquirido gran relevancia, especialmente desde que se ha demostrado la expresión local de todos los componentes del sistema tales como la pro-renina, el angiotensinógeno, la renina, la ECA, las angiotensinas y los receptores de ANG II, tal y como se ha descrito en células de neuroblastoma en cultivo (Okamura y col., 1981; Mizuno y col., 1985), células de feocromocitoma (Okamura y col., 1984), células adrenocorticales (Naruse y col., 1984, 1985), células de la zona glomerulosa (Nakamura y col., 1985), tumores de las células de Leydig testicular (Pandey e Inagami, 1986), los gonadotrofos que contiene hormona luteinizante de la glándula pituitaria (Mc Kenzei y col., 1985) y en células del músculo liso vascular (Dzau, 1984). Aun mas, la importancia del SRA suprarrenal se ve resaltado gracias a los hallazgos de Mullins y col. (1990), quienes reportaron que en ratas transgénicas que presentan el gen de renina de ratón Ren-2, se observa una asociación entre la hipertensión fulminante y el alto contenido de renina suprarrenal que resulta de la sobre-expresión del gen transgénico en este órgano, mientras que la renina plasmática y renal se encuentran disminuidas.

La glándula suprarrenal contiene los mayores niveles de ANG II hasta ahora medidos en todos los tejidos. Los niveles cuantificados de ANG II son de  $3,32 \pm 281$  pg/g. La mayoría de esta ANG II proviene de la corteza suprarrenal, aun cuando la médula también contiene ANG II. La presencia de inmunoreactividad a la ANG II en la glándula suprarrenal de la rata, persiste aun después de la nefrectomía bilateral (Aguilera y col., 1982; Mendelsohn, 1982), lo que apoya un origen intraglandular. Igualmente, se ha identificado el ARNm para renina, principalmente en

la cápsula de la corteza suprarrenal de la rata, el ratón y el hombre (Deschepper y col., 1986), mientras que hasta el presente no se ha detectado renina, ni su ARNm en la médula suprarrenal. La enzima convertidora de angiotensina (ECA) se encuentra presente tanto a nivel de la médula como la corteza suprarrenal. Los niveles elevados de la enzima en la médula suprarrenal sugieren un papel funcional para la ECA local (Israel y col., 1986). Esto se ratifica por el hallazgo mediante técnicas autoradiográficas en la que se demuestra la presencia de sitios de unión para el  $^{125}\text{I}$ -351A o  $^3\text{H}$ -captopril, ambos inhibidores específicos de la ECA, en la cápsula-zona glomerulosa y la médula suprarrenal de la rata (Plunkett y col., 1985). En relación a los receptores de ANG II y basados en estudios de ligandos y del efecto de DTT sobre la unión de la ANG II a su receptor, se demostró que la corteza suprarrenal contiene, fundamentalmente, receptores  $\text{AT}_1$ , mientras que la médula suprarrenal presenta dos subtipos de receptores:  $\text{AT}_1$  y  $\text{AT}_2$ . Siendo el receptor  $\text{AT}_2$  el que se encuentra en mayor proporción (95%) mientras que el  $\text{AT}_1$  representa un 5% (Chiu y col., 1989, Israel y col., 1995). Los efectos conocidos de la ANG II a nivel de la región cortical y medular son mediados por el receptor  $\text{AT}_1$  (Balla y col., 1991). El papel funcional del receptor  $\text{AT}_2$  de ANG II en la médula suprarrenal no ha sido elucidado hasta el presente.

La ANG II estimula la liberación de catecolaminas desde la médula suprarrenal tanto *in vivo* como *in vitro* (Armando y col., 2004). La estimulación a largo plazo de las células cromafines de la médula suprarrenal de bovino modula la expresión de las enzimas biosintéticas de las catecolaminas y las encefalinas (Armando y col., 2004). Estos hallazgos indican que la ANG II puede actuar localmente dentro de la glándula suprarrenal interactuando con sus receptores específicos para estimular las células cromafines.

Se ha demostrado en varios tejidos, así como en el sistema nervioso central (SNC) que la ANG II es capaz de estimular la producción del anión superóxido, principalmente a través de la estimulación de la NAD(P)H oxidasa (Griendling y col., 1994, 2000b). La NAD(P)H oxidasa cataliza la reducción del oxígeno molecular a superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), el cual es convertido a peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) por la familia de la enzima superóxido dismutasa (SOD). El  $\text{H}_2\text{O}_2$ , a su vez es convertido en agua por acción de la enzima catalasa o por la glutatión peroxidasa (Babior, 1999). Ahora bien, desde que la activación del receptor  $\text{AT}_1$  está asociado con una gran variedad de vías de señalización a nivel del tejido neuronal (Richards y col., 1999; Summers y col., 2002), se ha postulado que la NAD(P)H oxidasa podría participar en el mecanismo molecular que media mucha de las acciones de la ANG II. Sin embargo, se desconoce si existe esta relación en la

médula suprarrenal y aún menos se conoce el subtipo de receptor asociado a esta señalización.

En apoyo al papel de la NAD(P)H oxidasa en la señalización de la ANG II, se ha demostrado que la administración de inhibidores de la NAD(P)H oxidasa, como el difenileneiodonio (DPI) y la apocinina, en el RVLM (rostroventrolateral medulla) 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).

Debido a que los sistemas generadores de superóxido en el tejido nervioso (Lindenau y col., 2000), así como la señalización mediante especies reactivas de oxígeno (ERO), se encuentran ampliamente relacionados con los procesos celulares regulados por la ANG II, nos propusimos evaluar *in vitro* el papel del receptor AT<sub>1</sub> y AT<sub>2</sub>, de la NAD(P)H oxidasa y de la PKC en la activación inducida por ANG II de dos enzimas antioxidantes: la catalasa y la superóxido dismutasa, en la médula suprarrenal 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, los cuales fueron mantenidos en condiciones controladas de luz y temperatura y con acceso al alimento (Ratarina<sup>®</sup>) *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, la médula suprarrenal fue disecada mediante microdisección bajo control estereomicroscópico y mantenida 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 mM 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 la médula suprarrenal, 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.

## Determinación 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 estadístico

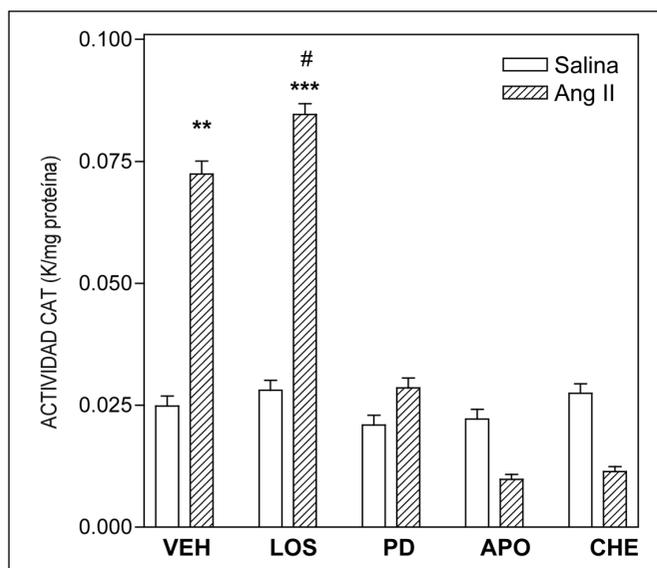
Los resultados se expresaron como la media ± E.E.M. La significancia de los resultados fue analizada mediante el análisis de varianza de una vía (ANOVA). Un valor de  $P < 0,05$  fue considerado significativo.

## Resultados

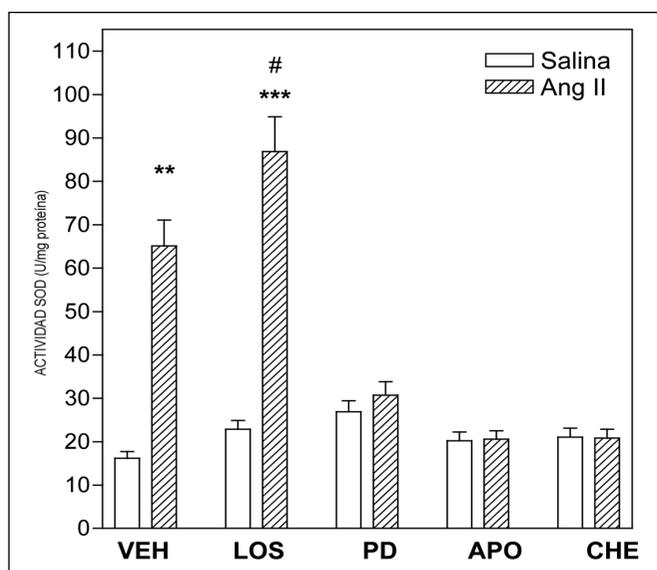
*Efecto de los inhibidores de la NAD(P)H oxidasa y de la PKC y de los bloqueantes de los receptores AT<sub>1</sub> y AT<sub>2</sub>, sobre la actividad CAT y SOD estimulada por la ANG II en la médula suprarrenal de la rata.*

Como se muestra en las figuras 1 y 2, la incubación de la médula suprarrenal de la rata con angiotensina II (10<sup>-7</sup> M) incrementa significativamente la actividad de la catalasa (2,88 veces comparada con el control) (figura 1) y de la superóxido dismutasa (4,02 veces comparada con el control) (figura 2). Estos efectos fueron completamente inhibidos por la adición al medio de incubación de un bloqueante del receptor AT<sub>2</sub>, el PD 123319 (PD, 10<sup>-6</sup>M), un inhibidor de la NAD(P)H oxidasa, la apocinina (APO, 10<sup>-4</sup>M) o un inhibidor de la PKC, la cheleritrina (CHE, 6,5 µM).

Por el contrario, la actividad de las enzimas antioxidantes estimulada por la ANG II fue potenciada por la adición del losartán (LOS,  $10^{-6}$  M) (CAT: en 18% y SOD: en 33% cuando se compara la ANG II con ANG II+LOS). N=6-9 experimentos individuales. \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  comparado con el control, # $p < 0,05$  comparado ANG II con ANG+LOS).



**Figura 1.** Efecto del LOS ( $10^{-6}$  M), el PD123319 ( $10^{-5}$  M), la APO ( $10^{-4}$  M) y la CHE ( $6.5 \mu\text{M}$ ) sobre la actividad enzimática de la catalasa (CAT) estimulada por la ANG II ( $10^{-7}$  M) en la médula suprarrenal de la rata. Los tejidos fueron incubados con o sin ANG II ( $10^{-7}$  M) durante 10 min. Cada barra representa la media  $\pm$  E.E.M. de N=6-9 experimentos individuales. \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  comparado con el control. # $p < 0,05$  comparando ANG II con ANG+LOS.



**Figura 2.** Efecto del LOS ( $10^{-6}$  M), el PD123319 ( $10^{-5}$  M), la APO ( $10^{-4}$  M) y la CHE ( $6.5 \mu\text{M}$ ) sobre la actividad de la superóxido dismutasa (SOD) estimulada por la ANG II ( $10^{-7}$  M) en la médula suprarrenal de la rata. Los tejidos fueron incubados con o sin ANG II ( $10^{-7}$  M) durante 5 min. Cada barra representa la media  $\pm$  E.E.M. de N=6-9 experimentos individuales. \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  comparado con el control. # $p < 0,05$  comparando ANG II con ANG+LOS.

## Discusión

Aun cuando se reconoce el papel fundamental del sistema renina-angiotensina en la regulación cardiovascular, el mecanismo preciso de señalización involucrado en la acción suprarrenal 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 col., 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  $\text{O}_2^{\cdot-}$  y la frecuencia disparo en cultivos de neuronas, 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  $\text{AT}_1$ , ya que son prevenidas por el pretratamiento con el losartán (Zimmerman y col., 2002; Sun y col., 2005).

En contraste a los efectos mediados por el receptor  $\text{AT}_1$ , poco se conoce acerca del papel funcional y las vías de las señales de transducción conectadas con el receptor  $\text{AT}_2$ . Se ha postulado que el receptor  $\text{AT}_2$  se encuentra involucrado en el crecimiento celular, la diferenciación y la apoptosis (Yamada y col., 1996; Stoll y col., 1995; Nakajima y col., 1995). El receptor  $\text{AT}_2$  se encuentra altamente expresado en el feto en desarrollo (Grady y col., 1991), mientras que en el adulto el receptor  $\text{AT}_2$  se encuentra confinado en áreas restringidas de algunos órganos como el cerebro, en el útero y en los miocitos cardiacos (Nio y col., 1995; y col., Obermuller y col., 1991; Tsuzuki y col., 1994). Igualmente, el receptor  $\text{AT}_2$  se encuentra altamente expresado en la médula suprarrenal, donde representa el 95% de la población de los receptores de ANG II (Chiu y col., 1989; Whitebread y col., 1989; Israel y col., 1995). Se sabe que el receptor  $\text{AT}_2$  participa en la regulación de la producción de GMPc ya que se ha demostrado que su estimulación reduce el contenido de GMPc intracelular en neuronas y células cromafines (Sumners y col., 1991; Israel y col., 1995). Sin embargo, el papel funcional exacto del receptor  $\text{AT}_2$  así como su señalización en las células cromafines suprarrenales aun permanece elusivo.

La ANG II actúa como un secretagogo de las catecolaminas en la médula suprarrenal, efecto que es

mediado por el receptor AT<sub>1</sub> y el incremento de la producción de fosfoinosítidos (Wong y col., 1990; Dendorfer y col., 1998; Israel y col., 1995). Al respecto, Wong y col. (1990) demostraron que la ANG II a través del receptor AT<sub>1</sub> es capaz de liberar catecolaminas desde la médula suprarrenal. Este efecto parece estar mediado por la activación del receptor AT<sub>1</sub> asociada a la activación de la fosfolipasa C y la subsecuente formación de IP<sub>3</sub> y la liberación del Ca<sup>2+</sup> desde sus depósitos hacia el citoplasma (Israel y col., 1995). Sin embargo, existe evidencia del grupo de Belloni y col. (1998) que demuestran que la estimulación del receptor AT<sub>2</sub> con ANG II o con CGP 42112 (agonista del receptor AT<sub>2</sub>), también produce la liberación de catecolaminas desde la médula suprarrenal (Belloni y col., 1998), efectos que fueron inhibidos por el PD 123319 (antagonista del receptor AT<sub>2</sub>), pero no por el losartan (antagonista del receptor AT<sub>1</sub>). Aun más, se ha demostrado en la médula suprarrenal, que el bloqueo de los dos subtipos de receptores de ANG II con candesartan o PD123319, disminuyen el ARNm de la tirosina hidroxilasa y el contenido de norepinefrina (NE), sin afectar el de la epinefrina, sugiriendo que en condiciones basales la ANG II, a través los receptores AT<sub>1</sub> y AT<sub>2</sub>, ejercen un control tónico de la síntesis y secreción de NE en la médula suprarrenal (Armando y col., 2004). Estos efectos sinérgicos funcionales y regulatorios de los receptores de ANG II, no concuerdan con la propuesta de un papel contrarregulatorio de los receptores AT<sub>1</sub> y AT<sub>2</sub> en otras funciones de la angiotensina II. Sin embargo, no se puede descartar que estas acciones sinérgicas estén asociadas a mecanismos de contrarregulación en la señalización «aguas abajo» que resultaría en una misma acción funcional.

En los tejidos periféricos, el O<sub>2</sub><sup>-</sup> producido por la estimulación del receptor AT<sub>1</sub> por la ANG II, es convertido a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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), lo que ha permitido proponer que la cascada de la NAD(P)H oxidasa y el subsecuente incremento de la actividad de las enzimas antioxidantes está involucrada en la señalización del receptor AT<sub>1</sub> en las neuronas (Richards y col., 1999; Sumners y col., 2002). Se desconoce si el receptor AT<sub>2</sub> está relacionado directamente con este tipo de señalización. Contrariamente a lo reportado hasta el presente, nuestros hallazgos en experimentos *in vitro* en tejido de la médula suprarrenal demuestran, por primera vez, que el receptor AT<sub>2</sub> también es capaz de estimular la actividad de las enzimas antioxidantes a través de la estimulación de la NAD(P)H oxidasa. En efecto, la preincubación de la

médula suprarrenal con un desacoplante del ensamblaje de la NAD(P)H oxidasa como es la apocinina, o con un bloqueante específico del receptor AT<sub>2</sub> como lo es el PD123319, inhibe completamente el efecto estimulador de la ANG II sobre la actividad de las enzimas antioxidantes: CAT y SOD. Lo que sugiere la existencia de un mecanismo regulatorio que ejerce un control inmediato de los niveles de las ERO estimulados por la ANG II a través de la cascada receptor AT<sub>2</sub>/NAD(P)H oxidasa. Por otro lado, el bloqueo del receptor AT<sub>1</sub> en la médula suprarrenal, resultó en una potenciación de la actividad de las dos enzimas antioxidantes estimulada por la ANG II a través del receptor AT<sub>2</sub>, sugiriendo la existencia de una señalización antagónica entre ambos subtipos de receptores. Este antagonismo en la capacidad de la ANG II de inducir la formación de superóxido ha sido reportado previamente, pero en sentido opuesto, en las células endoteliales (Sohn y col., 2000), en el hipotálamo (Silva y col., 2010), en la acción antidiurética de la ANG II administrada centralmente (Israel y col., 2009) y en la regulación de la biosíntesis de catecolaminas reportada por Takekoshi y col. (2002) en cultivo de células cromafines de la médula suprarrenal de porcino.

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 la estimulación del receptor AT<sub>1</sub> neuronal por la ANG II activa a la proteína quinasa C (PKC) y a 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 han implicado a estas dos quinasas en la producción de las ERO en muchos tipos de células incluyendo a las neuronas (Lassegue y Clempus, 2003); así la inhibición de estas quinasas es un requisito fundamental para la atenuación de la actividad neuronal y de la corriente de potasio (Sumners y col., 2002). Nuestros resultados presentes muestran, por primera vez, la posible participación de una PKC en la señalización asociada a la cascada de la NAD(P)H oxidasa/receptor AT<sub>2</sub> en un tejido nervioso como lo es la médula suprarrenal de la rata. Así, la preincubación del tejido de la médula suprarrenal con cheleritrina, un inhibidor de la PKC, produjo la completa inhibición del incremento de la actividad de las enzimas antioxidantes CAT y SOD 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 la cual se sabe

esta mediada por ambos subtipos de receptores de ANG II (Barbella y col., 1993; Fleegal y Sumners, 2003). Estos hallazgos permiten inferir que en la médula suprarrenal de la rata, la activación de los receptores AT<sub>2</sub>, conlleva a la estimulación de la proteína quinasa C y la modulación de la actividad de las células cromafines. 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).

En conclusión, nuestros resultados demuestran que en la médula suprarrenal de la rata, la ANG II incrementa la actividad de las enzimas antioxidantes: CAT y SOD, a través de la estimulación del receptor AT<sub>2</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) Proyecto PG-06-7349-2008/1, Universidad Central de Venezuela y el Ministerio para el Poder Popular de Ciencia Tecnología e Industrias, Proyecto Misión Ciencia, ECCV No. 2007001585.

### Referencias bibliográficas

- Aebi H. Catalase. In: L. Packer (Ed), *Methods in Enzymology*, Academic press, Orlando, 1984. 105: 121-126.
- Aguilera G. 1982. Role of angiotensin II receptor subtypes on the regulation of aldosterone secretion in the adrenal glomerulosa zone in the rat. *Mol Cell Endocrinol* 90: 53-60.
- Armando I, Jezova M, Bregonzio C, Baiardi G, Saavedra JM. 2004. Angiotensin II AT<sub>1</sub> and AT<sub>2</sub> receptor types regulate basal and stress-induced adrenomedullary catecholamines production through transcriptional regulation of tyrosine hydroxylase. *Ann N Y Acad Sci* 1018: 302-309.
- Babior BM. 1999. NADPH oxidase: an update. *Blood* 93: 1464-1476.
- Balla T, Baukal AJ, Eng S, Catt KJ. 1991. Angiotensin II receptor subtypes and biological responses in the adrenal cortex and medulla. *Mol Pharmacol* 40:401-406.
- 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.
- Belloni AS, Andreis PG, Macchi V, Gottardo G, Malendowicz LK, Nussdorfer GG. 1998. Distribution and functional significance of angiotensin-II AT<sub>1</sub>- and AT<sub>2</sub>-receptor subtypes in the rat adrenal gland. *Endocr Res* 24:1-15.
- 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.
- Chiu AT, Herblin WF, McCall DE, Ardecky RJ, Carini DJ, Duncia JV, Pease LJ, Wong PC, Wexler RR, Johnson A, Timmermans PB. 1989. Identification of angiotensin II receptor subtypes. *Biochem Biophys Res Commun* 165:196-203.
- Deschepper CF, Mellow SH, Cumin F, Baxter JD, Ganong WF. 1986. Analysis by immunocytochemistry and in situ hybridization of renin and its mRNA in kidney, testis, adrenal and pituitary of the rat. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 7552-7556.
- Dendorfer A, Raasch W, Tempel K, Dominiak P. 1998. Interactions between the renin-angiotensin system (RAS) and the sympathetic system. *Basic Res Cardiol* 93 (Suppl 2):24-29.
- Deng WX, Henati A, Tanier JA. 2005. Amyotrophic lateral sclerosis and structural defects in Cu, Zn superoxide dismutase. *Science* 261:1047-1051.
- Dzau VJ. 1984. Vascular renin-angiotensin; a possible autocrine or paracrine system in control of vascular function. *J Cardiovasc Pharmacol* 6: S377-S382.
- 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.
- 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.
- Grady EF, Sechi LA, Griffin CA, Schambelan M, Kalinyak JE. 1991. Expression of AT<sub>2</sub> receptors in the developing rat fetus. *J Clin Invest* 88:921-933.
- 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, Sorescu D, Ushio-Fukai M. 2000b. NAD(P)H oxidase: Role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* 86: 494-501.
- Griendling KK, Ushio-Fukai M. 2000a. Reactive oxygen species as mediators of angiotensin II signaling. *Regul Pept* 91:21-27.
- Israel A, Barbella Y, Saavedra JM. 1986. Compensatory increase in adrenomedullary angiotensin-converting enzyme activity (kininase II) after unilateral adrenalectomy. *Reg Peptide* 16: 97-105.
- Israel A, Stromberg C, Tsutsumi K, Garrido MR, Torres M, Saavedra JM. 1995. Angiotensin II receptor subtypes and phosphoinositide hydrolysis in rat adrenal medulla. *Brain Res Bull* 38:441-446.

- 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.
- 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.
- Lindenau J, Noack H, Possel 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.
- McKenzie MK, Naruse Km Inagami T. The renin angiotensin system in the rat anterior pituitary; colocalization of renin and angiotensin II in gonadotrophs. *Anat Rec* 212; 161-166.
- Mendelsohn FAO. 1982. Angiotensin II is concentrated or locally produced in rat adrenal gland. *Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl* 7: 3-7.
- Mizuno K, Ojima M, Hashimoto S, Fukuchi S. 1985. Renin and angiotensin converting enzyme in human neuroblastoma tissue *J Neurochem* 45: 626-629.
- Mullins JJ, Peters J, Ganten G. 1990. Fulminant hypertension in transgenic rats harboring the mouse Ren-2 gene. *Nature* 344: 541-544.
- Nakajima M, Hutchinson HG, Fujinaga M, Hayashida W, Morishita R, Zhang L, Horiuchi M, Pratt RE, Dzau VJ. 1995. The angiotensin II type 2 (AT<sub>2</sub>) receptor antagonizes the growth effects of the AT<sub>1</sub> receptor: gain-of-function study using gene transfer. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:10663-10667.
- Nakamura M, Misono KS, Maruse M. 1985. A role for the adrenal renin-angiotensin system in the regulation of potassium stimulated aldosterone production. *Endocrinol* 85; 1772-1778.
- Naruse M, Naruse K, Inagaki T, Inagami T. Immunoreactivity renin in mouse adrenal gland. Localization in the inner cortical region. *Hypertension* 6:275-280.
- Naruse M, Shizume K, Inagami T. 1985. Renin and angiotensins in the cultured adrenocortical tumor cells of mice. *Acta Endocrine* 108: 545-549.
- Nio Y, Matsubara H, Murasawa S, Kanasaki M, Inada M. 1995. Regulation of gene transcription of angiotensin II receptor subtypes in myocardial infarction. *J Clin Invest* 95:46-54.
- Oberley LW, Spitz DR. 1984. Assay of superoxide dismutase activity in tumor tissue. *Meth Enzymol* 105:457-464.
- Obermuller N, Unger T, Culman J, Gohlke P, De Gasparo M, Bottari SP. 1991. Distribution of angiotensin II receptor subtypes in rat brain nuclei. *Neurosci Lett* 132:11-15.
- Okamura T, Clemens DL, Inagami T. 1981. Renin, angiotensins and angiotensin-converting enzyme in neuroblastoma cells; evidence for intracellular formation of angiotensins. *Proc Natl Acad Sci* 78:6040-6043.
- Okamura T, Clemens DL, Inagami T. 1984. Generation of angiotensins in cultured pheochromocytoma cells. *Neurosci Letters*. 46:151-156.
- Pandey KN, Inagami T. 1986. Regulations of renin angiotensins by gonadotrophic hormones in cultured Leydig tumor cells: release of angiotensin but not renin. *J Biol Chem* 261:3394-3398.
- Richards EM, Raizada MK, Gelband CH, Sumners C. 1999. Angiotensin II type I receptor-modulated signaling pathway in neurons. *Mol Neurobiol* 19:25-41.
- Plunkett LM, Correa FMA, Saavedra JM. 1986. Quantitative autoradiographic determination of angiotensin converting enzyme kinetic in rat pituitary and adrenal glands with 125I-351A, a specific inhibitor. *Reg Peptide* 12: 263-272.
- Saavedra JM, Benicky J, Zhou J. 2006. Angiotensin II: multitasking in the brain. *J Hypertens Suppl* 24:S131-S137.
- Silva J, Pastorello M, Arzola J, Zavala LE, De Jesús S, Varela M, Matos MG, Garrido MR, Israel A. 2010. AT<sub>1</sub> receptor and NAD(P)H oxidase mediate angiotensin II-stimulated antioxidant enzymes and mitogen activated protein kinase activity in the rat hypothalamus. *J Renin Angiotensin System*.
- 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.
- Sohn HY, Raff U, Hoffman A, Gloe T, Heermeier K, Galle J, Pohl U. 2000. Differential role of angiotensin II receptor subtypes on endothelial superoxide formation. *British J Pharmacol* 131: 667-672.
- Stoll M, Steckelings UM, Paul M, Bottari SP, Metzger R, Unger T. 1995. The angiotensin AT<sub>2</sub>-receptor mediates inhibition of cell proliferation in coronary endothelial cells. *J Clin Invest* 95:651-657.
- Sumners C, Fleegal MA, Zhu MY. 2002. Angiotensin AT-1 receptor signalling pathways in neurons. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 29:483-490.
- Sumners C, Tang W, Zelezna B, Raizada MK. 1991. Angiotensin II receptor subtypes are coupled with distinct signal transduction mechanisms in neurons and astrocytes from rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:7567-7571.
- 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.
- Takekoshi K, Ishi K, Shibuya S y col. 2002. Angiotensin II type 2 receptor counter-regulates type I receptor in catecholamine synthesis in cultured porcine adrenal medullary chromaffin cells. *Hypertension* 39: 142-148.
- Tsuzuki S, Ichiki T, Nakakubo H, Kitami Y, Guo DF, Shirai H, Inagami T. 1994. Molecular cloning and expression of the gene encoding human angiotensin II type 2 receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 200:1449-1454.

- 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.
- Whitebread S, Mele M, Kamber B, De Gasparo M. 1989. Preliminary biochemical characterization of two angiotensin II receptor subtypes. *Biochem Biophys Res Commun* 163:284-291.
- Wong PC, Hart SD, Zaspel AM, Chiu AT, Ardecky RJ, Smith RD, Timmermans PB. 1990. Functional studies of non-peptide angiotensin II receptor subtype-specific ligands: DuP 753 (AII-1) and PD123177 (AII-2). *J Pharmacol Exp Ther* 255:584-592.
- Yamada T, Horiuchi M, Dzau VJ. 1996. Angiotensin II type 2 receptor mediates programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:156-160.
- 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, Sharma RV, Davisson RL. 2005. Superoxide mediates angiotensin II-induced influx of extracellular calcium in neural cells. *Hypertension* 45:717-723.