UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE FARMACIA
POSTGRADO DE FARMACOLOGÍA

SEÑALIZACIÓN DE LA ANGIOTENSINA II A TRAVÉS DE LA PRODUCCIÓN DE RADICALES LIBRES EN ESTRUCTURAS DEL SISTEMA NERVIOSO: PAPEL EN EL ESTRÉS AGUDO Y CRÓNICO

AUTOR: LICENCIADO JOSE ANTONIO SILVA LOZADA

Trabajo presentado ante la ilustre Universidad Central de Venezuela para optar al Título de Doctor en Ciencias, Mención Farmacología.

TUTORAS: DRA. ANITA STERN DE ISRAEL
DRA. MARIA DEL ROSARIO GARRIDO

Caracas, Octubre 2012

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE FARMACIA
POSTGRADO DE FARMACOLOGÍA

SEÑALIZACIÓN DE LA ANGIOTENSINA II A TRAVÉS DE LA PRODUCCIÓN DE RADICALES LIBRES EN ESTRUCTURAS DEL SISTEMA NERVIOSO: PAPEL EN EL ESTRÉS AGUDO Y CRÓNICO

AUTOR: LICENCIADO JOSE ANTONIO SILVA LOZADA

Trabajo presentado ante la ilustre Universidad Central de Venezuela para optar al Título de Doctor en Ciencias, Mención Farmacología.

TUTORAS: DRA. ANITA STERN DE ISRAEL
DRA. MARIA DEL ROSARIO GARRIDO

Caracas, Octubre 2012

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE FARMACIA
DIRECCIÓN DE POSTGRADO

VEREDICTO

Quienes suscriben, miembros del jurado designado por el Consejo de la Facultad de Farmacia y el Consejo de Estudios de Postgrado de la Universidad Central de Venezuela, para examinar la **Tesis Doctoral** presentada por el **Licenciado en Biología JOSÉ ANTONIO SILVA LOZADA,** titular de la Cédula de Identidad Nº V- **11.288.545,** bajo el título **"SEÑALIZACIÓN DE LA ANGIOTENSINA II A TRAVÉS DE LA PRODUCCIÓN DE RADICALES LIBRES EN ESTRUCTURAS DEL SISTEMA NERVIOSO: PAPEL DEL ESTRÉS AGUDO Y CRÓNICO",** a fin de cumplir con el requisito legal para optar al grado académico de **Doctor en Ciencias, Mención Farmacología,** dejan constancia de lo siguiente:

1.- Leído como fue dicho trabajo por cada uno de los miembros del jurado, se fijó el día **Lunes 15 de Octubre de 2012** a las **10:00** a.m., para que el **autor** lo defendiera en forma pública, lo que el autor hizo en el **aula 701**, del 7mo. piso de la Facultad de Farmacia, mediante un resumen oral de su contenido, luego de lo cual respondió a las preguntas que le fueron formuladas por el jurado, todo ello conforme con lo dispuesto en el Reglamento de Estudios de Postgrado.

2.- Finalizada la defensa del trabajo, el jurado decidió **aprobar por unanimidad**, por considerar, sin hacerse solidario con la ideas expuestas por el **autor**, que se ajusta a lo dispuesto y exigido en el Reglamento de Estudios de Postgrado.

Para dar este veredicto, el jurado estimó que el trabajo examinado constituye un aporte original en la descripción de los mecanismos de señalización de la angiotensina II y el estrés en el sistema nervioso, ya que aporta resultados originales en relación a la participación de los receptores AT_1 y AT_2 en la regulación de la actividad de las enzimas antioxidantes.

En fe de lo cual se levanta la presente ACTA, a los **15** días del mes de **Octubre** del año **2012**, conforme a lo dispuesto en el Reglamento de Estudios de Postgrado, actuaron como Tutoras las **Dra. Anita Stern de Israel** y la **Dra. María del Rosario Garrido** y como Coordinadora del jurado la **Dra. Anita Stern de Israel.**

Dra. Anita Stern de Israel
Tutora-Coordinadora
C.I. 3.187.562
Facultad de Farmacia, UCV

Dr. Marcelo Alfonzo
C.I. 3.824.127
IME, UCV

Dr. Jesús del Castillo
C.I. No. 4.425.029
IVIC

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE FARMACIA
CARACAS - VENEZUELA
DIRECCION DE POST-GRADO

Dra. Beatriz Sosa
C.I. 7.584.919
Univ. Lisandro Alvarado

Dra. Lida Zavala
C.I. 5.297.875
UNEFM

Es. 15/10/2012.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Central de Venezuela y la facultad de farmacia por permitirme formarme académicamente.

A la Unidad de Neuropéptidos, en especial a Maider, Yenny y Sara por ser todos un gran equipo de trabajo, que me permitió culminar con éxito mi tesis

Al Ministerio del Poder Popular para la Ciencia, Tecnología e Innovación a través del Proyecto Misión Ciencia, Sub-proyecto 7, ECCV No. 2007001585.

Al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CDCH) a través del Proyecto Individual N° PI 06-7348-2008.

Al FONACIT por otorgarme la beca perteneciente al programa para la Formación de Nuevos Talentos.

A mis tutoras las Dras. Anita Estern y María del Rosario Garrido “Chary” por permitirme entrar en su laboratorio y ser mis guías en este viaje. De ellas me queda el ejemplo y la mística. Gracias a ellas he podido terminar con éxito esta etapa de mi vida profesional. Estaré siempre agradecido por todo el tiempo y dedicación que pusieron en mí, para que yo pudiera llegar a ser lo que soy hoy en día.

A la Dra. Margarita Salazar-Bookaman por su labor incansable como coordinadora del postgrado de farmacología y por haberme abierto las puertas del posgrado y darme la oportunidad de demostrar mi talento para ser mejor profesional

A mis amigos del posgrado de farmacología que me brindaron el máximo apoyo y ayuda posible en diferentes momentos, buenos y malos. Gracias especiales le doy a Carlos Cianguerotti, que durante estos últimos 3 meses me brindo cobijo en su casa para poder terminar esta meta y a mis amigas Elsa y Katy que siempre fueron buenas confidentes y amigas, sobre todo en los malos momentos.

A mi familia que siempre ha sido mi apoyo en este viaje y que aun en la lejanía siempre fueron un puerto seguro en donde calar, para recargar fuerzas y poder terminar esta tarea.

A mi Sara que en los últimos años fue un motivo de inspiración y amor que me permitió en los momentos más duros tener la fuerza para terminar esta meta

RESUMEN

Existen evidencias que apoyan la participación de las especies reactivas de oxígeno en las cascadas de señalización y transducción intracelular de la angiotensina II. La ANG II es importante en el mantenimiento de la homeostasis corporal, regulando la presión arterial y el metabolismo de fluidos y electrolitos. Se sabe que en la periferia, la ANG II es capaz de estimular a la NAD(P)H oxidasa con la subsiguiente producción de ERO. El anión superóxido es metabolizado secuencialmente por las enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa, la catalasa y la glutatión peroxidasa. A su vez, las especies reactivas de oxígeno son capaces de activar a las proteínas kinasas activadas por mitógenos, las cuales se encuentran asociadas al crecimiento y la diferenciación celular. Se evaluó la posible participación de las especies reactivas de oxígeno en el mecanismo de señalización intracelular mediado por el receptor AT_1 en el hipotálamo, el órgano subfornical y médula suprarrenal de la rata. Nuestros resultados demostraron que la estimulación del tejido nervioso con ANG II *in vitro* incrementó la actividad de la enzimas antioxidante. Al evaluar el papel del receptor AT_1, la NAD(P)H oxidasa, el anión superóxido y la proteína kinasa C; así como la activación de las ERK1/2 en la señalización de la ANG II en el hipotálamo, OSF y MSR, demostramos que el bloqueo del receptor AT_1 con losartán, la interferencia del ensamblaje de la NAD(P)H oxidasa con apocinina, el secuestro de anión superóxido empleando un mimético de la SOD, tempol, y la inhibición de la PKC con cheleritrina, bloquearon completamente el efecto que produce la ANG II sobre las enzimas antioxidantes *in vitro.* Igualmente, la activación de la ERK1/2 inducida por la ANG II fue reducida por APO y LOS a nivel hipotalámico. Adicionalmente, el bloqueo del receptor AT_2 hipotalámico con PD123319, no bloqueo sino que mas bien potenció la respuesta de las enzimas antioxidantes y la activación de las ERK1/2 inducida por la ANG II, lo que desenmascaró el efecto contraregulatorio del receptor AT_2 sobre la acción de la ANG II mediada por el receptor AT_1. Se sabe que durante el estrés el sistema renina angiotensina circulante y cerebral se encuentra estimulado, por lo tanto el incremento de la ANG II endógena debería desencadenar vías de señalización similares a las reportadas *in vitro*. Efectivamente, nuestros hallazgos demostraron

que tanto, el estrés agudo inducido por la inmovilización forzada, como el estrés crónico en ratas espontáneamente hipertensas incrementaron la actividad de las enzimas antioxidantes en las tres estructuras cerebrales estudiadas. Este efecto es mediado por la vía del receptor AT_1, la estimulación de la NAD(P)H oxidasa y la producción de anión superóxido ya que el tratamiento *in vivo* con LOS, APO y TEM fue capaz de bloquear completamente el incremento de la actividad de las enzimas antioxidantes inducidas por el estrés y por ende por la ANG II endógena. A nivel de la MSR demostramos, por primera vez, que la estimulación del receptor AT_2 esta asociada a la estimulación de la NAD(P)H oxidasa, ya que la APO y el PD 123319 fueron capaces de bloquear el incremento de la actividad de las enzimas antioxidantes inducida por la ANG II. Demostrando así, que el receptor AT_1 en la MSR contrarregula la acción de la ANG II a través del receptor AT_2. En conclusión, nuestros resultados indican que a nivel del sistema nervioso las especies reactivas de oxígeno participan en la cascada de señalización intracelular de la ANG II, y ejercen un importante papel en la respuesta al estrés y la hipertensión.

INDICE GENERAL

Pag.

Título

Veredicto……..……..II

Agradecimientos……..……..……..…IV

Resumen……..……..……..V

Índice General……..……..…..VII

Índice de Figuras……...XII

Lista de abreviaturas……..……XVI

INTRODUCCION……1

Receptores de angiotensina II a nivel del SNC: distribución y señalización……....5

Sistema renina angiotensina cerebral…….…10

El eje órgano subfornical-hipotálamo-médula suprarrenal.....15

Especies reactivas de oxígeno y la NAD(P)H oxidasa……....22

Las especies reactivas de oxígeno y la angiotensina II…..……..….28

Estrés y las especies reactivas de oxígeno…….....…..31

Especies reactivas de oxígeno y enzimas antioxidantes…….....37

OBJETIVO GENERAL……..…..……..44

OBJETIVOS ESPECÍFICOS……..……..……44

Estudios *in vitro*…….....44

Estudios *in vivo*……..……45

MATERIALES Y MÉTODOS……..……...46
Animales…….....…….46

Protocolo de inmovilización forzada……..……...…46
Protocolo de estrés por inmovilización……...……..….47
Tratamientos…….…….47

Tratamiento de los tejidos……...…….48

Determinación de la actividad enzimática de la catalasa….....48

Determinación de la actividad enzimática de la superóxido dismutasa…..48

Determinación de la actividad enzimática de la glutatión peroxidasa…….49

Determinación de las proteínas tisulares…….50

Determinación de ERK 1/2 mediante Western blot……50

Determinación de catecolaminas urinarias……..……..51

Determinación de corticosterona urinaria……..……51
Método de determinación de corticosterona urinaria…….....52
Procedimiento……..……..…..52

Método indirecto de registro de presión arterial y frecuencia cardíaca…53

Análisis estadístico.....55

RESULTADOS……..……56

Efecto de los inhibidores de la NAD(P)H oxidas y la PKC y de los bloqueantes de los receptores AT_1 y AT_2, sobre la actividad CAT, SOD y GPX, estimulada por la ANG II en el HIP de la rata……..……56

Efecto de los inhibidores de la NAD(P)H oxidasa y la PKC y de los bloqueantes de los receptores AT_1 y AT_2, sobre la actividad CAT, SOD y GPX, estimulada por la ANG II en el OSF de la rata……...…..61

Efecto de los inhibidores de la NAD(P)H oxidasa y la PKC y de los bloqueantes de los receptores AT_1 y AT_2, sobre la actividad CAT, SOD y GPX, estimulada por la ANG II en la MSR de la rata……..……..66

Efecto de la inhibición de la NAD(P)H oxidasa y el bloqueante de los receptores AT_1 y AT_2, sobre la expresión y activación inducida por la ANG II sobre las ERK 1/2 en el HIP de la rata……..…..71

Modelo de estrés agudo: Efecto de la inmovilización forzada y el tratamiento *in vivo* con LOS sobre la presión arterial y la frecuencia cardiaca……....73

Modelo de estrés agudo: Efecto de la inmovilización forzada y el tratamiento *in vivo* con LOS sobre la liberación de catecolaminas y corticosterona urinarias, 24 horas después del estrés……..…….75

Modelo de estrés agudo: Efecto de la inmovilización forzada y el tratamiento *in vivo* con LOS, APO y TEM, sobre la actividad de las enzimas antioxidantes CAT, SOD y GPX, en el HIP de la rata……77

Modelo de estrés agudo: Efecto de la inmovilización forzada y el tratamiento con LOS, APO y TEM, sobre la actividad de las enzimas antioxidantes CAT, SOD y GPX, en el OSF de la rata……..……79

Modelo de estrés agudo: Efecto de la inmovilización forzada y el tratamiento *in vivo* con LOS, APO y TEM, sobre la actividad de las enzimas antioxidantes CAT, SOD y GPX, en la MSR de la rata……..…81

Modelo de estrés crónico: Efecto del tratamiento *in vivo* con LOS, sobre la presión arterial y la frecuencia cardiaca en ratas Wistar Kyoto y SHR……....83

Modelo de estrés crónico: Efecto del tratamiento *in vivo* con LOS, APO y TEM, sobre la actividad de las enzimas antioxidantes CAT, SOD y GPX, en el HIP de las ratas Wistar Kyoto y SHR….....85

Modelo de estrés crónico: Efecto del tratamiento *in vivo* con APO y TEM, sobre la actividad de las enzimas antioxidantes CAT, SOD y GPX, en el OSF de las ratas Wistar Kyoto y SHR……..……87

Modelo de estrés crónico: Efecto del tratamiento *in vivo* con APO y TEM, sobre la actividad de las enzimas antioxidantes CAT, SOD y GPX, en la MSR de ratas Wistar Kyoto y SHR…….....89

DISCUSIÓN…….....…….91

Papel de los receptores AT_1 y AT_2, la NAD(P)H oxidasa y la PKC, en la generación de ERO, en la cascada de señalización de la ANG II en el HIP y el OSF de la rata: papel de las enzimas antioxidantes, CAT, SOD y GPX……..…..91

Papel de los receptores AT_1 y AT_2, la NAD(P)H oxidasa y la PKC, en la generación de ERO, en la cascada de señalización de la ANG II en la MSR de la rata: papel de las enzimas antioxidantes, CAT, SOD y GPX……..…….107

Papel de la ANG II en la generación de ERO durante el estrés agudo en el HIP, OSF y MSR de la rata: papel de las enzimas antioxidantes CAT, SOD y GPX……..…113

Papel de la ANG II en la generación de estrés oxidativo en un modelo genético de estrés crónico: papel de las enzimas antioxidantes CAT, SOD y GPX en la hipertensión……..…..…….….128

CONCLUSIONES……..….136

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS……..….138

INDICE DE FIGURAS

Pag.

FIGURA 1. Efecto de la ANG II (10^{-7} M) sobre la actividad de las enzimas antioxidantes SOD, CAT y GPX en el HIP de la rata……..57

FIGURA 2. Efecto de LOS (10^{-6} M), la APO (10^{-4} M), la CHE (6,5 µM) y PD (10^{-6}M), sobre la actividad de la CAT estimulada por la ANG II (10^{-7} M) en el HIP de la rata……..……..58

FIGURA 3. Efecto de LOS (10^{-6} M), la APO (10^{-4} M), la CHE (6,5 µM) y PD (10^{-6}M) sobre la actividad de la SOD estimulada por la ANG II (10^{-7} M) en el HIP de la rata…….....59

FIGURA 4. Efecto de LOS (10^{-6} M), la APO (10^{-4} M) la CHE (6,5 µM) y PD (10^{-6}M), sobre la actividad de la GPX estimulada por la ANG II (10^{-7} M) en el HIP de la rata……...……...60

FIGURA 5. Efecto de la ANG II (10^{-7} M) sobre la actividad de las enzimas antioxidantes SOD, CAT y GPX en el OSF de la rata……..….62

FIGURA 6. Efecto de LOS (10^{-6} M), la APO (10^{-4} M), la CHE (6,5 µM) y PD (10^{-6}M), sobre la actividad de la CAT estimulada por la ANG II (10^{-7} M) en el OSF de la rata……...……...63

FIGURA 7. Efecto de LOS (10^{-6} M), la APO (10^{-4} M), la CHE (6,5 µM) y PD (10^{-6}M), sobre la actividad de la SOD estimulada por la ANG II (10^{-7} M) en el OSF de la rata……..……64

FIGURA 8. Efecto de LOS (10^{-6} M), la APO (10^{-4} M), la CHE (6,5 µM) y PD (10^{-6}M), sobre la actividad de la GPX estimulada por la ANG II (10^{-7} M) en el OSF de la rata……..…….65

FIGURA 9 Efecto de la ANG II (10^{-7} M) sobre la actividad de las enzimas antioxidantes SOD, CAT y GPX en la MSR de la rata……67

FIGURA 10. Efecto de LOS (10^{-6} M), la APO (10^{-4} M) y la CHE (6,5 µM) y PD (10^{-6}M), sobre la actividad de la CAT estimulada por la ANG II (10^{-7} M) en la MSR de la rata……..…….68

FIGURA 11. Efecto de LOS (10^{-6} M), la APO (10^{-4} M), la CHE (6,5 µM) y PD (10^{-6}M), sobre la actividad de la SOD estimulada por la ANG II (10^{-7} M) en la MSR de la rata……...69

FIGURA 12. Efecto de la APO (10^{-4} M) y PD (10^{-6}M), sobre la actividad de la GPX estimulada por la ANG II (10^{-7} M) en la MSR de la rata……..……..70

FIGURA 13. Efecto de LOS y el PD 123319 (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 HIP de la rata. ……..72

FIGURA 14. Efecto de LOS, sobre la respuesta cardiovascular inducida por la INM, en ratas *Sprague-Dawley*……..74

FIGURA 15. Efecto de LOS sobre la excreción urinaria de catecolaminas, en ratas *Sprague-Dawley*, sometidas a INM……75

FIGURA 16. Efecto de LOS sobre la excreción urinaria de corticotesrona, en ratas *Sprague-Dawley* sometidas a INM……..76

FIGURA 17. Efecto de la INM y de los diferentes tratamientos *in vivo* LOS; APO; TEM sobre la actividad de las enzimas antioxidantes CAT, SOD y GPX, en el HIP de la rata……78

FIGURA 18. Efecto de la INM y los diferentes tratamientos *in vivo* LOS; APO; TEM, sobre la actividad de las enzimas antioxidantes CAT, SOD y GPX, en el OSF de la rata.……..….80

FIGURA 19. Efecto de la INM y los diferentes tratamientos *in vivo* LOS; APO; TEM, sobre la actividad de las enzimas antioxidantes CAT, SOD y GPX, en la MSR de la rata. ……...…….82

FIGURA 20. Efecto de LOS, sobre la PAM y la FC basal, en ratas espontáneamente hipertensas (SHR) y sus controles normotensos *Wistar Kyoto*……..84

FIGURA 21. Efecto del tratamiento *in vivo* con LOS; APO; TEM, sobre la actividad de las enzimas antioxidantes CAT, SOD y GPX, en el HIP de ratas Wistar Kyoto y SHR. …….....86

FIGURA 22. Efecto del tratamiento *in vivo* con APO; TEM, sobre la actividad de las enzimas antioxidantes CAT, SOD y GPX, en el OSF de ratas Wistar Kyoto y SHR. ……..……88

FIGURA 23. Efecto del tratamiento con LOS; APO; TEM, sobre la actividad de las enzimas antioxidantes CAT, SOD y GPX, en la MSR de ratas Wistar Kyoto y SHR.…….....90

Esquema 1. Vías de señalización de la ANG II a nivel del OSF y el HIP de la rata: Sistema antioxidantes……..……106

Esquema 2. Vías de señalización de la ANG II a nivel de la MSR de la rata: Sistema antioxidantes……...112

Esquema 3. Participación del SRA y las ERO durante el estrés agudo…..…126

Esquema 4. Participación del SRA y el estrés oxidativo durante el estrés crónico……..…135

LISTAS DE ABREVIATURAS

ANG II	Angiotensina II
ANG	Angiotensinógeno
APO	Apocinina
DMH	Área dorsomedial del hipotálamo
AP	Área postrema
RVLM	Área rostroventrolateral del bulbo
CAT	Catalasa
ECA	Enzima convertidora de angiotensina
ERO	Especies reactivas de oxigeno
PP2A	Fosfatasa serina/treonina
GPX	Glutatión peroxidasa
HIP	Hipotálamo
ACTH	Hormona adrenocorticotrópica
CRH	Hormona liberadora de corticotropina
INM	Inmovilización forzada
LOS	Losartan
MSR	Médula suprarrenal
NE	Norepinefrina
NTS	Núcleo del tracto solitario
NPV	Núcleo paraventricular
NPOM	Núcleo preóptico medial
NSO	Núcleo supraóptico
OSF	Órgano subfornical
OCV	Órganos circunventriculares
PAD	Presión arterial diastólica
PAM	Presión arterial media
PAS	Presión arterial sistólica
PKC	Proteína kinasa C
MAPKs	Proteínas kinasas activadas por mitógenos

SHR	Ratas espontáneamente hipertensas
WKY	Ratas Wistar Kyoto
SNC	Sistema nervioso central
SRA	Sistema renina angiotensina
SOD	Superóxido dismutasa
TEM	Tempol

INTRODUCCION

El mantenimiento de la homeostasis cardiovascular es un proceso que integra el balance general de los fluidos corporales junto con una apropiada distribución general de los mismos dentro del organismo. En este proceso el sistema renina angiotensina (SRA), juega un papel preponderante. El SRA, responde a las alteraciones en los fluidos corporales y la presión arterial provocando cambios dentro del organismo, en los sistemas efectores que controlan las respuestas cardiovascular, renal, y conductual. La desregulación del balance de los fluidos corporales tiene como consecuencia la aparición de hipertensión y otras enfermedades cardiovasculares (Guyton y col., 1972).

El SRA es considerado clásicamente como un sistema endocrino, en el cual el péptido efector más importante es la angiotensina II (ANG II), el cual media sus efectos, a través de su interacción principalmente con los receptores AT_1 y AT_2. Estos receptores se encuentran ampliamente localizados por todos los tejidos. La ANG II, como péptido regulatorio posee múltiples acciones fisiológicas, siendo uno de los péptidos más importantes relacionados con el control de la presión arterial sistémica y el balance de fluidos y electrolitos (Paul y col., 1993). La demostración de la existencia de la ANG II, así como de otros componentes del SRA en una variedad de tejidos tales como la glándula suprarrenal, el riñón, el corazón y el cerebro, permite postular que el SRA juega un papel importante en la regulación de diferentes procesos, vía mecanismos endocrinos, paracrinos o autocrinos (Dzau y col., 1986, Phillips y col., 1993).

Durante las últimas tres décadas, la evidencia creciente apoya la noción de que el SRA tiene una profunda significación biológica en el sistema nervioso central (SNC). En el cerebro, la administración de la ANG II evoca acciones fisiológicas que incluyen el incremento de la presión arterial, la activación del sistema nervioso, la estimulación de la liberación de vasopresina, la regulación de la respuesta dipsogénica y del flujo sanguíneo cerebral (Qadri y col., 1992; Strömberg y col., 1992). Adicionalmente, se ha sugerido un papel para la ANG II en el control del aprendizaje, la memoria y la conducta exploratoria (Wright y Harding, 1994). La importancia de la angiotensina cerebral se apoya en la demostración de que todos los componentes del SRA, tales como renina, angiotensinógeno, enzima convertidora de angiotensina (ECA), ANG II y los receptores de ANG II están presentes en el cerebro de los mamíferos (Dzau y col., 1986; Phillips y col., 1993).

En la actualidad se postula que el SRA cerebral presenta dos vertientes, aquella que presenta receptores de ANG II en neuronas de áreas cerebrales presentes dentro de la barrera hematoencefálica, y que responde a la ANG II generada endógenamente. En segundo lugar, aquella que presenta receptores de ANG II en regiones carentes de barrera hematoencefálica como en los órganos circunventriculares (OCV) y las células del endotelio cerebrovascular, que responde tanto a la ANG II generada endógenamente como a la circulante. Así ambos sistemas actúan coordinadamente en respuesta a la ANG II circulante o endógena, a nivel cerebral (Phillips y Edilamar, 2008).

Uno de los aspectos más importantes para determinar el nivel de acción de la ANG II a nivel cerebral, es la localización neuroanotómica y el número de receptores de ANG II, así como los mecanismos de regulación. Clásicamente las acciones de la ANG II cerebral, están bien establecidas y van desde la regulación, liberación y formación de hormonas, el control del sistema simpático central y periférico y la regulación de la ingesta de sodio y agua, así como el control de la presión arterial (Phillips, 1987). Cualquier cambio a nivel de los sistemas de electrolitos, del simpático y de las hormonas, produce la activación de mecanismos de retroalimentación en donde está implicado el SRA cerebral (Buggy y col., 1978; Phillips y Sumners, 1998).

Existe una hipótesis razonable que implica a la ANG II cerebral en la regulación de múltiples funciones adicionales a las anteriormente descritas, que incluyen: el desarrollo cerebral, la migración neuronal, procesos cognitivos y sensoriales, regulación de la respuesta al estrés y el control del flujo sanguíneo cerebral (Phillips y Edilamar, 2008). Todas estas funciones están de alguna u otra forma, relacionadas con un aumento en la producción de radicales libres y un consecuente aumento del estrés oxidativo (Schumacker, 2002). Estudios realizados en esta última década han demostrado la relación que existe entre la ANG II y la producción de especies reactivas de oxigeno (ERO9 a nivel SNC y la participación de la ANG II cerebral en numerosas patologías, en donde la base fisiopatológica está relacionada con un aumento del estrés oxidativo (Lawrence y Lewanczuk, 2005; Petterson y col., 2006 y 2009).

En muchos de los procesos antes mencionados, se ha demostrado que están mediados a través de la estimulación del receptor AT_1, a nivel del SNC (Phillips y Edilamar, 2008; Petterson y col., 2006 y 2009). Aunque el receptor AT_2 a nivel cerebral se encuentra altamente expresado durante las primeras etapas del desarrollo cerebral, en la fase de adultez, estos receptores se encuentran restringidos a áreas predominantemente implicadas en los procesos sensoriales y cognitivos (Bonini y col., 2006). Sin embargo, el papel del receptor AT_2 a nivel cerebral todavía no está muy claro.

Estudios realizados empleando diferentes modelos de estrés, han demostrado, que el pretratamiento con antagonistas del receptor AT_1, previene por completo la respuesta simpatoadrenal y hormonal, así como el desarrollo de úlceras gástricas inducidas por estrés (Saavedra, 2005). Estos hallazgos sugieren que el bloqueo del receptor AT_1 puede ser considerado como una nueva herramienta terapéutica para el tratamiento de los múltiples desórdenes relacionados con el estrés. Se sabe que la administración periférica de antagonistas del receptor AT_1 afecta la circulación cerebral y normaliza algunas de las alteraciones estructurales y funcionales a nivel cerebrovascular, en individuos que presentan hipertensión de tipo crónica (Saavedra, 2005). Los antagonistas del receptor AT_1 son capaces de remodelar y normalizar la función cerebrovascular (Zhou y col., 2006), además de normalizar la expresión de las isoformas de la sintasa del óxido nítrico y revertir los procesos inflamatorios característicos de los individuos hipertensos, lo que tiene como consecuencia una reducción drástica del

riesgo de presentar isquemia cerebral, además de reducir el estrés oxidativo y la muerte neuronal (Kagiyama y col., 2003; Zhou y col., 2006).

Todos estos efectos anteriormente mencionados, están relacionados de una u otra forma con la inhibición del SRA cerebral, lo que proyecta a este sistema como un importante regulador de la homeostasis corporal y a los antagonistas del receptor AT_1 como nuevos agentes terapéuticos en el control de enfermedades asociadas al estrés, inflamación, isquemia, y estrés oxidativo a nivel del SNC.

Receptores de angiotensina II a nivel del SNC: distribución y señalización

Actualmente, el desarrollo de antagonistas selectivos de los receptores para la ANG II ha demostrado la existencia de, al menos, dos subtipos distintos de receptores a nivel cerebral y ha permitido su caracterización farmacológica. Así, la unión de alta afinidad del compuesto losartán (K_i 10-50 nM), define al receptor AT_1, mientras que la alta afinidad de unión de compuestos como el PD 123177 o CGP 42112A (K_i 10-100nM), definen al receptor AT_2 (Chang y col., 1990; Bumpus y col., 1991).

Los receptores AT_1 y AT_2 son estructural y funcionalmente diferentes. El receptor AT_1 es un receptor de siete dominios transmembranales acoplado, mediante una proteína que une nucleótidos de guanina (proteína Gq), a sistemas de segundos mensajeros, tales como la proteína kinasa C (PKC), fosfolipasa C, la movilización del calcio y la inhibición de la producción de AMPc mediada por diacil

glicerol. Además, el receptor AT_1 es capaz de estimular a las proteínas kinasas activadas por mitógenos, las C-Jun kinasa, jano kinasa (JAK) (Izumi y col., 2000, Wei y col., 2000). El receptor AT_2, aunque también pertenece a la familia de receptores de siete dominios que atraviesan la membrana plasmática, y comparte un 33% de homología de secuencia de aminoácidos con el receptor AT_1 y no comparte ninguno de sus sistemas de segundos mensajeros (Unger y col., 1996).

Los receptores de ANG II están ampliamente distribuidos en el cerebro, sugiriendo la participación de este péptido en la regulación de la función y desarrollo de esta estructura. Así, estudios autorradiográficos e inmunohistoquímicos han demostrado la presencia del receptor AT_1 en áreas circunventriculares tales como el órgano subfornical (OSF) y el órgano vasculoso de la lámina terminal (OVLT), en áreas del cerebro anterior como los núcleos supraóptico (NSO) y paraventricular (NPV), y el núcleo preóptico medial (NPOM). También ha sido encontrado en estructuras del tallo cerebral como el *locus coeruleus* y en estructuras involucradas en el control de la presión arterial como es el núcleo del tracto solitario (NTS) y el área postrema (AP) (Tsutsumi y Saavedra, 1992; Steckelings y col., 1992; Phillips y col., 1993).

La mayoría de las acciones de la ANG II, tanto a nivel central como periférico, están mediadas por su unión a los receptores AT_1 (McKinley y col., 1994; Champion y col., 1998). Estudios realizados *in vivo* mediante la administración de ligandos selectivos del receptor AT_2 junto con el desarrollo de modelos de animales transgénicos han establecido acciones de este receptor en

la función renal y cardiovascular, así como en procesos de desarrollo. Una importante función emergente del receptor AT_2 constituye el papel atenuador o contrarregulador de las funciones del receptor AT_1 (Nouet y Nahmias, 2000). Esto fue evidenciado empleando técnicas de ingeniería genética, para crear una cepa de ratones carentes del gen que codifica para el receptor AT_2, lo que confirmo el efecto regulador negativo de este receptor sobre la presión arterial (Hein y col., 1995, Siragy y col., 1999). Contrario a las acciones cardiovasculares de la ANG II, la sobre-expresión del receptor AT_2 en el miocardio de ratones manipulados genéticamente, produjo un efecto cronotrópico negativo y una acción antihipertensiva (Masaki y col., 1998). Estudios mediante técnicas inmunohistoquímicas confirmaron la distribución de la población de receptores AT_2, previamente descritas por técnicas autorradiográficas en el cerebro de ratas adultas (Reagan y col., 1994), encontraron una alta densidad de receptores AT_2 en estructuras del tallo cerebral como son el *locus coeruleus*, el núcleo motor trigeminal y el núcleo reticular lateral. El *locus coeruleus* es una estructura rica en neuronas noradrenérgicas. Se ha demostrado que la ANG II incrementa la liberación de noradrenalina en el *locus coeruleus* (Speth y col., 1991), la alta densidad del subtipo de receptor AT_2 en este núcleo sugiere un posible papel del mismo en el control de la actividad simpática.

Estudios autorradiográficos han demostrado la existencia de receptores AT_2 en la corteza cerebelar, indicando la posible participación de la ANG II en funciones de coordinación y actividades somáticas motoras. Adicionalmente otros estudios inmunohistoquímicos, han demostrado la presencia de los receptores

AT2 en células de Purkinje (Reagan y col., 1994), las cuales envían aferentes GABAérgicos a los núcleos cerebelares profundos. Por otro lado, la administración central de GABA, es capaz de atenuar algunas de las funciones mediadas por la ANG II, tales como las respuestas presoras o la de ingesta de agua (Brennan y col., 1984; Unger y col., 1989).

Estudios realizados mediante radioinmunoensayo muestran que el hipocampo contiene la mayor concentración de inmunorreactividad a la ANG II en el cerebro (Sirett, 1981). Varias evidencias implican esta área en el control de las funciones de aprendizaje y memoria (Bliss y Collingridge, 1993), y se ha sugerido la participación de la ANG II en estos procesos (Morgan y Routtenberg, 1977). Estudios autorradiográficos han demostrado que en el hipocampo el receptor predominante es el AT_1, sin embargo, recientemente se ha descubierto la presencia de receptores AT_2 en todos los subcampos del hipocampo (Reagan y col., 1994), indicando un posible papel para estos receptores en las funciones de aprendizaje y memoria mediadas centralmente por la ANG II.

Se ha demostrado también, que los receptores AT_1 estimulan la fosforilación de proteínas en residuos tirosina (Butcher y col., 1993; Salles y col., 1993), y que activan una compleja cascada de proteínas kinasas estimuladas por mitógenos (MAPKs). Por otra parte, se ha reportado que el receptor AT_2 modula la actividad de fosfatasas, tanto del tipo fosfatasas serina/treonina (PP2A) (Kang y col., 1995; Nahmias y col., 1995), como de fosfatasas tirosina, bien sea estimulando su actividad (Bottari y col., 1992), o inhibiéndola (Kambayashi y col.,

1993). Ahora bien, está claramente definido que las PP2A pueden inhibir la actividad de kinasas que son intermediarias en la cascada de señalización intracelular acoplada a factores de crecimiento (Mumby y Walter, 1993). Desde que Huang y colaboradores (1995) reportaron un incremento en la actividad de PP2A en respuesta a la estimulación de receptores AT_2, se ha sugerido un posible papel para este receptor en dichos procesos.

El mecanismo de señalización intracelular de la ANG II es bien conocido en los tejidos periféricos. Pero con relación al SNC, el panorama no está muy claro, aunque si bien, alguno de los mecanismos de señalización descritos para el receptor AT_1, a nivel periférico pueden ser encontrados a nivel cerebral, estos no son completamente iguales. La estimulación del receptor AT_1, en cultivos de neuronas, está asociado con la hidrólisis del fosfatidil inositol (PI), el incremento intracelular de las concentraciones de calcio y la activación de PKC (Hay y col., 1993; Raizada col., 1993; Sumners y col., 2002). La ANG II, inhibe tanto a las corrientes rectificadoras de potasio (I_k), como a las corrientes tipo A de potasio, incrementando las corrientes totales de calcio. Estos cambios en las corrientes iónicas, están asociados con despolarización y aumento de la tasa de disparo de las neuronas (Sumners y col., 1996; Wang y col., 1997). Numerosas evidencias han demostrado que este aumento en la tasa de disparo producido por la ANG II, a través de su receptor AT_1, ocurre en las neuronas del OSF, NPV y NSO, sin embargo, la totalidad del mecanismo por el cual se observa este efecto no está completamente dilucidado (Ambuhl y col., 1992; Li y Ferguson, 1993; Jhonson, 2001).

Durante la pasada década un gran número de trabajos han identificado, a las ERO como intermediarios en las cascadas de señalización de diferentes tejidos periféricos (Griendling y col., 1994) y es ampliamente conocido en la actualidad, que la ANG II media sus efectos tanto a nivel periférico como central, a través de la generación de ERO por estimulación de la NAD(P)H oxidasa, mediada por el receptor AT_1 (Saavedra y col., 2005). Esto abre nuevos caminos de estudio en lo que se refiere a la señalización de la ANG II y el receptor AT_1 a nivel del SNC.

Sistema renina angiotensina cerebral

El SRA es uno de los componentes más importantes para el mantenimiento de la homeostasis general del cuerpo, regulando la concentración de sodio, el volumen de los fluidos corporales y la presión arterial (Phillips, 2008). La demostración de la existencia de la ANG II, así como de otros componentes del SRA en una variedad de tejidos tales como la glándula suprarrenal, el riñón, el corazón y el cerebro, permite postular que el SRA juega un papel importante en la regulación de diferentes procesos, vía mecanismos endocrinos, paracrinos o autocrinos (Dzau y col., 1986; Phillips y col., 1993 y 2008).

Durante las últimas cuatro décadas, la evidencia creciente apoya la noción de que el SRA tiene una profunda significación biológica en el SNC. Los primeros en demostrar esto, fueron Bickerton y Buckey (1961) a través de sus estudios de perfusión con ANG II en el cerebro de ratas, que arrojó evidencias de un

mecanismo central en el control de la presión arterial por parte de la ANG II. Posteriormente, Booth (1968), planteó la posible existencia de un SRA cerebral, pero fueron Ganten, Fisher y Ferraro (1971), los primeros en demostrar la existencia de una sustancia similar a la renina, que después fue denominada como renina cerebral. Subsecuentemente, todos los demás componentes del SRA cerebral fueron identificados. El Angiotensinógeno (ANG), fue el primer precursor identificado de la ANG II a nivel del SNC, en neuronas y glías (Deschepper y col., 1986; Imboden y col., 1987; Yang y col., 1999), este hallazgo fue realizado mediante radioinmunoensayo en células nerviosas y glías, posteriormente se demostró que el ANG estaba ampliamente distribuido en el cerebro, con altos niveles en el hipotálamo (HIP), particularmente en el NSO, NPV y el NPOM.

En la actualidad se ha sugerido un papel para la ANG II en el control del aprendizaje, la memoria y la conducta exploratoria (Wright y Harding, 1994). La importancia de la angiotensina cerebral se apoya en la demostración de que todos los componentes del SRA, tales como renina, angiotensinógeno, ECA, ANG II y los receptores de ANG II, están presentes en el cerebro de los mamíferos (Dzau y col., 1986; Phillips y col., 1993; Phillips y Edilamar, 2008).

La renina es la enzima encargada de la conversión del angiotensinógeno en angiotensina I. Esta se ha encontrado en diferentes regiones del cerebro, como el tallo cerebral y la corteza (Dzau y col., 1986). Otros estudios han identificado a la ECA, en las mismas regiones en donde se ha identificado a la ANG II y la renina. Estudios posteriores demostraron la presencia de la ECA en los ganglios

basales, el NTS y los núcleos motores dorsales del vago (Chai y col., 1993). Diferentes estudios han reportado la presencia de ANG II en los terminales de fibras nerviosas y en el cuerpo celular de muchas otras neuronas del SNC (Lind y col., 1985).

No fue sino hasta la década de los 90 que surgieron evidencias de la co-expresión de receptores AT_1 y AT_2 en diferentes regiones del cerebro de la rata, donde previamente se había reportado la ausencia de estos últimos, tales como los NSO y NPV del HIP (Reagan y col., 1994). El receptor AT_1, tiene una alta afinidad por los antagonistas, losartán, valsartán, candesartán, e irbesartán. El receptor AT_2 muestra una afinidad mayor por el PD123319 (De Gasparo y col., 2000). Dos grupos de investigadores diferentes, usando agentes farmacológicos, lograron identificar la localización de los dos principales subtipos de receptores para ANG II, en neuronas que juegan un papel importante en el control central de la respuesta cardiovascular, como es el OSF, OVLT, la eminencia media, AP y el NPV (Lenkei y col., 1997; Allen y col., 2000).

Se ha demostrado ampliamente que el receptor AT_1, es el encargado de mediar los efectos de la ANG II, tanto en los cambios en la presión arterial como en la conducta de la ingesta de líquidos a nivel del SNC (Jhonson y col., 1997; Phillips y Sumners, 1998; Phillips y Edilamar, 2008). El OSF, OVLT y el AP, son conocidos como los sensores primarios para la ANG II, además de responder a los cambios de flujo sanguíneo (Simpson, 1981). Estas áreas presentan capilares fenestrados con una alta permeabilidad. Los OCV, están localizados alrededor del

tercer y cuarto ventrículo (Ganong, 2000), y responden, tanto, a los incrementos de la ANG II circulantes, como a la ANG II generada por el sistema ventricular del cerebro, mediando el incremento en la presión sanguínea y la ingesta de agua (Mangiapane y Simpson, 1980; Simpson, 1981).

Las vías neuronales que se originan a partir de los OCV también reciben proyecciones de barorreceptores y quimiorreceptores dentro del SNC, lo que produce una respuesta que moviliza a varios sistemas encargados del mantenimiento de la homeostasis corporal, produciendo la liberación de vasopresina, respuesta autonómica y la conducta dipsogénica (Johnson y Gross, 1993; Ganong, 2000). Se ha establecido previamente que ciertas funciones conductuales atribuidas a la ANG II, tales como la ingesta de agua y el apetito por la sal están primariamente bajo el control de receptores AT_1 localizados en estructuras circunventriculares y que responden a los niveles circulantes de la ANG II (Severs y col., 1970; Fitzsimons, 1980). Estas estructuras envían proyecciones angiotensinérgicas hacia los NSO y NPV del HIP, que a su vez proyectan a regiones del tallo cerebral tales como el NTS y *locus coeruleus* los cuales participan en el control de la homeostasis corporal.

Se sabe que los receptores AT_1 juegan un papel crítico, en relación a la información proveniente de la ANG II circulante y que los receptores AT_2 pueden estar involucrados en el procesamiento central de las aferencias viscerales y endocrinas en la coordinación de la respuesta fisiológica. Al respecto se sabe que la angiotensina II participa en la regulación de las neuronas magnocelulares del

NSO y del NPV hipotalámico las cuales liberan oxitocina y vasopresina (Qadri y col., 1992). Se ha demostrado que la dipsogenia y la liberación de oxitocina y vasopresina inducida por la ANG II, está regulada por ambos subtipos de receptores (Hogarty y col., 1992; Jensen y col., 1992). Este efecto es bloqueado por la administración del antagonista AT_1 losartán y al contrario fue potenciado por el tratamiento con el antagonista del receptor AT_2, el PD123177 (Höhle y col., 1995). Estos resultados proporcionan evidencia que los receptores AT_1 y AT_2 periventriculares afectan la liberación de vasopresina y la respuesta dipsogénica de una forma opuesta y sugieren un papel contrarregulatorio del receptor AT_2 en dicha función. Adicionalmente, la administración intravenosa de ANG II induce la expresión del gen de expresión temprana *c-fos* en los núcleos cerebrales anteriormente nombrados, el cual es parcialmente mediado por el subtipo de receptor AT_2, confirmando un posible papel para este receptor en las funciones centrales de la ANG II (Li y col., 1998).

Estos estudios se han visto confirmados mediante experimentos de "knockout" del receptor AT_2 en ratones, los cuales presentaron un patrón de conducta similar al de la ansiedad (Okuyama, 1999) reducción de la actividad locomotora y de la respuesta de ingesta de bebida (Hein y col., 1995), y disminución de la temperatura corporal (Watanabe y col., 1999). Adicionalmente, la ANG II a través de los receptores AT_2 incrementa la excitabilidad y la tasa de disparo neuronal (Kang y col., 1994), la secreción hormonal (Qadri y col., 1992), la inhibición del crecimiento (Stoll y col., 1995), modifica las variables hemodinámicas, regula el flujo sanguíneo regional en el cerebro (Stromberg y col.,

1992; Naveri y col., 1994) y participa en los procesos de apoptosis (Yamada y col., 1996). La expresión de los receptores AT_2 es especialmente alta durante el desarrollo y en consecuencia han sido implicados en funciones orgánicas tan relevantes como el crecimiento, desarrollo y diferenciación neuronal (Sumners y col., 1994).

En adición a la acciones de la ANG II circulante sobre los OCV, hay que agregar las generadas por el SRA cerebral, que también produce ANG II y que actualmente es considerado como un importante neurotransmisor y modulador de la respuesta cardiovascular a nivel del SNC (Phillips y Sumners, 1998). Diferentes modelos genéticos de hipertensión (Saavedra y col., 1986; Morimoto y col., 2001; Lilach y col., 2005) han demostrado la importancia del SRA cerebral en la hipertensión arterial. La administración central de fármacos o sondas antisentido para inhibir al SRA cerebral han logrado implicar a este sistema en varias formas de hipertensión (Saavedra y col., 1986; Bunnemann y col., 1993). Recientes trabajos han demostrado que la sobreactivación del SRA cerebral produce hipertensión (Davisson y col., 1998; Zhou y col., 2006; Phillips y Edilamar, 2008), y cambios en la sensibilidad cardiovascular, en modelos de ratones transgénicos (Lazartigues y col., 2002).

El eje órgano subfornical-hipotálamo-médula suprarrenal

La lámina terminalis forma la pared rostral del tercer ventrículo cerebral y dentro de esta región se encuentran los OCV, que son estructuras que se

encuentran ricamente irrigados por vasos sanguíneos y como ya hemos mencionado anteriormente, carentes de barrera hematoencefálica, lo que los hace permeables a cualquier macromolécula circulante en el torrente sanguíneo (Landas y Phillips, 1987). El OSF, es una de las estructuras más importantes dentro de esta región, encargado del control hidro-salino a nivel central (Eng y Miselis, 1981; Lind y Johnson, 1982; Yun-Hui y Yao-Hua, 2003). Este núcleo se observa como una pequeña prominencia en el lado medial de la columna del fórnix por arriba del foramen interventricular, formando parte del techo del tercer ventrículo cerebral, al igual que los demás OCV, el OSF se encuentra extensamente vascularizado, con grandes espacios perivasculares y endotelio con capilares fenestrados (Landas y Phillips, 1987). Esta conformación estructural le permite monitorear cualquier sustancia que este circulando en la sangre, además de presentar un extenso número de receptores para péptidos y neurotransmisores como la ANG II. Este núcleo puede responder tanto a los niveles circulantes de ANG II, como a los producidos localmente. También es capaz de responder a la vasopresina, al péptido Y, y a los cambios en el volumen sanguíneo (Johnson y Gross, 1993; Kazuto y col., 1986; Plunkett y col., 1987). Estas características convierten al OSF en una importante interfase sangre-cerebro, favoreciendo funciones sensoriales dentro del circuito del control autonómico (Landas, 1987; Yun-Hui y Yao-Hua, 2003).

Es bien conocido que el OSF esta implicado en el mantenimiento de la homeostasis de los fluidos corporales y del control de la presión arterial (Simpson y Routtenberg, 1973; Ferguson y Renaud, 1984) además de regular la liberación

de oxitocina y vasopresina de la neurohipófisis (Ferguson, 1987; Ferguson y Kasting, 1988). La microinyección de ANG II, en el OSF, produce una respuesta presora importante, bradicardia y dipsogenia. Es sabido que estos efectos son mediados a través del receptor AT_1 y que existe una densidad importante de receptores AT_1 en el OSF (Mangiapane y Simpson 1980, Lenkei y col., 1995). Adicionalmente a esta información se sabe que la ANG II incrementa la tasa de disparo de las neuronas del OSF (Li y Ferguson, 1993), y un aumento en la expresión de *c-fos*, y otros genes de expresión temprana dentro de esta estructura (McKinley y col., 1995).

Las neuronas del OSF se proyectan al HIP, y estudios neuroanatómicos soportan el concepto que los OCV y en especial el OSF funcionan como sensores para el mantenimiento de los fluidos corporales con importantes conexiones con centros autonómicos hipotalámicos y extrahipotalámicos, influenciando la actividad sobre la ingesta de líquido, respuesta presora y secreción de vasopresina (Oldfield y col., 1991; Weisinger y col., 1996; Pauline y col., 1997; McKinley y col., 2003). Así, se ha demostrado que el OSF presenta proyecciones que van a las células magnocelulares del NSO y el NPV donde se sintetiza la oxitocina y la vasopresina las cuales son liberadas a la circulación desde la neurohipófisis (Miselis, 1981; Jhamandas y col., 1989). En adición, las neuronas del NPV proyectan axones a centros simpáticos en el área rostroventrolateral del bulbo (RVLM), y el intermedio lateral de la médula espinal, las cuales están implicadas en la regulación de la actividad simpática y juegan un importante papel en el reflejo vasomotor. En estas estructuras, la ANG II ejercer una importante función como

neurotransmisor y modulador de la homeostasis cardiovascular y de la respuesta frente al estrés (Swanson y Lind, 1986; Lind, 1986; Dampney, 1994).

Otro de los componentes de este eje lo constituye la medula suprarrenal (MSR), que participa en la respuesta frente el estrés físico y emocional. La MSR se considera como una neurona postganglionar simpática modificada y las hormonas que libera son consideradas como neurotransmisores. La MSR está encargada de la secreción de dos importantes neurohormonas. La primera es la epinefrina, que ejerce efectos cronotrópicos e inotrópicos positivos sobre el corazón, facilita el flujo de sangre a los músculos y al cerebro, causa relajación del músculo liso vascular y ayuda a convertir el glicógeno en glucosa en el hígado, entre muchos otros efectos. El segundo neurotrasmisor secretada por esta estructura es la norepinefrina, la cual tiene efectos vasoconstrictores fuertes, aumentando de esta manera la presión sanguínea (Llewellyn-Smith, 2009). La médula suprarrenal está constituida por varias capas y tiene un origen diferente al de la corteza. Es un tejido ectodérmico (proviene de las crestas neurales). Dentro de ella encontramos células cromafines que están inervadas por terminaciones del nervio esplácnico. Las células cromafines se clasifican en dos tipos celulares diferentes, según el tipo de gránulos secretores que presenten, las células que presentan gránulos que se tiñen de color oscuro, contienen, noradrenalina, dimorfinas y otras sustancias como el ATP, dopamina y cromograninas. Las que se tiñen de color claro contienen adrenalina y encefalinas. En general, los dos tipos de células liberan catecolaminas, péptidos opioides, ATP y otras sustancias (Llewellyn-Smith, 2009).

Es ampliamente conocido que la ANG II tiene efecto sobre el aumento de la liberación en la transmisión noradrenérgica. La ANG II es capaz de aumentar la respuesta vasoconstrictora mediada a través de los nervios simpáticos, este proceso es mediado por un aumento en la liberación de catecolaminas y es consecuencia de un efecto dual a nivel periférico y central que facilita la respuesta cardiovascular (Shepherd y Vanhoutte, 1981; Mazur-Ruder y col., 1979). La ANG II también tiene efecto sobre el sistema nervioso simpático, mediante la estimulación de la síntesis de catecolaminas y está mediado a través de una regulación sobre la enzima tirosina hidroxilasa, lo que le permite modular de forma más eficiente la actividad simpática ante una respuesta fisiológica (Roth y Hughes, 1972).

Ahora bien, existe evidencia que apoya el papel del SRA tisular en la glándula suprarrenal, especialmente porque se ha demostrado la expresión local de todos los componentes del sistema como la pro-renina, el ANG, la renina, la ECA y de las angiotensinas (Jun Ming Wang y col., 2002) 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., 1985), células de la zona glomerulosa (Nakamura y col., 1985), tumores de las células de Leydig testicular (Pendey e Inagami, 1986), los gonadotrofos que contiene hormona luteinizante de la glándula pituitaria (McKenzei y col., 1985) y células del musculo liso vascular (Dzau, 1984).

El SRA suprarrenal ha adquirido relevancia gracias a los hallazgos de Mullins y Ganten (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 medios de ANG II son de 3,32 pg/g. La mayoría de esta ANG II proviene de la corteza suprarrenal, aun cuando la médula también contiene ANG II. La presencia de la ANG inmunoreactiva 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 rata, de ratón y del hombre (Deschepper y col., 1986), mientras que hasta la presente fecha no se ha detectado renina ni su ARNm en la médula suprarrenal. La ECA se encuentra presente tanto a nivel de la médula como la corteza suprarrenal. Los niveles elevados de ECA 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}I-351A o captopril-^{3}H, ambos inhibidores específicos de la ECA, en la cápsula de la zona glomerulosa de la corteza 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 sobre la unión de la ANG II a su receptor, se demostró que la corteza suprarrenal contiene, fundamentalmente, receptores AT_1, mientras que en la médula suprarrenal presentan dos subtipos de receptores: AT_1 y AT_2, siendo el AT_2 el que se encuentra en mayor proporción (95%) mientras que el receptor AT_1 representa un 5% (Chiu y col., 1989). Los efectos conocidos de la ANG II a nivel de la región cortical y medular son mediados por el receptor AT_1 (Balla y col., 1991). El papel funcional del receptor AT_2 en la médula suprarrenal no ha sido elucidado hasta el presente.

Es ampliamente conocido que la adrenalina y la noradrenalina, tienen una importante participación en situaciones de estrés. Estas sustancias posibilitan que el organismo se enfrente a situaciones adversas (estímulos estresantes). Cualquier estímulo estresante puede determinar un aumento de la descarga del nervio esplácnico y un aumento de la síntesis y liberación de estas hormonas. La adrenalina y la noradrenalina tienen efectos metabólicos y efectos sobre órganos y sistemas, en especial el sistema cardiovascular. La MSR recibe información del SNC vía neuronas del NPV del HIP, que se encargan de secretar la hormona liberadora de corticotropina, la cual es una hormona peptídica y un neurotransmisor involucrado en la respuesta al estrés; es la encargada de activar la secreción hipofisiaria de ACTH. La ANG II actúa como un secretagogo de las catecolaminas en la MSR, efecto que es mediado por el receptor AT_1 y el incremento de la producción de fosfoinositidos (Wong y col., 1990; Dendorfer y col., 1998; Israel y col., 1995). Al respecto, Wong y colaboradores (1990)

demostraron que la ANG II a través del receptor AT_1 es capaz de liberar catecolaminas desde la médula suprarrenal, especialmente durante episodios de estrés (Saavedra y col., 2004). Este efecto parece estar mediado por la activación del receptor AT_1 asociada a la activación de la fosfolipasa C y la subsecuente formación de IP_3 y la liberación del Ca^{2+} desde sus depósitos hacia el citoplasma (Israel y col., 1995) o debido a una disminución en la producción de GMPc (Takekoshi y col., 2001).

Especies reactivas de oxígeno y la NAD(P)H oxidasa

Son varias las enzimas productoras de ERO en las células de los mamíferos. Dentro de este grupo de enzimas podemos encontrar, la xantina oxidasa, la ciclooxigenasa, el citocromo P450, la sintasa de oxido nítrico y la NAD(P)H oxidasa (Cohen, 1994; Bobba y col., 2008). Cada una de estas enzimas tiene una importancia bajo ciertas condiciones, dentro de la homeostasis corporal en diferentes sistemas. Así tenemos que para el sistema cardiovascular la NAD(P)H oxidasa es una de las principales fuentes de ERO, con un importante papel dentro del funcionamiento del sistema cardiovascular (Griendling y col., 2000, Sedeek y col., 2009).

Esta enzima cataliza la reducción del oxígeno a anión superoxido, vía la transferencia de un electrón proveniente del NAD(P)H. la NAD(P)H oxidasa es mejor conocida por su papel en la defensa contra microorganismos y ha sido

caracterizada en numerosos estudios realizados en células que tienen función fagocítica (Shatwell y Segal, 1996; Huang y Brumell, 2009).

Basados en estos estudios, se ha podido determinar que la NAD(P)H oxidasa es un complejo multimérico consistente de múltiples subunidades, dos subunidades unidas a la membrana plasmática ($gp91^{phox}$+$p22^{phox}$) y tres subunidades citoplasmáticas ($p47^{phox}$, $p67^{phox}$ y las proteínas rac, que unen GTP), en el momento de la activación estas últimas se traslocan a la membrana, tras ser fosforilados ciertos dominios dentro de estas unidades (Vignais, 2002). El núcleo catalítico de la NAD(P)H oxidasa es un flavocitocromo b_{558}, que es una proteína con un potencial redox bajo que se encuentra anclada a la membrana por una serie de segmentos transmembranales hidrofóbicos y forma un enlace no covalente con las subunidades p22phox y gp91phox, en una relación molar de uno a uno (Biberstine-Kinkade y col., 2001). Es conocido que la subunidad gp91phox es el componente catalítico del núcleo y estudios realizados en membranas de células de riñón de mono (COS7), en donde se realizaron mediciones de potenciales y espectros de la subunidad gp91phox, demostraron que esta subunidad contiene dos núcleos hemo con distintos potenciales de -225 mV y -265 mV (Cross y col., 1995).

Este bajo potencial redox permite la reducción directa del oxígeno a anión superoxido por la reducción del citocromo, en adición a los grupos hemo la subunidad gp91phox contiene un grupo prostético esencial y funcional de FAD, como se demostró en un estudio donde la actividad enzimática fue abolida

empleando preparaciones de flavocitocromos b_{558} purificadas, en donde se perdieron los sitios de unión para el FAD, la actividad oxidante se recuperó al adicionar estos sitios de unión dentro del complejo enzimático (Babior y Kipnes 1977). Otro estudio demostraron que existen sitio de unión para FAD y NAD(P)H en el extremo carboxilo terminal de la sub unidad gp91phox (Suminoto y col., 1992).

Los grupos hemo de la NAD(P)H oxidasa están unidos a dos pares de residuos de histidina localizados en el extremo N-terminal, mas específicamente en la hélice transmembranal III y V de la subunidad gp91phox (Biberstine-Kinkade y col., 2001). Uno de estos grupos hemo se encuentra en una posición cerrada al lado citoplasmático de la membrana y en proximidad del dominio que une FAD; sin embargo el segundo grupo hemo se encuentra sobre el lado opuesto de la membrana. El NAD(P)H transfiere electrones al FAD y subsecuentemente estos pasan al grupo hemo, que se encuentran del lado citoplasmático, posteriormente estos electrones son transferidos al segundo grupo hemo y finalmente al oxígeno para producir anión superóxido en la matriz extracelular o en las vacuolas fagocíticas (Vignais , 2002).

La hipótesis planteada hasta este momento es que la p47phox es la subunidad responsable de la activación y translocación de los diferentes componentes que se encuentran en el citoplasma y se translocan la membrana. Estudios realizados en neutrófilos deficientes de p47phox y p67phox, demostraron la importancia de la subunidad p47phox en el proceso de translocación de todas

las subunidades del citoplasma a la membrana después de una estimulación. Esto fue evidenciado al estimular los neutrófilos deficientes de p67phox, que lograban realizar translocaciones normales a diferencia de los deficientes de p47phox que eran incapaces de realizar la translocación (Vignais, 2002).

La p47phox es una proteína básica con regiones ricas en arginina en su extremo C-terminal, que también contiene numerosos residuos de serina que son fosforilados en el momento de la translocación de esta subunidad a la membrana (Segal y col., 1985). Adicionalmente, la p47phox y la p67phox contienen dominios SH3 que son bien conocidos como mediadores de interacciones de proteína a proteína, en donde se encuentran regiones ricas en prolina y que se encuentran bien caracterizados en la mayoría de los complejos multienzimáticos (Segal y col., 1985). Estas mismas regiones se encuentran identificadas en la subunidad p22phox, sugiriendo la existencia de una variedad de interacciones entre los componentes de este complejo enzimático (Leto y col., 1990).

La p47phox puede interaccionar, consigo misma a través de los dominios SH3 ricos en prolina, o con los dominios SH3 del extremo C terminal de la p67phox, lo que permite la translocación y unión de todos los componentes del complejo enzimático (Leto y col., 1990). En adición a todas estas interacciones, al unirse la p67phox con la p47phox, permite la fosforilación de la p47phox en el sitio opuesto al sitio de unión para la p47phox con el citoctromo b_{558}, que produce un cambio conformacional en la subunidad p47phox, abriendo el sitio de unión para la p47phox con el citocromo b_{558}.

El último componente citosólico en formar el complejo de la NAD(P)H oxidasa, son las proteínas Rac, que son activadas por un cambio en la tasa de recambio de GDP para GTP, y se cree que la formación de la isoforma Rac-GTP, debe ser el paso crucial para la activación NAD(P)H oxidasa y la obtención de su máxima activación, para la generación de anión superóxido (Moldovan y col., 2006). Numerosos estudios en cultivo de células libres, usando los dominios negativos de Rac (N17Rac), demostraron que esta unidad es indispensable para la activación de la NAD(P)H oxidasa (Page y col., 1999; Dinauer, 2003).

Durante la pasada década, se ha identificado a la NAD(P)H oxidasa en numerosas células no fagocíticas, dentro del sistema cardiovascular y otros tejidos afines, así como en los riñones y otros tipos de células fagocíticas (Griendling y col., 1994; Fukui y col., 1997; Gorlach y col., 2000). Suh y colaboradores (1999), fueron los primeros en identificar una secuencia homóloga a la gp91phox que contenía FAD y un sitio de unión para NAD(P)H, en humanos. Esta proteína homólogo fue denominada inicialmente como Mox-1 (por sus siglas en ingles “mitogenic oxidase”). Posteriormente Mox-1 fue hallada con una alta tasa de expresión en epitelio de colon humano, en células de carcinoma de colon humano y en células de músculo liso vascular de aorta (Suh y col., 1999). La gp91phox fue identificada en otros tejidos y se le dio el nombre de Nox (por NAD(P)H oxidasa). Así fue, como se identifico a la Nox-4 en células de riñón (Geiszt y col., 2000; Chabrashvili y col., 2002).

En las células de músculo liso vascular de aorta, la Nox-1 tenía una muy baja producción de anión superóxido comparativamente con las isoformas inactivas de neutrófilos (Suh y col., 1999; Lassegue y col., 2001). Estudios posteriores demostraron que en células endoteliales se expresaban todas las subunidades que se encontraban presentes en los fagocitos, incluyendo a la gp91phox, pero con la diferencia de que poseían dos subunidades homologas a la Nox-1 y Nox-4 (Jones y col., 1996; Gorlach y col., 2000; Lassegue y col., 2001).

En el corazón, el complejo de la NAD(P)H oxidasa, es relativamente menos conocido que en otros tejidos, pero algunas evidencias han demostrado que la producción de anión superóxido en las células cardíacas, esta mediado por la NAD(P)H oxidasa (Xiao y col., 2002; Nakagami y col., 2003). Es de hacer notar que en cada uno de estos estudios se ha identificado a la NAD(P)H oxidasa, tanto en células como en tejidos del sistema cardiovascular, implicándola dentro estructuras biológicas y funcionales, que van desde el lecho vascular pasando por el endotelio, hasta llegar a los miocitos, todos estos hallazgos demuestran la importancia de la NAD(P)H oxidasa no fagocítica dentro del control de la presión arterial y la función cardiovascular.

Estudios realizados en la ultima década han identificado a los componentes de la NAD(P)H oxidasa, en cultivo primario de neuronas y en diferentes áreas del cerebro de roedores (Suzukawa y col., 2000; Tammariello y col., 2000; Kumanogoh y col., 2001; Serrano y col., 2003). Aunque inicialmente estos estudios sugieren que las ERO derivadas de la NAD(P)H oxidasa cerebral a nivel

del SNC, solo mediaban los procesos relacionados con apoptosis neuronal, isquemia cerebral y enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer y Parkinson (Walder y col., 1997; Floyd, 1999; Tammariello y col., 2000), estudios posteriores han demostrado que las ERO derivadas de la NAD(P)H oxidasa cerebral juegan un importante papel en el control de la homeostasis del SNC, respuesta cardiovascular y conducta dipsogénica (Suzukawa y col., 2000; Gao y col., 2004; Zimmerman y col., 2004). Aun cuando estas evidencias apuntan a la importancia de la NAD(P)H oxidasa en el control de la función cardiovascular tanto a nivel periférico como del SNC, aun no se ha establecido completamente el papel de esta enzima y las ERO en los mecanismos de señalización en el tejido nervioso asociados a la ANG II.

Las especies reactivas de oxígeno y la angiotensina II

Se ha demostrado que la ANG II es capaz de generar ERO como parte de su mecanismo de señalización intracelular a nivel del SNC (Zimmerman y col., 2002 y 2004). Estos hallazgos, indican claramente que la respuesta a nivel del SNC, inducida por la administración ICV de ANG II requiere de la formación intracelular de anión superóxido. Otros autores también han demostrado que el H_2O_2 es un importante mediador en la cascada de señalización del SRA cerebral (Schumaker, 2002). Muchos de los efectos fisiológicos de la ANG II a nivel periférico son mediados por la formación de ERO, por lo que se ha postulado que alteraciones en los mecanismos redox mediados por la ANG II, estarían implicados en la generación de estrés oxidativo, que a su vez está relacionado con

numerosas patologías como la insuficiencia cardiaca, la hipertensión, la aterosclerosis, las enfermedades neurodegenerativas y la diabetes (Petterson y col., 2006; Phillips y Menezes, 2008). Estos hallazgos también demostraron el papel que juegan las enzimas antioxidantes, como la SOD, en el control y regulación de los efectos de la ANG II a nivel del SNC.

Griendling y colaboradores (1994), fueron los primeros en describir que la ANG II activa a la NAD(P)H oxidasa de las células de músculo liso vascular. Subsecuentemente, otros investigadores demostraron que la ANG II produce un incremento de tres veces en la producción de anión superóxido y de 5 veces en la producción de peróxido de hidrógeno.

Se ha demostrado que la activación del receptor AT_1 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 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 difenileneiodonio (DPI) y la APO, en el RVLM o en los ventrículos cerebrales atenúa la respuesta presora de la ANG II en ratas (Chan y col., 2005; Erdös y col., 2006); y la microinyección de DPI o el oligonucleótido antisentido de la subunidad $p22^{phox}$ o $p47^{phox}$ de la NAD(P)H oxidasa dentro del RVLM, previene parcialmente la producción local de $O_2^{\cdot -}$ inducida por ANG II (Chan y col., 2005). Adicionalmente, 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 $O_2^{\cdot -}$ inhibe el influjo del calcio extracelular inducido por la ANG II en neuronas (Zimmerman y col., 2004).

Más aun, la hipertensión inducida por la administración periférica o central de ANG II, es contrarrestada al aumentar la expresión de la SOD o al emplear un mimético de la SOD, reduciendo dramáticamente la presión sanguínea (Laursen y col., 1997; Schnackenberg y col., 1998; Zimmerman y col., 2002, 2004). Igualmente, 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). Empleando herramientas de ingeniería molecular se demostró que al producir la sobreexpresión de la CAT o también por la inhibición con péptidos antisentido de las subunidades p22phox y Nox-1, se atenuó el efecto promotor que produce la ANG II, sobre el crecimiento de las células de músculo liso vascular, demostrado así el papel de la NAD(P)H oxidasa y el peróxido de hidrógeno en la hipertrofia de las células del músculo liso vascular inducida por la ANG II (Ushio-Fukai y col., 1996; Zafari y col., 1998; Lassegue y col., 2001).

La relación entre la generación de anión superóxido y el efecto presor de la ANG II implica la activación de la NAD(P)H oxidasa. Experimentos realizados en ratones carentes de la subunidad p47phox exhibían una reducción en los niveles

de anión superóxido y desarrollaban una hipertensión suave, comparado con el tipo silvestre cuando se sometían a un tratamiento crónico con ANG II (Landmesser y col., 2002). Esto, junto con los hallazgos de que la ANG II causaba una hipertensión marcada y exacerbada en ratones carentes de SOD (Fukai y col., 1999), ha demostrado sin dejar ninguna duda, que las ERO juegan un papel importante en el desarrollo de la hipertensión dependiente de ANG II. Evidencias en la última década apuntan, que en animales y seres humanos el efecto vasoconstrictor inducido por de la infusión de ANG II sobre la arteria braquial, es reducido por el tratamiento con vitaminas antioxidantes como la vitamina C (Wada y col., 2002).

Estas evidencias parecen apuntar a que las ERO juegan un papel importante en la regulación de la función cardiovascular, he intervienen en la generación de múltiples patologías asociadas al sistema cardiovascular, particularmente aquellas en las que se encuentra implicada la ANG II y el estrés oxidativo (Saavedra, 2005). Los mecanismos moleculares precisos, las vías de señalización detalladas, así como los sistemas fisiológicos implicados en estos procesos, no han sido bien definidos hasta el presente en especial a nivel del SNC, aun cuando varios estudios sugieren la importancia de mecanismos oxidativos en el sistema nervioso periférico en relación con las estructuras del SNC (Li y col., 1996; Xu y col., 2001; Zimmerman, 2004).

Estrés y las especies reactivas de oxígeno

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 del 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 y la frecuencia cardiaca, 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 ANG II, como una de las hormonas reguladoras más importantes en el estrés. Se sabe que el estrés agudo, a través de la activación de los receptores ß-adrenérgicos, incrementa la formación de la renina, y por tanto la síntesis y liberación de la ANG II periférica (Yang y Wan, 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 glucocortiocoides 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 SNC, gracias a su acción sobre los receptores localizados en las estructuras circunventriculares tales como el OSF, y cuyas conexiones con el 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 SNC como el NPV del hipotálamo y el OSF (Saavedra, 1992; Yang y Wan, 1996; Aguilera y col., 1995), sugiriéndose la existencia de una coordinación entre los 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 magnitud, se requiere de la integridad y participación del SRA, 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 Wan, 1996; Watanabe y col., 1998). La administración periférica o ICV 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 INM, el producido por una corriente de aire en la cara de la rata (*air-jet*), (Hirasawa y Hashimoto, 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 cardiaca, se demostró que el losartán 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 candesartán previno la respuesta simpatoadrenal y hormonal así como el incremento de las catecolaminas urinarias inducidas en un modelo de estrés agudo (Armando y col., 2001) o en un modelo de estrés crónico como lo son las ratas espontáneamente hipertensas en las cuales el sistema simpático y el SRA se encuentran activados (Seltzer y col., 2004). Aun mas, se ha reportado que la disrupción genética dirigida de la expresión del ANG cerebral disminuye la respuesta cardiovascular frente al estrés por INM en ratas (Baltatu y col., 2004), y la microinyección de antagonistas selectivos del receptor AT_1 en regiones presinápticas cerebrales reduce o abole la respuesta presora del estrés por INM 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 SRA, 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 ANG II durante situaciones de estrés tales como la INM y la hipertensión por causas genéticas (ratas SHR). La evidencia creciente indica que las ERO, y en particular el anión superoxido ($O_2 \cdot^-$) 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 OSF (Zimmerman y col., 2002; Sun y col., 2005), el HIP y el tallo cerebral (Erdös 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 (Erdös y col., 2006; Schnackenberg y col., 1998; Zimmerman y col., 2002, 2004). Así, los cambios que induce la administración 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 SOD (Zimmerman y col., 2002). Así mismo, la administración ICV de un mimético de la SOD, el 4-hidroxi-2,2,6,6-tetramethilpiperidina 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 HIP posterior en ratas normotensas (Gao y col., 2004; Campese y col., 2005; Lu y col., 2004).

Se desconoce hasta el presente si la producción local ERO podría estar involucrada, al menos en parte, en la acciones excitatorias de la ANG II endógena liberada durante situaciones de estrés como la inmovilización forzada. Este estímulo ocasiona la activación del eje simpático-suprarrenal, incrementando la

presión arterial y la frecuencia cardiaca (Lee y col., 1989), y la excreción urinaria de catecolaminas (Israel y col., 1994, Medina e Israel, 2004). Igualmente, aun no se ha establecido con claridad la vía se señalización de la ANG II asociada a las ERO en un modelo de estrés como es, el de las ratas espontáneamente hipertensas en donde los sistemas SRA y adrenérgico, se encuentra sobre activados (Baiardi y col., 2004).

Al respecto, estudios realizados por Peng y Phillips (2001) empleando un modelo de estrés de exposición al frio, demostraron que existe una regulación diferencial de los componentes del SRA cerebral en diferentes áreas del cerebro de la rata, encontrando que en los individuos sometidos al estrés, se produce un aumento del número y expresión de los receptores AT_1, junto con una reducción en el número y expresión de los receptor AT_2, áreas del cerebro implicadas en el control de la presión arterial. Igualmente, en un modelo de estrés por nado forzado se observó un aumento del estrés oxidativo y de los niveles de ANG II en diferentes áreas del cerebro de la rata relacionados con el estrés emocional (Pedreanez y col., 2006), implicando al SRA cerebral con estados depresivos y de ansiedad.

Estos hallazgos implican que los blancos de acción periféricos y centrales, relacionados con la generación de ERO inducidas por la ANG II, son sitios potenciales para la generación de estrés oxidativo a nivel del SNC. Siendo este sistema uno de los más importantes para las acciones de la ANG II y el control de la presión arterial, es imperativo conocer cuáles son los mecanismos precisos

mediante los cuales ocurre la señalización redox y la generación de ERO mediada por la ANG II a nivel del SNC, asunto que forma parte de las interrogantes del presente trabajo.

Especies reactivas de oxígeno y enzimas antioxidantes

Las ERO incluyen una gran variedad de diversas especies químicas que han sido tradicionalmente consideradas como productos tóxicos de los diferentes procesos metabólicos de la célula o como producto de la reducción del oxigeno molecular (Rees y col., 2008; Bobba y col., 2008). Siguiendo la reducción de uno, dos o tres electrones, los radicales más comunes son, el anión superóxido, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo, respectivamente. La formación de estas moléculas ocurre a través de reacciones catalizadas por enzimas que se encuentran acopladas entre sí, un ejemplo es la transformación del anión superóxido en peróxido de hidrógeno que es llevado a cabo por la SOD (Miao y Clair, 2009).

También pueden ocurrir reacciones entre los mismos radicales o entre los radicales y metales de transición como es el caso del peróxido de hidrógeno y el hierro para formar radicales hidroxilos o por la interacción de estos radicales con la vía del transporte de electrones mitocondrial, un ejemplo de esto es el ácido hipocloroso. Otros tipos de reacciones son las que ocurren con el oxido nítrico formando peroxinitritos, reacción que ocurre cuando interaccionan el oxido nítrico con el anión superoxido o el radical hidroxilo (Rees y col., 2008).

La generación de ERO es normal en todas las células y forma parte de la homeostasis celular: este equilibrio se pierde cuando hay una excesiva producción de radicales que pueden generar gran daños a nivel celular afectando la funcionalidad de las mismas. Un ejemplo de los efectos del exceso de ERO son las mutaciones en el ADN, la perioxidación lipídica, el daño en proteínas y en casos extremos se puede producir la muerte celular, vía necrosis o apoptosis (Carmody y Cotter, 2001; Ueda y col., 2002).

Así como existe un sistema complejo para la producción de radicales libres, también existe todo un sistema diseñado para defender a la célula de los cambios generados por la producción de ERO, y así mantener el equilibrado del ambiente redox dentro de la célula (Rees y col., 2008). Este sistema está formado por numerosas enzimas antioxidantes, siendo las más importantes, la SOD, CAT y GPX. Las ERO son generadas bajo una compartamentalización intracelular específica y las enzimas antioxidantes se encuentran selectivamente distribuidas dentro de las células en regiones subcelulares acorde con su función, un ejemplo de esto son los tres tipos de SOD que se localizan en diferentes lugares de la célula (Beyer y col., 1991). Cada una de ellas media la rápida conversión del anión superoxido en peróxido de hidrógeno, la CAT y la GPX que se encuentran en los peroxisomas y en el citoplasma y se encargan de la eliminación del peróxido de hidrógeno convirtiéndolo en agua y oxígeno (Rees y col., 2008; Bobba y col., 2008).

La SOD es una metaloenzima que cataliza la conversión del anión superóxido para producir oxígeno molecular y H_2O_2. Esta enzima fue descubierta por McCord y Fridovich (1969). En las células eucariotas existen tres isoenzimas de SOD, todas producto de genes nucleares diferentes y son sintetizadas en los ribosomas citoplásmicos (Ho y col., 1991), dos de estas isoformas contienen en su sitio activo cobre y zinc (Cu,Zn-SOD), y la tercera contiene manganeso (Mn-SOD). Una de las isoformas de CuZn-SOD se localiza principalmente en el citosol, aunque también se encuentra en lisosomas, núcleo y en menor cantidad, en los peroxisomas y en el espacio intermembranoso mitocondrial (Weisiger y col., 1973), su estructura es un dímero, con un peso de 17 kDa por subunidad (Hsu y col., 1992; Crapo y col., 1992).

La otra isoforma de Cu,Zn-SOD es extracelular (EC-SOD), que en el humano tiene un peso molecular de 104 kDa y presenta una estructura tetramérica (Oury y col., 1996), se localiza en fluidos como el plasma, el líquido sinovial y la linfa. Se ha sugerido que su sitio de síntesis son las células endoteliales, en donde cumple funciones de protección. Posee afinidad por la heparina y por los proteoglicanos de sulfato de heparán (Carlsson y col.,1996), contribuye de un 0.5 a un 20% de la actividad de la SOD total (Oury y col., 1996). En la rata esta isoforma está constituida por dos subunidades, su peso molecular es de 85 kDa y a diferencia de la forma tetramérica del humano, no posee afinidad por la heparina (Carlsson y col., 1996). La Mn-SOD también es un tetrámero con un peso de 80 kDa, contiene 2 átomos de manganeso por dímero y se localiza en la matriz mitocondrial (Weisiger y col., 1973).

Otra de las enzimas antioxidantes encargada de la degradación de ERO es la GPX, descubierta por Mills (1957). Esta enzima cataliza la descomposición del H_2O_2 o de otros peróxidos orgánicos a H_2O con la concomitante oxidación del glutatión reducido (GSH) el que se transforma en glutatión oxidado (GSSG). El GSSG es, a su vez, reducido a GSH por la glutatión reductasa (GSH-Rx) en presencia de NAD(P)H formando un ciclo redox, impidiendo que se agoten las reservas de GSH (Harris 1992; Ichikawa y col., 1994). Los niveles de NAD(P)H son regenerados por la acción de las enzimas málica y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.

Se conocen diferentes isoformas de la GPX las cuales contienen en su sitio activo un átomo de selenio GSH-Px citosólica (cGPX). Es una enzima tetramérica (Arthur y Beckett, 1994), que sólo tiene actividad antioxidante en casos de un incremento de H_2O_2 y de hidroperóxidos de lípidos, pero muestra una baja actividad sobre hidroperóxidos de fosfolípidos y de colesterol. GSH-PX extracelular (pIGPX) es una enzima glicosilada, que se sintetiza en riñón y pulmón, su ARNm se ha encontrado en células de epitelio tubular proximal y en células parietales de la cápsula de Bowman. Se piensa que tiene un papel importante en la protección del riñón durante el daño oxidativo (Maser y col., 1994), sin embargo su función no ha sido bien establecida, ya que su sustrato (GSH), en el plasma está en muy bajas concentraciones 0.3 μM (Avissar y col., 1994; Arthur y Beckett, 1994). Está constituida por 226 aminoácidos y tiene un peso molecular de 25 kDa. Esta enzima puede estar presente en la circulación como un homotetrámero

(Yoshimura y col., 1991). La GSH-PX gastrointestinal (giGPX) se localiza principalmente en el tracto gastrointestinal de los roedores y en el humano también en el hígado y colon (Arthur y Beckett, 1994), la secuencia de su ADNc predice que está constituida por 190 aminoácidos (Chu y col., 1993). Inmunológicamente esta enzima no reacciona con los anticuerpos contra la GPX extracelular o citosólica (Chu y col., 1993), se piensa que tiene un papel de protección contra efectos adversos en la ingesta de hidroxiperóxidos (Arthur y Beckett, 1994). Es además una hidroxiperoxidasa de fosfolípidos, está unida a membranas intracelulares y tiene una menor afinidad por GSH, su actividad se encuentra mejor preservada en casos de deficiencia de selenio, es abundante en los testículos y puede ser regulada por las gonadotropinas (Brigelius-Flohé y col., 1994). Se ha reportado que reduce los hidroperóxidos de colesterol y al 7β-hidroperóxido de colesterol, uno de los compuestos más citotóxicos de las lipoproteínas estudiadas (Pushpa-Rekha y col., 1995). En todos los casos con excepción de la PlGPX que es un monómero, todas las isoformas de GPx son tetrámeros con un PM aproximado a los 84 kDa, el riñón contiene alrededor de un 7.5% de la concentración total de selenio encontrado en tejidos de rata y la actividad de la GPX en este órgano es de aproximadamente un 2.0% de la total (Pushpa-Rekha y col., 1995; Spallholz, 1990; Behne y col., 1990).

Por último, pero no menos importante tenemos a la CAT, que es la enzima encargada de catalizar la descomposición del peróxido de hidrógeno (H_20_2) en oxígeno y agua. La CAT es una enzima perteneciente a la familia de

las Fe-protoporfirinas IX, y se encuentra presente en muchos tipos de células. Su función es proteger a las células del efecto tóxico del peróxido de hidrógeno producido en distintas reacciones redox del metabolismo celular. La CAT fue una de las primeras enzimas purificadas y ha sido muy estudiada (Deisseroth y Dounce, 1970). Es una de las enzimas más eficientes con una velocidad de aproximadamente 200,000 transformaciones/segundo/subunidad y presenta una cinética de tipo ping pong. Esta enzima esta formada por un tetrámero con cuatro subunidades idénticas (350,000 kD). Cada monómero contiene un grupo prostético Hem en el núcleo catalítico de la enzima. En algunas especies animales también contiene una molécula de NADP por subunidad cuya función es proteger a la enzima de la oxidación por su sustrato H_2O_2 (Ivancich y col., 1997).

La CAT se encuentra comúnmente en los peroxisomas, que son organelos citoplasmáticos en forma de vesículas que contienen oxidasas y CAT. En los peroxisomas se degradan las purinas y otros compuestos. En los peroxisomas se produce H_2O_2, compuesto muy tóxico para la célula que es degradado rápidamente por la CAT (Chance y Hocino, 1971).

El peróxido de hidrógeno es un residuo del metabolismo celular de muchos organismos vivos, además de ser un importante segundo mensajero implicado en procesos de fagocitosis de microorganismos patógenos, principalmente anaerobios, pero dada su toxicidad debe transformarse rápidamente en compuestos menos peligrosos. Esta función la efectúa la catalasa, enzima que

cataliza su descomposición en agua y oxígeno. El mecanismo completo mediante el cual actúa la catalasa no se conoce del todo, aun así la reacción química se produce en dos etapas, en donde Fe-E representa el núcleo de hierro del grupo hemo unido a la enzima que actúan como cofactores (Vetrano y col., 2005). Esta enzima puede actuar como una peroxidasa para muchas sustancias orgánicas, especialmente para el etanol, que actúa como donante de hidrógeno. Las enzimas de muchos microrganismos, como el *Penicillium simplicissimum*, que exhiben actividad de catalasa y peroxidasa, son frecuentemente llamadas catalasas-peroxidasas (Kehrer, 1993).

Las evidencias presentadas hasta ahora 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 SOD; y a su vez este último convertido en agua por acción de la CAT o GPX (Babior, 1999), es plausible proponer que la cascada de la NAD(P)H oxidasa está involucrada en la señalización del receptor AT_1 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. Ahora bien, cuando los niveles de ERO exceden la capacidad antioxidante de la célula, hecho que puede ocurrir como consecuencia de una disrupción mitocondrial, una sobre activación de las enzimas generadoras de ERO o una desregulación del sistema antioxidante, se genera una condición conocida como estrés oxidativo. Esta condición, es la base para muchas patologías incluidas, la hipertensión arterial, la insuficiencia cardiaca,

arterioesclerosis y diabetes, todas estas enfermedades están asociadas a un aumento del estrés oxidativo (Cai y Harrison 2000; Landmesser y Harrison 2001; Sorescu y Griendling 2002; Wilcox 2002; Petterson y col., 2006; Tamara, 2006). Es por ellos que la cuantificación de la actividad de estas enzimas podría constituir una medida indirecta que refleje la producción de ERO inducida por la ANG II en condiciones basales o cuando el SRA se encuentra estimulado como ocurre en el estrés y en la hipertensión.

OBJETIVO GENERAL

Establecer la posible participación de los radicales libres como señalización del sistema renina angiotensina en el tejido nervioso en ratas, mediante la cuantificación de la actividad de las enzimas antioxidantes. Evaluar el papel del estrés oxidativo regulado por la angiotensina II en dos modelos de estrés: un modelo de estrés agudo como lo es la INM y un modelo de estrés a largo plazo empleando ratas espontáneamente hipertensas (SHR) y sus controles normotensos Wistar-Kyoto, que es un modelo genético de hipertensión arterial.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Estudios *in vitro*:

- Evaluar el efecto de la angiotensina II sobre la actividad de las enzimas antioxidantes: superoxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa en estructuras cerebrales tales como el hipotálamo, el órgano subfornical y la médula de la glándula suprarrenal de la rata.
- Establecer el papel de la NAD(P)H oxidasa, la PKC y los subtipos de receptores de angiotensina II, sobre la estimulación inducida por angiotensina II de la actividad de las enzimas antioxidantes: superoxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa en el hipotálamo, el órgano subfornical y la médula de la glándula suprarrenal de la rata.

Estudios *in vivo*:

- Evaluar el efecto de la inmovilización forzada sobre la actividad de las enzimas antioxidantes en estructuras cerebrales tales como el hipotálamo, órgano subfornical y en la médula de la glándula suprarrenal de la rata.
- Establecer la posible participación de la NAD(P)H oxidasa, la SOD, y el subtipo de receptor de angiotensina II AT_1, en la alteración de la actividad de las enzimas antioxidantes inducida por la inmovilización forzada, en estructuras cerebrales tales como el hipotálamo, el órgano subfornical y en la médula de la glándula suprarrenal de la rata.
- Evaluar el efecto de la hipertensión genética sobre la actividad de las enzimas antioxidantes en estructuras nerviosas tales como el hipotálamo, órgano subfornical y en la médula de la glándula suprarrenal.
- Establecer la posible participación de la NAD(P)H oxidasa, la SOD, y el subtipo de receptor de angiotensina II AT_1, en la alteración de la actividad de las enzimas antioxidantes inducida por la hipertensión genética (ratas SHR y WKY), en las estructuras cerebrales como el hipotálamo, el órgano subfornical y en la médula de la glándula suprarrenal de la rata.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Para este estudio se emplearon ratas machos de la cepa *Sprague-Dawley* de entre 150-250 g de peso, tanto para la caracterización de la cascada de señalización de las enzimas antioxidantes, como para los experimentos de estrés inducidos por inmovilización forzada. Para el estudio de las enzimas antioxidantes en un modelo genético crónico de hipertensión se emplearon ratas macho de la cepa *Wistar Kyoto* y *SHR* (ratas espontáneamente hipertensas) de entre 150-250 g de peso. Todos estos animales procedíeran del Bioterio Del Instituto Nacional de Higiene “Rafael Rangel” y del Instituto de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina. Las ratas fueron divididas en grupos de 4 animales, con agua y comida *ad libitum.* Todos los experimentos fueron realizados siguiendo las buenas prácticas para el manejo de animales de laboratorio (NIH Guide for the care and use of Laboratory Animals).

Protocolo de inmovilización forzada

En este estudio se empleó una modificación del protocolo de Jindra y Kvetnansky (1982). Los animales fueron inmovilizados 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 una hora, e inmediatamente fueron sacrificados por decapitación.

Procedimiento:

Los animales fueron divididos en cuatro grupos experimentales de 4 animales cada uno:

1. Grupo control: animales que solo se les administró el vehículo por vía oral (intragástrica) o por vía intraperitoneal, según el caso.
2. Grupo tratamiento: animales que se les administró el compuesto a evaluar.
3. Grupo sometido a estrés por inmovilización: animales que solo se les administra el vehículo por vía oral (intragástrica) o por vía intraperitoneal, según el caso y fueron inmovilizados por una hora.
4. Grupo tratamiento: animales que se les administra el compuesto a evaluar y posteriormente son inmovilizados por una hora.

Tratamientos:

Grupo tratamiento (APO): animales que se les administró apocinina, a una dosis de 15 mg/kg por vía intraperitoneal, por 5 días.

Grupo tratamiento (TEM): animales que se les administró tempol, a una dosis de 20 mg/kg por vía intraperitoneal, por 7 días.

Grupo tratamiento (LOS): animales que se les administró losartan, a una dosis de 50 mg/kg por vía oral, por 15 días.

Tratamiento de los tejidos

Una vez decapitados los animales, los cerebros fueron extraídos del cráneo, para posteriormente extraer el HIP y el OSF bajo control estereomicroscópico. Para la MSR, esta fue extraída de la glándula suprarrenal empleando estereomicroscópico. Estos tejidos fueron mantenidos en Buffer Krebs-Ringer (KRB) hasta la determinación respectiva. Posteriormente, los tejidos fueron transferidos a un buffer de lisis y homogenizados mediante sonicación. Los homogenatos fueron centrifugados a 10.000 rpm por 30 minutos a 4°C y se tomaron los sobrenadantes para realizar los ensayos de actividad enzimática. y la médula suprarrenal.

Determinación de la actividad enzimática de la catalasa

La actividad de la CAT fue determinada empleando una modificación del método de Aebi (1984). La actividad CAT fue cuantificada como la velocidad de descomposición enzimática del H_2O_2, y monitoreada a una longitud de onda de 240 nm, a 25^{o}C. La mezcla de incubación contenía 10 mM H_2O_2 en un buffer fosfato 10 mM a pH 7 y 25 μL de proteínas obtenidas a partir del homogenato de HP, para un volumen final de 750 μL. Los resultados fueron expresados en k/mg proteína (k= constante de reacción).

Determinación de la actividad enzimática de la superóxido dismutasa

La actividad de SOD se determinó mediante una modificación del método de Oberley y Spitz. (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 de la actividad enzimática de la glutatión peroxidasa

La actividad de la GPX fue determinada de forma indirecta por una modificación del método descrito por Lawrence y Burks (1976), 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. La actividad de la GPX se mide de manera indirecta por una reacción acoplada con la glutatión reductasa y se basa en la disminución de la absorbancia a 340 nm debido a la desaparición de NAD(P)H. La GPX al reducir los hidroperóxidos consume glutatión reducido, el cual es regenerado por la glutatión reductasa a partir de glutatión oxidado, proceso que consume NAD(P)H. Los resultados se expresaron promediando los cambios de absorbancia por minuto, multiplicando este promedio por 0,16 (este factor se obtiene tomando en cuenta que el coeficiente de absorción milimolar del NAD(P)H a 340 nm es de 6.22 L $mmol^{-1}$ cm^{-1} y dividiendo el resultado entre los mg de proteína adicionados en el ensayo. Así se obtiene la actividad específica expresada en U/mg de proteína, donde 1 U = µmol de NAD(P)H oxidado/min). Los resultados fueron expresados como actividad enzimática en

U/mg proteína (ε = 6.22 mM^{-1} 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 fueron determinadas por el método de Lowry y colaboradores (1951) utilizando albúmina sérica de bovino como patrón. Las muestras fueron ajustadas a una concentración de 10-20 μg de proteínas/10 μl.

Determinación de ERK 1/2 mediante Western blot

El tejido hipotalámico fue incubado a 37ºC con ANG II (10^{-7} 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_3VO_4, 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 4ºC, lavadas y posteriormente incubadas con el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con peroxidasa de rábano (Cell Signaling Technology) (1:10.000), durante 1 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 ®-BioRad Software).

Determinación de catecolaminas urinarias.

Las catecolaminas urinarias se determinaron por el método de purificación y adsorción por alúmina descrito por Alberti y Taylor *(1968)*, modificado por Nakano y colaboradores, (1970), el cual consiste en recolectar las muestras de orina sobre HCl 6N, metabisulfito de sodio y EDTA disódico. Las muestras se centrifugaron a 12.000 rpm por 5 minutos y el sobrenadante se ajusto a pH 8,3 con hidróxido de amonio. Cada muestra fue pasada por una columna de óxido de aluminio de 5 cm x 0,5 cm y después de tres lavados con 10 ml de agua destilada se eluyó mediante la adición de 3 ml de ácido acético 0,2 N. Posteriormente se oxidaron las fracciones.

La cuantificación diferencial de la epinefrina y norepinefrina se realizó oxidando las catecolaminas a diferentes pH y temperaturas, registrándose la fluorescencia en un espectrofotómetro (Aminco Bowman) a 2 longitudes de onda (410-500 nM para la oxidación a pH 3,5 a 2ºC y a 390-480 nm para la oxidación a pH 6,5 a temperatura ambiente). Los resultados de la excreción urinaria de catecolaminas fueron expresados como µg/24 horas de orina.

Determinación de corticosterona urinaria

Para la recolección de la muestra se siguió el mismo procedimiento descrito en la determinación de catecolaminas, con la diferencia que durante la recolección de la muestra no se empleó preservativo. Una vez cumplidas las 24 horas de recolección de la orina, se congeló a -80°C hasta el momento de la determinación y cuantificación de la corticosterona.

Método de determinación de corticosterona urinaria

La costicosterona se determinó mediante el uso de un kit comercial de DSL-10-81100 ACTIVE® Rat Corticosterone Enzyme, de Diagnostic Systems Laboratories, Inc, por el método de ELISA (Enzyme Linked Inmunoabsorvent Assay).

Este ensayo se fundamenta en la detección de un antígeno inmovilizado sobre una fase sólida mediante anticuerpos que directa o indirectamente producen una reacción cuyo producto, en este caso el colorante, puede ser cuantificado espectrofotométricamente. En este procedimiento sigue el principio básico de la competencia entre un antígeno no marcado y un antígeno marcado con una enzima; que competirán para unirse a un anticuerpo que previamente ha sido fijado a un posillo. La cantidad del antígeno marcado con la enzima unida al anticuerpo es inversamente proporcional a la concentración del antígeno no marcado presente en la muestra problema.

Procedimiento:

- Adición de los estándares, controles y muestra problema a los posillos que contienen el anticuerpo fijado al soporte y es específico contra la corticosterona (anticuerpo de cabra anti-conejo IgG).
- Adición de la solución de antígeno unido a la enzima (corticosterona de rata conjugada a la enzima peroxidasa de rábano).
- Adición del segundo anticuerpo el cual posee un epítope diferente del anticuerpo que ha sido fijado al soporte de los posillos (anticuerpo de conejo anti-corticosterona de rata).

- Incubación a temperatura ambiente por una hora en agitación suave. Luego aspirado de la muestra y lavado con solución de lavado, para lavar los complejos antígenos o anticuerpos que no hayan reaccionado.
- Aplicación de la solución cromógena tetrametilbenzidina (TMB). Incubar en agitación suave por 20 minutos, colocar la solución de stop y leer la absorbancia de la solución usando un Lector de Placa a 450nm.

Los resultados de los niveles circulantes de corticosterona fueron expresados como ng/ml.

Método indirecto de registro de presión arterial y frecuencia cardíaca.

El registro de los parámetros cardiovasculares, presión arterial (PA) y frecuencia cardíaca (FC) se realizó en ratas conscientes, por un método no invasivo mediante el uso de un pletismógrafo digital de cola (DIGITAL PRESSURE METER LE 5002, LETICA®, Panlab, s.l., Barcelona, España).

Las ratas se mantuvieron en una estufa a 42° C durante quince minutos con el fin de producir una dilatación de los vasos sanguíneos periféricos. Después, fueron colocadas en un cepo para inmovilizarlas y mediante el uso de transductor de presión arterial y frecuencia cardiaca se procedió a la toma de la frecuencia cardíaca, presión arterial sistólica (PAS) y presión arterial diastólica (PAD).

Fundamento de la medición no invasiva

El equipo LETICA emplea una aproximación de la medida de la presión arterial que es básicamente esfingomanométrica. Este proceso es el mismo al empleado para medir la presión arterial en humanos. En este caso se aplica sobre la arteria de la cola una presión externa controlada, al mismo tiempo que es detectada la presión de pulso. La detección de la señal de pulso se realiza mediante un transductor basado en un "Puente de Wheastone" semiconductor de Silicon montado sobre la base de "una abrazadera" localizada sobre la arteria. Esta tecnología permite la detección del pulso en forma precisa y con una alta sensibilidad, sin importar la posición del transductor alrededor de la cola, mientras que el montaje sobre "la abrazadera" permite que un único transductor sea utilizado para un amplio rango de tamaño de animales, sin importar su peso. El nivel de la señal de pulso es monitoreado permanentemente en la pantalla LCD del instrumento, lo que permite asegurar la medición con un nivel adecuado del pulso.

La medición de los parámetros cardiovasculares mediante el pletismógrafo digital de cola consiste en un circuito neumático de presiones variables. El manguito de presión ocluye la luz del vaso progresivamente. En este caso se trata de la arteria caudal de la cola, concomitantemente con la deformación del vaso, la onda de pulso va desapareciendo gradualmente, hasta su desaparición total. En este momento la presión del mango se hace igual a la del vaso que, a su vez, corresponde a la presión PAS. Cuando el proceso se revierte y la onda de pulso alcanza su nivel inicial, se registra la PAD. El transductor de pulso, detecta la onda de pulso, cuya intensidad se muestra en el "indicador de nivel de pulso".

En general, se realizan tres registros sucesivos de cada parámetro cardiovascular y luego, se calcularán los promedios. La presión arterial media se calcula mediante la siguiente fórmula:

PAM = PAD + 0.33 (PAS-PAD)

La semana previa al experimento, a las ratas se les determinó diariamente la presión arterial y la frecuencia cardíaca, para minimizar el estrés asociado al manejo y al movimiento de la cola (período de adaptación a la toma de la presión arterial y la frecuencia cardiaca). Los resultados se expresaron como presión arterial, sistólica, diastólica y media (PAM) y frecuencia cardiaca (FC).

Análisis estadístico

Los resultados fueron expresados como la media $\pm$ E.E.M. La significancia de los resultados fue analizada mediante el análisis de varianza de una vía (ANOVA) y el post-test de Bonferroni. Un valor de $P<0,05$ fue considerado significativo.

RESULTADOS

Efecto de los inhibidores de la NAD(P)H oxidasa y la PKC y de los bloqueantes de los receptores AT_1 y AT_2, sobre la actividad CAT, SOD y GPX, estimulada por la ANG II en el hipotálamo de la rata

Como se muestra en la figura 1, la incubación del tejido hipotalámico con ANG II (10^{-7} M) incrementó de manera significativa la actividad de la CAT (6 veces comparada con el grupo control), la SOD (6 veces comparada con el grupo control) y la GPX (3 veces comparada con el grupo control). Este incremento en la actividad de las enzimas antioxidantes inducido por la ANG II, tuvo su pico de actividad a los 5 min para la SOD y a los 10 min para la CAT y la GPX (ver figura 1). El efecto de la ANG II sobre la actividad de las enzimas antioxidantes fue completamente inhibido por la adición al medio de incubación de LOS (10^{-6} M), APO (10^{-4}M) y CHE (6,5 µM), respectivamente (figuras 2, 3 y 4). Por el contrario, los tejidos tratados con PD 123319 (PD, 10^{-6}M), mostraron un incremento significativo en la actividad de las enzimas antioxidantes SOD, CAT y GPX, inducido por la ANG II, potenciando la respuesta a la ANG II en un 16% para SOD, 17% para GPX y un 50% para la CAT (figuras 2D, 3D y 4D).

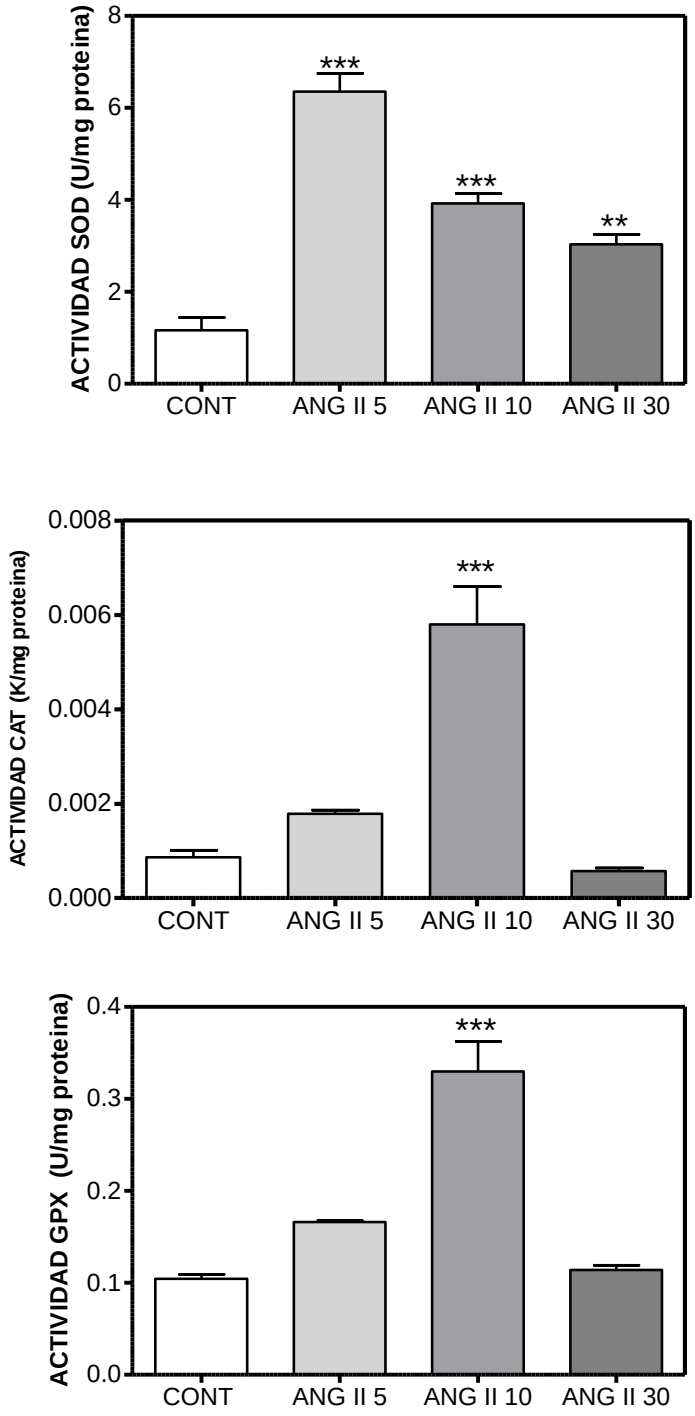


FIGURA 1. Efecto de la ANG II (10^{-7} M) sobre la actividad de las enzimas antioxidantes SOD, CAT y GPX en el HIP de la rata. Los tejidos fueron incubados con ANG II (10^{-7} M) durante 5, 10 y 30 min. El grupo control fue incubado sin ANG II. Cada barra representa la media $\pm$ E.E.M. de N=6-9 experimentos individuales. ***p*<0,01; ****p*<0,001 comparado con el grupo control.

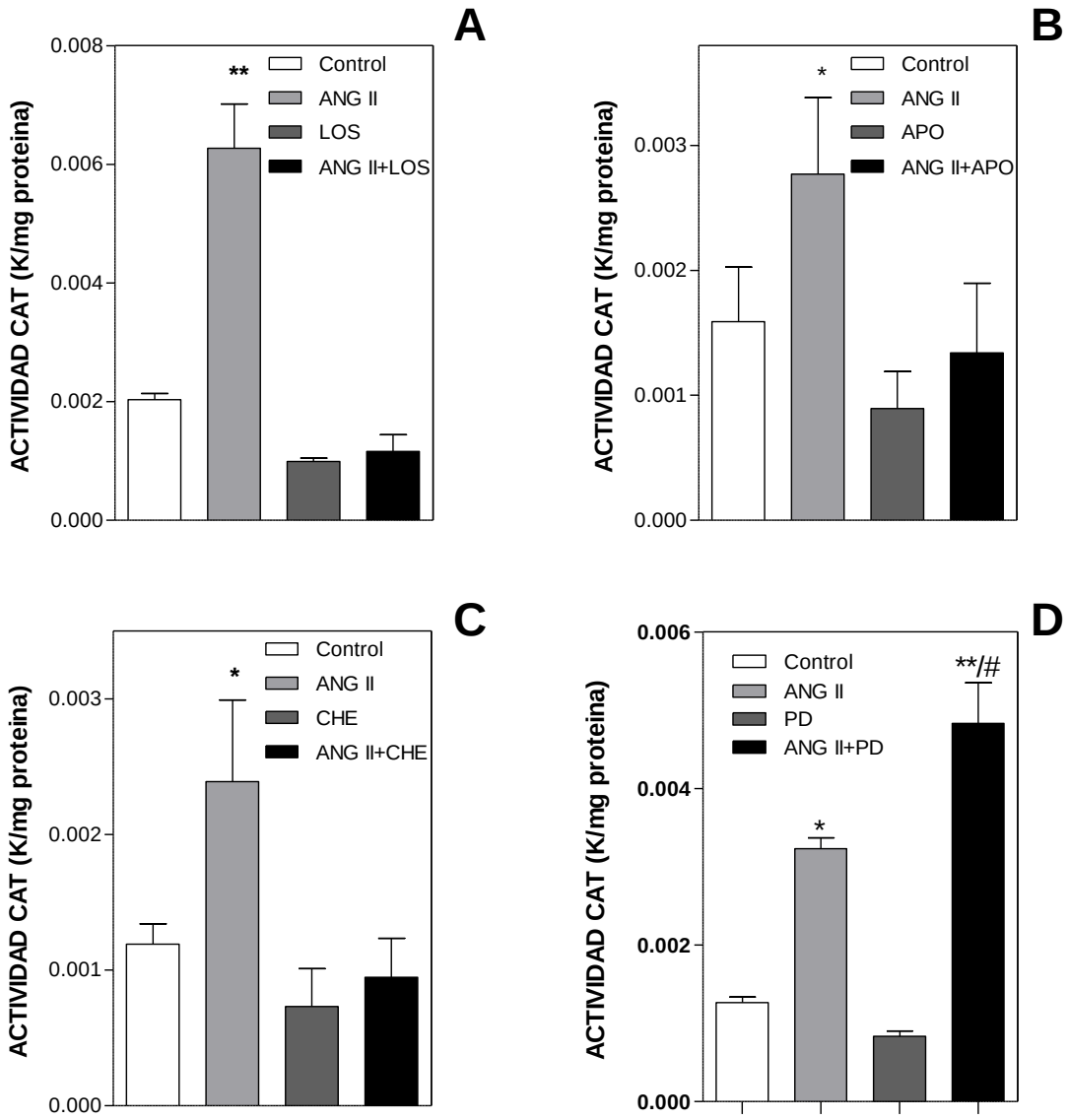


FIGURA 2. Efecto de LOS (10^{-6} M), la APO (10^{-4} M), la CHE (6,5 µM) y PD (10^{-6}M), sobre la actividad de la CAT estimulada por la ANG II (10^{-7} M) en el HIP de la rata. Los tejidos fueron incubados con o sin ANG II (10^{-7} M) durante 10 min. Cada barra representa la media ± E.E.M. de N=6-9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

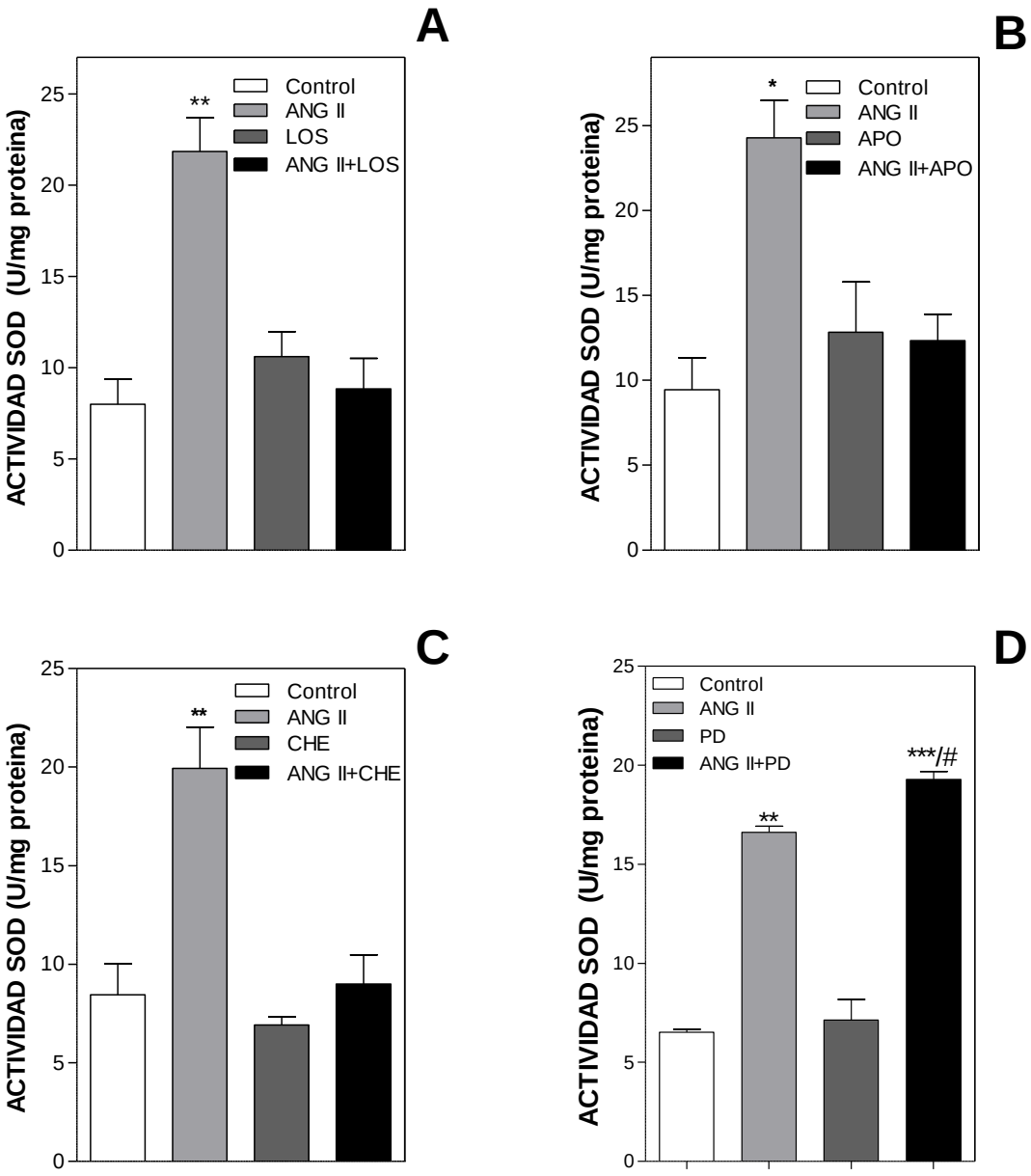


FIGURA 3. Efecto del LOS (10^{-6} M), la APO (10^{-4} M), la CHE (6.5 µM) y PD (10^{-6}M) sobre la actividad de la SOD estimulada por la ANG II (10^{-7} M) en el HIP de la rata. Los tejidos fueron incubados con o sin ANG II (10^{-7} M) durante 5 min. Cada barra representa la media ± E.E.M. de N=6-9 experimentos individuales. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 comparado con el grupo control. #p<0,05 comparado con el grupo tratado con ANG II.

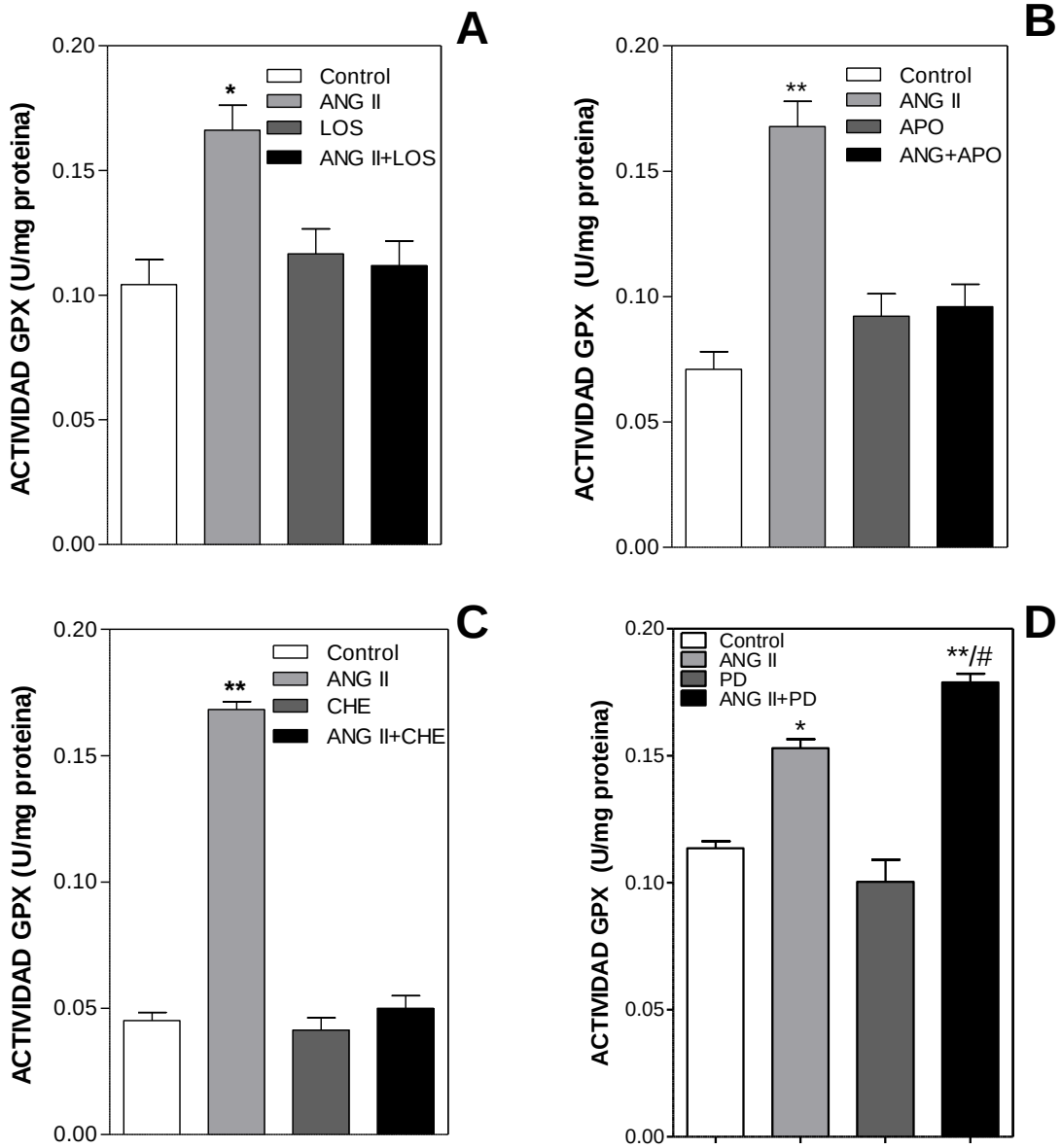


FIGURA 4. Efecto de LOS (10^{-6} M), la APO (10^{-4} M) la CHE (6,5 µM) y PD (10^{-6}M), sobre la actividad de la GPX estimulada por la ANG II (10^{-7} M) en el HIP de la rata. Los tejidos fueron incubados con o sin ANG II (10^{-7} M) durante 10 min. Cada barra representa la media ± E.E.M. de N=6-9 experimentos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

Efecto de los inhibidores de la NAD(P)H oxidasa y la PKC y de los bloqueantes de los receptores AT_1 y AT_2, sobre la actividad CAT, SOD y GPX, estimulada por la ANG II en el OSF de la rata

La figura 5 muestra que la incubación del OSF con ANG II (10^{-7} M) incrementa de manera significativa la actividad de la SOD (3 veces comparada con el grupo control), la CAT (3 veces comparada con el grupo control) y la GPX (3 veces comparada con el grupo control). Este incremento en la actividad de las enzimas antioxidantes tuvo su pico máximo de actividad a los 5 min para la SOD y a los 10 min para la CAT y GPX (figura 5). Estos efectos fueron completamente inhibidos por la adición al medio de incubación de LOS (10^{-6} M), APO (10^{-4}M) y CHE (6,5 µM), respectivamente (figuras 6, 7 y 8). En el caso de los tejidos incubados con PD 123319 (PD, 10^{-6}M), se observó que el bloqueante del receptor AT_2 no fue capaz de inhibir la actividad de las enzimas antioxidantes SOD, CAT y GPX, estimulada por la ANG II (figuras 6D, 7D y 8D).

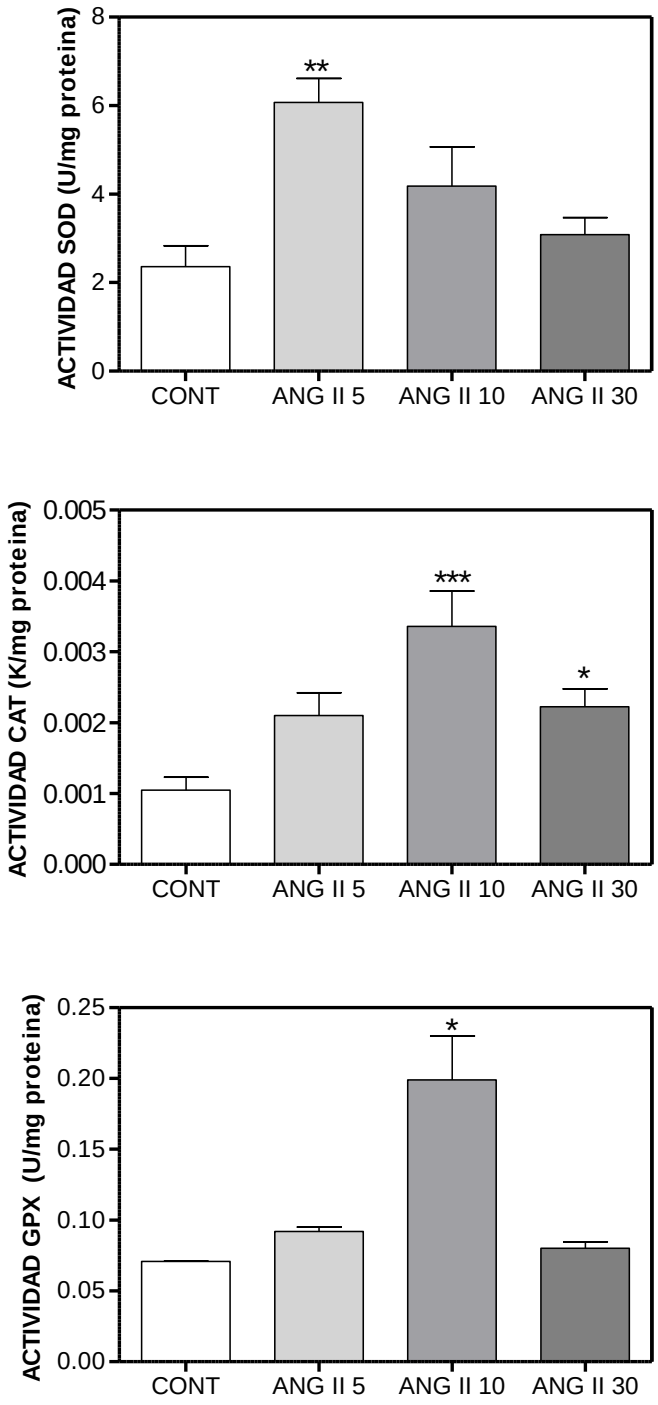


FIGURA 5. Efecto de la ANG II (10^{-7} M) sobre la actividad de las enzimas antioxidantes SOD, CAT y GPX en el OSF de la rata. Los tejidos fueron incubados con ANG II (10^{-7} M) durante 5, 10 y 30 min. El grupo control fue incubado sin ANG II. Cada barra representa la media $\pm$ E.E.M. de N=6-9 experimentos individuales. **p*<0,05; ***p*<0,01; ****p*<0,001 comparado con el grupo control.

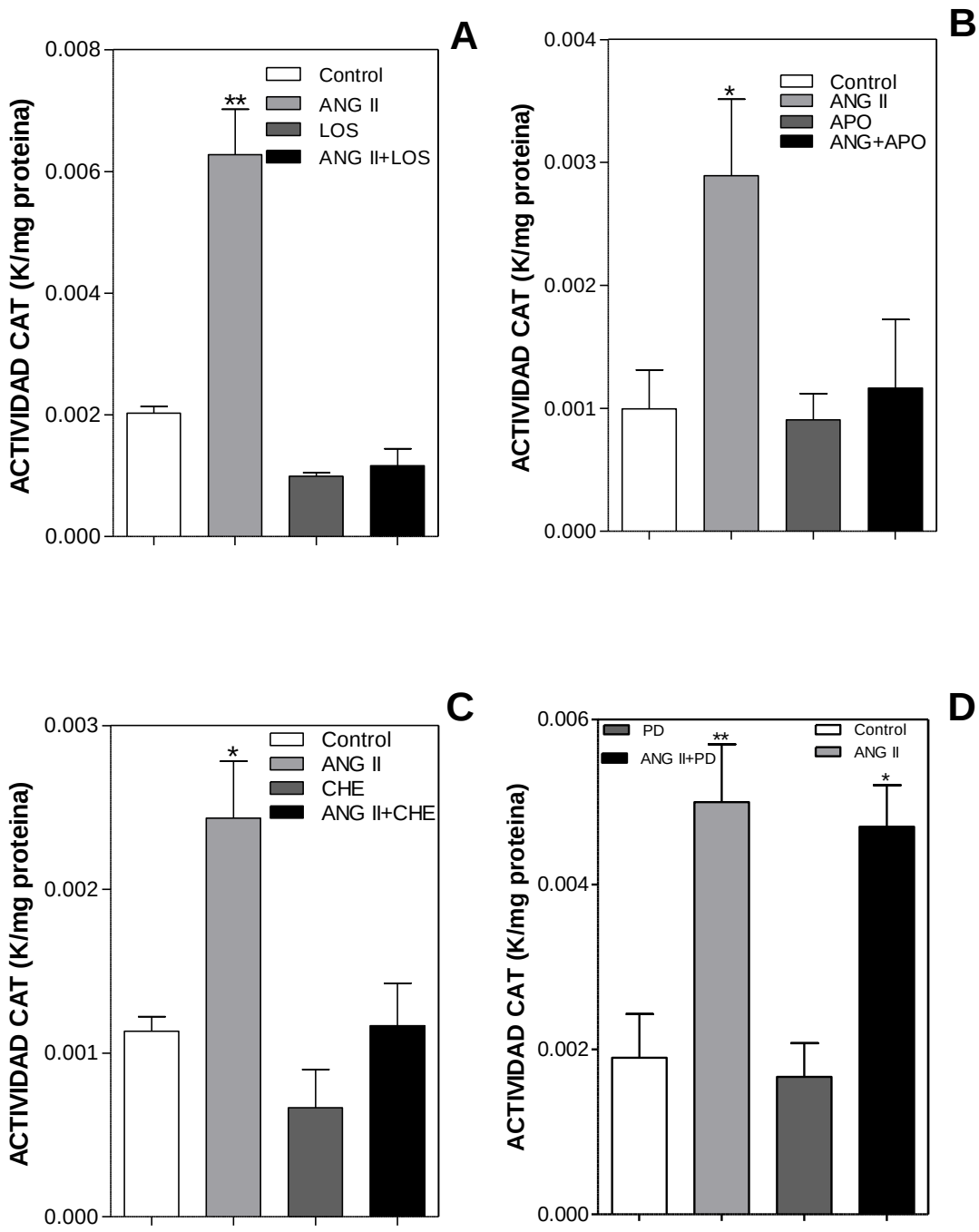


FIGURA 6. Efecto de LOS (10^{-6} M), la APO (10^{-4} M), la CHE (6,5 µM) y PD (10^{-6}M), sobre la actividad de la CAT estimulada por la ANG II (10^{-7} M) en el OSF de la rata. Los tejidos fueron incubados con o sin ANG II (10^{-7} M) durante 10 min. Cada barra representa la media ± E.E.M. de N=6-9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

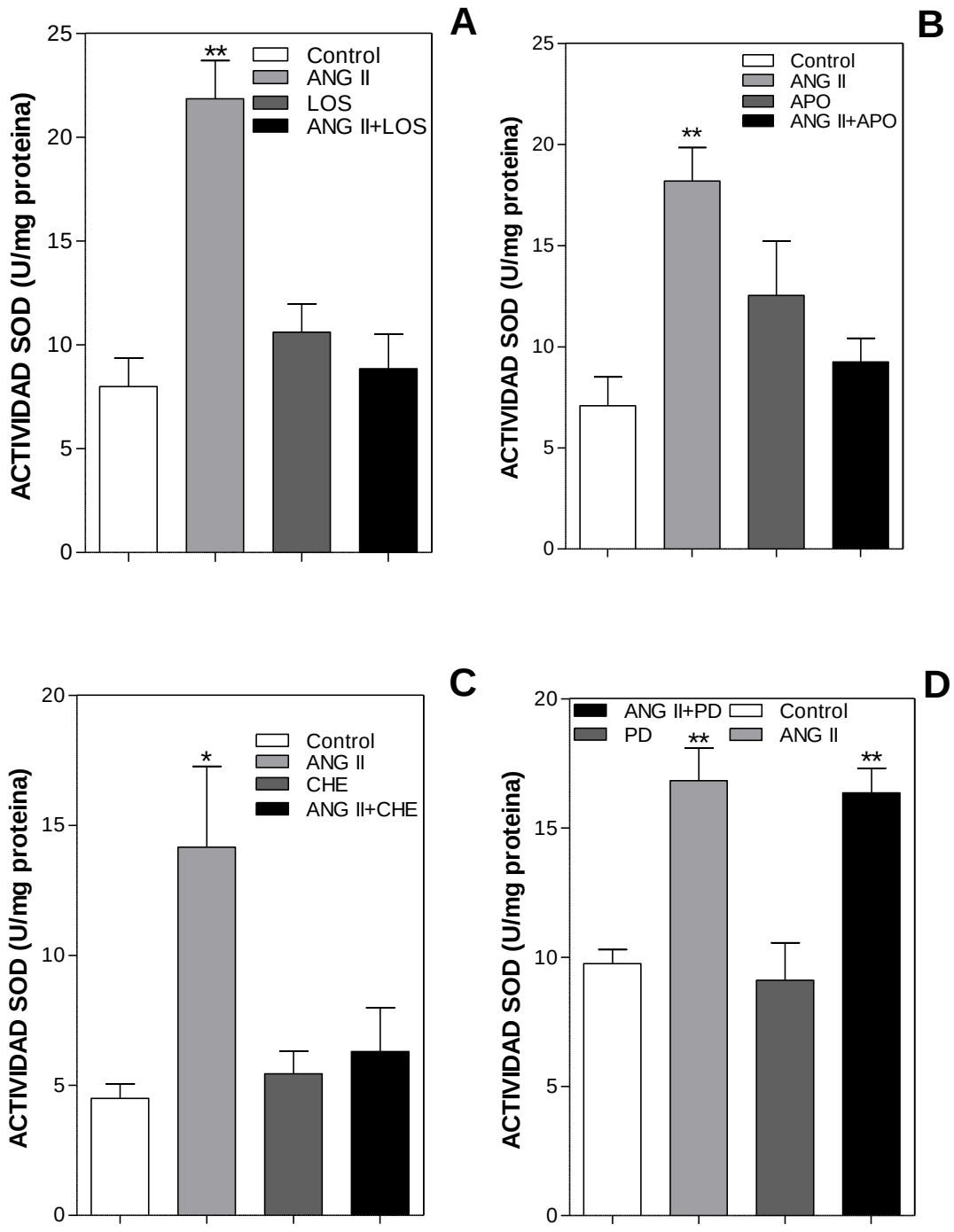


FIGURA 7. Efecto de LOS (10^{-6} M), la APO (10^{-4} M), la CHE (6,5 µM) y PD (10^{-6}M), sobre la actividad de la SOD estimulada por la ANG II (10^{-7} M) en el OSF de la rata. Los tejidos fueron incubados con o sin ANG II (10^{-7} M) durante 5 min. Cada barra representa la media ± E.E.M. de N=6-9 experimentos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

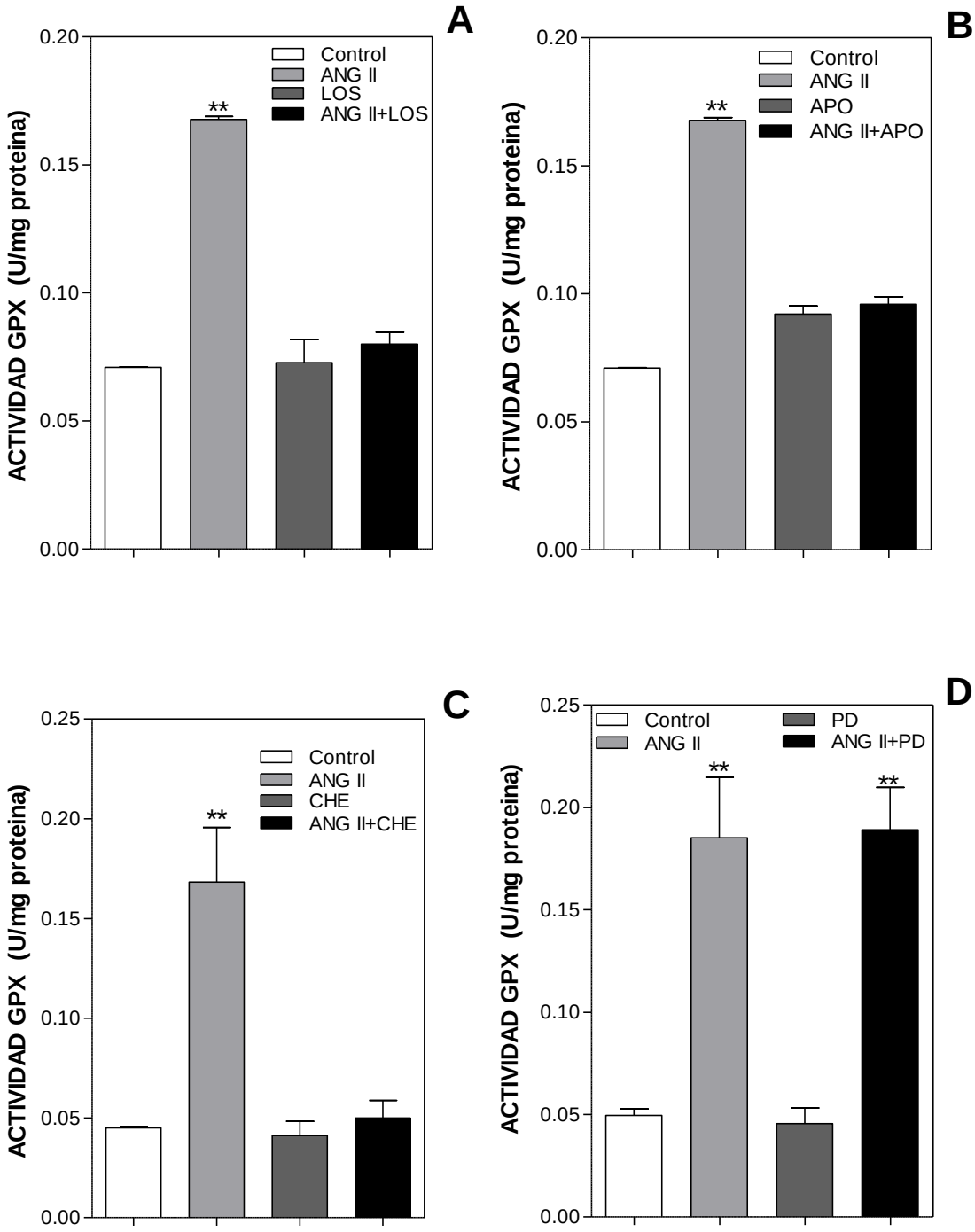


FIGURA 8. Efecto de LOS (10^{-6} M), la APO (10^{-4} M), la CHE (6,5 µM) y PD (10^{-6}M), sobre la actividad de la GPX estimulada por la ANG II (10^{-7} M) en el OSF de la rata. Los tejidos fueron incubados con o sin ANG II (10^{-7} M) durante 10 min. Cada barra representa la media ± E.E.M. de N=6-9 experimentos individuales. **p*<0,05; ***p*<0,01 comparado con el control.

Efecto de los inhibidores de la NAD(P)H oxidasa y la PKC y de los bloqueantes de los receptores AT_1 y AT_2, sobre la actividad CAT, SOD y GPX, estimulada por la ANG II en la MSR de la rata

Como se muestra en la figura 9, la incubación de la MSR de la rata con ANG II (10^{-7} M) incrementa de manera dependiente del tiempo y significativa la actividad de las enzimas antioxidantes SOD (mas 2 veces comparada con el grupo control), CAT (5 veces comparada con el control) y GPX (4 veces comparado con el grupo control). El pico máximo de actividad se observó a los 30 min (figura 9). Estos efectos fueron completamente inhibidos por la adición al medio de incubación del bloqueante del receptor AT_2, PD 123319 (PD, 10^{-6}M), el inhibidor de la NAD(P)H oxidasa, APO (10^{-4}M) y el inhibidor de la PKC, CHE (6,5 µM). Por el contrario, la actividad de las enzimas antioxidantes estimulada por la ANG II fue parcialmente potenciada por el losartán, como se muestra en las figuras 10A y 11A, (LOS, 10^{-6} M) (CAT: en 18% y SOD: en 33% cuando se comparan los grupos tratados con ANG II vs ANG II+LOS), ya que el incremento fue significativo para la actividad de la SOD, y en el caso de la CAT se observó una tendencia al incremento.

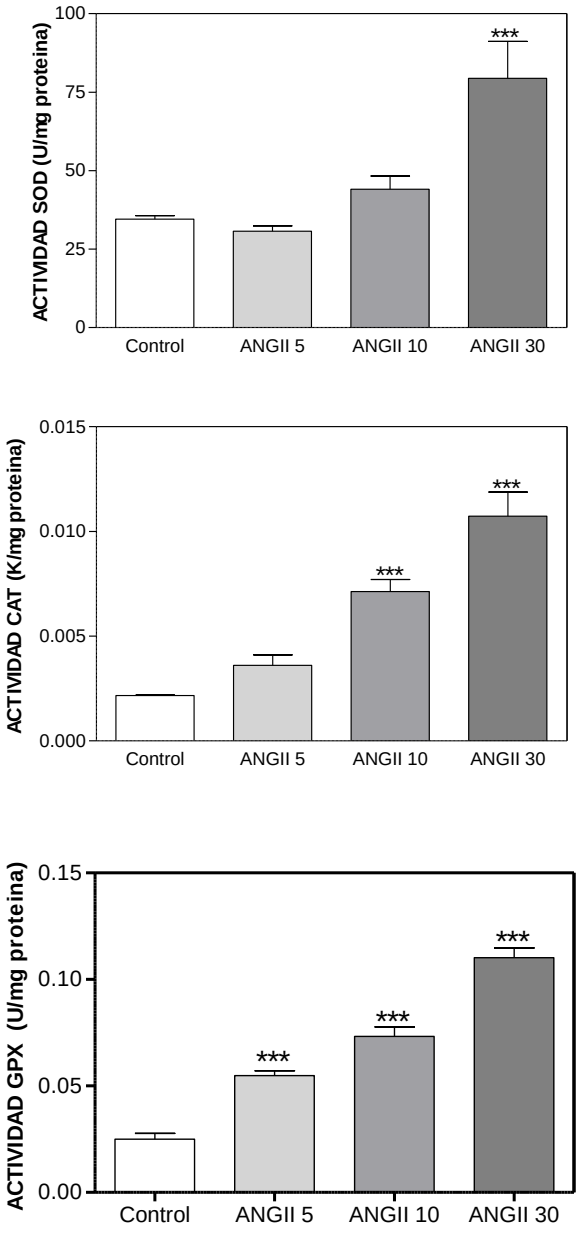


FIGURA 9 Efecto de la ANG II (10^{-7} M) sobre la actividad de las enzimas antioxidantes SOD, CAT y GPX en la MSR de la rata. Los tejidos fueron incubados con ANG II (10^{-7} M) durante 5, 10 y 30 min. El grupo control fue incubado sin ANG II. Cada barra representa la media $\pm$ E.E.M. de N=6-9 experimentos individuales. ***p<0,001 comparado con el grupo control.

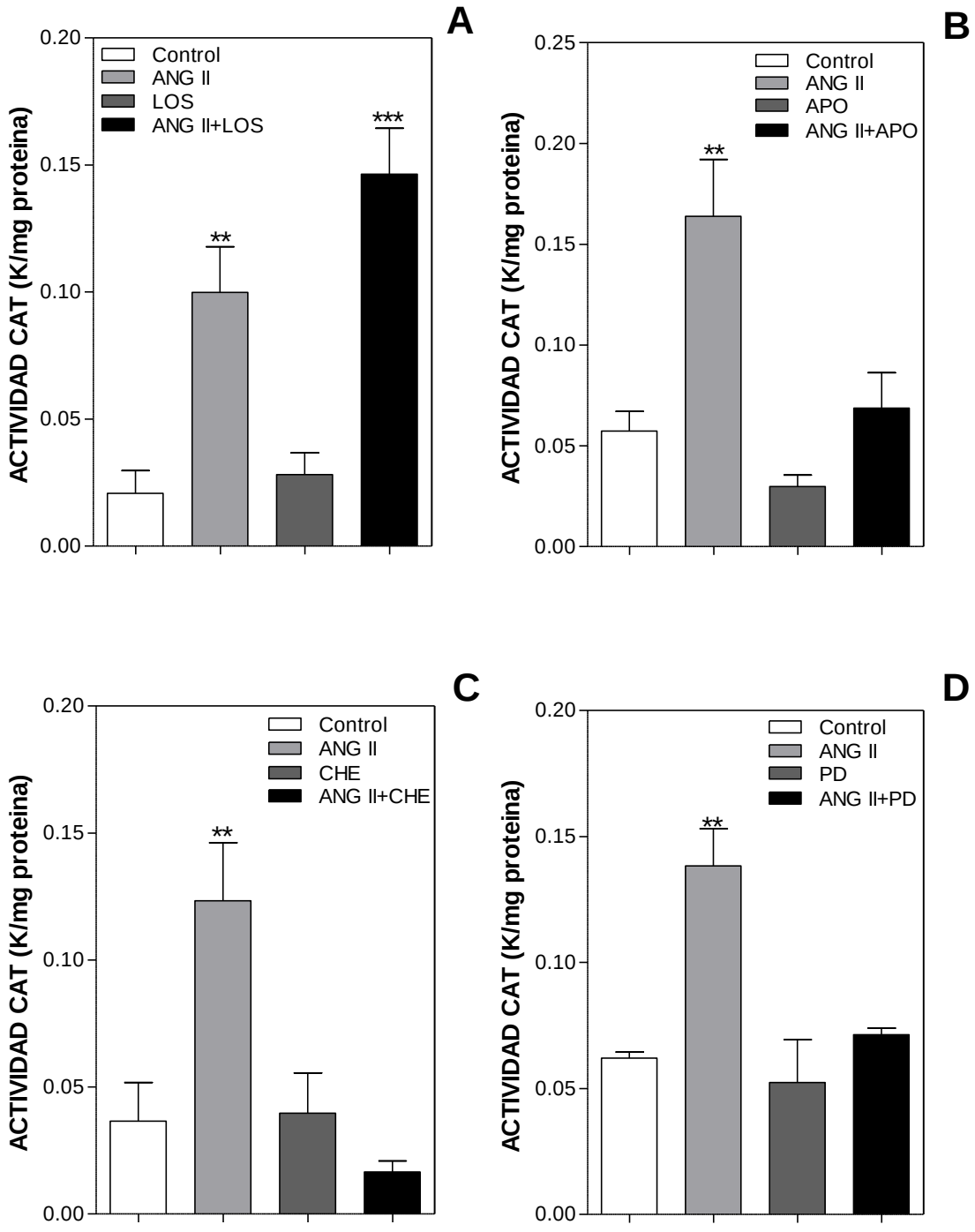


FIGURA 10. Efecto de LOS (10^{-6} M), la APO (10^{-4} M) y la CHE (6,5 µM) y PD (10^{-6}M), sobre la actividad de la CAT estimulada por la ANG II (10^{-7} M) en la MSR de la rata. Los tejidos fueron incubados con o sin ANG II (10^{-7} M) durante 30 min. Cada barra representa la media ± E.E.M. de N=6-9 experimentos individuales. **p*<0,05; ***p*<0,01; ****p*<0,001 comparado con el grupo control.

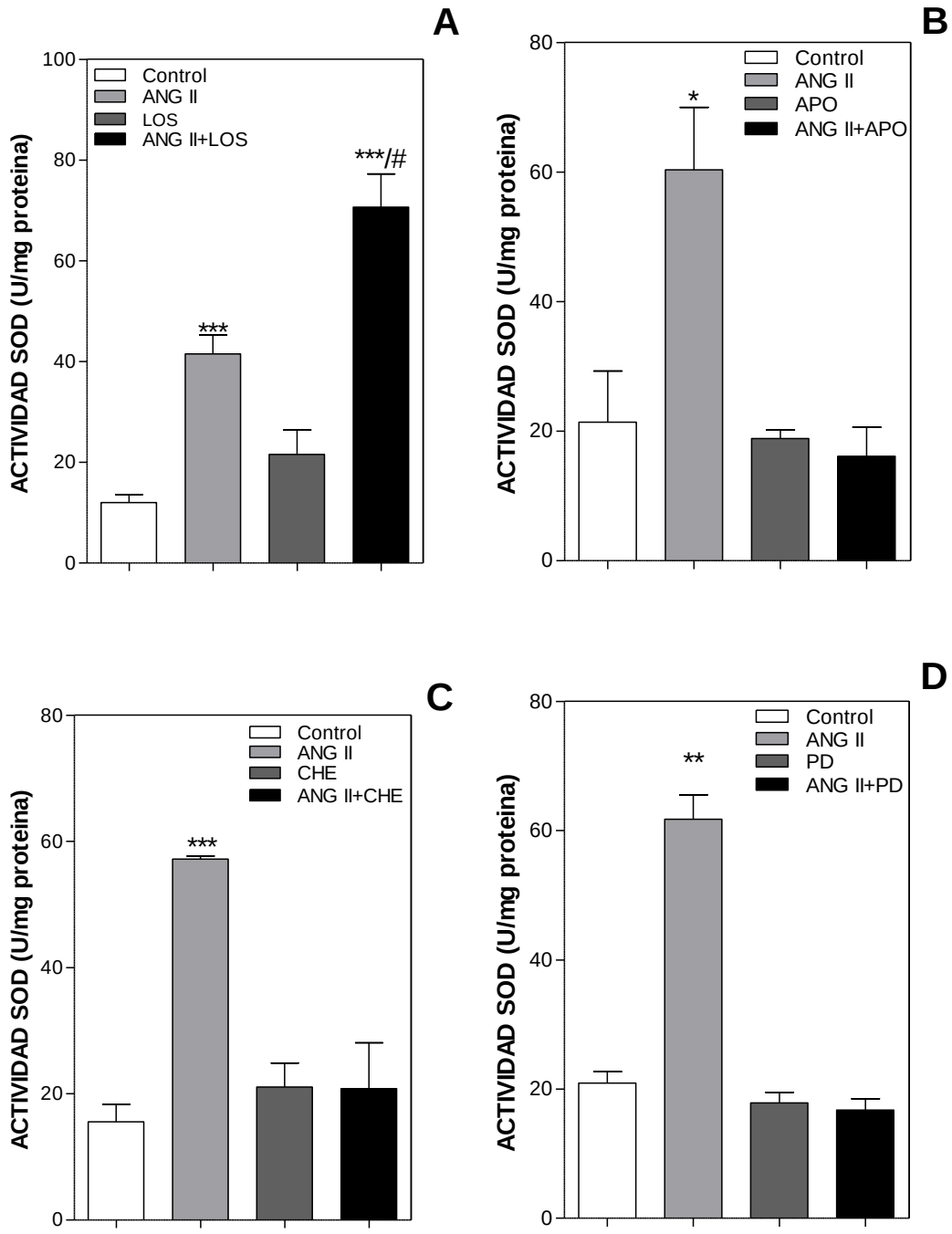


FIGURA 11. Efecto de LOS (10^{-6} M), la APO (10^{-4} M), la CHE (6,5 µM) y PD (10^{-6}M), sobre la actividad de la superóxido dismuta (SOD) estimulada por la ANG II (10^{-7} M) en la médula suprarrenal de la rata. Los tejidos fueron incubados con o sin ANG II (10^{-7} M) durante 30 min. Cada barra representa la media ± E.E.M. de N=6-9 experimentos individuales. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 comparado con el grupo control. #p<0,05 comparado con el grupo tratado con ANG II.

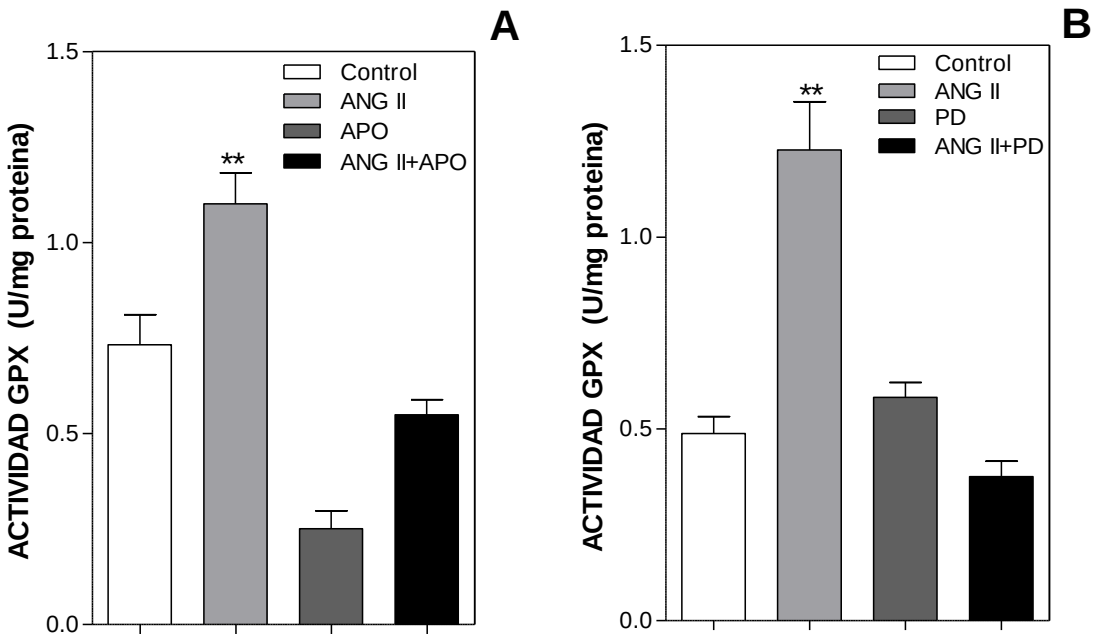


FIGURA 12. Efecto de la APO (10^{-4} M) y PD (10^{-6}M), sobre la actividad de la GPX estimulada por la ANG II (10^{-7} M) en la MSR de la rata. Los tejidos fueron incubados con o sin ANG II (10^{-7} M) durante 30 min. Cada barra representa la media $\pm$ E.E.M. de N=6-9 experimentos individuales. ***p*<0,01 comparado con el grupo control.

Efecto de la inhibición de la NAD(P)H oxidasa y el bloqueante de los receptores AT_1 y AT_2, sobre la expresión y activación inducida por la ANG II sobre las ERK 1/2 en el HIP de la rata

En la figura 13 se muestran 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 el control). La preincubación del hipotálamo con LOS (10^{-6} M), un antagonista selectivo del receptor AT_1, 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. El pretratamiento con PD123319 (10^{-6} M), bloqueante del receptor AT_2, produjo un mayor incremento en la activación de las ERK1/2 que la inducida por la ANG II sola. Los resultados del Western blot se expresan como la media ± E.E.M., normalizado con el control (*p<0,05 y **p<0,01 versus control).

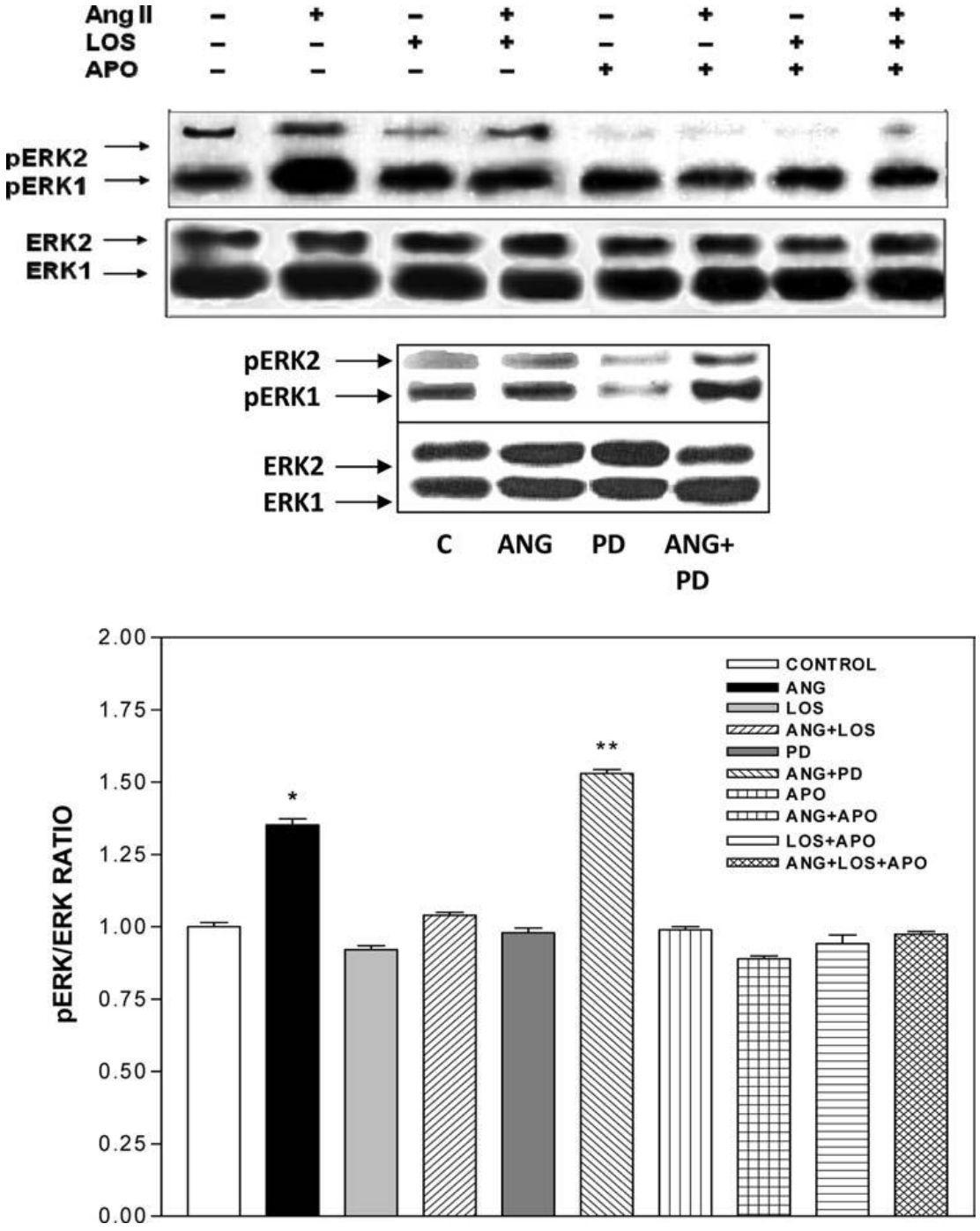


FIGURA 13. Efecto del LOS y el PD 123319 (10^{-6} M) y la APO (10^{-7} M) sobre la expresión y activación de ERK 1/2 inducida por la ANG II (10^{-7}M), en el hipotálamo de la rata. El panel superior muestra los resultados de los *inmunoblot* analizados e incubados con anticuerpos contra p-ERK y ERK. 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 y **p<0,01 *comparado* con el control (Silva y col., J Renin Angiotensin System, 11(4):234-242, 2010).

Modelo de estrés agudo: Efecto de la inmovilización forzada y el tratamiento *in vivo* con LOS sobre la presión arterial y la frecuencia cardiaca

En las figura 14A, podemos observar el efecto del estrés por INM sobre la presión arterial media (PAM), presión arterial sistólica (PAS) y presión arterial diastólica (PAD). En el grupo control, el estrés por INM produjo un incremento significativo en la PAM, PAS y PAD cuyos valores alcanzaron a 35 mmHg de incremento (figura 14A). El LOS no solo bloqueó la respuesta presora inducida por la INM, sino que desenmascara una respuesta vasodepresora (figura 14A). Con relación a la frecuencia cardiaca (FC), podemos observar que el estrés por INM aumentó la FC y el LOS no alteró la respuesta de la FC frente al estrés (figura 14B).

.

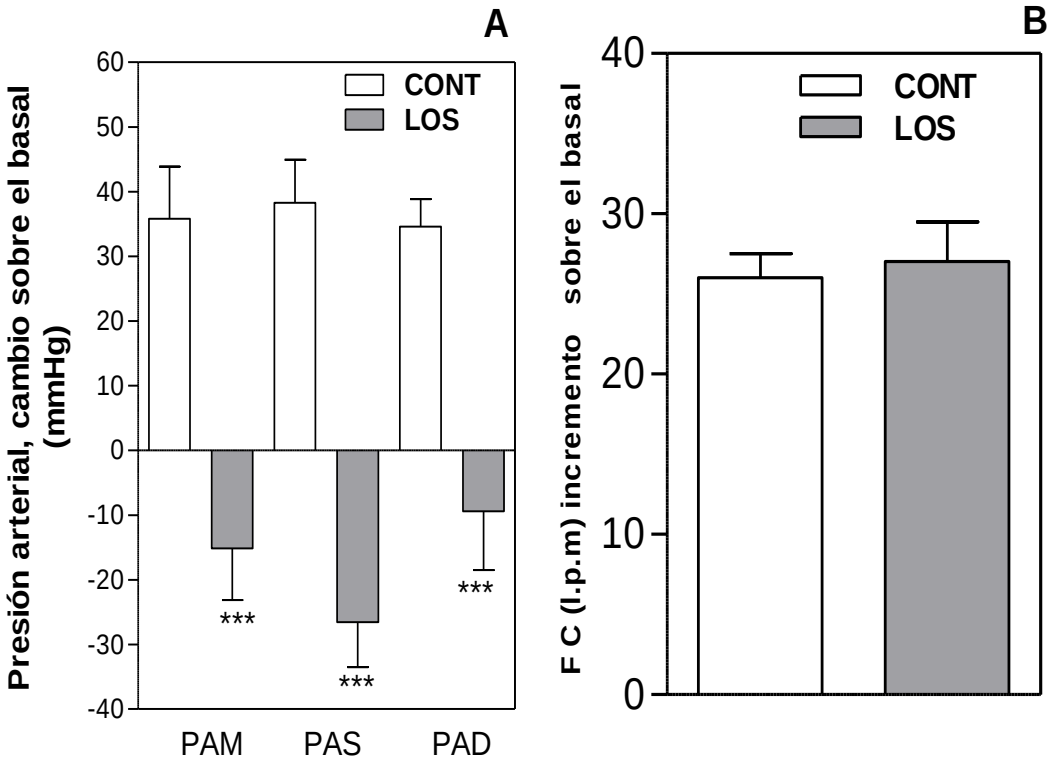


FIGURA 14. Efecto de LOS (50 mg, p.o.. por 15 días), sobre la respuesta cardiovascular inducida por la INM, en ratas *Sprague-Dawley*. PAM, presión sistólica (PAS) y presión diastólica (PAD) (panel A) y FC (Panel B). Los valores representan las medias ± E.E.M.; N= 10 por grupo; ***p<0,001 comparado con el grupo control.

Modelo de estrés agudo: Efecto de la inmovilización forzada y el tratamiento *in vivo* con LOS sobre las catecolaminas y corticosterona urinarias, 24 horas después del estrés

En las figuras 15 y 16 se muestra que la INM durante una hora, produce un incremento significativo en la excreción urinaria de norepinefrina y corticosterona. El tratamiento con LOS (50 mg/Kg por vía oral, por 15 días), bloqueó el incremento de la excreción urinaria de norepinefrina y corticosterona inducida por la INM (figuras 15A y 16). En relación a la liberación de epinefrina la INM no alteró la epinefrina urinaria (figura 15B).

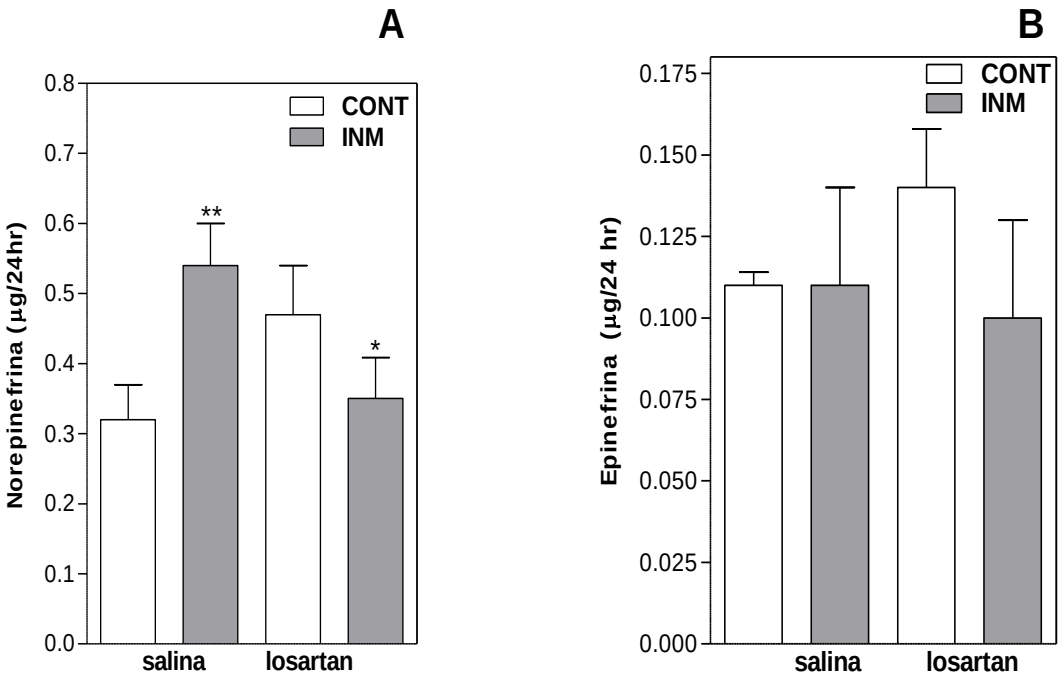


FIGURA 15. Efecto de LOS (50 mg/Kg, p.o., por 15 días) sobre la excreción urinaria de catecolaminas, en ratas *Sprague-Dawley*, sometidas a INM. Norepinefrina (panel A) y Epinefrina (Panel B). Los valores representan las medias ± E.E.M.; N= 5 por grupo; *p<0,05; **p<0,01 comparado con el grupo control.

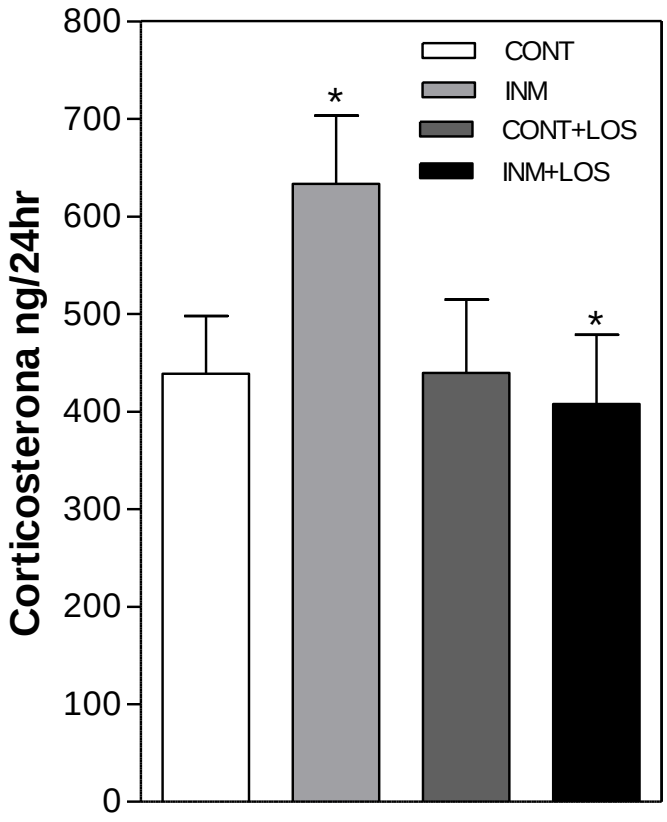


FIGURA 16. Efecto de LOS (50 mg/Kg, p. o., por 15 días) sobre la excreción urinaria de corticotesrona, en ratas *Sprague-Dawley* sometidas a inmovilización forzada. Los valores representan las medias ± E.E.M.; N= 6 por grupo; *p<0,05 comparado con el grupo control.

Modelo de estrés agudo: Efecto de la inmovilización forzada y el tratamiento *in vivo* con LOS, APO y TEM, sobre la actividad de las enzimas antioxidantes CAT, SOD y GPX, en el HIP de la rata

Como se muestra en la figura 17, la INM incrementa de manera significativamente la actividad de las enzimas antioxidantes SOD y CAT en más de 2 veces comparado con el grupo control y la GPX en casi 3 veces comparado con el grupo control, en el hipotálamo de la rata. Éste efecto fue completamente bloqueado por el tratamiento *in vivo* con LOS (50 mg/kg, p.o. por 15 días), APO (15 mg/kg, i.p., por 5 días) y TEM (20 mg/Kg, i.p., por 7 días).

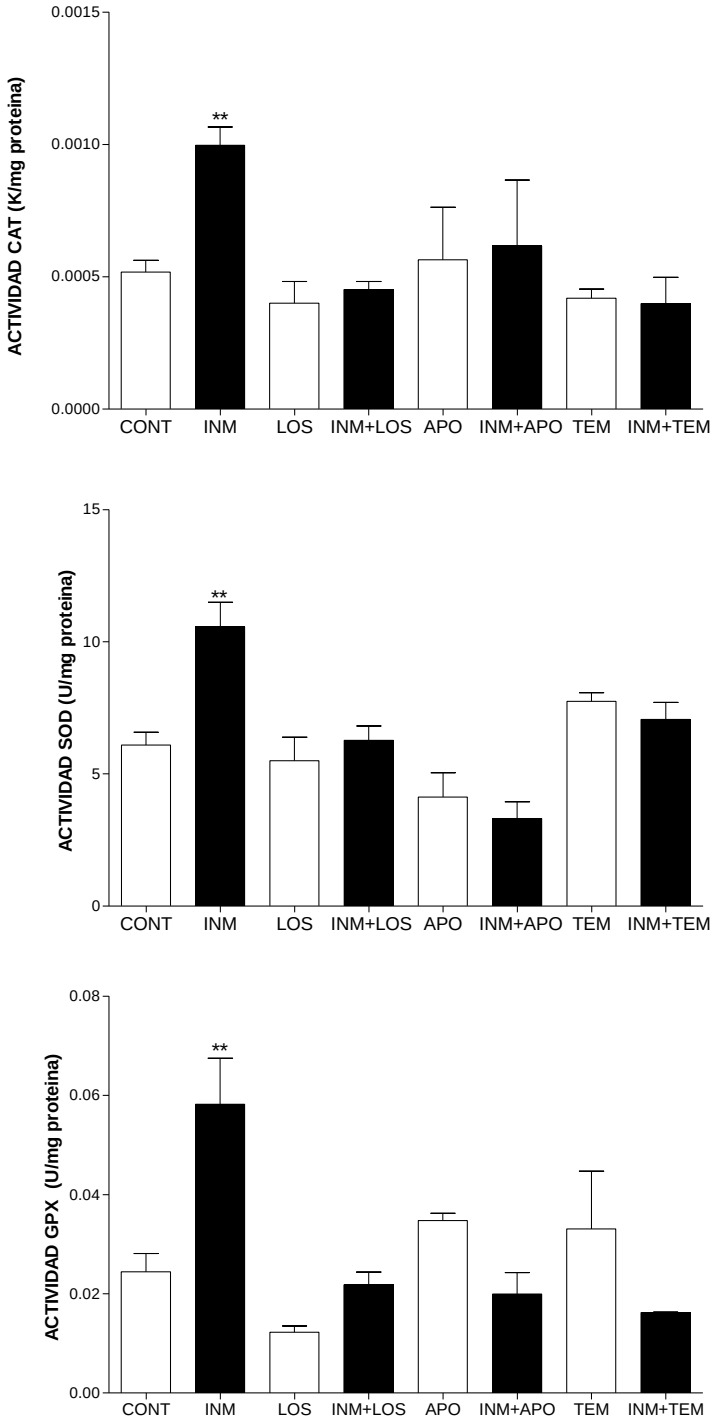


FIGURA 17. Efecto de la INM y de los diferentes tratamientos *in vivo* LOS (50 mg/kg, p.o., por 15 días); APO (15 mg/kg, i.p., por 5 días); TEM (20 mg/Kg, i.p., por 7 días) sobre la actividad de las enzimas antioxidantes CAT, SOD y GPX, en el HIP de la rata. Cada barra representa la media $\pm$ E.E.M. de N=6-9 experimentos individuales. ***p*<0,01 comparado con el grupo control.

Modelo de estrés agudo: Efecto de la inmovilización forzada y el tratamiento con LOS, APO y TEM, sobre la actividad de las enzimas antioxidantes CAT, SOD y GPX, en el OSF de la rata

Como se muestra en la figura 18, la INM incrementa de manera significativamente la actividad de las enzimas antioxidantes CAT y SOD en más de 2 veces comparado con el grupo control y la GPX en mas 3 veces comparado con el grupo control, en el OSF de la rata de manera similar a lo ocurrido en el HIP. Éste efecto al igual que en el HIP fue completamente bloqueado por el tratamiento *in vivo* con LOS (50 mg/kg p.o. por 15 días), APO (15 mg/kg, i.p., por 5 días) y TEM (20 mg/Kg, i.p., por 7 días).

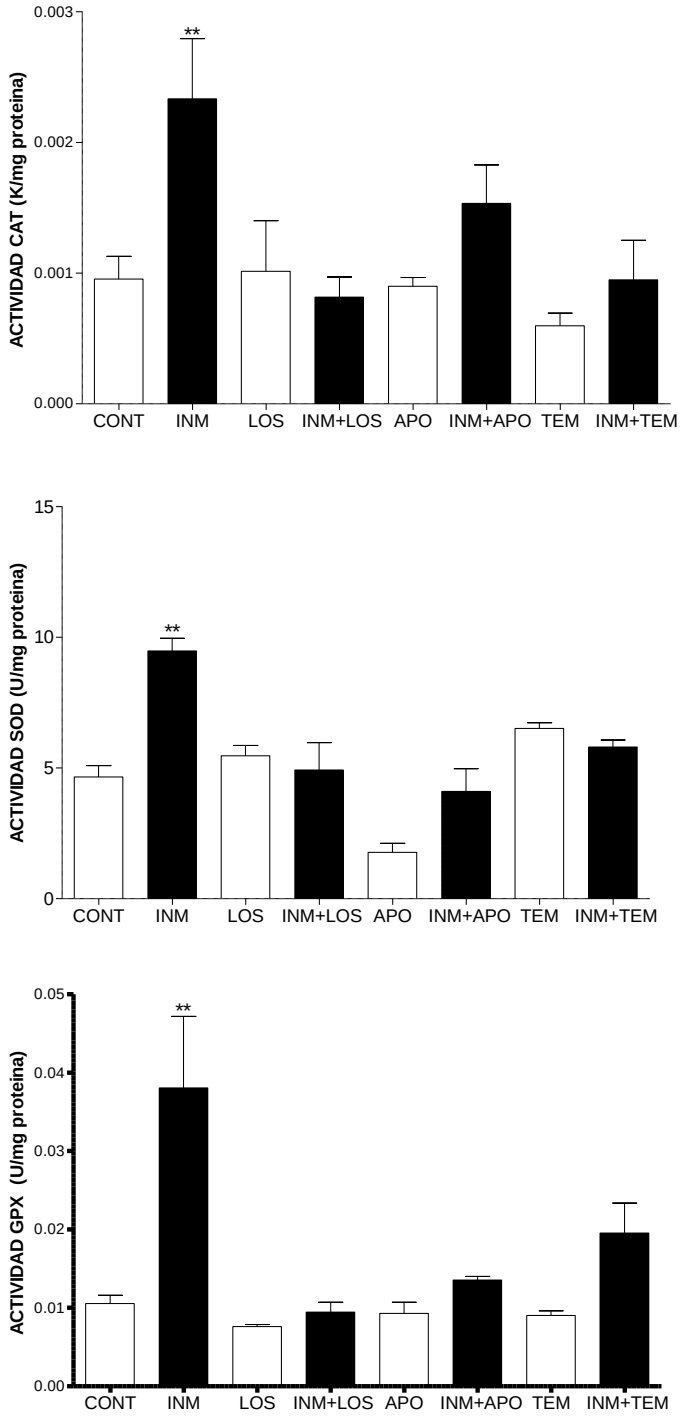
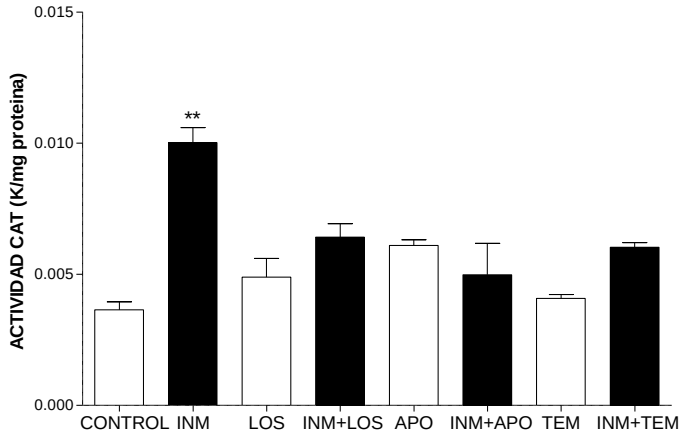
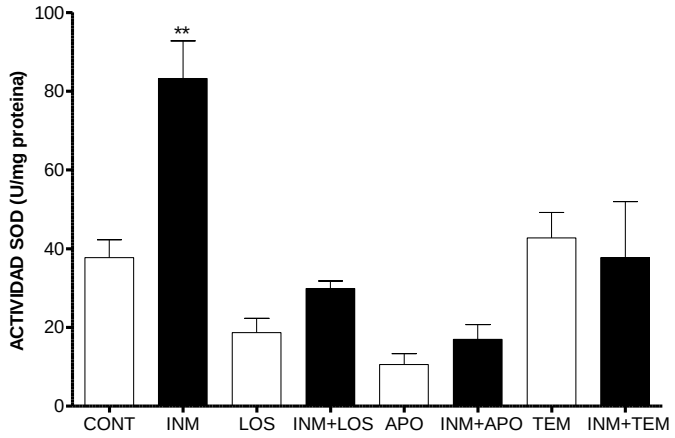


FIGURA 18. Efecto de la INM y los diferentes tratamientos *in vivo* LOS (50 mg/kg, p.o., por 15 días); APO (15 mg/kg, i.p., por 5 días); TEM (20 mg/Kg, i.p., por 7 días), sobre la actividad de las enzimas antioxidantes CAT, SOD y GPX, en el OSF de la rata. Cada barra representa la media ± E.E.M. de N=6-9 experimentos individuales. ***p*<0,01 comparado con el grupo control.

Modelo de estrés agudo: Efecto de la inmovilización forzada y el tratamiento *in vivo* con LOS, APO y TEM, sobre la actividad de las enzimas antioxidantes CAT, SOD y GPX, en la MSR de la rata

Como se muestra en la figura 19, la INM incrementa de manera significativamente la actividad de las enzimas antioxidantes CAT, SOD y GPX, en 2 veces comparado con el grupo control en la MSR de la rata. Éste efecto fue completamente bloqueado por el tratamiento *in vivo* con LOS (50 mg/kg, p.o., por 15 días), APO (15 mg/kg, i.p., por 5 días) y TEM (20 mg/Kg, i.p., por 7 días), de similar manera que en el HIP y el OSF.





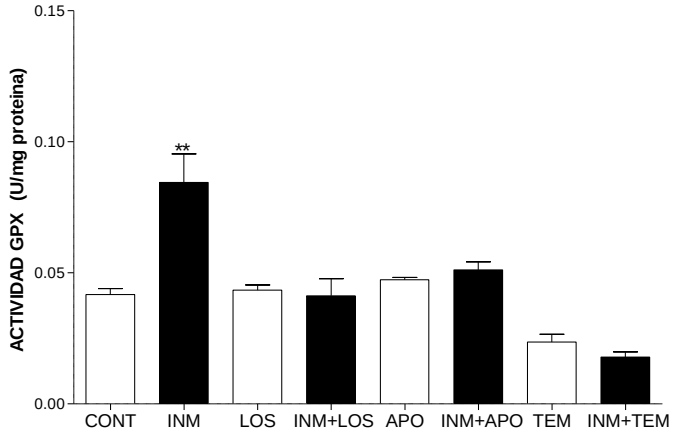


FIGURA 19. Efecto de la INM y los diferentes tratamientos *in vivo* LOS (50 mg/kg, p.o., por 15 díias); APO (15 mg/kg, i.p., por 5 días); TEM (20 mg/Kg, i.p., por 7 días), sobre la actividad de las enzimas antioxidantes CAT, SOD y GPX, en la MSR de la rata. Cada barra representa la media ± E.E.M. de N=6-9 experimentos individuales. ***p*<0,01 comparado con el grupo control.

Modelo de estrés crónico: Efecto del tratamiento *in vivo* con LOS, sobre la presión arterial y la frecuencia cardiaca en ratas Wistar Kyoto y SHR

Tal y como se observa en la figura 20, las ratas SHR presentan valores basales de PAM mayores que las de su control normotenso Wistar Kyoto (figura 20A). El tratamiento con LOS redujo de forma significativa la PAM de las ratas SHR a valores similares al del grupo Wistar Kyoto. Con relación a la FC, no se observa ninguna diferencia significativa entre las ratas SHR y Wistar Kyoto, y el tratamiento con LOS no demostró tener ningún efecto significativo (figura 20B).

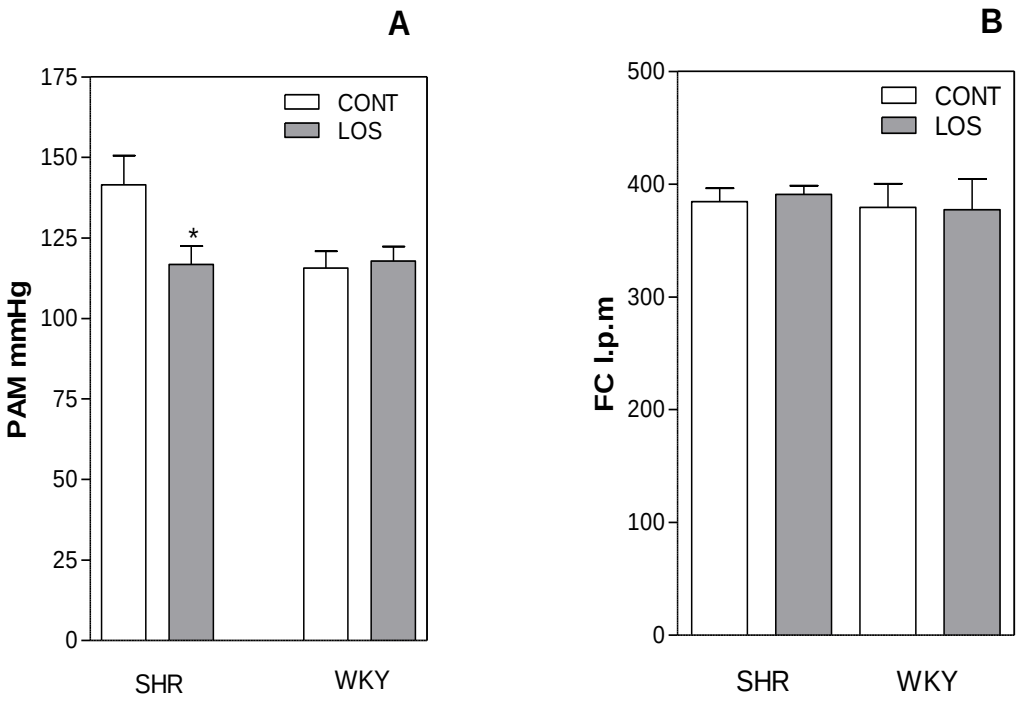


FIGURA 20. Efecto de LOS (50 mg/kg, p.o., por 15 días), sobre la PAM y la FC basal, en ratas espontáneamente hipertensas (SHR) y sus controles normotensos *Wistar Kyoto*. PAM (panel A) y FC (Panel B). Los valores representan las medias ± E.E.M.; N= 10 por grupo; *p<0,05 respecto al grupo control.

Modelo de estrés crónico: Efecto del tratamiento *in vivo* con LOS, APO y TEM, sobre la actividad de las enzimas antioxidantes CAT, SOD y GPX, en el HIP de las ratas Wistar Kyoto y SHR

En la figura 21 podemos observar que la actividad de las enzimas antioxidantes (CAT, SOD y GPX) incrementan de manera significativa en más de 2 veces en las ratas SHR comparadas con su grupo control (Wistar Kyoto), en el HIP de la rata. Éste efecto fue completamente revertido por el tratamiento *in vivo* con LOS (50 mg/kg, p.o., por 15 días), APO (15 mg/kg, i.p., por 5 días) y TEM (20 mg/Kg, i.p., por 7 días).

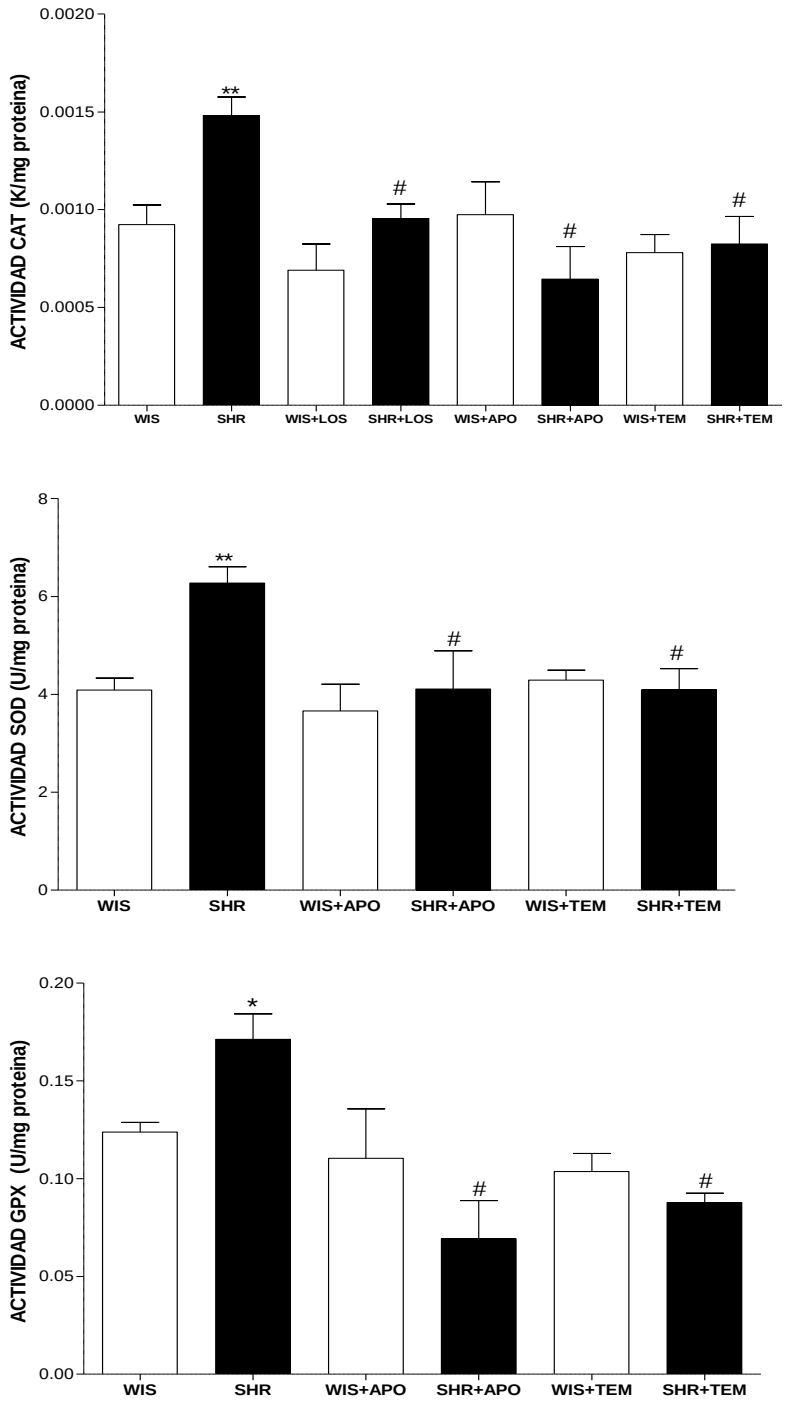


FIGURA 21. Efecto del tratamiento *in vivo* con LOS (50 mg/kg, p.o por 15 días); APO (15 mg/kg, i.p., por 5 días); TEM (20 mg/Kg, i.p., por 7 días), sobre la actividad de las enzimas antioxidantes CAT, SOD y GPX, en el HIP de ratas Wistar Kyoto y SHR. Cada barra representa la media ± E.E.M. de N=6-9 experimentos individuales. *p<0,05; **p<0,01 comparado con el grupo control. #p<0,01 comparado con el grupo SHR.

Modelo de estrés crónico: Efecto del tratamiento *in vivo* con APO y TEM, sobre la actividad de las enzimas antioxidantes CAT, SOD y GPX, en el OSF de las ratas Wistar Kyoto y SHR

Al observar la figura 22 podemos evidenciar que la actividad de las enzimas antioxidantes (CAT, SOD y GPX) incrementa de manera significativa, en casi 2 veces, en las ratas SHR comparadas con su grupo control (Wistar Kyoto), en el OSF de la rata. Éste efecto fue completamente revertido por el tratamiento *in vivo* con APO (15 mg/kg, i.p., por 5 días) para el caso de la SOD y GPX, y el TEM (20 mg/Kg, i.p., por 7 días) para la CAT y la SOD.

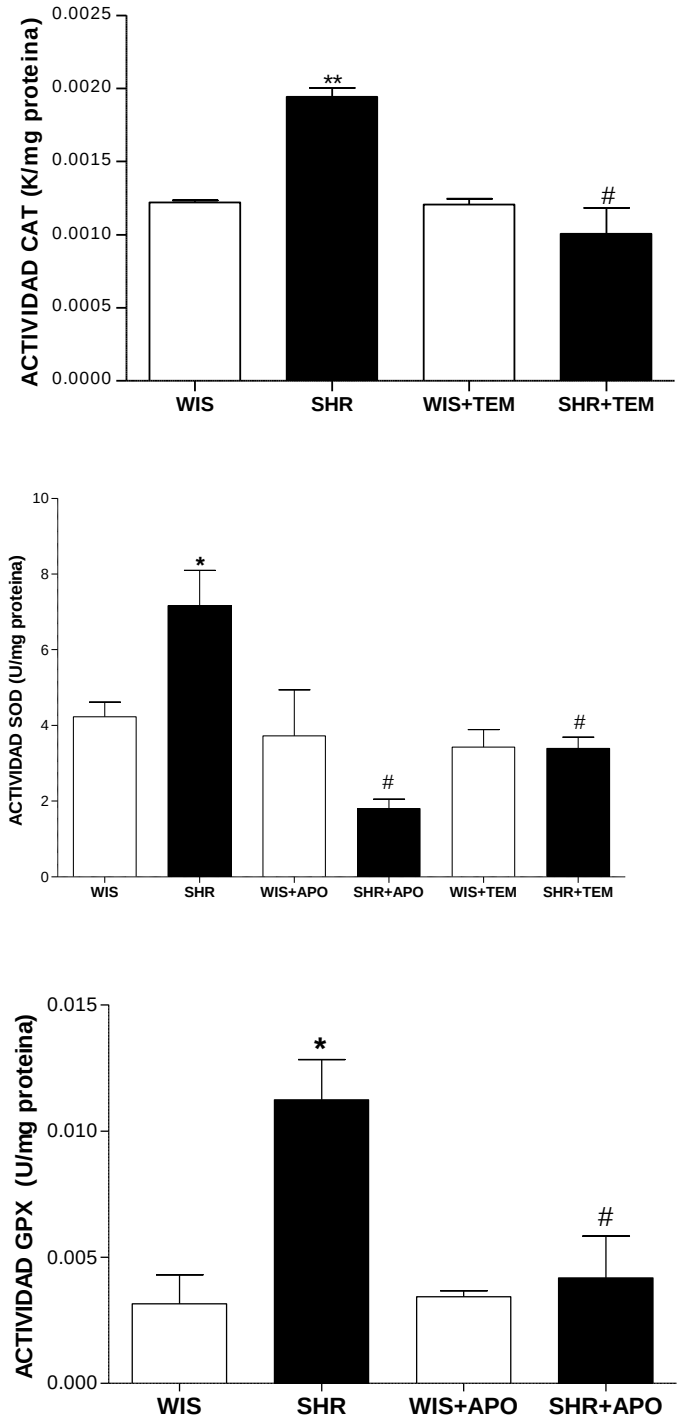


FIGURA 22. Efecto del tratamiento *in vivo* con APO (15 mg/kg, i.p., por 5 días); TEM (20 mg/Kg, i.p., por 7 días), sobre la actividad de las enzimas antioxidantes CAT, SOD y GPX, en el OSF de ratas Wistar Kyoto y SHR. Cada barra representa la media ± E.E.M. de N=6-9 experimentos individuales. **p*<0,05; ***p*<0,01 comparado con el grupo control. #p<0,01 comparado con el grupo SHR.

Modelo de estrés crónico: Efecto del tratamiento *in vivo* con APO y TEM, sobre la actividad de las enzimas antioxidantes CAT, SOD y GPX, en la MSR de ratas Wistar Kyoto y SHR

Como se muestra en la figura 23, la actividad de las enzimas antioxidantes (CAT, SOD y GPX) incrementa de manera significativa, en casi 2 veces, en las ratas SHR comparadas con su grupo control (Wistar Kyoto), en la médula suprarrenal de la rata. Éste efecto fue completamente revertido por el tratamiento con LOS (50 mg/kg, p.o., por 15 días), APO (15 mg/kg, i.p., por 5 días), y TEM (20 mg/Kg, i.p., por 7 días), para la CAT y SOD, y en el caso de la GPX solo se empleo APO (15 mg/kg, i.p., por 5 días) y TEM (20 mg/Kg, i.p., por 7 días).

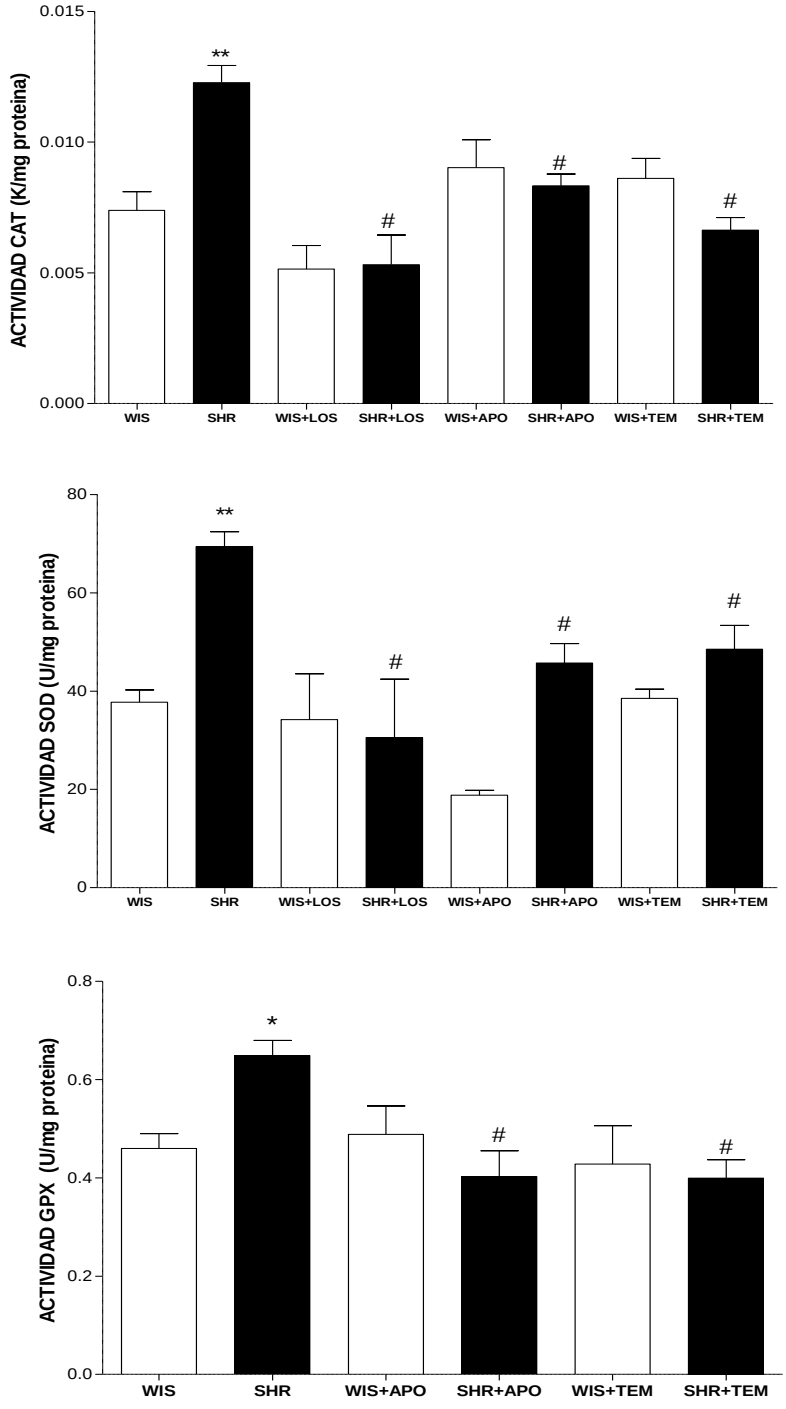


FIGURA 23. Efecto del tratamiento con LOS (50 mg/kg, p.o., por 15 días); APO (15 mg/Kg, i.p., por 5 días); TEM (20 mg/Kg, i.p., por 7 días), sobre la actividad de las enzimas antioxidantes CAT, SOD y GPX, en la MSR de ratas Wistar Kyoto y SHR. Cada barra representa la media $\pm$ E.E.M. de N=6-9 experimentos individuales. *p<0,05; **p<0,01 comparado con el grupo control. #p<0,01 comparado con el grupo SHR.

DISCUSIÓN

Papel de los receptores AT_1 y AT_2, la NAD(P)H oxidasa y la PKC, en la generación de ERO, en la cascada de señalización de la ANG II en el HIP y OSF de la rata: papel de las enzimas antioxidantes, CAT, SOD y GPX

Las ERO, tales como el anión superóxido ($O_2^{\cdot -}$) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), son moléculas producidas en varios tipos celulares y en oportunidades actúan como segundos mensajeros intracelulares en diversas células, entre las que se encuentran las células cardiovasculares y en el tejido nervioso. Aparte del origen mitocondrial, las ERO pueden ser producidas por enzimas tales como las xantino-oxidasa, la ciclo-oxigenasa, la lipo-oxigenasa, la sintasa de óxido nítrico, la hemo-oxigenasa, la peroxidasas, y la NAD(P)H oxidasa. El metabolismo de las ERO es coordinado por enzimas antioxidantes tales como la SOD, la cual mediante una dismutación produce ERO más estables como el H_2O_2, el cual es convertido a su vez a H_2O y O_2 por la acción de la CAT y la GPX (Griendling y col., 2000; Bobik 2003).

Las ERO se pueden producir por múltiples estímulos, tales como factores de crecimiento, hormonas, citokinas, radiación ultravioleta, incremento de la osmolaridad y otros estímulos estresantes. Actualmente se consideran a las ERO como segundos mensajeros intracelulares que se originan de la estimulación de una mezcla de receptores de membrana y que son capaces de activar proteínas kinasas intracelulares, muchas de las cuales promueven

múltiples respuestas celulares como la inflamación, el crecimiento, la diferenciación, entre los cuales se destacan el receptor epidérmico del factor del crecimiento, c-Src, p38 kinasa, MAPKs y la Ras. Estas cascadas activan factores de trascripción con papeles funcionales importantes en la fisiología y fisiopatología de células vasculares (Griendling y col., 2000; Ohtsu y col., 2005).

En el interior de las células, constantemente se están produciendo ERO, y estas pueden transfundir por la célula y actuar sobre blancos inespecíficos. Las ERO forman parte de diferentes cascadas de señalización en distintos sistemas y mientras se mantengan en concentraciones manejables por la célula, estas no inducen daño celular, sin embargo las ERO producidas por el estímulo de la ANG II son altamente reactivas (Suvara y col., 2001).

Existe evidencia experimental que permite establecer la relación entre la ANG II y las ERO en diferentes patologías como la hipertrofia del músculo liso vascular y la hipertensión inducida por la ANG II periférica (Griendling y col., 2000; Lv y col., 2012). Así, se ha demostrado en células aisladas de aorta provenientes de ratas *Sprague-Dawley*, que la hipertrofia del músculo liso vascular causada por la ANG II está mediada por ERO provenientes de la NAD(P)H oxidasa, y aunque el mecanismo no está todavía claro, se sabe que incluye la activación de la PKC, tirosinas kinasas, producción de fosfatidilinositol-3-kinasa, y la activación de la Rac, esta última una proteína G de bajo peso molecular (Seshiah y col., 2002).

De igual forma, la infusión de ANG II causa disfunción endotelial por el incremento de la actividad de la NAD(P)H oxidasa y con el consiguiente aumento de la producción del anión superóxido. La influencia de la ANG II sobre la expresión de las subunidades p22-phox**,** nox1, nox4, y gp91-phox ha sido estudiada, y se ha encontrado un aumento de la expresión de todas ellas, así como un incremento significativo de la actividad de la PKC, lo que conlleva a suponer que efectivamente la ANG II está vinculada en el músculo liso vascular a la producción del anión superóxido (Mollnau y col., 2002).

Reportes de la literatura indican que se ha identificado la presencia de los componentes de la NAD(P)H oxidasa en células en cultivo del SNC (Suzukawa y col., 2000) y algunas de las subunidades han sido localizadas en el cerebro de roedores (Serrano y col., 2003). Específicamente, se describe actividad NAD(P)H oxidasa en áreas selectas del SNC que participan en la regulación de la función cardiovascular, el eflujo simpático, el equilibrio hidromineral y la función neuroendocrina como lo son el OSF, el NTS, la RVLM y el HIP (Chan y col., 2005; Erdös y col., 2006; Wang y col., 2004; Zimmerman y col., 2004b).

Las ERO producidas a bajas concentraciones en el SNC se encuentran asociadas a funciones fisiológicas, especialmente las mediadas por la ANG II, como son la regulación cardiovascular, la ingesta de agua y la estimulación simpatoexcitatoria (Leiter y col., 2005; Erdös y col., 2006; Gao y col., 2004; Zimmermman y col., 2004a).

Aún cuando se reconoce el papel fundamental del SRA en la regulación cardiovascular, el mecanismo de señalización involucrado en la acción central de la ANG II, aún está por determinarse. Se ha establecido que las ERO tienen un papel importante como segundos mensajeros, en muchas de las acciones fisiológicas y fisiopatológicas de la ANG II circulante y en el SNC (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., 2011) 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 HIP y el tallo cerebral (Erdös 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 LOS (Zimmerman y col., 2002; Sun y col., 2005).

Aún más, los hallazgos demuestran que el anión superóxido actúa como una molécula de señalización intracelular dentro de la cascada de señalización de la ANG II, para la modulación de la presión arterial (Erdös 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 puede ser abolidos al inducir la sobre expresión de la SOD (Zimmerman y col., 2002). Así mismo, la administración ICV de un mimético de la SOD, el TEM, 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 HIP posterior en ratas normotensas (Gao y col., 2005; Campese y col., 2005; Lu y col., 2004).

Aun mas, numerosos estudios parecen indicar que los efectos de la ANG II sobre la presión arterial son mediados en el cerebro por neurotransmisión noradrenérgica (Sun y col., 2005). Así, se sabe que ciertas acciones centrales de la ANG II producen la liberación de norepinefrina desde neuronas catecolaminérgicas por un incremento de la actividad eléctrica neuronal. Se ha sugerido la participación del anión superóxido como una molécula señalizadora a nivel intracelular en la modulación de la actividad nerviosa simpática por parte de la ANG II.

Efectivamente, se ha demostrado que la sobre expresión de la Cu/Zn SOD empleando un adenovirus, redujo la simpatoexcitación en ratones con infarto al miocardio crónico, indicando que la estimulación del receptor AT_1 con la ANG II activa la salida simpática por estimulación de la NAD(P)H oxidasa y la producción de las ERO (Lindley y col., 2004). De igual forma, se demostró que la administración intracerebroventricular de ANG II incrementa la actividad simpática renal en conejos sanos y en mayor proporción, en los que se les ha inducido infarto al miocardio experimental e insuficiencia cardiaca crónica. Este

incremento del eflujo simpático estuvo asociado con un aumento de la producción de ERO en el RVLM y ambos efectos fueron abolidos con el tratamiento ICV con un bloqueante del receptor AT_1 como el LOS, un SOD mimético como el TEM y un bloqueante de la NAD(P)H oxidasa, la APO (Gao y col., 2004). Estos hallazgos apoyan la relación de la ANG II, su receptor AT_1 y las ERO, tanto en la regulación del eflujo simpático como en la simpatoexcitación en la insuficiencia cardiaca crónica.

Nuestros resultados *in vitro* van en esta misma línea de evidencias, demostrando que la ANG II es capaz de aumentar la actividad de las enzimas antioxidantes SOD, CAT y GPX, en el HIP y el OSF (figuras 1 y 5), y que este aumento en la actividad de las enzimas antioxidantes esta mediado a través del receptor AT_1 a nivel del SNC en el HIP y el OSF (figuras 2A-4A y 6A-8A), y desde que se conoce que la NAD(P)H oxidasa cataliza la reducción del oxígeno molecular a superóxido, el cual es convertido posteriormente a H_2O_2 por la SOD; y a su vez este último convertido en agua y oxigeno por acción de la enzima CAT o por la GPX (Babior, 1999), es plausible proponer que la NAD(P)H oxidasa está involucrada en la cascada de señalización del receptor AT_1 en las neuronas (Richards y col., 1999; Sumners y col., 2002), y por ende el subsecuente 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 de dos estructuras específicas del SNC como lo son el HIP y el OSF, con el inhibidor de la NAD(P)H oxidasa (APO), bloqueó completamente el efecto estimulatorio de la ANG II sobre la actividad de las enzimas

antioxidantes: CAT, SOD y GPX observado en las figuras 1 y 5 (figuras 2B-4B; 6B-8B). En este mismo sentido, mediante técnicas inmunohistoquímicas para detectar la inducción de la familia de c-fos, FosB, Fra1 y Fra2, se demostró que las neuronas de los NSO y NPV son crónicamente activadas durante el desarrollo de la insuficiencia cardiaca, que se refleja en un incremento de la expresión de c-fos, siendo el anión superóxido el que conduce la cascada señalizadora (Lindley y col., 2004). Aun más, se demostró que el incremento de la presión arterial inducido por la infusión crónica de ANG II se asocia con la elevación de los niveles del anión superóxido en el OSF, una estructura circunventricular localizada fuera de la barrera hematoencefálica y rica en receptores AT_1. La sobre expresión de la SOD empleando transfección viral selectiva para la SOD citosólica o mitocondrial en el OSF, previno el desarrollo de la hipertensión y el aumento en la producción de anión superóxido, inducido por la ANG II, lo que demuestra que el incremento de la producción intracelular del anión superóxido en el OSF es crítico en la desarrollo de la hipertensión inducida por ANG II (Zimmerman y col., 2004a). Aun mas, el desarrollo de la hipertensión en ratas SHR está asociado con la NAD(P)H oxidasa mediante la producción del anión superóxido en tejido vascular. Wang y col. (2004), usando la técnica de *patch clamp* en neuronas disociadas del NTS 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_1 y es abolido por la APO y el inhibidor peptídico de la secuencia del *docking* de la subunidad $gp91^{phox}$ de la NAD(P)H oxidasa. 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.

Estas evidencias y los resultados mostrados en el presente estudio (ver figuras 2B-4B; 6B-8B), permiten especular que regiones neuroanatómicas como el OSF, el RVLM y el HIP constituyen blancos de acción periférica y central relacionados con la generación de ERO inducidas por la ANG II, y por ello el estrés oxidativo podría ser el responsable de la modulación que ejercen estas estructuras sobre el control de la presión arterial y el metabolismo hidromineral. En apoyo a esto están el hecho que las acciones fisiológicas que media la ANG II en el sistema nervioso central se encuentran relacionadas con las ERO y la estimulación de la NAD(P)H oxidasa ya que la respuesta presora, bradicárdica y dipsogénica inducida por la ANG II son abolidas por la sobre-expresión de la isoforma de la proteína Rac1 dominante-negativa (carente), mientras que dicha respuesta es incrementada con la sobre-expresión de la Rac1 del ratón salvaje (Zimmerman y col., 2002). De igual manera, la respuesta presora y dipsogénica es también bloqueada mediante la administración ICV de gp91ds-tat, un inhibidor de la NAD(P)H oxidasa (Sun y col., 2005). Adicionalmente, el incremento de la producción de superóxido dependiente de la NAD(P)H oxidasa, así como la tasa de disparo de las neuronas en cultivos neuronales de HIP y tallo cerebral inducido por la ANG II fueron atenuados mediante el uso de la gp91ds-tat (Sun y col., 2005), la APO, un compuesto que inhibe el ensamblaje de la subunidad p47phox de la NAD(P)H con el complejo de la enzima unido a la membrana y por el TEM, un SOD mimético (Erdös y col., 2006).

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), esta enzima, también participa en la cascada de señalización de 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^{+2} (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 ANG II también es capaz de inhibir las corrientes de K^+ en las neuronas aumentando la tasa de descarga (Sun y col., 2005).

En efecto, en cultivos de neuronas hipotalámicas y del tallo cerebral provenientes de ratas recién nacidas, la administración de ANG II produce cambios de polaridad en la membrana, generando potenciales de acción a través de la estimulación del receptor AT_1 (Sun y col., 2002; Wang y col., 1997a), estos cambios son generados por el incremento de las corrientes de calcio (I_{Ca}), la disminución de las corrientes de potasio voltaje dependiente $(I_{Kv})^-$ y las corrientes de potasio del tipo-A (I_A) K^+ (Wang y col., 1997b), todo ello asociado a un incremento en la actividad neuronal PKC (Sumners y col., 1996; Wang y col., 1997a,b).

También se ha demostrado que la estimulación del receptor AT_1 neuronal mediante la ANG II activa a la proteína kinasa 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_{kv}) neuronal (Sumners y col., 2002). Se han 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).

Si esto es así, la inhibición de la PKC con un inhibidor específico como la CHE debería tener efecto sobre la estimulación de la actividad de las enzimas antioxidantes inducida por la vía AT_1/NAD(P)H oxidasa. Nuestros resultados apoyan esta posibilidad (ver figuras 2C-4C; 6C-8C). Así, la preincubación del tejido hipotalámico y del OSF con CHE un inhibidor de la PKC, produjo la completa inhibición del incremento de la actividad de las enzimas antioxidantes CAT, SOD y GPX inducida por la ANG II *in vitro*. Nuestros resultados *in vitro* validan las observaciones *in vivo*. En efecto, se ha demostrado que el inhibidor específico de la PKC-α, el Go-6976, atenúa la respuesta dipsogénica de la ANG II vía ICV (Fleegal y Sumners, 2003) y la CHE, bloquea completamente la acción natriurética y kaliurética de la ANG II administrada centralmente (Israel y col., 2009).

Aun cuando el mecanismo íntimo no ha sido establecido, estos hallazgos permiten inferir que en el SNC específicamente en el HIP y OSF de la rata, la activación de los receptores AT_1, acoplados a proteínas G, conlleva a la estimulación de la proteína kinasa C-α 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). Alternativamente, la ANG II estimularía la vía de señalización del receptor AT_1/NAD(P)H oxidasa, produciéndose aniones superóxido a partir del oxígeno molecular, este a su vez estimula a la fosfolipasa C que a su vez estimulan a la PKC (Erdös y col., 2006). Finalmente esta última enzima estimularía a la proteína kinasa dependiente de la formación del complejo calcio-calmodulina, liberándose entonces una serie de neurotransmisores responsables de numerosos efectos fisiológicos.

Tal y como describimos anteriormente, la evidencia apoya que el mecanismo molecular que subyace en la señalización de la ANG II a través del receptor AT_1 implica a la cascada de la NAD(P)H. Sin embargo se desconoce acerca del potencial papel del receptor AT_2 en este proceso en el tejido cerebral. Al respecto, en el HIP se ha descrito la presencia de ambos subtipos de receptores, AT_1 y AT_2 (Reagan y col., 1994), por lo que se plantea la posibilidad de efectos opuestos o contrarregulatorios de estos subtipos de receptores hipotalámicos.

Nuestros resultados sugieren efectivamente esta posibilidad ya que, el bloqueo del receptor AT_2 con PD 123319 resultó en una potenciación del efecto de la ANG II endógena mediada por el receptor AT_1, la cual se manifestó con un

aumento en la actividad de las enzimas antioxidantes CAT, SOD y GPX inducida por la ANG II *in vitro,* (ver figuras 2D, 3D y 4D). Es decir que el bloqueo del receptor AT_2 desenmascaró un efecto contrarregulatorio del receptor AT_2 sobre el incremento de la actividad de las enzimas antioxidantes inducidas por la ANG II.

Estos resultados proporcionan evidencia que los receptores AT_1 y AT_2 a nivel hipotalámico, afectan la generación de ERO de una forma opuesta y sugieren un papel contrarregulatorio del receptor AT_2 en dicha función. Tales resultados fueron descritos previamente en la formación de anión superóxido endotelial (Sohn y col., 2000) y sobre la acción antidiuretica inducida por la angiotensina II administrada centralmente (Israel y col., 2009). Efectivamente, Nouet y Nahmias (2000), mediante técnicas de ingeniería genética, utilizando una cepa de ratones carentes del gen que codifica para el receptor AT_2, demostraron el efecto regulador negativo de este receptor a las acciones del receptor AT_1 sobre funciones cardiovasculares, renal y central así como en procesos de desarrollo (Hein y col., 1995, Siragy y col., 1999).

Es conocido que los receptores AT_1 juegan un papel crítico, en relación a la información proveniente de la ANG II circulante y que los receptores AT_2 pueden estar involucrados en el procesamiento central de las aferencias viscerales y endocrinas, en la coordinación de la respuesta fisiológica. Al respecto se sabe que la ANG II participa en la regulación de las neuronas magnocelulares del NSO y del NPV hipotalámico las cuales liberan oxitocina y vasopresina (Qadri y col., 1992). Se ha demostrado que la dipsogenia y la liberación de oxitocina y

vasopresina inducida por la ANG II, está regulada por ambos subtipos de receptores (Hogarty y col., 1992; Jensen y col., 1992). Este efecto es bloqueado por la administración del antagonista AT_1 LOS y al contrario fue potenciado por el tratamiento con el antagonista del receptor AT_2, el PD123319 (Höhle y col., 1995).

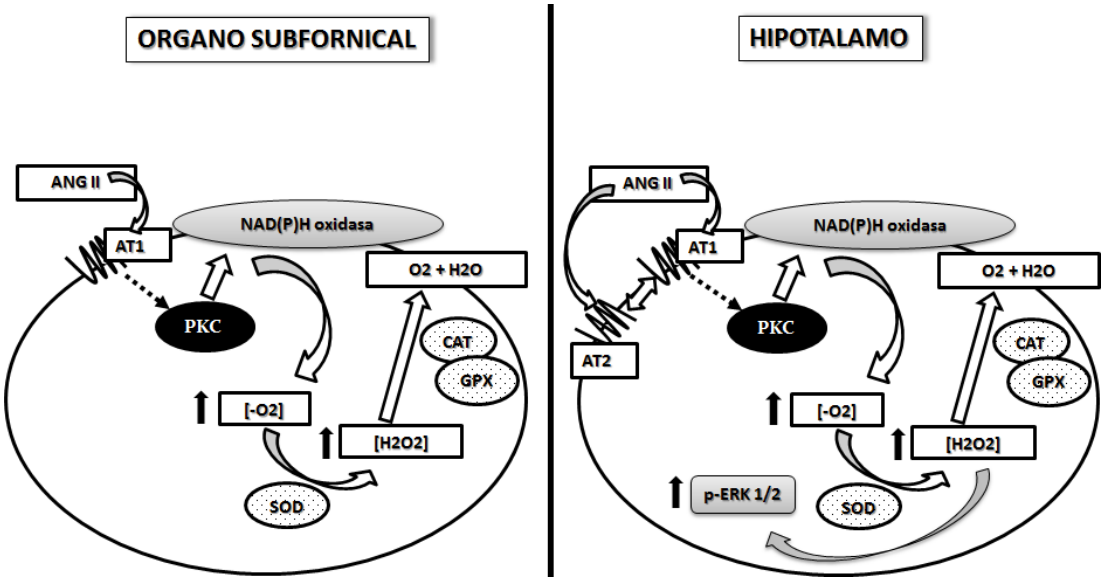
Nuestros resultados muestras que el efecto contrarregulatorio inducido por el receptor AT_2 sobre la actividad de las enzimas antioxidantes inducida por la ANG II, estuvo ausente en el OSF (ver figuras 6D, 7D y 8D). Este hallazgo era de esperar ya que esta estructura no expresa receptores AT_2. El OSF se encuentra altamente vascularizado, con grandes espacios perivasculares y endotelio con capilares fenestrados, siendo una de las estructuras circunventriculares, idealmente situada para cumplir un papel primordial como sensor tanto para la información sistémica como para la central (Landas y Phillips, 1987), además de presentar un extenso número de receptores para péptidos y neurotransmisores como la ANG II. La microinyección de ANG II, en el OSF, produce una respuesta presora importante, bradicardia y dipsogenia. Además, la ANG II circulante se une a estructuras circunventriculares como el OSF incrementando la concentración plasmática de vasopresina asociada a un incremento en la descarga de frecuencia de neuronas vasopresinérgicas y oxitocinérgicas. Adicionalmente, se ha demostrado efectos excitatorios de la ANG II sobre neuronas del OSF que proyectan al NPV, con un incremento paralelo en la presión arterial sistémica (Qadri y col., 1992). Estas acciones son bloqueadas por el LOS, lo que apoya que estos efectos son mediados a través del receptor AT_1, que se encuentra ampliamente expresado en esta estructura (Mangiapane y

Simpson 1980, Lenkei y col., 1995). Nuestros resultados apoyan el concepto que las acciones de la ANG II en el OSF están mediados por la cascada de señalización que involucra a el receptor AT_1/la NAD(P)H oxidasa y el consecuente incremento de las enzimas antioxidantes.

Estudios realizados en la última década, han 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., 1996). Y que de las ERO, el H_2O_2 juega un importante papel como segundo mensajero en la activación de las vías asociadas a las ERK1/ERK2, en diferentes patologías (Chan y col., 2005; Silva y col., 2010). 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 APO, y el bloqueante del receptor AT_1 LOS, no solo 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 (ver figura 13). Estos datos sugieren que las ERO producidas por la NAD(P)H oxidasa y la estimulación del receptor AT_1 contribuyen a la activación de las ERK en el HIP de forma similar a lo reportado en el músculo liso vascular. En relación al SNC, Chan y col. (2005) demostraron que la inyección de ANG II en el RVLM incrementa la fosforilación de las ERK 1/2 y la p38 MAPK, pero no la JNK. La inhibición de la NAD(P)H oxidasa con difenileneiodonio (DPI) abolió la producción de ERO inducida por la ANG II, así como la fosforilación de las ERK y la hipertrofia del músculo liso vascular (Chan y col., 2005; Shanmugam y col., 2011). Al respecto, se ha propuesto al

H_2O_2 como el posible mediador de la estimulación del las ERK, ya que se ha demostrado en células NIH 3T3 que las ERK representan las principales MAPKs sensibles a las reacciones redox (Guyton y col., 1996) y que en las células HeLa, el H_2O_2 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).

Por otra parte, nuestros resultados en los que se demuestra que el bloqueo del receptor AT_2 hipotalámicos con PD 123319 potencia la fosforilación de las ERK1/2, apoyan el concepto de un efecto contrarregulatorio de este receptor sobre la acción del receptor AT_1 en la activación de las ERK1/2.



Esquema 1. Vías de señalización de la ANG II a nivel del OSF y el HIP de la rata: Sistema antioxidantes

Papel de los receptores AT_1 y AT_2, la NAD(P)H oxidasa y la PKC, en la generación de ERO, en la cascada de señalización de la ANG II en la MSR de la rata: papel de las enzimas antioxidantes, CAT, SOD y GPX

En contraste a los efectos mediados por el receptor AT_1, poco se conoce acerca del papel funcional y las vías de las señales de transducción asociadas con el receptor AT_2. Se ha postulado que el receptor 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 AT_2 se encuentra altamente expresado en el feto durante el desarrollo (Grady y col., 1991), mientras que en el adulto el receptor AT_2 se encuentra confinado en áreas restringidas de algunos órganos como el cerebro, el útero y en los miocitos cardiacos (Nio y col., 1995; y col., Obermuller y col., 1991; Tsuzuki y col., 1994). De igual manera, podemos encontrar al receptor AT_2 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 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 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 MSR, efecto que es mediado por el receptor AT_1 y el incremento de la producción de fosfoinositidos (Wong y col., 1990; Dendorfer y col., 1998; Israel y col., 1995). Al respecto, Wong y colaboradores en 1990, demostraron que la ANG II a través del receptor AT_1 es capaz de liberar catecolaminas desde la MSR. Este efecto parece estar mediado por la activación del receptor AT_1 asociada a la activación de la fosfolipasa C y la subsecuente formación de IP_3 y la liberación del Ca^{2+} desde sus depósitos hacia el citoplasma (Israel y col., 1995). Sin embargo, existen evidencias que demuestran que la estimulación del receptor AT_2 con ANG II o con CGP 42112 (agonista del receptor AT_2), también produce la liberación de catecolaminas desde la MSR (Belloni y col., 1998), ya que este efecto fue inhibido por el PD 123319 (antagonista del receptor AT_2), pero no por el LOS (antagonista del receptor AT_1).

Aun mas, se ha demostrado en la MSR, 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_1 y AT_2 ejercen un control tónico de la síntesis y secreción de NE en la MSR (Armando y col., 2004). Estos efectos sinergísticos funcionales y regulatorios de los receptores de ANG II, no concuerdan con la propuesta de un papel contraregulatorio de los receptores AT_1 y AT_2 en otras funciones de la ANG II. Sin embargo, no se puede descartar que estas

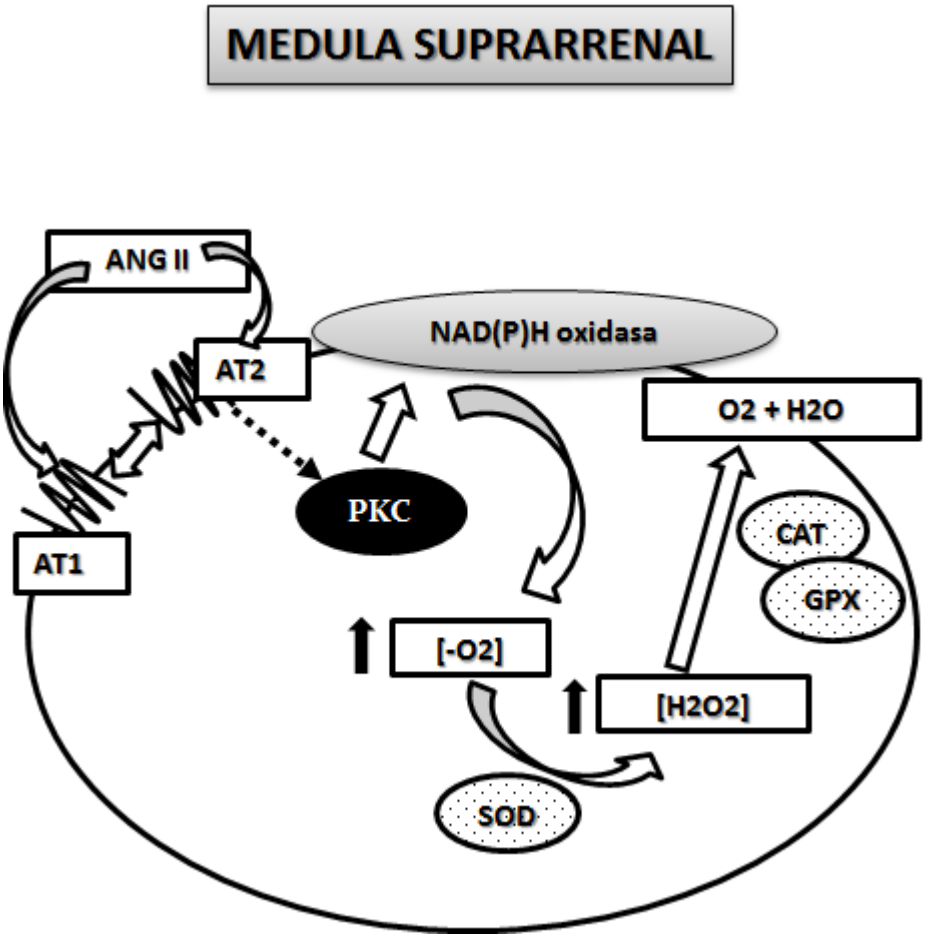
acciones sinérgicas estén asociadas a mecanismos de contrarregulación en la señalización “aguas abajo” que resultaría en una misma acción funcional.

En los tejidos periféricos, el $O_2\cdot^-$ producido por la estimulación del receptor AT_1 por la ANG II, es convertido en H_2O_2 por la SOD, y a su vez este último convertido en agua y oxigeno por acción de la CAT o la GPX (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 están involucradas en la cascada de señalización del receptor AT_1 en las neuronas (Richards y col., 1999; Sumners y col., 2002). Se desconoce si el receptor AT_2 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 MSR demuestran, por primera vez, que la ANG II es capaz de estimular a las enzimas antioxidantes: SOD, CAT y GPX (ver figura 9) y que esta estimulación esta mediada por el receptor AT_2 (ver figuras 10D-12D). Adicionalmente la estimulación de las enzimas antioxidantes por parte de la ANG II en la MSR es a través de la activación de la NAD(P)H oxidasa (ver figura 10B-12B). En efecto, la preincubación de la MSR con un desacoplante del ensamblaje de la NAD(P)H oxidasa como es la APO, o con un bloqueante especifico del receptor AT_2 como lo es el PD123319, inhibe completamente el efecto estimulatorio de la ANG II sobre la actividad de las enzimas antioxidantes: CAT, SOD y GPX. 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_2/NAD(P)H oxidasa.

Por otro lado, el bloqueo del receptor AT_1 *in vitro* en la MSR con LOS, resultó en una potenciación de la actividad, de dos de las tres enzimas antioxidantes medidas (CAT y SOD), como se muestra en las figuras 10A y 11A, sugiriendo la existencia de una señalización antagónica o contrarregulatoria entre ambos subtipos de receptores. Este antagonismo en la capacidad de la ANG II de inducir la formación de anión superóxido ha sido reportado previamente, pero en sentido opuesto, en las células endoteliales (Sohn y col., 2000), en el HIP (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 Takekosh y colaboradores (2002) en cultivo de células cromafines de la MSR de porcino, por lo que este sería un hallazgo inédito y novedoso sobre la generación de ERO en la MSR de la rata.

También en este mismo sentido, 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_1 neuronal por la ANG II activa a la PKC y a la proteína kinasa 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_{kv}) neuronal (Sumners y col., 2002). Se han 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 muestran, por primera vez, la posible participación de una PKC en la señalización asociada a la cascada de la NAD(P)H oxidasa vía receptor $AT_{2,}$ en un tejido nervioso como lo es la MSR de la rata. Así, la preincubación del tejido de la MSR con CHE 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* (ver figuras 10C y 11C). En apoyo a estas acciones *in vitro*, la evidencia *in vivo* indica que el inhibidor específico de la PKC-α, el Go-6976, atenúan la respuesta dipsogénica de la ANG II vía 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_2, conlleva a la estimulación de la PKC y la modulación de de la actividad de las células cromafines.



Esquema 2. Vías de señalización de la ANG II a nivel de la MSR de la rata: Sistema antioxidantes

Papel de la ANG II en la generación de ERO durante el estrés agudo en el HIP, OSF y MSR de la rata: papel de las enzimas antioxidantes CAT, SOD y GPX

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 y la frecuencia cardiaca. Este efecto de la respuesta simpática inducida por el estrés que se manifiesta en la circulación sistémica mediante un abrupto incremento de la presión arterial y la frecuencia cardiaca, se conoce como reactividad cardiovascular.

La regulación central de la reactividad cardiovascular frente al estrés es un fenómeno complejo que involucra múltiples sistemas de neurotransmisores y vías nerviosas a diferentes niveles del sistema nervioso central (Carrasco y Van de Kar, 2003; Lovallo y Gerin, 2003; McDougall y col., 2005). Nuestros resultados y numerosas evidencias apoyan el concepto que indica que la activación del receptor AT_1 por la ANG II endógena es un requisito indispensable para que se manifieste plenamente la respuesta simpática cardiovascular frente a varios estímulos estresores tanto psicoemocionales

como físicoemocionales (ver figura 14). Efectivamente, se ha demostrado que la administración ICV de ANG II produce respuestas similares al estrés en diferentes modelos experimentales (Yang y col., 1996; Watanabe y col., 1998), y en nuestros resultados se observa que el tratamiento con LOS previene los efectos presores inducidos por la INM.

La administración intracerebroventricular de antagonistas del receptor AT_1 atenuó la respuesta presora y simpatoadrenal inducida por estrés por agitación, INM, o la corriente de aire en la cara de la rata (*air-jet*), y el estímulo eléctrico plantar en ratas (Hirasawa y col., 1990; Cierco e Israel, 1994; Huang y Leenen, 1996; Saiki y col., 1997; Jezova y col., 1998; Watanabe y col., 1998). Aun mas, la disrupción genética de la expresión de ANG inhibió completamente la respuesta presora inducida por estrés por aislamiento en ratas (Baltatu y col., 2004). Finalmente, se ha demostrado que la microinyección de antagonistas del receptor AT_1 directamente en regiones de inervación presináptica cerebral, reduce marcadamente o abolen el efecto presor inducido por el estrés (*air-jet*), en ratas y conejos (Kubo y col., 2001; Mayoro y col., 2003; De Matteo y col., 2006a).

Se ha propuesto a la ANG II, como una de las hormonas reguladoras más importantes en el estrés. Se sabe que el estrés agudo, a través de la activación de los receptores ß-adrenérgicos, incrementa la formación de la renina, y por tanto la síntesis y liberación de la ANG II periférica (Yang y Wan, 1996). A su vez, la ANG II circulante, estimula a los receptores localizados en

la glándula pituitaria anterior y la glándula suprarrenal, contribuyen con la formación y liberación de la ACTH, los glucocortiocoides 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 desde la glándula suprarrenal, este es uno de los efectos típicos de la ANG II, inducido por el estrés (Keller-Wood y col., 1983; Livett y col., 1990). Nuestros resultados corroboran estos hechos, al analizar las figuras 15A y 16, podemos observar que el estrés por INM fue capaz de promover la liberación de norepinefrina y corticosterona respectivamente, pero no así la de epinefrina.

Aunado a sus efectos periféricos, se sabe que la ANG II circulante es capaz de estimular las vías localizadas en el SNC, gracias a su acción sobre los receptores AT_1 localizados en las estructuras circunventriculares tales como el OSF, y cuyas conexiones con el NPV del HIP son cruciales en la respuesta del eje hipotálamo-pituitaria-glándula 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 del aumento en la expresión del receptor AT_1, en áreas del SNC tales como el NPV del HIP y el OSF (Saavedra, 1992; Yang y Wan, 1996; Aguilera y col.,

1995), sugiriéndose la existencia de una estrecha coordinación entre los SRA periférico y central en la respuesta al estrés.

Modelos de estrés como la INM, incrementan la expresión de los receptores AT_1 en áreas cerebrales cruciales para el control central de la respuesta al estrés, tales como el NPV del HIP, la adenohipófisis y la MSR (Aguilera y col., 1995; Castrén y Saavedra, 1989). Armando y col. (2001), mediante el uso de un modelo de estrés por aislamiento, en roedores, en el que la restricción del movimiento impidió el acceso al territorio con el que estaba familiarizado el aminal, demostraron el efecto de la administración de candesartan por 2 semanas. Estos investigadores demostraron que un día de aislamiento, incrementó la expresión del receptor AT_1 en el NPV, incrementó la ACTH de la hipófisis, la corticosterona de la glándula suprarrenal, la aldosterona, las catecolaminas y la transcripción de la tirosina hidroxilasa. El pretratamiento con candersantan bloqueó el receptor AT_1 y previno el incremento de la ACTH y de los corticoides y disminuyó la excreción urinaria de las catecolaminas y la expresión de la tirosina hidroxilasa. Esta observación confirma que la ANG II y la estimulación de los receptores AT_1 son necesarias para la respuesta del eje hipotálamo-hipófisis-glándula suprarrenal y para la estimulación simpática ante el estrés (Saavedra, 1992).

Estos hallazgos indican que los receptores AT_1 median la regulación de la reacción al estrés a través de la ANG II. Más aún, la ANG II ejerce sus efectos no sólo mediante su interacción con los receptores AT_1 postsinápticos,

sino también vía los receptores AT_1 presinápticos; estos últimos se sabe que amplifican la liberación de norepinefrina de los terminales nerviosos simpáticos e incrementa su recaptación (Roth, 1972). La ANG II también estimula la síntesis de catecolaminas e incluso a sus catalizadores biosintéticos como la enzima tirosina hidroxilasa, paso limitante en la producción de estos neurotransmisores (Saavedra y col., 2004). La angiotensina II tiene acceso a sus receptores presentes en las glándulas suprarrenales e hipófisis, y en áreas localizadas dentro de la barrera hamatoencefálica como en el núcleo paraventricular del hipotálamo, donde se encuentran los grupos celulares productores de la hormona liberadora de corticotropina (CRH). La estimulación de los receptores AT_1 en el NPV por la angiotensina II incrementa la formación y secreción de la CRH. Esta última, es liberada a la circulación portal y estimula la producción y secreción de la hormona ACTH en la hipófisis anterior. La ACTH liberada a la circulación, estimula a la corteza suprarrenal, lo cual resulta en el aumento de la producción y secreción de los glucocorticoides como el cortisol (Armando y col., 2003). De igual forma, la expresión de los receptores AT_1 en la zona glomerulosa y en la médula de la glándula suprarrenal, e hipófisis anterior están aumentadas durante el estrés por aislamiento, aunque estos cambios son dependientes del tipo y duración del estresor (Armando y col., 2001).

La ANG II también posee efectos directos sobre la función de la glándula suprarrenal, estimulando la secreción de aldosterona en la zona glomerulosa y la liberación de catecolaminas desde la MSR durante el estrés agudo (Chiu y col.,

1989). El estrés también afecta la expresión de los receptores AT_1 y AT_2 en la médula y zona glomerulosa de la glándula suprarrenal, pero el aumento de estos receptores parece que está íntimamente relacionado con la duración del estímulo estresor (Armando y col., 2003; Leong y col., 2002).

Se ha postulado que la angiotensina II endógena y la estimulación de su receptor AT_1 juegan un papel determinante en la manifestación de la respuesta simpática frente al estrés. En apoyo a este concepto se encuentran los hallazgos de Sosa e Israel (2002) en un modelo de ratas con depleción de sodio, en el cual el SRA se encuentra incrementado y donde se demuestra que el EEP produce un aumento de la respuesta presora frente al EEP, el cual fue de magnitud mayor a la observada en las ratas con dietas normosódicas. Por el contrario, en los animales que recibieron una sobrecarga de sodio y en los que el SRA se encuentra disminuido, ocurre una disminución significativa la respuesta vasopresora ante el EEP. Estos hallazgos sugieren que la respuesta simpática al estrés requiere de la integridad del sistema renina angiotensina.

Dado que existe una gran variedad se vías de señalización asociada al receptor AT_1 presente en las neuronas (Richards y col., 1999; Sumners y col., 2002), el mecanismo molecular preciso que subyace la acción cardiovascular de la ANG II endógena central durante el estrés permanece elusiva. Sin embargo la evidencia creciente indica que las especies reactivas de oxigeno, particularmente el superóxido y el peróxido de oxígeno representan importantes

mensajeros intracelulares de muchas de las acciones de la ANG II (Griendling y Ushio-Fukai, 2000; Zimmerman y col., 2002).

Al respecto, en el presente estudio demostramos que la ANG II es capaz de generar ERO *in vitro* como parte del mecanismo de señalización intracelular a nivel del SNC, por lo tanto es lógico pensar que mecanismos similares deben ocurrir cuando el sistema renina angiotensina cerebral es estimulado endógenamente mediante el estrés (Zimmerman y col., 2002 y 2004). Nuestros hallazgos apuntan claramente a esa posibilidad, ya que demuestran que la INM (ver figuras 17, 18 y 19) se asocia a un incremento de la actividad de las enzimas antioxidantes CAT, SOD y GPX en el HIP, el OSF y la MSR de la rata. Esto apoya el concepto que el estrés incrementa la ANG II endógena, la cual al estimular el receptor AT_1 desencadenaría la cascada de señalización asociada a la NADP(H) oxidasa/ERO.

Otros autores también han demostrado que el H_2O_2 es un importante mediador en la cascada de señalización del SRA cerebral (Schumaker, 2002). Muchos de los efectos fisiológicos de la ANG II a nivel periférico son mediados por la formación de ERO, por lo que se ha postulado que alteraciones en los mecanismos redox mediados por la ANG II, estarían implicados en la generación de estrés oxidativo, que a su vez está relacionado con numerosas patologías como: la insuficiencia cardiaca, la hipertensión, la aterosclerosis, las enfermedades neurodegenerativas y la diabetes (Petterson y col., 2006; Phillips y Menezes, 2008).

Estudios realizados por Han y colaboradores (2011) han demostrado que es necesario el incremento en la producción de anión superóxido a nivel del NPV del HIP para que se genere la respuesta simpática sobre la actividad cardiovascular en un modelo de hipertensión aguda. Estos hallazgos también demuestran el papel que juegan las enzimas antioxidantes, como la CAT, SOD y GPX, en el control y regulación de los efectos de la ANG II liberada durante el estrés a nivel del SNC.

Como se ha comentado previamente, la fuente principal de $\cdot O_2^-$ en el cerebro incluye a la NAD(P)H oxidase, la xantina oxidasa, la respiración mitocondrial y la NOS desacoplada (Pou y col., 1992; Atlante y col., 2001; Wang y col., 2004; Gao y col., 2005). La evidencia indica que en el SNC la NAD(P)H oxidasa constituye la fuente principal de producción de $\cdot O_2^-$ estimulada por ANG II, similar a lo que ocurre en el tejido vascular (Griendling y col., 2000b). Así, la administración dentro del RVLM de un inhibidor de la NAD(P)H oxidasa, el DPI y la APO, atenuó la respuesta presora frente a la ANG II en ratas (Chan y col., 2005; Erdös y col., 2006). Aun mas, la microinyección al RVLM de oligonucleótidos antisentido a las subunidades p22phox o p47phox de la NAD(P)H oxidasa, previno el incremento de la producción de $\cdot O_2^-$ inducida por la ANG II (Chan y col., 2005). Igualmente, la aplicación del inhibidor selectivo de la NAD(P)H oxidasa, el gp91ds-tat, redujo a la mitad el disparo de las neuronas hipotalámicas y el tallo cerebral (Sun y col., 2005). Finalmente, la expresión de la isoforma negativamente dominante

de la Rac1, un componente crítico de la activación de la NAD(P)H oxidasa y la producción de $\cdot O_2^-$, inhibió el influjo del calcio extracelular inducido por la ANG II en neuronas (Zimmerman y col., 2004).

Por ello, es plausible sugerir que NAD(P)H oxidasa está involucrada en la producción de $\cdot O_2^-$ en respuesta de la liberación endógena de ANG II durante el estrés. Efectivamente, los resultados del presente estudio apoyan esta aseveración ya que la APO fue capaz de inhibir el incremento de la actividad de las tres enzimas antioxidantes inducida por la INM en la rata (ver figuras 17, 18 y 19). Resultados similares que apoyan nuestros resultados fueron reportados por Gao y col. (2004) quienes demostraron que la microinyección de APO en el RVLM atenúa marcadamente la respuesta presora y taquicardia frente al estrés inducido por la corriente de aire en la cara de la rata (*air-jet*), sin alterar los valores basales de los parámetros hemodinámicas.

El incremento de la actividad de las enzimas antioxidantes inducida por el estrés agudo debe estar relacionado con la producción de radicales libres y el aumento del estrés oxidativo (Schumacker, 2002). Efectivamente, Griendling y colaboradores fueron los primeros en describir que la ANG II activa a la NAD(P)H oxidasa de las células de músculo liso vascular (Griendling y col., 1994). Subsecuentemente, otros investigadores demostraron que la ANG II, es capaz de producir un incremento de tres veces en la producción de anión superóxido y de cinco veces en la producción de peróxido de hidrógeno. Aun mas, 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 HIP y el tallo cerebral (Erdös y col., 2006) y en las neuronas aisladas del núcleo dorsomedial del tracto solitario (Wang y col., 2004). Esta generación de ERO a nivel del SNC, se encuentra mediada por la activación de la NAD(P)H oxidasa vía el receptor AT_1 (Zimmerman y col., 2002; Sun y col., 2005), tal como debe ocurrir durante el estrés agudo.

En efecto, se ha demostrado que la inhibición de la NAD(P)H oxidasa con 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). Aún más, estos hallazgos demuestran el importante papel de las enzimas antioxidantes en la modulación de la respuesta al estrés mediada por la ANG II, y el papel del anión superóxido como una molécula de señalización intracelular en los efectos mediados por la ANG II sobre el estrés y la presión arterial (Erdös y col., 2006; Schnackenberg y col., 1998; Zimmerman y col., 2002, 2004).

Hallazgos similares, ya han sido reportados por otros investigadores, en donde los cambios inducidos por la administración ICV de ANG II sobre la presión arterial media y la frecuencia cardíaca pueden ser abolidos mediante la sobre-expresión de la SOD empleando un vector viral (Zimmerman y col., 2002). Así mismo, la administración ICV de un mimético de la SOD, el TEM, 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 HIP posterior en ratas normotensas (Gao y col., 2004; Campese y col., 2005; Lu y col., 2004).

Si la producción de anión superóxido inducido por la ANG II liberada endógenamente durante el estrés media la respuesta cardiovascular frente al estrés, el tratamiento *in vivo* de un agente SOD mimético debería afectar la respuesta de las enzimas antioxidantes inducida por el estrés. Efectivamente, el tratamiento con tempol, abolió el incremento en la actividad de las enzimas antioxidantes CAT, SOD y GPX inducido por el estrés por INM en las tres estructuras evaluadas (HIP, OSF y MSR) (ver figuras 17, 18 y 19). Resultados similares fueron reportados por Mayorov y col. (2004) en los que demostraron que la microinyección bilateral de tempol o tirón dentro del RVLM, atenúa la respuesta presora, taquicardia y la respuesta simpatoadrenal renal en respuesta al estrés por o la corriente de aire en la cara de la rata (*air-jet*).

Estudios realizados empleando diferentes modelos de estrés, han demostrado, que el pretratamiento con antagonistas del receptor AT_1, previene por completo la respuesta simpatoadrenal y hormonal, así como el desarrollo de úlceras gástricas inducidas por estrés (Saavedra, 2005). Lo que demuestra la participación del receptor AT_1 en la respuesta central frente al estrés. Si el receptor AT_1 estimulado por la ANG II endógena está asociado al estrés oxidativo, su bloqueo debería reducir la producción de ERO. Nuestros resultados, aun cuando indirectos, apoyan esta posibilidad ya que como podemos evidenciar en

las figuras 17, 18 y 19, el tratamiento *in vivo* con losartan, un antagonista de los receptores $AT_{1,}$ fue capaz de bloquear el incremento en la actividad de las enzimas antioxidantes CAT, SOD y GPX inducido por el estrés en el HIP, el OSF y la MSR.

Estos resultados indican que el losartan es capaz de disminuir el estrés oxidativo. Adicionalmente, ratifican que para que la respuesta simpática, frente al estrés de tipo agudo, se manifieste en toda su magnitud, se requiere de la participación del SRA cerebral, a través de la liberación de ANG II y la activación del receptor AT_1 y el consecuente incremento de la producción de ERO (Yang y Wan, 1996; Watanabe y col., 1998). Efectivamente, la administración periférica o ICV de cualquiera de los antagonistas del receptor $AT_{1,}$ atenúa la respuesta presora y simpatoadrenal frente a diferentes tipos de estrés agudo, tales como la agitación, la inmovilización, o la corriente de aire en la cara de la rata (*air-jet*), (Hirasawa y Hashimoto, 1990; Huang y Leenen, 1996; Cierco e Israel, 1994; Saiki y col., 1997; Jezova y col., 1998; Watanabe y col., 1998).

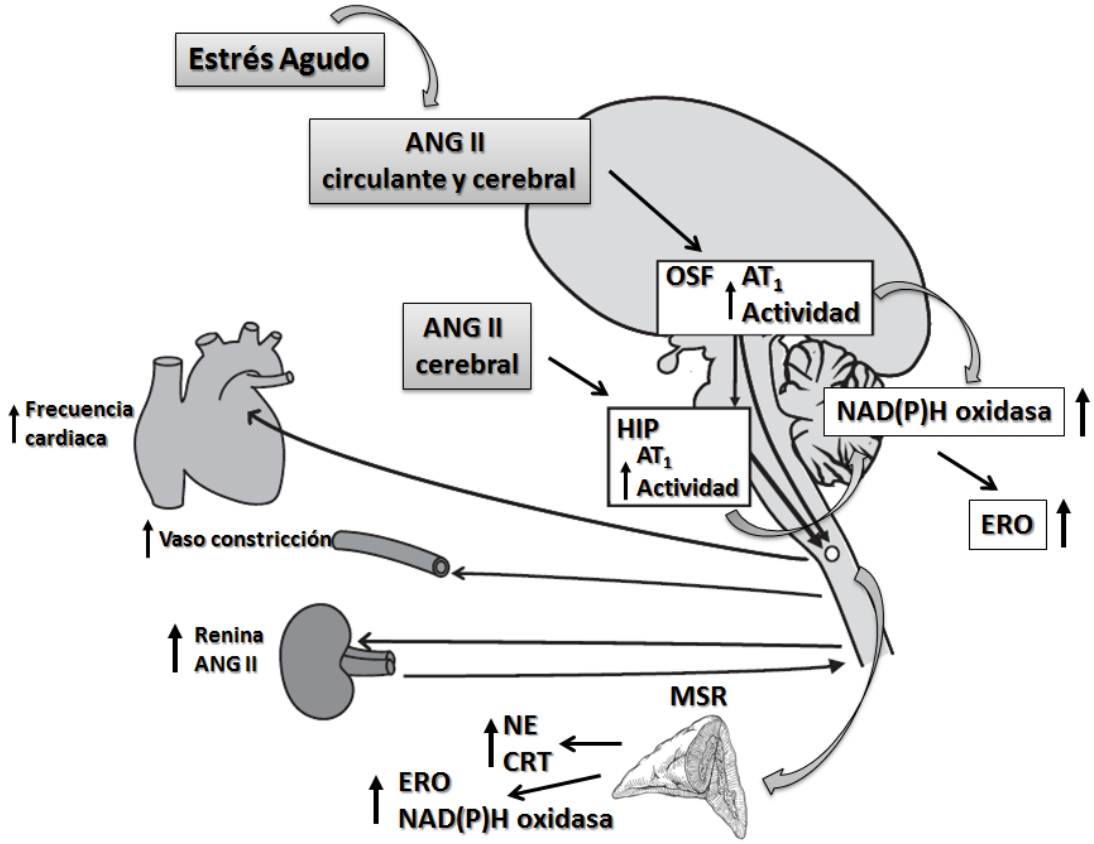
Debido al hecho que la ANG II ha emergido en los últimos años como la hormona del estrés (Yang y col., 1996; Saavedra y col., 2004), junto al hecho que la activación del receptor AT_1 hipotalámico y RVLM son requisitos indispensables para la completa expresión de la respuesta cardiovascular frente al estrés (Kubo y col., 2001; Mayorov y Head, 2003), es plausible proponer que las ERO locales pondrían mediar, al menos en parte, la acción excitatoria de la ANG II durante el estrés. Nuestros hallazgos en el presente estudio apoyan esta posibilidad ya que la inmovilización forzada en rata produjo un

aumento significativo de la actividad de las enzimas antioxidantes CAT, SOD y GPX. Aun cuando indirecto este resultado parece indicar que la estimulación de la producción local de anión superóxido inducido por el estrés estimula compensatoriamente la actividad de las enzimas antioxidantes.

Todos estos hallazgos parecen indicar que la liberación local de $\cdot O_2^-$ podrían alterar la respuesta de la neuronas vasomotoras del RVLM de manera específica, y este efecto está relacionado intrínsecamente con la activación de las vías de señalización del receptor AT_1, de la misma forma que se ha descrito para la ANG II circulante, pero no para otros agentes presores, al evocar vasoconstricción aguda a través de mecanismos redox-sensibles que sugiere la relación especifica entre la ANG II y la formación de ERO en las células vasculares (Rajagopalan y col., 1996; Kawazoe y col., 2000; Shastri y col., 2002).

En relación a la respuesta frente al estrés, se puede inferir que en otras regiones cerebrales que controlan el eflujo autonómico y neouroendocrino debe existir relaciones similares ente la ANG II y el $\cdot O_2^-$, tal y como se demuestra en el presente estudio en el hipotálamo, el OSF y la médula suprarrenal. En apoyo a esto están los resultados reportados para el área dorsomedial del HIP (DMH), una región relacionada con la regulación de la respuesta de “lucha o huida” frente al estrés (Stotz-Potter y col., 1996; Lowry y col., 2003; McDougall y col., 2004; De Matteo y col., 2006a). Al respecto, se ha sugerido que el receptor AT_1 dentro del área DMH, juega el papel esencial en la modulación de

la respuesta cardiovascular y de comportamiento frente al estrés. Así, la microinyección de candesartan, un antagonista del receptor AT_1, en el DMH atenuó la respuesta presora y taquicardia inducida por el estrés por la corriente de aire en la cara de la rata (*air-jet*) en conejos (De Matteo y col., 2006a). Aun mas, el bloqueo del receptor AT_1 en el DMH reduce en forma diferencial la respuesta similar a la ansiedad y cardiovascular de la respuesta de pánico inducida por el lactato en ratas "propensas al pánico" (Shekhar y col., 2006). Igualmente, la administración de tempol o tirón en el DMH, redujo significativamente la respuesta cardiovascular frente al estrés por la corriente de aire en la cara de la rata (*air-jet*) en conejos (DeMatteo y col., 2006b). Estos hallazgos indican qua la producción local de $\cdot O_2^-$ está implicada en la regulación de la respuesta de "lucha o huida" frente al estrés.



Esquema 3. Participación del SRA y las ERO durante el estrés agudo.

Papel de la ANG II en la generación de estrés oxidativo en un modelo genético de estrés crónico: papel de las enzimas antioxidantes CAT, SOD y GPX en la hipertensión

Además del estrés agudo, la NAD(P)H oxidasa podría ser importante en la regulación de la producción $\cdot O_2^-$ dependiente del receptor AT_1 en condiciones crónicas como lo son la hipertensión y la insuficiencia cardiaca congestiva. En efecto, se ha demostrado un incremento de los niveles de $\cdot O_2^-$ en el RVLM de conejos con insuficiencia cardiaca congestiva, que se acompaña con incrementos en la expresión del ARNm y la proteína del receptor AT_1 y las subunidades p40phox, p47phox, y gp91phox de la NAD(P)H oxidasa (Gao y col., 2004).

Un gran número de estudios han demostrado que las ratas SHR desarrollan hipertensión a temprana edad, por un mecanismo genético que produce alteraciones neuronales y vasculares en los animales, y que es dependiente de la actividad del SRA (Ferrone y Antonaccio, 1979; Michel y col., 1990; Madeddu y col., 1995; Pinto y col., 1998). Esto queda demostrado en la figura 20, en donde podemos evidenciar que las ratas SHR presentan cifras de presión arterial mayores que la de su control normo tenso Wistar Kyoto, y que este aumento en las cifras de PAM están asociadas al SRA, ya que el bloqueo con LOS produjo una reducción de las cifras de PAM.

Es ampliamente conocido, que el SRA está implicado en la patogénesis de la hipertensión y el daño endotelial a través de la generación de ERO, tales como anión superóxido, peróxido de hidrógeno, radical hidroxilo, oxido nítrico y peroxinitritos. La ANG II es capaz de inducir estrés oxidativo tanto en las células endoteliales como en el tejido nervioso a través de la activación de la NAD(P)H oxidasa (Griendling y col., 2000; Rui y col., 2008).

En las ratas SHR, la NAD(P)H oxidasa se encuentra sobre-expresada, lo que promueve la generación de estrés oxidativo por sobreproducción de anión superóxido a nivel del endotelio vascular (Zalva y col., 2000; Yongli y col., 2009). Ahora bien, la NAD(P)H oxidasa no es la única fuente de ERO, en relación a la patogénesis de la hipertensión, existen una gran variedad de fuentes para la generación de ERO como la xantina oxidasa, la auto-oxidación de NADH y la inactivación de la SOD (Sowers, 2002). El exceso de anión superóxido, reduce la biodisponibilidad del óxido nítrico, produciendo disfunción endotelial e hipertensión (Zafari y col., 1998; Irani 2000; Sowers y col., 2001).

Adicionalmente a esto, en el cerebro de las ratas SHR, podemos observar cambios importantes en las poblaciones de los receptores de ANG II AT_1 y AT_2, localizados en áreas relacionadas con el control de la presión arterial y la función cardiovasculares, como son el NTS, RVLM y el HIP posterior (Takeda y Bunag 1978; Saavedra 1992; Dampney 1994). Estos cambios están relacionados con un aumento en la expresión de los receptores AT_1 y una disminución de los receptores AT_2 (Bradley y col., 2004), que conlleva a la sobre

activación del SRA y a un estado oxidativo elevado, lo que genera estrés oxidativo.

Así como existe un sistema generador de ERO, también existe un sistema antioxidantes, conformado por las enzimas antioxidantes. Estas protegen a las células de los efectos negativos del exceso de producción de ERO. Un exagerado aumento en la producción de ERO o una reducción de la actividad de las enzimas antioxidantes, puede generar estrés oxidativo. El cerebro es particularmente vulnerable al ataque de las ERO, y las razones principales son dos: primero el cerebro consume el 20% del oxígeno del cuerpo, exponiéndolo a una abundante presencia de ERO como consecuencia de su metabolismo. Por otra parte, el cerebro tiene una gran cantidad de ácidos grasos polinsaturados que son susceptibles de ser atacados por las ERO, lo que genera una condición proclive al estrés oxidativo.

Existe evidencia de una alteración en la respuesta cardiovascular en las ratas hipertensas. De hecho, Stuart y col., (2000) estudiaron como el estrés por restricción agudo (1 hora) o crónico (1 hr/10 días consecutivos) puede afectar la respuesta cardiovascular en ratas SHR y WKY. Determinaron que ante la exposición al estrés agudo se originaron respuestas de taquicardia e incrementos de la presión arterial, en ambas cepas y éstas fueron significativamente mayores en las SHR que en las WKY. Después del periodo de 10 días de estrés la presión arterial fue significativamente elevada en las SHR comparadas con las ratas WKY; y la capacidad de recuperación a valores basales fue más rápida en la WKY que

en la SHR. Estos datos sugieren que las WKY regulan más eficientemente las respuestas cardiovasculares frente al estrés crónico, en consecuencia en las SHR está reducida su capacidad de compensar las respuestas ante los estímulos estresores y lo cual puede tener efectos directos sobre la regulación cardiovascular.

Ahora bien, si el estrés agudo está asociado con un incremento de la producción de anión superóxido y a la estimulación de la actividad de la enzimas antioxidantes mediada por la ANG II endógena (presente trabajo), es plausible suponer que debería ocurrir una estimulación similar en un modelo de estrés crónico como lo son las ratas SHR en el que el SRA se encuentra sobre activado (Baiardi y col., 2004; Seltzer y col., 2004). Nuestros hallazgos demuestran esta posibilidad ya que se pudo evidenciar que las ratas SHR poseen una actividad basal mayor de sus enzimas antioxidantes CAT, SOD y GPX, comparado contra su control normotenso Wistar Kyoto, en el HIP, OSF y la MSR (ver figuras 21, 22 23), concordando con la hipótesis de que en las ratas SHR los niveles de estrés oxidativo son más altos.

Si la activación del SRA en la hipertensión se encuentra asociado a la activación de la vía de señalización del estrés oxidativo, alguna maniobra que sea capaz de reducir el anión superóxido debería revertir la hipertensión y el incremento de la actividad de las enzimas antioxidantes. Efectivamente, tal y como se muestra en las figuras 21, 22 y 23, el tratamiento crónico *in vivo* con tempol a ratas SHR revirtió el incremento de la actividad de las enzimas

antioxidantes CAT, SOD y GPX inducida por la hipertensión, en el HIP, el OSF y la MSR. Estos hallazgos se apoyan por los resultados reportados sobre el efecto del TEM en modelos de hipertensión y simpatoexcitacion. Así, en ratas uni-nefrectomizadas jóvenes con sobrecarga de sodio, las cuales exhiben simpatoexcitacion, hipertensión, daño renal y proteinuria, se demostró que la infusión de tempol en el ventrículo lateral cerebral redujo la actividad nerviosa simpática, la presión arterial y el daño renal (Fujita y col., 2012). Igualmente, en el modelo de hipertensión de Goldblatt (2-riñones 2 clips, 2K 2C) se demostró que la administración de tempol fue más efectiva que el candesartan en reducir la presión arterial y mejorar la presión de perfusión renal (Palm y col., 2010).

Existe evidencia que sugiere que el bloqueo del receptor AT_1 puede ser considerado como una nueva herramienta terapéutica para el tratamiento de los múltiples desórdenes relacionados con el estrés. Se demostró que el tratamiento a largo plazo con candesartán previene la respuesta simpatoadrenal y hormonal así como el incremento de las catecolaminas urinarias en ratas SHR. Por lo tanto, el bloqueo de los receptores AT_1 debería asociarse a una reducción del estrés oxidativo en las ratas hipertensas. En este sentido nuestros resultados apoyan este concepto, ya que las ratas SHR tratadas con LOS se observó una reversión del incremento de la actividad de las enzimas antioxidantes CAT y SOD inducida por la hipertensión en el HIP y MSR (figuras 21 y 23).

Se sabe en la actualidad que la administración periférica de antagonistas del receptor AT_1 afecta la circulación cerebral y normaliza algunas de las alteraciones estructurales y funcionales a nivel cerebrovasculares, en individuos que presentan hipertensión de tipo crónica (Saavedra, 2005). Los antagonistas del receptor AT_1 son capaces de remodelar y normalizar la función cerebrovascular (Zhou y col., 2006). Además de normalizar la expresión de las isoformas de la sintasa del óxido nítrico y revertir los procesos inflamatorios característicos de los individuos hipertensos, lo que tiene como consecuencia una reducción drástica del riesgo de presentar isquemia cerebral, además de reducir el estrés oxidativo y la muerte neuronal (Kagiyama y col., 2003; Zhou y col., 2006).

Estos hallazgos apoyan el concepto que la respuesta hormonal y cardiovascular frente al estrés de tipo crónico se encuentra mediada por el SRA, a través de la estimulación del receptor $AT_{1.}$ Al respecto, estudios realizados por Peng y Phillips (2001) empleando un modelo de estrés de exposición al frío, demostraron que existe una regulación diferencial de los componentes del SRA cerebral en diferentes áreas del cerebro de la rata, encontrando que en los individuos sometidos al estrés, se produce un aumento del número y expresión de los receptores AT_1, junto con una reducción en el número y expresión de los receptor AT_2, en áreas del cerebro implicadas en el control de la presión arterial. Igualmente, en un modelo de estrés crónico por nado forzado se observó un aumento del estrés oxidativo y de los niveles de ANG II en diferentes áreas del cerebro de la rata relacionados con el estrés

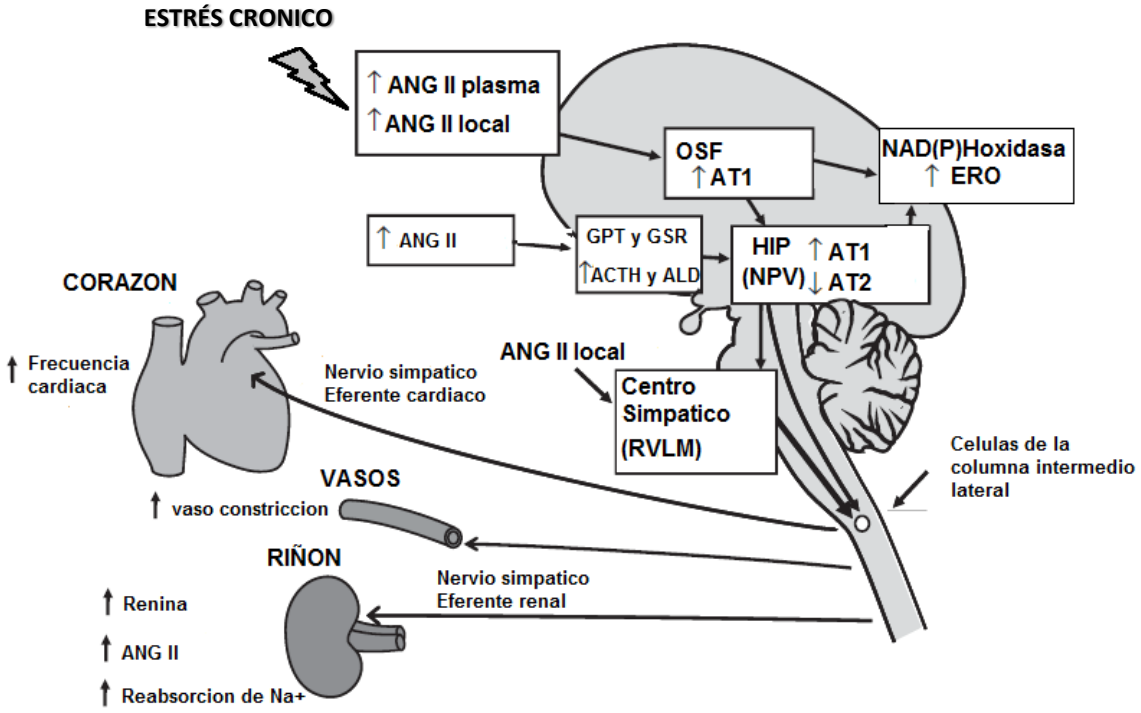
emocional (Pedreanez y col., 2006), implicando al SRA cerebral con estados depresivos y de ansiedad. Estos hallazgos implican que los blancos de acción periféricos y centrales, relacionados con la generación de ERO inducidas por la ANG II, son sitios potenciales para la generación de estrés oxidativo a nivel del SNC, siendo este sistema uno de los más importantes para las acciones de la ANG II y el control de la presión arterial.

Una serie de experimentos llevados a cavo por Ye y col. (2006), en donde se empleó un modelo de hipertensión crónica, se demostró que el aumento de la presión arterial estaba asociado con una mayor actividad simpática, lo que a su vez promovía un aumento en la liberación de norepinefrina de los núcleos del hipotálamo posterior. Aunado a esto, también se encontró un aumento del ARNm de la NAD(P)H oxidasa en los núcleos del hipotálamo posterior y paraventricular, así como locus coeruleus. Estas observaciones sugieren que en la hipertensión crónica el aumento de la presión arterial esta mediado por un aumento en la producción de anión superóxido a través de un aumento en la expresión de la NAD(P)H oxidasa en los núcleos cerebrales implicados en el control de la presión arterial.

Nuestros datos van en este mismo sentido, demostrando la importancia de la NAD(P)H oxidasa en la hipertensión crónica, ya que podemos evidenciar que el tratamiento *in vivo* con apocinina un inhibidor de la NAD(P)H oxidasa, a las ratas SHR revirtió en incremento de la actividad de las enzimas antioxidantes, SOD y GPX, en el HIP, OSF y MSR (ver figuras 21, 22 y 23).

Estos hallazgos, están acordes con estudios realizados en la última década en donde se relaciona el aumento en la presión arterial en modelos de hipertensión crónica con un aumento en la expresión de la MnSOD a nivel cerebral (Yongli y col., 2009). Igualmente, con los hallazgos de Tain y col., (2012) quienes demostraron que la administración de apocinina por 8 semanas a ratas SHR jóvenes redujo el estrés oxidativo y la hipertensión arterial de forma independiente de la vía del ADMA y el óxido nítrico.

En resumen, La evidencia y nuestros resultados sugieren que la producción $\cdot O_2^-$ cerebral es un requisito para la total expresión de la respuesta cardiovascular frente al estrés. Especialmente las estructuras como el HIP, el OSF, DMH y RVLM, la cascada se señalización que comprende al receptor AT_1/NAD(P)H oxidasa/$\cdot O_2^-$ se encuentran asociadas a los componentes cardiovasculares simpáticos de la respuesta “lucha o huida” típica del estrés. Lo que le da a nuestros resultados una significancia funcional y clínica ya que sugieren que la señalización de la vía receptor AT_1/NAD(P)H oxidasa/$\cdot O_2^-$ cerebral constituye un blanco terapéutico que selectivamente sería capaz de reducir la reactividad cardiovascular y la respuesta emocional negativa frente al estrés, y por lo tanto reducir el riesgo de hipertensión y enfermedad cardiovascular.



Esquema 4. Participación del SRA y el estrés oxidativo durante el estrés crónico (ratas SHR) glándula pituitaria (GPT), glándula suprarrenal (GSR), aldosterona (ALD), hipotálamo (HIP), núcleo paraventricular (NPV), órgano subfornical (OSF).

CONCLUSIONES

En conclusión, nuestros resultados demuestran que en el HIP y el OSF 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_1 y la producción de anión superóxido dependiente de la activación de la NAD(P)H-oxidasa y la PKC. Adicionalmente, demostramos que a nivel hipotalámico el receptor AT_2 contrarregula las acciones de la ANG II en relación a la producción de de anión superóxido y el aumento en la actividad de las ERK1/2 esta mediado por el receptor AT_1 y la NAD(P)H-oxidasa (ver esquema 1).

A nivel de la MSR 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_2 y la producción de anión superóxido dependiente de la activación de la NAD(P)H oxidasa y la PKC. Aunado a estos hechos, también demostramos que el receptor AT_1 es capaz de modular la actividad del recetor AT_2 sobre la producción de anión superóxido (ver esquema 2).

El estrés agudo por inmovilización forzada, aumentó la actividad de las enzimas antioxidantes: CAT, SOD y GPX, en el OSF, HIP y MSR. Este aumento en la actividad de las enzimas antioxidantes, esta mediado por un aumento en la producción de ERO a través de la activación de la vía AT1/NAD(P)H oxidasa, a nivel del SNC en el HIP y el OSF, como podemos ver en el esquema número 3.

En relación al modelo de estrés crónico (ratas SHR y WKY), nuestros datos van en la misma línea de las evidencias actuales, en donde la base fisiopatológica de la hipertensión en estos animales, está relacionada a un aumento del estrés oxidativo, producto de la sobreactividad del SRA cerebral, a través de la activación de la vía AT1/NAD(P)H oxidasa a nivel del SNC como podemos evidenciar en el esquema número 4.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Aebi H. Catalase *in vitro*. *Methods Enzymol.* 1984; 105: 121-126.

Aguilera G. Role of angiotensin II receptor subtypes on the regulation of aldosterone secretion in the adrenal glomerulosa zone in the rat. *Mol Cell Endocrinol.* 1992; 90(1): 53-60.

Aguilera G, Kiss A, Luo X, Akbasak BS. The renin angiotensin system and the stress response. *Ann N Y Acad Sci.* 1995; 771: 173-86.

Allen AM, Zhuo J, Mendelsohn FAO. Localization and function of angiotensina AT_1 receptors. *Am J Hypertens*. 2000; 13: 31S-38S.

Ambuhl P, Felix D, Imboden H, Khosla MC, Ferrario CM. Effects of angiotensina analogues and angiotensin receptor antagonists on paraventricular neurones. *Regul Pept*. 1992; 38: 111-120.

Armando I, Carranza A, Nishimura Y, Hoe KL, Barontini M, Terrón JA, Falcón-Neri A, Ito T, Juorio AV, Saavedra JM. Peripheral administration of an angiotensin II AT(1) receptor antagonist decreases the hypothalamic-pituitary-adrenal response to isolation Stress. *Endocrinology.* 2001; 142(9): 3880-9.

Armando I., Seltzer A., Bregonzio C., y Saavedra J.M. Stress and angiotensin II: novel therapeutic opportunities. *Current Drugs Targets – CNS & Neurological Disorders* 2003; 2:413 - 419.

Armando I, Jezova M, Bregonzio C, Baiardi G, Saavedra JM. Angiotensin II AT1 and AT2 receptor types regulate basal and stress-induced adrenomedullary catecholamine production through transcriptional regulation of tyrosine hydroxylase. *Ann N Y Acad Sci*. 2004; 1018:302-309.

Arthur JR, Beckett GJ: Newer aspects of micronutrients in at risk groups. New metabolic roles for selenium. *Proc.Nutr.Soc*. 1994; 53: 615-624.

Atlante A, Calissano P, Bobba A, Giannattasio S, Marra E, Passarella S. Glutamate neurotoxicity, oxidative stress and mitochondria. *FEBS Lett.* 2001; 18;497(1):1-5.

Avissar NS, Ornt DB, Yagil Y, Horowitz S, Watkins RH, Kerl EA, Takahashi K, Palmer IS, Cohen HJ: Human kidney proximal tubule are the main source of plasma glutathione peroxidase. *Am.J.Physiol*. 1994; 266: C367-C375.

Babior BM, Kipnes RS. Superoxide-forming enzyme from human neutrophils: evidence for a flavin requirement. *Blood*. 1977; 50: 517-524.

Babior BM. NADPH oxidase: an update. *Blood.* 1999; 93(5):1464-76.

Baiardi G, Bregonzio C, Jezova M, Armando I, Saavedra JM. Angiotensin II AT1 receptor blockade prolongs the lifespan of spontaneously hypertensive rats and reduces stress-induced release of catecholamines, glucocorticoids, and vasopressin. *Ann N Y Acad Sci. 2004;* 1018: 131-6.

Balla T, Baukal AJ, Eng S, Catt KJ. Angiotensin II receptor subtypes and biological responses in the adrenal cortex and medulla. *Mol Pharmacol.* 1991; 40(3): 401-6.

Baltatu O, Campos LA, Bader M. Genetic targeting of the brain renin-angiotensin system in transgenic rats: impact on stress-induced renin release. *Acta Physiol Scand.* 2004; 181(4): 579-84.

Barbella Y, Cierco M, Israel A. Effect of Losartan, a nonpeptide angiotensin II receptor antagonist, on drinking behavior and renal actions of centrally administered renin. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1993; 202(4):401-6.

Behne D, Scheid S, Kyriakopoulos A, Hilmert H: Subcellular distribution of selenoproteins in the liver of the rat. *Biochim Biophys Acta* 1990; 1033: 219-225.

Belloni AS, Andreis PG, Macchi V, Gottardo G, Malendowicz LK, Nussdorfer GG. Distribution and functional significance of angiotensin-II AT1- and AT2-receptor subtypes in the rat adrenal gland. *Endocr Res* 1998; 24(1):1-15.

Beyer W, Imlay J, Fridovich I. Superoxide dismutases. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 1991; 40:221-253.

Biberstine-Kinkade KJ, DeLeo FR, Epstein RI, LeRoy BA, Nauseef WM, Dinauer MC. Heme-ligating histidines in flavocytochrome b(558): identification of specific histidines in gp91(phox). *J Biol Chem* 2001; 276: 31105-31112.

Bickerton RK, Buckley JP. Evidence for a central mechanism in angiotensin-induced hypertension. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1961; 106: 836-843.

Bliss TV, Collingridge GL. A synaptic model of memory: long term potentiation in the hippocampus. *Nature.* 1993; 361(6407): 31-9.

Bobba A, Atlante A, Vito A, Petragallo T, Ersilia Marra. Different sources of reactive oxygen species contribute to low potassium-induced apoptosis in cerebellar granule cells. *International J Mol Med.* 2008; 21: 737-745.

Bobik A. Intracellular signaling pathways regulating vascular NAD(P)H oxidase and hypertension: an opportunity for development of novel antihypertensive agents?. *J Hypertension.* 2003; 21: 859-861.

Bonini JS, Bevilaqua LR, Zinn CG, Kerr DS, Medina JH, Izquierdo I, Cammarota M. Angiotensin II disrupts inhibitory avoidance memory retrieval. *Horm Behav*. 2006; 50(2): 308–313.

Booth DA. Mechanism of action of norepinephrine in eliciting an eating response on injection into the rat hypothalamus. *J Pharmacol Exp Ther.* 1968; 160(2): 336-48.

Bottari SP, King I.N, Reichlin S, Dahlstrom I, Lydon N, De Gasparo M. The angiotensin AT_2 receptor stimulates protein tyrosine phosphatase activity and mediates inhibition of particulate guanylate cyclase. *Biochem Biophys Res Comm.,* 1992; 183: 206-211.

Brennan TJ, Morris M, Haywood JR. GABA agonist inhibits the vasopressin-dependent pressor effects of central angiotensin II. *Neuroendocrinol* 1984; 39(5): 429-36.

Brigelius-Flohé R, Aumann KD, Blöcker H, Gross G, Kiess M, Klöppel KD, Maiorino M, Roveri A, Schuckelt R, Ursini F, Wingender E, Flohé L. Phospholipid-

hydroperoxide glutathione peroxidase. Genomic DNA, cDNA, and deduced aminoacid sequence. *J Biol Chem* 1994; 269:7342-7348.

Buggy J, Fisher AE, Hoffman WE, Johnson AK, Phillips MI. Subfornical organ: a dipsogenic site of action of angiotensin II. *Science*, 1978; 201(4353):380–381.

Bumpus FM, Catt K.J, Chiu A.T, DeGasparo M, Goodfriend T, Husain A, Peach M.J, Taylor DJ, Timmermans P. Nomenclature for angiotensin receptors *Hypertension* 1991; 17: 720-723.

Bunnemann B, Fuxe K, Ganten D. The renin-angiotensin system in the brain: an update. *Regul Peptides*. 1993;46:487-509.

Butcher RD, Schollmann C, Marmé D. Angiotensin II mediates intracellular signalling in vascular smotth muscle cells by activation of tyrosine-specific protein kinases and c-raf-1. *Bioche Biophys Res Commun* 1993; 196: 1280-1287.

Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res* 2000; 87: 840-844.

Campese VM, Shaohua Y, Huiquin Z. Oxidative stress mediates angiotensin II-dependent stimulation of sympathetic nerve activity. *Hypertension.* 2005; 46(3): 533-9.

Carlsson LM, Marklund SL, Edlund T. The rat extracellular superoxide dismutase dimer is converted to a tetramer by the exchange of a single aminoacid. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 5219-5222.

Carmody RJ, Cotter TG. Signalling apoptosis: a radical approach. *Redox Report*. 2001; 6:77-90.

Carrasco GA, Van de Kar LD. Neuroendocrine pharmacology of stress. *Eur J Pharmacol.* 2003; 463(1-3): 235-72.

Castrén E, Saavedra JM. Angiotensin II receptors in paraventricular nucleus, subfornical organ, and pituitary gland of hypophysectomized, adrenalectomized, and vasopressin deficient rats. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 1989;86:725-729.

Chabrashvili T, Tojo A, Onozato ML, Kitiyakara C, Quinn MT, Fujita T, Welch WJ, Wilcox CS. Expression and cellular localization of classic NAD(P)H oxidase subunits in the spontaneously hypertensive rat kidney. *Hypertension*. 2002; 39:269-274.

Chai SY, Zhuo J, Mendelsohn FA. Localization of components of the reninangiotensin system and site of action of inhibitors. *Arzneimittel-Forschung*. 1993; 43: 214-221.

Champion H, Czapla M, Kadowitz P. Responses to angiotensin peptides are mediated by AT1 receptors in the rat. *Am J Physiol.* 1998; 274: E115-E123,

Chance B, Oshino N. Kinetics and mechanisms of catalase in peroxisomes of the mitochondrial fraction. *Biochem J.* 1971; 122, 225–233.

Chan S, Hsu K, Huang Ch, Wang L, Ou Ch, Chan J. 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*. 2005; 97:772-780.

Chang RSL, Lotti VJ, Chen TB, Faust K.A. Two angiotensin II binding sites in rat brain revealed using [^{125}I]Sar^{1}-Ile-angiotensin II and selective nonpeptide antagonist. *Biochem Biophys Res Commun.* 1990; 171: 813-817.

Chiu AT, Herblin WF, McCall DE, Ardecky RJ, Carini DJ, Duncia JV, Pease LJ, Wong PC, Wexler RR, Johnson AL. Identification of angiotensin II receptor subtypes. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989; 165(1): 196-203.

Chu FF, Doroshow JH, Esworthy RS. Expression, characterization, and tissue distribution of a new cellular selenium-dependent glutathione peroxidase, GSHPx-GI. *J Biol Chem* 1993; 268:2571-2576.

Cierco M, Israel A. Role of angiotensin AT1 receptor in the cardiovascular response to footshock. *Eur J Pharmacol.* 1994; 251(1): 103-6.

Cohen G. Enzymatic/nonenzymatic sources of oxyradicals and regulation of antioxidant defenses. *Ann NY Acad Sci*. 1994; 738:8-14.

Crapo JD, Oury T, Rabouille C, Slot JW, Chang LY. Copper, zinc superoxide dismutase is primarily a cytosolic protein in human cell. *Proc Natl Acad Sci .USA* 1992; 89: 10405-10409.

Cross AR, Rae J, Curnutte JT. Cytochrome b-245 of the neutrophil superoxide generating system contains two nonidentical hemes. Potentiometric studies of a mutant form of gp91phox. *J Biol Chem*. 1995; 270: 17075-17077.

Dampney RA. Functional organization of central pathways regulating the cardiovascular system. *Physiol Rev*. 1994; 74: 323-364.

Davisson RL, Yang GY, Beltz TG, Cassell MD, Johnson AK, Sigmund CD. The brain renin-angiotensin system contributes to the hypertension in mice containing both the human renin and human angiotensinogen transgenes. *Circ Res*.1998; 83: 1047-1058.

De Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright JW, Unger T. International Union of Pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev*. 2000; 52: 415-472.

De Matteo R, Head GA, Mayorov DN. Angiotensin II in dorsomedial hypothalamus modulates cardiovascular arousal caused by stress but not feeding in rabbits. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2006; 290(1): R257-64.

Deisseroth A, Dounce AL. Catalase. Physical and chemical properties, mechanism of catalysis, and physiological role. *Physiol Rev* 1970; 50: 319–375.

Dendorfer A, Raasch W, Tempel K, Dominiak P. Interactions between the renin-angiotensin system (RAS) and the sympathetic system. *Basic Res Cardiol.* 1998; 93(2): 24-9.

Deng HX, Bigio EH, Zhai H, Fecto F, Ajroud K, Shi Y, Yan J, Mishra M, Ajroud-Driss S, Heller S, Sufit R, Siddique N, Mugnaini E, Siddique T. Differential involvement of optineurin in amyotrophic lateral sclerosis with or without SOD1 mutations. *Arch Neurol*. 2011; 68(8):1057-61.

Deschepper CF, Bouhnik J, Ganong WF. Colocalization of angiotensinogen and glial fibrillary acidic protein in astrocytes in rat brain. *Brain Res*. 1986; 374: 195-198.

Dinauer MC. Regulation of neutrophil function by Rac GTPases. *Curr Opin Hematol*. 2003; 10: 8-15.

Dzau VJ. Vascular renin-angiotensin: a possible autocrine or paracrine system in control of vascular function. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1984; 6(2): S377-82.

Dzau VJ, Ingelfinger J, Pratt R, Ellison KE. Identification of renin and angiotensinogen messenger RNA sequences in mouse and rat brains. *Hypertension*. 1986; 8: 544-548.

Dzau VJ, Ingelfinger JR, Pratt R.E. Regulation of tissue renin and angiotensin gene expressions. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1986; 8(10): S11-16.

Eng R, Miselis RR. Polydipsia and abolition of angiotensina-induced drinking after transaction of subfornical organ efferent projections in the rat. *Brain Res*. 1981; 225: 200-206.

Esler MD, Thompson JM, Kaye DM, Turner AG, Jennings GL, Cox HS, Lambert GW, Seals DR. Effects of aging on the responsiveness of the human cardiac sympathetic nerves to stressors. *Circulation.* 1995; 91(2): 351-8.

Esler M. High blood pressure management: potential benefits of I1 agents. *J Hypertens Suppl.* 1998;16(3):S19-24.

Erdös B, Broxson CS, King MA, Scarpace PJ, Tümer N. 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.* 2006; 24(1): 109-16.

Ferguson AV, Renaud LP. Hypothalamic paraventricular nucleus lesions decrease pressor responses to subfornical organ stimulation. *Brain Res*. 1984; 305: 361-364.

Ferguson AV. The Subfornical Organ: A central integrator in the control of neurohypophysial hormone secretion. In: *Organization of the autonomic nervous system: Central and peripheral mechanisms.* 435-455. 1987. *Alan R. Liss, Inc.*

Ferguson AV, Kasting NW. Angiotensin acts at the subfornical organ to increase plasma oxytocin concentrations in the rat. *Regul Peptides*. 1988; 23: 343-352

Fischer-Ferraro C, Nahmod VE, Goldstein DJ, Finkielman S. Angiotensin and rennin in rat and dog brain. *J Exp Med*. 1971; 133: 353-361.

Fitzsimons JT. Angiotensin stimulation on the central nervous system. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 1980; 87: 117-167.

Fleegal MA, Sumners C. Drinking behavior elicited by central injection of angiotensin II: roles for protein kinase C and Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase II. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2003; 285(3):R632-40.

Floyd RA. Antioxidants, oxidative stress, and degenerative neurological disorders. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1999; 222(3): 236-45

Francis GS. The relationship of the sympathetic nervous system and the reninangiotensin system in congestive heart failure. *Am Heart J*. 1989; 118:642-648.

Fujita M, Ando K, Kawarazaki H, Kawarasaki C, Muraoka K, Ohtsu H, Shimizu H, Fujita T. Sympathoexcitation by brain oxidative stress mediates arterial pressure elevation in salt-induced chronic kidney disease. *Hypertension.* 2012; 59(1):105-112.

Fukai T, Siegfried MR, Ushio-Fukai M, Griendling KK, Harrison DG. Modulation of extracellular superoxide dismutase expression by angiotensin II and hypertension. *Circ Res*. 1999; 85:23-28.

Fukui T, Ishizaka N, Rajagopalan S, Laursen JB, Capers Q, Taylor WR, Harrison DG, de Leon H, Wilcox JN, Griendling KK. p22phox mRNA expression and NAD(P)H oxidase activity are increased in aortas from hypertensive rats. *Circ Res*. 1997; 80:45-51.

Ganong WF. Circumventricular organs: definition and role in the regulation of endocrine and autonomic function. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2000; 27:422-427.

Ganten D, Marquez-Julio A, Granger P, Hayduk K, Karsunky KP, Boucher R, Genest J. Renin in dog brain. *Am J Physiol*. 1971; 221:1733-1737.

Gao L, Wang W, Li YL, Schultz HD, Liu D, Cornish KG, Zucker IH. Superoxide mediates sympathoexcitation in heart failure: roles of angiotensin II and NAD(P)H oxidase. *Circ Res.* 2004; 95(9):937-944.

Gao L, Wang W, Li YL, Schultz HD, Liu D, Cornish KG, Zucker IH. Simvastatin therapy normalizes sympathetic neural control in experimental heart failure: roles of angiotensin II type 1 receptors and NAD(P)H oxidase. *Circulation.* 2005; 20;112(12):1763-1770.

Geiszt M, Kopp JB, Varnai P, Leto TL. Identification of renox, an NAD(P)H oxidase in kidney. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000; 97:8010-8014.

Goldstein DS. Clinical assessment of sympathetic responses to stress. *Ann N Y Acad Sci.* 1995; 771: 570-93.

Gorlach A, Brandes RP, Nguyen K, Amidi M, Dehghani F, Busse R. A gp91phox containing NAD(P)H oxidase selectively expressed in endothelial cells is a major source of oxygen radical generation in the arterial wall. *Circ Res*. 2000; 87: 26-32.

Grady EF, Sechi LA, Griffin CA, Schambelan M, Kalinyak JE. Expression of AT2 receptors in the developing rat fetus. *J Clin Invest*. 1991; 88(3):921-33.

Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW. Angiotensin II stimulates NADH and NAD(P)H oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Cir Res*. 1994; 74: 1141-1148.

Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res*. 2000a; 86: 494-501.

Griendling KK, Ushio-Fukai M. Reactive oxygen species as mediators of angiotensin II signaling. *Regul Pept.* 2000b; 91(1-3): 21-7.

Guyton AC, Coleman TG, Cowley AW, Liard JF, Norman RA, Manning RD, Jr. Systems analysis of arterial pressure regulation and hypertension. *Ann Biomed Eng*. 1972; 1: 254-281.

Guyton KZ, Gorospe M, Kensler TW, Holbrook NJ. Mitogen-activated protein kinase (MAPK) activation by butylated hydroxytoluene hydroperoxide: implications for cellular survival and tumor promotion. *Cancer Res*. 1996; 56(15):3480-5.

Harris ED, Regulation of antioxidant enzymes. *FASEB J.* 1992; 6:2675-2683,

Hay M, Edwards GL, Lindsley K, Murphy S, Sharma RV, Bhalla RC, Johnson AK. Increases in cytosolic Ca2+ in rat area postrema/mNTS neurons produced by angiotensin II and arginine-vasopressin. *Neurosci Lett*. 1993; 151: 121-125.

Hein L, Barsh G.S, Pratt RE, Dzau VJ, Kobilka BK. Behavioral and cardiovascular effects of disrupting the angiotensin II type-2 receptor in mice, *Nature.* 1995; 377: 744-747.

Hirasawa R, Hashimoto K, Ota Z. Role of central angiotensinergic mechanism in shaking stress-induced ACTH and catecholamine secretion. *Brain Res.* 1990; 533(1): 1-5.

Ho YS, Howard AJ, Crapo JD. Molecular structure of a functional rat gene for manganese-containing superoxide dismutase. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1991; 4: 278-286.

Hogarty DC, Speakman EA, Puig V, Phillips MI. The role of AT1 and AT2 receptors in the pressor, drinking and vasopressin responses to angiotensin II. *Brain Res.* 1992; 586: 389-395.

Höhle S, Spitznagel H, Rascher W, Culman J, Unger T. Angiotensin AT1 receptor-mediated vasopressin release and drinking are potentiated by an AT2 receptor antagonist . *Eur J Pharmacol*. 1995; 275: 277-282.

Hsu JL, Visner GA, Burr IA, Nick HS. Rat copper/zinc superoxide dismutase gene: Isolation, characterization and species comparison. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 186: 936-943.

Huang J, Brumell JH. NAD(P)H oxidases contribute to autophagy regulation. *Autophagy.* 2009;5(6).

Huang X.C, Richards E.M, Sumners C. Angiotensin II Type 2 receptor-mediated stimulation of protein phosphatase 2A in rat hypothalamic/brainstem neuronal cocultures". *J Neurochem*. 1995; 65: 2131-2137.

Huang BS, Leenen FH. Brain "ouabain" and angiotensin II in salt-sensitive hypertension in spontaneously hypertensive rats. Hypertension. 1996; 28(6): 1005-12.

Ichikawa I, Kiyama S, Yoshioka T. Renal antioxidant enzymes: their regulation and function. *Kidney Int.* 1994; 45: 1-9.

Imboden H, Harding JW, Hilgenfeldt U, Celio MR, Felix D. Localization of angiotensinogen in multiple cell types of rat brain. *Brain Res*. 1987; 410:74-77.

Israel A, Barbella Y, Saavedra JM. Compensatory increase in adrenomedullary angiotensin-converting enzyme activity (kininase II) after unilateral adrenalectomy. *Regul Pept.* 1986; 16(2): 97-105

Israel A, Strömberg C, Tsutsumi K, Garrido MR, Torres M, Saavedra JM. Angiotensin II receptor subtypes and phosphoinositide hydrolysis in rat adrenal medulla. *Brain Res Bull.* 1995; 38(5): 441-446.

Israel A, Arzola A, Varela Maider, De Jesus S. Role of oxidative stress in the natriuresis induced by intracerebroventricular administration of angiotensin II. *J Renin Angiotensin System.* 2009; 10(1): 9-14.

Ivancich A, Jouve HM, Sartor B, Gaillard J. EPR investigation of compound I in Proteus mirabilis and bovine liver catalases: formation of porphyrin and tyrosyl radical intermediates. *Biochemistry.* 1997; 36(31): 9356–9364.

Izumi Y, Kim S, Zhan Y, Namba M, Yasumoto H, Iwao H. Important role of angiotensin II-mediated c-Jun NH(2)-terminal kinase activation in cardiac hypertrophy in hypertensive rats. *Hypertension*. 2000; 36: 511-516.

Jensen LL, Harding JW, Wright JW. Role of paraventricular nucleus in control of blood pressure and drinking in rats. *Am J Physiol*. 1992; 262(6 pt 2): F1068-1075.

Jezova D, Ochedalski T, Kiss A, Aguilera G. Brain angiotensin II modulates sympathoadrenal and hypothalamic pituitary adrenocortical activation during stress. *J Neuroendocrinol.* 1998; 10(1): 67-72.

Jhamandas JH, Lind RW, Renaud LP. Angiotensin II may mediate excitatory neurotransmission from the subfornical organ to the hypothalamic supraoptic nucleus: an anatomical and electrophysiological study in the rat. *Brain Res*. 1989; 487:52-61.

Jindra AJR, Kvetnansky R. Stress-induced Activation of Inactive Renin. *J Biol Chem.*1982; 257(11): 5997-5999.

Johnson AK, Gross PM. Sensory circumventricular organs and brain homeostatic pathways. *FASEB Journal*. 1993; 7:678-686.

Johnson AK, Thunhorst RL. The neuroendocrinology of thirst and salt appetite: visceral sensory signals and mechanisms of central integration. *Frontiers Neuroendocrinol*. 1997; 18:292-353.

Johnson RF, Beltz TG, Sharma RV, Xu Z, Bhatty RA, Johnson AK. Agonist activation of cytosolic Ca2+ in subfornical organ cells projecting to the supraoptic nucleus. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2001; 280:R1592-R1599.

Jones SA, O'Donnell VB, Wood JD, Broughton JP, Hughes EJ, Jones OT. Expression of phagocyte NAD(P)H oxidase components in human endothelial cells. *Am J Phys*. 1996; 271:H1626-H1634.

Jun Ming Wang, Slembrouck D, Junhui Tan, Arckens L, Frans HH. Leenen, Pierre J. Courtoy, Werner P. De Potter. Presence of cellular renin-angiotensin system in chromaffin cells of bovine adrenal medulla. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002; 283: 1811-1818.

Kagiyama T, Kagiyama T, Phillips MI. Expression of angiotensin type 1 and type 2 receptors in brain after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Reg Pept*. 2003; 110: 241–247.

Kambayashi Y, Bardhan S, Takahashi K, Tsuzuki S, Inui H, Hambuko T, Inagami T. Molecular cloning of a novel angiotensin II receptor isoform involved in phosphotirosine phosphatase inhibition. *J Biol Chem.* 1993; 268: 24543-24545.

Kang J, Posner P, Sumners C. Angiotensin II type 2 receptor stimulation of neuronal K- currents involves an inhibitory GTP binding protein. *Am J Physiol.* 1994; 267: C1389-C1397.

Kang J, Richards EM, Posner P, Sumners C. Modulation of the delayed rectifier K+ current in neurons by an angiotensin II type 2 receptor fragment. *Am J Physiol.* 1995; 268: C278-C282.

Kario K, McEwen BS, Pickering TG. Disasters and the heart: a review of the effects of earthquake-induced stress on cardiovascular disease. *Hypertens Res.* 2003; 26(5): 355-67.

Kawazoe T, Kosaka H, Yoneyama H, Hata Y. Acute production of vascular superoxide by angiotensin II but not by catecholamines. *J Hypertens.* 2000;18(2):179-185.

Keller-Wood ME, Shinsako J, Dallman MF. Inhibition of the adrenocorticotropin and corticosteroid responses to hypoglycemia after prior stress. *Endocrinology*. 1983;113(2):491-496.

Kehrer JP. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Crit Rev Toxicol.* 1993; 23, 21–48

Kotani E, Sugimoto M, Kamata H, Fujii N, Saitoh M, Usuki S, Kubo T, Song K, Miiyazaki M, Murakami K, Miyazaki H. Biological roles of angiotensin II via its type 2 receptor during rat follicle atresia. *Am J Physiol.* 1999; 276: E25-E33.

Krukoff TL. Central actions of nitric oxide in regulation of autonomic functions. *Brain Res.* 1999; 30(1):52-65.

Kubo T, Numakura H, Endo S, Hagiwara Y, Fukumori R. Angiotensin receptor blockade in the anterior hypothalamic area inhibits stress-induced pressor responses in rats. *Brain Res Bull.* 2001; 56(6): 569-74.

Kumanogoh H, Miyata S, Sokawa Y, Maekawa S. Biochemical and morphological analysis on the localization of Rac1 in neurons. *Neurosci Res.* 2001; 39(2): 189-96.

Landas S, Phillips MI. Comparative anatomy of the organum vasculosum of the lamina terminalis. Circumventricular Organs and Body Fluids. Edited by CRC Press. 1987. pp 131-156.

Landmesser U, Harrison DG. Oxidative stress and vascular damage in hypertension. *Coron Artery Dis*. 2001; 12:455-461.

Landmesser U, Cai H, Dikalov S, McCann L, Hwang J, Jo H, Holland SM, Harrison DG. Role of p47(phox) in vascular oxidative stress and hypertension caused by angiotensin II. *Hypertension*. 2002; 40: 511-515.

Lassegue B, Sorescu D, Szocs K, Yin Q, Akers M, Zhang Y, Grant SL, Lambeth JD, Griendling KK. Novel gp91(phox) homologues in vascular smooth muscle cells: nox1 mediates angiotensin II-induced superoxide formation and redoxsensitive signaling pathways. *Circ Res*. 2001; 88: 888-894.

Lassègue B, Clempus RE. Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2003; 85(2):R277-97.

Laursen JB, Rajagopalan S, Galis Z, Tarpey M, Freeman BA, Harrison DG. Role of superoxide in angiotensin II-induced but not catecholamine-induced hypertension. *Circulation*. 1997; 95: 588-593.

Lawrence RA, Burk RF. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem.Biophys.Res.Commun*. 1976; 71: 952-958.

Lawrence A. Leiter and Richard Z. Lewanczuk. Of the Renin-Angiotensin System and Reactive Oxygen Species. *AJH.* 2005; 18: 121–128.

Lazartigues E, Dunlay SM, Loihl AK, Sinnayah P, Lang JA, Espelund JJ, Sigmund CD, Davisson RL. Brain-selective overexpression of angiotensin (AT1) receptors causes enhanced cardiovascular sensitivity in transgenic mice. *Circ Res*. 2002; 90: 617-624.

Leiter L A, Lewanczu K R Z. Of the rennin-angiotensin system and reactive oxygen species type 2 diabetes and angiotensin II inhibition. *Am J Hypertens.* 2005; 18(1):121-8.

Lenkei Z, Corvol P, Llorens-Cortes C. The angiotensin receptor subtype AT1A predominates in rat forebrain areas involved in blood pressure, body fluid homeostasis and neuroendocrine control. *Brain Res*. 1995; 30: 53-60.

Lenkei Z, Palkovits M, Corvol P, Llorens-Cortes C. Expression of angiotensin type-1 (AT1) and type-2 (AT2) receptor mRNAs in the adult rat brain: a functional neuroanatomical review. *Front Neuroendocrinol*. 1997; 18: 383-439.

Leto TL, Lomax KJ, Volpp BD, Nunoi H, Sechler JM, Nauseef WM, Clark RA, Gallin JI, Malech HL. Cloning of a 67-kD neutrophil oxidase factor with similarity to a noncatalytic region of p60c-src. *Science*. 1990; 248: 727-730.

Leong DS, Terron JA, Falcon-Neri A, Armando I, Ito T, Johren O, Tonelli LH, Hoe K-L, Saavedra JM. Restraint stress modulates brain, pituitary and adrenal

expression of angiotensin II AT1A, AT1B and AT2 receptors. *Neuroendocrinol.* 2002; 75:227–240.

Li JS, Touyz R.M, Schiffrin EL. Effects of AT1 and AT2 angiotensin receptor antagonists in angiotensin II-infused rats. *Hypertension.* 1998; 31: 487-492.

Li Z, Ferguson AV. Angiotensin II responsiveness of rat paraventricular and subfornical organ neurons in vitro. *Neuroscience*. 1993; 55: 197-207.

Li Z, Mao HZ, Abboud FM, Chapleau MW. Oxygen-derived free radicals contribute to baroreceptor dysfunction in atherosclerotic rabbits. *Circ Res*. 1996; 79: 802-811.

Lilach O. Lerman, Alejandro R. Chade, Vincenzo Sica, Claudio Napoli. Animal models of hypertension: An overview. *J Lab Clin Med*. 2005; 146: 160–173.

Lind RW, Johnson AK. Subfornical organ-median preoptic connections and drinking and pressor responses to angiontensin II. *J Neurosci.* 1982; 2: 1043-1051.

Lind RW, Swanson LW, Ganten D. Organization of angiotensin II immunoreactive cells and fibers in the rat central nervous system. An immunohistochemical study. *Neuroendocrinology*. 1985; 40: 2-24.

Lind RW. Bi-directional, chemically specified neural connections between the subfornical organ and the midbrain raphe system. *Brain Res*. 1986; 384:250-261.

Lindley TE, Doobay MF, Sharma RV, Davisson RL. Superoxide is involved in the central nervous system activation and sympathoexcitation of myocardial infarction-induced heart failure. *Circ Res.* 2004; 94(3):402-9.

Liu KL, Lo M, Grouzmann E, Mutter M, Sassard J. The subtype 2 of angiotensin II receptors and pressure-natriuresis in adult rat kidneys. *Br J Pharmacol.* 1999; 126: 826-832.

Llewellyn-Smith IJ. Anatomy of synaptic circuits controlling the activity of sympathetic preganglionic neurons. *J Chem Neuroanat.* 2009; 38(3): 231-9.

Lovallo WR, Gerin W. Psychophysiological reactivity: mechanisms and pathways to cardiovascular disease. *Psychosom Med.* 2003; 65(1): 36-45.

Lowry ON, Rosebrough NH, Farr AL, Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; 193: 265-257.

Lowry CA, Plant A, Shanks N, Ingram CD, Lightman SL. Anatomical and functional evidence for a stress-responsive, monoamine-accumulating area in the dorsomedial hypothalamus of adult rat brain. *Horm Behav*. 2003; 43, 254–262.

Lu N, Helwig BG, Fels RJ, Parimi S, Kenney MJ. Central Tempol alters basal sympathetic nerve discharge and attenuates sympathetic excitation to central ANG II. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004; 287(6): H2626-33.

Lv P, Miao SB, Shu YN, Dong LH, Liu G, Xie XL, Gao M, Wang YC, Yin YJ, Wang XJ, Han M. Phosphorylation of smooth muscle 22α facilitates angiotensin II-induced ROS production via activation of the PKCδ-P47phox axis through release of PKCδ and actin dynamics and is associated with hypertrophy and hyperplasia of vascular smooth muscle cells in vitro and in vivo. Circ Res. 2012;111(6):697-707.

Livett BG, Marley PD, Wan DC, Zhou XF. Peptide regulation of adrenal medullary function. *J Neural Transm Suppl.* 1990; 29:77-89.

Mangiapane ML, Simpson JB. Subfornical organ: forebrain site of pressor and dipsogenic action of angiotensin II. *Am J Physiol*. 1980; 239: R382-R389.

Masaki H, Kurihar T, Yamaki A, Inomata N, Nozawa Y, Mori Y, Murasawa S, Kizima K, Maruyana K, Horiuchi M, Dzau VJ, Takahashi I.T, Iwasaka T, Matsubara H. Cardiac-specific overexpression of angiotensin II receptors causes attenuated response to AT1 receptor-mediated pressor and chronotropic effect. *J Clin Invest.* 1998; 101: 527-535.

Maser RL, Magenheimer BS, Calvet JP. Mouse plasma glutathione peroxidase. cDNA sequence analysis and renal proximal tubular expression and secretion. *J Biol Chem*. 1994; 269: 27066-27073.

Mayorov DN, Head GA. AT1 receptors in the RVLM mediate pressor responses to emotional stress in rabbits. *Hypertension.* 2003; 41(5): 1168-73.

Mazur-Ruder M, Feuerstein G, Roll D, Gutman Y. Selective reduction of adrenal medulla response to angiotensin induced by suppression of renin-angiotensin. *Eur J Pharmacol.* 1979; 59(3-4): 261-6.

McCord JM, Fridovich I: Superoxide dismutase. An enzymic function for erithrocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem.* 1969; 244: 6049-6055.

McDougall SJ, Widdop RE, Lawrence AJ. Medial prefrontal cortical integration of psychological stress in rats. *Eur J Neurosci.* 2004; 20, 2430–2440.

McDougall SJ, Widdop RE, Lawrence AJ. Central autonomic integration of psychological stressors: focus on cardiovascular modulation. *Auton Neurosci.* 2005; 123(1-2): 1-11.

McKenzie JC, Naruse K, Inagami T. The renin-angiotensin system in the rat anterior pituitary: colocalization of renin and angiotensin II in gonadotrophs. *Anat Rec.* 1985; 212(2): 158-66.

McKinley M.J, Rundgren M, Coghlan J.P. Cerebral osmoregulatory reduction of plasma renin concentration in sheep. *Acta Physiol Scand.* 1994; 152: 323-332.

McKinley MJ, Badoer E, Vivas L, Oldfield BJ. Comparison of c-fos expression in the lamina terminalis of conscious rats after intravenous or intracerebroventricular angiotensin. *Brain Res Bull*. 1995; 37: 131-137.

McKinley MJ, Albiston AL, Allen AM, Mathai ML, May CN, McAllen RM, Oldfield BJ, Mendelsohn FAO, Chai SY. The brain renin–angiotensin system: location and physiological roles. *International J Biochem Cell Biol*. 2003; 35(6): 901-918.

Medina I, Israel A. Efecto del eprosartan, un antagonista selectivo del receptor AT1, sobre la respuesta cardiovascular inducida por el estrés en ratas. *Revista Facultad de Farmacia. 2004;* 67(1-2): 18-23.

Mendelsohn FA. Angiotensin II is concentrated or locally produced in rat adrenal gland. *Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl.* 1982; 7: 3-7.

Miao L, St Clair DK. Regulation of superoxide dismutase genes: implications in disease. *Free Radic Biol Med.* 2009; 47(4): 344-56.

Miselis RR. The efferent projections of the subfornical organ of the rat: a circumventricular organ within a neural network subserving water balance. *Brain Res*. 1981; 230: 1-23.

Mizuno K, Ojima M, Hashimoto S, Watari H, Tani M, Satoh M, Fukuchi S. Multiple forms of immunoreactive renin in human pituitary tissue. *Life Sci.* 1985; 37(24): 2297-304.

Moldovan L, Mythreye K, Goldschmidt-Clermont PJ, Satterwhite LL. Reactive oxygen species in vascular endothelial cell motility. Roles of NAD(P)H oxidase and Rac1. *Cardiovasc Res.* 2006; 71(2): 236-46.

Mollnau H, Wendt M, Szöcs K, Lassègue B, Schulz E, Oelze M, Li H, Bodenschatz M, August M, Kleschyov A, Tsilimingas N, Walter U, Förstermann U, Meinertz T, Griendling K, Münzel T. Effects of Angiotensin II Infusion on the Expression and Function of NAD(P)H Oxidase and Components of Nitric Oxide/cGMP Signaling. *Circ Res*. 2002; 90:e58-e65.

Morgan JM, Routtenberg A. Angiotensin injected into the neostriatum after learning disrupts retention performance. *Science.* 1977; 196: 87-89.

Morimoto S, Cassell MD, Beltz TG, Johnson AK, Davisson RL, Sigmund CD. Elevated blood pressure in transgenic mice with brain-specific expression of

human angiotensinogen driven by the glial fibrillary acidic protein promoter. *Circ Res*. 2001; 89: 365-372.

Mullins JJ, Ganten D. Transgenic animals: new approaches to hypertension research. *J Hypertens Suppl.* 1990; 8(7): S35-7.

Mumby MC, Walter G. Protein serine/threonine phosphatases: structure, regulation and functions in cell growth. *Physiol Rev*. 1993; 73: 673-699.

Nahmias C, Cazaubon S.M, Briend-Sutren M.M, Lazard D, Villageois P, Strosberg A.D. Angiotensin II AT2 receptors are functionally coupled to protein tyrosine dephosphorylation in N1E-115 neuroblastoma cells. *Biochem J.* 1995; 306: 87-92.

Nakagami H, Takemoto M, Liao JK. NAD(P)H oxidase-derived superoxide anion mediates angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol*. 2003; 35: 851-859.

Nakajima M, Hutchinson HG, Fujinaga M, Hayashida W, Morishita R, Zhang L, Horiuchi M, Pratt RE, Dzau VJ. The angiotensin II type 2 (AT2) receptor antagonizes the growth effects of the AT1 receptor: gain-of-function study using gene transfer. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995; 92(23):10663-7.

Nakamura KT, Ayres NA, Gomez RA, Robillard JE. Renal responses to hypoxemia during renin-angiotensin system inhibition in fetal lambs. *Am J Physiol.* 1985; 249(1 Pt 2): R116-24.

Naruse M, Naruse K, Kurimoto F, Sakurai H, Yoshida S, Toma H, Ishii T, Obana K, Demura H, Inagami T. Evidence for the existence of des-Asp1-angiotensin II in human uterine and adrenal tissues. *J Clin Endocrinol Metab.* 1985; 61(3): 480-3.

Naveri L, Stromberg, C, Saavedra JM. Angiotensin II AT_2 receptor stimulation extends the upper limit of cerebral blood flow autoregulation: agonistic effects of CGP 42112 and PD 123319. *J. Cereb Blood Flow Metab.* 1994; 14(1): 38-44.

Nio Y, Matsubara H, Murasawa S, Kanasaki M, Inada M. Regulation of gene transcription of angiotensin II receptor subtypes in myocardial infarction. *J Clin Invest.* 1995; 95(1):46-54.

Nouet S, Nahmias, C. Signal transduction from the angiotensin II AT_2 receptor. *Trends Endocrinol. Metabol*. 2000; 11: 1-6.

Oberley LW, Spitz DR: Assay of superoxide dismutase activity in tumor tissue. *Meth Enzymol*. 1984; 105: 457-464.

Obermüller N, Unger T, Culman J, Gohlke P, de Gasparo M, Bottari SP. Distribution of angiotensin II receptor subtypes in rat brain nuclei. *Neurosci Lett.* 1991;132(1):11-5.

Ohtsu H, Frank G, Utsunomiya H, Eguchi S. Redox-Dependent Protein Kinase Regulation by Angiotensin II: Mechanistic Insights and Its Pathophysiology. *Antioxid. Redox Signal.* 2005; 7:1315-1326.

Okamura T, Clemens DL, Inagami T. Renin, angiotensins, and angiotensin-converting enzyme in neuroblastoma cells: evidence for intracellular formation of angiotensins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981; 78(11): 6940-3.

Okamura T, Clemens DL, Inagami T. Generation of angiotensins in cultured pheochromocytoma cells. *Neurosci Lett.* 1984; 46(2): 151-6.

Okuyama S. Anxiety-like behaviour in mice lacking the angiotensin II type-2 receptor. *Brain Res*. 1999; 821: 150-159.

Oldfield BJ, Hards DK, McKinley MJ. Projections from the subfornical organ to the supraoptic nucleus in the rat: ultrastructural identification of an interposed synapse in the median preoptic nucleus using a combination of neuronal tracers. *Brain Research*. 1991; 558(1): 13-19.

Oury TD, Day BJ, Crapo JD. Extracellular superoxide dismutase: A regulator of nitric oxide bioavailability. *Lab Invest*. 1996; 75: 617-636.

Page K, Li J, Hodge JA, Liu PT, Vanden Hoek TL, Becker LB, Pestell RG, Rosner MR, Hershenson MB. Characterization of a Rac1 signaling pathway to cyclin D(1) expression in airway smooth muscle cells. *J Biol Chem*. 1999; 274: 22065-22071.

Palm F, Onozato M, Welch WJ, Wilcox CS.Blood pressure, blood flow, and oxygenation in the clipped kidney of chronic 2-kidney, 1-clip rats: effects of tempol and Angiotensin blockade. Hypertension. 2010; 55(2):298-304.

Pandey KN, Inagami T. Regulation of renin angiotensins by gonadotropic hormones in cultured murine Leydig tumor cells. Release of angiotensin but not renin. *J Biol Chem.* 1986; 261(9): 3934-8.

Paul M, Bader M, Steckelings UV, Voigtländer T, Ganten D. The renin-angiotensin system in the brain: localization and functional significance. *Drug Res*. 1993; 43(I-2a): 207-213.

Pauline M. Smith, Jaideep S. Bains and Alastair V. Ferguson. Long duration pressor responses following activation of subfornical organ neurons in rats are the result of increased circulating vasopressin. *Neuroscience Letters*. 1997; 233(2-3): 81-84.

Pedreanez, Jose Luis Arcaya, Edgardo Carrizo, Jesus Mosquera. Forced swimming test increases superoxide anion positive cells and angiotensin II positive cells in the cerebrum and cerebellum of the rat. *Brain Res Bull*. 2006; 71: 8–22.

Peng S, Phillips MI. Opposite regulation of brain angiotensin type 1 and type 2 receptors in cold-induced hypertension. *Reg Peptides*. 2001; 97: 91–102.

Peterson JR, Ram V, Sharma W, Robin LD. Reactive Oxygen Species in the Neuropathogenesis of Hypertension. *Current Hypertension Reports*. 2006; 8: 232-241.

Peterson JR, Burmeister MA, Tian X, Zhou Y, Guruju MR, John A. Stupinski JA, Sharma RV, Davisson RL. Genetic Silencing of Nox2 and Nox4 Reveals Differential Roles of These NADPH Oxidase Homologues in the Vasopressor and Dipsogenic Effects of Brain Angiotensin II. *Hypertension.* 2009; 54: 1106-1114.

Phillips MI. Functions of angiotensin in the central nervous system. *Annu Rev Physiol.* 1987; 49: 413–435.

Phillips MI, Speakman EA, Kimura B. Levels of angiotensin and molecular biology of the tissue renin angiotensin systems. *Regul Pept.* 1993; 43: 1-20.

Phillips MI, Sumners C. Angiotensin II in central nervous system physiology. *Regul Peptides*. 1998; 78: 1-11.

Phillips MI, Menezes de Oliveira E. Brain renin angiotensin in disease. *J Mol Med.* 2008; 86: 715–722

Plunkett LM, Correa FM, Saavedra JM. Quantitative autoradiographic determination of angiotensin-converting enzyme binding in rat pituitary and adrenal glands with 125I-351A, a specific inhibitor. *Regul Pept.* 1985; 12(4): 263-72.

Plunkett LM, Shigematsu K, Kurihara M, Saavedra JM. Localization of angiotensin II receptors along the anteroventral third ventricle area of the rat brain. *Brain Research*. 1987; 405(2): 205-212.

Pou S, PouWS, Bredt DS, Snyder SH, Rosen GM Generation of superoxide by purified brain nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 1992; 267, 24173–24176.

Pushpa-Rekha TR, Burdsall AL, Oleksa LM, Chisolm GM, Driscoll DM: Rat phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase. cDNA cloning and identification of multiple transcription and translation start sites. *J Biol Chem.* 1995; 270: 26993-26999.

Qadri F, Veltmar A, Culman J, Maas K, Rasher W, Unger T. Angiotensin II activates α1-adrenoceptors in the supraoptic nucleus to release vasopressin. *J. Hypertens.*, 1992; 10(4): S12.

Raizada MK, Lu D, Tang W, Kurian P, Sumners C. Increased angiotensin II type-1 receptor gene expression in neuronal cultures from spontaneously hypertensive rats. *Endocrinology*. 1993; 132: 1715-1722.

Rajagopalan S, Kurz S, Munzel T, Tarpey M, Freeman BA, Griendling KK, Harrison DG. Angiotensin IImediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. *J Clin Invest* 1996; 97, 1916–1923.

Reagan L.P, Flanagan-Cato L.M, Yee D.K, Ma L.Y, Sakay R.R, Fluharty S.J. Immunohistochemical mapping of angiotensin type 2 (AT2) receptors in rat brain. *Brain Res*. 1994; 662(1-2): 45-59.

Rees C, Kennett M, Whitelock J, Davies. Oxidative damage to extracellular matrix and its role in human pathologies. *Free Radical Biol Med*. 2008; 44: 1973–2001.

Richards EM, Raizada MK, Gelband CH, Sumners C. Angiotensin II type 1 receptor-modulated signaling pathways in neurons. *Mol Neurobiol.* 1999; 19(1): 25-41.

Roth RH, Hughes J. Acceleration of protein synthesis by angiotensin--correlation with angiotensin's effect on catecholamine biosynthesis. *Biochem Pharmacol.* 1972; 21(23): 3182-7.

Rozanski A, Blumenthal JA, Kaplan J. Impact of psychological factors on the pathogenesis of cardiovascular disease and implications for therapy. *Circulation.* 1999; 99(16): 2192-217.

Saavedra JM, Correa FM, Kurihara M, Shigematsu K. Increased number of angiotensin II receptors in the subfornical organ of spontaneously hypertensive rats. *J Hyperten - Supplement*. 1986; 4:S27-S30.

Saavedra JM. Brain and pituitary angiotensin. *Endocr Rev.* 1992; 13(2): 329-80.

Saavedra JM, Ando H, Armando I, Baiardi G, Bregonzio C, Jezova M, Zhou J. Brain angiotensin II, an important stress hormone: regulatory sites and therapeutic opportunities. *Ann N Y Acad Sci.* 2004; 1018: 76-84.

Saavedra JM. Brain Angiotensin II: New Developments, Unanswered Questions and Therapeutic Opportunities. *Cell Molec Neurobiol.* 2005; 25(3/4): 485-512.

Saiki Y, Watanabe T, Tan N, Matsuzaki M, Nakamura S. Role of central ANG II receptors in stress-induced cardiovascular and hyperthermic responses in rats. *Am J Physiol.* 1997; 272(1 Pt 2): R26-33.

Salles JP, Gayral-Taminh M, Fauvel J, Delobbe I, Mignon-Conte M, Conte JJ, Chap H. Sustained effect of angiotensin II on tyrosine phosphorylation of annexin I in glomerular mesangial cells . *J Biol Chem.* 1993; 268: 12805-12811.

Seltzer A, Bregonzio C, Armando I, Baiardi G, Saavedra JM. Oral administration of an AT1 receptor antagonist prevents the central effects of angiotensin II in spontaneously hypertensive rats. *Brain Res.* 2004; 1028(1): 9-18.

Seshiah P, Weber D, Rocic P, Valppu L, Taniyama Y, Griendling K. Angiotensin II Stimulation of NAD(P)H Oxidase Activity Upstream Mediators. *Circ Res* 2002; 91:406-413.

Schnackenberg CG, Welch WJ, Wilcox CS. Normalization of blood pressure and renal vascular resistance in SHR with a membrane-permeable superoxide dismutase mimetic: role of nitric oxide. *Hypertension*. 1998; 32: 59-64.

Schumacker PT. Angiotensin II Signaling in Brain: Compartmentalization of Redox Signaling. *Circ. Res.* 2002; 91: 982-984.

Sedeek M, Hébert RL, Kennedy CR, Burns KD, Touyz RM. Molecular mechanisms of hypertension: role of Nox family NAD(P)H oxidases. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2009; 18(2): 122-7.

Segal AW, Heyworth PG, Cockcroft S, Barrowman MM. Stimulated neutrophils from patients with autosomal recessive chronic granulomatous disease fail to phosphorylate a Mr-44,000 protein. *Nature*. 1985; 316: 547-549.

Serrano F, Kolluri NS, Wientjes FB, Card JP, Klann E. NAD(P)H oxidase immunoreactivity in the mouse brain. *Brain Res.* 2003; 988(1-2): 193-8.

Severs W, Summy-Long J, Taylor J. A central effect of angiotensin: release of pituitary pressor material. *J Pharmacol Exp Ther*. 1970; 74: 27-34.

Shanmugam P, Valente AJ, Prabhu SD, Venkatesan B, Yoshida T, Delafontaine P, Chandrasekar B. Angiotensin-II type 1 receptor and NOX2 mediate TCF/LEF and CREB dependent WISP1 induction and cardiomyocyte hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol.* 2011; 50(6):928-38.

Shastri S, Gopalakrishnan V, Poduri R, DiWang H. Tempol selectively attenuates angiotensin II evoked vasoconstrictor responses in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens.* 2002; 20, 1381–1391.

Shatwell KP, Segal AW. NAD(P)H oxidase. *Int J Biochem Cell Biol*. 1996; 28: 1191-1195.

Shekhar A, Johnson PL, Sajdyk TJ, Fitz SD, Keim SR, Kelley PE, Gehlert DR, DiMicco JA. Angiotensin-II is a putative neurotransmitter in lactate-induced panic-

like responses in rats with disruption of GABAergic inhibition in the dorsomedial hypothalamus. *J Neurosci.* 2006; 26, 9205–9215.

Shepherd JT, and Vanhoutte PM. George E. Brown memorial lecture. Local modulation of adrenergic neurotransmission. *Circulation*. 1981; 64(4): 655-66.

Shigematsu K, Saavedra JM, Plunkett LM, Kurihara M, Correa FMA. Angiotensin II binding sites in the anteroventral-third ventricle (AV3V) area and related structures of the rat brain. *Neurosc Letters*. 1986; 67(1): 37-41.

Silva S, Pastorello M, Arzola J, Zavala L, De Jesus S, Varela M, Matos M, Garrido MR and Israel A. AT_1 receptor and NAD(P)H oxidase mediate angiotensin II-stimulated antioxidant enzymes activity and mitogen activated kinase activity in the rat hypothalamus. *J Renin Angiotensin System*. 2010; 11(4):234-242.

Simpson JB, Routtenberg A. Subfornical organ: Site of drinking elicited by angiotensin II. *Science*. 1973; 181: 1172-1175.

Simpson JB. The circumventricular organs and the central actions of angiotensin. *Neuroendocrinology*. 1981; 32:248-256.

Siragy H.M, Inagamy T, Ichiki T, Carey R.M. Sustained hypersensitivity to angiotensin II and its mechanism in mice lacking the subtype-2 (AT2) angiotensin receptor", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.,* 1999; 96: 6506-6510.

Sirett N.E. Localization of immunoreactive angiotensin II in the hippocampus and striatum of rat brain. *Brain Res*. 1981; 217(2): 405-411.

Smith MA, Harris PL, Sayre LM, Perry G. Iron accumulation in Alzheimer disease is a source of redox-generated free radicals. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997; 94(18):9866-8.

Sohn HY, Raff U, Hoffman A,Gloe T, Heermeier K, Galle J, Pohl U. Differential role of angiotensin II receptor subtypes on endothelial superoxide formation. *British J Pharmacol* 2000; 131: 667-672.

Sosa B e Israel A. Papel permisivo de la angiotensina II en la respuesta simpática al estrés. *Arch Venezol Farmacol Terap*. 2002; 21(1): 47-52.

Sorescu D, Griendling KK. Reactive oxygen species, mitochondria, and NAD(P)H oxidases in the development and progression of heart failure. *Congest Heart Fail*. 2002; 8: 132-140

Spallholz JE. Selenium and glutathione peroxidase: essential nutrient and antioxidant component of the immune system, in Antioxidant Nutrients and Immune

Functions, edited by Bendich A, Phillips M, Tengerdy RP Plenum Publishing Corporation, 1990, pp 145-158.

Speth RC, Rowe BP, Grove KL, Carter MR, Sailor D. Sulfhydryl reducing agents distinguish two subtypes of angiotensin II receptors in rat brain. *Brain Res.* 1991; 548(1-2): 1-8.

Steckelings M, Bottari S, Unger T. Angiotensin receptor subtypes in the brain. *TIPS* 1992; 13: 365-368.

Stoll M, Steckelings M, Bottari S.P, Metzeger R, Unger T. The angiotensin AT2-receptor mediates inhibition of cell proliferation in coronary endothelial cells. *J Clin Invest.* 1995; 95: 651-657.

Strömberg C, Naveri L, Saavedra J.M. Angiotensin AT2 receptors regulate cerebral blood flow in rats. *Neuroreport.* 1992; 3(8): 703-704.

Stotz-Potter EH, Willis LR, DiMicco JA. Muscimol acts in dorsomedial but not paraventricular hypothalamic nucleus to suppress cardiovascular effects of stress. *J Neurosci*. 1996; 16, 1173–1179.

Suh YA, Arnold RS, Lassegue B, Shi J, Xu X, Sorescu D, Chung AB, Griendling KK, Lambeth JD. Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1. *Nature*. 1999; 401: 79-82.

Sumimoto H, Sakamoto N, Nozaki M, Sakaki Y, Takeshige K, Minakami S. Cytochrome b558, a component of the phagocyte NAD(P)H oxidase, is a flavoprotein. *Biochem Biophys Res Commun*. 1992; 186: 1368-1375.

Sumners C, Tang W, Zelezna B, Raizada MK. Angiotensin II receptor subtypes are coupled with distinct signal-transduction mechanisms in neurons and astrocytes from rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991; 88(17):7567-71.

Sumners C, Raizada MK, Kang J, Lu D, Posner P. Receptor-mediated effects of angiotensin II on neurons. *Front Neuroendocrinol.*1994; 15(3): 203-30.

Sumners C, Zhu M, Gelband CH, Posner P. Angiotensin II type 1 receptor modulation of neuronal K+ and Ca2+ currents: intracellular mechanisms. *Am J Physiol*. 1996; 271: C154-C163.

Sumners C, Fleegal MA, Zhu M. Angiotensin AT1 receptor signalling pathways in neurons. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2002; 29: 483-490.

Sun C, Sellers KW, Sumners C, Raizada MK. NAD(P)H oxidase inhibition attenuates neuronal chronotropic actions of angiotensin II. *Circ Res*. 2005; 96(6): 659-66.

Suvara KW, Bauer JA. Oxidative pathways in cardiovascular disease Roles, mechanisms, and therapeutic implications. *Pharmacology & Therapeutics*. 2001; 89: 187± 206

Suzukawa K, Miura K, Mitsushita J, Resau J, Hirose K, Crystal R, Kamata T. Nerve growth factor-induced neuronal differentiation requires generation of Rac1-regulated reactive oxygen species. *J Biol Chem.* 2000; 275(18): 13175-8.

Swanson LW, Lind RW. Neural projections subserving the initiation of a specific motivated behavior in the rat: new projections from the subfornical organ. *Brain Res*. 1986; 379: 399-403.

Tain YL, Hsu CN, Huang LT, Lau YT. Apocynin attenuates oxidative stress and hypertension in young spontaneously hypertensive rats independent of ADMA/NO pathway. *Free Radic Res.* 2012;46(1):68-76.

Takekoshi K, Ishii K, Kawakami Y, Isobe K, Nakai T. Activation of angiotensin II subtype 2 receptor induces catecholamine release in an extracellular Ca(2+)-dependent manner through a decrease of cyclic guanosine 3',5'-monophosphate production in cultured porcine adrenal medullary chromaffin Cells. *Endocrinology.* 2001; 142(7): 3075-86.

Takekoshi K, Ishii K, Shibuya S, Kawakami Y, Isobe K, Nakai T. Angiotensin II type 2 receptor counter-regulates type 1 receptor in catecholamine synthesis in cultured porcine adrenal medullary chromaffin cells. *Hypertension*. 2002; 39(1):142-8.

Tammariello SP, Quinn MT, Estus S. NAD(P)H oxidase contributes directly to oxidative stress and apoptosis in nerve growth factor-deprived sympathetic neurons. *J Neurosci.* 2000; 20(1): RC53.

Tsutsumi K, Saavedra JM. Characterization and development of angiotensin II receptor subtypes (AT1 y AT2) in rat brain". Am. J. Physiol., 1992; 261: H667-H670.

Tsuzuki S, Ichiki T, Nakakubo H, Kitami Y, Guo DF, Shirai H, Inagami T. Molecular cloning and expression of the gene encoding human angiotensin II type 2 receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994; 200: 1449-54.

Ueda S, Masutani H, Nakamura H, Tanaka T, Ueno M, Yodoi J. Redox control of cell death. *Antioxid Redox Signal*. 2002; 4: 405-414.

Unger T, Horst PJ, Bauer M, Demmert G, Retting R, Rohmeiss P. Natriuretic action of central angiotensin II in conscious rats. *Brain Res.* 1989; 486: 33-38.

Unger,T, Chung O, Csikos T, Culman J, Gallinat S, Gohlke P, Höhle S, Meffert S, Stoll M, Stroth U, Zhu, Y-Z. Angiotensin receptors. *J. Hypertension*. 1996; 14 (5): S95-S103.

Ushio-Fukai M, Zafari AM, Fukui T, Ishizaka N, Griendling KK. p22phox is a critical component of the superoxide-generating NADH/NAD(P)H oxidase system and regulates angiotensin II-induced hypertrophy in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*. 1996; 271: 23317-23321.

Vetrano AM, Heck DE, Mariano TM, Mishin V, Laskin DL, Laskin JD. Characterization of the Oxidase Activity in Mammalian Cabalase. *J Biol Chem.* 2005; 280(42): 35372–35381.

Vignais PV. The superoxide-generating NAD(P)H oxidase: structural aspects and activation mechanism. *Cell Mol Life Sci*. 2002; 59: 1428-1459.

Wada A, Ueda S, Masumori-Maemoto S, Kuji N, Sugimoto K, Umemura S. Angiotensin II attenuates the vasodilating effect of a nitric oxide donor, glyceryl trinitrate: roles of superoxide and angiotensin II type 1 receptors. *Clin Pharmacol Ther*. 2002; 71:440-447.

Walder CE, Green SP, Darbonne WC, Mathias J, Rae J, Dinauer MC, Curnutte JT, Thomas GR. Ischemic stroke injury is reduced in mice lacking a functional NAD(P)H oxidase. *Stroke.* 1997; 28(11): 2252-8.

Wang D, Gelband CH, Sumners C, Posner P. Mechanisms underlying the chronotropic effect of angiotensin II on cultured neurons from rat hypothalamus and brain stem. *J Neurophysiol*. 1997;78:1013-1020.

Wang G, Anrather J, Huang J, Speth RC, Pickel VM, Iadecola C. NADPH oxidase contributes to angiotensin II signaling in the nucleus tractus solitarius. *J Neurosci.* 2004; 24(24): 5516-24.

Watanabe T, Fujioka T, Hashimoto M, Nakamura S. Stress and brain angiotensin II receptors. *Crit Rev Neurobiol.* 1998; 12(4): 305-17.

Watanabe T, Hashimoto M, Okuyana S, Inagami T, Nakamura S. Effects of targeted disruption of the mouse angiotensin II type-2 receptor gene on stress-induced hyperthermia. *J Physiol.* 1999; 515: 881-885.

Wei C, Cardarelli MG, Downing SW, McLaughlin JS. The effect of angiotensin II on mitogen-activated protein kinase in human cardiomyocytes. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*. 2000; 1: 379-384.

Weisiger RA, Fridovich I. Mitochondrial superoxide dismutase. Site of synthesis and intramitochondrial localization. *J.Biol.Chem*. 1973; 248: 4793-4796

Weisinger R. S, Blair-West P, Burns D. A, Denton M. J, McKinley E, Tarjan. The role of angiotensin II in ingestive behaviour: A brief review of angiotensin II, thirst and Na appetite. *Regul Peptides*. 1996; 66(1-2): 73-81

Whitebread S, Mele M, Kamber B, de Gasparo M. Preliminary biochemical characterization of two angiotensin II receptor subtypes. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989; 163(1):284-91.

Wilcox CS. Reactive oxygen species: roles in blood pressure and kidney function. *Curr Hyperten Rep*. 2002; 4: 160-166.

Wong PC, Hart SD, Zaspel AM, Chiu AT, Ardecky RJ, Smith RD, Timmermans PB. Functional studies of nonpeptide angiotensin II receptor subtype-specific ligands: DuP 753 (AII-1) and PD123177 (AII-2). *J Pharmacol Exp Ther.* 1990; 255(2): 584-92.

Wright JW, Harding JW. Brain angiotensin receptor subtypes in the control of physiological and behavioural responses. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 1994; 18: 21-53.

Xiao L, Pimentel DR, Wang J, Singh K, Colucci WS, Sawyer DB. Role of reactive oxygen species and NAD(P)H oxidase in alpha(1)-adrenoceptor signaling in adult rat cardiac myocytes. *Am J Phys - Cell Phys*. 2002; 282: C926-C934.

Xu H, Fink GD, Chen A, Watts S, Galligan JJ. Nitric oxide-independent effects of tempol on sympathetic nerve activity and blood pressure in normotensive rats. *Am J Phys - Heart Circ Phys*. 2001; 281: H975-H980.

Yamada H, Horiuchi M, Dzau V.J. Angiotensin II type 2 receptor mediates programmed cell death". *Proc Natl Acad Sci. USA.* 1996; 93(1): 156-60.

Yang G, Wan Y, Zhu Y. Angiotensin II--an important stress hormone. *Biol Signals.* 1996; 5(1): 1-8.

Yang G, Gray TS, Sigmund CD, Cassell MD. The angiotensinogen gene is expressed in both astrocytes and neurons in murine central nervous system. *Brain Res*. 1999; 817: 123-131.

Yoshimura S, Watanabe K, Suemizu H, Onozawa T, Mizoguchi J, Tsuda K, Hatta H, Moriuchi T: Tissue specific expression of the plasma glutathione peroxidase gene in rat kidney. *J .Biochem.* 1991; 109: 918-923.

Yoshimura Y, Karube M, Aoki H, Oda T, Koyama N, Nagai A, Akimoto Y, Hirano H, Nakamura Y. Angiotensin II induces ovulation and oocyte maturation in rabbit ovaries via the AT_2 receptor subtype. *Endocrinology,* 1996; 137: 1204-1211.

Yun-Hui Ku, Yao-Hua Li. Subfornical organ-angiotensin II pressor system takes part in pressor response of emotional circuit. *Peptides*. 2003; 24(7): 1063-1067.

Zafari AM, Ushio-Fukai M, Akers M, Yin Q, Shah A, Harrison DG, Taylor WR, Griendling KK. Role of NADH/NAD(P)H oxidase-derived H2O2 in angiotensin IIinduced vascular hypertrophy. *Hypertension*. 1998; 32: 488-495.

Zanzinger J. Mechanisms of action of nitric oxide in the brain stem: role of oxidative stress. *Auton Neurosci.* 2002; 98(1-2):24-7.

Zhou J, Pavel J, Macova M, Yu ZX, Imboden H, Ge L, Nishioku T, Dou J, Delgiacco E, Saavedra JM. AT1 Receptor Blockade Regulates the Local Angiotensin II System in Cerebral Microvessels From Spontaneously Hypertensive Rats. *Stroke* 2006; 37: 1271-1276.

Zimmerman MC, Lazartigues E, Lang JA, Sinnayah P, Ahmad IM, Spitz DR, Davisson RL. Superoxide mediates the actions of angiotensin II in the central nervous system. *Circ Res.* 2002; 91(11): 1038-1045.

Zimmerman MC, Lazartigues E, Sharma RV, Davisson RL. Hypertension caused by angiotensin II infusion involves increased superoxide production in the central nervous system. *Circ Res.* 2004a; 95(2): 210-216.

Zimmerman MC, Dunlay RP, Lazartigues E, Zhang Y, Sharma RV, Engelhardt JF, Davisson RL. Requirement for Rac1-dependent NAD(P)H oxidase in the

cardiovascular and dipsogenic actions of angiotensin II in the brain. *Circ Res.* 2004b; 95(5): 532-539.