

Efecto del valsartán sobre la señalización de la insulina hipotalámica en ratas diabéticas

Effect of valsartan on insulin signaling in diabetic rats hypothalamus

MARIELLA PASTORELLO y ANITA ISRAEL*

RESUMEN

La regulación ejercida por la insulina central en individuos diabéticos ha sido muy poco estudiada. La angiotensina II promueve el estrés oxidativo y la resistencia a la insulina. Dada la co-localización del receptor AT₁ de la angiotensina II y el receptor de insulina a nivel del núcleo arcuato hipotalámico, se evaluó el efecto central de la angiotensina II sobre la señalización acoplada al receptor de insulina hipotalámico en un modelo animal de diabetes mellitus tipo II en ratas, así como el posible efecto protector del tratamiento sistémico crónico con valsartán. Los efectos de la angiotensina II sobre la señalización de la insulina a nivel hipotalámico fueron evaluados *in vivo* e *in vitro*, mediante Western blot. En condiciones normales, se demostró que la angiotensina II es capaz de inhibir la señalización de la insulina a nivel hipotalámico por un mecanismo dependiente de especies reactivas de oxígeno. En condiciones diabéticas, se produce una disminución basal de la activación de las proteínas de señalización de la insulina, la cual fue prevenida por el tratamiento con valsartán. Los resultados demuestran que existe un estado de resistencia neuronal a la insulina en nuestro modelo de diabetes mellitus tipo 2, mediado al menos en parte, por un aumento del estrés oxidativo intracelular, el cual es prevenido por el tratamiento crónico con valsartán.

Palabras clave: Diabetes, valsartán, insulina, hipotálamo.

ABSTRACT

The regulation exercised by central insulin in diabetic individuals has been poorly studied. Angiotensin II promotes oxidative stress and insulin resistance. Given the co-localization of AT₁ angiotensin II receptor and the insulin receptor in the arcuate nucleus of the hypothalamus, in this work, we evaluated the effect of angiotensin II on insulin receptor signaling in the hypothalamus of an animal model of type II diabetes mellitus, and the possible protective effect of chronic treatment with valsartan. The effects of angiotensin II on insulin signaling in the hypothalamus were evaluated *in vivo* and *in vitro* by Western blot analysis. Under normal conditions, it was shown that angiotensin II is able to inhibit insulin signaling in the hypothalamus by a mechanism dependent on reactive oxygen species. In diabetic conditions, there was a decreased of basal activation of insulin signaling proteins, which was prevented by treatment with valsartan. Our results show that there is a state of insulin resistance in our model of type 2 diabetes, which is partially mediated through the increase of intracellular oxidative stress and is prevented by chronic treatment with valsartan.

Key words: Diabetes, valsartán, insulin, hypothalamus.

Introducción

Las acciones metabólicas ejercidas por la insulina a nivel central parecen ser uno de los mecanismos claves en el mantenimiento de la homeostasis energética, por lo tanto, las alteraciones en este sistema podrían relacionarse con trastornos metabólicos y viceversa (Gerozissis y col., 1999; Gelling y col., 2006).

En efecto, se ha demostrado que en ratones con una disrupción neuronal específica del gen que codifica para el receptor de la insulina, desarrollan obesidad sensible a la dieta, acompañada de un incremento en los niveles plasmáticos de leptina y de una ligera resistencia a la insulina. Adicionalmente, los ratones *knock-out* para el receptor de insulina hipotalámico,

Laboratorio de Neuropéptidos. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Farmacia. Caracas, Venezuela

* Correspondencia: Santa Rosa de Lima, Sección Las Mesetas, Calle La Cima, Res Mara, No. 82. Caracas, Venezuela. Tel: 58212-6052689, Email: astern88@gmail.com

poseen un elevado porcentaje de grasa corporal y altos niveles de leptina, resistencia a la insulina, hiperinsulinemia e hipertrigliceridemia (Brüning y col., 2000). Más recientemente, Obici y col. (2002,a,b) muestran que la inhibición del receptor de insulina (RI), luego de la administración de oligodesoxinucleótidos antisentido dirigido contra la proteína precursora del receptor de insulina en el núcleo arcuato, induce hiperfagia y resistencia a la insulina en ratas.

Numerosas evidencias muestran una importante asociación entre los cambios en la señalización de la insulina central, la obesidad y la diabetes tipo 2 (DM2). En perros, la obesidad inducida por dietas altas en grasa se ha asociado con una reducción en el transporte de insulina en el cerebro (Baura y col., 1996). Igualmente, en modelos genéticos de animales obesos y diabéticos como las ratas Zucker (*fa-fa*) se ha encontrado una disminución en la fosforilación del IR, IRS-1 y Akt hipotalámico (Carvalho y col., 2003). Estos hallazgos han puesto en evidencia el importante papel que juega la insulina central sobre el balance energético sistémico, y bien sea en la etiología o en la progresión, participa en la fisiopatología de la diabetes tipo 2.

La angiotensina II (ANG II) favorece la actividad simpática, tanto central como periféricamente, siendo un regulador importante de la función cardiovascular, la presión sanguínea y del balance hidroelectrolítico (Sowers y col., 2004; Taniyama col., 2005). La ANG II se une a dos subtipos de receptores: AT₁ y AT₂. Las acciones periféricas clásicas de la ANG II son mediadas por el receptor AT₁. La activación de este receptor desencadena diversas cascadas de señalización, incluyendo movilización de calcio, producción de IP₃, activación de la PKC, PLD (Berk y Corson, 1997; Touyz y col., 2003), JAK/STAT, PLC y p21ras/Raf-1/MAP kinasa (Schmitz y col., 1997; Marrero y col., 1998; Berk y Corson, 1997) y numerosas proteínas tirosina kinasas que estimulan la activación de diversos factores de transcripción (Berk y Corson, 1997). A nivel central, la activación del receptor AT₁ induce la producción de anión superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$), a través de la NAD(P)H oxidasa, el cual actúa como un segundo mensajero y participa en el incremento del eflujo simpático en respuesta a la ANG II en núcleos como el rostroventrolateral del bulbo, el núcleo paraventricular y el órgano subfornical (Sun y col., 2005; Chan y col., 2005; Erdös y col., 2006).

Numerosos estudios en células y modelos animales demuestran que la ANG II parece modular negativamente las acciones periféricas mediadas por la insulina a múltiples niveles de su cascada de señalización (De Gasparo, 2000; Fujita, 2002). Se ha observado que la infusión de ANG II induce resistencia a la

insulina en ratas (Ogihara y col., 2002; Rao y col., 1994), y el uso de los inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina (IECA) y de los antagonistas del receptor de angiotensina II (ARA) mejoran la sensibilidad a la insulina (Cheetham y col., 2000; Henriksen y col., 2001), entonces, la sobrereactividad del sistema renina angiotensina (SRA), observada en enfermedades cardiovasculares como la hipertensión estaría participando en el inicio de la resistencia a la insulina en estos paciente. Por otro lado, se ha demostrado que el uso de los IECA y de los antagonistas del receptor AT₁ reduce el daño tisular que se observa en pacientes con DM tipo 2 (hiperplasia neointima, neuropatía), tanto en modelos animales como en pacientes (Goodfriend y col., 1996; Sowers y col., 2004). Aunque estas y otras evidencias avalan la participación del SRA en el desarrollo de la resistencia a la insulina, muy poco se sabe acerca del efecto de la ANG II sobre la señalización de la insulina en el SNC.

Ciertos elementos relacionados con la señalización de la ANG II periférica se reproducen a nivel central. Según los estudios autoradiográficos y por hibridación *in situ*, se evidencia que existen receptores de insulina y de ANG II co-localizados en el hipotálamo, específicamente en el núcleo arcuato (Marks y col., 1990; Pardini y col., 2006). Aunque la evidencia obtenida en tejidos periféricos permiten afirmar que la ANG II interfiere con la señalización de la insulina, aun no se sabe si las acciones centrales de la ANG II pueden alterar la sensibilidad a la insulina en tejido nervioso. El estudio de la interrelación entre ambas vías, en condiciones diabéticas, aportaría información crucial sobre las posibles alteraciones en los circuitos neuronales encargados de la regulación metabólica en el desarrollo de la diabetes tipo 2.

Materiales y métodos

ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Experimentos realizados en ratas no diabéticas

Se emplearon ratas macho de la cepa *Sprague-Dawley*, de 250-300 g de peso corporal, procedentes del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel" o del Bioterio del Instituto de Medicina Experimental de la UCV. Los animales fueron mantenidos en un ambiente de luz controlada, con períodos alternos de 12h de luz y oscuridad, permitiéndoles libre acceso al agua y al alimento estándar. El día del experimento, los animales fueron sacrificados por decapitación y el hipotálamo fue extraído del cerebro mediante control estereomicroscópico, el cual fue mantenido en frío en buffer Krebs para la realización de los experimentos *in vitro* correspondientes.

1.2. Experimentos realizados en ratas diabéticas

Se emplearon ratas macho de la cepa *Sprague-Dawley*, de 100-120 g de peso corporal, procedentes del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel" o del Bioterio del Instituto de Medicina Experimental de la UCV. Los animales fueron mantenidos en un ambiente de luz controlada, con periodos alternos de 12h de luz y oscuridad, permitiéndoles libre acceso al agua y al alimento. Las ratas fueron divididas en 4 grupos experimentales: 1) Control (alimentados con dieta estándar); 2) Control + valsartán (60 mg/Kg, p.o.); 3) Diabéticos (alimentados con dieta alta en grasa) y 4) Diab + Val. Los animales diabéticos, recibieron una dieta alta en grasa (DAG), por adición de manteca de cerdo a la dieta estándar, donde el 35% de la dieta corresponde a lípidos, durante diez (10) semanas. Los animales alimentados con DAG fueron tratados con una dosis baja de estreptozotocina (35 mg/Kg, i.p) dos semanas antes de los estudios correspondientes (Pastorello e Israel, 2011).

Posteriormente, a los animales de experimentación se les implantó una cánula en el ventrículo lateral izquierdo bajo anestesia con pentobarbital sódico (40mg/kg, i.p.), 1 mm caudal a la sutura coronal y a 1.5 mm lateral de la sutura sagital del cráneo, mediante la ayuda de un aparato estereotáxico (David Kopf Instruments). La cánula se fijó al hueso con cemento acrílico de secado rápido. Pasadas 72 horas de periodo de recuperación post-operatorio, los animales se mantuvieron en ayuna durante 12-16h antes de recibir el tratamiento ICV con ANG II, INS o ANG+INS. La inyección ICV se realizó con una inyectora Hamilton acondicionada con un tope para asegurar la penetración de la aguja a la misma profundidad de la cánula. Finalizados los tratamientos, los animales fueron sacrificados por decapitación y el hipotálamo fue extraído del cerebro mediante control estereomicroscópico, el cual fue mantenido en frío para su posterior tratamiento y obtención de proteínas destinadas al análisis por WB. La validez de la canulación ICV se confirmó post-mortem, con la inyección, previo a la decapitación, de una solución de colorante (fast green, 5 µL), considerándose válidos, aquellos cuya distribución del colorante se observó en los ventrículos laterales, tercero y cuarto.

Los experimentos fueron realizados siguiendo las buenas prácticas para el manejo de animales de laboratorio (NIH Guide, 1996) y la aprobación del Comité de Bioterio de la Facultad de Farmacia de la UCV.

TRATAMIENTO CON ANTAGONISTAS DEL RECEPTOR DE ANGIOTENSINA II E INHIBIDOR DE LA NADPH OXIDASA *IN VITRO*

Los hipotálamos obtenidos para los experimentos

in vitro fueron incubados a 37°C con el tratamiento correspondiente (ANG II, 100 nM y/o Insulina 100 µM, por 5 min), pretratadas o no con apocinina (100 µM, por 10 min), losartán (1 µM, por 10 min) o PD123319 (1 µM, por 10 min), una vez finalizado el tratamiento, los tejidos fueron enfriados y cambiados a buffer de lisis para obtención de proteínas destinadas al análisis por WB.

Identificación y cuantificación de la activación y/o expresión de proteínas mediante Western Blot

Los tejidos tratados tanto *in vitro* como *in vivo* se colocaron en presencia de buffer de lisis (50 mM Tris base, 5 mM EDTA, 1 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, mezcla de inhibidores de proteasas compuesto por pepstatina A, aprotinina, leupeptina y Tritón X-100 al 1%, pH 7.4), para su homogenización manual y posterior sonicación, centrifugados a 5.000 rpm por 10 minutos a 4°C, y separación del sobrenadante. Las proteínas totales presentes en el sobrenadante fueron cuantificadas por el método de Lowry y col. (1951), modificado para microplaca. Para el análisis por Western blot, se separaron 50 µg proteínas por electroforesis en gel SDS-poliacrilamida 10% y fueron posteriormente transferidas a una membrana de PVDF (difluoruro de polivinilideno) o nitrocelulosa. La transferencia fue verificada incubando las membranas en Rojo Ponceau. Después del bloqueo con leche descremada al 10%, las membranas fueron incubadas con el anticuerpo primario respectivo para cada ensayo: anti-pERK/ERK (Cell Signaling Technology), anti-pAkt/Akt (Ser473) (Cell Signaling Technology), anti pIRS-1/IRS-1 (Ser307), diluidos en solución de albúmina sérica bovina al 3% en PBS-Tween al 0,1% (1:1000 o según la dilución sugerida por el fabricante) durante toda la noche a 4°C. Las membranas fueron lavadas con PBS-Tween al 0,1% e incubadas con anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano respectivo, diluido en solución de albúmina sérica bovina al 1,5% en PBS-Tween al 0,1% (1:10.000/1:100.000), durante 1 h. Las proteínas fueron visualizadas por la reacción quimioluminiscencia (SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate) mediante el uso de películas para rayos X y cuantificadas mediante el análisis desintométrico (Quantity One 1-D® BioRad).

Análisis estadístico

Los resultados fueron expresados como la media ± el error estándar de la media (E.E.M.) y luego graficados y analizados mediante el uso del programa GraphPad Prism versión 5.

La comparación entre dos grupos se realizó mediante la prueba de "t de student", determinando la

significancia estadística entre las medias. Las comparaciones entre dos o más grupos se realizaron por medio de un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, seguido de la prueba de Bonferroni. Valores con una $p < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

Resultados

DETERMINACIÓN DEL SUBTIPO DE RECEPTOR DE ANGIOTENSINA II INVOLUCRADO EN LA ACTIVACIÓN DE LAS ERK1/2 EN EL HIPOTÁLAMO

El tratamiento *in vitro* con ANG II en hipotálamo de ratas incrementó significativamente la fosforilación de las ERK1/2, efecto que fue bloqueado completamente por el losartán, antagonistas del receptor AT₁. Por su parte el bloqueo del receptor AT₂ con PD 123319, no solo no bloqueó la fosforilación de las ERK1/2 inducida por ANG II, sino que más bien incrementó significativamente la activación de las mismas (Figura 1).

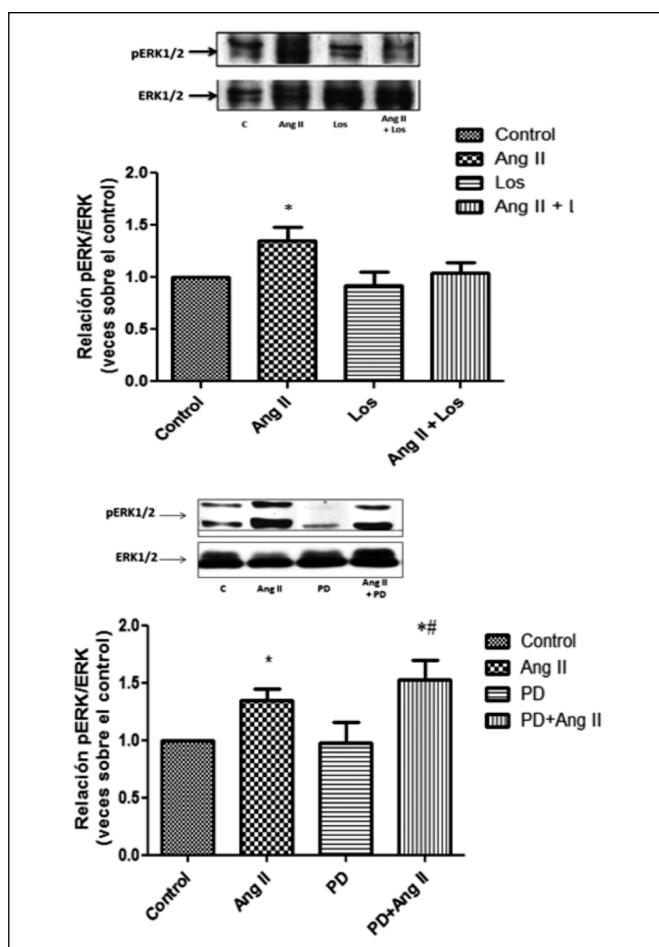


Figura 1. Efecto del losartán y PD 123319 sobre la activación de las ERK1/2 inducida por ANG II en hipotálamo de ratas SD. Hipotálamos de ratas fueron incubados con ANG II (100 nM) en presencia o no de losartán (1 μ M) (A) o PD 123319 (1 μ M) (B) y posteriormente analizados mediante WB. * $p < 0,05$ comparado con el grupo control. ** $p < 0,05$ comparado con el grupo PD (N=8).

EFFECTO DE LA APOCININA SOBRE LA ACTIVACIÓN DE LAS ERK1/2 Y AKT INDUCIDA POR ANG II E INSULINA EN EL HIPOTÁLAMO DE RATAS SPRAGUE-DAWLEY

La estimulación *in vitro* del hipotálamo de ratas tanto con ANG II (100nM) como con insulina (1 μ M) indujo la fosforilación de las ERK1/2. El tratamiento simultáneo con ANG II e Insulina disminuyó significativamente la activación de estas proteínas. Por otro lado, el pre-tratamiento con apocinina, un desacoplante de la NAD(P)H oxidasa, bloqueó la fosforilación de las ERK1/2 inducida tanto por la ANG II como por la insulina. De manera interesante, el uso de este desacoplante revirtió parcialmente el efecto inhibitorio inducido por la administración conjunta de ANG II+insulina en estas proteínas (Figura 2).

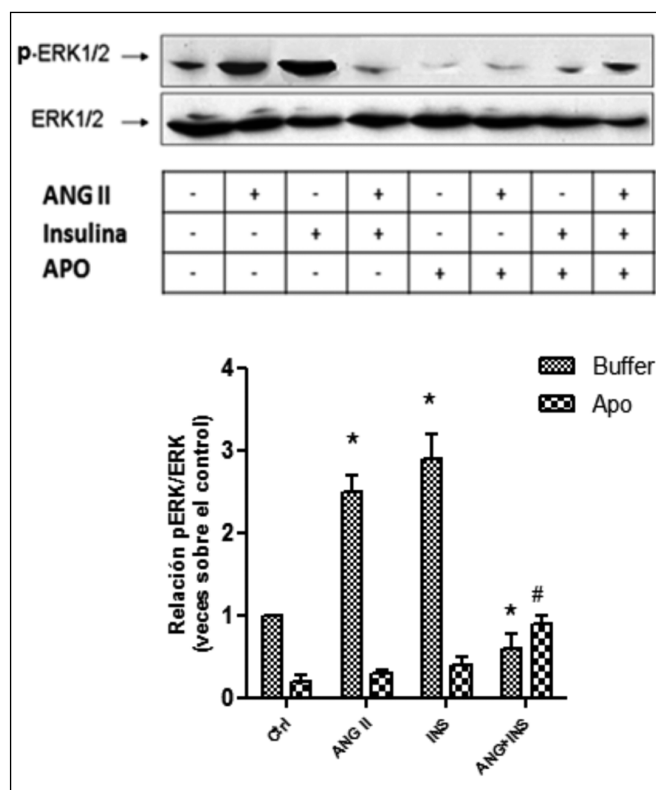


Figura 2. Efecto de la apocinina sobre la fosforilación de las ERK1/2 inducida por ANG II e Insulina en el hipotálamo de ratas Sprague-Dawley (SD). Tratamiento *in vitro* de hipotálamos de ratas con ANG II (100 nM) y/o insulina (1 μ M), pre-tratadas con apocinina (Apo) (100 μ M) o buffer, determinado mediante Western blot. * $p < 0,05$ con respecto al control. # $p < 0,05$ con respecto al control de apocinina (N=24).

Por otro lado, el tratamiento con ANG II (100nM) e insulina (1 μ M) fue capaz de activar a la Akt, y el pre-tratamiento con apocinina no bloqueó este efecto. De forma similar a las ERK1/2, el tratamiento conjunto con ANG II+insulina disminuyó significativamente la activación de estas proteínas, efecto que no es revertido por la apocinina (Figura 3).

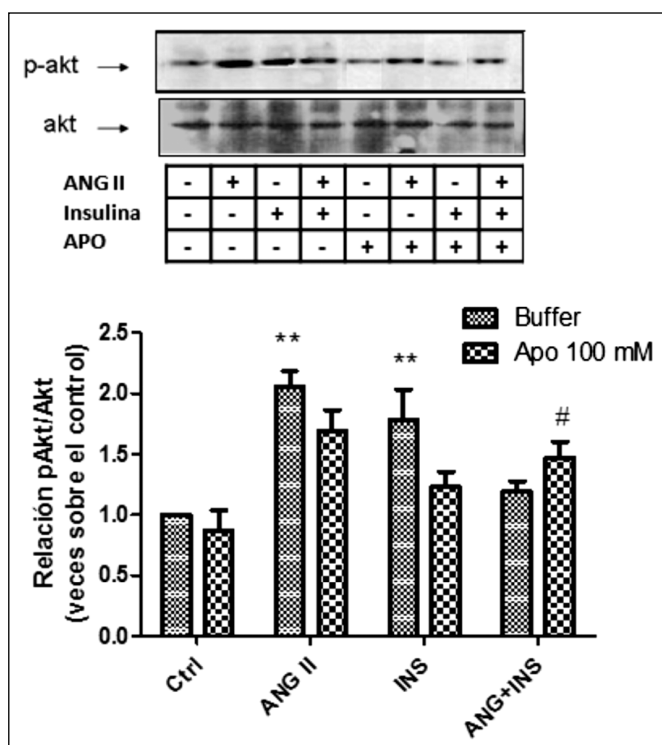


Figura 3. Efecto de la apocinina sobre la fosforilación de la Akt inducida por ANG II e Insulina en el hipotálamo de ratas *Sprague-Dawley* (SD). Tratamiento *in vitro* de hipotálamos de ratas *Sprague-Dawley* con ANG II (100 nM) y/o insulina (1 µM), pretratadas con apocinina (Apo) (100 mM) o buffer, determinado mediante Western blot. *p<0,05 con respecto al control (N=8).

EFECTO DEL TRATAMIENTO CRÓNICO CON VALSARTÁN SOBRE LA FOSFORILACIÓN DE LAS ERK 1/2, AKT E IRS-1 EN EL HIPOTÁLAMO DE RATAS DIABÉTICAS

En la Figura 4 se muestra el efecto de la diabetes y el tratamiento con valsartán *in vivo* sobre la activación de las ERK1/2 y Akt. En el análisis mediante Western blot del hipotálamo de ratas diabéticas se observó una disminución en el estado de fosforilación basal, tanto de la Akt como en las ERK1/2. Sin embargo, el tratamiento crónico con valsartán en ratas diabética conservó los niveles de fosforilación de estas proteínas de forma comparable al grupo control. (Figura 4).

Tal y como se observa en la Figura 5, la fosforilación basal de IRS-1 fue similar en todos los grupos de experimentales. Luego de la administración ICV de insulina se incrementó la fosforilación de IRS-1 al compararla con las ratas control, sin embargo, este incremento en la fosforilación estuvo inhibido en las ratas diabéticas.

Discusión

A nivel periférico, son diversos los mediadores químicos que participan en la resistencia a la insulina, entre ellos, la angiotensina II. Este péptido, a través

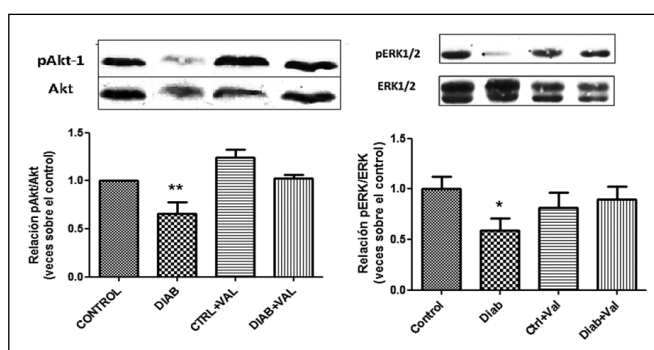


Figura 4. Efecto del tratamiento crónico con valsartán sobre el estado de fosforilación de la Akt y ERKs en el hipotálamo de ratas diabéticas. Determinado mediante Western blot. *p<0,05 con respecto al grupo control (N=28).

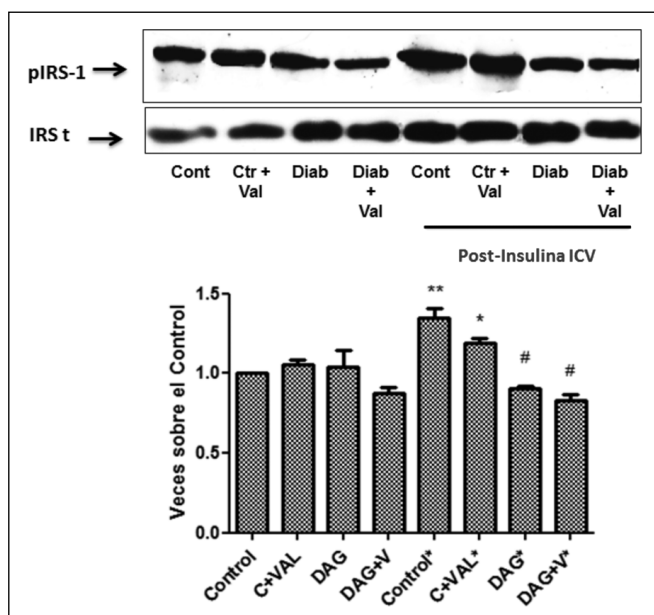


Figura 5. Activación basal y post-insulina ICV del IRS-1. Fosforilación de la IRS-1 en el hipotálamo de ratas control (Ctr) y diabéticas (Diab) tratadas o no con valsartán crónicamente, en condiciones basales y post-administración de insulina ICV (3mUI/5µL), determinado mediante WB. *p<0,05; **p<0,001 con respecto al grupo control (previo insulina); #p<0,05 con respecto al grupo control (post-insulina) (N=12).

del receptor AT₁, incrementa la producción de especies reactivas de oxígeno a nivel intracelular, las cuales de forma directa e indirecta, inhiben la señalización de la insulina (Folli y col., 1997; Ogiyara y col., 2002; Taniyama y col., 2005). Por otro lado, la síntesis de este péptido es sensible a los niveles de glicemia, así como la glicemia es sensible a los cambios en la concentración plasmática de la angiotensina II (Frier y col., 1984; Herings y col., 1995). De forma tal, que el sistema renina-angiotensina está íntimamente imbricado con el control de la glicemia. Sin embargo su interrelación a nivel central ha sido muy poco estudiada.

La evidencia neuroanatómica de la co-localización del receptor de insulina y del receptor AT₁ de la

angiotensina, en las neuronas del núcleo arcuato del hipotálamo (Marks y col., 1990; Pardini y col., 2006), sugieren la posibilidad de una interacción funcional entre estos dos péptidos. A nivel hipotalámico, las quinasas reguladas por señales extracelulares o ERK1/2 median las acciones anorexigénicas y de gasto energético de la insulina (Stockhorst y col., 2004, Fernández y Torres-Alemán, 2012). Sin embargo, su activación también puede estar estimulada por la ANG II. Se ha determinado que la insulina central potencia la respuesta presora inducida por la ANG II hipotalámica mediante un mecanismo dependiente de las ERK1/2 (Mayer y col., 2010), sin embargo el efecto de la ANG II sobre las acciones centrales de la insulina ha sido muy poco estudiado. Al respecto, nuestros resultados demuestran que el tratamiento, tanto con ANG II como con Insulina, induce una significativa fosforilación de las ERKs en el hipotálamo de ratas *Sprague-Dawley*. El efecto de la ANG II sobre la activación de las ERK1/2 fue mediado por el receptor AT₁ ya que fue bloqueado por el losartán y fue contrarregulado por el receptor AT₂, ya que fue potenciado por el PD123319. Paradójicamente, nuestros resultados demostraron que el tratamiento simultáneo con ANG II e insulina disminuye la activación de las ERK1/2. Al respecto, en el hipotálamo se ha descrito la presencia de ambos subtipos de receptores, AT₁ y AT₂ (Reagan y col., 1994), por lo que se plantea la posibilidad de efectos opuestos o contraregulatorios de estos subtipos de receptores hipotalámicos.

Se sabe que el mecanismo molecular que subyace en la señalización de la ANG II a través del receptor AT₁ implica a la cascada de la NAD(P)H, tanto en tejidos periféricos y centrales. Nuestros resultados apoyan esta posibilidad y amplía la participación de la NAD(P)H oxidasa en la señalización de la insulina, ya que la apocinina, un inhibidor de la NAD(P)H oxidasa, fue capaz de bloquear las acciones individuales de la ANGII e INS, pero previno parcialmente la disminución de la fosforilación inducida por el tratamiento combinado. Estos resultados dejan clara la participación de las especies reactivas de oxígeno en el proceso de activación de las ERK1/2 estimulada tanto por la ANG II como por la INS.

Estudios previos realizados en cultivo de células de músculo liso vascular han reportado que el incremento de las especies reactivas de oxígeno (ERO) inducido por la insulina produce la oxidación de numerosas proteínas tirosina fosfatasa (PTP), en particular la PTP1B, facilitando y prolongando el proceso de fosforilación de las diversas proteínas de señalización (Goldstein y col., 2005). Sin embargo, se ha observado que altas concentraciones de ERO estimulan la activación de numerosas serina/treonina quinasas

sensibles al estado redox, como la JNK o IKK β (Nakanishi y col., 2005), que induce fosforilación de la serina 307 del IRS-1, bloqueando así su posibilidad de ser fosforilado por el receptor de insulina (Aguirre y col., 2000; Hirosumi y col., 2002). Nuestros resultados muestran que tanto la ANG II como la insulina activan a las ERK1/2, por un mecanismo dependiente de la producción de anión superóxido, el cual podría inhibir la PTP1B y facilitar la fosforilación de las diferentes proteínas de señalización. Sin embargo, la estimulación simultánea de ambos péptidos podrían inducir un incremento significativo de las ERO, causando la activación de la JNK y el bloqueo subsiguiente de la señalización de la insulina aguas abajo.

Al respecto, Li y col. (2005) demostraron que la activación de la Akt inducida por ANG II en el músculo liso vascular es mediada por los metabolitos del ácido araquidónico. Se sabe que la activación del receptor AT₁ induce a su vez la activación de la fosfolipasa A2, la cual estimula la producción de ácido araquidónico y sus metabolitos (Mehta y Griendling, 2007). Podrían entonces otras vías de señalización estar involucradas en la activación de la Akt hipotalámica inducida por la angiotensina II. Por otro lado, los resultados obtenidos con el tratamiento combinado de la angiotensina II con la insulina demuestran que la inhibición ejercida sobre la Akt por la ANG II e insulina cursa con incremento del estrés oxidativo. Como ocurre con las ERKs, el incremento del estado redox podría estimular a la JNK o IKK β e inhibir la fosforilación del IRS-1 y de todas las demás proteínas aguas abajo. El tratamiento con apocinina previene entonces el incremento del estrés oxidativo, permitiendo la fosforilación de la Akt. Estos resultados demuestran que la ANG II puede interferir con la señalización de la insulina por un mecanismo dependiente del incremento de las EROs.

Se sabe que bajo la condición de diabetes existe un incremento del estrés oxidativo sistémico, responsable de muchas de las alteraciones metabólicas y del daño a numerosos tejidos como el páncreas, riñón y vasos sanguíneos, sin embargo, hasta el momento no ha sido completamente estudiado el impacto de este sobre el control metabólico ejercido por el SNC (Haligur y col., 2012). Nuestros resultados muestran una disminución significativa en la fosforilación basal de la Akt y ERK1/2 en el hipotálamo de ratas diabéticas y el tratamiento crónico con valsartán logró preservar el estado de fosforilación tanto de la Akt como de la ERK1/2 hipotalámicas, lo que indica que la activación del receptor AT₁ posiblemente a través del incremento en el estrés oxidativo, podría ser el responsable de la inhibición de la activación de proteínas claves en la señalización de la insulina. Este efecto ha sido obser-

vado previamente en células de músculo liso vascular (Ogihara y col., 2002; Zhou y col., 2009). En el caso de la IRS-1, si bien se encuentran en niveles relativamente iguales en todos los grupos de tratamiento (tanto la forma fosforilada como la total), la respuesta ante la estimulación con insulina estuvo significativamente disminuida en las ratas diabéticas, tratadas o no con valsartán. Si la IRS-1 sufrió fosforilación previa en la serina 307, inducida por la serina/treoninas kinasas sensibles al estado redox, se inhibiría la fosforilación catalizada por el receptor de insulina en las diferentes tirosinas del IRS-1, bloqueando así su capacidad de activación y unión con otras proteínas de ensamblaje necesaria para que continúe la señalización. La inactivación del IRS-1 por kinasas serina/treonina en condiciones de estrés oxidativo ha sido previamente descrito (Lee y col., 2003; Greene y col., 2003; Boura-Halfon y Zick, 2009; Wang y col., 2009). Se requerirían estudios posteriores para confirmar esta hipótesis, sin embargo, este hallazgo pone en evidencia el estado de resistencia neuronal a la insulina bajo la condición de diabetes tipo 2.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Sr. Bany Caraballo por su ayuda técnica en los experimentos. Este trabajo fue subvencionado por los Proyectos: Misión Ciencia, Subproyecto 7, ECCV-2007001585, PEII-20122000760, el CDCH-UCV proyectos CDCH PG-06-8353-2011-I y AIA-06.8402.2012 y la Facultad de Farmacia-UCV No. IIF-19-2011.

Referencias bibliográficas

- Aguirre V, Uchida T, Yenush L, Davis R, and White MF. 2000. The c-jun NH2-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser 307. *J Biol Chem* 275: 9047-9054.
- Baura GD, Foster DM, Kaiyala K, Porte D Jr, Kahn SE, Schwartz MW. 1996. Insulin transport from plasma into the central nervous system is inhibited by dexamethasone in dogs. *Diabetes* 45(1):86-90.
- Berk BC y Corson MA. 1997. Angiotensin II signal transduction in vascular smooth muscle: role of tyrosine kinases. *Circ Res* 80: 607-616.
- Brüning JC, Gautam D, Burks DJ, Gillette J, Schubert M, Orban PC, Klein R, Krone W, Müller-Wieland D, Kahn CR. 2000. Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. *Science* 289(5487): 2122-2125.
- Boura-Halfon S y Zick Y. 2009. Phosphorylation of IRS proteins, insulin action, and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296: E581-E591.
- Carvalho JB, Ribeiro EB, Araújo EP, Guimarães RB, Telles MM, Torsoni M, Gontijo JA, Velloso LA, Saad MJ. 2003. Selective impairment of insulin signalling in the hypothalamus of obese Zucker rats. *Diabetologia* 46(12): 1629-40.
- Chan SHH, Hsu KS, Huang CC, Wang LL, Ou CC, Chan JYH. 2005. NADPH oxidase-derived superoxide anion mediates angiotensin II-induced pressor effect via activation of p38 mitogen-activated protein kinase in the rostral ventrolateral medulla. *Circ Res* 97: 772-780.
- Cheetham C, Collis J, O'Driscoll G, Stanton K, Taylor R, Green D. 2000. Losartan, an angiotensin type I receptor antagonist, improves endothelial function in non-insulin-dependent diabetes. *J Am Coll Cardiol* 36(5): 1461-1466.
- De Gasparo M, Hess P, Nusslein-Hildesheim B, Bruneval P, Clozel JP. 2000. Combination of non-hypotensive doses of valsartan and enalapril improves survival of spontaneously hypertensive rats with endothelial dysfunction. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 1(2): 151-8.
- Erdős B, Broxon CS, King MA, Scarpace PJ, Tumer N. 2006. Acute pressor effect of central angiotensin II is mediated by NAD(P)H-oxidase-dependent production of superoxide in the hypothalamic cardiovascular regulatory nuclei. *J Hypertens* 24:109-116.
- Fernández AM, Torres-Alemán I. 2012. The many faces of insulin-like peptide signalling in the brain. *Nature Reviews. Neuroscience* 13: 225-239.
- Folli F, Kahn CR, Hansen H, Bouchie JL, Feener EP. 1997. Angiotensin II inhibits insulin signaling in aortic smooth muscle cells at multiple levels. A potential role for serine phosphorylation in insulin/angiotensin II crosstalk. *J Clin Invest* 100(9):2158-69.
- Frier BM, Al-Dujaili EA, Corral RJ. 1984. Autonomic neural control mechanisms and the release of adrenal steroids after hypoglycaemia in man. *Horm Metab Res* 16 (suppl 1): 138-141.
- Fujita T. 2002. Angiotensin II-induced insulin resistance is associated with enhanced insulin signaling. *Hypertension* 40:872- 879.
- Gelling RW, Morton GJ, Morrison CD, Niswender KD, Myers MG Jr, Rhodes CJ, Schwartz MW. 2006. Insulin action in the brain contributes to glucose lowering during insulin treatment of diabetes. *Cell Metab* 3(1):67-73.
- Gerozissis K, Rouch C, Nicolaidis S, Orosco M. 1999. Brain insulin response to feeding in the rat is both macronutrient and area specific. *Physiol Behav* 66(1):271-215.
- Goldstein BJ, Mahadev K, Wu X. 2005. Redox paradox: insulin action is facilitated by insulin-stimulated reactive oxygen species with multiple potential signaling targets. *Diabetes* 54(2):311-321.
- Goodfriend TL, Elliott ME, Catt KJ. 1996. Angiotensin receptors and their antagonists. *N Engl J Med* 334: 1649-1654.
- Greene MW, Sakaue H, Wang L, Alessi DR, Roth RA. 2003. Modulation of insulin-stimulated degradation of human insulin receptor substrate-1 by Serine 312 phosphorylation. *J Biol Chem* 278: 8199-8211.
- Haligur M, Topsakal S, Ozlem. 2012. Early Degenerative Effects of Diabetes Mellitus on Pancreas, Liver, and Kidney in Rats: An Immunohistochemical Study. *Experimental Diabetes Res* 2012. Article ID 120645, 10 pages doi:10.1155/2012/120645.
- Henriksen EJ, Jacob S, Kinnick TR, Teachey MK, Krekler M. 2001. Selective Angiotensin II Receptor Antagonism

- Reduces Insulin Resistance in Obese Zucker Rats. *Hypertension* 38:884–890.
- Herings RMC, de Boer A, Stricker BHC, Leufkens HGM and Porsius A. 1995. Hypoglycaemia associated with use of inhibitors of angiotensin converting enzyme. *Lancet* 345: 1195–1198.
- Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, Görgün CZ, Uysal KT, Maeda K, Karin M, Hotamisligil GS. 2002. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature* 420(6913):333–336.
- Lee YH, Giraud J, Davis RJ, White MF. 2003. c-Jun N-terminal kinase (JNK) mediates feedback inhibition of the insulin signaling cascade. *J Biol Chem* 31 278(5): 2896–902.
- Li F, Malik KU. 2005. Angiotensin II-induced Akt activation is mediated by metabolites of arachidonic acid generated by CaMKII-stimulated Ca^{2+} -dependent phospholipase A2. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288(5):H2306–H2316.
- Lowry O, Rosebrough N, Farr A, Randall R. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265–275.
- Marks JL, Porte D Jr, Stahl WL, Baskin DG. 1990. Localization of insulin receptor mRNA in rat brain by in situ hybridization. *Endocrinology* 127(6):3234–3236.
- Marrero MB, Venema VJ, Ju H, Eaton DC, Venema RC. 1998. Regulation of angiotensin II-induced JAK2 tyrosine phosphorylation: roles of SHP-1 and SHP-2. *Am J Physiol* 275:C1216–C1223.
- Mayer MA, Giani JF, Höcht C, Silberman EA, Muñoz MC, Taira CA, Dominici FP, Puyó AM, Fernández BE. 2010. Centrally administered insulin potentiates the pressor response to angiotensin II. *Regul Pept* 163(1–3):57–61.
- Mehta PK, Griendling KK. 2007. Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol* 292(1): C82–97.
- Nakatani Y, Kaneto H, Kawamori D, Yoshiuchi K, Hatazaki M, Matsuoka TA, Ozawa K, Ogawa S, Hori M, Yamasaki Y, Matsuhisa M. 2005. Involvement of endoplasmic reticulum stress in insulin resistance and diabetes. *J Biol Chem* 280(1):847–851.
- NIH Guide for the care and use of animals. 1996. Institute of Laboratory Animal Resources. National Research Council. National Academy Press, Washington DC, USA.
- Obici S, Feng Z, Karkanias G, Baskin DG, Rossetti L. 2002a. Decreasing hypothalamic insulin receptors causes hyperphagia and insulin resistance in rats. *Nat Neurosci* 5(6):566–572.
- Obici S, Zhang BB, Karkanias G, Rossetti L. 2002b. Hypothalamic insulin signaling is required for inhibition of glucose production. *Nat Med* 8(12):1376–1382.
- Ogihara T, Asano T, Ando K, Chiba Y, Sakoda H, Anai M, Shojima N, Ono H, Onishi Y, Fujishiro M, Katagiri H, Fukushima Y, Kikuchi M, Noguchi N, Aburatani H, Komuro I, Fujita T. 2002. Angiotensin II-induced insulin resistance is associated with enhanced insulin signaling. *Hypertension* 40:872–879.
- Pardini AW, Nguyen HT, Figlewicz DP, Baskin DG, Williams DL, Kim F, Schwartz MW. 2006. Distribution of insulin receptor substrate-2 in brain areas involved in energy homeostasis. *Brain Res* 1112(1):169–178.
- Pastorello M e Israel A. 2011. Papel de la angiotensina II en la resistencia a la insulina neuronal en un modelo experimental de diabetes tipo 2 en ratas. *Diabetes Internacional* 3(4): 88–97.
- Rao RH. 1994. Effects of angiotensin II on insulin sensitivity and fasting glucose metabolism in rats. *Am J Hypertens* 7:655–660.
- Reagan LP, Flanagan-Cato LM, Yee DK, Ma LY, Sakai RR, Fluharty SJ. 1994. Immunohistochemical mapping of angiotensin type 2 (AT2) receptors in rat brain. *Brain Res* 662(1–2):45–59.
- Schmitz U, Berk BC. 1997. Angiotensin II signal transduction: Stimulation of multiple mitogen-activated protein kinase pathways. *Trends Endocrinol Metab* 7:261–266.
- Sowers JR. 2004. Insulin resistance and hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286:H1597–H1602.
- Stockhorst U, de Fries D, Steingrueber HJ, Scherbaum WA. 2004. Insulin and the CNS: effects on food intake, memory, and endocrine parameters and the role of intranasal insulin administration in humans. *Physiol Behav* 83(1): 47–54.
- Sun C, Sellers KW, Sumners C, Raizada MK. 2005. NAD(P)H oxidase inhibition attenuates neuronal chronotropic actions of angiotensin II. *Circ Res* 96:659–666.
- Taniyama Y, Hitomi H, Shah A, Alexander RW, Griendling KK. 2005. Mechanisms of reactive oxygen species-dependent downregulation of insulin receptor substrate-1 by angiotensin II. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25(6): 1142–1147.
- Touyz RM, Cruzado M, Tabet F, Yao G, Salomon S, Schiffrin EL. 2003. Redox-dependent MAP kinase signaling by Ang II in vascular smooth muscle cells: role of receptor tyrosine kinase transactivation. *Can J Physiol Pharmacol* 81(2):159–167.
- Wang Y, Nishina PM, Naggert JK. 2009. Degradation of IRS1 leads to impaired glucose uptake in adipose tissue of the type 2 diabetes mouse model TALLYHO/Jng J *Endocrinol* 203(1):65–74.
- Zhou MS, Schulman IH, Raji L. 2009. Role of angiotensin II and oxidative stress in vascular insulin resistance linked to hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 296(3):H833–H839.