



**UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA**  
**FACULTAD DE FARMACIA**  
**POSTGRADO DE FARMACOLOGÍA**



**PAPEL DE LA ADRENOMEDULINA CEREBELOSA EN LA  
REGULACIÓN DE LA PRESIÓN ARTERIAL**

**REALIZADOR POR: LIC. LETICIA FIGUEIRA**

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

**TUTOR: DRA. ANITA STERN DE ISRAEL**

**Caracas, octubre 2012**



## 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 **Licenciada en Bioanálisis LETICIA MARÍA FIGUEIRA DE FREITAS**, titular de la Cédula de Identidad N° V- 17.065.615, bajo el título **“PAPEL DE LA ADRENOMEDULINA CEREBELOSA EN LA REGULACIÓN DE LA PRESIÓN ARTERIAL”** 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 **Martes 16 de Octubre de 2012** a las **09:00 a.m.**, para que la **autora** lo defendiera en forma pública, lo que la autora 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 **aprobarlo por unanimidad**, por considerar, sin hacerse solidario con la ideas expuestas por la **autora**, 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 representa un aporte extenso y original en el conocimiento del papel de la adrenomedulina y el cerebelo en la regulación de la presión arterial.

El jurado evaluador acuerda por unanimidad otorgar la calificación de **“EXCELENTE”** a la presente Tesis Doctoral.

En fe de lo cual se levanta la presente ACTA, a los 16 días del mes de Octubre del año 2012, conforme a lo dispuesto en el Reglamento de Estudios de Postgrado, actuó como Tutora-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**

**Dra. Emilia Díaz**  
**C.I. 6.513.844**  
**IME, UCV**

**Dra. Nathalie Gago**  
**C.I. 9.963.488**  
**Escuela José María Vargas, UCV**



**Dr. Jesús del Castillo**  
**C.I. 4.425.029**  
**IVIC**

**Dr. Gustavo Bruges**  
**C.I. 18.184.898**  
**IVIC**

Es. 16/10/2012.

## **DEDICATORIA**

En primer lugar a Dios Yavé, todopoderoso por iluminar mis pasos y decisiones, guiándome por el camino de la vida y estar conmigo en cada paso que doy.

A mis padres, Manuel Avelino Dinis Figueira y María José De Freitas, por darme la vida, por sus consejos, valores y apoyarme en todos mis proyectos. Ustedes son ejemplos de lucha y perseverancia.

A mis hermanos, Víctor y Sergio Figueira, por estar siempre a mi lado y apoyarme en los momentos más difíciles.

A mi querida Nikky.

A todos Ustedes les dedico este esfuerzo y trabajo.

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios Yavé, por darme la vida y salud y guiarme con su luz para vencer los obstáculos que se me han presentado.

A mis padres, María José De Freitas y Manuel Avelino Figueira, por darme su amor incondicional, por confiar en mí y apoyarme en cada momento de mi vida y haberme financiado gran parte de mi Postgrado.

A mi tutora la Dra. Anita Stern Israel, por orientarme y brindarme su apoyo y sabios consejos a todo momento en la realización de mi tesis.

Al FONACIT, por financiarme gran parte de mi Postgrado.

Al Ministerio del Poder Popular para la Ciencia, Tecnología e Innovación, a través del Proyecto Misión Ciencia N° 2007001585.

A Bany Caraballo, por su asistencia y colaboración en el sacrificio y cuidado de los animales.

A la Dra. María del Rosario Garrido por su valiosa colaboración y asistencia.

A mis compañeras de trabajo María Gabriela Matos, Elsa Camacho, Mariella Pastorello y Elodie Billet por su colaboración y ayuda prestada.

A la Dra. Neira Gamboa por su incondicional ayuda, apoyo moral en los momentos más difíciles en mi estadía en el Postgrado, y por permitirme realizar algunos experimentos en la Unidad de Bioquímica.

A la Dra. Marlene Vargas y a María Eugenia Pineda por su valiosa amistad y colaboración al permitirme realizar algunos experimentos en el Laboratorio de Investigaciones.

Al Dr. Jesús del Castillo y a Freddy González por su invaluable ayuda en facilitarme los animales, sin eso no sería posible la realización de este trabajo.

A mis amigas, María Eugenia Acosta, Silvia Díaz y Arlenia Montes, por siempre estar allí, apoyándome. Muchas gracias amigas.

A todos ustedes.

**GRACIAS...**

## **RESUMEN**

La adrenomedulina (AM) es un péptido ubicuo de 52 residuos de aminoácidos que cumple funciones importantes en la regulación de la función cardiovascular (CDV). La AM ejerce sus acciones a través de su unión con tres subtipos de receptores, el receptor del péptido relacionado al gen de la calcitonina tipo 1 (CGRP1), el receptor de AM tipo 1 (AM1) y tipo 2 (AM2). El CGRP1 está formado por el receptor similar al receptor de calcitonina (CRLR) y la proteína que modifica la actividad del receptor tipo 1 (RAMP1). El AM1 por el CRLR+RAMP2 y el AM2 por el CRLR+RAMP3. A nivel del sistema nervioso central, la AM y sus receptores se localizan en diversas regiones, incluyendo el cerebelo. Se ha demostrado marcados incrementos en la densidad de los sitios de unión para la AM en el cerebelo durante la hipertensión, lo que sugiere un papel del sistema adrenomedulinérgico cerebeloso en la regulación de la presión arterial (PA). En el presente estudio se evaluó la participación de la AM cerebelosa en la regulación de la PA. Nuestros hallazgos muestran la existencia de desregulación de los componentes del sistema AM cerebeloso durante la hipertensión, ya que se encontró una reducida expresión de CRLR, RAMP1 y RAMP3 y una incrementada expresión de la AM y RAMP2 en el vermis de cerebelo de ratas hipertensas (SHR), cuando se comparó con las ratas controles, Wistar Kyoto (WKY), de 8 y 16 semanas de edad. La reducción de la PA mediante el tratamiento crónico con valsartán (60mg/Kg/día,p.o.) revirtió las desregulación de la AM y los componentes de su receptor, observados en las ratas SHR. El papel de las especies reactivas de oxígeno (EROS) en la acción de la AM cerebelosa quedó evidenciado, ya que la AM fue capaz de reducir la actividad de las tres enzimas antioxidantes, superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx), en las ratas WKY y Sprague - Dawley (SD). Aún mas, nuestros hallazgos mostraron claramente el efecto antagónico entre la AM y la ANG II sobre la actividad de las enzimas antioxidantes inducida por la ANG II. El efecto de la AM sobre las enzimas antioxidantes no se manifestó en la ratas hipertensas, sin embargo el mismo fue restaurado mediante la disminución de la presión arterial con la

administración crónica de dos antihipertensivos de mecanismo de acción distintos como la amlodipina (5mg/Kg/día,p.o) o el valsartán (60mg/Kg/día,p.o), lo que sugiere una relación entre la hipertensión y ausencia del efecto de AM en las ratas SHR. Al evaluar la posible vía de señalización que media la acción de la AM y el antagonismo con la ANG II sobre la actividad de las enzimas antioxidantes, demostramos que no existe una vía final común para dicho antagonismo, siendo la proteína quinasa A (PKA) y los 3 subtipos de receptores CGRP1, AM1 y AM2 los que median la acción de la AM, mientras que la acción de la ANG II se encuentra mediada a través de una vía que involucra la PKC/NAD(P)H oxidasa. Los hallazgos demuestran el antagonismo entre la AM y la ANG II en la regulación del estrés oxidativo en el cerebelo y ratifican la desregulación de la señalización de la AM mediada por EROs durante la hipertensión. Al evaluar las vías de señalización intracelular que median la acción de la AM en el cerebelo, demostramos que la AM es capaz de activar a las ERK, la producción de GMPc y NO a través de la estimulación del receptor AM1, y del AMPc a través de los tres subtipos de receptores de AM, lo que apoya que en el cerebelo la AM ejerce acciones a través de diversas vías de señalización como lo son NO/GMPc, AC/AMPc/PKA y/o ERK. El posible papel funcional de la AM *in vivo* fue inequívoco, ya que se demostró que la microinyección de AM en el vermis cerebeloso produjo una respuesta hipotensora profunda en las ratas SHR pero no en las normotensas. El hecho que la microinyección de AM en el vermis cerebelar en las ratas SD, WKY y SHR disminuyó significativamente la respuesta presora frente al estrés simpatoadrenal inducido por el estímulo eléctrico plantar, sugiere que la acción hipotensora está mediada a través de la regulación del eflujo simpático e indica un posible papel de la AM en la regulación de la respuesta CDV frente al estrés. En conjunto, nuestros resultados demuestran la existencia de un sistema adrenomedulinérgico funcional en el cerebelo, e indican por primera vez, que la AM cumple un papel importante en la regulación de la PA durante la hipertensión y el estrés.

## TABLA DE CONTENIDO

	Título	i
	Veredicto	ii
	Dedicatoria	iv
	Agradecimientos	v
	Resumen	vi
	Tabla de Contenidos	viii
	Lista de Tablas	xiv
	Lista de Figuras	xv
	Lista de Abreviaturas	xxv
1.	Introducción	1
1.1.	La Adrenomedulina	6
1.2.	Los Receptores de la Adrenomedulina	14
1.3.	Vías de Señalización de la Adrenomedulina	26
1.3.1	Principales Vías de Señalización de la Adrenomedulina	28
1.3.1.1.	Vía de la Adenosina Monofosfato Cíclico (AMPc) / Proteína Quinasa A (PKA)	28
1.3.1.2.	Vía Proteína Tirosina Quinasa (PTK) / Quinasa regulada por señales Extracelulares (ERK)	31
1.3.1.3	Vía Óxido Nítrico (NO) / Guanosina Monofosfato Cíclico (GMPc) / Proteína Quinasa G (PKG)	32
1.3.1.4.	Vía Fosfatidil inositol – 3 quinasa (PIK3) / Akt	33
1.3.1.5.	Señalización a través de Especies Reactivas de Oxígeno (EROs)	34



1.3.1.6.	Otras Vías de Señalización	38
1.4.	Acciones de la Adrenomedulina	40
1.4.1.	Acciones Cardiovasculares	41
1.4.2.	Acciones en el Sistema Nervioso	43
1.4.3.	Acciones Renales	44
1.4.4.	Otras Acciones	45
1.5.	La Adrenomedulina en la Hipertensión	46
1.6.	La Adrenomedulina y el Sistema Nervioso Central	54
1.7.	La Adrenomedulina y el Cerebelo	75
2.	Objetivos	83
2.1.	Objetivo General	83
2.2.	Objetivos Específicos	84
3.	Materiales y Métodos	86
3.1.	Animales de Experimentación	86
3.2.	Drogas	86
3.3.	Diseño Experimental	86
3.3.1.	Protocolo de Incubación <i>In Vitro</i>	88
3.3.2.	Ensayos para la Determinación de las Vías de Señalización	89
3.3.2.1.	Ensayo de la Guanilil Ciclasa	89
3.3.2.1.1.	Determinación del GMPc	89
3.3.2.2.	Ensayo de la Adenilil Ciclasa	90
3.3.2.2.1.	Determinación del AMPc	91
3.3.2.3.	Determinación del Recambio de Fosfoinosítidos	91

3.3.2.4.	Ensayo para la determinación de la producción de NO	92
3.3.2.5.	Determinación de las ERK	92
3.3.3.	Preparación de la Muestra para la Determinación de la Actividad de las Enzimas Antioxidantes	93
3.3.3.1.	Ensayo de la Actividad de la Catalasa (CAT)	94
3.3.3.2.	Ensayo de la Actividad de la Superóxido Dismutasa Total (SOD)	94
3.3.3.3.	Ensayo de la Actividad de la Glutación Peroxidasa (GPx)	96
3.3.4.	Ensayo de la concentración de productos de peroxidación lipídica que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBARS)	97
3.3.5.	Determinación de las Proteínas Tisulares	98
3.3.6.	Protocolos <i>In Vivo</i>	98
3.3.6.1.	Administración <i>In Situ</i> en el Vermis Cerebeloso	98
3.3.6.2.	Administración <i>in situ</i> en el Vermis Cerebeloso en animales sometidos a estímulo eléctrico plantar (EEP)	99
3.3.6.3.	Administración del Bloqueante AT <sub>1</sub> o del Antagonista de canales de calcio	100
3.3.7.	Determinación de la Expresión de la AM y sus Receptores	100
3.3.8.	Determinación de la Presión Arterial	101
3.3.9.	Preparación de los tejidos y examinación de los cortes histológicos de corazón	102
3.4.	Análisis Estadístico	103
4.	Resultados	104
4.1.	Características de las ratas SHR y WKY de 8 y 16 semanas de edad	104

4.2.	Expresión de la AM en el vermis de cerebelo de ratas WKY y SHR de 8 y 16 semanas de edad	105
4.3.	Expresión de los componentes del receptor de AM en el vermis del cerebelo de la rata	107
4.4.	Efecto de la AM sobre la actividad de las enzimas antioxidantes SOD, CAT y GPx en el vermis cerebelar de la rata SHR y controles normotensos, WKY adultos. Papel de la angiotensina II	116
4.5.	Efecto de la administración <i>in vivo</i> de valsartán y amlodipina sobre la Presión Arterial Media (PAM) en ratas SHR y WKY adultas	121
4.6.	Efecto de la administración <i>in vivo</i> de valsartán y amlodipina sobre la relación Peso Corazón / Peso Corporal en ratas SHR y WKY adultas	122
4.7.	Efecto de la administración <i>in vivo</i> de valsartán y amlodipina sobre el tamaño de los miocitos cardíacos de ventrículo izquierdo en ratas SHR y WKY adultas	124
4.8.	Efecto de la administración <i>in vivo</i> de valsartán y amlodipina sobre la acción de la AM sobre la actividad de las enzimas antioxidantes <i>in vitro</i> , en ratas SHR y WKY adultas	128
4.9.	Efecto de la administración <i>in vivo</i> de valsartán sobre la expresión de AM y los componentes de su receptor en el vermis de cerebelo de ratas SHR y WKY adultas	132
4.10.	Efecto de la AM sobre la actividad de las enzimas antioxidantes en el vermis cerebeloso en ratas Sprague - Dawley. Papel de la angiotensina II	138
4.11.	Papel de la NADP(H) oxidasa, la PKA y la PKC en la acción de la AM y la ANG II sobre la actividad de las enzimas antioxidantes en el vermis del cerebelo de la rata Sprague - Dawley	140
4.12.	Subtipos de receptores que median la acción de la AM sobre la actividad de las enzimas antioxidantes en el	144

	cerebelo de la rata	
4.13.	Efecto de la AM sobre la producción de TBARS en el vermis cerebelar de la rata SHR y controles normotensos, WKY adultos	146
4.14.	Efecto de la AM y ANG II sobre la producción de TBARS en el vermis cerebelar de la rata Sprague – Dawley	147
4.15.	Subtipos de receptores que median la acción de la AM sobre la producción de TBARS en el cerebelo de la rata	148
4.16.	Papel de la hipertensión sobre la activación basal de las ERK en el vermis del cerebelo de la rata	149
4.17.	Efecto de la AM sobre la activación de la vía de señalización ERK en el vermis cerebeloso en ratas SHR y WKY	151
4.18.	Subtipos de receptores que median la acción de la AM sobre la activación de la ERK en el cerebelo de la rata	153
4.19.	Efecto de la AM sobre la activación de la producción de fosfoinositol en el vermis cerebeloso en la rata	155
4.20.	Efecto de la AM sobre la producción de AMPc en el vermis cerebeloso de ratas WKY y SHR	155
4.21.	Subtipos de receptores que median la acción de la AM sobre la producción de AMPc en el cerebelo de la rata Sprague - Dawley	157
4.22.	Efecto de la AM sobre la activación de la guanilil ciclasa en el vermis cerebeloso de ratas WKY y SHR	158
4.23.	Subtipos de receptores que median la acción de la AM sobre la activación de la guanilil ciclasa en el cerebelo de la rata Sprague - Dawley	160
4.24.	Efecto de la AM sobre la producción de NO en el vermis cerebeloso de ratas WKY y SHR	161
4.25.	Subtipos de receptores que median la acción de la AM sobre la producción de NO en el cerebelo de la rata	163

	Sprague – Dawley	
4.26.	Efecto de la administración intracerebelar de AM sobre la presión arterial en ratas Sprague - Dawley, WKY y SHR adultas	164
4.27.	Efecto de la administración intracerebelar de ANG II sobre la presión arterial media en ratas Sprague-Dawley, WKY y SHR adultas	173
4.28.	Efecto de la administración intracerebelar de AM sobre la presión arterial media en ratas Sprague-Dawley, WKY y SHR adultas sometidas a estrés por estímulo eléctrico plantar (EEP)	176
4.29.	Efecto de la administración intracerebelar de ANG II sobre la presión arterial media en ratas SHR adultas sometidas a estrés por estímulo eléctrico plantar (EEP)	182
5.	Discusión	184
6.	Conclusiones	236
7.	Referencias Bibliográficas	239

## LISTA DE TABLAS

Tabla I	Definición y Clasificación de los Niveles de Presión Arterial	2
Tabla II	Prevalencia de Hipertensión Arterial en Varios Países Latinoamericanos	3
Tabla III	Características Farmacológicas de los heterodímeros CRLR/RAMP recombinates	24
Tabla IV	Efectos Biológicos de la AM	41
Tabla V	Características de las ratas WKY y SHR de 8 y 16 semanas de edad	104
Tabla VI	Efecto del tratamiento con valsartán (VAL) <i>in vivo</i> , sobre la relación Peso Corazón / Peso Corporal en ratas WKY y SHR	123
Tabla VII	Efecto del tratamiento con amlodipina (AMLO) <i>in vivo</i> , sobre la relación Peso Corazón / Peso Corporal en ratas WKY y SHR	124

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Mecanismo Fisiopatológico de la Hipertensión	5
Figura 2	Estructura de la AM humana	7
Figura 3	Comparación de la secuencia de aminoácidos de la AM de diferentes especies animales	8
Figura 4	Péptidos derivados del gen de la AM	10
Figura 5	AM inmunoreactiva en células de médula suprarrenal de bovino y en línea celular de oligodendrocitos	13
Figura 6	Diagrama esquemático del CRLR	16
Figura 7	Unión de los péptidos de la familia de la calcitonina a CLR y CTR: Regulación por las RAMPs	18
Figura 8	El paradigma del RAMP/Receptor para la señalización de la AM y CGRP	19
Figura 9	Northern blots de ARN de tejido de ratas hibridado con CRLR, RAMP1, RAMP2 y RAMP3	20
Figura 10	Comparación estructural de las RAMPs	22
Figura 11	Elevación del AMPc de plaquetas en respuesta a concentraciones crecientes de CGRP, AM y amilina	27
Figura 12	Vías de Señalización de la AM	28
Figura 13	Curso temporal de acumulación de AMPc por AM, CGRP o amilina	29
Figura 14	Efecto de la AM ( $10^{-7}$ M) sobre la producción de GMPc y la actividad de la sintasa de óxido nítrico	33
Figura 15	Formación de Radicales Libres	35
Figura 16	Expresión de p22phox y la Actividad de la NAD(P)H oxidasa en ratas Wistar Kioto (WKY) y	36

Espontáneamente Hipertensas (SHR)		
Figura 17	Incremento de la concentración de $Ca^{+2}$ intracelular ( $Ca^{2+}$ )i inducido por AM en células KG-1C	38
Figura 18	Cambio en la expresión de ARNm de adrenomedulina (ADM), CL, RAMPs en el ventrículo de ratas controles e hipertensas	47
Figura 19	Expresión de la ADM (AM) y Neprisilina (NEP) en el ventrículo izquierdo, aorta, yeyuno y riñón en ratas SHR y WKY	47
Figura 20	Efecto de la administración crónica de L-NAME (20 y 50 mg/Kg/día) durante 8 semanas en ratas sobre la expresión de la AM en cardiomiocitos del ventrículo izquierdo.	49
Figura 21	Efectos de la administración crónica de L-NAME (20 mg/Kg/día) durante 8 semanas sobre la expresión de CRLR, RAMP1, RAMP2 y RAMP3 en cardiomiocitos del ventrículo izquierdo.	50
Figura 22	Efecto del estrés crónico sobre la expresión de AM, CRLR, RAMP2 y RAMP3 en el bulbo raquídeo, el mesencéfalo, el hipotálamo, la glándula pituitaria y suprarrenal	53
Figura 23	Concentración de AM inmunoreactiva (IR-ADM) en el cerebro humano	55
Figura 24	Sección de la pituitaria de una rata hibridada con pro-AM	56
Figura 25	ARNm de la AM en cerebro humano	57
Figura 26	Distribución autoradiográfica de los sitios de unión de la $I^{125}$ AM(13-53) humana en el cerebro de la rata	58
Figura 27	Sitios de unión para la AM- $I^{125}$ en el cerebro humano	59
Figura 28	Colocalización de CRLR y RAMP2 o CRLR y RAMP3 en neuronas hipotalámicas.	59



Figura 29	Expresión celular de CGRP y RAMPs en arterias meníngea media (MMA), cerebral pial (PA) y media (MCA) en humanos	60
Figura 30	Efecto de la administración central de la AM sobre la ingesta de sal inducida por hipovolemia isotónica	62
Figura 31	Efecto renal inducido por la administración <i>icv</i> de AM o CGRP en ratas hidratadas conscientes	63
Figura 32	Efecto de una simple inyección <i>icv</i> de AM sobre la excreción urinaria de agua, sodio y potasio en ratas conscientes hidratadas	64
Figura 33	Inhibición de la actividad de la Na <sup>+</sup> K <sup>+</sup> ATPasa en el túbulo proximal renal tras la administración de AM en el órgano subfornical	65
Figura 34	Efecto de la administración <i>icv</i> de AM sobre los niveles plasmáticos de oxitocina en ratas.	66
Figura 35	Inmunoreactividad a c-fos y SON neuronal (SONn) en el PVN, NSO, NTS y PGL.	67
Figura 36	Curso temporal de la presión arterial media y frecuencia cardíaca en ratas tras administración unilateral de salina o AM en el RVLM.	68
Figura 37	Efecto de ADM22-52 sobre el curso temporal de la presión arterial media y frecuencia cardíaca en ratas tras administración unilateral de salina o AM en el RVLM.	69
Figura 38	Efecto de 7-NiNa sobre el curso temporal de la presión arterial media y frecuencia cardíaca en ratas tras administración unilateral de salina, AM, NiNa, azul de metileno en el RVLM.	70
Figura 39	Porcentaje de cambio de la presión arterial media (MAP) y de la actividad simpática (SNA) y contenido de AM en cerebro de los cuatro grupos de ratones	72
Figura 40	Porcentaje de cambio de la presión arterial media	74

(MAP) y de la actividad simpática (SNA) en respuesta a la administración icv de solución salina hipertónica y pretratamiento con 3CP (3-carbamoil-2,2,5,5-tetrametil-3-pirolina-N-oxil) o tempol en cerebro. Producción de anión superóxido en hipotálamo inmerso en salina hiperosmótica de los cuatro grupos de ratones

Figura 41	Respuesta dilatadora de las arteriolas cerebrales a dos aplicaciones tópicas de AM	75
Figura 42	RT-PCR de ARNm para CRLR, CTR y RAMPs en cerebelo humano.	76
Figura 43	Unión del <sup>125</sup> I-hAM (13-52) al cerebelo de rata	77
Figura 44	Módulos CDV en el cerebelo	79
Figura 45	Diagrama esquemático del sistema de control CDV en el nódulo – úvula	80
Figura 46	Cambio en la expresión de la AM en el vermis de cerebelo de ratas WKY y SHR de 8 y 16 semanas de edad	105
Figura 47	Efecto de la edad sobre la expresión de la AM en el vermis de cerebelo de ratas WKY y SHR	106
Figura 48	Cambio en la expresión de la RAMP1 en el vermis de cerebelo de ratas WKY y SHR de 8 y 16 semanas de edad	108
Figura 49	Cambio en la expresión de la RAMP3 en el vermis de cerebelo de ratas WKY y SHR de 8 y 16 semanas de edad	109
Figura 50	Cambio en la expresión de la CRLR en el vermis de cerebelo de ratas WKY y SHR de 8 y 16 semanas de edad	110
Figura 51	Efecto de la edad sobre la expresión de la RAMP1 en el vermis de cerebelo de ratas WKY y SHR	111

Figura 52	Efecto de la edad sobre la expresión de la RAMP3 en el vermis de cerebelo de ratas WKY y SHR	112
Figura 53	Efecto de la edad sobre la expresión de la CRLR en el vermis de cerebelo de ratas WKY y SHR	113
Figura 54	Cambio en la expresión de la RAMP2 en el vermis de cerebelo de ratas WKY y SHR de 8 y 16 semanas de edad	114
Figura 55	Efecto de la edad sobre la expresión de la RAMP2 en el vermis de cerebelo de ratas WKY y SHR	115
Figura 56	Efecto de la AM y ANG II sobre la actividad de las enzimas antioxidantes, SOD en el vermis de cerebelo de ratas WKY y SHR	118
Figura 57	Efecto de la AM y ANG II sobre la actividad de las enzimas antioxidantes, CAT en el vermis de cerebelo de ratas WKY y SHR	119
Figura 58	Efecto de la AM y ANG II sobre la actividad de las enzimas antioxidantes, GPx en el vermis de cerebelo de ratas WKY y SHR	120
Figura 59	Efecto del tratamiento con valsartán (VAL) <i>in vivo</i> , sobre la PAM en ratas WKY y SHR	121
Figura 60	Efecto del tratamiento con amlodipina (AMLO) <i>in vivo</i> , sobre la PAM en ratas WKY y SHR	122
Figura 61	Cortes histológicos de ventrículo izquierdo de ratas tratadas con valsartán (VAL) <i>in vivo</i>	125
Figura 62	Efecto del tratamiento oral con valsartán (VAL) sobre el tamaño de miocitos de ventrículo izquierdo de ratas WKY, WKY VAL, SHR y SHR VAL	126
Figura 63	Cortes histológicos de ventrículo izquierdo de ratas tratadas con amlodipina (AMLO) <i>in vivo</i>	127
Figura 64	Efecto del tratamiento oral con amlodipina (AMLO) sobre el tamaño de miocitos de ventrículo izquierdo de	128

	ratas WKY, WKY AMLO, SHR y SHR AMLO	
Figura 65	Efecto del tratamiento con valsartán (VAL) <i>in vivo</i> , sobre la actividad de las enzimas antioxidantes, SOD, CAT y GPx basal e inducida por la AM en el vermis de cerebelo de ratas WKY y SHR	130
Figura 66	Efecto del tratamiento con amlodipina (AMLO) <i>in vivo</i> , sobre la actividad de las enzimas antioxidantes, SOD, CAT y GPx basal e inducida por la AM en el vermis de cerebelo de ratas WKY y SHR	131
Figura 67	Efecto del tratamiento con valsartán (VAL) <i>in vivo</i> , sobre la expresión de la AM en el vermis de cerebelo de ratas WKY y SHR	132
Figura 68	Efecto del tratamiento con valsartán (VAL) <i>in vivo</i> , sobre la expresión de la RAMP1 en el vermis de cerebelo de ratas WKY y SHR	134
Figura 69	Efecto del tratamiento con valsartán (VAL) <i>in vivo</i> , sobre la expresión de RAMP3 en el vermis de cerebelo de ratas WKY y SHR	135
Figura 70	Efecto del tratamiento con valsartán (VAL) <i>in vivo</i> , sobre la expresión de CRLR en el vermis de cerebelo de ratas WKY y SHR	136
Figura 71	Efecto del tratamiento con valsartán (VAL) <i>in vivo</i> , sobre la expresión de RAMP2 en el vermis de cerebelo de ratas WKY y SHR	137
Figura 72	Efecto de la AM y ANG II sobre la actividad de las enzimas antioxidantes, SOD, CAT y GPx en el vermis de cerebelo de ratas Sprague – Dawley	139
Figura 73	Efecto de la apocinina sobre el efecto inducido por la AM y ANG II sobre la actividad de las enzimas antioxidantes, SOD, CAT y GPx en el vermis de cerebelo de ratas Sprague – Dawley	141
Figura 74	Efecto de la cheleritrina sobre el efecto inducido por la AM y ANG II sobre la actividad de las enzimas	142

	antioxidantes, SOD, CAT y GPx en el vermis de cerebelo de ratas Sprague – Dawley	
Figura 75	Efecto del inhibidor de la PKA (iPKA) sobre el efecto inducido por la AM y ANG II sobre la actividad de las enzimas antioxidantes, SOD, CAT y GPx en el vermis de cerebelo de ratas Sprague – Dawley	143
Figura 76	Subtipos de receptores de AM involucrados en la disminución de la actividad de las enzimas antioxidantes, SOD (Panel A), CAT (Panel B) y GPx (Panel C) inducida por la AM en el vermis de cerebelo de ratas Sprague – Dawley	145
Figura 77	Efecto de la AM sobre la producción de TBARS en el vermis de cerebelo de ratas WKY y SHR	147
Figura 78	Efecto de la AM y ANG II sobre la producción de TBARS en el vermis de cerebelo de ratas Sprague-Dawley	148
Figura 79	Subtipos de receptores de AM involucrados en la disminución de la producción de TBARS inducida por la AM en el vermis de cerebelo de ratas Sprague – Dawley	149
Figura 80	Efecto de la hipertensión sobre la expresión basal de las p-ERK en el vermis de cerebelo de ratas WKY y SHR	150
Figura 81	Efecto de la AM sobre la activación (fosforilación) de las ERK en el vermis de cerebelo de ratas WKY y SHR	152
Figura 82	Subtipos de receptores de AM involucrados en la activación (fosforilación) de las ERK en el vermis de cerebelo de ratas Sprague – Dawley	154
Figura 83	Efecto de la AM sobre la activación de la producción de monofosfato de inositol en el vermis de cerebelo de ratas Sprague – Dawley	155

Figura 84	Efecto de la AM sobre la producción de AMPc en el vermis de cerebelo de ratas WKY y SHR	156
Figura 85	Subtipos de receptores de AM involucrados en la producción de AMPc en el vermis de cerebelo de ratas Sprague – Dawley	158
Figura 86	Efecto de la AM sobre la activación de la guanilil ciclasa en el vermis de cerebelo de ratas WKY y SHR	159
Figura 87	Subtipos de receptores de AM involucrados en la activación de la guanilil ciclasa en el vermis de cerebelo de ratas Sprague – Dawley	161
Figura 88	Efecto de la AM sobre la producción de nitratos en el vermis de cerebelo de ratas WKY y SHR	162
Figura 89	Subtipos de receptores de AM involucrados en la producción de NO en el vermis de cerebelo de ratas Sprague – Dawley	163
Figura 90	Coordenadas Estereotáxicas empleadas para la canulación de los animales	164
Figura 91	Efecto de la administración <i>in situ</i> de AM en el vermis de cerebelo de ratas Sprague - Dawley sobre la presión arterial media	165
Figura 92	Efecto de la administración <i>in situ</i> de AM en el vermis de cerebelo de ratas WKY sobre la presión arterial media	166
Figura 93	Efecto de la administración <i>in situ</i> de AM en el vermis de cerebelo de ratas SHR sobre la presión arterial media	167
Figura 94	Efecto de la administración <i>in situ</i> de AM en el vermis de cerebelo de ratas SHR sobre la presión arterial media en el tiempo	168
Figura 95	Efecto de la administración <i>in situ</i> de varias dosis de AM en el vermis de cerebelo de ratas SHR sobre la presión arterial media	169

Figura 96	Efecto de la administración <i>in situ</i> de varias dosis de AM en el vermis de cerebelo de ratas SHR sobre la AUC del cambio de presión arterial media	170
Figura 97	Efecto de la administración <i>in situ</i> de AM fuera del vermis de cerebelo de ratas Sprague - Dawley sobre la presión arterial media	171
Figura 98	Efecto de la administración <i>in situ</i> de AM fuera del vermis de cerebelo de ratas WKY sobre la presión arterial media	172
Figura 99	Efecto de la administración <i>in situ</i> de AM fuera del vermis de cerebelo de ratas SHR sobre la presión arterial media	173
Figura 100	Efecto de la administración <i>in situ</i> de ANGII en el vermis de cerebelo de ratas Sprague-Dawley sobre la presión arterial media	174
Figura 101	Efecto de la administración <i>in situ</i> de ANG II en el vermis de cerebelo de ratas WKY sobre la presión arterial media	175
Figura 102	Efecto de la administración <i>in situ</i> de ANG II en el vermis de cerebelo de ratas SHR sobre la presión arterial media	176
Figura 103	Efecto de la administración <i>in situ</i> de AM en el vermis de cerebelo de ratas Sprague-Dawley sometidas a estrés por EEP sobre la presión arterial media	177
Figura 104	Efecto de la administración <i>in situ</i> de AM en el vermis de cerebelo de ratas WKY sometidas a estrés por EEP sobre la presión arterial media	178
Figura 105	Efecto de la administración <i>in situ</i> de AM en el vermis de cerebelo de ratas SHR sometidas a estrés por EEP sobre la presión arterial media	179
Figura 106	Efecto de la administración <i>in situ</i> de AM fuera del vermis de cerebelo de ratas Sprague-Dawley sometidas a estrés por EEP sobre la presión arterial	180

	media	
Figura 107	Efecto de la administración <i>in situ</i> de AM fuera del vermis de cerebelo de ratas WKY sometidas a estrés por EEP sobre la presión arterial media	181
Figura 108	Efecto de la administración <i>in situ</i> de AM fuera del vermis de cerebelo de ratas SHR sometidas a estrés por EEP sobre la presión arterial media	182
Figura 109	Efecto de la administración <i>in situ</i> de ANG II en el vermis de cerebelo de ratas SHR sometidas a estrés por EEP sobre la presión arterial	183
Figura 110	Efecto de la hipertensión y de la disminución de la presión arterial sobre la expresión de AM y los componentes de su receptor en el vermis de cerebelo	195
Figura 111	Propuesta del mecanismo de la vía de acción de la AM en el vermis de cerebelo de la rata	210
Figura 112	Vías de señalización activadas por la AM en el vermis de cerebelo de la rata	224
Figura 113	Propuesta del mecanismo de la vía de acción de la AM en el vermis de cerebelo de la rata	235



## LISTA DE ABREVIATURAS

AC	Adenilil Ciclasa
ACTH	Hormona Adrenocorticotropina
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AM	Adrenomedulina
AMi	Adrenomedulina inmadura
AMPc	Adenosina Monofosfato Cíclico
ANG II	Angiotensina II
AP	Área Postrema
AP-1	Proteína Adaptadora – 1
ARE	Elementos de Respuesta Antioxidantes
ARNm	Ácido Ribonucleico mensajero
AT1	Antagonista del Receptor tipo 1 de Angiotensina II
bCRLR	Receptor similar al receptor de calcitonina bovino
Ca <sup>+2</sup> <sub>i</sub>	Calcio Intracelular
CAT	Catalasa
CDV	Cardiovasculares
cGK	Proteínas quinasas dependientes de GMPc
CGRP	Péptido relacionado con el gen de la Calcitonina
CGRP $\alpha$	Péptido relacionado con el gen de la Calcitonina $\alpha$

CGRP $\beta$	Péptido relacionado con el gen de la Calcitonina $\beta$
CRH	Hormona liberadora de Corticotropina
CRLR	Receptor similar al receptor de calcitonina
CRLR 1	Receptor similar al receptor de calcitonina tipo 1
CRLR 2	Receptor similar al receptor de calcitonina tipo 2
Csk	Quinasa Src COOH- terminal
CT	Calcitonina
CTr	Receptor de Calcitonina
CTX	Proteína G sensible a la toxina del cólera
EDHF	Factor Hiperpolarizante Derivado del Endotelio
EEP	Estímulo eléctrico plantar
ERK	Quinasa regulada por señales extracelulares
EROs	Especies Reactivas de Oxígeno
FNT- $\alpha$	Factor de Necrosis tumoral - $\alpha$
GABA	Ácido Gamma Aminobutírico
GAPDH	Gliceraldehído – 3 fosfato Deshidrogenasa
GC	Guanilil ciclasa
GMPc	Guanosina Monofostato cíclico
GPx	Glutación Peroxidasa
Gs	Proteína G estimuladora
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno

hCRLR	Receptor similar al receptor de calcitonina humano
hRAMP	Proteínas que modifican la actividad del receptor humano
ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular -1
<i>icv</i>	Intracerebroventricular
IFN- $\gamma$	Interferón gamma
IL-1	Interleuquina-1
IL-1 $\beta$	Interleuquina 1 $\beta$
InsP <sub>1</sub>	Monofosfato de inositol
IP3	Inositol 1,4,5 – Trifosfato
JNC VI	Sexto Reporte del Comité Nacional para la Prevención, Detección, Evaluación y Tratamiento de la Presión Arterial Alta
JNK	Proteína Quinasa c-Jun NH2 terminal
KBR	Buffer Krebs Ringer
Kd	Constante de disociación
Ki	Constante de inhibición
LCR	Líquido Cefalorraquídeo
MAP	Presión Arterial Media
MAPK	Proteína Quinasa activada por Mitógenos
MCP-1	Proteína-1 Quimiotáctica de Monocitos
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido reducido
NAD(P)H	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido

NEP	Neprisilina
NF	Núcleo Fastigio
NF- $\kappa$ B	Factor Nuclear kappa B
NHERF	Factor Regulador del Intercambiador $\text{Na}^+/\text{K}^+$
NO	Óxido Nítrico
$\text{NO}^-$	Anión Nitroxilo
$\text{NO}_2$	Dióxido de Nitrógeno
Nrf2	Factor 2 relacionado NF-E2
NSF	Factor sensible a N-etilmaleimida
NSO	Núcleo Supraóptico
NTS	Núcleo del Tracto Solitario
$\text{O}_2^-$	Anión Superóxido
$\text{OH}^-$	Radical Hidroxilo
OMS	Organización Mundial de la Salud
$\text{ONOO}^-$	Anión peroxinitrito
PA	Presión arterial
PAM	Presión arterial media
PAMP	Proadrenomedulina N-terminal 20 péptido
pCRLR	Receptor similar al receptor de calcitonina porcino
PDGF	Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas
PGL	Núcleo Paragigantocelularis Lateral

PIK3	Fosfatidilinositol – 3 Quinasa
PKA	Proteína Quinasa A
PKC	Proteína Quinasa C
PKG	Proteína Quinasa G
PLC	Fosfolipasa C
PTK	Proteína Tirosina Quinasa
PVN	Núcleo Paraventricular
RAMP	Proteínas que modifican la actividad del receptor
RCP	Proteína del componente del receptor
RVLM	Región Ventrolateral Rostral del Bulbo Raquídeo
SHR	Rata Espontáneamente Hipertensa
SNC	Sistema Nervioso Central
SOD	Superóxido Dismutasa
SON	Sintasa del Óxido Nítrico
SONe	Sintasa del Óxido Nítrico Endotelial
SONn	Sintasa del Óxido Nítrico Neuronal
TBARS	Productos de Peroxidación Lipídica que reaccionan con el Ácido Tiobarbitúrico
TGF- $\beta$	Factor de Crecimiento Transformante beta
VCAM-1	Molécula de adhesión celular vascular-1
WKY	Rata Wistar Kyoto

## 1. INTRODUCCIÓN

La hipertensión arterial es una enfermedad de etiología multifactorial que se caracteriza por la elevación mantenida de los niveles de la presión arterial por encima de los límites normales, que es capaz de ocasionar daños a varios y diferentes órganos, tales como el corazón, cerebro, vasos sanguíneos, riñón y retina (Zago y col., 2006); por lo tanto, la hipertensión arterial implica un elevado riesgo para el padecimiento de eventos cardiovasculares (CDV) y del deterioro del funcionamiento de diferentes órganos en el cual la presión arterial se encuentra crónicamente elevada por encima de los valores considerados normales (Sánchez y col., 2009).

La hipertensión arterial frecuentemente está asociada a otras enfermedades tales como diabetes mellitus, enfermedad coronaria, infarto, insuficiencia cardíaca, ataques isquémicos, enfermedad vascular periférica, insuficiencia renal crónica. Asimismo, la hipertensión persistente es considerada como uno de los factores de riesgo para infartos, aneurismas y es una de las causas que conlleva a la insuficiencia renal crónica. Incluso, la elevación moderada de la presión arterial trae consigo una disminución en la expectativa de vida; por su parte, cuando la presión arterial es marcadamente elevada (50% por encima del rango normal), la expectativa de vida se reduce en un 30 a 40%, a menos que la hipertensión sea tratada apropiadamente (Sánchez y col., 2009).

De acuerdo al Sexto Reporte del Comité Nacional para la Prevención, Detección, Evaluación y Tratamiento de la Presión Arterial Alta (JNC VI), la hipertensión en adultos se define y clasifica como se muestra en la Tabla I; donde se indica que el diagnóstico de hipertensión se establece cuando el promedio de dos o más mediciones de la presión arterial diastólica es igual o superior que 90 mm Hg o cuando el promedio de dos o más mediciones de la

presión arterial sistólica es igual o superior que 140 mm Hg (JNC, 1997). Tomando en cuenta esta definición, para el año 2000, se estimaba que alrededor de 43 millones de personas en los Estados Unidos eran hipertensos, lo cual representaba aproximadamente el 23% de la población del país (Carretero y col., 2000).

**Tabla I.** Definición y Clasificación de los Niveles de Presión Arterial (JNC, 1997).

Categoría	Sistólica (mm Hg)		Diastólica (mm Hg)
Óptimo	< 120	y	< 80
Normal	< 130	y	< 85
Normal alta	130 – 139	o	85 – 89
<b>Hipertensión</b>			
Estadio 1 (Leve)	140 – 159	o	90 – 99
Subgrupo: Límite	140 – 149	o	90 – 94
Estadio 2 (Moderado)	160 – 179	o	100 – 109
Estadio 3 (Severo)	$\geq 180$	o	$\geq 110$
Hipertensión Sistólica Aislada	$\geq 140$	y	< 90
Subgrupo: Límite	140 - 149	y	< 90

La prevalencia de la hipertensión arterial ha aumentado progresivamente, especialmente entre descendientes africanos y en personas mayores de edad. Se estima que más del 50% de los sujetos entre 60 – 69 años de edad y aproximadamente  $\frac{3}{4}$  de la población mayor de 70 años están afectados con esta enfermedad (Zago y col., 2006).

Esta enfermedad conocida como el enemigo silente constituye el principal factor de riesgo modificable para las enfermedades CDV (Carretero y col., 2000; Ignaro y col., 2007; Figueira y col., 2008; González y col., 2008), las cuales representan actualmente la principal causa de muerte en los países occidentales de acuerdo al reporte de la Organización Mundial de la Salud (OMS). Asimismo, Venezuela no escapa de esta realidad, pues las enfermedades CDV representan la principal causa de muerte en el país, ya que para el año 2006 estas enfermedades representaron el 34,2% de las muertes reportadas en enfermedades (Hernández, 2009).

En Latinoamérica, el 13% de las muertes registradas son atribuidas a la hipertensión arterial; siendo la prevalencia de esta enfermedad en la población adulta ajustada a la edad en estos países entre 26 a 42%. En la Tabla II se muestra la prevalencia y el porcentaje de mortalidad CDV en varios países de Latinoamérica (Sánchez y col., 2009).

**Tabla II.** Prevalencia de Hipertensión Arterial en Varios Países Latinoamericanos (Sánchez y col., 2009).

Países	Prevalencia de Hipertensión (%)	Hipertensión Tratada (%*)	Hipertensión Controlada (%*)	Mortalidad Cardiovascular (%)
Argentina	28,1	42	18	23,5
Brazil	25 – 35	40,5	10,2	27,5
Chile	33,7	36,3	11,8	28,4
Colombia	23	46	15	28
Ecuador	28,7	23	6,7	28
México	30,5	23	19,2	-
Paraguay	35	27	7	28
Perú	24	14,7	14	-
Uruguay	33	48	11	29,5
Venezuela	33	30	12	20,6

\* % referidos con respecto a la población hipertensa (Prevalencia de Hipertensión).

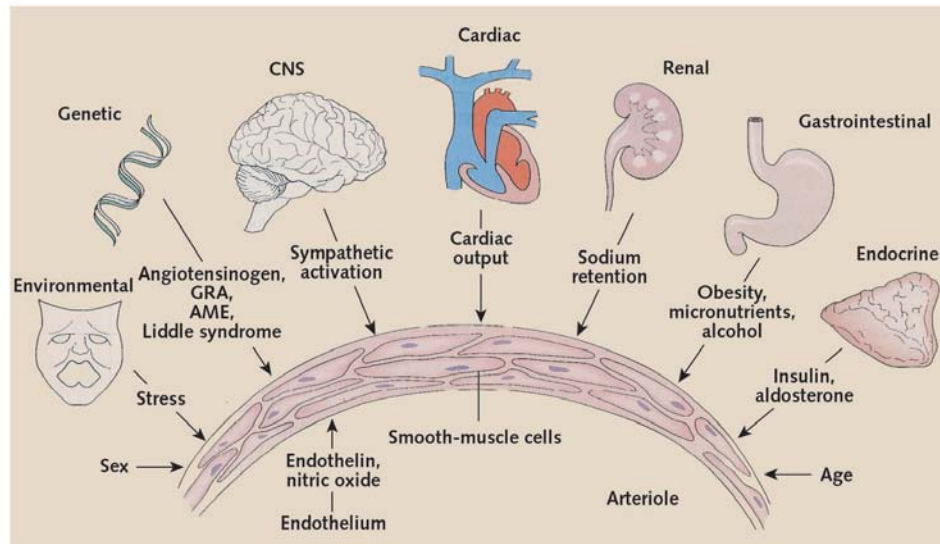


La hipertensión impone un enorme gasto económico y una importante carga social, debido a las morbilidades asociadas y a las complicaciones crónicas que deterioran la supervivencia y calidad de vida de la población; ya que diferentes estudios han mostrado que una muy importante proporción de las enfermedades CDV son debido a la elevación de la presión arterial; siendo el gasto global por tratamiento antihipertensivo cercano a 50 billones de dólares anuales (Sánchez y col., 2009).

Es conocido que en el control de la presión arterial participan tanto mecanismos neurales como humorales. La regulación neural involucra el sistema nervioso autónomo (asociado con los baroreceptores y quimiorreceptores). Por su parte, la regulación humoral implica un gran repertorio de sustancias liberadas por diferentes tipos celulares; por lo que, alteraciones en uno o ambos mecanismos de control, pueden resultar en la elevación de los niveles de presión arterial conllevando la hipertensión arterial (Zago y col., 2006).

Muchos factores fisiopatológicos han sido implicados en la génesis de la hipertensión arterial esencial, como el incremento en la actividad del sistema nervioso simpático relacionado con la respuesta y exposición al estrés, sobreproducción de hormonas que retienen sodio y vasoconstrictoras, alta ingesta de sodio por prolongado período de tiempo, ingesta inadecuada de potasio y calcio en la dieta, incrementada e inadecuada secreción de renina con el consecuente incremento en la producción de angiotensina II (ANG II) y aldosterona, deficiencia de vasodilatadores como prostaciclina, óxido nítrico (NO) y péptido natriurético, alteraciones en la expresión del sistema kalicreína – cinina que afecta el tono vascular y el manejo renal de la sal, anormalidades en los vasos de resistencia, diabetes mellitus, resistencia a la insulina, obesidad, incrementada actividad de factores de crecimiento vascular, alteraciones en los

receptores adrenérgicos y alterado transporte iónico celular (Fig. 1) (Oparil y col., 2003).



**Fig. 1.** Mecanismo Fisiopatológico de la Hipertensión. AME: Exceso aparente de mineralocorticoides. CNS: Sistema nervioso central. GRA: Aldosteronismo remediable con glucocorticoides (Oparil y col., 2003).

Sin embargo, la hipertensión es debida principalmente a un control humoral inapropiado precipitado por un incremento en el estrés oxidativo, incrementada producción de endotelina-1, disminución de la producción o biodisponibilidad del NO y debido a una sobre-estimulación del sistema renina – angiotensina (Zago y col., 2006). Estos cambios han sido asociados con las enfermedades CDV, demostrándose correlación directa y positiva entre la hipertensión y el riesgo para arritmias, hipertrofia cardíaca, infarto de miocardio e insuficiencia cardíaca (Zago y col., 2006; Larson y col., 2010).

Es conocido que los tejidos CDV sintetizan y secretan una gran cantidad de sustancias bioactivas que regulan la homeostasis circulatoria mediante mecanismos paracrinos, endocrinos y autocrinos. Un conjunto de evidencias

indican que estas sustancias bioactivas juegan un papel importante en la patogénesis de la hipertensión, por lo que los sistemas autocrinos – paracrinos constituyen un poderoso y potencial blanco terapéutico en la hipertensión, la adrenomedulina (AM) constituye uno de estos péptidos (Jiang y col., 2004).

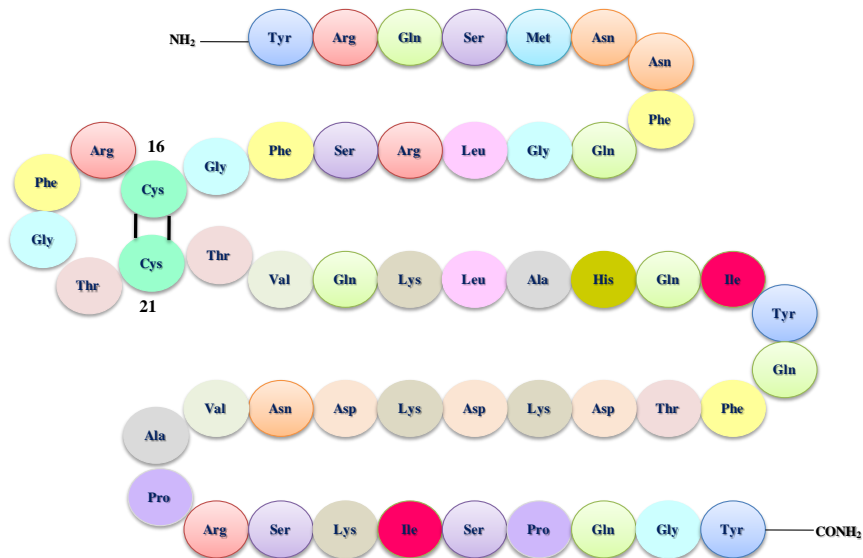
### 1.1. La Adrenomedulina

La AM es un péptido perteneciente a la familia de los péptidos de la calcitonina, el cual está formado por seis miembros que incluyen, la calcitonina (CT), amilina, el péptido relacionado con el gen de la calcitonina  $\alpha$  (CGRP $\alpha$ ), el péptido relacionado con el gen de la calcitonina  $\beta$  (CGRP $\beta$ ), la intermedina y la AM (Chakravarty y col., 2000; Poyner y col 2002; Roh y col., 2004; Takei y col., 2004), los mismos se caracterizan por presentar baja homología en su secuencia primaria de aminoácidos; sin embargo, muestran alta relación entre sus estructuras secundarias, puesto que poseen una estructura cíclica de seis residuos de aminoácidos cercano al extremo N- terminal (siete en el caso de la CT) formada por un puente disulfuro intramolecular; seguido por una región de hélice  $\alpha$  anfipática y un extremo C-terminal amidado (Cases y col., 2001; Poyner y col., 2002).

La AM fue aislada por primera vez en el feocromocitoma humano por Kitamura y col., en el año 1993. Este término fue acuñado debido a su elevada presencia tanto en la médula suprarrenal de sujetos normales como de pacientes con feocromocitoma. En su estudio, los investigadores no sólo purificaron el péptido y lo encontraron en concentraciones elevada en la circulación, sino que además encontraron que la AM tenía efecto sobre la presión sanguínea y causaba elevación de los niveles de adenosina monofosfato cíclico (AMPc) plaquetario (Kitamura y col., 1993<sup>A</sup>). Tres meses después de la purificación de la AM, el

mismo grupo de investigadores japoneses secuenciaron el gen que codifica al péptido humano (Kitamura y col., 1993<sup>B</sup>) y posteriormente, secuenciaron el gen que codifica la AM en ratas (Sakata y col., 1993).

La AM humana es un péptido de 52 residuos de aminoácidos de bajo peso molecular (alrededor de 6 KDa), que se caracteriza por tener una estructura de anillo cíclico formado por un puente disulfuro intramolecular entre la Cys 16 y 21, el cual forma un anillo de 6 residuos de aminoácidos. Además posee una Tyr amidada en su extremo carboxilo terminal, siendo estas características esenciales para su actividad biológica y unión a su receptor (Kitamura y col., 1993<sup>A</sup>; Díaz y col., 2006) (Fig. 2).



**Fig. 2.** Estructura de la AM humana. Nótese la estructura cíclica de seis residuos de aminoácidos, formada por un puente disulfuro intracadena cerca de la región N-terminal, y el extremo C-terminal amidado.

La estructura de la AM se encuentra altamente conservada entre las especies. En la rata, este péptido tiene 50 residuos de aminoácidos, evidenciándose 2

deleciones y 6 sustituciones cuando se compara con la AM humana. Por su parte, la AM porcina es muy parecida a la humana, difiere únicamente en un residuo de aminoácido, Gly por Asn en la posición 40 (Hinson y col., 2000) (Fig. 3).

<b>Human</b>	YRQSMNNFQGLRSFGCRFGTCTVQKLAHQIYQFTDKDKDNVAPRSKISPQGY-NH <sub>2</sub>
<b>Pig</b>	YRQSMNNFQGLRSFGCRFGTCTVQKLAHQIYQFTDKDKDGVAPRSKISPQGY-NH <sub>2</sub>
<b>Bovine</b>	YRQSLN <del>N</del> FQGLRSFGCRFGTCTVQKLAHQIYHFTDKDKDGSAPRSKISPQGY-NH <sub>2</sub>
<b>Rat</b>	YRQSMN--QGSRS <del>T</del> GCRFGTCTM <del>Q</del> KLAHQIYQFTDKDKDGM <del>A</del> PRNKISPQGY-NH <sub>2</sub>
<b>Mouse</b>	YRQSMN--QGSRSNGCRFGTCTF <del>Q</del> KLAHQIYQLTDKDKDGM <del>A</del> PRNKISPQGY-NH <sub>2</sub>

**Fig. 3.** Comparación de la secuencia de aminoácidos de la AM de diferentes especies animales. Los residuos de aminoácidos se comparan con la AM humana. –, Residuo eliminado (Hinson y col., 2000).

El gen que codifica a la AM humana se localiza en el cromosoma 11. En el procesamiento de la AM, la pre-pro-AM de 185 aminoácidos, es clivada a pro-AM de 164 aminoácidos, el cual es el precursor de dos péptidos vasoactivos, la AM y el péptido proadrenomedulina N- terminal 20 (PAMP) (Fig. 4) (Ishimitsu y col., 1994; Hinson y col., 2000).

Recientemente se ha descrito que la AM es secretada en forma de un péptido inmaduro de 53 residuos de aminoácidos que tiene una Gly en el extremo carboxilo terminal, denominado AM inmadura (AMi) y a partir de la cual se forma la AM madura de 52 residuos de aminoácidos mediante un proceso de amidación enzimática, donde el residuo de Gly dona el grupo amida al grupo ácido carboxílico libre en una reacción catalizada por la enzima peptidil glicina  $\alpha$ -mono-oxigenasa (EC 1.14.17.3); ésta es coexpresada con la AM en

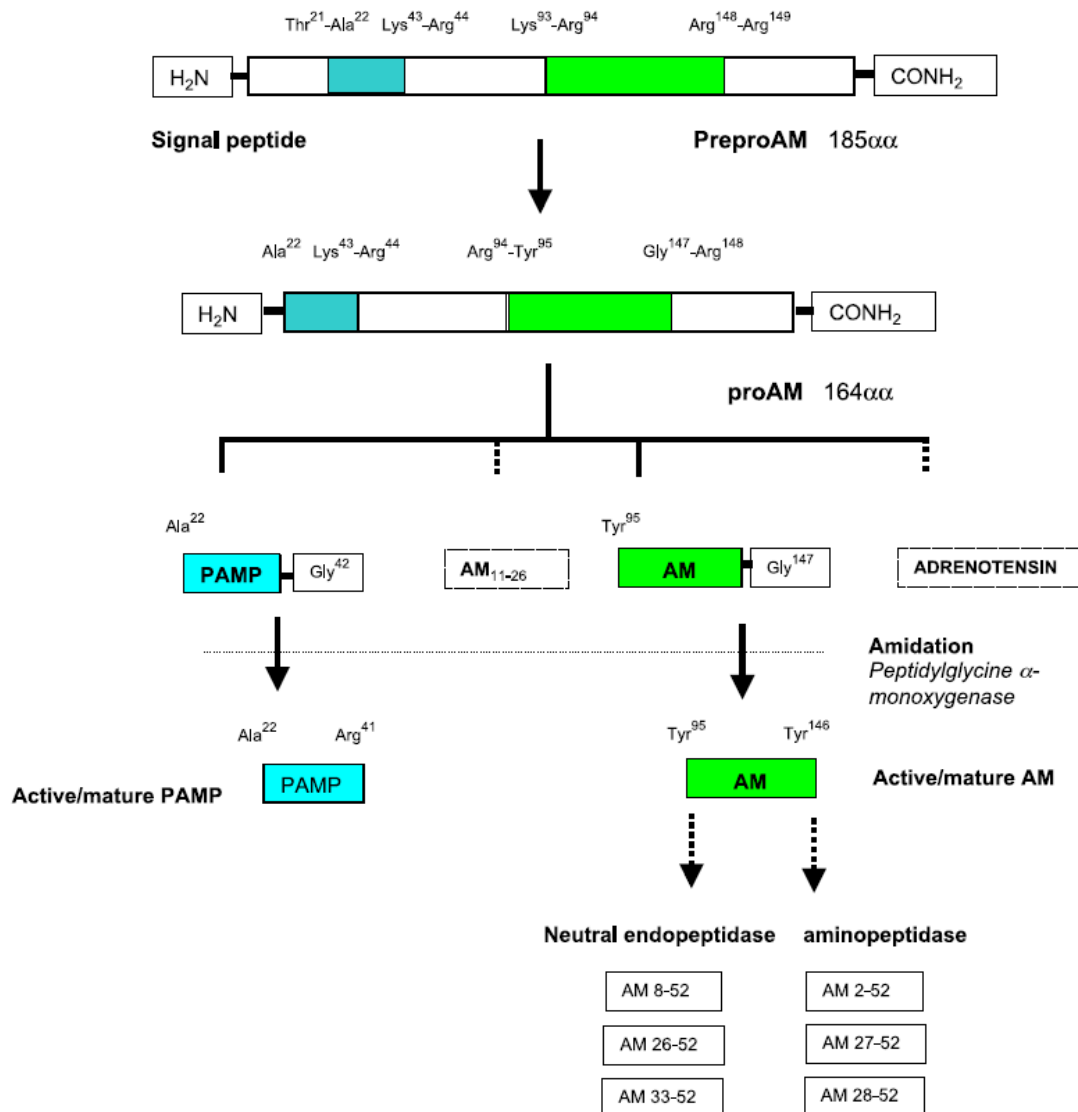
diferentes tejidos (Kitamura y col., 1998<sup>c</sup>; Cases y col., 2001; Beltowski y col., 2004).

La AMi es la principal forma circulante del péptido, representando alrededor del 85% de la AM total plasmática. A pesar de que la AMi es biológicamente activa *in vivo*, estos efectos dependen de la amidación del péptido a nivel tisular, ya que la co-administración de un inhibidor de la amidación elimina la actividad del péptido (Cao y col., 2003; Beltowski y col., 2004).

Adicionalmente, se ha descrito una proteína que es capaz de unir a la AM en el plasma de diferentes especies. Después de su purificación y secuenciación, esta molécula fue caracterizada como el factor H. Éste, es el principal regulador de la cascada alternativa del complemento. Además de sus funciones a nivel de la cascada del complemento y de unir a la AM, el factor H es capaz de regular las funciones de la AM, pues aumenta la actividad de la AM en los eventos mediados por sus receptores tales como la elevación del AMPc, crecimiento de células cancerígenas e inhibición de la liberación de insulina por los islotes pancreáticos; por otra parte, en la actividad antimicrobiana de la AM independiente del receptor, la presencia del factor H reduce el potencial antimicrobiano de la AM, posiblemente debido al secuestro del péptido del microambiente bacteriano (Pío y col., 2002; Serrano y col., 2003).

Es conocido que la expresión del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) de la AM, su síntesis y secreción se ve estimulada por muchos factores tales como la ANG II, endotelina-1, norepinefrina, estímulos físicos (estrés de rozamiento), los cuales además participan en la patogénesis de la hipertensión arterial (Eto, 2001). Asimismo, el estrés oxidativo, la hipoxia, hiperglicemia, aldosterona, la infusión del péptido natriurético auricular y las citoquinas proinflamatorias como

el factor de necrosis tumoral alfa (FNT- $\alpha$ ) y la interleuquina-1 (IL-1) estimulan la producción de AM (Sugo y col., 1995; Vesely y col 1996; Uemura y col., 2002; Beltowski y col., 2004).



**Fig. 4.** Péptidos derivados del gen de la AM. La AM y el PAMP son convertidos a su forma biológicamente activa mediante amidación. La AM es degradada por endopeptidasas neutras y aminopeptidasas (Hamid y col., 2005).

La concentración de AM plasmática en humanos en condiciones normales se encuentra entre un rango de 2 a 10 pM, y tiene un tiempo de vida media de  $22 \pm 1,6$  minutos (Meeran y col., 1997). Inicialmente, se pensaba que la fuente de esta AM plasmática era la médula suprarrenal; sin embargo diferentes evidencias rechazan esta aseveración. En primer lugar, en contraste con las catecolaminas, la concentración de AM en la vena suprarrenal no es superior a la encontrada en la vena cava inferior. En segundo lugar, estímulos fisiológicos como hipoglicemia e hipotensión, los cuales regulan la secreción de catecolaminas y AM suprarrenal, no tienen efecto sobre la concentración de AM plasmática. Por último, las concentraciones de AM plasmáticas no se ven incrementadas durante las crisis en los pacientes con feocromocitoma, cuando las catecolaminas son rápidamente liberadas. En la actualidad, se piensa que la AM plasmática es derivada principalmente de las células endoteliales en diferentes lechos vasculares (Beltowski y col., 2004); pues la expresión de la AM es 20 a 40 veces superior en las células endoteliales que en la médula suprarrenal (Kis y col., 2003); por lo que se considera que este péptido es un producto secretorio del endotelio (Hinson y col., 2000).

El contenido de AM en plasma y tejidos es el resultado de un cuidadoso equilibrio entre producción / degradación. Se ha sugerido que los pulmones constituyen el órgano encargado de depurar la AM circulante y modular sus concentraciones plasmáticas; diferentes estudios lo han confirmado (Nishikimi y col., 1994; Hirayama y col., 1999; Nishikimi y col., 2004). En la rata, la AM tiene un tiempo de vida media de eliminación corto de 16 min, un volumen de distribución para el compartimiento central corto de 3,5 mL y una rápida e importante distribución al compartimiento periférico; siendo los pulmones el sitio primario de depuración del péptido, donde se evidencia una depuración de primer paso mediada por receptores específicos de AM (Dupuis y col., 2005). Por otra parte, adicionalmente a los receptores de depuración, existe otra vía de depuración de la AM circulante, la hidrólisis proteolítica (Eto, 2001).

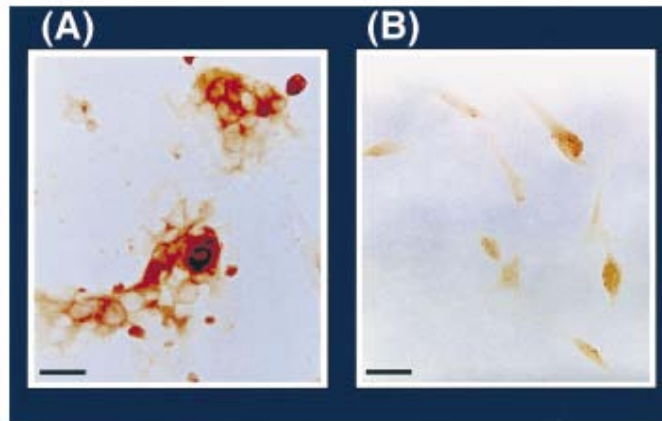


La Neprililina (NEP) es una endopeptidasa neutra que constituye la principal enzima que degrada a la AM (Lapointe y col., 2002). La NEP (E.C.3.4.24.11) es una metaloproteasa unida a la membrana de 87 – 96 KDa que tiene un pH óptimo de 7. El gen que codifica a la NEP humana se encuentra localizado en el cromosoma 3. La NEP tiene un centro activo que une zinc, que contribuye al clivaje de la AM en residuos hidrofóbicos. Asimismo, la AM puede ser hidrolizada por metaloproteasas *in vitro* para generar AM (8-52), AM (26-52), AM (33-52), y mediante la actividad de aminopeptidasas producir AM (2-52), AM (27-52), AM (28-52) (Fig. 4) (Hinson y col., 2000), los cuales, se creen poseen diferente actividad biológica (Lewis y col., 1997).

Se ha demostrado que la NEP tiene una distribución difusa en plasma y tejidos de la rata; sin embargo se ha reportado que las ratas espontáneamente hipertensas (SHR) tienen una menor expresión y actividad de la enzima en miocardio y aorta, y mayor actividad en riñón con respecto a ratas controles, Wistar Kyoto (WKY) (Jiang y col., 2004). Algunos estudios indican que las variaciones de la expresión de la NEP entre los tejidos puede ser debida a diferencias en las características fisiológicas y metabólicas de ellos; por otra parte, existen diversos factores que pueden afectar la expresión de la NEP; en este sentido, el forbol 12- miristato 13 acetato y el diacilglicerol inducen la internalización de NEP y por consiguiente su actividad (González y col., 1998), asimismo, el interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) disminuye la expresión de NEP; por su parte, los glucocorticoides, la trombina, la calcitonina y las citoquinas como la Interleuquina1- $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), el FNT- $\alpha$  y el factor estimulante de colonias macrófago – granulocito, pueden incrementar la expresión del ARNm de la NEP (Roques y col., 1993).

En cuanto a la distribución de la AM, es sabido que a pesar de que ésta fue inicialmente descrita en la médula suprarrenal de pacientes con

feocromocitoma, la AM y su ARNm son ubicuos, pues han sido encontrados en varios tejidos a nivel periférico como, la aurícula y ventrículo cardíaco, aorta, pulmón, riñón, páncreas, intestino delgado, hígado, bazo, tiroides, testículo y músculo (Fig. 5) (Kitamura y col., 1993<sup>B</sup>; Sakata y col., 1993; Ichiki y col., 1994; Sakata y col., 1994); además se ha encontrado AM en la circulación, orina, saliva, fluido cerebroespinal y amniótico (Kitamura y col., 1994; Macri y col., 1996; Nagata y col., 1998).



**Fig. 5.** AM inmunoreactiva en células de médula suprarrenal de bovino (Panel A) y en línea celular de oligodendrocitos (KG1C) (Panel B) (Uezono y col., 2001).

Por otra parte, el gen de la AM se encuentra ampliamente distribuido en muchos órganos tanto en el desarrollo embrionario como en la edad adulta, encontrándose mayor expresión en células endoteliales y en células de músculo liso vascular (Hinson y col., 2000; Garayoa y col., 2002). Asimismo, un gran número de células producen AM como células pulmonares humanas, células de islotes pancreáticos, miocitos cardíacos, células del endotelio vascular y músculo liso (Sugo y col., 1994; Martínez y col 1995).

## 1.2. Los Receptores de la Adrenomedulina

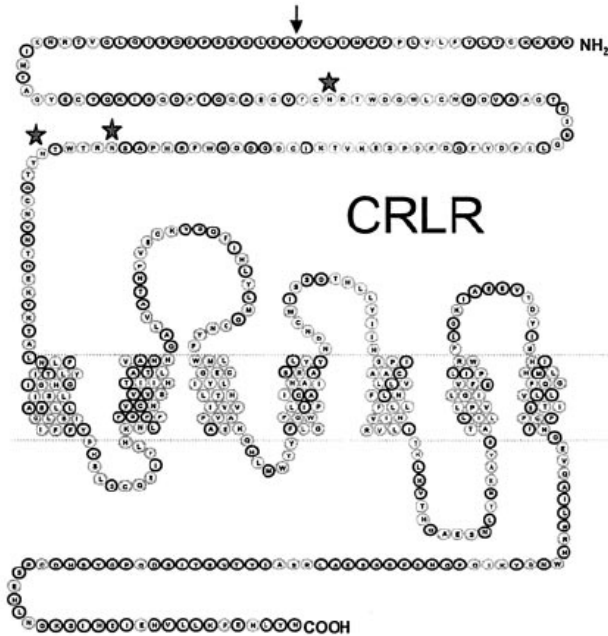
La identificación y caracterización de los receptores específicos para la AM no ha sido una tarea sencilla. Desde el inicio, los estudios con la AM sugerían que sus efectos eran mediados a través de su unión a receptores acoplados a proteína G, y se creía que éstos eran receptores de péptidos pertenecientes a su misma familia, como el CGRP, CT y amilina (Wimalawansa, 1996), debido a que los miembros de esta familia comparten estructuras similares y algunas funciones biológicas (Poyner y col., 2002).

Los receptores de la familia del péptido de la calcitonina han sido caracterizados tanto *in vivo* como *in vitro* en base a la respuesta farmacológica y a los estudios de unión de radioligandos. El fragmento C-terminal de la AM humana, el AM22-52 ha constituido un valioso recurso para la caracterización del receptor de AM humano; ya que se comporta como un antagonista competitivo de los receptores específicos de AM y bloquea una gran variedad de efectos inducidos por la AM. Por su parte, el fragmento CGRP8-37, es empleado como un antagonista del receptor de CGRP (Hinson y col., 2000).

En el año 1991, un grupo de investigadores clonaron el receptor de CT (Lin y col., 1991); sin embargo este hallazgo no llevó a una rápida identificación de los receptores relacionados a esta familia de péptidos. Posteriormente, se descubrió un receptor relacionado, el receptor similar al receptor de CT (CRLR) (Chang y col., 1993), pero los reportes iniciales fallaron en identificar a un ligando para este receptor; sin embargo más tarde, se pudo evidenciar que éste podía servir como un receptor para el CGRP, ya que este péptido se unía y provocaba acumulación de AMPc en células HEK293 transfectadas con el CRLR (Aiyar y col., 1996). Asimismo, se evidenció que la AM también producía efectos por medio de su unión a este receptor (Brain y col., 1996), ya que

diversos estudios demostraban que los efectos vasodilatadores de la AM y CGRP eran bloqueados por el CGRP8-37 (Entzeroth y col., 1995; Hinson y col., 2000).

El CRLR (también llamado CALCRL, CL y CRL) es una proteína de siete dominios transmembrana perteneciente a la clase B de los receptores acoplados a proteínas G (Fig. 6). En el humano la CRLR tiene 461 residuos de aminoácidos y su gen se encuentra ubicado en el cromosoma 2q32.1; en la rata la proteína tiene 464 residuos de aminoácidos y su gen se localiza en el cromosoma 3q24. En cuanto a la distribución del ARNm para CRLR y el péptido, diferentes estudios han demostrado que éstos se encuentran ampliamente expresados, principalmente en pulmón, corazón y cerebro; asimismo se ha evidenciado CRLR en arterias cerebrales, corteza suprarrenal, cerebelo, bazo, útero, en línea celular de neuroblastoma SK-N-MC, oligodendroglías, KG1C y en células de músculo liso y endotelial (Muff y col., 2001; Kuwasako y col., 2004). Históricamente, el CRLR ha sido dividido en dos clases, de acuerdo a su sensibilidad al antagonista CGRP8-37, en CRLR tipo 1 (CRLR1) y en CRLR tipo 2 (CRLR2); siendo el CRLR1 más sensible al CGRP8-37 (Dennis y col., 1989). Sin embargo, actualmente se discute la existencia del subtipo CRLR2, ya que no se han obtenido evidencias concluyentes.



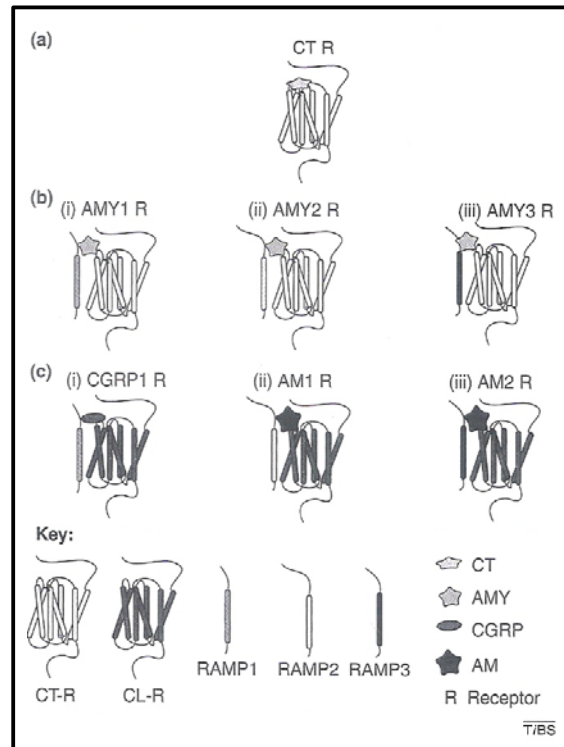
**Fig. 6.** Diagrama esquemático del CRLR (Poyner y col., 2002).

Estudios posteriores, demostraron que no todas las acciones biológicas de la AM eran ejercidas por medio de este receptor; ya que experimentos con AM marcada radiactivamente, mostraron que la  $^{125}\text{I}$ -AM se unía a células de músculo liso vascular y dicha unión podía ser desplazada por la AM de manera más efectiva (Constante de disociación,  $K_d=13$  nM) que por el CGRP (Constante de inhibición,  $K_i= 300$  nM). Asimismo, en otros estudios se observaba que la vasodilatación inducida por la AM en la arteria pulmonar de cobayos no era bloqueada por el antagonista de los receptores de CRLR, el CGRP8-37 (Pinto y col., 1996); lo cual sugería la existencia de receptores de AM específicos. Sin embargo, la identificación de estos receptores fue facilitada tras la identificación de las proteínas que modifican la actividad del receptor (RAMP); las mismas son proteínas accesorias requeridas por el CRLR para que este pueda funcionar como un receptor (McLatchie y col., 1998); y que además van a dictar la especificidad de la unión al ligando de los receptores (Gibbons y col., 2007). Por lo tanto, McLatchie y col., describieron que el CRLR funciona

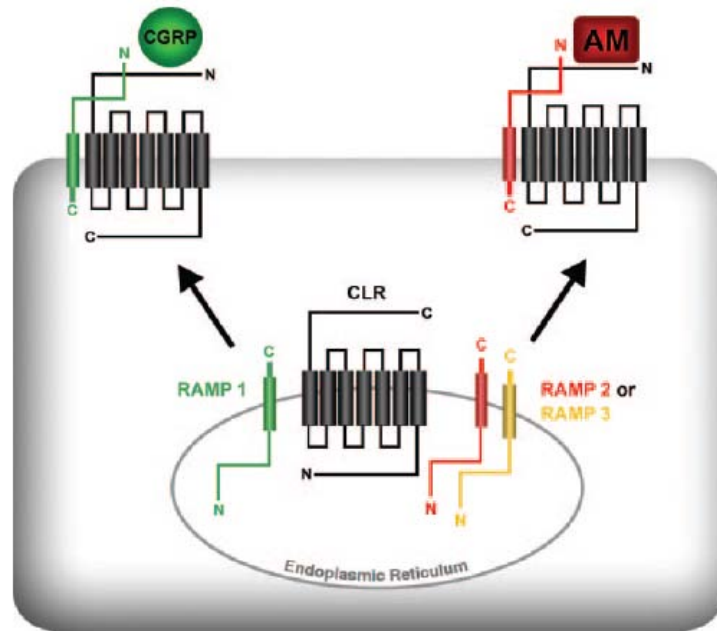
como receptor del CGRP o de AM dependiendo de cambios moleculares accesorios debidos a las RAMPs (Cases y col., 2001).

Existe tres tipos de RAMPs humano (hRAMP), la RAMP1, RAMP2 y RAMP3, los cuales son producto de tres genes distintos, los mismos tienen 148, 175 y 148 residuos de aminoácidos, respectivamente (Fig. 7). Cuando la RAMP1 se asocia con el CRLR se obtiene el receptor del CGRP; por su parte si se asocia la RAMP2 o la RAMP3, se tiene al receptor de AM. El complejo CRLR/RAMP2 y CRLR/RAMP3 constituyen los receptores de AM, denominados AM1 y AM2 respectivamente (Fig. 8). Estos complejos CRLR/RAMP son heterodímeros, que tienen una estequiometría 1:1 (Hilariet y col., 2001<sup>A</sup>), donde la asociación CRLR/RAMP es de tipo no covalente.

Las RAMPs son proteínas ubicuas, las cuales se expresan en concentraciones diferentes según el tipo tisular; por ejemplo se ha demostrado que el ARNm que codifica para RAMP2 y RAMP3 se expresa de manera abundante en órganos como corazón, pulmón, riñón, páncreas, músculo esquelético, hígado y cerebro. Asimismo, la expresión de las isoformas de la RAMPs, generalmente se correlaciona con la respuesta dada por el tipo celular a CGRP, a la AM, o a ambos; ya que se ha reportado la expresión de RAMP2, pero no de RAMP1 en células endoteliales de aorta que selectivamente responden a la AM (Parameswaran y col., 2006). El gen RAMP1 es expresado en muchos tejidos incluyendo útero, vejiga, páncreas, tracto gastrointestinal y cerebro (McLatchie y col., 1998). Asimismo, el RAMP2 y RAMP3, han sido evidenciados en las células endoteliales y de músculo liso vascular, el corazón, cerebelo, hígado, pulmón, bazo, útero, ovario, placenta, cerebro, entre otros (Fig. 9) (Chakravarty y col., 2000; Juaneda y col., 2000; Muff y col., 2001; Kuwasako y col., 2004; Gibbons y col., 2007).



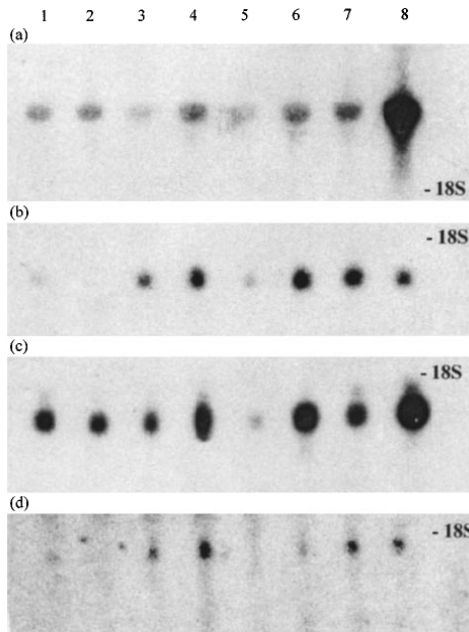
**Fig. 7.** Unión de los péptidos de la familia de la calcitonina a CLR y CTR: Regulación por las RAMPs. A) La unión de la calcitonina a su receptor, CTR, no requiere RAMPs. B) Interacción de CTR con RAMP1 (i), RAMP2 (ii) y RAMP3 (iii) produce los receptores de amilina 1, 2 y 3, respectivamente (AMY1,2,3). C) Interacción de CLR con RAMP1 produce el receptor CGRP1 (i); por su parte, su interacción con RAMP2 (ii) y RAMP3 (iii), produce los receptores de AM1 y AM2 respectivamente (Parameswaran y col., 2006).



**Fig. 8.** El paradigma del RAMP/Receptor para la señalización de la AM y CGRP. Las RAMPs determina la especificidad del receptor mediante la formación de un heterodímero con CLR (también llamado CRLR) en el retículo endoplásmico, seguido por su localización en la membrana plasmática. La asociación de CLR con RAMP determina la especificidad de unión del ligando. Por lo tanto, el heterodímero CLR/RAMP1 (verde) une preferencialmente CGRP, mientras que el heterodímero CLR/RAMP2 (rojo) o CLR/RAMP3 (amarillo) une preferencialmente a la AM (Modificado de Gibbons y col., 2007).

A pesar de que estas proteínas comparten una baja homología en su secuencia primaria (menor al 30%), las mismas poseen una estructura común que incluye un largo dominio N-terminal extracelular, un único dominio transmembrana y un dominio citoplasmático corto (Muff y col., 2001; Sexton y col., 2001; Kuwasako y col., 2004) (Fig.10). Asimismo, los tres receptores heterodiméricos CRLR/RAMP, median la producción intracelular de AMPc y la movilización de  $Ca^{++}$  intracelular (Kuwasako y col., 2000).





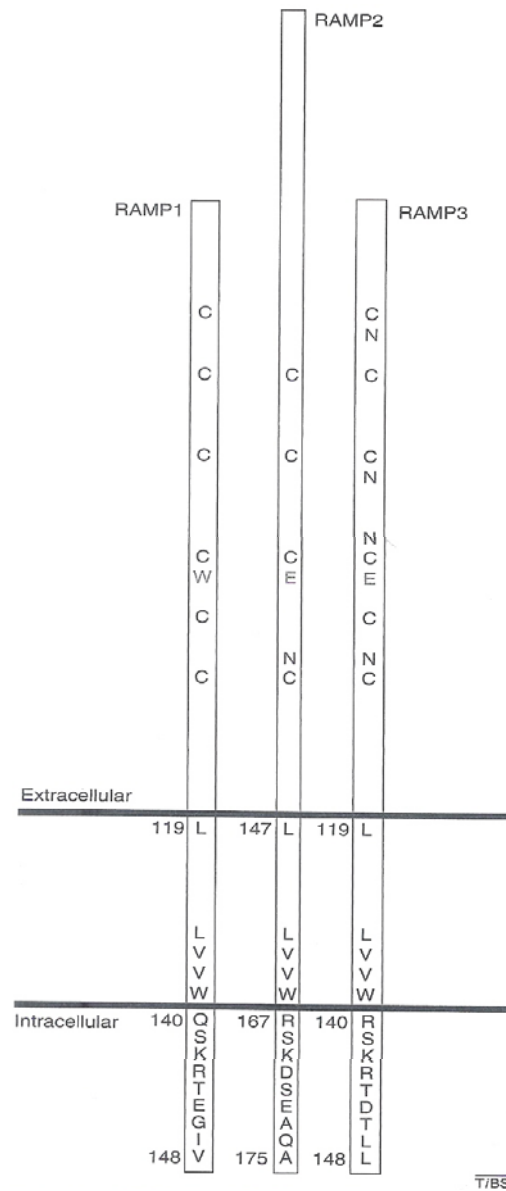
**Fig. 9.** Northern blots de ARN de tejido de ratas hibridado con CRLR (a), RAMP1 (b), RAMP2 (c) y RAMP3 (d). 1: aurícula. 2: ventrículo. 3: cerebelo. 4: médula espinal. 5: hígado. 6: bazo. 7: conducto deferente. 8: pulmón (Chakravarty y col., 2000).

El dominio transmembrana de las RAMPs es la región más conservada de estas proteínas entre las especies animales y es requerida para la formación del heterodímero estable con CRLR dentro del retículo endoplásmico y el aparato de Golgi (Steiner y col., 2002). Por su parte, el dominio de unión a ligando se encuentra en el extremo N-terminal de las RAMPs y del CRLR. En el caso de la RAMP2 y RAMP3, se ha evidenciado que la eliminación de los residuos aminoácidos 86 – 92 de la RAMP2 y de los residuos 59 – 65 de la RAMP3 ocasiona la pérdida de la unión de la AM y de la respuesta (Kuwasako y col., 2001); sin embargo, debido al tamaño del RAMP se postula que estos dominios (RAMP y CRLR) no actúan de manera autónoma (Gibbons y col., 2007). Por su parte, el dominio C-terminal intracelular de las RAMPs representa una potencial interfase para la interacción de moléculas intracelulares, las cuales pueden gobernar el tráfico del receptor, procesos de degradación o

reciclaje, que se creen son diferentes para cada una de las RAMPs (Kuwasako y col., 2006).

El dominio C-terminal de la (h)RAMP3 tiene un motivo de reconocimiento PDZ (Asp-Thr-Leu-Leu) en los residuos 145-148, el cual se sugiere que interviene en la regulación del tráfico de receptores después de la estimulación con agonista (Hinson y col., 2000; Gibbons y col., 2007); ya que tanto en células HEK-293 transfectadas con CRLR y RAMP3 humano, como en células del túbulo proximal renal que endógenamente expresan CRLR, se observa que el dominio PDZ de la (h)RAMP3 interactúa con el factor regulador del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (NHERF), lo cual ocasiona inhibición de la internalización del receptor. Por su parte, la supresión de este dominio resulta en la disminución de la expresión del receptor en la superficie celular (Bomberger y col., 2005<sup>A,B</sup>). Es relevante acotar que en lugar de la secuencia Asp-Thr-Leu-Leu que se localiza en la cola citoplasmática de la (h)RAMP3, la correspondiente secuencia en la rata es Asp-Arg-Leu-Leu (Parameswaran y col., 2006).

De igual manera, el dominio citoplasmático del (h)RAMP3 contiene residuos de Ser-Lys altamente conservados, que permiten la internalización menos eficiente del receptor. Además, la (h)RAMP3 contiene un motivo Leu-Leu conservado, el cual es importante para la internalización de otros receptores acoplados a proteína G, donde este media la interacción con componentes de la maquinaria de endocitosis, como la clatrina, adaptinas y arrestina. Por otra parte, a pesar de que la eliminación de la cola citoplasmática del RAMP3 no afecta el tráfico de la CRLR a la membrana plasmática, la supresión de la cola citoplasmática de la RAMP2 inhibe el transporte de CRLR a la superficie celular, lo cual resulta en una inhibición de la unión y señalización por parte de la AM (Parameswaran y col., 2006).



**Fig. 10.** Comparación estructural de las RAMPS. RAMP1, RAMP2 y RAMP3 comparten alrededor de 30% de identidad. RAMP2 es la menos conservada, teniendo 26 residuos de aminoácidos más que las RAMP1 y RAMP3. Los residuos de Cys conservados, se encuentran en el fragmento extracelular de todas las RAMPs; además se muestran los sitios de N-glicosilación (N) en el fragmento N- terminal. Las tres RAMPs contienen una secuencia conservada de Ser-Lys en el dominio intracelular. El motivo de unión PDZ (Asp-Thr-Leu-Leu) se muestra en el dominio intracelular de la RAMP3 (Tomado y Modificado de Parameswaran y col., 2006).

Es importante tener presente que las RAMPs no sólo son requeridas para determinar el fenotipo del receptor (McLatchie y col., 1998; Kuwasako y col., 2000), también son necesarias para facilitar la translocación intracelular de la proteína CRLR madura y su inserción a la membrana plasmática, ya que se ha demostrado mediante una serie de evidencias bioquímicas y microscópicas que las RAMPs y el CRLR interactúan a nivel del retículo endoplásmico o en el aparato de Golgi y permanecen asociadas durante todo el ciclo de vida del receptor (Kuwasako y col., 2000) hasta el momento de ser transportado hasta la superficie de la membrana celular, donde la forma glicosilada (madura) es capaz de unir al ligando (Hilariret y col., 2001<sup>B</sup>).

Por su parte, Hilariret y col., demostraron que la farmacología específica conferida por las RAMP, es independiente del estado de glicosilación de los receptores CRLR; en su lugar, se sugiere que las RAMPs determinan la especificidad del ligando contribuyendo directamente a la estructura de la hendidura de unión al ligando o mediante modulación alostérica de la conformación del receptor (Hilariret y col., 2001<sup>B</sup>).

Asimismo, se ha demostrado que el CRLR interactúa además con otra proteína, la proteína del componente del receptor (RCP), identificada como una proteína que confiere la respuesta del AMPc mediada por el CGRP en oocitos de *Xenopus laevis*, de una manera similar a como lo hace la RAMP1. No existe similitud en la secuencia de aminoácidos entre estas dos proteínas. Sin embargo, la existencia del complejo RAMP/CRLR/RCP se ha demostrado en experimentos de inmunoprecipitación, en los que la RCP parece representar una clase de proteína requerida para acoplar el receptor de AM a la vía de señalización intracelular (Prado y col., 2001).

Tradicionalmente, los receptores de AM se definen de acuerdo a sus características farmacológicas; en este sentido, se conoce que el receptor de AM1, tiene mayor selectividad para la AM que para el CGRP (con una selectividad de dos o tres órdenes de magnitud), siendo antagonizado de manera más efectiva tanto por hAM22-52 o rAM20-50 que por el CGRP8-37. Por su parte, las características farmacológicas del receptor de AM2 difieren entre las especies; ya que los antagonistas de la AM son más potentes que el CGRP8-37 en inhibir a los receptores de AM2 humano, porcino y bovino, lo cual no resulta diferente de lo visto para el receptor de AM1. Sin embargo, el receptor de AM2 de rata y ratones reconoce con mayor especificidad a la AM que al CGRP (en un orden de magnitud), y es antagonizado de manera más efectiva por el CGRP8-37 que por los antagonistas de la AM (Kuwasako y col., 2004). (Tabla III).

<b>Tabla III.</b>					
Características Farmacológicas de los heterodímeros CRLR/RAMP recombinantes					
Subtipo del Receptor	Especificidad del Agonista			Potencia del Antagonista para la respuesta evocada por la AM	
	AM		CGRP $\alpha$	hAM-(22-52) rAM-(20-50)	CGRP-(8-37)
CRLR/RAMP1 (receptor CGRP1)	<				<<
CRLR/RAMP2 (receptor AM1)	>>				>>
CRLR/RAMP3 (receptor AM2)					
Humano, porcino, bovino	>>				>
Rata, ratón	>				<<

Modificado de Kuwasako y col., 2004

Por otra parte, se ha demostrado que la AM se puede unir y activar otros receptores a parte de los receptores de AM. En células HEK-293 transfectadas con CRLR humana, porcina o bovina (h, p, bCRLR) y hRAMP1, se ha

evidenciado que el CGRP es capaz de aumentar la producción de AMPc; sin embargo la AM fue 2 a 8 veces menos potente que el CGRP $\alpha$  en producir dicha respuesta (Aiyar y col., 2001). Asimismo, la AM (en altas concentraciones) puede interactuar y activar al receptor CGRP1 (también llamado CRLR/RAMP1), siendo su respuesta inhibida por CGRP8-37, pero no por los antagonistas del receptor de AM; sin embargo no existe evidencias de que el CRLR/RAMP1 funcione como un receptor de AM sensible a CGRP8-37 *in vivo* (Kuwasako y col., 2004).

La AM también ha demostrado tener poca afinidad por los receptores pertenecientes a otros miembros de su familia de péptidos, la CT y la amilina. Se ha demostrado que la AM interactúa con el receptor de calcitonina (CTr), éste es un miembro de la familia B de receptores acoplados a proteínas G de siete dominios transmembrana (McLatchie y col., 1998). El CTr y el CRLR comparten un 57% de homología en su secuencia primaria. El CTr no requiere de ninguna RAMP conocida para unir a la CT; sin embargo para unir a la CGRP es necesario que el CTr se asocie con RAMP1 (Leuthäuser y col., 2000) (Fig. 7).

Asimismo, se ha evidenciado que la AM puede provocar la producción de AMPc a través del complejo CTr con RAMP 1, 2 o 3, sobre-expresados en células embrionarias de riñón humano (HEK)-239; sin embargo, dicha respuesta es 10 a 100 veces más débil que la producida por la amilina o el CGRP $\alpha$ , y es inhibida por el antagonista del CTr, salmónCT-(8-32) ((s)CT-(8-32)), pero no por hCGRP8-37 o AM22-52, lo cual indica que la AM puede además activar al CTr/RAMP sensible a (s)CT-(8-32) (Kuwasako y col 2003; Kuwasako y col., 2004); sin embargo no está claro si este receptor se comporta como un receptor funcional de la AM *in vivo* (Kuwasako y col., 2004).

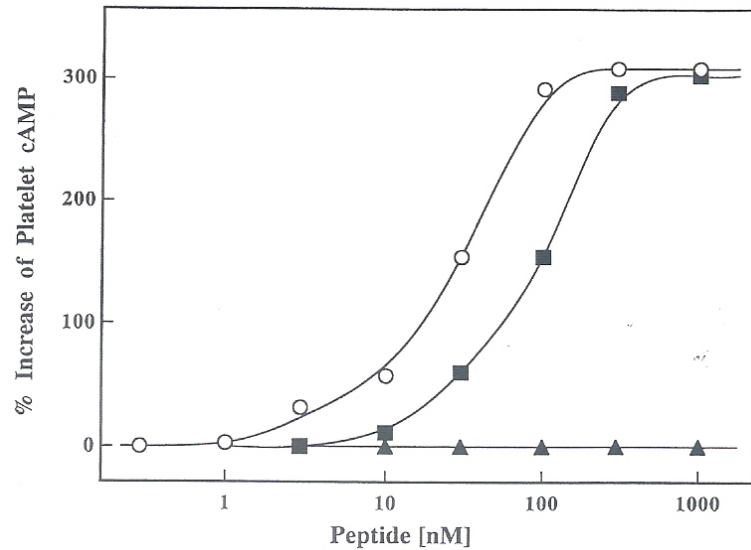
Por lo tanto, la co-expresión de CRLR con RAMP2 o RAMP3, producen receptores de AM funcionales; donde el heterodímero CRLR/RAMP2 define el receptor AM1 que es particularmente sensible a AM22-52; y el heterodímero CRLR/RAMP3 define el receptor AM2, el cual es más sensible a CGRP8-37 que el receptor AM1. En el caso del receptor de AM2 de rata y ratón, la respuesta producida por la AM es bloqueada de manera más eficiente con CGRP8-37 que por AM22-52; sin embargo esto no ocurre para el receptor de AM humano, porcino y bovino. Por otra parte, la sobreexpresión del receptor de CGRP1 (CRLR/RAMP1) puede responder a la AM en altas concentraciones, y la respuesta es bloqueada por CGRP8-37 pero no por la AM22-52 (Kuwasako y col., 2004).

La mayor expresión de receptores para AM ha sido encontrada en corazón, pulmón, glándula suprarrenal, riñón y en el SNC. Asimismo, el endotelio vascular y las células inmunes gastrointestinales también poseen receptores específicos para la AM (Oliver y col., 2002). A nivel del sistema nervioso central (SNC), se ha descrito sitios de unión para la AM, en localizaciones como la corteza cerebral, cerebelo, tálamo, hipotálamo, bulbo raquídeo y en el puente de Varolio (Sone y col., 1997).

### **1.3. Vías de Señalización de la Adrenomedulina**

Uno de los mecanismos de acción a través del cual actúa la AM y por el cual fue descubierto fue a través de su capacidad de elevar los niveles de AMPc (Kitamura y col., 1993<sup>A</sup>). En diferentes tipos celulares como plaquetas, células de músculo liso vascular, endoteliales, tubulares renales, mesangiales, estelares hepáticas y líneas celulares como la oligodendroglial humana KG-1C, entre otras; la AM ha demostrado elevar los niveles de AMPc (Fig. 11)

(Shimekake y col., 1995; Uezono y col., 1998; Uezono y col., 2001; Beltowski y col., 2004).



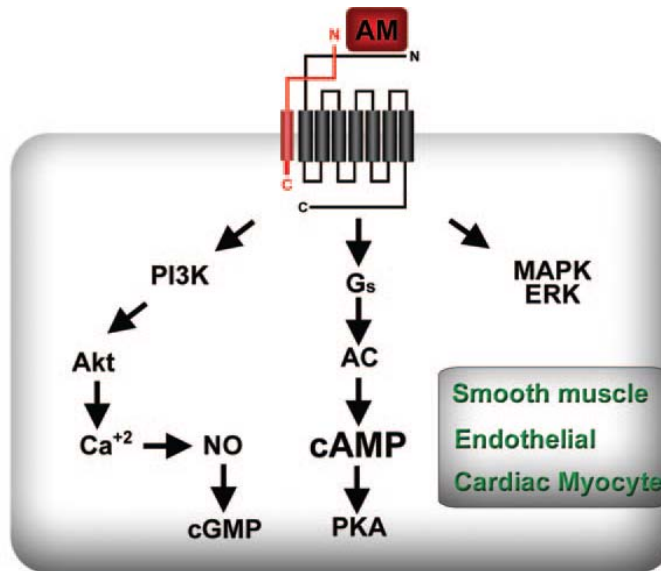
**Fig. 11.** Elevación del AMPc de plaquetas en respuesta a concentraciones crecientes de CGRP (círculos), AM (cuadrados) y amilina (triángulos) (Kitamura y col., 1993<sup>A</sup>).

Adicionalmente, en varios tipos de células, la AM ha demostrado activar otras vías de señalización como la fosfolipasa C (PLC), guanilil ciclasa (GC), quinasa regulada por señales extracelulares (ERK) y otras proteínas de la familia de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) como MAPK p38 y la proteína quinasa c-Jun NH2 terminal (JNK) (Iwasaki y col., 2001).

Por lo tanto, los mecanismos de señalización por los cuales la AM media sus funciones varían entre especies y lecho vascular, pero generalmente involucran al AMPc, NO y mecanismos dependientes de calcio. En la Fig. 12 se puede apreciar que la AM se une a su receptor y puede activar una proteína Gs con



incremento de los niveles de AMPc celular y activar una proteína quinasa dependiente de AMPc tanto en células de músculo liso como en células endoteliales. Por su parte, el efecto antiapoptótico de la AM en células de miocardio ha sido relacionado con la vía fosfatidil inositol 3 quinasa (PIK3) – Akt. Finalmente en células endoteliales, la cascada de las MAPK puede ser activada por la AM (Gibbons y col., 2007).



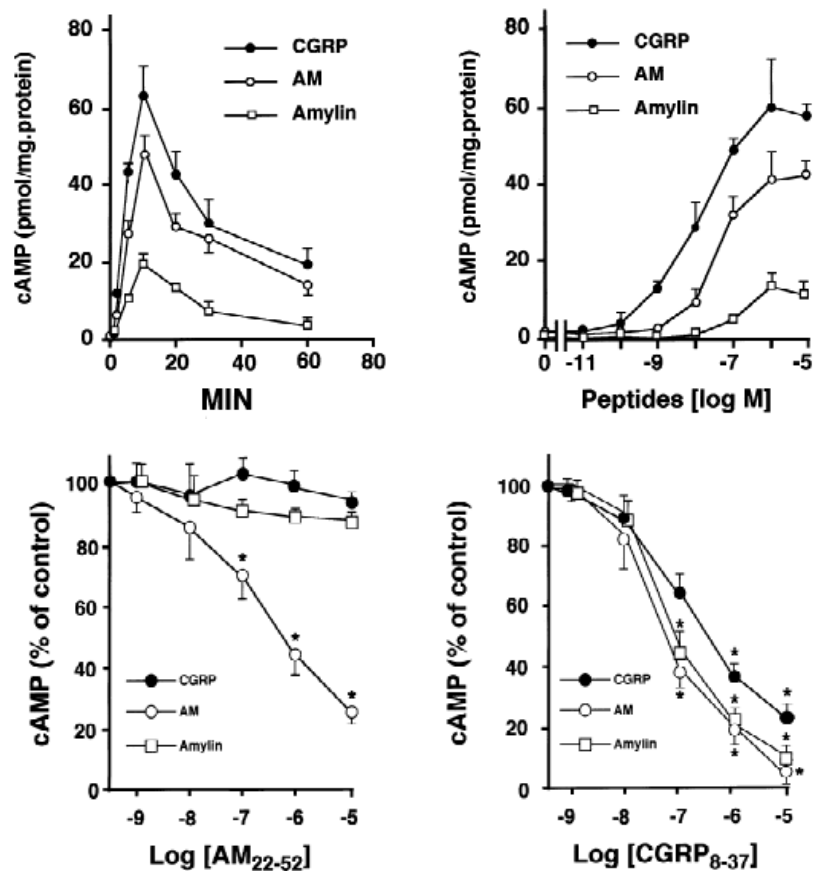
**Fig. 12.** Vías de Señalización de la AM. AC: Adenilil ciclasa, PIK3: Fosfatidilinositol – 3 quinasa. PKA: Proteína quinasa A (Modificado de Gibbons y col., 2007).

### 1.3.1. Principales Vías de Señalización de la Adrenomedulina

#### 1.3.1.1. Vía de la Adenosina Monofosfato Cíclico (AMPc) / Proteína Quinasa A (PKA)

Desde el descubrimiento de la AM, el AMPc fue considerado inicialmente como la principal molécula de señalización intracelular de este péptido. La AM activa la adenilil ciclasa (AC) en células de músculo liso vascular produciendo un

incremento en los niveles de AMPc; sugiriéndose que el receptor de AM está acoplado a la AC a través de una proteína G estimuladora (Gs) sensible a toxina de cólera, que activa la proteína AC con producción de AMPc y activación de la PKA (Hinson y col., 2000). Adicionalmente se ha demostrado en células KG1C, que el incremento de los niveles de AMPc inducidos por la AM es mediado por el receptor de AM y el CGRP; ya que este efecto es inhibido por antagonista de los receptores de AM y CGRP, AM22-52 y CGRP8-37 respectivamente, pero no por el antagonista del receptor de amilina, amilina-(8-37) (Fig. 13) (Uezono y col., 2001).



**Fig. 13.** Curso temporal de acumulación de AMPc por AM, CGRP o amilina. Las células KG1C fueron incubadas con 10<sup>-7</sup> M de AM, CGRP o amilina para los tiempos indicados a 37°C en 1mL de buffer KR-Tris (pH: 7,4) (Panel superior

izquierdo). Incremento del AMPc estimulado por concentraciones crecientes de AM, CGRP y amilina. Las células KG1C fueron incubados durante 10 min. Valores expresados como media  $\pm$  error estándar de la media (Panel superior derecho). Efecto de la AM22-52 (Panel inferior izquierdo) o CGRP8-37 (Panel inferior derecho) sobre la producción de AMPc inducida por AM, CGRP o amilina. Las células KG1C fueron incubadas con una concentración de  $10^{-7}$ M de los péptidos durante 10 min a 37°C. \* $p < 0,05$  vs. valores obtenidos sin la presencia del antagonista (Uezono y col., 2001).

La acción vasodilatadora de la AM es ejercida mediante esta vía de señalización; de hecho el AMPc es el principal segundo mensajero conocido para la vasodilatación. Por otra parte, la acción mitogénica de la AM también es ejercida mediante esta vía de señalización, ya que algunos estudios en células Swiss 3T3 y queratinocitos han demostrado que la AM incrementa la síntesis de ácido desoxirribonucleico (ADN) y la proliferación celular, siendo estos efectos bloqueados por un inhibidor de la PKA (H-89) (Withers y col., 1996; Kapas y col., 1997).

Sin embargo, la vía AMPc/PKA es conocida como un regulador negativo del crecimiento celular; en este sentido la AM ha demostrado inhibir la síntesis de ADN en células de músculo liso vascular que crecen de manera asincrónica y suplementada con suero que contiene varios factores de crecimiento (Iwasaki y col., 1998; Shichiri y col., 2003). En vista de ello, se ha sugerido que el papel bifuncional de la AM para el control del crecimiento celular depende del tipo celular y del estado del ciclo celular; ya que en células quiescentes la AM ejerce su acción mitótica mediante la vía Proteína Tirosina Quinasa (PTK)/ERK, mientras que la AM ejerce su acción anti-mitogénica mediante la vía AMPc/PKA en células que crecen asincrónicamente (Shichiri y col., 2003).

Por otra parte, a la AM se le ha atribuido acción antioxidante *in vivo* (Shimosawa y col., 2002), ya que la AM es capaz de inhibir de manera directa la generación intracelular de especies reactivas de oxígeno (EROs) mediante su unión a su receptor y activación de la vía AMPc/PKA en células de músculo liso vascular, ya que la AM inhibió la formación de radicales libres inducido por ANG II, dicho efecto fue imitado por el dibutil-AMPc e inhibido por el inhibidor de la PKA; estos datos sugieren que la AM tiene un papel protector como antioxidante endógeno en el daño vascular inducido por ANG II (Yoshimoto y col., 2004).

La vía de señalización AMPc/PKA de la AM ha sido postulada como el principal mecanismo de transducción de la AM para sus efectos biológicos, sin embargo, no es la única vía de señalización. A pesar de que los efectos CDV de la AM tales como la vasodilatación y el inotropismo positivo generalmente se acompañan de elevación del AMPc, hay pocos estudios que indican que tales acciones son bloqueadas tanto por inhibidores de la PKA o por antagonistas del AMPc. Por lo tanto, se ha sugerido que las acciones pleiotrópicas de la AM (crecimiento celular, migración y apoptosis) son independientes de la vía AMPc/PKA.

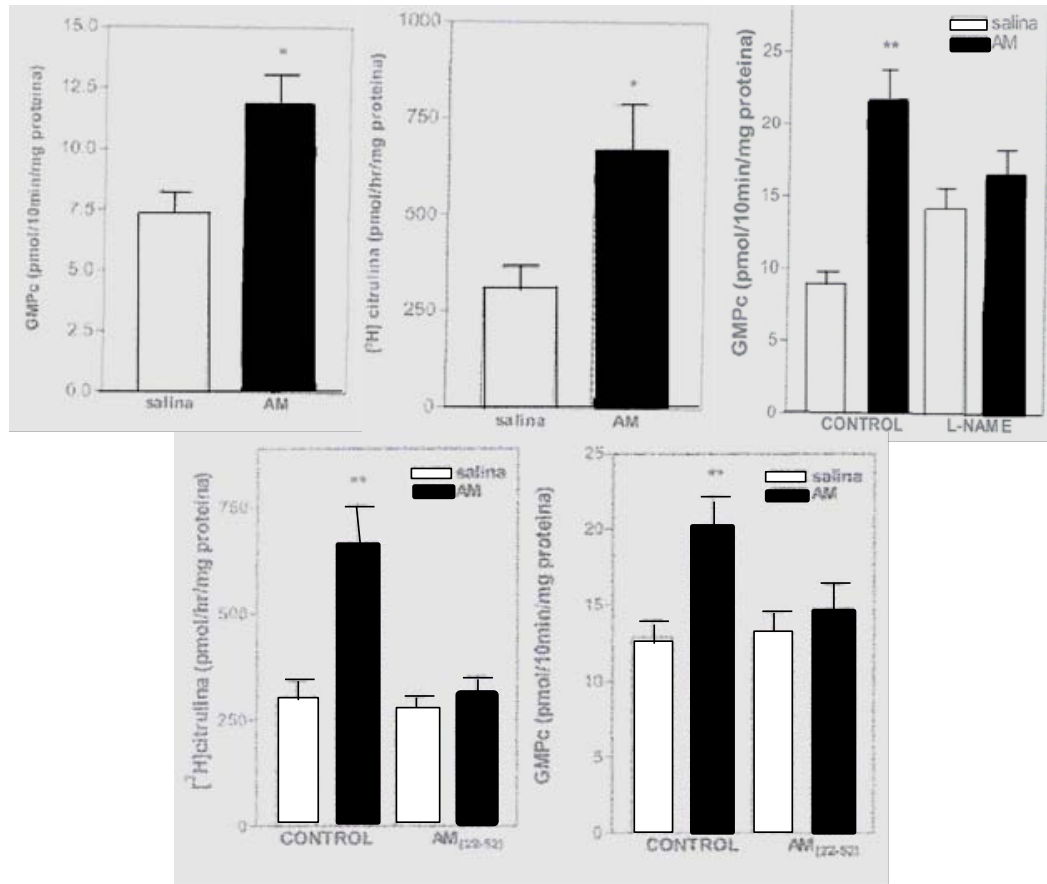
#### **1.3.1.2. Vía Proteína Tirosina Quinasa (PTK) / Quinasa regulada por señales extracelulares (ERK)**

Los efectos mitogénicos de la AM han sido demostrado en una gran variedad de células como líneas celulares tumorales, fibroblastos, queratinocitos, células de músculo liso vascular; en éstas, los efectos mitogénicos de la AM son mediados a través de la vía PTK/ERK, ya que la AM es capaz de estimular la actividad de la ERK (Iwasaki y col., 2001), siendo esta activación y los efectos

mitogénicos inducidos por la AM bloqueados totalmente por un inhibidor de la MEK (PD98059) y un inhibidor de la PTK (genisteína); esta activación de la ERK dependiente de PTK por la AM fue independiente de calcio y PKC (Iwaasaki y col., 1998; Shichiri y col., 2003), lo cual sugiere que la AM activa la cascada PTK que podría llevar a vía MEKK-MEK-ERK dependiente de Ras (Iwasaki y col., 2001).

#### **1.3.1.3. Vía Óxido Nítrico (NO)/ Guanosina monofosfato cíclico (GMPc) /Proteína Quinasa G (PKG)**

Existe un gran cuerpo de evidencias que indican que las acciones vasodilatadoras de la AM son mediadas principalmente por el NO, ya que el efecto vasodilatador de este péptido es bloqueado por inhibidores de la sintasa de óxido nítrico (SON) (Hinson y col., 2000). En células endoteliales de bovino, la AM ha demostrado activar la PLC a través de la proteína Gq para incrementar los niveles de calcio intracelular, que posiblemente conlleva la activación de SON endotelial (SONe) dependiente de calcio (Shimekake y col., 1995). En vista de que el NO activa a la GC soluble para incrementar los niveles de GMPc intracelulares en células de músculo liso vascular; la PKG dependiente de GMPc podría funcionar como la principal molécula señalizadora en la vasorelajación mediada por AM. Asimismo, en el SNC, específicamente en la eminencia media de la rata, se ha observado que la AM estimula la actividad de la SON, así como la formación de GMPc, siendo dicho efecto mediado a través de los receptores de AM (Fig. 14) (Mathison y col., 2006).



**Fig. 14.** Efecto de la AM ( $10^{-7}$ M) sobre la producción de GMPc (Panel superior izquierdo) y la actividad de la sintasa de óxido nítrico (SON) expresada como producción de ( $^3$ H)citrulina (Panel superior medio) en la eminencia media de la rata. Efecto del análogo de la L-Arg, el L-NAME, sobre la producción de GMPc inducida por AM (Panel superior derecho). Efecto del antagonista del receptor de AM, AM22-52 ( $10^{-5}$  M) sobre la actividad de la SON (Panel inferior izquierdo) y la producción de GMPc (Panel inferior derecho) estimulada por AM. \* $p < 0,01$  vs. salina (Mathison y col., 2006).

#### 1.3.1.4. Vía Fosfatidilinositol-3 quinasa (PIK3)/ AKT

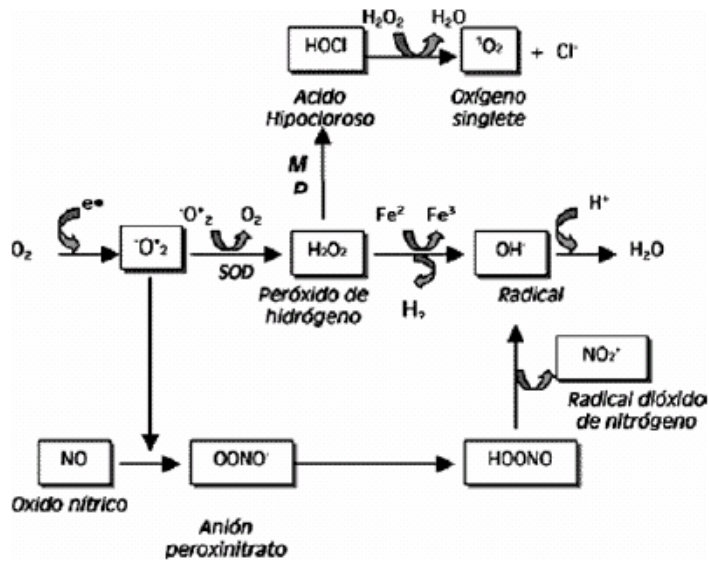
En un estudio del año 2001, se demostró que la AM produce vasodilatación dependiente del NO a través de la vía PIK3/AKT (Nishimatsu y col., 2001), por

lo que diferentes estudios sugieren que la AM ejerce un papel protector en el daño al miocardio por isquemia – reperfusión a través de esta vía (Okumura y col., 2004). Por otra parte, se ha evidenciado que la respuesta mitogénica de la AM en células de músculo liso vascular es bloqueada tanto por inhibidor de la PIK3 (la wortmanina, el LY294002) como por el inhibidor de la MEK (Shichiri y col., 2003).

#### **1.3.1.5. Señalización a través de Especies Reactivas de Oxígeno (EROs)**

El estrés oxidativo se produce por un desbalance pro y antioxidante (redox), caracterizado por un aumento en la producción de radicales libres, los cuales son especies químicas altamente reactivas e inestables, que tienen la capacidad de generar a otros radicales libres mediante reacciones químicas en cadena (Halliwell, 1994; Ballester, 1996). Éstos, a concentraciones elevadas, son altamente peligrosos para el organismo; ya que son capaces de reaccionar con cualquier compuesto biológico, entre ellos, los lípidos (Cross y col., 1987; Siekmeier y col., 2007).

Entre las EROs se encuentran el anión superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y anión hidroxilo ( $OH^\cdot$ ); donde la reducción de un electrón del oxígeno produce anión  $O_2^-$ , la de dos electrones produce  $H_2O_2$ , y un tercer electrón separa al oxígeno en un radical  $OH^\cdot$  y un ión hidróxido (Kojo, 2004; Vargas y col., 2007) (Fig. 15), Entre las especies reactivas del nitrógeno, la más importante es el NO, a partir del cual se forman otras especies como el anión peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), anión nitroxilo ( $NO^\cdot$ ) y el dióxido de nitrógeno ( $NO_2$ ) (Vargas y col., 2007).

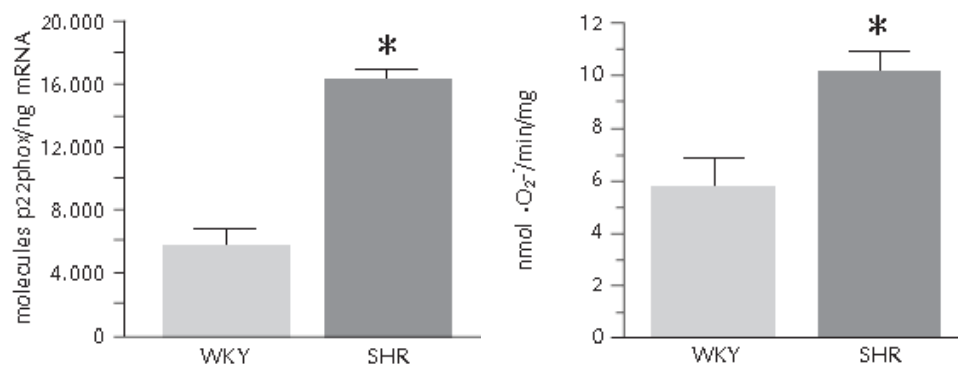


**Fig. 15.** Formación de Radicales Libres (Vargas y col., 2007).

En las células vasculares, las fuentes potenciales de  $O_2^{\cdot-}$  incluyen la cadena transportadora de electrones mitocondrial y las enzimas nicotinamida adenina dinucleótido (NADH) / nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NAD(P)H) oxidasa, xantina oxidasa y SON. El sistema de la NADH / NAD(P)H oxidasa es la fuente principal de  $O_2^{\cdot-}$  vascular y está constituido por oxidasas unidas a membranas que emplean el NADH y NAD(P)H como sustratos. Estructuralmente, estas oxidasas constan de varias subunidades gp91phox, p22phox, p47phox, p67phox y rac; las dos primeras intervienen en la transferencia de un electrón del NAD(P)H al oxígeno por la oxidasa, originando  $O_2^{\cdot-}$  y NAD(P)<sup>+</sup>, y las tres últimas subunidades actúan como reguladores de la actividad de la enzima. Este sistema enzimático está regulado por factores involucrados en la patogénesis de las enfermedades vasculares como citoquinas, hormonas vasoactivas y fuerza física (Zalba y col., 2002).



Por lo tanto, la importancia de las EROs en la función vascular y el desarrollo de hipertensión ha sido ampliamente descrita (Rodrigo y col., 2007); ya que la elevada producción de EROs ha sido demostrada en varios modelos de hipertensión animal (Zalba y col., 2002), demostrándose que la expresión de la subunidad p22phox y la actividad de la NAD(P)H oxidasa están aumentadas en la aorta de ratas SHR (Fig. 16) (Zalba y col., 2000), siendo dicho aumento revertido por el ibersartán, un antagonista de los receptores tipo 1 de ANG II (AT1); por su parte, el tratamiento oral o la inyección intravenosa de 4- hidroxí-2,2,6,6- tetrametilpiperidina – N-oxil (tempol), un mimético de la superóxido dismutasa (SOD), ha demostrado disminuir la presión arterial y la actividad nerviosa simpática en ratas SHR (Fujita y col., 2005); de igual manera, en la región ventrolateral rostral del bulbo raquídeo (RVLM) de ratas SHR se ha reportado elevados niveles de EROs; sin embargo, la inyección de tempol en RVLM ha demostrado disminuir la presión arterial (Fujita y col., 2005). Por otra parte, el  $O_2^-$  es el determinante principal de la biosíntesis y biodisponibilidad del NO, por lo que puede modificar la función endotelial, ya que es conocido que el  $O_2^-$  inactiva rápidamente al NO derivado del endotelio (Ferroni y col., 2005; Rodrigo y col., 2007; Figueira, 2010).



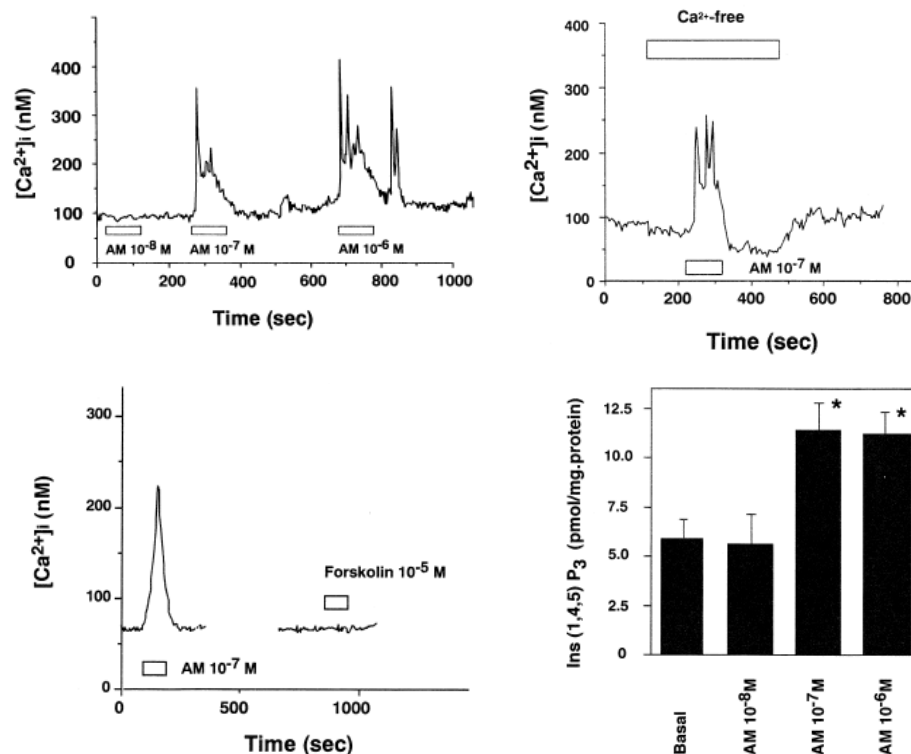
**Fig. 16.** Expresión de p22phox (Panel izquierdo) y la Actividad de la NAD(P)H oxidasa (Panel derecho) en ratas Wistar Kioto (WKY) y Espontáneamente Hipertensas (SHR) (Zalba y col., 2000).

Asimismo, actualmente se reconoce a las EROs como moduladores del estado redox intracelular, los cuales tienen una importante función como segundos mensajeros en regular las vías de señalización y la subsecuente expresión de genes (Kunsch y col., 1999). En este sentido se ha evidenciado la modulación de la expresión de un conjunto selectivo de genes inflamatorios vasculares por señales oxidativas intracelulares; lo cual indica que los radicales libres y sus moléculas blancas modulan una amplia variedad de procesos biológicos mediante señales de acoplamiento en la superficie celular en cambios a largo plazo en la expresión de productos de genes inflamatorios vasculares. En este sentido los radicales libres se comportan como segundos mensajeros que regulan cascadas de señalización intracelulares, afectando la actividad transcripcional celular (Kunsch y col., 1999).

La AM ha demostrado tener efecto sobre la producción de radicales libres, pues es capaz de disminuir la producción de EROs mediada por NAD(P)H oxidasa, a través de la inhibición de la actividad de la enzima (Rahman y col., 2006). De igual manera, se ha demostrado que la AM posee propiedades protectoras contra el daño a órganos producidos por condiciones fisiopatológicas, mediante la inhibición del estrés oxidativo. El mecanismo que subyace a esta actividad varía dependiendo de la célula. En células mesangiales, la AM suprime la producción de ROS a través de la vía AMPc/PKA, mientras que en el ventrículo de la rata, la AM inhibe la NAD(P)H oxidasa a través de la vía NO/GMPc. Por otra parte, se ha descrito que la AM inhibe la estimulación de la NAD(P)H oxidasa inducida por ANG II en células de músculo liso (Liu y col., 2006).

### 1.3.1.6. Otras Vías de Señalización

Por otra parte, se ha demostrado en células KG-1C, que la AM es capaz de elevar los niveles de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular por la vía del inositol 1,3,4- trifosfato (Fig. 17) (Uezono y col., 1998).



**Fig. 17.** Incremento de la concentración de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular ( $\text{Ca}^{2+}$ )<sub>i</sub> inducido por AM en células KG-1C (Panel superior izquierdo). Efecto de la remoción del  $\text{Ca}^{+2}$  extracelular sobre el incremento del ( $\text{Ca}^{2+}$ )<sub>i</sub> inducido por AM (Panel superior derecho) y efecto de la forskolina sobre los niveles de ( $\text{Ca}^{2+}$ )<sub>i</sub> en células KG-1C. Las células fueron estimuladas con AM seguido por Forskolina durante 90 s (Panel Inferior izquierdo). Efecto de la AM sobre los niveles de Inositol 1,3,4 – trifosfato en células KG-1C. Las células fueron estimuladas durante 1 min a 37°C. \* $p < 0,05$  vs. valor basal (Panel inferior derecho) (Uezono y col., 1998).

Asimismo, la AM ha demostrado provocar relajación en tiras de arteria coronaria porcina, mediante la disminución de la concentración de calcio intracelular y de la sensibilidad al calcio del aparato contráctil por un mecanismo mediado posiblemente por AMPc (Kureishi y col., 1995), y a través de la activación de canales de potasio sensibles a ATP (Hinson y col., 2000; Beltowski y col., 2004).

En células endoteliales, la AM posee receptores funcionales cuya activación probablemente conlleva acumulación de AMPc y movilización de calcio mediada por inositol – 1,4,5- trifosfato (IP<sub>3</sub>), lo cual está asociado con un incremento de la concentración de GMPc intracelular que puede ser bloqueado por inhibidores de la SON, sugiriendo que el mecanismo final es la liberación de NO del endotelio (Shimekake y col., 1995).

Por lo tanto, a pesar de que la AM provoca vaso-relajación por un mecanismo que involucra la estimulación de la AC en células de músculo liso vascular, lo cual generalmente ha sido relacionado como un mecanismo de vasodilatación independiente del endotelio. La vaso-relajación en respuesta a la AM ha demostrado incluir la liberación de NO, un potente vasodilatador derivado del endotelio vascular. De hecho, los efectos de la AM sobre la vía de señalización del calcio, también han sido estudiados, desde que el NO ha sido implicado en la vasodilatación mediada por la AM, la cual puede ser debida a un incremento en el calcio intracelular, que activa a la SON endotelial (Hinson y col., 2000).

Se ha descrito que la AM actúa como un factor anti-apoptótico en células endoteliales de aorta de la rata, de manera dosis dependiente (Kato y col., 1997), sin tener efecto mitogénico; ya que la neutralización de la AM produce un incremento en la apoptosis después de la eliminación de suero; estas acciones

anti-apoptóticas de la AM son independientes de la vía AMPc/PKA (Kato y col., 1997).

Por otra parte, la AM es capaz de influir sobre la migración celular, ya que este péptido inhibe la migración de células de músculo liso vascular estimulado por suero, ANG II y factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), este efecto parece ser mediado por la vía AMPc/PKA (Horio y col., 1995; Kohno y col., 1997; Kohno y col., 1999); sin embargo en un estudio realizado por Fukai y col., (2003), los investigadores encontraron que el mecanismo antimigratorio de la AM era por una vía independiente de la AMPc/PKA (Fukai y col., 2003).

#### **1.4. Acciones de la Adrenomedulina**

La AM inicialmente fue caracterizada como un péptido hipotensor (Kitamura y col., 1993<sup>A</sup>); sin embargo, han sido muchas las acciones descritas para la AM (Tabla IV) (Cases y col., 2001). Existe un gran cuerpo de evidencias que indican que la AM ejerce acciones pleiotrópicas, entre las que se incluye proliferación celular, apoptosis, migración, inflamación, angiogénesis y secreción hormonal (Cases y col., 2001; Beltowski y col., 2004).

Es importante destacar que debido a que los receptores de AM generalmente se expresan en los mismos tejidos que el péptido, se considera a la AM como un efector local autocrino / paracrino (Takahashi, 2001).

**Tabla IV. Efectos Biológicos de la AM**

Órgano o estirpe celular	Efecto biológico
Vasos	Vasodilatación de la FMLV. Inhibición de la secreción de endotelina. Inhibición/activación proliferación de la FMLV. Aumento de la síntesis endotelial de óxido nítrico. Inhibición de la apoptosis de la célula endotelial.
Corazón	Efecto inotrópico positivo (±). Inhibe la hipertrofia del cardiomiocito.
Riñón	Vasodilatación renal. Aumento del filtrado glomerular. Reducción de la reabsorción tubular distal de sodio. Estimulación secreción de renina.
Pulmón	Vasodilatación pulmonar.
Plaquetas	Elevación de AMPc.
Suprarrenal	Inhibición secreción aldosterona.
SNC	Inhibición ingesta de sal y agua.
Hipófisis	Inhibición secreción de ACTH.

FMLV: fibra muscular lisa vascular, SNC: sistema nervioso central.

#### **1.4.1. Acciones Cardiovasculares**

Desde el descubrimiento de la AM mediante un ensayo desarrollado para identificar nuevos péptidos relevantes en el control de la circulación, el principal énfasis de la mayoría de los investigadores ha estado orientado en las acciones CDV de este péptido. La administración aguda o crónica de la AM ocasiona disminución de la resistencia vascular periférica acompañada de una caída en la presión arterial, lo cual se acompaña de elevación en la frecuencia y del gasto cardíaco (Haynes y col., 1995; Hirata y col., 1995; Lainchbury y col., 1997; Hinson y col., 2000; Nagaya y col., 2000; Beltowski y col., 2004; Martínez y col., 2004; Nicholls, 2004). Se ha descrito que la AM es vasodilatadora en diferentes lechos, como el mesentérico, renal, coronario, pulmonar, cerebral, en

extremidades inferiores e induce relajación en preparaciones de anillos de aorta o arterias cerebrales (Cases y col., 2001).

El mecanismo del efecto vasodilatador de la AM ha sido estudiado por muchos investigadores, sin embargo, los resultados difieren dependiendo del modelo animal y de la preparación vascular empleada. En general, la mayoría de los estudios indican que la AM induce vasodilatación independiente del endotelio actuando a través de los receptores CGRP y elevando los niveles de AMPc en células de músculo liso vascular (Beltowski y col., 2004). Por otra parte, la AM puede activar canales de potasio en células de músculo liso e inducir hiperpolarización de las mismas (Sakai y col., 1998). Asimismo, la AM por medio de sus receptores específicos en las células endoteliales produce relajación dependiente del endotelio mediada por NO (Hayakawa y col., 1999), por el factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF) (Wangenstein y col., 2002), y/o prostanoïdes vasodilatadores (Yang y col., 1996). Asimismo, la AM es capaz de activar la SON en por lo menos dos vías distintas, mediante la elevación de los niveles de calcio intracelular que incrementan la actividad de la SON (Shimekake y col., 1995), y mediante la activación por parte de la AM de la PIK3 y la proteína quinasa B / Akt, el cual fosforila a la SONe e incrementa su actividad, aún a bajas concentraciones de calcio (Nishimatsu y col., 2001).

En cuanto a la contractilidad del miocardio, se ha evidenciado que la AM reduce la contractilidad de los miocitos ventriculares aislados de conejos mediante estimulación de la producción de NO, el cual disminuye la concentración intracelular de calcio mediante un mecanismo dependiente de GMPc (Ikenouchi y col., 1997). Sin embargo, un estudio posterior indica que la perfusión de AM en miocitos auriculares prolonga la duración del potencial de acción, indicando un efecto inotrópico positivo (Szokodi y col., 1998).

De igual manera, otros estudios indican que la AM inhibe la síntesis proteica y la hipertrofia de cardiomiocitos, así como la proliferación de fibroblastos cardíacos y la producción de matriz extracelular (Tsuruda y col., 1998; Cases y col., 2001). De igual manera, la AM regula la proliferación de células de músculo liso vascular, estimula la producción de células endoteliales e inhibe la apoptosis (Miyashita y col., 2003; Beltowski y col., 2004).

#### **1.4.2. Acciones en el Sistema Nervioso**

En cuanto a los efectos de la AM sobre la presión arterial, es importante resaltar que los efectos ejercidos por la AM a nivel periférico, muchas veces no se corresponden con los vistos a nivel central; ya que la AM es hipertensora cuando es microinyectada en el área postrema (AP) o en la RVLM, mientras que induce un efecto hipotensor cuando se administra en el núcleo paraventricular (PVN) del hipotálamo (Allen y col., 1997; Ji y col., 2002; Xu y col 2004<sup>B</sup>).

Por otra parte, la AM administrada intracerebroventricular (*icv*) en ratas conscientes produce un efecto hipertensor, debido posiblemente a la activación del sistema nervioso simpático (Samson y col., 1998).

Asimismo, la AM cuando es administrada *icv*, ha demostrado provocar inhibición de la ingesta de agua inducida por ANG II o por hiperosmolaridad (Murphy y col., 1995) y del apetito por la sal inducido por hipovolemia (Samson y col., 1997) y de la ingesta de alimentos. Asimismo, el bloqueo de la AM produce incremento en la ingesta de agua y sal, sugiriendo que tónicamente la AM inhibe la sed y el apetito por la sal (Taylor y col., 2002). De igual manera, la



administración central de AM incrementa el volumen urinario y la excreción de sodio y potasio (Israel y col., 2000; Beltowski y col., 2004).

Por otra parte, se ha observado que la AM administrada centralmente estimula la liberación de oxitocina e inhibe la secreción de vasopresina estimulada por hiperosmolaridad. Por otra parte, la AM *in vitro* inhibe la secreción de la hormona adrenocorticotropina (ACTH) basal, como la estimulada por hormona liberadora de corticotropina (CRH) por parte de las células de la pituitaria anterior. Asimismo, la AM administrada a nivel periférico, disminuye la ACTH; sin embargo la inyección *icv* de la AM produce activación del eje hipotálamo – pituitaria – suprarrenal mediante la activación de las neuronas que producen CRH (Beltowski y col., 2004).

### **1.4.3. Acciones Renales**

La presencia de la AM y los componentes de su receptor en el riñón, han sugerido que este péptido participa en la regulación hemodinámica renal, filtración glomerular y la homeostasis del sodio tubular (Cases y col., 2001).

Se ha demostrado que AM es un potente vasodilatador en la regulación del tono vascular. De hecho, en estudios de órgano aislado, la AM induce vasodilatación dependiente de la concentración en arterias renales canina (Jougasaki y col., 2000).

Asimismo, se ha encontrado que la AM por vía intravenosa o infusión intrarenal tiene efectos diuréticos y natriuréticos, los cuales se asocian a su poder vasodilatador, al incremento del flujo sanguíneo renal y de la tasa de filtración

glomerular, así como a la disminución de la reabsorción tubular de sodio a nivel distal (Cases y col., 2001; Beltowski y col., 2004).

El efecto vasodilatador renal, diurético y natriurético inducido por la AM ha sido asociado en parte por la liberación de NO endógeno (Jougasaki y col., 2000).

#### **1.4.4. Otras Acciones**

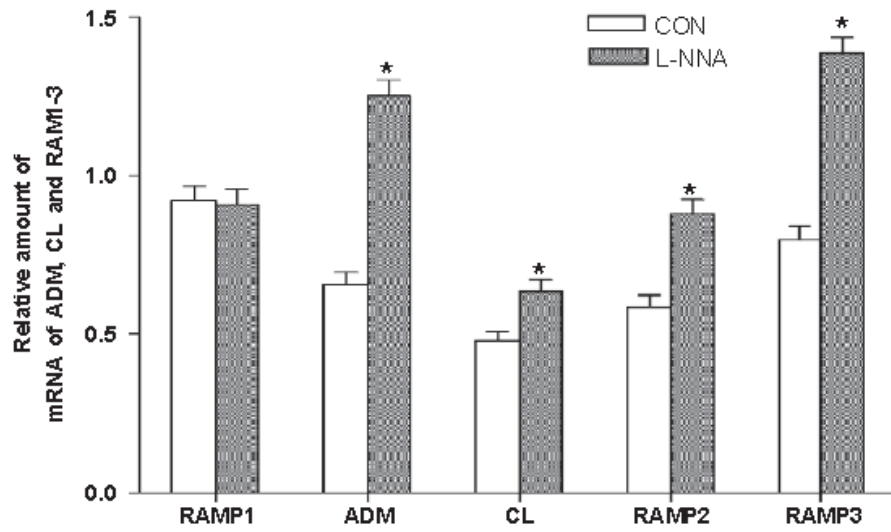
Se ha demostrado que la AM inhibe la secreción de citoquinas pro-inflamatorias, reduce la permeabilidad endotelial incrementada por EROs, endotoxinas o citoquinas. Tiene efectos sobre la proliferación celular, dependiendo del tipo de célula, produciendo estimulación en fibroblastos, queratinocitos, células endoteliales, osteoblastos, entre otras. La AM tiene propiedades angiogénicas (Beltowski y col., 2004). Por otra parte, la AM estimula la secreción de renina (Jensen y col., 1997).

La AM ha demostrado tener un papel protector ante el estrés oxidativo, actuando como antioxidante *in vivo*. Asimismo, *in vitro*, se ha demostrado que la AM tiene un papel protector como antioxidante en el daño vascular inducido por ANG II, demostrándose que la AM inhibe la generación intracelular de EROs inducida por ANG II en células de músculo liso vascular, siendo dicho efecto mediado por el receptor de AM a través de la vía AMPc/PKA; asimismo, la AM es capaz de inhibir la expresión de varios genes sensibles al estado redox como la proteína -1 quimiotáctica de monocitos (MCP-1) y la NAD(P)H oxidasa, los cuales son inducidos por la ANG II; lo cual indica que la AM es un poderoso antioxidante que juega un papel vasculoprotector en el daño vascular inducido por la ANG II (Yoshimoto y col., 2004).

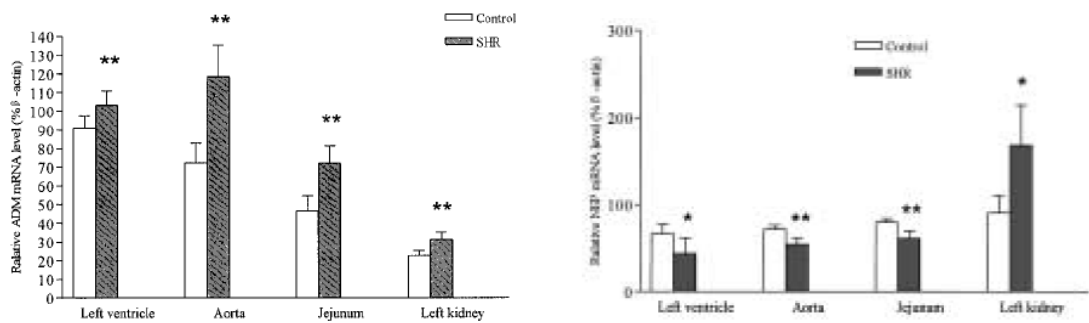
## **1.5. La Adrenomedulina en la Hipertensión**

Diferentes estudios experimentales y epidemiológicos han demostrado que la expresión de la AM y sus componentes se encuentran alterados en diferentes patologías CDV tales como la hipertensión arterial, infarto agudo de miocardio, insuficiencia cardíaca congestiva, insuficiencia renal y diabetes complicada (Cases y col., 2001).

Durante la hipertensión se ha observado un aumento en la expresión de la AM y de los componentes de sus receptores, que se cree se debe a una respuesta de adaptación CDV compensatoria al proceso fisiopatológico. Dichos cambios se han evidenciado en tejidos periféricos como la aorta, el ventrículo cardíaco (Fig. 18) (Pan y col., 2005; Gibbons y col., 2007), así como a nivel del SNC (Cases y col., 2001). De igual manera, la hipertensión se acompaña de cambios en la expresión y actividad de la NEP que han sido demostrados en el plasma y tejidos como yeyuno, aorta y ventrículo izquierdo, donde se evidencia disminución de su actividad y un consecuente incremento en la expresión de AM, lo cual podría potenciar los efectos de este péptido (Fig. 19) (Jiang y col., 2004).



**Fig. 18.** Cambio en la expresión de ARNm de adrenomedulina (ADM), CL, RAMPs en el ventrículo de ratas controles e hipertensas inducidas con L-NNA (n=6) (Pan y col., 2005).



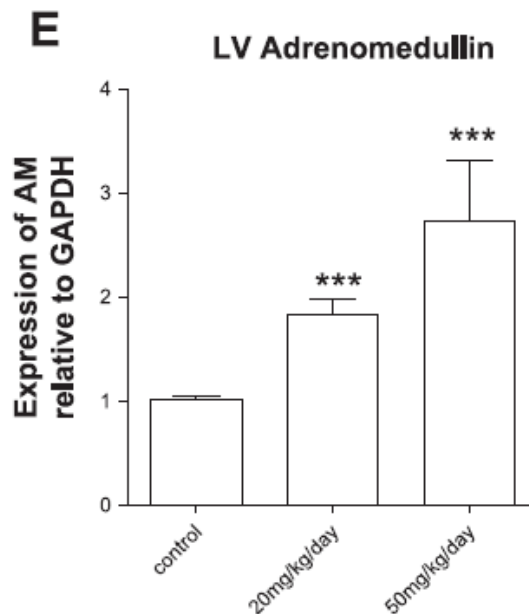
**Fig. 19.** Expresión de la ADM (AM) (Panel izquierdo) y Neprilina (NEP) (Panel derecho) en el ventrículo izquierdo, aorta, yeyuno y riñón en ratas SHR (Barras llenas) y WKY (Barras vacías) (Jiang y col., 2004).

En enfermedades como la hipertensión simple o con complicaciones, la expresión de la AM en los tejidos CDV se ha encontrado incrementada en relación a la severidad de la enfermedad; puesto que en pacientes con hipertensión arterial esencial se han descrito niveles de AM elevados con respecto a los controles sanos, y el grado de elevación se corresponde con la gravedad de la hipertensión, así como el grado de hipertrofia ventricular izquierda y de la disminución de la distensibilidad carotídea. Asimismo, en formas secundarias de hipertensión, los niveles de AM se encuentran elevados (Cases y col., 2001).

Sin embargo, los cambios más dramáticos en el sistema AM se observan en modelo de hipertensión maligna, como se aprecia en las ratas SHR tratadas con deoxicorticosterona acetato y dieta alta en sal (DOCA- sal SHR) (Nishikimi y col., 2001; Beltowski y col., 2004); sin embargo, la AM ha demostrado ejercer efectos favorables en este modelo, ya que la infusión crónica de AM a dosis donde no exista efecto sobre la presión arterial, ha demostrado mejorar la depuración de creatinina, disminuir la proteinuria y los cambios histológicos renales, reducir la expresión renal de la enzima convertidora de angiotensina y el factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ) y aumentar la supervivencia de las ratas hipertensas en este modelo de hipertensión maligna (Mori y col., 2002; Beltowski y col., 2004).

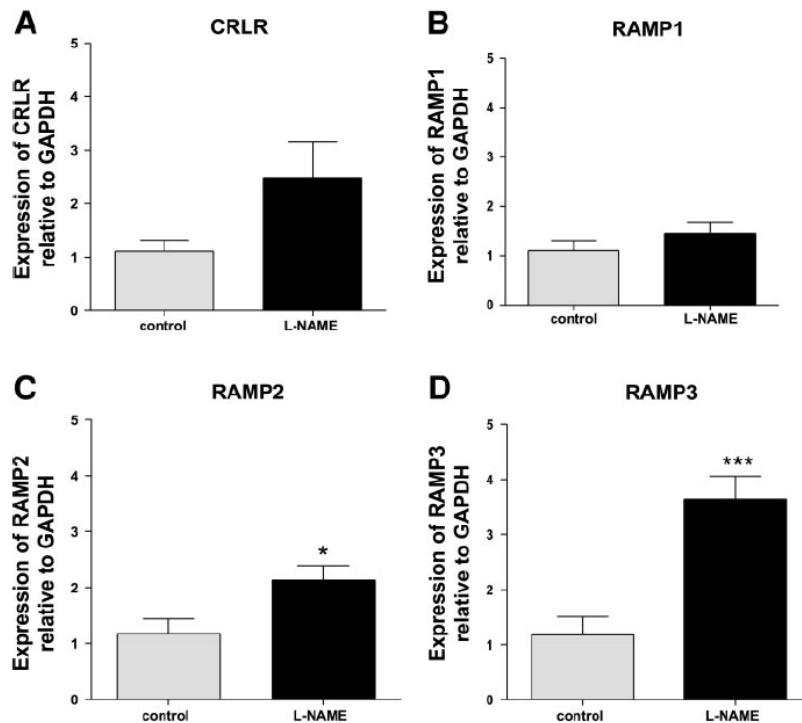
Se ha demostrado que la administración de AM provoca una marcada reducción de la presión arterial, atenúa la hipertrofia cardíaca, la fibrosis, el daño renal y mejora el funcionalismo renal en ratas SHR, lo cual sugiere que el aumento de la AM es un evento biológico relevante para compensar el daño cardíaco y renal, por lo que la AM podría constituir una estrategia promisoriosa para el tratamiento de pacientes con hipertensión arterial (Jiang y col., 2004).

A nivel cardíaco, ha sido ampliamente demostrado un aumento en la expresión de la AM en los cardiomiocitos del ventrículo izquierdo durante la hipertensión inducida por L-NAME (20 o 50 mg/Kg/día) administrada a ratas durante 8 semanas. Se ha postulado que dicho aumento en la expresión de la AM puede proveer de un mecanismo compensatorio local al incremento del estrés oxidativo y a la liberación de mediadores hipertróficos, ayudando a compensar la hipertrofia de los cardiomiocitos observada en este modelo después de la administración de L-NAME, ya que es conocido que la administración de AM reduce la masa ventricular izquierda, posiblemente mediante una atenuación del crecimiento de los cardiomiocitos (Fig. 20) (Bell y col., 2006).



**Fig. 20.** Efecto de la administración crónica de L-NAME (20 y 50 mg/Kg/día) durante 8 semanas en ratas. Expresión de la AM en cardiomiocitos del ventrículo izquierdo. Los datos son expresados como la media  $\pm$  desviación estándar de la expresión del ARNm de la AM normalizada con Gliceraldehído – 3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH). \*\*\*  $p < 0,005$  (Bell y col., 2006).

De igual manera, los componentes de los receptores de la AM también se ven alterados en este modelo de hipertensión, ya que la expresión de RAMP2 y RAMP3 en los cardiomiocitos del ventrículo izquierdo incrementa considerablemente (Zhao y col., 2006), lo cual podría promover la interacción de la AM con los receptores AM1 y AM2 en lugar del receptor CGRP1, favoreciendo un efecto antihipertrófico local de la AM. Sin embargo, no se ha establecido el receptor responsable de este efecto de la AM, aunque la marcada elevación de la expresión del RAMP3 sugiere un papel más prominente del receptor AM2 en la contra-regulación en respuesta a los cambios fisiopatológicos que ocurren en el miocardio en la hipertensión arterial inducida por la deficiencia de NO (Fig. 21) (Bell y col., 2006).



**Fig. 21.** Efectos de la administración crónica de L-NAME (20 mg/Kg/día) durante 8 semanas sobre la expresión de CRLR (Panel A), RAMP1 (Panel B), RAMP2 (Panel C) y RAMP3 (Panel D) en cardiomiocitos del ventrículo izquierdo. Los datos son expresados como la media  $\pm$  desviación estándar de la

expresión del ARNm de la AM normalizada con GAPDH. \* $p < 0,05$ . \*\*\*  $p < 0,005$  (Bell y col., 2006).

Esto sugiere que la elevación de los componentes del sistema AM cardíaco en la hipertensión es un mecanismo protector que disminuye la sobrecarga cardíaca debido a las propiedades natriuréticas y vasodilatadoras de la AM, además de limitar la hipertrofia y el remodelaje cardíaco (Beltowski y col., 2004).

Es conocido que la expresión, síntesis y secreción de la AM es regulada por muchos factores tales como ANG II, endotelina-1, norepinefrina, y estímulos físicos como el estrés de rozamiento, los cuales participan en la fisiopatología de la hipertensión (Jiang y col., 2004). Por otra parte es relevante considerar que la ANG II induce aumento en la expresión de RAMP1 y RAMP3, y la endotelina-1 aumenta la expresión de CRLR, RAMP3 y disminuye la expresión de RAMP2, por lo que es posible que la activación de factores de crecimiento hipertróficos (incluyendo la ANG II y la endotelina-1) pueda explicar la modulación de los componentes de los receptores de la AM en el modelo de hipertensión con L-NAME (Bell y col., 2006).

Asimismo, muchos han sido los efectos favorables que tiene la administración de AM durante la hipertensión, puesto que la administración subcutánea de AM ejerce un efecto antioxidante en ratas sensible a sal (Dahl), las cuales son un modelo de hipertensión genética que exhibe un aumento en el estrés oxidativo; por lo que estas ratas con una dieta rica en sal evidencian disminución en la transcripción de la citidina trifosfato ciclohidrolasa I y sobreexpresión de p22 phox, lo cual contribuye al aumento de la actividad desacoplada de la SON con el consecuente incremento de la producción de anión superóxido. En este

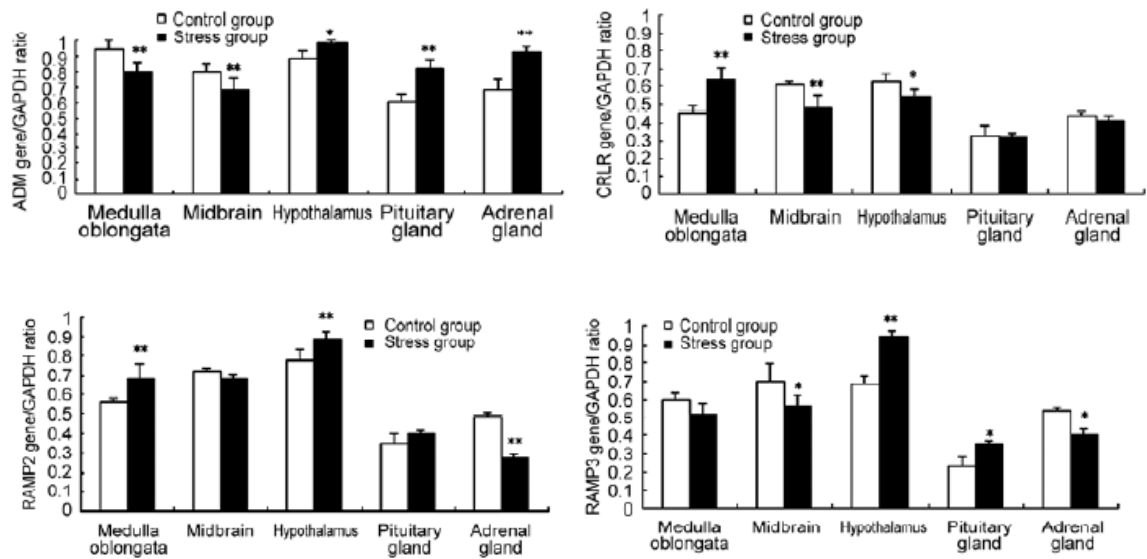


sentido, la AM suprime la producción de anión superóxido e incrementa tanto la síntesis como la biodisponibilidad de NO mejorando la función endotelial (Cao y col., 2005).

Se ha demostrado que los daños vasculares inducidos por la ANG II son mediados por el estrés oxidativo. En este sentido, la AM ha mostrado inhibir el estrés oxidativo, ya que su deficiencia es capaz de agravar el daño CDV inducido por el estrés oxidativo, puesto que ratones deficientes en AM ( $AM^{+/-}$ ) con administración de ANG II y dieta alta en sal presentan niveles elevados de isoprostano urinario, marcador de estrés oxidativo, en comparación a los ratones  $AM^{+/-}$  a los que no se les administró ANG II y dieta alta en sal. Sin embargo, este marcador no se elevó en ratones  $AM^{+/+}$  con administración de ANG II y dieta alta en sal. Esto sugiere que la AM puede representar una sustancia endógena protectora de órganos que contrarresta el estrés oxidativo en el sistema CDV (Shimosawa y col., 2002).

Por otra parte, a nivel del SNC diferentes estudios han demostrado la existencia de cambios en la expresión de la AM y sus componentes en la hipertensión. De hecho, se ha evidenciado cambios en la expresión del ARNm para los componentes de los receptores de la AM y para la AM en ratas hipertensas inducidas por estrés; donde aquellas ratas que recibieron estímulo eléctrico plantar (EEP) y estrés de sonido, presentaron un incremento en la expresión de pre-pro AM en hipotálamo, pituitaria y glándula suprarrenal, y disminución en el bulbo raquídeo y mesencéfalo, en comparación a las ratas controles; por su parte en las ratas sometidas a estrés la expresión de CRLR en el bulbo raquídeo fue mayor, estuvo disminuida en el mesencéfalo e hipotálamo y no experimentó cambios en la pituitaria y en la glándula suprarrenal, con respecto a las controles. La expresión del ARNm para RAMP2 estuvo incrementada en ratas sometidas a estrés en el bulbo raquídeo e hipotálamo y disminuido en la

glándula suprarrenal. Por otra parte, la expresión del ARNm para RAMP3 estuvo incrementada en el hipotálamo, pituitaria y disminuida en la glándula suprarrenal y en el mesencéfalo de las ratas sometidas a estrés en comparación con las controles (Fig. 22) (Li y col., 2004).



**Fig. 22.** Efecto del estrés crónico sobre la expresión de AM (Panel Superior Izquierdo), CRLR (Panel Superior Derecho), RAMP2 (Panel Inferior Izquierdo) y RAMP3 (Panel Inferior Derecho) en el bulbo raquídeo, el mesencéfalo, el hipotálamo, la glándula pituitaria y suprarrenal. Valores expresados como la media  $\pm$  desviación estándar. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  versus el grupo control, respectivamente (Li y col., 2004).

Esta sobre-expresión de la AM y de los componentes de sus receptores a nivel del hipotálamo, sugiere un efecto compensatorio protector para reajustar el incremento en la presión arterial; por otro lado, la disminución de la pre-pro AM en el bulbo raquídeo, también puede obedecer a un mecanismo compensatorio, pues en esta región la AM ejerce un efecto hipertensor (Li y col., 2004).

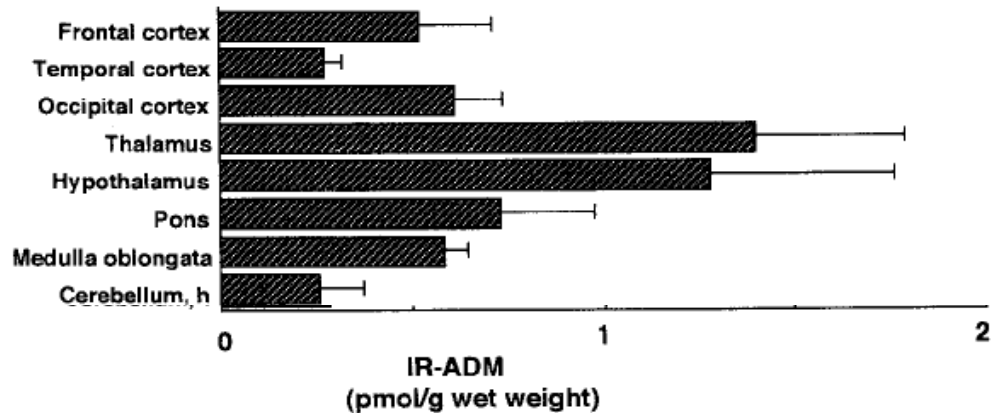
Por otra parte, se ha evidenciado que la AM endógena cerebral podría inhibir la elevación de la presión arterial y la activación simpática inducida por la administración *icv* de solución salina hiperosmótica en ratones (Fujita y col., 2005); por lo que la AM tiene efectos beneficiosos en la hipertensión.

## **1.6. La Adrenomedulina y el Sistema Nervioso Central**

Existe evidencia de la presencia de un sistema adrenomedulinérgico en el SNC; pues de acuerdo a Carey y col., (2003), para poder hablar de la existencia de un sistema peptídico local, es necesario que se cumplan varios requisitos los cuales incluye: la presencia de ARNm para todos los componentes del sistema, síntesis en el tejido del producto biológicamente activo, presencia de los receptores para el producto biológicamente activo, regulación dentro del tejido (independientemente de la regulación sistémica) del producto biológicamente activo, y la existencia de respuesta fisiológica tras la reducción o eliminación de las acciones del producto (Carey y col., 2003; Figueira y col., 2009). La AM es un péptido que parece cumplir con estos requisitos en el cerebro; ya que se ha evidenciado los elementos del sistema de la AM a nivel central y se ha demostrado que la AM cumple importantes acciones a este nivel; en este sentido, se podría hablar de la existencia de un sistema “adrenomedulinérgico” a nivel central.

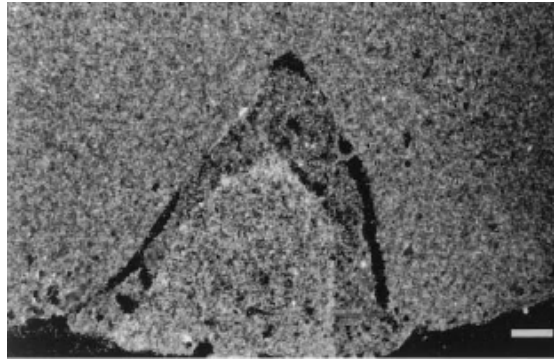
Los estudios iniciales de la AM parecían indicar que ésta estaba ausente en el cerebro de humanos y ratas; sin embargo estudios posteriores encontraron que la AM se encontraba presente en el cerebro humano a concentraciones que oscilan entre 0,26 – 1,4 pmol/g, reportándose los mayores niveles en el tálamo y el hipotálamo (Sato y col., 1995). Posteriormente, se observó este péptido en la corteza cerebral, cerebelo, glándula pituitaria (Sakata y col., 1994), bulbo

raquídeo, hipotálamo y amígdala (Fig. 23) (Samson y col., 1997; Hinson y col., 2000; Serrano y col., 2002; Juaneda y col., 2003; Macchi y col., 2006).



**Fig. 23.** Concentración de AM inmunoreactiva (IR-ADM) en el cerebro humano (Takahashi, 2001).

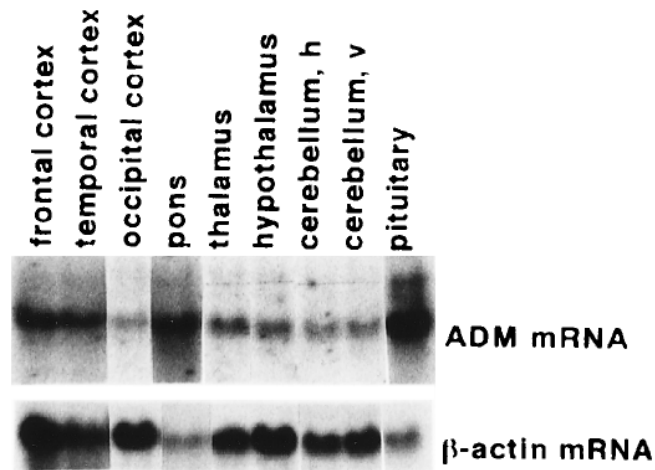
En el hipotálamo de la rata, se ha encontrado AM en los núcleos supraóptico (NSO), magnocelular paraventricular, periventricular anterior, circularis y magnocelular accesorio, coexistiendo con la oxitocina y con la arginina vasopresina en las neuronas magnocelulares (Ueta y col., 1995; Serrano y col., 2000; Serrano y col., 2003; Macchi y col., 2006). En el hipotálamo humano, la AM ha sido localizada en el NSO, y tanto en la porción magnocelular y parvocelular del PVN, así como en el núcleo infundibular (Satoh y col., 1996). Asimismo, se ha evidenciado AM en el bulbo olfatorio accesorio y principal, en las áreas posterior, medial dorsal, lateral y ventral del núcleo olfatorio, núcleo accumbens y la estría terminal, área septal, caudado-putamen, tubérculo olfatorio, pálido ventral, banda diagonal de Broca, globo pálido, sustancia innominata, hipocampo, amígdala, tálamo, mesencéfalo, bulbo raquídeo, órganos circunventriculares (en el órgano subfornical y AP) y en el cerebelo (Fig. 24) (Serrano y col., 2000).



**Fig. 24.** Sección de la pituitaria de una rata hibridada con pro-AM (Cameron y col., 1998).

En el cerebelo, la AM se localiza en las células de Purkinje. La capa granular, contiene dos tipos de estructuras neurales inmunoreactivas a la AM, las terminales de las fibras musgosas y las células de Golgi. Asimismo, los núcleos cerebelares lateral, interpósito y medial contienen neuronas inmunoreactivas a AM (Serrano y col., 2000).

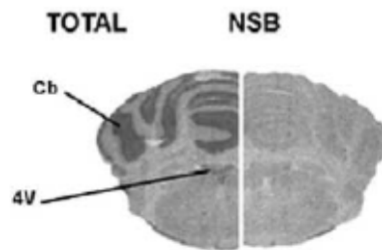
Como se puede apreciar, la AM es un péptido producido en múltiples tejidos, entre ellos el SNC donde se aprecia la existencia de ADN, ARNm y del péptido de la AM y sus receptores en diferentes regiones del SNC (Fig. 25) (Sone y col., 1997; Yang y col., 2003). Asimismo, se ha observado que el gen de la AM es transcrito y expresado a nivel cerebral, en regiones como el PVN, NSO, locus coeruleus, RVLM, columna intermediolateral de la médula espinal; lo cual sugiere que este péptido cumple importantes funciones a nivel central (Shan y col., 2001). Por lo tanto, los hallazgos de la presencia de AM en algunas neuronas y los sitios de unión a la AM en el cerebro sugieren el papel de neurotransmisor / neuromodulador de la AM (Takahashi, 2001).



**Fig. 25.** ARNm de la AM en cerebro humano (Takahashi, 2001).

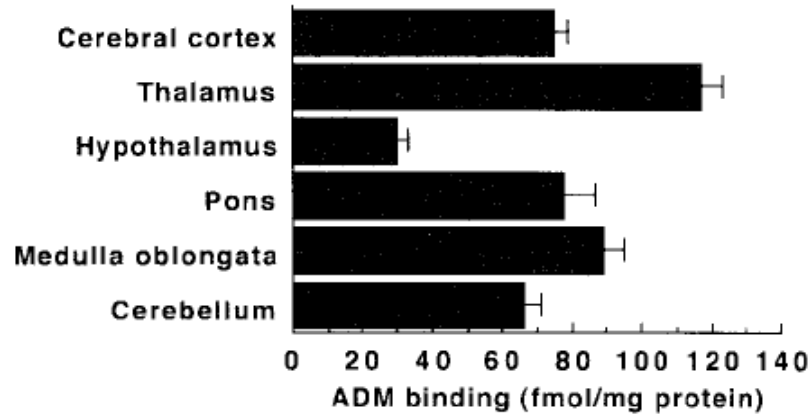
Además de las células endoteliales cerebrales, otras células en el cerebro pueden producir la AM, como las células de músculo liso vascular, pericitos, astrocitos y neuronas; sin embargo, todas estas células están del lado del cerebro de la barrera hematoencefálica, por lo que su contribución a los niveles de AM en la circulación cerebral es cuestionable. Parece más probable que la producción de AM por estas células y por el plexo coroideo contribuya a los niveles de AM en el líquido cefalorraquídeo (LCR); siendo la concentración de AM en este compartimiento comparable o menor que la del plasma (Kis y col., 2003). No es conocido si la AM circulante puede cruzar la barrera hematoencefálica; sin embargo, esta puede ganar acceso a través de los órganos circunventriculares tales como el órgano subfornical o la lámina vascular terminal, donde la barrera se encuentra ausente. Alternativamente, la AM puede actuar de manera autocrina como paracrina dentro del cerebro, pues cuando se administra la AM intravenosa, ésta actúa predominantemente en órganos donde los genes de AM se encuentran altamente expresados (Samson y col., 1997; Kis y col., 2003).

De igual manera, a nivel cerebral existe una muy discreta distribución de los sitios de unión a la AM (Fig. 26), los mismos se encuentran localizados en el plexo coroides y en el revestimiento del tercer, cuarto y ventrículo lateral, en el núcleo amigdaloides basolateral, lóbulo neural de la pituitaria, nervio trigémino y en la capa de células granulares del cerebelo (Fig. 27) (Juaneda y col., 2001). Asimismo, la AM y sus receptores se distribuyen ampliamente a nivel de la corteza cerebral, médula espinal, tálamo, tallo cerebral, RVLM, hipotálamo, en neuronas del PVN, NSO (Fig. 28) (Owji y col., 1996; Xu y col., 2004<sup>A</sup>).

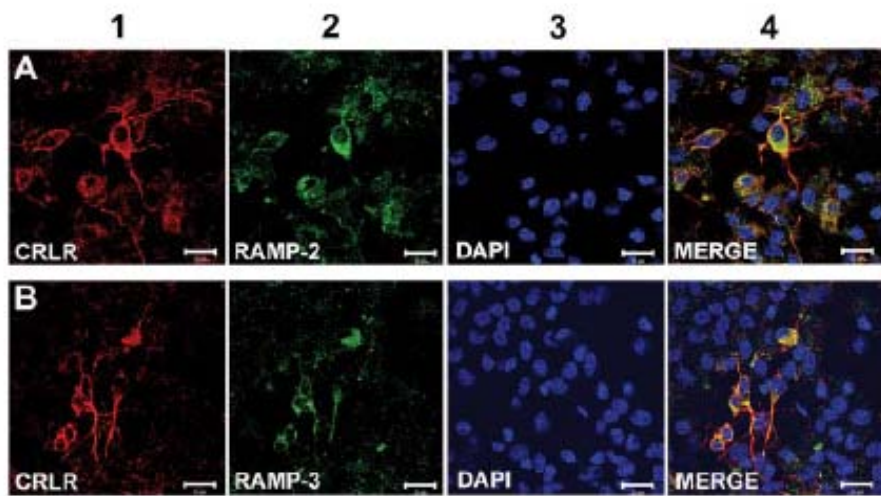


**Fig. 26.** Distribución autoradiográfica de los sitios de unión de la  $^{125}\text{I}$ -AM(13-53) humana en el cerebro de la rata. TOTAL representa la unión total, NSB representa la unión no específica. Abreviaciones: Cb: Cerebelo. 4V: Cuarto ventrículo (Juaneda y col., 2001).

Asimismo, la AM además es detectada en el LCR. Adicionalmente, se ha demostrado que la producción de AM en las células endoteliales del cerebro es mayor en un orden de magnitud con respecto a otras células endoteliales; por lo que la concentración de AM en la circulación cerebral es mayor que en otros lechos vasculares; por lo que estas evidencias indican que la AM podría actuar en neuronas del SNC como neurotransmisor y/o neuromodulador, participando en la respuesta CDV y neuroendocrina (Ueta y col., 2001; Kis y col., 2003).



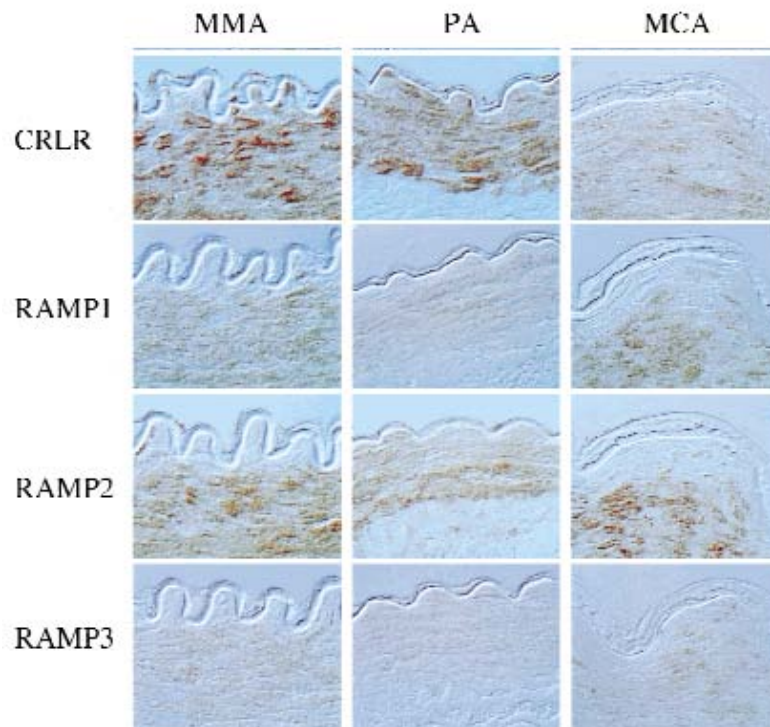
**Fig. 27.** Sitios de unión para la AM-1<sup>125</sup> en el cerebro humano (Takahashi, 2001).



**Fig. 28.** Colocalización de CRLR y RAMP2 (Panel A) o CRLR y RAMP3 (Panel B) en neuronas hipotalámicas. Las células positivas CRLR son identificadas por cy3 (rojo) en 1; RAMPs son identificados por la tinción fluorescente Alexa 488 (verde) en 2; la presencia de células es indicado por la tinción nuclear 4-6-diamidino – 2- fenilindol (azul) en 3; y la colocalización se observa en amarillo en 4 (Xu y col., 2007).



Existe evidencia que indica la presencia de CRLR y RAMPs en arterias cerebrales humanas (Fig. 29) (Oliver y col., 2002). Asimismo, se ha evidenciado el ARNm CRLR a nivel del caudado-putamen y en el núcleo amigdaloides central y basolateral y plexos coroideos. Por su parte, el ARNm para RAMP1 se encuentra ampliamente distribuido en todo el cerebro incluyendo la corteza cerebral, caudado – putamen, complejo amigdaloides, hipocampo, AP, cerebelo y epéndimo. La RAMP2 se encontró más abundantemente en el hipocampo, cerebelo, hipotálamo, piamadre y vasos sanguíneos. La RAMP3 ha sido detectada en el AP, núcleos talámicos y en el cerebelo (Díaz y col., 2006).

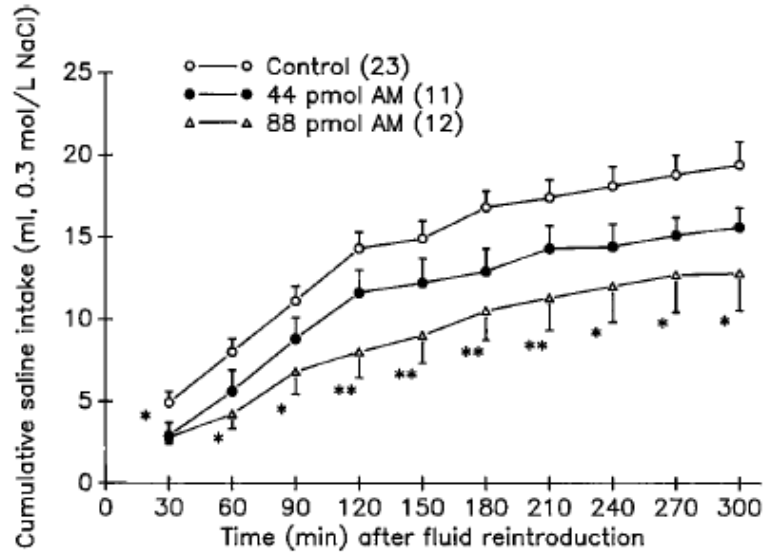


**Fig. 29.** Expresión celular de CGRP y RAMPs en arterias meníngea media (MMA), cerebral pial (PA) y media (MCA) en humanos (Oliver y col., 2002).

La localización de receptores de AM en el SNC en áreas involucradas con el equilibrio hidromineral y liberación de vasopresina, sugiere el papel de este

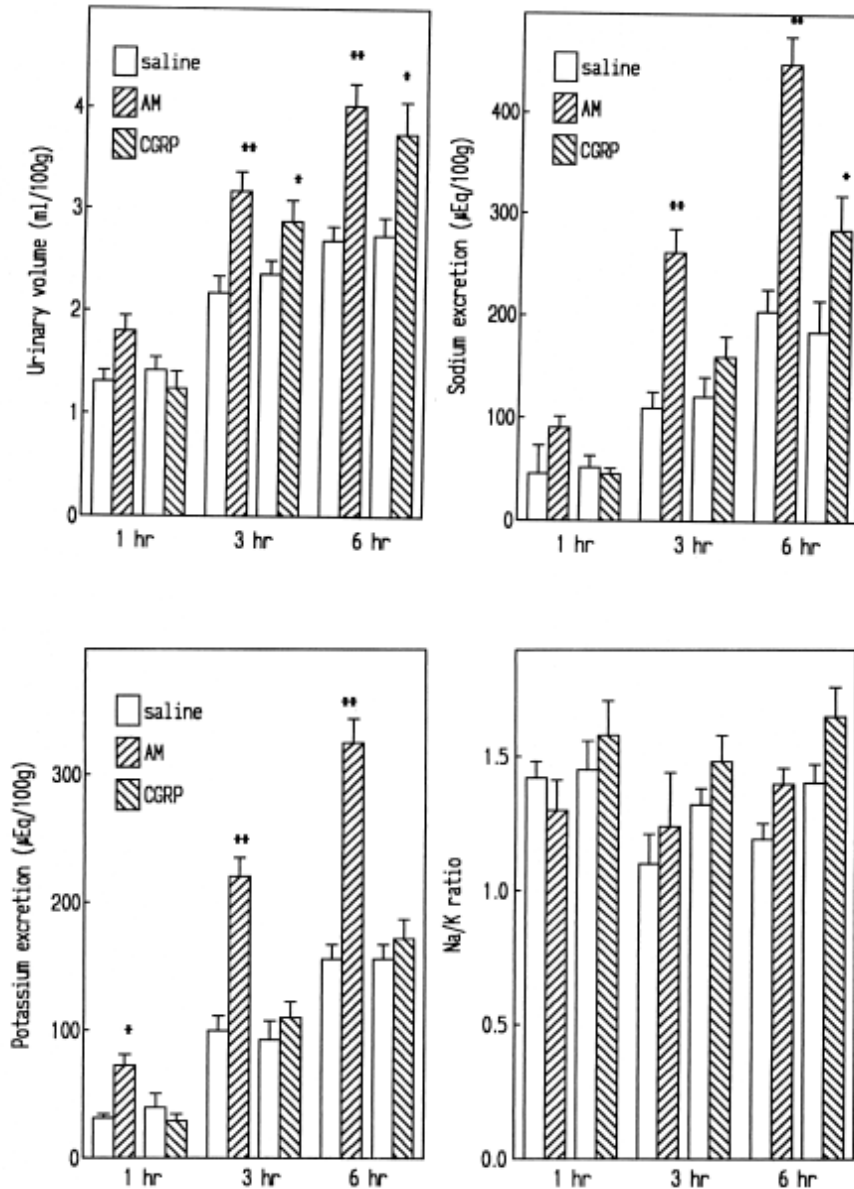
péptido en la regulación de la homeostasis del fluido corporal; asimismo, de manera interesante, muchos de los sitios de unión específicos a AM además tienen una alta densidad de receptores de ANG II, péptido natriurético atrial y endotelina, péptidos vasoactivos; lo cual sugiere que esta localización anatómica común podría significar un papel de la AM en el control de la secreción de vasopresina, ingesta de agua y sal y regulación de la presión arterial (Díaz y col., 2001).

Asimismo, la AM parece tener un importante papel a nivel central, pues su presencia se acompaña de importantes efectos ya que la AM inhibe la ingesta de agua inducida por ANG II (Samson y col., 1997), y la ingesta de alimentos e inhibe la ingesta de sal (Fig. 30) (Samson y col., 1997); de igual manera la AM *icv* incrementa la liberación del péptido natriurético auricular, e inhibe la liberación de la ACTH. Asimismo, la administración *icv* de AM resulta en diversas respuestas neuroendocrinas tales como la inhibición de la secreción de arginina vasopresina inducida por estímulos hipovolémicos y osmóticos, y la excitación de neuronas que secretan oxitocina en el hipotálamo de la rata (Yokoy y col., 1996; Serino y col., 1999).

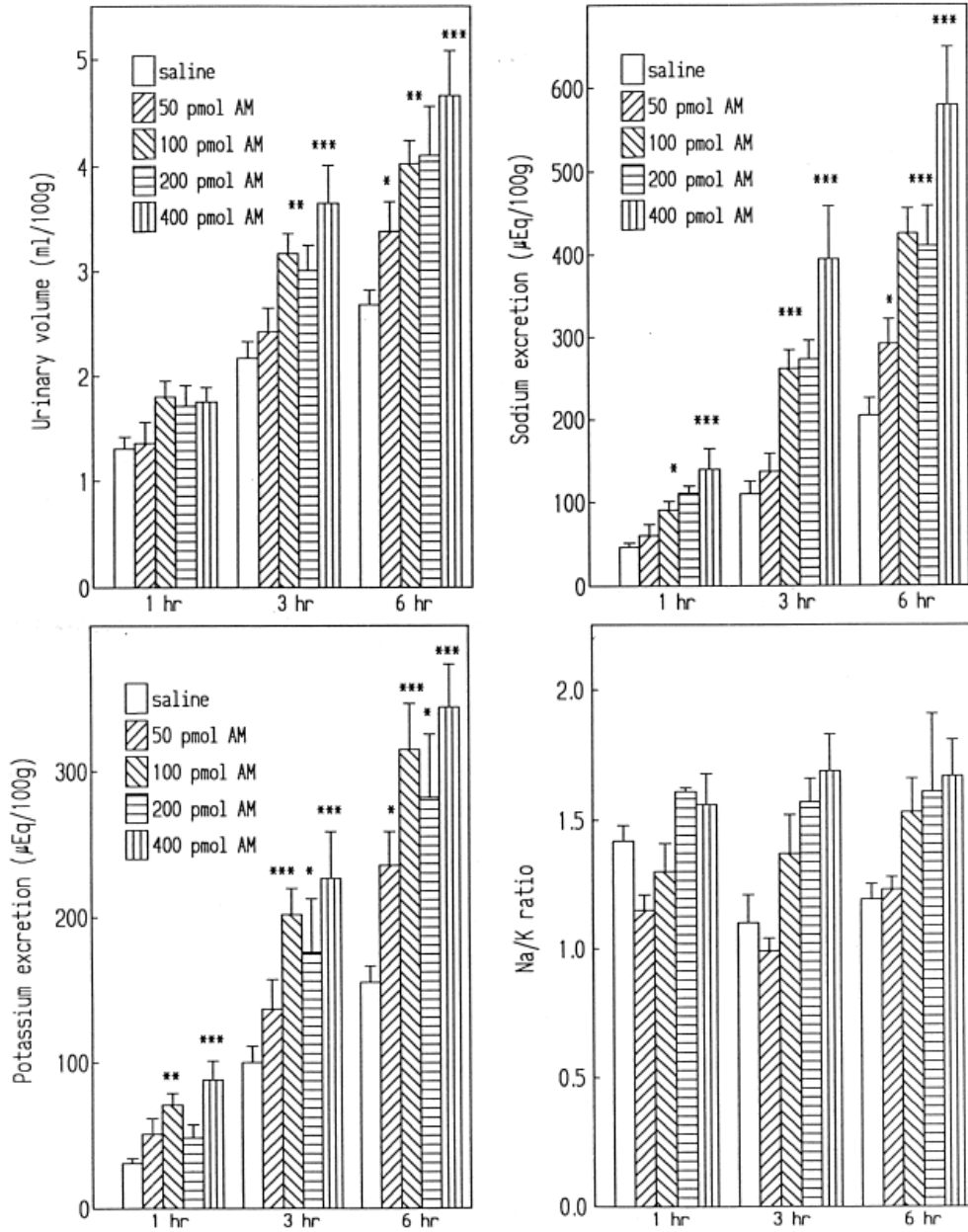


**Fig. 30.** Efecto de la administración central de la AM sobre la ingesta de sal inducida por hipovolemia isotónica. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  (vs. Control) (Samson y col., 1997).

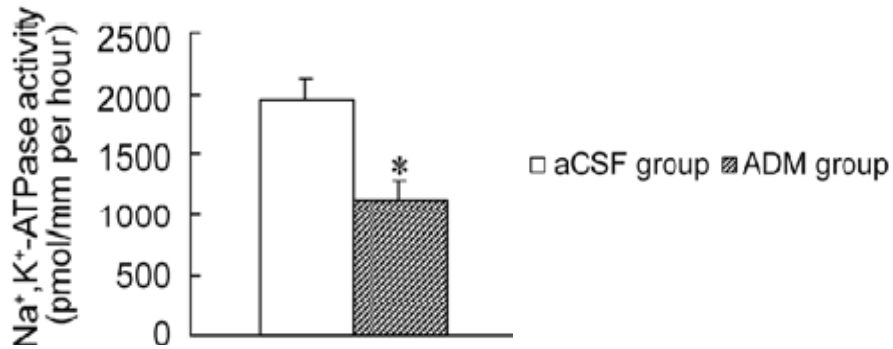
Asimismo, la administración central de AM es capaz de incrementar la excreción urinaria de agua, sodio y potasio de manera dependiente de la dosis en ratas hidratadas conscientes. Este efecto diurético y natriurético puede ser debido en parte a su capacidad de inhibir la actividad nerviosa simpática renal y/o a su capacidad de liberar polipéptidos natriuréticos. Se ha sugerido que el efecto diurético y natriurético observado después de la administración de AM en el órgano subfornical están asociados con la disminución de la actividad de la bomba  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPasa}$  en el túbulo proximal renal (Gao y col., 2009). De cualquier modo estos efectos sugieren que el sistema adrenomedulinérgico cerebral puede actuar como un factor paracrino / autocrino con el fin de defender al organismo contra estados de hipervolemia e hipernatremia (Figs. 31 al 33) (Israel y col., 2000; Díaz y col., 2001).



**Fig. 31.** Efecto renal inducido por la administración *icv* de AM o CGRP en ratas hidratadas conscientes. Los grupos de ratas fueron tratadas con AM o CGRP (100 pmol/ 5  $\mu$ L) o salina como ~~control~~ (5 $\mu$ L) seguido por agua p.o (20 mL/Kg). La orina fue recolectada a la 1, 3 y 6 h (n: 12 – 26/ grupo). Valores presentados como la media  $\pm$  error estándar de la media. \*p<0,01; \*\*p<0,001 comparado con el grupo control (Díaz y col., 2001).

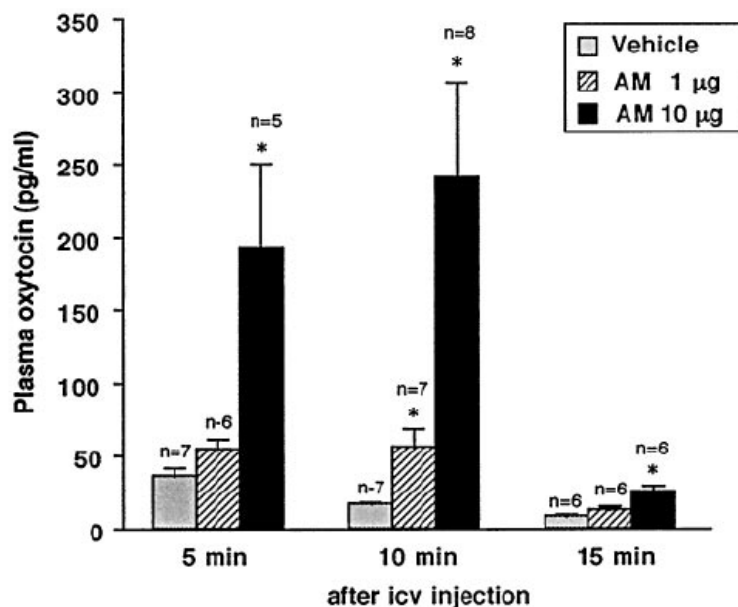


**Fig. 32.** Efecto de una simple inyección *icv* de AM sobre la excreción urinaria de agua, sodio y potasio en ratas conscientes hidratadas. Las ratas recibieron una inyección *icv* de salina o AM. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  comparado con el grupo control salina (Israel y col., 2000).



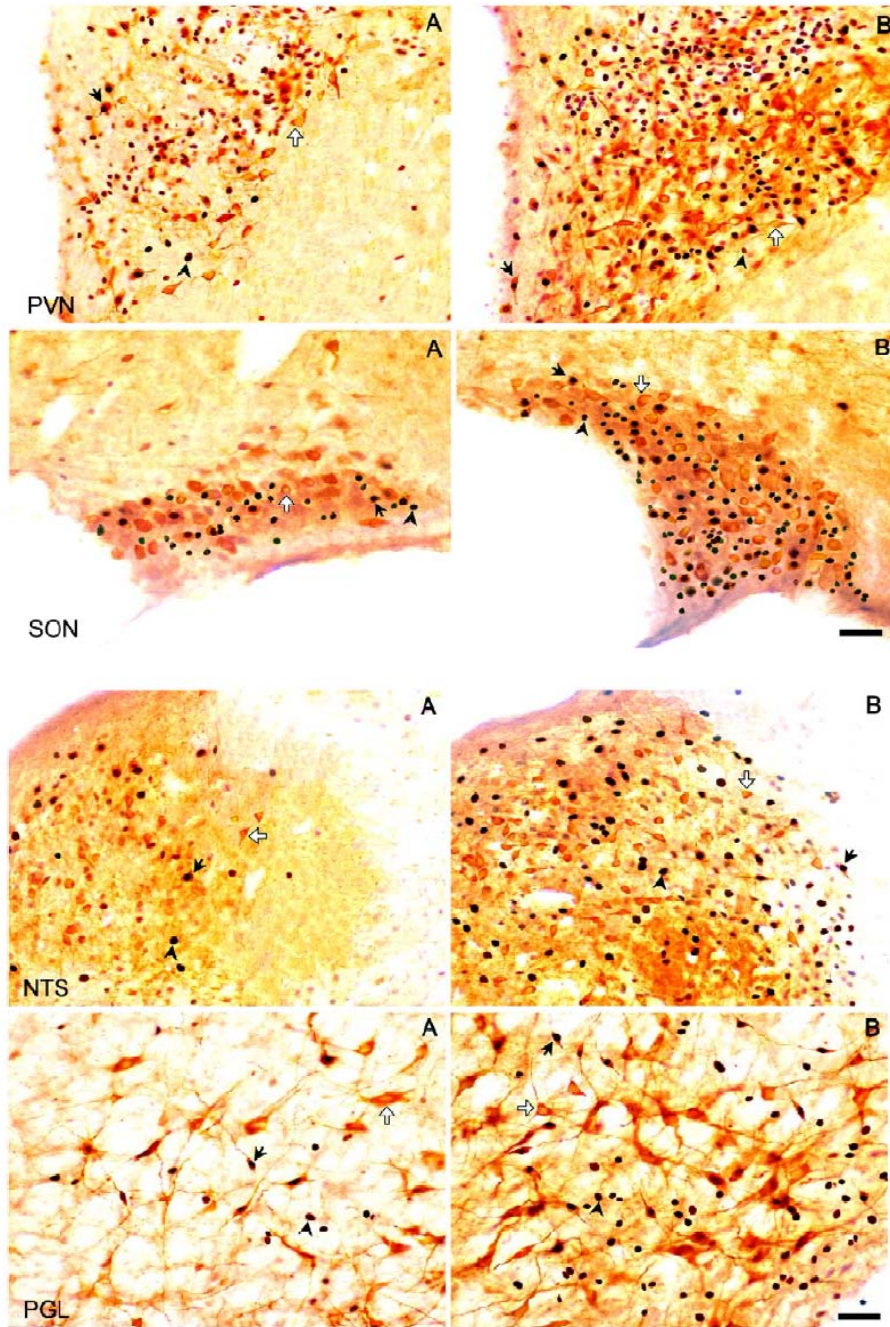
**Fig. 33.** Inhibición de la actividad de la Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup> ATPasa en el túbulo proximal renal tras la administración de AM en el órgano subfornical (n=6). aCSF: Líquido cefalorraquídeo. ADM: adrenomedulina (20 ng/μL; 0,1 μL). \*p<0,01 vs. grupo aCSF (Gao y col., 2009).

Por otra parte se ha demostrado que la administración *icv* de AM provoca una marcada inducción de la inmunopresión similar a Fos, (producto del gen *c-fos* usado para detectar actividad neuronal en el SNC) en regiones cerebrales de la rata que incluye el proencéfalo, hipotálamo (NSO, división magnocelular del PVN) y tallo cerebral (núcleo del tracto solitario (NTS), AP), lo cual podría estar relacionado con respuestas fisiológicas mediante la activación de la red neural en el hipotálamo y en el tallo cerebral; ya que células inmunoreactivas a Fos fueron detectadas en NSO y PVN después de la administración *icv* de AM; y la administración central de AM provoca secreción de oxitocina y activa a las células que secretan oxitocina (Fig. 34) (Serino y col., 1999; Ueta y col., 2001).



**Fig. 34.** Efecto de la administración *icv* de AM sobre los niveles plasmáticos de oxitocina en ratas. Datos expresados como media  $\pm$  error estándar. \* $p < 0,05$  vs. grupo tratado con vehículo (Serino y col., 1999).

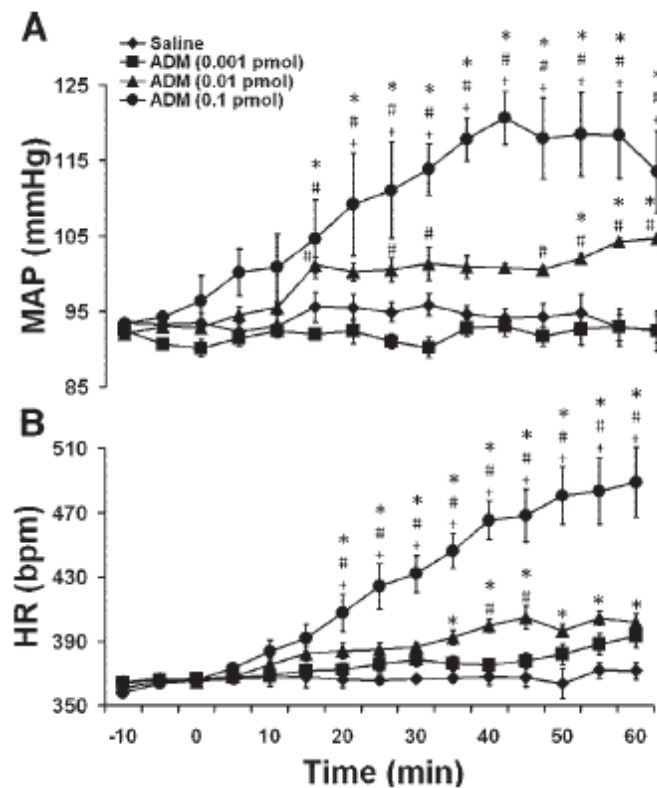
Por otra parte, la administración central de AM incrementa la expresión de *c-fos* en pro-encéfalo, hipotálamo y en tallo cerebral y activa neuronas productora de NO en el PVN, NSO, NTS y en el núcleo paragigantocelularis lateral (PGL) (Fig. 35). Los efectos de la AM sobre la producción de NO en el cerebro no son claros; sin embargo, existe evidencia que indica que el sistema NO en el cerebro puede activarse durante estados de desbalance homeostático como deshidratación, hipertensión y estrés; siendo una de las principales funciones del sistema NO central restablecer la homeostasis a través de la inhibición de la actividad simpática (Ji y col., 2004).



**Fig. 35.** Inmunoreactividad a c-fos y SON neuronal (SONn) en el PVN, NSO, NTS y PGL. A: Ratas controles (Vehículo *icv*). B: Ratas tratadas con AM (3 nmol/Kg *icv*). Punta de las flechas: Neuronas inmunomarcadas c-fos. Flechas blancas: Neuronas inmunomarcadas a SONn. Flechas negras: Neuronas inmunomarcadas a c-fos y SONn (Ji y col., 2004).

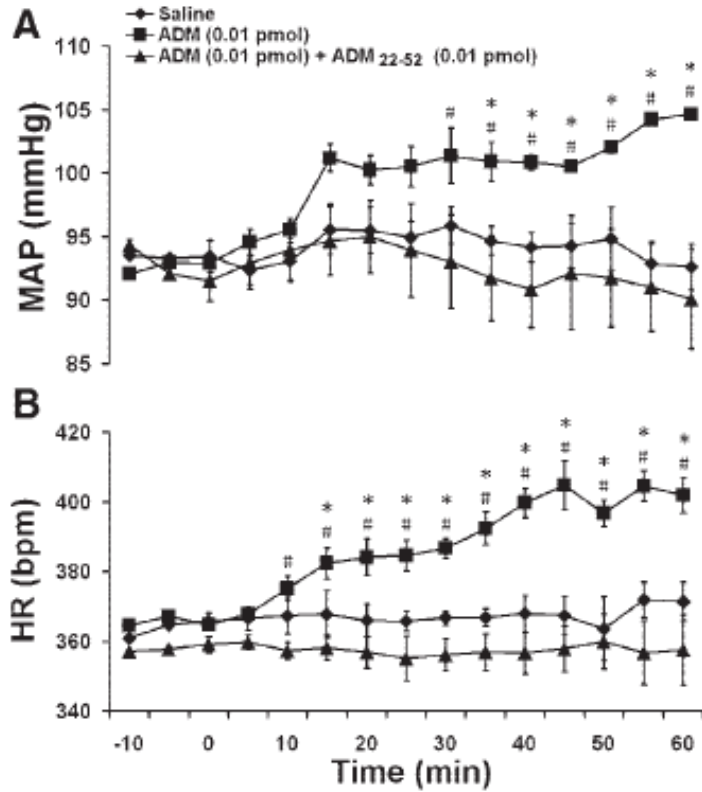


La evidencia indica que la AM está involucrada en la regulación de la presión arterial, tanto por mecanismo periféricos como centrales, ya que la administración intravenosa de la misma provoca una rápida y sostenida disminución de la presión arterial debida a la relajación de las células de músculo liso vascular. Por su parte, los efectos de la AM a nivel central son área específicos, pues la administración de AM *icv*, en el RVLM y en el AP ha demostrado incrementar la presión arterial (Figs. 36 al 38); observándose que las acciones de la AM a nivel de la RVLM son mediadas a través de receptores de AM; induciendo efectos vasopresores potenciando tanto la transmisión glutamatérgica como nitrérgica (Samson y col., 1998; Yang y col., 2003; Xu y col., 2004<sup>A</sup>).

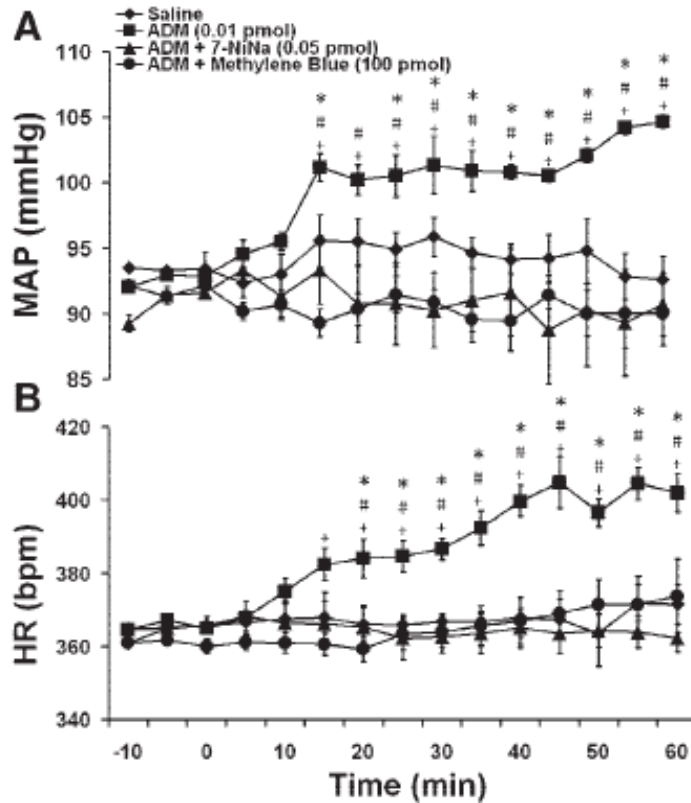


**Fig. 36.** Curso temporal de la presión arterial media (Panel A) y la frecuencia cardíaca (Panel B) en ratas tras administración unilateral de salina o AM en el RVLM. Tiempo 0 indica inicio de la administración. Valores presentados como la media  $\pm$  desviación estándar; n=6 para cada grupo. Bpm: latidos por minuto.

\* $p < 0,05$ , con respecto a salina. # $p < 0,001$  pmol ADM, o + 0,01 pmol de ADM (Xu y col., 2004<sup>A</sup>).



**Fig. 37.** Efecto de ADM<sub>22-52</sub> sobre el curso temporal de la presión arterial media (Panel A) y frecuencia cardíaca (Panel B) en ratas tras administración unilateral de salina o AM en el RVLM. Tiempo 0 indica inicio de la administración. Valores presentados como la media  $\pm$  desviación estándar; n=6 para cada grupo. Bpm: latidos por minuto. \* $p < 0,05$ , respecto a salina. #  $p < 0,01$  pmol ADM + 0,01 pmol ADM 22-52 (Xu y col., 2004<sup>A</sup>).



**Fig. 38.** Efecto de 7-NiNa sobre el curso temporal de la presión arterial media (Panel A) y frecuencia cardíaca (Panel B) en ratas tras administración unilateral de salina, AM, NiNa, azul de metileno en el RVLM. Tiempo 0 indica inicio de la administración. Valores presentados como la media  $\pm$  desviación estándar; n=6 para cada grupo. Bpm: latidos por minuto. 7-NiNa: 7-sal sódica de nitroindazol. \*p<0,05, respecto a salina. # p<0,01 pmol ADM + 0,05 pmol 7-NiNa, o + 0,01 pmol de ADM + 100 pmol azul de metileno (Xu y col., 2004<sup>A</sup>).

Es importante tener en cuenta que en un estudio realizado por Samson y col., (1998), se demostró que el efecto hipertensivo de la AM *icv* fue abolido con el bloqueo  $\alpha$ -adrenérgico (Samson y col., 1998).

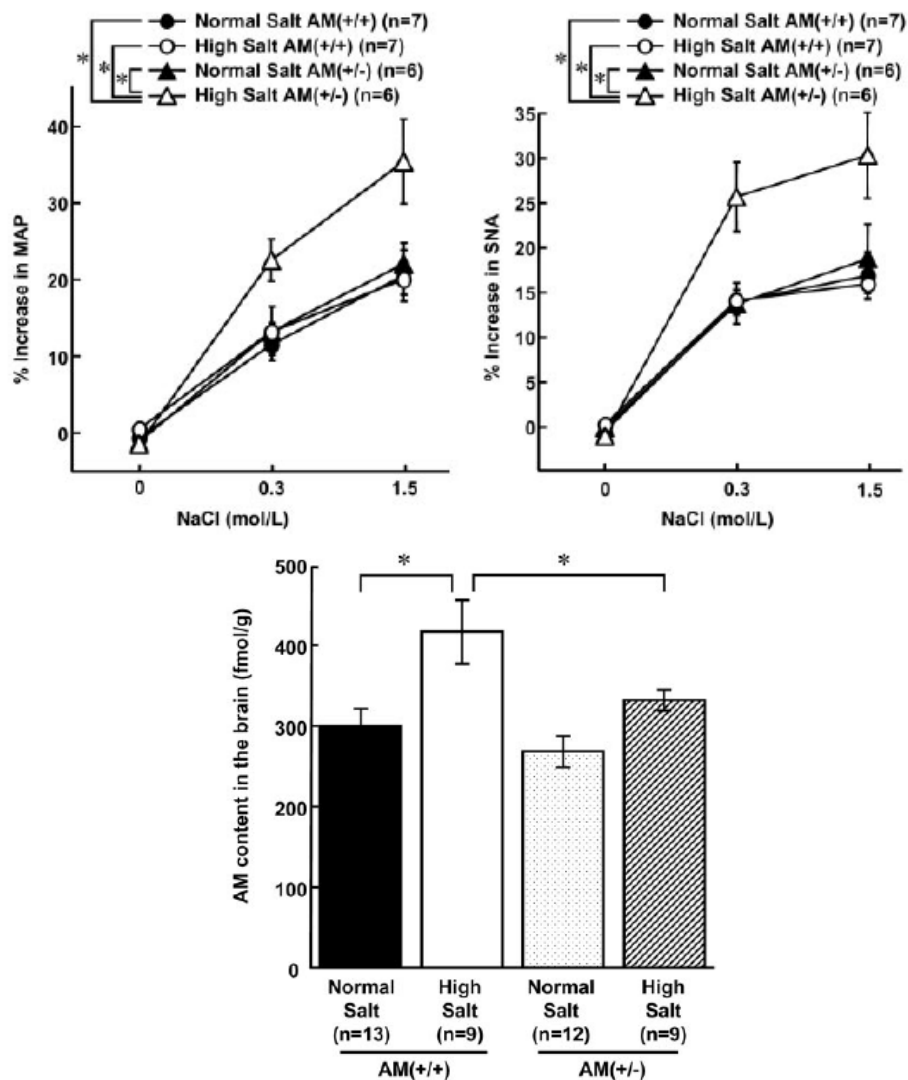
Por su parte, la administración de AM en el PVN del hipotálamo causa disminución de la presión arterial, el cual es mediado por NO y ácido gamma aminobutírico (GABA) (Xu y col., 2004<sup>B</sup>).

Diversos estudios se han enfocado en evaluar la acción de la AM del SNC sobre el sistema CDV. La actividad barorefleja constituye un reflejo central vital en el mantenimiento normal de la presión arterial media, no sólo mediante el control momento a momento de la presión arterial; también mediante el control a largo plazo de la presión arterial, ya que el daño crónico de la actividad barorefleja resulta en hipertensión neurogénica (Thrasher, 2002; Malpas, 2004). En este sentido, la AM ha demostrado participar en la regulación CDV mediante la modulación del baroreflejo, observándose que la administración *icv* de AM aumenta el control baroreflejo de la actividad nerviosa simpática renal (Saita y col., 1998; Matsumura y col., 1999); por su parte, la AM en el RVLM inhibe el control baroreflejo de la frecuencia cardíaca, a través de su interacción con receptores AM y mediante una vía de señalización asociada a PKA (Xu y col., 2006). Este efecto de la AM a este nivel, se cree es debido a la modulación ejercida por el péptido sobre el flujo simpático de este núcleo, pues la microinyección de altas concentraciones de AM en el RVLM induce incremento en la frecuencia cardíaca y presión arterial media, lo cual indica que la AM en el RVLM estimula neuronas que controlan la actividad simpática cardíaca (Xu y col., 2006).

En este sentido, el hecho de que la AM en el RVLM inhiba el control baroreflejo de la frecuencia cardíaca y que induzca efectos vasopresores, sugiere que la AM en el RVLM potencia la neurotransmisión adrenomedulinérgica dentro del RVLM, bien elevando la liberación de AM o incrementando la expresión de sus receptores; lo cual podría contribuir al desarrollo de hipertensión (Xu y col., 2006); ya que se ha demostrado en ratas hipertensas, que la expresión de receptores de AM en el tallo cerebral está incrementado con respecto a las normotensas (Li y col., 2004).

La AM endógena ha demostrado que juega un papel muy importante en el SNC para el control de la presión arterial, ya que en ratones homocigotos a la AM

(AM<sup>+/+</sup>) sometidos a una dieta alta en sal a las que se le administró una carga de solución salina hipertónica *icv*, se observó que la AM endógena cerebral inhibió la elevación de la presión arterial y la actividad simpática con respecto a su contraparte heterocigoto AM<sup>+/-</sup>; lo cual pudo ser debido a una inducción en la producción de AM cerebral en los ratones homocigotos (Fig. 39) (Fujita y col., 2005).



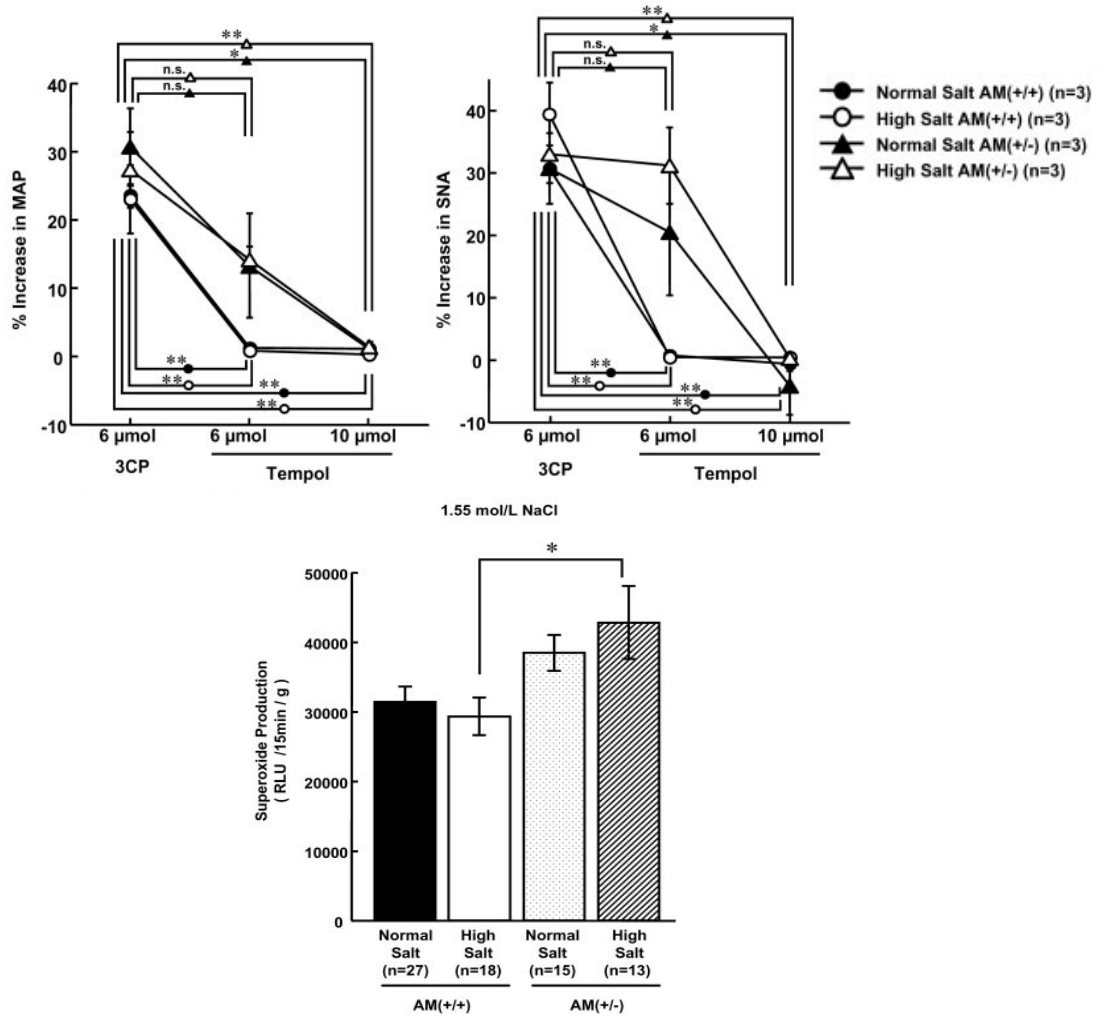
**Fig. 39.** Porcentaje de cambio de la presión arterial media (MAP) (Panel superior izquierdo) y de la actividad simpática (SNA) (Panel superior derecho) y

contenido de AM en cerebro (Panel inferior) de los cuatro grupos de ratones. \* $p < 0,05$  (Fujita y col., 2005).

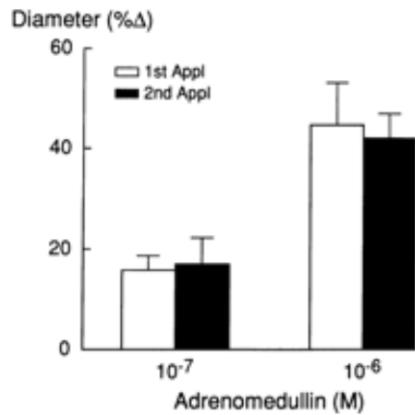
Sin embargo, el pretratamiento con tempol, un mimético de la SOD permeable a la membrana, logró revertir la elevación de la presión arterial y la activación simpática en el grupo de ratones  $AM^{+/-}$  con dieta alta en sal, lo cual sugiere que los radicales libres podrían estar involucrados en el efecto presor de la solución salina hipertónica *icv*; y que la AM endógena cerebral modula la regulación simpática de la presión arterial por medio de su efecto antioxidante; ya que el estrés oxidativo podría incrementar la producción de AM cerebral en ratones homocigotos, y a su vez la AM generada en el cerebro podría contrarrestar la estimulación de la actividad simpática inducida por la solución salina hipertónica, posiblemente a través de la capacidad de inhibir la producción de EROs (Fig. 40) (Fujita y col., 2005).

Por lo tanto, la AM también ha demostrado ser un poderoso antioxidante a nivel central, ya que este péptido se puede comportar como un regulador negativo para compensar la sobreproducción de EROs (Fujita y col., 2005).

Finalmente, se ha demostrado que la AM provoca una importante dilatación de las arteriolas cerebrales *in vivo*; siendo dicha respuesta dependiente de la activación de canales de  $K^+$  (Fig. 41) (Lang y col., 1997).



**Fig. 40.** Porcentaje de cambio de la presión arterial media (MAP) (Panel superior izquierdo) y de la actividad simpática (SNA) (Panel superior derecho) en respuesta a la administración *icv* de solución salina hipertónica y pretratamiento con 3CP (3-carbamoil-2,2,5,5-tetrametil-3-pirolina-N-oxil) o tempol en cerebro. Producción de anión superóxido en hipotálamo inmerso en solución salina hiperosmótica (1,55 M NaCl) de los cuatro grupos de ratones. \* $p < 0,05$ . \*\* $p < 0,01$  (Fujita y col., 2005).



**Fig. 41.** Respuesta dilatadora de las arteriolas cerebrales a dos aplicaciones tópicas de AM (Appl). El diámetro arteriolar basal fue de  $46 \pm 1 \mu\text{m}$ . Valores presentados como la media  $\pm$  ESM.  $n=5$  ratas (Lang y col., 1997).

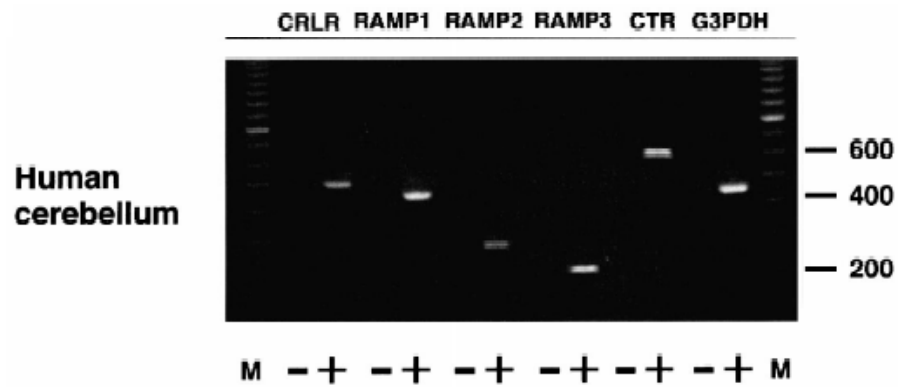
En vista de la existencia de la evidencia presentada que indica la presencia de AM y sus receptores en el cerebro, y del papel que juega en el procesamiento de información asociada a la regulación de los fluidos corporales y en la regulación de la presión arterial; se sugiere la existencia de un sistema adrenomedulinérgico a nivel central de importancia fisiológica.

### 1.7. La Adrenomedulina y el Cerebelo

A nivel del cerebelo, pocos han sido los estudios que se han llevado a cabo con la AM. La gran mayoría de estos trabajos de investigación se centran en la localización de la AM y de los componentes de sus receptores a nivel del cerebelo. En este sentido, diferentes estudios en animales de experimentación han demostrado la presencia de sitios de unión a la AM e inmunoreactividad a la AM en cerebelo de ratas normotensas (Sakata y col., 1994; Owji y col., 1995; Sone y col., 1997; Serrano y col., 2000; Serrano y col., 2003), así como la



expresión del CRLR, RAMP2 y RAMP3 a este nivel (Fig. 42) (Chakravarty y col., 2000; Uezono y col., 2001).

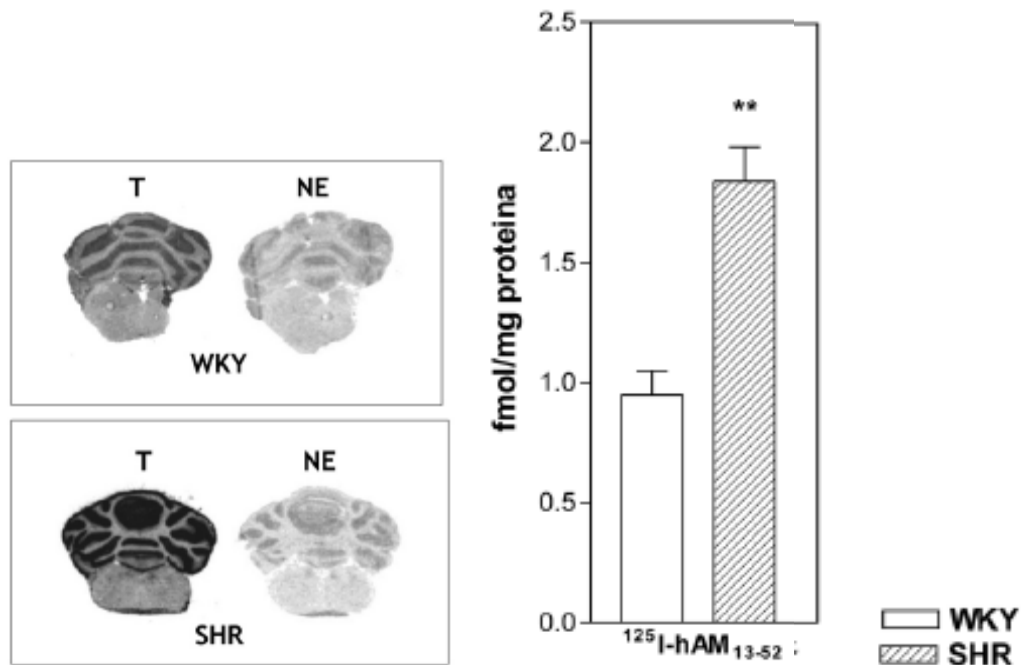


**Fig. 42.** RT-PCR de ARNm para CRLR, CTR y RAMPs en cerebelo humano. El ARNm fue transcrito (+) o no (-) y luego amplificado por PCR. Los productos amplificados fueron corridos por electroforesis y visualizados. M: Marcador DNA (Uezono y col., 2001).

En el cerebelo, la inmunoreactividad a la AM se ha apreciado en los núcleos lateral, interpósito y medial cerebelar; así como en las capas molecular, de las células de Purkinje y en la granular de la corteza cerebelar (Serrano y col., 2000). Esta última contiene dos tipos de estructuras neuronales inmunoreactivas, las terminales de las fibras de musgosas y las células de Golgi. Por su parte, en las células de Purkinje se demuestra además colocalización de la AM con el Factor H (Serrano y col., 2003).

La presencia del sistema AM cerebelar, sugiere un posible papel de este péptido a este nivel. Sin embargo muy pocos han sido los estudios sobre la AM en el cerebelo de ratas hipertensas. En un estudio realizado en el año 2007, Pastorello y col., demostraron, por primera vez, la existencia de diferencias en la expresión de los receptores de AM a nivel del cerebelo en ratas hipertensas y

normotensas; observándose un incremento en la concentración de los receptores para AM en el cerebelo en un modelo de hipertensión arterial como lo son las ratas SHR, al compararlas con las ratas normotensas WKY (Fig. 43). Este incremento en la densidad de los receptores de AM en el cerebelo de las ratas SHR sugiere que la AM podría estar participando en el mantenimiento de la hipertensión genética. Estos hallazgos soportan la hipótesis de un papel funcional, no descrito hasta ahora, para los receptores de AM en el cerebelo, cuyo incremento en la hipertensión podría representar un mecanismo de regulación hacia arriba de los receptores para compensar el incremento de la presión arterial de las ratas SHR; o alternatively constituir la modificación primaria cuya consecuencia secundaria resultaría en una alteración de los mecanismos de regulación autonómica que ocurren en el cerebelo y que traería como consecuencia un incremento de la presión arterial (Pastorello y col., 2007).

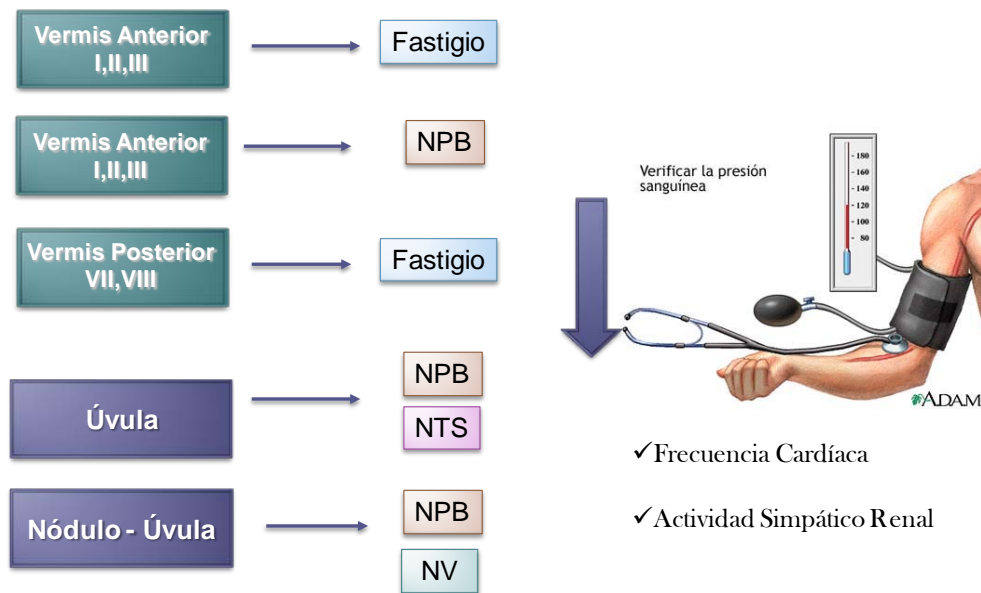


**Fig. 43.** Unión del  $^{125}\text{I}$ -hAM13-52 al cerebelo de rata. Se muestran secciones coronales del cerebelo de ratas controles (WKY) y espontáneamente hipertensas (SHR). Unión: T: Total, NE: No específica (Pastorello y col., 2007).

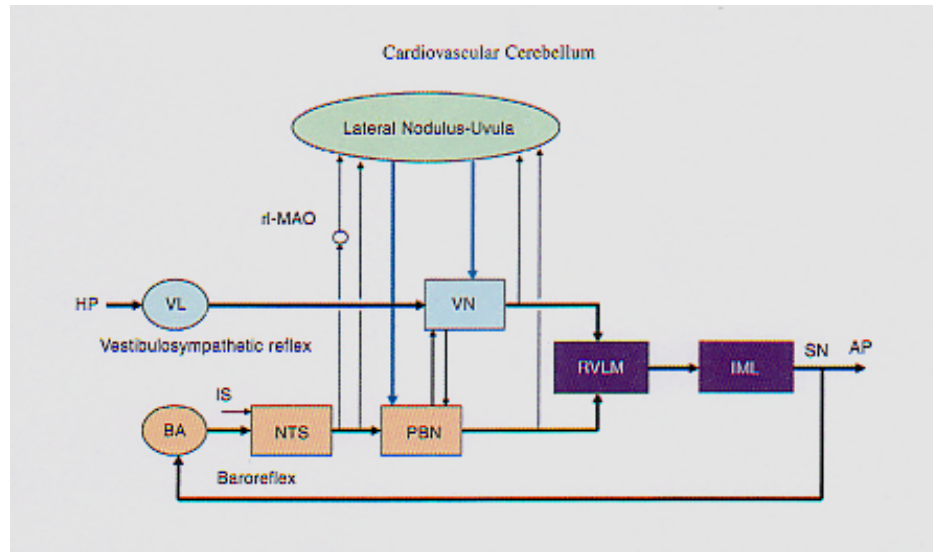
Los mecanismos fisiológicos involucrados en las acciones de la AM en el cerebelo aún no han sido esclarecidos y podrían ser múltiples y complejos. Más aún, hay poca información acerca del papel del cerebelo en la regulación CDV. Sin embargo, existe alguna evidencia proveniente de modelos animales y humanos que demuestra que el sistema vestibular y sus conexiones cerebelosas contribuyen al control CDV durante el movimiento y la alteración de la postura (Cui y col., 1997). Varias regiones del cerebro que participan en el control CDV reciben señales nerviosas desde el cerebelo específicamente desde el núcleo fastigio (NF) y la corteza cerebelosa posterior (Dormer, 1984; Bradley y col., 1987<sup>A, B</sup>; Bradley y col., 1991). Aún más, evidencias anatómicas apoyan el papel del NF en la función CDV. En efecto, en el cerebelo se han identificado diversos módulos CDV, como el NF, vermis anterior, vermis posterior, úvula (lóbulo IX), nódulo (lóbulo X); pues la estimulación de estas estructuras conlleva cambios en la presión arterial, frecuencia respiratoria y resistencia vascular (Nisimaru, 2004).

Por lo tanto, diferentes evidencias han señalado que el cerebelo cumple un papel muy importante en la regulación CDV, ya que la estimulación eléctrica de diversas zonas cerebelosas conlleva cambios en la presión arterial y frecuencia cardíaca (Nisimaru, 2004; Rector y col., 2006; Tandon y col., 2006). Pues, la estimulación eléctrica de la corteza cerebelar posterior a nivel del lóbulo IX del vermis cerebelar, en conejos anestesiados ha demostrado provocar bradicardia, caída de la presión arterial e inhibición transitoria de la actividad simpática renal (Bradley y col., 1987<sup>A</sup>); de igual manera, Rocha y col., (2008) encontraron que la estimulación del lóbulo IX del vermis cerebeloso de conejos provocó hipotensión y bradicardia. Por su parte, la estimulación eléctrica de la porción rostral del NF en conejos anestesiados provocó una respuesta presora (Bradley y col., 1987<sup>B</sup>). Estos hallazgos constituyen evidencias clara del papel del cerebelo, específicamente el vermis cerebelar en la regulación de la presión arterial.

Por otra parte, se ha descrito la existencia de cinco módulos CDV a nivel del cerebelo (Fig. 44) dedicados al control CDV. El primero está formado por el NF y el vermis anterior, específicamente los lóbulos I, II y III, este módulo controla el baroreflejo. El segundo, está constituido por el vermis anterior que forma un complejo con el núcleo parabraquial. El tercero, está formado por la porción caudal del NF y la porción posterior del vermis (lóbulos VII y VIII), el cual controla el reflejo vestibulo simpático. El cuarto complejo, incluye la porción medial de la úvula con el NTS y el núcleo parabraquial. El quinto módulo está formado por el nódulo y la úvula con el núcleo parabraquial y el núcleo vestibular, el cual forma un microcomplejo CDV que controla la presión arterial y la actividad nerviosa simpática durante los cambios de la posición de la cabeza y los cambios de postura (Fig. 45) (Nisimaru, 2004).



**Fig. 44.** Módulos CDV en el cerebelo. NPB: Núcleo Parabraquial. NTS: Núcleo del tracto solitario. NV: Núcleo vestibular.



**Fig. 45.** Diagrama esquemático del sistema de control CDV en el núcleo – úvula. Se ilustra la relación entre el núcleo – úvula lateral y el reflejo vestibulosimpático y el baroreflejo. HP: posición de la cabeza. VL: Laberinto. BA: Baroreceptor. IS: Señal que ajusta los niveles de presión arterial. SN: Nervio simpático. AP: Presión arterial. Las líneas azules indican las proyecciones de las células de Purkinje (Nisimaru, 2004).

Por otra parte, diversos estudios en diferentes especies animales han demostrado que la estimulación eléctrica del NF produce una pronunciada respuesta presora, la cual puede deberse a las conexiones de este núcleo con otros importantes y reconocidos módulos CDV; pues se ha establecido que neuronas en la porción rostral del NF proyectan al NTS, núcleo parabraquial, por lo que por medio de estas proyecciones la porción rostral del NF puede intervenir en el control CDV y en el reflejo baroreceptor (Bradley y col., 1987<sup>A,B</sup>; Nisimaru, 2004). Por su parte, los otros núcleos cerebelares, interpósito y lateral, fallan en inducir cambios evidentes en la presión arterial y frecuencia cardíaca (Nisimaru, 2004).

Por su parte, se ha establecido que la estimulación del vermis anterior (Lóbulos I, II y III), vermis posterior (Lóbulos VII y VIII) y úvula (Lóbulo IX) provoca respuesta depresora e inhibición de la actividad nerviosa simpática (Nisimaru, 2004; Rocha y col., 2008; Baumel y col., 2009).

Aunque la distribución de los sitios de unión de la AM en el SNC ha sido bien documentada, su presencia en el cerebelo así como los mecanismos de señales de transducción de los receptores de este péptido en el mismo no han sido clarificados y se conoce todavía menos de los segundos mensajeros intracelulares relacionados con sus acciones biológicas. Al respecto, además de la localización cerebelar de la AM en ratas normotensas, recientemente se ha demostrado la activación de vías de señalización de la AM en el cerebelo. En este sentido, la presencia de actividad de la SON en el cerebelo, en elementos celulares que presentan receptores para la AM, indica un posible papel de la misma en la regulación de la función celular mediante la posible generación de NO/GMPc, como mediadores de los efectos de dicho péptido. Los resultados reportados por Pastorello y col., (2007) en los que demuestran un incremento de la actividad SON inducida por la AM en el cerebelo de rata apuntan a esta posibilidad. Aun más, el hecho que el antagonista selectivo de dicho receptor, el AM22-52, bloqueó la activación de la SON inducida por la AM, permite inferir que la producción de NO inducida por la AM en el cerebelo ocurre mediante la estimulación de su receptor específico.

Existe evidencia de la participación de las cascadas de las quinasas (ERK) en el cerebelo y su alteración durante la hipertensión, ya que se ha reportado un incremento de la activación de las ERK en las ratas hipertensas SHR, al compararlas con la normotensas WKY, indicando que en las ratas hipertensas hay mayor fosforilación de las ERK (Pastorello y col., 2007). Las ERK1/2 son miembros importantes de una cascada intracelular implicada en muchos

aspectos de la fisiología celular y en el desarrollo de neuronas y glías. Las ERK1/2 y su ARNm se expresan en numerosas regiones del SNC entre las cuales se incluye el cerebelo (Davis, 1993; Thomas y Hunt, 1993), sin embargo, su papel en la función CDV del cerebelo es totalmente desconocido. Se ha postulado que en el cerebelo adulto la señalización de ERK podría mediar el procesamiento de información postsináptica (Zsarnovzky y Belcher, 2004). Estudios inmunohistoquímicos usando anticuerpos específicos contra la ERK1/2-activada (pERK) permitieron demostrar la pERK-IR se encuentra confinada a la capa de las células Purkinje (Zsarnovzky y Belcher, 2004) en donde también se ha demostrado la presencia de una alta actividad de PKG (Endo y Launey, 2003).

En conclusión, la evidencia indica que los receptores de AM se encuentran ampliamente distribuidos en el cerebelo de la rata y su concentración se encuentra alterada en la rata hipertensa SHR. La estimulación del receptor de AM en el cerebelo de la rata desencadena una vía de señalización acoplada a la producción de NO. De igual forma, el cerebelo de la rata expresa ERKs y la forma fosforilada (activa), la cual está alterada en la hipertensión. Estos hallazgos permiten inferir un papel funcional de la AM cerebelosa en la regulación CDV que no se ha descrito hasta el presente y cuya caracterización constituye el objetivo principal del presente trabajo, pudiendo constituir esta la primera evidencia de un papel de algún péptido y del cerebelo en la regulación de la presión arterial.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo General**

Evaluar el posible papel de la adrenomedulina (AM) cerebelosa en la regulación de la presión arterial.

### **2.2. Objetivos Específicos:**

#### **Experimentos *In Vitro***

**2.2.1.** Evaluar la expresión de la AM y de los componentes de sus receptores (las RAMPs y CRLR) en el vermis del cerebelo de ratas espontáneamente hipertensas (SHR) y controles normotensos Wistar Kyoto (WKY) jóvenes (8 semanas) y adultas (16 semanas).

**2.2.2.** Caracterizar las posibles vías de señalización de la AM en el vermis cerebeloso:

**2.2.2.1.** Evaluar el efecto de la AM sobre la actividad de las enzimas antioxidantes, superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx) en ratas Sprague-Dawley, WKY y SHR.

**2.2.2.2.** Evaluar el posible antagonismo entre la AM y la ANG II sobre la actividad de las enzimas antioxidantes SOD, CAT y GPx en el vermis del cerebelo de ratas Sprague-Dawley, WKY y SHR.

**2.2.2.3.** Evaluar el posible papel de la NAD(P)H oxidasa, PKA y PKC en la acción de la AM y la ANG II sobre la actividad de las enzimas antioxidantes, SOD, CAT y GPx en el vermis del cerebelo de ratas Sprague-Dawley.



- 2.2.2.4.** Evaluar el efecto de la AM sobre la producción de fosfatidilinositol, AMPc, GMPc y la producción de NO y la activación mediante fosforilación de la ERK en el vermis del cerebelo de ratas WKY y SHR.
  - 2.2.2.5.** Evaluar el efecto de la AM y ANG II sobre la peroxidación lipídica en ratas Sprague-Dawley, WKY y SHR.
  - 2.2.2.6.** Determinar los subtipos de receptores de la AM que median la acción de la AM sobre la peroxidación lipídica en el vermis del cerebelo de ratas Sprague-Dawley, empleando el antagonista del receptor de AM, la AM22-52 y del receptor CGRP, el CGRP8-37.
  - 2.2.2.7.** Determinar los subtipos de receptores de la AM que median la acción de la AM sobre la actividad de las enzimas antioxidantes, SOD, CAT y GPx en el vermis del cerebelo de ratas Sprague-Dawley, empleando el antagonista del receptor de AM, la AM22-52 y del receptor CGRP, el CGRP8-37.
  - 2.2.2.8.** Determinar los subtipos de receptores de la AM involucrados en la activación de las vías de señalización fosfatidilinositol, AMPc, GMPc y la producción de NO y ERK en el vermis del cerebelo de ratas Sprague-Dawley, empleando el antagonista del receptor de AM, la AM22-52 y del receptor CGRP, el CGRP8-37.
- 
- 2.2.3.** Evaluar el efecto de la administración oral crónica (11 días) de un bloqueante del receptor AT<sub>1</sub> sobre la expresión de CRLR, RAMPs y AM en el vermis cerebeloso en ratas WKY y SHR.
  - 2.2.4.** Evaluar el efecto de la administración oral crónica (11 días) de un bloqueante del receptor AT<sub>1</sub> sobre la acción de la AM y ANG II sobre la

actividad de enzimas antioxidantes SOD, CAT y GPx en el vermis cerebeloso en ratas WKY y SHR.

- 2.2.5.** Evaluar el efecto de la administración oral crónica (11 días) de un bloqueante de los canales de calcio sobre la acción de la AM y ANG II sobre la actividad de enzimas antioxidantes SOD, CAT y GPx en el vermis cerebeloso en ratas WKY y SHR

### **Experimentos *In Vivo***

- 2.2.6.** Evaluar el efecto de la administración *in situ* de AM en el vermis del cerebelo sobre la presión arterial en ratas Sprague-Dawley, WKY y SHR *in vivo*.
- 2.2.7.** Evaluar el efecto de la administración *in situ* de ANG II en el vermis del cerebelo sobre la presión arterial en ratas Sprague-Dawley, WKY y SHR *in vivo*.
- 2.2.8.** Evaluar el efecto de la administración *in situ* de AM o ANG II en un área localizada fuera del vermis cerebeloso sobre la presión arterial en ratas Sprague-Dawley, WKY y SHR *in vivo*.
- 2.2.9.** Evaluar el efecto de la administración *in situ* de AM en el vermis del cerebelo sobre la respuesta presora inducida por el estímulo eléctrico plantar (EEP) en ratas Sprague-Dawley, WKY y SHR *in vivo*.
- 2.2.10.** Evaluar el efecto de la administración *in situ* de ANG II en el vermis del cerebelo sobre la respuesta presora inducida por el estímulo eléctrico plantar (EEP) en ratas SHR *in vivo*.

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. Animales de Experimentación**

Se emplearon ratas macho SHR y sus controles normotensos WKY de 8 y 16 semanas de edad, y ratas macho Sprague-Dawley de 250 g, provenientes de los Bioterios del Instituto Nacional de Higiene Dr. Rafael Rangel y del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC). Los animales fueron mantenidos en jaulas a temperatura ambiente ( $25 \pm 1$  °C) con ciclos de 12 horas luz / oscuridad. La dieta de los animales consistió en Ratarina® y agua *ad libitum*. 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. Las ratas se sacrificaron por decapitación, los cerebros fueron extraídos y el vermis del cerebelo se disecó mediante microdissección bajo control estereomicroscópico y mantenido en Buffer Krebs-Ringer (KBR).

#### **3.2. Drogas**

AM rata (American Peptide, Company Inc), AM22-52 y CGRP8-37 como antagonistas de los receptores de AM y CGRP respectivamente (American Peptide, Company Inc), apocinina, chelerritrina y PKI-(6-22)-amide como inhibidores de la NAD(P)H oxidasa, PKC y PKA, respectivamente (Sigma-Aldrich, USA). ANG II (American Peptide, Company Inc), valsartán como antagonista AT1, amlodipina como antagonista de los canales de calcio.

#### **3.3. Diseño Experimental**

Ratas macho de la cepa SHR y WKY, jóvenes (8 semanas) y adultos (16 semanas) fueron sacrificados. Su cerebro extraído y el vermis cerebeloso disecado para la determinación de la expresión de la AM, CRLR, RAMP1, RAMP2 y RAMP3 por Western Blot (Sección 3.3.7.).

De igual manera, el vermis cerebeloso de las ratas WKY y SHR de 16 semanas (adultos) fueron empleados para evaluar el posible efecto antagonista *in vitro* entre la AM y la ANG II sobre la actividad de las enzimas antioxidantes (Sección 3.3.3.).

Por otra parte, el vermis cerebeloso de ratas WKY, SHR de 16 semanas (adultos) fueron empleados para evaluar el efecto de la AM sobre la producción de TBARS. De igual manera, el vermis cerebeloso de ratas Sprague-Dawley fueron empleados para evaluar el posible efecto de la AM y la ANG II sobre la producción de TBARS (Sección 3.3.4.).

Asimismo, el vermis cerebeloso de ratas Sprague-Dawley fueron empleados para los ensayos de incubación *in vitro* con AM y ANG II en presencia y/o ausencia de los inhibidores de la NAD(P)H oxidasa, PKC y PKA (Sección 3.3.1.) para la determinación de la actividad de las enzimas antioxidantes (Sección 3.3.3.).

De igual manera, el vermis cerebeloso de ratas Sprague-Dawley fueron empleados para los ensayos de incubación *in vitro* con AM en presencia y/o ausencia de los de los antagonistas de sus receptores, AM22-52 y CGRP8-37, para la determinación de la actividad de las enzimas antioxidantes (Sección 3.3.3.) y la producción de TBARS (Sección 3.3.4.).

Por otro lado, el vermis de cerebelo de ratas WKY y SHR adultas se emplearon para evaluar el efecto de la administración *in vivo* de valsartán y amlodipina sobre la actividad de las enzimas antioxidantes (Sección 3.3.3) y sobre la expresión de AM, CRLR, RAMP1, RAMP2 y RAMP3 (sólo tras la administración de valsartán. Sección 3.3.7.).

El vermis cerebeloso de ratas Sprague-Dawley, SHR y WKY fueron empleados para los ensayos de incubación *in vitro* con AM (Sección 3.3.1.) para la determinación de la activación de las vías de señalización (Sección 3.3.2.).

Asimismo, el vermis cerebeloso de ratas Sprague-Dawley fueron empleados para los ensayos de incubación *in vitro* con AM en presencia y/o ausencia de los antagonistas de sus receptores, AM22-52 y CGRP8-37 (Sección 3.3.1) para la determinación de la activación de las vías de señalización (Sección 3.3.2.).

Por otra parte, se emplearon ratas Sprague-Dawley, WKY y SHR adultas para evaluar el efecto de la administración *in situ* de AM y ANG II en el vermis cerebeloso (Sección 3.3.6.1).

### **3.3.1. Protocolo de Incubación *In Vitro***

Los vermis de los cerebelos de las ratas fueron extraídos mediante microdissección bajo control estereomicroscópico y mantenidos en frío en KBR burbujeado con 95% O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub>. Posteriormente cada muestra fue preincubada a 37°C en presencia o ausencia de los antagonistas o inhibidores y posterior estimulación con agonista. Seguidamente, las muestras fueron retiradas del baño a 37°C, se retiró el medio de incubación, y se lavó el tejido dos veces con buffer fosfato pH 7,0, y se colocó en hielo. Posteriormente, se añadieron 300 µL de buffer de lisis, se sonicó y centrifugó la preparación para obtener el homogeneizado del vermis del cerebelo.

El protocolo de estimulación *in vitro* se llevó a cabo previamente para la determinación posterior de las vías de señalización y la actividad de las enzimas antioxidantes.

### **3.3.2. Ensayos para la Determinación de las Vías de Señalización**

#### **3.3.2.1. Ensayo de la Guanilil Ciclasa**

El vermis del cerebelo fue extraído mediante microdissección bajo control estereomicroscópico y mantenido en KBR (conteniendo en mM: NaCl 125; KCl 3,5;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,25;  $\text{MgSO}_4$  1,20;  $\text{CaCl}_2$  0,75;  $\text{NaHCO}_3$  25; glucosa 10 y teofilina 1,6) burbujeado con 95%  $\text{O}_2$  : 5%  $\text{CO}_2$ .

Para el ensayo de la activación de la GC cada vermis del cerebelo fue transferido individualmente a tubos Eppendorf de 1,5 mL conteniendo 180  $\mu\text{L}$  de buffer KBR, sometiéndose a preincubación durante 10 minutos a 37°C, en presencia o ausencia de los correspondientes antagonistas. La reacción se inició con el agregado de los agonistas (20  $\mu\text{L}$ ), o buffer para los controles, al medio de incubación seguidos de 10 minutos adicionales de incubación. La reacción se detuvo agregando 20  $\mu\text{L}$  EDTA (166 mM, pH 7,5) y calentando a 90 °C durante 3 min. Las muestras fueron mantenidas en hielo y posteriormente homogeneizadas mediante sonicación. Las muestras fueron congeladas a -20°C para la posterior determinación del GMPc.

##### **3.3.2.1.1. Determinación del GMPc.**

Se tomó una alícuota de 100  $\mu\text{L}$  para la determinación del GMPc. El contenido de GMPc se cuantificó por radioinmunoensayo (RIA) por el método descrito por Steiner y col., (1972), utilizando un kit comercial (Amersham<sup>®</sup> International plc, UK). El ensayo se fundamenta en la competencia entre el GMPc no radioactivo (muestra) y una cantidad fija del compuesto marcado, por la unión a un anticuerpo que posee alta especificidad y afinidad por el GMPc. La cantidad de GMPc radioactivo unido al anticuerpo está relacionada inversamente con la concentración de GMPc presente en la muestra.

Para el ensayo, las muestras a una dilución 1 :25 en solución buffer Tris/EDTA (50 mM Tris/HCl, 4 mM EDTA, pH 7.5) fueron incubadas en hielo con 50  $\mu$ L de  $^3\text{H}$ -GMPc y 50  $\mu$ L de anticuerpo específico para GMPc durante 90 minutos (volumen final : 200  $\mu$ L). Se separó el GMPc unido al anticuerpo por precipitación con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y posterior centrifugación (12000 r.p.m/5 min a 4°C). Se descartó el sobrenadante y los precipitados fueron reconstituidos con agua destilada. La radioactividad se cuantificó mediante espectrometría de centelleo líquido (Packard® Tricarb 2700TR).

La cantidad de GMPc se calculó utilizando una curva estándar (rango de 0 a 4 pmol/tubo). La actividad GC se reportó como pmoles de GMPc formados/10 min/mg de proteínas.

### **3.3.2.2. Ensayo de la Adenilil Ciclasa**

El vermis del cerebelo fue extraído mediante microdisección bajo control estereomicroscópico y mantenido en KBR (conteniendo en mM: NaCl 125; KCl 3,5;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,25;  $\text{MgSO}_4$  1,20;  $\text{CaCl}_2$  0,75;  $\text{NaHCO}_3$  25; glucosa 10 y teofilina 1,6) burbujeado con 95%  $\text{O}_2$  : 5%  $\text{CO}_2$ .

Para el ensayo de la activación de la AC cada vermis del cerebelo fue transferido individualmente a tubos Eppendorf de 1,5 mL conteniendo 180  $\mu$ L de buffer KBR, sometiéndose a preincubación durante 10 minutos a 37°C, en presencia o ausencia de los correspondientes antagonistas. La reacción se inició con el agregado de los agonistas (20  $\mu$ L), o buffer para los controles, al medio de incubación seguidos de 10 minutos adicionales de incubación. La reacción se detuvo agregando 20  $\mu$ L EDTA (166 mM, pH 7,5) y calentando a 90 °C durante 3 min. Las muestras fueron mantenidas en hielo y posteriormente homogeneizadas mediante sonicación. Las muestras fueron congeladas a -20°C para la posterior determinación del AMPc.

### **3.3.2.2.1. Determinación del AMPc.**

Se tomó una alícuota de 50  $\mu$ L para la determinación del AMPc. El contenido de AMPc se cuantificó por ensayo inmunoenzimático (ELISA), utilizando un kit comercial (Arbor Assay, USA). Para ello, se incubó 50  $\mu$ L de muestra en una placa de 96 pozos cubierta con un anticuerpo para captura. Posteriormente se agregó un conjugado AMPc – peroxidasa. La reacción de unión fue iniciada con la adición de anticuerpo al AMPc. Después de 2 horas de incubación, la placa fue lavada y el sustrato añadido, el cual reaccionó con el conjugado AMPc- peroxidasa unido a los complejos unidos a la placa. Posteriormente, la reacción fue detenida y la intensidad del color generada fue detectada en un lector de microplaca. La absorbancia fue leída a 450 nm. Asimismo, paralelamente se construyó una curva estándar.

La cantidad de AMPc se calculó utilizando una curva estándar (rango de 0 a 150 pmol/mL). La producción de AMPc se reportó como pmoles de AMPc formados/10 min/mg de proteínas.

### **3.3.2.3. Determinación del Recambio de Fosfoinosítidos**

La hidrólisis de los fosfoinosítidos fue determinada como la acumulación de monofosfato de inositol ( $\text{InsP}_1$ ) en presencia de LiCl 10 mM, de acuerdo a Latinen y col., (1989) e Israel y col., (1995). Para ello, los vermis de los cerebelos fueron marcados durante dos horas a 37°C, en 20 mL de KBR que contenía 0,5 mCi de *myo*-[2- $^3\text{H}$ ]-inositol (Amersham, actividad específica 18,8 Ci/mmol) gasificado continuamente con  $\text{O}_2$  (95%):  $\text{CO}_2$  (5%).

Después del marcaje, los tejidos fueron lavados en KBR fresco gasificado y transferidos a KBR que contenía LiCl 10 mM. El tejido fue transferido a tubos Eppendorf de 1,5 mL que tenían 360  $\mu$ L de buffer KBR - LiCl y se incubaron por 10 minutos a 37°C con los agonistas en presencia o ausencia de los



antagonistas. La reacción fue detenida mediante la adición de 100  $\mu$ L de ácido tricloroacético (concentración final 6%) en frío. Los tejidos fueron sometidos a ultrasonido en hielo y centrifugados a 10.000 g durante 15 min., a 4°C. El sobrenadante se utilizó para cuantificar la acumulación del  $\text{InsP}_1$  mediante cromatografía de intercambio aniónico. Las fracciones (5 mL) que contenía el  $\text{InsP}_1$  fueron recolectadas y la radioactividad cuantificada mediante espectrometría de centelleo líquido.

#### **3.3.2.4. Ensayo para la determinación de la Producción de NO**

La producción de NO fue determinado colorimétricamente como una medida de la producción de nitrato/nitrito formado. Este ensayo consiste en determinar la acumulación de nitrito (producto final estable de la síntesis de NO) en el sobrenadante mediante la reacción de Griess (Green y col., 1982).

Para ello, 100 $\mu$ L de los sobrenadantes del homogeneizado del vermis de cerebelar de las ratas fueron colocados en placas de 96 pozos, mezclados con 50 $\mu$ L de sulfanilamida 1% m/v (en ácido fosfórico al 2,5% m/v) e incubados a 4°C por 10 minutos, seguidamente, fueron agregados 50 $\mu$ L de diclorhidrato de naftiletildiamina 0,1% m/v, mezclados e incubados a 4°C por 10 minutos adicionales para completar la reacción de diazotación. Paralelamente se construyó una curva patrón con nitrato de sodio. Se determinó la densidad óptica a 540 nm y la concentración de nitrato formado fue calculado y expresados como  $\mu$ mol/mg de proteínas del tejido.

#### **3.3.2.5. Determinación de las ERK**

La determinación de la ERK total y fosforilada se realizó por Western Blot. Para lo cual el tejido estimulado con agonista (AM) en presencia y ausencia de los antagonistas fue homogeneizado en frío mediante sonicación, en Buffer de lisis para ERK (Tris Base 50 mM, 5mM EDTA, 1mM NaF,  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , Tritón X-100 1%

y mezcla de inhibidores de proteasas compuesto por Pepstatina A 5 $\mu$ M, aprotinina 10 $\mu$ g/ml, leupeptina 10 $\mu$ M, PMSF 2mM, pH 7,4). El homogeneizado fue centrifugado a 4°C, a 10.000 rpm durante 10 minutos, para obtener el sobrenadante, el cual fue congelado a -70°C hasta el momento de su procesamiento.

Para el análisis por Western Blot, alícuotas del homogeneizado (100 $\mu$ g proteínas) diluidas en Laemmli fueron separadas por electroforesis en gel SDS-poliacrilamida al 10 % y transferidas a una membrana de nitrocelulosa durante 1 hora. La transferencia fue verificada incubando las membranas con Rojo Ponceau. Las membranas fueron bloqueadas con leche descremada al 10%, y posteriormente incubadas durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario, anti-fosfo-ERK y anti-ERK de conejos (Cell Signaling) diluido en solución de albúmina sérica bovina al 3% en TBS-Tween al 0,1% (Dilución 1:1000). Las membranas fueron lavadas con TBS- Tween al 0,1% e incubadas con anticuerpo secundario anti conejo conjugado con peroxidasa de rábano, diluido en solución de albúmina sérica bovina al 1,5% en TBS- Tween al 0,1 % (Dilución 1:1000) durante 1 hora en agitación lenta a temperatura ambiente. Las proteínas fueron visualizadas por quimioluminiscencia (SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate) a través de películas para rayos X y cuantificadas mediante análisis densitométrico (Quantity One 1-D ®- BioRad). La expresión de la ERK fosforilada fue normalizada con la ERK total.

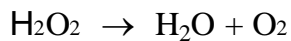
### **3.3.3. Preparación de la Muestra para la Determinación de la Actividad de las Enzimas Antioxidantes**

El vermis cerebeloso inmediatamente después de extraído o posterior al tratamiento *in vitro* fue homogeneizado mediante sonicación en buffer Fosfato 10 mM pH 7,0 -Tritón al 1%, centrifugado a 10.000 rpm durante 30 min y el sobrenadante recolectado fue utilizado como muestra. Se determinó las

actividades de tres enzimas antioxidantes: superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx).

### 3.3.3.1. Ensayo de la Actividad de la Catalasa (CAT)

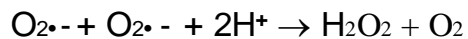
La CAT es una enzima que descompone el peróxido de oxígeno en agua y oxígeno



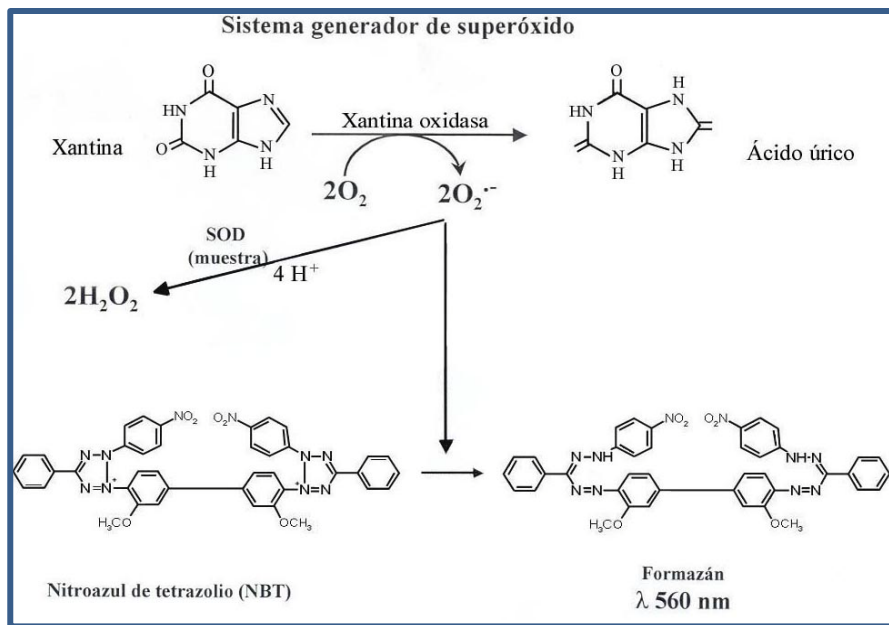
La actividad de la CAT fue determinada empleando una modificación del método de Aebi (1984), el cual se basa en determinar la disminución de la absorbancia del  $\text{H}_2\text{O}_2$  a 240 nm debido a su degradación por la CAT presente en la muestra. Para ello, se añadió 25  $\mu\text{L}$  del homogenizado de cerebelo diluido 1:10 en amortiguador de fosfatos 10 mM pH 7,0 a 725  $\mu\text{L}$  de la mezcla de incubación (10 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  en buffer fosfato 10 mM a pH 7) y se monitoreó el cambio de absorbancia a 240 nm a los 0, 60, 120 y 180 segundos, utilizando la constante de reacción de primer orden (k) como la unidad de actividad de la CAT, la cual queda definida de acuerdo a la siguiente fórmula:  $k = (1/t) (2,3 \times \log A_1 / A_2)$ , donde t es el intervalo de tiempo medido (seg),  $A_1$  y  $A_2$  son las absorbancias del  $\text{H}_2\text{O}_2$  en los tiempos  $t_1$  y  $t_2$ . Los resultados se expresaron en actividad específica.

### 3.3.3.2. Ensayo de la Actividad de la Superóxido Dismutasa Total (SOD)

Las SOD son metaloenzimas que catalizan la conversión del anión superóxido para dar oxígeno molecular y  $\text{H}_2\text{O}_2$ :



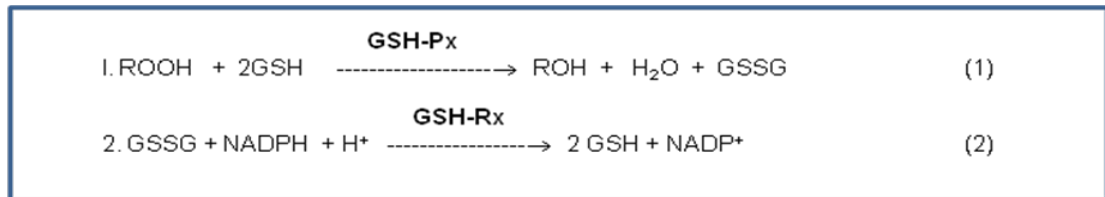
La actividad de la SOD se determinó por la capacidad de esta enzima de inhibir la reducción del azul de nitrotetrazolio (NBT) por los aniones superóxido generados por el sistema de la xantina-xantina oxidasa (Oberley y col., 1984).



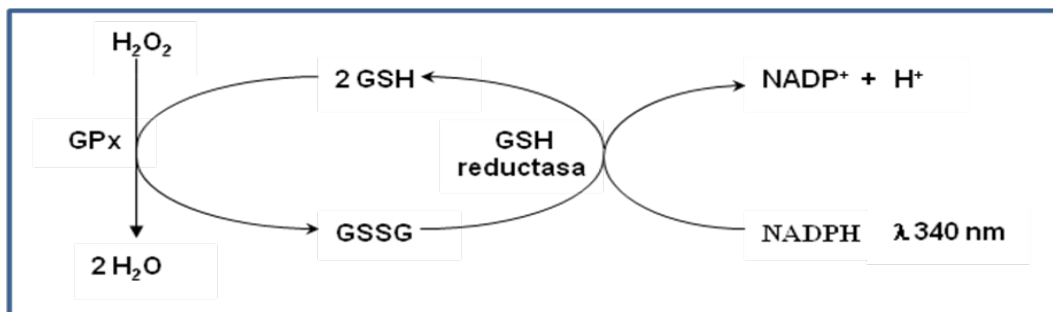
Para ello, en una cubeta se añadió 166  $\mu\text{L}$  de la mezcla de incubación (xantina 0,3 mM, EDTA 0,6 mM, NBT 150mM, albúmina 0,1% y  $\text{NaHCO}_3$  400 mM) y se agregó 33  $\mu\text{L}$  del homogeneizado del vermis del cerebelo. La reacción se inició con la adición de 10  $\mu\text{L}$  de la enzima xantina oxidasa. Se incluyó controles constituídos por tejido sin enzima, así como de enzima sin tejido (100% de reducción). Los tubos se incubaron durante 30 minutos, seguidos de la adición de 66  $\mu\text{L}$   $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,8 mM que detuvo la reacción y se midió la absorbancia a 595 nm. Los resultados se expresaron como actividad específica. Una unidad de SOD se define como la cantidad de SOD necesaria para inhibir en un 50 % la formación de los cristales de formazán.

### 3.3.3.3. Ensayo de la Actividad de la Glutatión Peroxidasa (GPx)

La GPx es una selenoproteína que cataliza la descomposición del  $\text{H}_2\text{O}_2$  o de otros peróxidos orgánicos a  $\text{H}_2\text{O}$  con la concomitante oxidación del glutatión reducido (GSH) que se transforma en glutatión oxidado (GSSG) (reacción 1). 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 (reacción 2) (Harris, 1992).



La actividad de la GPx de las muestras fue determinada de forma indirecta de acuerdo al método descrito por Flohé y col., (1984), mediante una reacción acoplada con la GSH-Rx. El método se basa en determinar la disminución de la absorbancia a 340 nm debido a la desaparición de NAD(P)H. La GPx al reducir los hidroperóxidos consume GSH, el cual es regenerado por la GSH-Rx a partir de GSSG, proceso que consume NAD(P)H. El producto de la GPx, el GSSG se acopla a la oxidación del NAD(P)H catalizado por la GSH-Rx; por lo que el consumo de NAD(P)H (la disminución de la absorbancia a 340 nm) es una medida indirecta de la actividad de la GPx.



Para ello se agregó en un pozo, respetando el orden, 25  $\mu\text{L}$  de la muestra y 200  $\mu\text{L}$  de mezcla de reacción (Buffer fosfato 50 mM pH=7, GSH 10 mM, GSH-Rx 0,24 U, NAD(P)H,  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , azida de sodio), y se incubó durante 5 min a temperatura ambiente. Bajo estas condiciones ocurre la oxidación del NAD(P)H independiente de peróxido. Posteriormente se inició la oxidación del NAD(P)H dependiente de peróxido, mediante el agregado de 25  $\mu\text{L}$  de peróxido de hidrógeno 0,7 mM. Se registró la disminución de la absorbancia a 340 nm. Paralelamente, se evaluó la tasa de oxidación no enzimática del NAD(P)H, para ello se agregó en otro pozo buffer fosfato 50 mM pH 7,0 en lugar de muestra. Los resultados fueron expresados como actividad específica de la enzima. Para ello se promedió los cambios de absorbancia por minuto y se multiplicó este promedio por 0,16 (factor que se obtiene tomando en cuenta el coeficiente de absorción milimolar del NAD(P)H a 340 nm,  $6,22 \text{ L mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) posteriormente se dividió el resultado entre los mg de proteína adicionados en el ensayo. De esta manera se obtendrá la actividad específica expresada en U/mg de proteína, donde 1 U =  $\mu\text{mol}$  de NAD(P)H oxidado/min.

#### **3.3.4. Ensayo de la concentración de productos de peroxidación lipídica que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBARS)**

La concentración de los productos de peroxidación lipídica que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBARS) fue evaluada por un método colorimétrico descrito por Ohkawa y col., (1979), el cual consiste en evaluar el efecto de las especies reactivas de oxígeno sobre los lípidos, que resulta en la producción de varias sustancias que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico y que pueden ser medida por espectrofotometría.

Para ello, muestras de homogeneizado de vermis de cerebelo fueron tratadas con ácido tricloroacético al 10% y centrifugadas a 1.600 g durante 15 min a 4°C. Seguidamente, el sobrenadante fue incubado con ácido tiobarbitúrico 0,67% durante 10 min a 100°C. Paralelamente se construyó una curva patrón con

malonildialdehído. Se determinó la densidad óptica a 532 nm y la concentración de los productos de peroxidación lipídica fueron calculados y expresados como malonildialdehído formado. Los resultados de los TBARS fueron expresados como nmol/mg de proteínas del tejido.

### **3.3.5. Determinación de las Proteínas Tisulares**

Las proteínas tisulares totales fueron determinadas por el método de Lowry y col., (1951), utilizando albúmina sérica de bovino como patrón. Este es un método colorimétrico de valoración cuantitativa de las proteínas que se fundamenta en la medición espectrofotométrica a 655 nm del desarrollo de coloración azul por la reacción de óxido reducción entre los residuos de aminoácidos aromáticos, triptófano y tirosina presentes en la muestra y el reactivo de Folin – Ciocalteau; siendo la intensidad de color proporcional a la concentración de proteínas.

### **3.3.6. Protocolos *In Vivo***

#### **3.3.6.1. Administración *in situ* en el Vermis Cerebeloso**

Ratas Sprague-Dawley, SHR y WKY adultas fueron anestesiadas con pentobarbital sódico a la dosis de 40 mg/kg. Posteriormente, mediante el uso de un aparato estereotáxico (David Kopf Instruments) se procedió a su canulación en el vermis del cerebelo de acuerdo a las coordenadas estereotáxicas Antero-posterior (AP): -10,3, Lateral (L):0 y Ventral (V): 2,4; de acuerdo a Pellegrino y col., (1979) y a Sacchetti y col., (2002). Se permitió la recuperación de los animales (3 días) y los mismos fueron divididos en dos grupos cada uno. El día del ensayo se determinó la presión arterial basal de cada animal, y posteriormente se procedió a la administración de los tratamientos, un grupo recibió AM o ANG II (0,2 a 200 pmol/5µL), y el otro grupo recibió vehículo (5µL) empleando una inyectadora

Hamilton. Inmediatamente se procedió a la determinación de la presión arterial mediante pletismografía digital no invasiva.

Una vez finalizado el experimento se confirmó la inyección de la AM o vehículo *post-mortem* con la inyección, previo a la decapitación de una solución de colorante (fast green, 5 µL). Sólo se utilizó los datos experimentales de aquellos animales en los que el colorante se localizó en el vermis cerebeloso.

Para evaluar si los cambios en la presión arterial media (PAM) inducidos tras la administración de AM o ANG II eran sitio específico, se evaluó el efecto de la administración *in situ* de AM o ANG II fuera del vermis de cerebelo sobre la presión arterial en ratas Sprague-Dawley, WKY y SHR de 16 semanas de edad *in vivo*. En este caso, sólo se tomaron en cuenta los datos de aquellos animales en los que el colorante se localizó fuera del vermis cerebeloso.

### **3.3.6.2. Administración *in situ* en el Vermis Cerebeloso de AM o ANG II en animales sometidos a estímulo eléctrico plantar (EEP)**

Asimismo, se determinó el efecto de la administración *in situ* de AM en el vermis de cerebelo sobre la respuesta presora inducida por el EEP *in vivo* en ratas Sprague- Dawley, WKY y SHR. Igualmente, se evaluó el efecto de la administración *in situ* de ANG II en el vermis de cerebelo sobre la respuesta presora inducida por el EEP *in vivo* en ratas SHR. Para ello, cada cepa de ratas previamente canuladas en el vermis, fueron divididas en dos grupos experimentales a los cuales se les determinó la presión arterial basal. Posteriormente, a un grupo se le administró AM o ANG II y al otro vehículo. Inmediatamente, las ratas fueron sometidas a estrés por EEP durante 4 min (100 V, 5 Hz, 10 mseg), después de lo cual se determinó la PAM. Los



resultados fueron expresados como la media  $\pm$  error estándar del cambio de la PAM (mmHg) con respecto a sus valores basales (antes de la administración de AM o vehículo). Únicamente se tomaron los datos de aquellos animales en los que el colorante se localizó en el vermis cerebeloso. Asimismo, se determinó el efecto de la administración *in situ* de AM fuera del vermis de cerebelo sobre la respuesta presora inducida por el EEP *in vivo* en ratas Sprague- Dawley, WKY y SHR. En este caso se tomó en cuenta los datos de aquellos animales en los que el colorante se localizó fuera del vermis del cerebelo.

### **3.3.6.3. Administración del Bloqueante AT<sub>1</sub> o del Antagonista de los canales del calcio**

Ratas SHR y WKY fueron divididos en tres grupos cada uno, uno recibió el bloqueante AT<sub>1</sub>, valsartán a la dosis 60 mg/Kg, uno recibió el antagonista de los canales de calcio, amlodipina a la dosis de 5 mg/Kg/día por vía oral y el tercer grupo recibió vehículo. La administración de los fármacos se realizó durante 11 días. Se determinó la presión arterial de las ratas antes y al final del experimento. Finalizado el período de tiempo experimental, los animales fueron sacrificados por decapitación y sus cerebelos removidos para la determinación de la expresión de CRLR, RAMPs y AM por Western Blot en el caso de valsartán y para la determinación de las enzimas antioxidantes en ambos tratamientos.

### **3.3.7. Determinación de la Expresión de la AM y sus Receptores**

La determinación de CRLR, RAMP1, RAMP2, RAMP3 y AM se realizó por Western Blot. Para lo cual el vermis del cerebelo fue homogeneizado en frío mediante sonicación, en Buffer de lisis para receptores (Tris-HCl 200 mM, CHAPS 160 mM, Na<sub>2</sub>EDTA 10 mM, PMSF 5mM y mezcla de inhibidores de proteasas compuesto por pepstatina A 5 $\mu$ M, aprotinina 10 $\mu$ g/mL, leupeptina 10 $\mu$ M pH 7,5) o en Buffer de lisis para AM (NaCl 50mM, Tris-HCl 25 mM, Tritón

X-100 1%, PMSF 1mM y mezcla de inhibidores de proteasas compuesto por pepstatina A 5 $\mu$ M, aprotinina 10 $\mu$ g/mL, leupeptina 10 $\mu$ M pH 8,1). Posteriormente el homogeneizado fue centrifugado, se recolectó y reservó el sobrenadante.

Para el análisis por Western Blot, alícuotas del homogeneizado (100  $\mu$ g proteínas) diluidas en Laemmli fueron separadas por electroforesis en gel SDS-poliacrilamida al 10 % y transferidas a una membrana de nitrocelulosa durante 1 hora. La transferencia fue verificada incubando las membranas con Rojo Ponceau. Las membranas fueron bloqueadas con leche descremada al 10%, y posteriormente se incubaron durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario, anti-CRLR, anti-RAMP1, anti-RAMP2, anti-RAMP3 y/o anti-AM de conejos (Santa Cruz, Biotechnology, Inc) diluido en solución de albúmina sérica bovina al 3% en TBS-Tween al 0,1% (Dilución 1:1000). Las membranas fueron lavadas con TBS-Tween al 0,1% e incubados con anticuerpo secundario anti conejo conjugado con peroxidasa de rábano, diluido en solución de albúmina sérica bovina al 1,5% en TBS-Tween al 0,1 % (Dilución 1:1000) durante 1 hora en agitación lenta a temperatura ambiente. Las proteínas fueron visualizadas por quimioluminiscencia (SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate) a través de películas para rayos X y cuantificadas mediante análisis densitométrico (Quantity One 1-D ®- BioRad). La expresión de la CRLR, RAMP1, RAMP2, RAMP3 y AM fueron normalizados con la expresión de  $\beta$ -actina.

### **3.3.8. Determinación de la Presión Arterial**

El registro de los parámetros CDV, presión arterial y frecuencia cardíaca se realizó en ratas Sprague-Dawley, SHR y WKY conscientes por un método no invasivo mediante el uso de un plestimógrafo digital de cola (Digital Pressure Meter Le

5002 LETICA ®, Panlab, S.L. Barcelona - España). Dicho equipo emplea una aproximación de la medida de la presión arterial que es básicamente esfigomanométrica; ya que emplea sobre la arteria de la cola una presión externa controlada al mismo tiempo que es detectada la presión de pulso.

Para determinar los parámetros CDV, las ratas se mantuvieron en una estufa a 42°C durante 15 min con la finalidad de producir vasodilatación de los vasos sanguíneos periféricos. Posteriormente, cada rata fue colocada en un cepo con el fin de inmovilizarlas, y mediante el uso de un transductor de presión arterial y frecuencia cardíaca se procedió a la cuantificación de la presión arterial sistólica (PAS) y presión arterial diastólica (PAD) y la frecuencia cardíaca. Se calculó la PAM mediante la siguiente fórmula:

$$\text{PAM} = \text{PAD} + 1/3 (\text{PAS} - \text{PAD})$$

La semana previa al experimento, se determinó diariamente la presión arterial y 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 de la frecuencia cardíaca).

### **3.3.9. Preparación de los tejidos y examinación de los cortes histológicos de corazón**

Para la determinación del tamaño (diámetro) de los cardiomiocitos de ventrículo izquierdo se realizaron cortes histológicos de corazón de las ratas. Para ello, ratas WKY y SHR tratadas o no con valsartán (60 mg/Kg) o amlodipina (5 mg/Kg) durante 11 días fueron sacrificados, posteriormente se procedió a realizar la autopsia de dichos animales, extrayendo el corazón para ser examinado. Las muestras de tejido extraídas, fueron procesadas según la técnica de rutina, para

ello se fijaron en formaldehído al 10 % en PBS (pH= 7,6) durante 24 horas, a continuación se deshidrataron en etanol en grado creciente (70 y 100%), se incluyó en parafina, y se les hizo cortes transversales de 4  $\mu\text{m}$  de espesor para posteriormente ser teñidos con hematoxilina-eosina (H-E) (Luna, 1968), para luego ser observadas por microscopía óptica. Las secciones fueron examinadas empleando un microscopio de luz (Zeiss, Oberkochen, Germany) acoplado a una cámara (Canon Power Shot G9) y analizándolas con el programa AxionVision Release, 4.7.1 Se midió el diámetro de 10 cardiomiocitos aleatoriamente seleccionados, observando secciones transversales de los miocitos cardíacos de ventrículo izquierdo para cada muestra. Los datos fueron reportados como la media  $\pm$  error estándar del diámetro de los miocitos cardíacos.

#### **3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  E.E.M. Se realizó la prueba de Shapiro-Will, para evaluar la distribución de las variables. La significancia de los resultados fue analizada mediante el análisis de varianza de una vía (ANOVA) y la prueba de Bonferroni. Un valor de  $p < 0,05$  fue considerado significativo. El análisis de los resultados y la elaboración de los gráficos se realizaron empleando el programa Graph Pad Prism versión 5.1.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Características de las ratas SHR y WKY de 8 y 16 semanas de edad

En la Tabla V se presenta los valores medios y el error estándar de los valores de peso corporal, PAS, PAD y PAM de las ratas WKY y SHR de 8 y 16 semanas de edad.

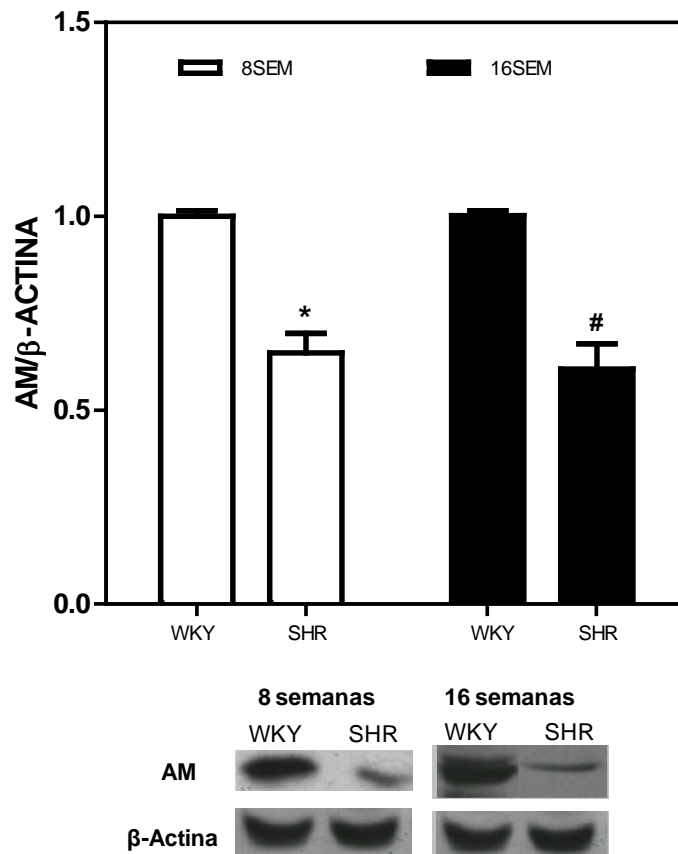
Como se puede observar, las ratas SHR de 8 y 16 semanas de edad tienen valores estadísticamente superiores de PAS, PAD y PAM cuando se compara con las ratas WKY de 8 y 16 semanas de edad, respectivamente. Asimismo, la PAS, PAD y PAM de las ratas SHR de 16 semanas de edad es estadísticamente mayor que las SHR de 8 semanas de edad.

**Tabla V.** Características de las ratas WKY y SHR de 8 y 16 semanas de edad. Ratas WKY y SHR de 8 y 16 semanas de edad. Se determinó su peso corporal (g), PAS, PAD y PAM (mmHg). Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  error estándar. (N= 40). \*p<0,0001 vs. WKY 8 semanas. #p<0,0001 vs. WKY 16 semanas.  $\zeta$ p<0,0001 vs. SHR 8 semanas.

GRUPO	Peso (g)	PAS (mmHg)	PAD (mmHg)	PAM (mmHg)
WKY 8 SEMANAS	282 $\pm$ 2	141 $\pm$ 1	89 $\pm$ 3	106 $\pm$ 2
WKY 16 SEMANAS	415 $\pm$ 24	145 $\pm$ 3	91 $\pm$ 3	108 $\pm$ 2
SHR 8 SEMANAS	221 $\pm$ 4	167 $\pm$ 1*	119 $\pm$ 2*	135 $\pm$ 1*
SHR 16 SEMANAS	366 $\pm$ 11	174 $\pm$ 3 $\zeta$	126 $\pm$ 3 $\zeta$	142 $\pm$ 3 $\zeta$

#### 4.2. Expresión de la AM en el vermis de cerebelo de ratas WKY y SHR de 8 y 16 semanas de edad.

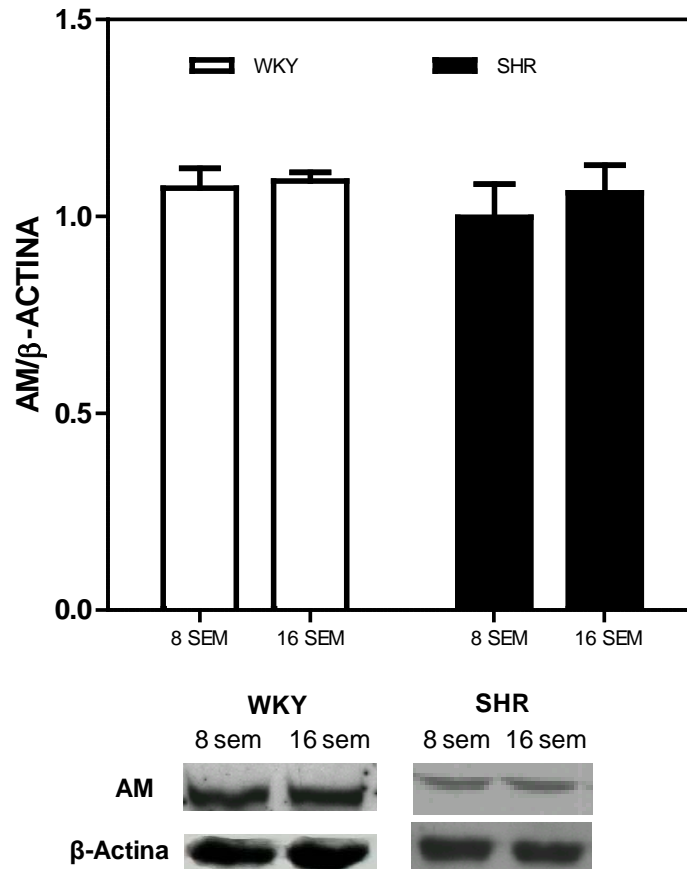
En las Fig. 46 y 47 se muestran los resultados de los inmunoblots analizados en el vermis del cerebelo contra anticuerpos anti-AM en ratas SHR y WKY de 8 y 16 semanas de edad. Los gráficos muestran los resultados del análisis densitométrico de los datos normalizados con la expresión de la  $\beta$ -actina. Como se observa en la figura 46, la expresión de la AM en el vermis del cerebelo fue significativamente menor en las ratas SHR tanto de 8 semanas ( $0,64 \pm 0,05$ ) como de 16 semanas de edad ( $0,60 \pm 0,06$ ), cuando se compara con las WKY ( $N=10$ ;  $p<0,0001$ ). Los resultados de los western blot fueron expresados como la media  $\pm$  error estándar, normalizados con el respectivo control.



**Fig. 46.** Cambio en la expresión de la AM en el vermis de cerebelo de ratas WKY y SHR de 8 y 16 semanas de edad. 100  $\mu$ g de proteínas provenientes del

vermis cerebelar de las ratas WKY y SHR de 8 y 16 semanas de edad fueron empleados para el western blotting. Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  error estándar de la media, de N=10 por grupo experimental. La expresión de la AM fue normalizada con la de la  $\beta$ -actina. (N=10), \* $p < 0,0001$  vs. WKY 8 semanas. # $p < 0,0001$  vs. WKY 16 semanas.

Adicionalmente, se observa que la expresión de la AM en el vermis cerebelar tanto de las ratas SHR como de las WKY no cambió con la edad de los mismos ( $1,07 \pm 0,05$  vs.  $1,09 \pm 0,02$  WKY 8 sem vs. WKY 16 sem;  $p = 0,487$ . N=10) ( $0,99 \pm 0,08$  vs.  $1,06 \pm 0,07$  SHR 8 sem vs. SHR 16 sem;  $p = 0,569$ . N=10) (Fig. 47).



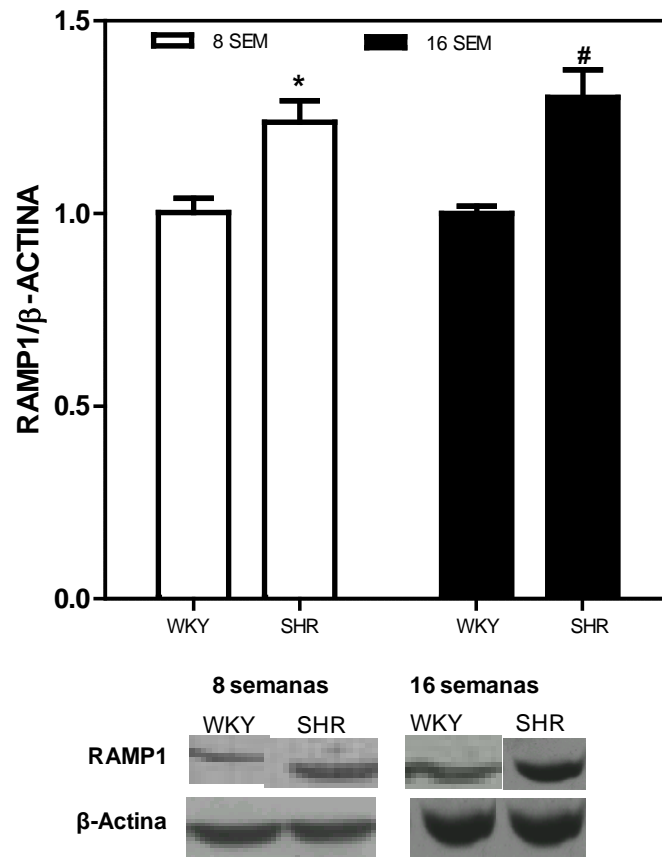
**Fig. 47.** Efecto de la edad sobre la expresión de la AM en el vermis de cerebelo de ratas WKY y SHR. 100  $\mu$ g de proteínas provenientes del vermis cerebelar de las ratas WKY y SHR de 8 y 16 semanas de edad fueron empleados para el western blotting. Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  error

estándar de la media. La expresión de la AM fue normalizada con la de la  $\beta$ -actina. (N=10).

#### **4.3. Expresión de los componentes del receptor de AM en el vermis del cerebelo de la rata**

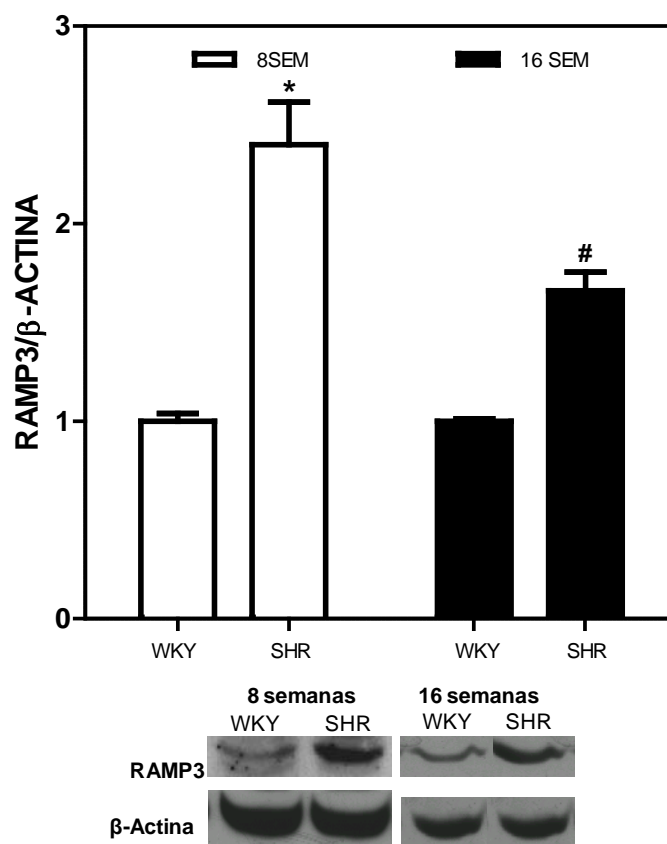
Se cuantificó la expresión de los componentes del receptor para la AM: RAMP1, RAMP2, RAMP3 y CRLR. Como se puede apreciar, la RAMP1 (Fig. 48), RAMP3 (Fig. 49) y el CRLR (Fig. 50) muestran mayor expresión en el vermis del cerebelo de las ratas SHR tanto de 8 semanas como de 16 semanas de edad con respecto a las WKY de la misma edad (N=9,  $p < 0,001$ ). Pues, la expresión de la RAMP1 en las ratas SHR de 8 semanas es 24% mayor que su control WKY de la misma edad ( $1,24 \pm 0,05$  vs.  $1,00 \pm 0,03$ ; N=9;  $p < 0,001$ ) y la expresión de la RAMP1 en las ratas SHR de 16 semanas de edad es 30% mayor con respecto a las WKY de la misma edad ( $1,30 \pm 0,07$  vs.  $1,00 \pm 0,01$ ; N=9;  $p < 0,001$ ) (Fig. 48).





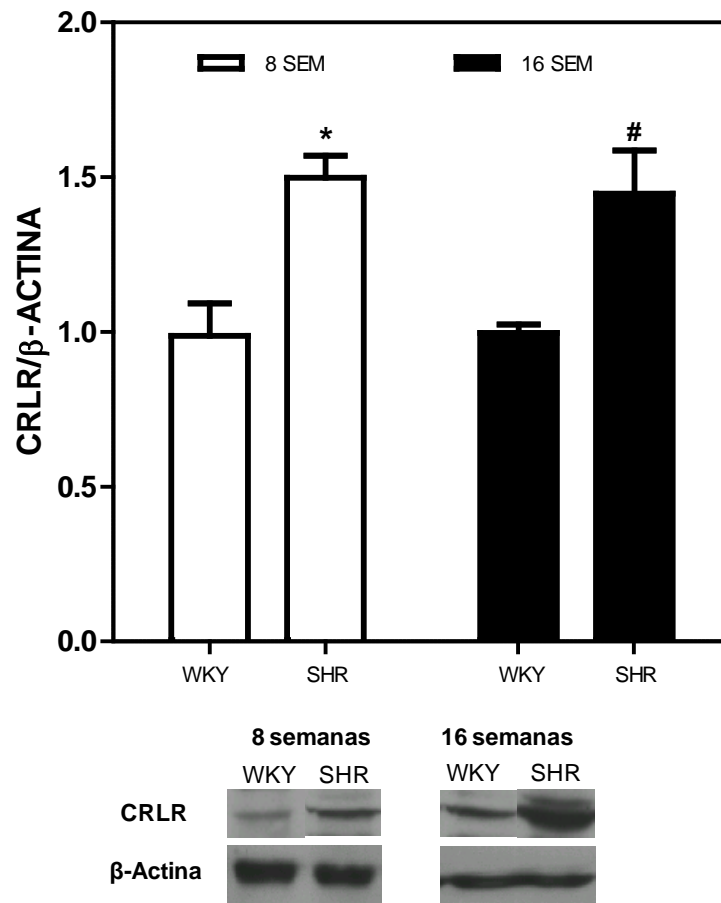
**Fig. 48.** Cambio en la expresión de la RAMP1 en el vermis de cerebelo de ratas WKY y SHR de 8 y 16 semanas de edad. 100 µg de proteínas provenientes del vermis cerebelar de las ratas WKY y SHR de 8 y 16 semanas de edad fueron empleados para el western blotting. Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  error estándar de la media. La expresión de la RAMP1 fue normalizada con la de la  $\beta$ -actina. (N=9). \* $p < 0,001$  vs. WKY 8 semanas. # $p < 0,001$  vs. WKY 16 semanas.

Por su parte, la expresión de la RAMP3 en las ratas SHR de 8 semanas es 142% mayor que su control WKY de la misma edad ( $2,40 \pm 0,21$  vs.  $0,99 \pm 0,04$ ; N=15;  $p < 0,0001$ ) y la expresión de la RAMP3 en las ratas SHR de 16 semanas de edad es 68% mayor con respecto a las WKY de la misma edad ( $1,66 \pm 0,09$  vs.  $0,99 \pm 0,01$ ; N=15;  $p < 0,0001$ ) (Fig. 49).



**Fig. 49.** Cambio en la expresión de la RAMP3 en el vermis de cerebelo de ratas WKY y SHR de 8 y 16 semanas de edad. 100 µg de proteínas provenientes del vermis cerebelar de las ratas WKY y SHR de 8 y 16 semanas de edad fueron empleados para el western blotting. Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  error estándar de la media. La expresión de la RAMP3 fue normalizada con la de la  $\beta$ -actina. (N=15). \* $p < 0,0001$  vs. WKY 8 semanas. # $p < 0,0001$  vs. WKY 16 semanas.

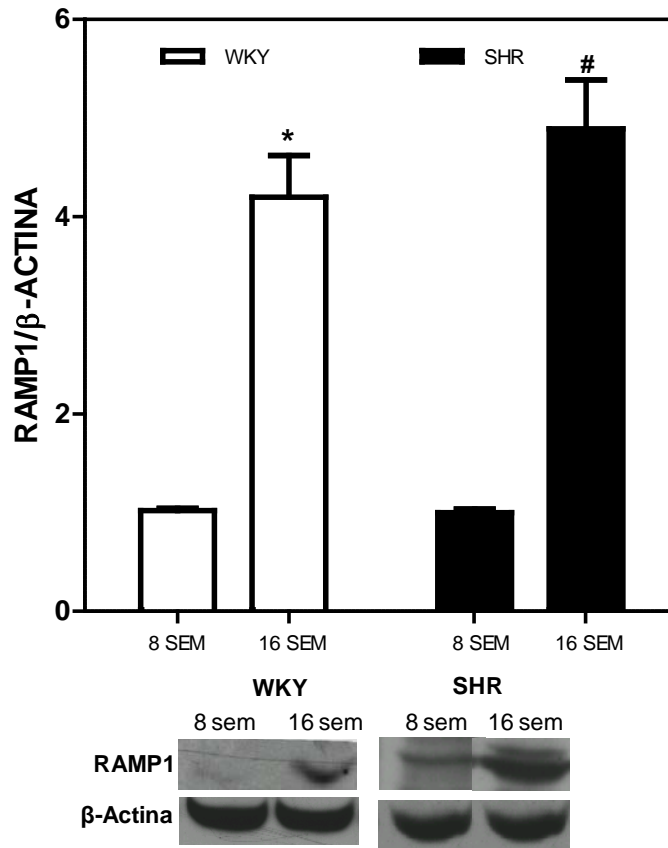
De igual manera, las ratas SHR de 8 semanas de edad muestran un 52% más de expresión de la CRLR con respecto a su control WKY ( $1,50 \pm 0,07$  vs.  $0,99 \pm 0,10$ ; N=10;  $p < 0,0001$ ) y la expresión de la CRLR en las ratas SHR de 16 semanas de edad es un 46% mayor con respecto a las WKY de la misma edad ( $1,45 \pm 0,13$  vs.  $0,99 \pm 0,02$ ; N=10;  $p < 0,0001$ ) (Fig. 50).



**Fig. 50.** Cambio en la expresión de la CRLR en el vermis de cerebelo de ratas WKY y SHR de 8 y 16 semanas de edad. 100 µg de proteínas provenientes del vermis cerebelar de las ratas WKY y SHR de 8 y 16 semanas de edad fueron empleados para el western blotting. Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  error estándar de la media. La expresión de la CRLR fue normalizada con la de la  $\beta$ -actina. (N=10). \* $p < 0,0001$  vs. WKY 8 semanas. # $p < 0,0001$  vs. WKY 16 semanas.

Por su parte, en las Fig. 51, 52 y 53 se muestra que la edad de las ratas WKY y SHR afecta la expresión de RAMP1, RAMP3 y CRLR en el vermis del cerebelo; pues, la expresión del RAMP1 en el vermis cerebelar tanto en las ratas SHR como las WKY aumenta con la edad de los mismos, ya que la expresión de las RAMP1 en las ratas WKY de 16 semanas aumentó en un 311% con respecto a

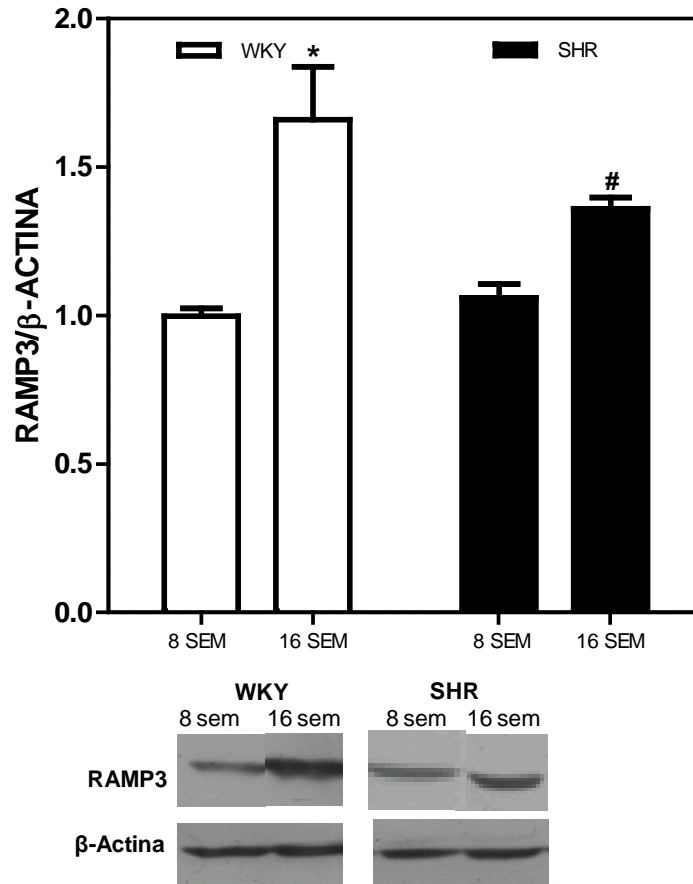
su expresión a las 8 semanas ( $1,02 \pm 0,02$  vs.  $4,20 \pm 0,42$  WKY 8 sem vs. WKY 16 sem) y en un 389% en las ratas SHR ( $1,00 \pm 0,03$  vs.  $4,89 \pm 0,49$  SHR 8 sem vs. SHR 16 sem) N=9.  $p < 0,0001$  (Fig. 51).



**Fig. 51.** Efecto de la edad sobre la expresión de la RAMP1 en el vermis de cerebelo de ratas WKY y SHR. 100 µg de proteínas provenientes del vermis cerebelar de las ratas WKY y SHR de 8 y 16 semanas de edad fueron empleados para el western blotting. Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  error estándar de la media. La expresión de la RAMP1 fue normalizada con la de la  $\beta$ -actina. (N=9). \* $p < 0,0001$  vs. WKY 8 semanas. # $p < 0,0001$  vs. SHR 8 semanas.

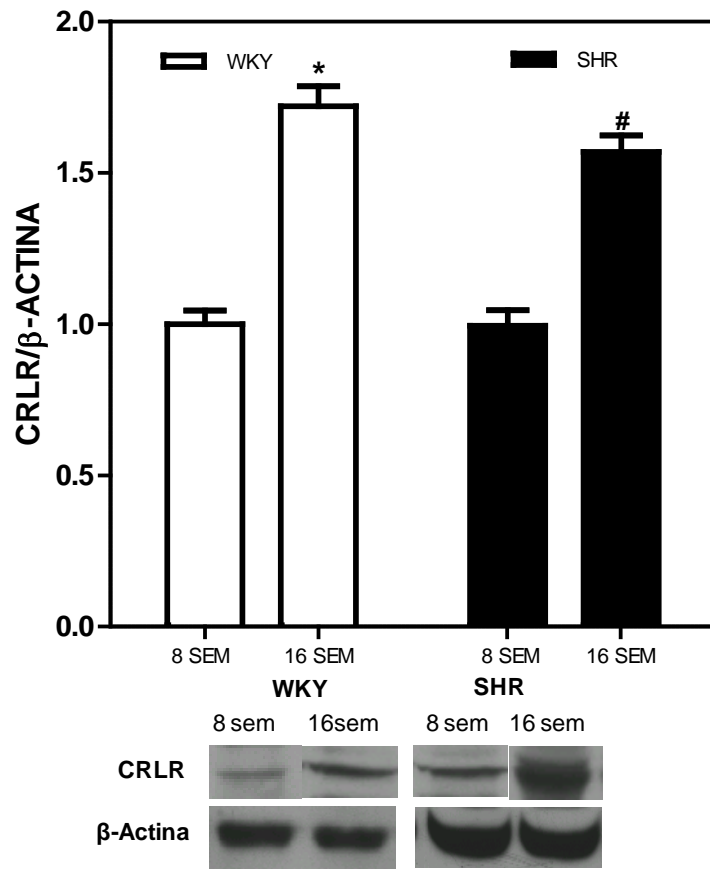
Asimismo, la expresión de la RAMP3 en el vermis cerebelar tanto en las ratas SHR como las WKY aumenta con la edad de los mismos, ya que la expresión

de las RAMP3 en las ratas WKY de 16 semanas aumentó en un 68% con respecto a su expresión a las 8 semanas ( $0,99 \pm 0,02$  vs.  $1,66 \pm 0,17$  WKY 8 sem vs. WKY 16 sem) y en un 28% en las ratas SHR ( $1,06 \pm 0,04$  vs.  $1,36 \pm 0,04$  SHR 8 sem vs. SHR 16 sem)  $N=15$ .  $p<0,0001$  (Fig. 52).



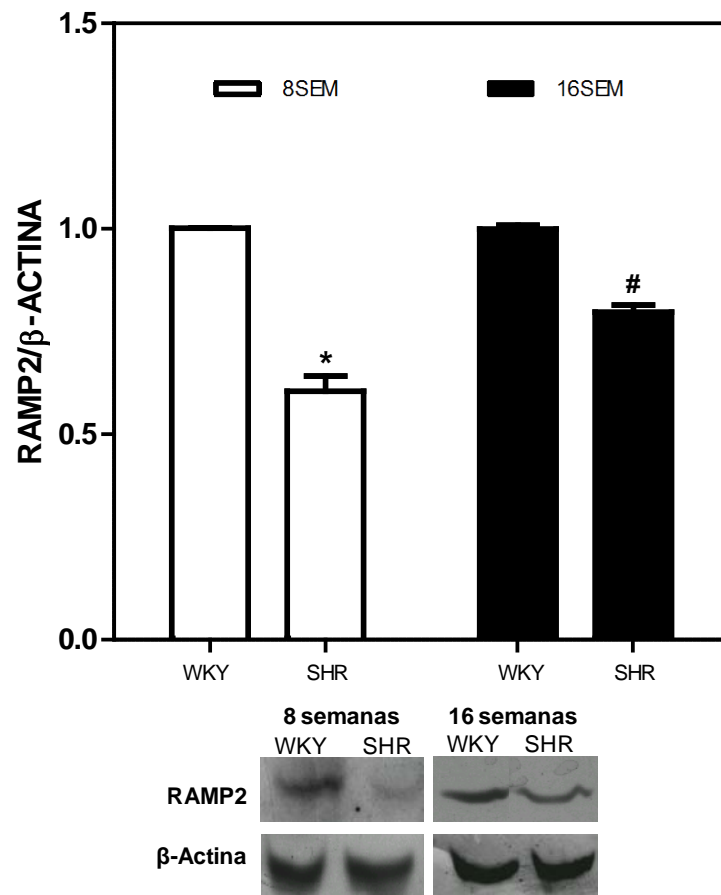
**Fig. 52.** Efecto de la edad sobre la expresión de la RAMP3 en el vermis de cerebelo de ratas WKY y SHR. 100 µg de proteínas provenientes del vermis cerebelar de las ratas WKY y SHR de 8 y 16 semanas de edad fueron empleados para el western blotting. Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  error estándar de la media. La expresión de la RAMP3 fue normalizada con la de la  $\beta$ -actina. ( $N=15$ ). \* $p<0,0001$  vs. WKY 8 semanas. # $p<0,0001$  vs. SHR 8 semanas.

De igual manera, la expresión del CRLR en el vermis cerebelar tanto de las ratas SHR como las WKY aumentó con la edad de los mismos, ya que su expresión en las ratas WKY de 16 semanas aumentó en un 72% con respecto a su expresión a las 8 semanas ( $1,00 \pm 0,04$  vs.  $1,72 \pm 0,06$  WKY 8 sem vs. WKY 16 sem) y en un 59% en las ratas SHR ( $0,99 \pm 0,05$  vs.  $1,57 \pm 0,05$  SHR 8 sem vs. SHR 16 sem) N=10.  $p < 0,0001$  (Fig. 53).



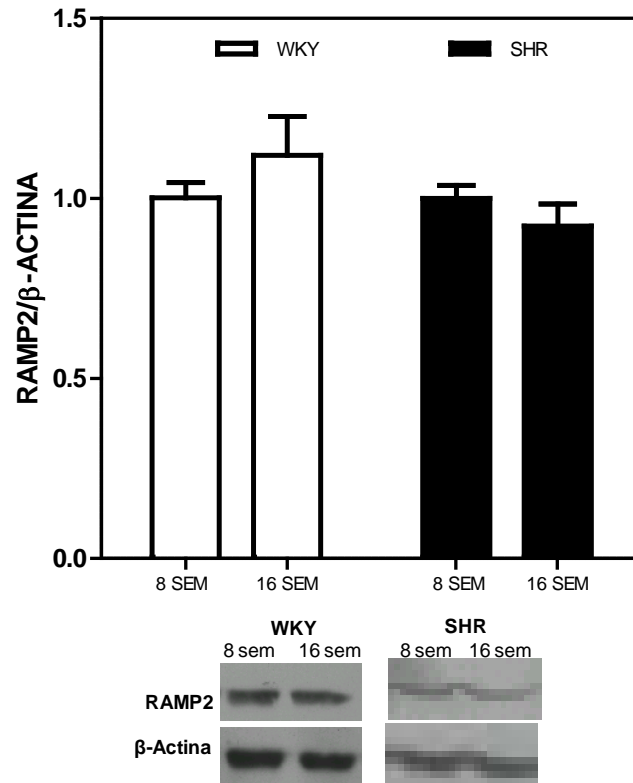
**Fig. 53.** Efecto de la edad sobre la expresión de la CRLR en el vermis de cerebelo de ratas WKY y SHR. 100  $\mu$ g de proteínas provenientes del vermis cerebelar de las ratas WKY y SHR de 8 y 16 semanas de edad fueron empleados para el western blotting. Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  error estándar de la media. La expresión de la CRLR fue normalizada con la de la  $\beta$ -actina. (N=10). \* $p < 0,0001$  vs. WKY 8 semanas. # $p < 0,0001$  vs. SHR 8 semanas.

Ahora bien, cuando se cuantifica la expresión de la RAMP2 en el vermis cerebelar de las ratas SHR de 8 y 16 semanas de edad, se observa una expresión significativamente menor cuando se compara con las WKY de su misma edad (N=11;  $p < 0,0001$ ) (Fig. 54), pues la expresión de la RAMP2 en las ratas SHR 8 semanas es 39% menor que su control WKY de la misma edad ( $0,61 \pm 0,04$  vs.  $1,00 \pm 0,01$ ) y 19% menor en las ratas SHR de 16 semanas con respecto a las WKY de la misma edad ( $0,80 \pm 0,01$  vs.  $0,99 \pm 0,01$ ).



**Fig. 54.** Cambio en la expresión de la RAMP2 en el vermis de cerebelo de ratas WKY y SHR de 8 y 16 semanas de edad. 100 µg de proteínas provenientes del vermis cerebelar de las ratas WKY y SHR de 8 y 16 semanas de edad fueron empleados para el western blotting. Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  error estándar de la media. La expresión de la RAMP2 fue normalizada con la de la  $\beta$ -actina. (N=11). \* $p < 0,0001$  vs. WKY 8 semanas. # $p < 0,0001$  vs. WKY 16 semanas.

Sin embargo, la edad no alteró la expresión de la RAMP2 en el vermis cerebelar de las ratas WKY y SHR (Fig. 55) ( $1,00 \pm 0,04$  vs.  $1,12 \pm 0,11$  WKY 8 sem vs. WKY 16 sem;  $p=0,335$ .  $N=11$ ) ( $1,00 \pm 0,03$  vs.  $0,92 \pm 0,06$  SHR 8 sem vs. SHR 16 sem;  $p=0,371$ .  $N=11$ ).



**Fig. 55.** Efecto de la edad sobre la expresión de la RAMP2 en el vermis de cerebelo de ratas WKY y SHR. 100 µg de proteínas provenientes del vermis cerebelar de las ratas WKY y SHR de 8 y 16 semanas de edad fueron empleados para el western blotting. Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  error estándar de la media. La expresión de la RAMP2 fue normalizada con la de la  $\beta$ -actina. ( $N=11$ ).



#### **4.4. Efecto de la AM sobre la actividad de las enzimas antioxidantes SOD, CAT y GPx en el vermis cerebelar de la rata SHR y controles normotensos, WKY adultos. Papel de la angiotensina II.**

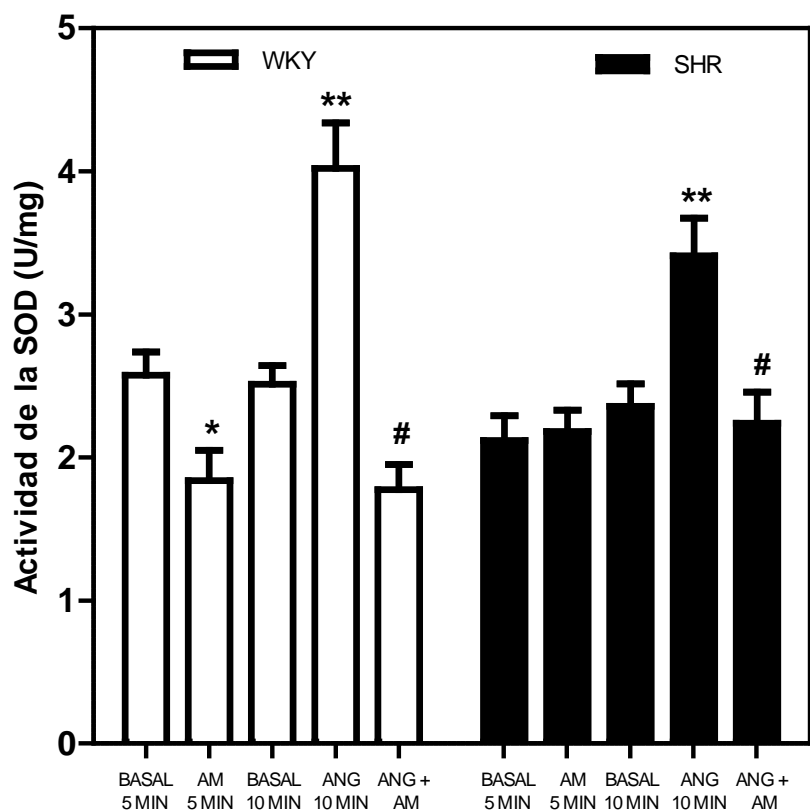
Se evaluó el efecto de la AM sobre la actividad de las enzimas antioxidantes SOD, CAT y GPx en el vermis cerebelar de ratas SHR y WKY. Igualmente, se estudio el papel de la ANG II. Como se observa, la incubación del vermis cerebelar con AM ( $2 \times 10^{-7} M$ ) durante 5 min, disminuyó significativamente la actividad de las enzimas antioxidantes SOD ( $2,572 \pm 0,1620$  vs.  $1,838 \pm 0,212$  Basal 5min vs. AM 5min) (Fig. 56), CAT ( $0,0152 \pm 0,001937$  vs.  $0,0101 \pm 0,000679$  Basal 5min vs. AM 5min) (Fig. 57) y GPx ( $0,0110 \pm 0,00082$  vs.  $0,0057 \pm 0,0006$ ; Basal 5min vs. AM 5min) (Fig. 58) en las ratas WKY de 16 semanas de edad con respecto a su basal ( $p < 0,001$ . N=17).

Contrariamente, en las ratas SHR la adición al baño de incubación de la AM no alteró la actividad de ninguna de las tres enzimas antioxidantes ( $2,1190 \pm 0,1722$  vs.  $2,1818 \pm 0,149$  Basal 5min vs. AM 5min;  $0,0133 \pm 0,0005341$  vs.  $0,0122 \pm 0,00079$  Basal 5min vs. AM 5min;  $0,0128 \pm 0,00184$  vs.  $0,0103 \pm 0,00153$  Basal 5min vs. AM 5min para SOD, CAT y GPx, respectivamente).

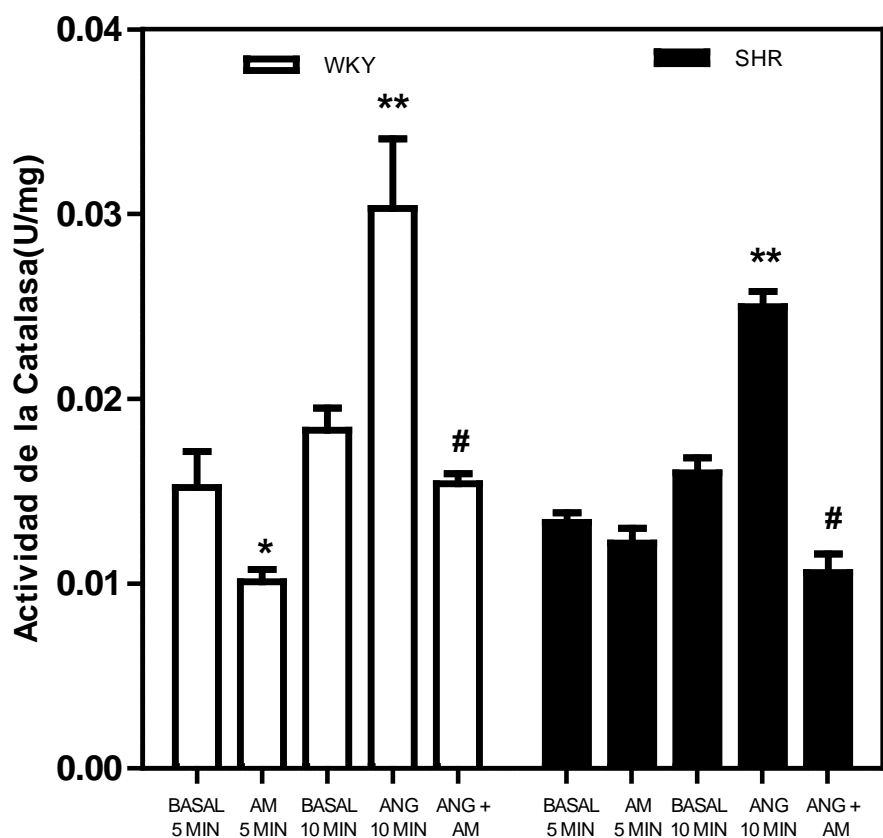
Ahora bien, la incubación del vermis cerebelar con ANG II ( $2 \times 10^{-7} M$ ), incrementó significativamente la actividad de las tres enzimas antioxidantes evaluadas, tanto en las ratas WKY como las SHR; pues la ANG II incrementó la actividad de la SOD ( $2,513 \pm 0,130$  vs.  $4,022 \pm 0,316$ ; Basal 10min vs. ANG II 10min) (Fig. 56), CAT ( $0,0183 \pm 0,0012$  vs.  $0,0303 \pm 0,00377$ ; Basal 10min vs. AM 10min) (Fig. 57) y GPx ( $0,0113 \pm 0,00125$  vs.  $0,0200 \pm 0,00157$ ; Basal 10min vs. ANG II 10min) (Fig. 58) en las ratas WKY de 16 semanas de edad con respecto a su control WKY ( $p < 0,001$ . N=17), observándose también dicho

efecto en el vermis del cerebelo de las ratas SHR incubadas con ANG II 10 min ( $2,358 \pm 0,157$  vs.  $3,41 \pm 0,2625$  Basal 10 min vs. ANG II 10min;  $0,016 \pm 0,000816$  vs.  $0,025 \pm 0,000802$  Basal 10min vs. ANG II 10min;  $0,011 \pm 0,001$  vs.  $0,020 \pm 0,001$  Basal 10min vs. ANGII 10min, para SOD, CAT y GPx, respectivamente).

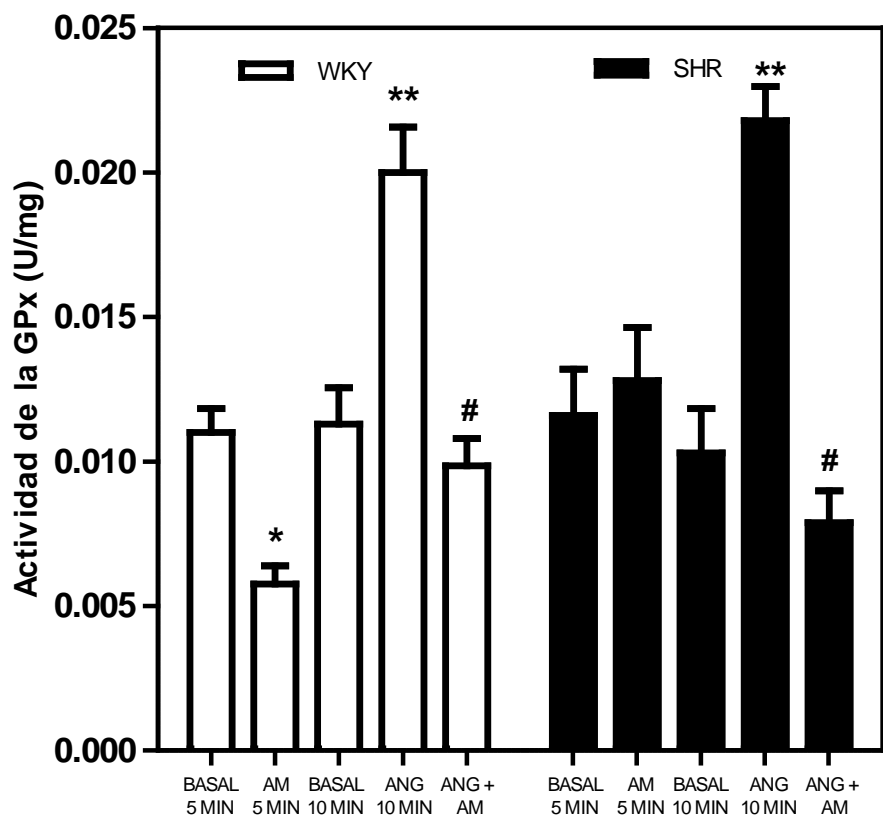
Aun más, en ambas cepas la AM antagonizó la respuesta estimuladora de la ANG II sobre la actividad de las enzimas antioxidantes; pues la preincubación de ANGII ( $2 \times 10^{-7} M$ ) en el vermis de cerebelo de las ratas SHR como WKY revirtió la disminución de la actividad de las enzimas antioxidantes SOD, CAT y GPx inducida por la AM, llevándolos a valores similares al control. ( $p < 0,001$ .  $N=17$ ). Los resultados de la actividad enzimática de las enzimas antioxidantes, SOD, CAT y GPx fueron normalizados con la concentración de proteínas y expresados como la media  $\pm$  error estándar de la misma, ( $N=17$ ;  $p < 0,0001$ ).



**Fig. 56.** Efecto de la AM y ANG II sobre la actividad de las enzimas antioxidantes, SOD en el vermis de cerebelo de ratas WKY y SHR. El vermis cerebelar fue incubado con ANG II ( $2 \times 10^{-7} \text{M}$ ) durante 10 min en presencia o ausencia de AM ( $2 \times 10^{-7} \text{M}$ ) durante 5 min. Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  error estándar de la actividad específica de las enzimas. \* $p < 0,05$  vs. control (Basal 5 min). (N=17). \*\* $p < 0,001$  vs. control (Basal 10min). #  $p < 0,001$  vs. ANG II.



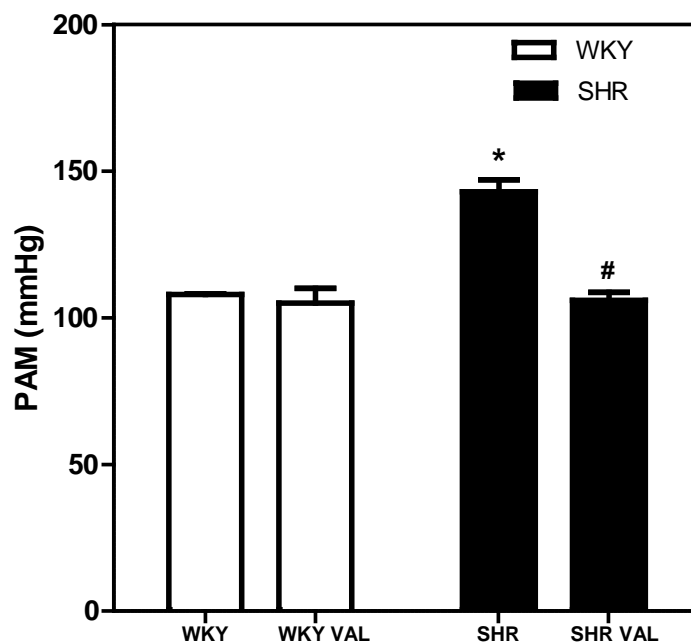
**Fig. 57.** Efecto de la AM y ANG II sobre la actividad de las enzimas antioxidantes, CAT en el vermis de cerebelo de ratas WKY y SHR. El vermis cerebelar fue incubado con ANG II ( $2 \times 10^{-7} \text{M}$ ) durante 10 min en presencia o ausencia de AM ( $2 \times 10^{-7} \text{M}$ ) durante 5 min. Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  error estándar de la actividad específica de las enzimas. \* $p < 0,05$  vs. control (Basal 5 min). (N=17). \*\* $p < 0,001$  vs. control (Basal 10min). #  $p < 0,001$  vs. ANG II.



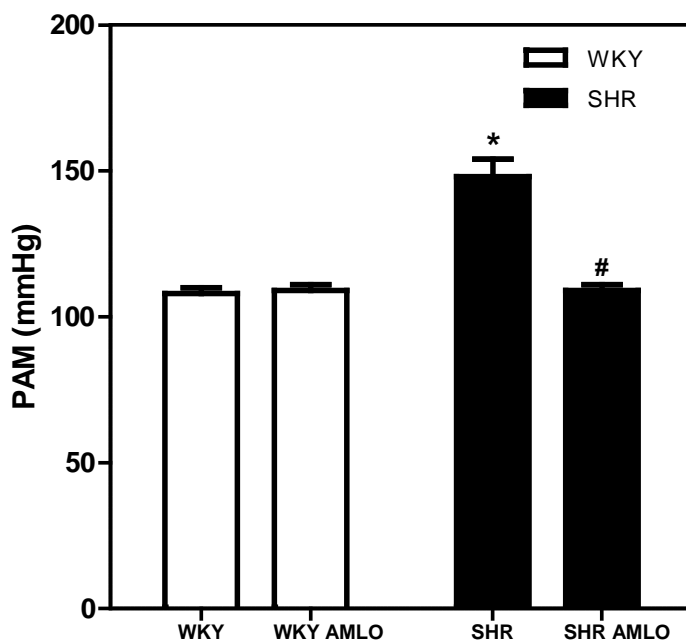
**Fig. 58.** Efecto de la AM y ANG II sobre la actividad de las enzimas antioxidantes, GPx en el vermis de cerebelo de ratas WKY y SHR. El vermis cerebelar fue incubado con ANG II ( $2 \times 10^{-7} \text{M}$ ) durante 10 min en presencia o ausencia de AM ( $2 \times 10^{-7} \text{M}$ ) durante 5 min. Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  error estándar de la actividad específica de las enzimas. \* $p < 0,05$  vs. control (Basal 5 min). (N=17). \*\* $p < 0,001$  vs. control (Basal 10min). #  $p < 0,001$  vs. ANG II.

#### 4.5. Efecto de la administración *in vivo* de valsartán y amlodipina sobre la Presión Arterial Media (PAM) en ratas SHR y WKY adultas.

Se evaluó el efecto que ejerce la reducción de la presión arterial inducida por la administración *in vivo* de dos antihipertensivos con mecanismos de acción diferentes (valsartán y amlodipina) sobre los valores de PAM en las ratas WKY y SHR adultas. En las figuras 59 y 60 se muestran que las ratas SHR tienen valores significativamente superiores de PAM cuando se compara con la WKY (N=9.  $p < 0,05$ ). La administración *in vivo* de valsartán (60 mg/Kg/día, p.o.) o amlodipina (5mg/Kg/día, p.o.) durante 11 días, redujo la PAM a valores basales y no alteró la presión en la WKY normotensas.



**Fig. 59.** Efecto del tratamiento con valsartán (VAL) *in vivo*, sobre la PAM en ratas WKY y SHR. Ratas WKY y SHR de 16 semanas de edad fueron tratadas durante 11 días con VAL (60 mg/Kg/día), se determinó su PA. Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  error estándar de la PAM. (N=9) \* $p < 0,0001$  vs. WKY. #  $p < 0,0001$  vs. SHR.



**Fig. 60.** Efecto del tratamiento con amlodipina (AMLO) *in vivo*, sobre la PAM en ratas WKY y SHR. Ratas WKY y SHR de 16 semanas de edad fueron tratadas durante 11 días con VAL (5 mg/Kg/día), se determinó su PA. Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  error estándar de la PAM. (N=8) \* $p < 0,0001$  vs. WKY. #  $p < 0,0001$  vs. SHR.

#### 4.6. Efecto de la administración *in vivo* de valsartán y amlodipina sobre la relación Peso Corazón / Peso Corporal en ratas SHR y WKY adultas.

Se evaluó el efecto que ejerce la reducción de la presión arterial inducida por la administración *in vivo* de dos antihipertensivos con mecanismos de acción diferentes (valsartán y amlodipina) sobre los valores de peso corporal, peso del corazón y su relación en las ratas WKY y SHR adultas. En las Tablas VI y VII se muestra que las ratas SHR tienen valores significativamente superiores de peso

del corazón y relación peso del corazón/peso corporal cuando se compara con la WKY (N=9.  $p < 0,05$ ). Asimismo, la administración *in vivo* de valsartán (60 mg/Kg/día) o amlodipina (5mg/Kg/día) durante 11 días revirtió el incremento de dichos parámetros.

**Tabla VI.** Efecto del tratamiento con valsartán (VAL) *in vivo*, sobre la relación Peso Corazón / Peso Corporal en ratas WKY y SHR. Ratas WKY y SHR de 16 semanas de edad fueron tratadas durante 11 días con VAL (60 mg/Kg/día). Se determinó su peso corporal (Kg) y del peso del corazón (g). Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  error estándar. (N= 9). \* $p < 0,05$  vs. WKY. #  $p < 0,05$  vs. SHR.

GRUPO	Peso Corporal (Kg)	Peso Corazón (g)	Peso Corazón /Peso Corporal
WKY	0,283 $\pm$ 0,018	1,059 $\pm$ 0,054	3,753 $\pm$ 0,053
WKY VAL	0,316 $\pm$ 0,001	1,175 $\pm$ 0,011	3,715 $\pm$ 0,038
SHR	0,305 $\pm$ 0,003	1,200 $\pm$ 0,020*	3,960 $\pm$ 0,042*
SHR VAL	0,318 $\pm$ 0,006	1,118 $\pm$ 0,018#	3,567 $\pm$ 0,074#

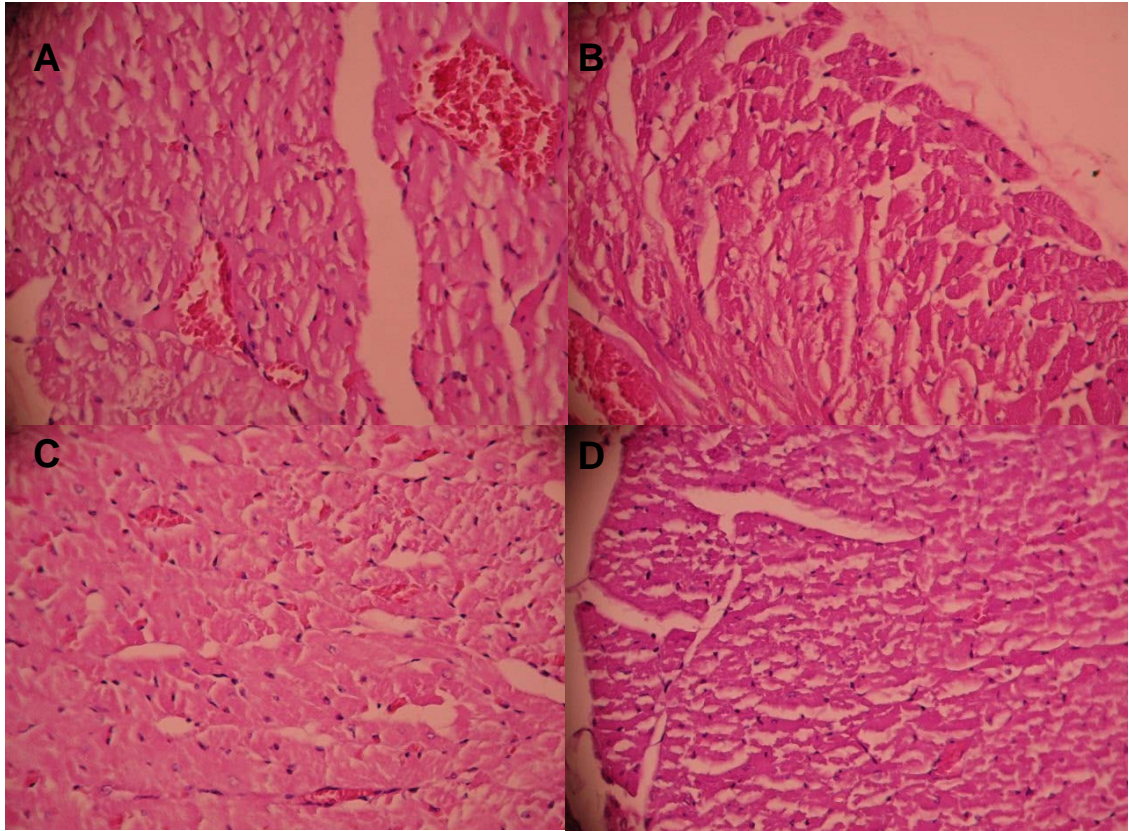


**Tabla VII.** Efecto del tratamiento con amlodipina (AMLO) *in vivo*, sobre la relación Peso Corazón / Peso Corporal en ratas WKY y SHR. Ratas WKY y SHR de 16 semanas de edad fueron tratadas durante 11 días con VAL (5mg/Kg/día). Se determinó su peso corporal (Kg) y del peso del corazón (g). Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  error estándar. (N= 8). \* $p < 0,05$  vs. WKY. # $p < 0,05$  vs. SHR.

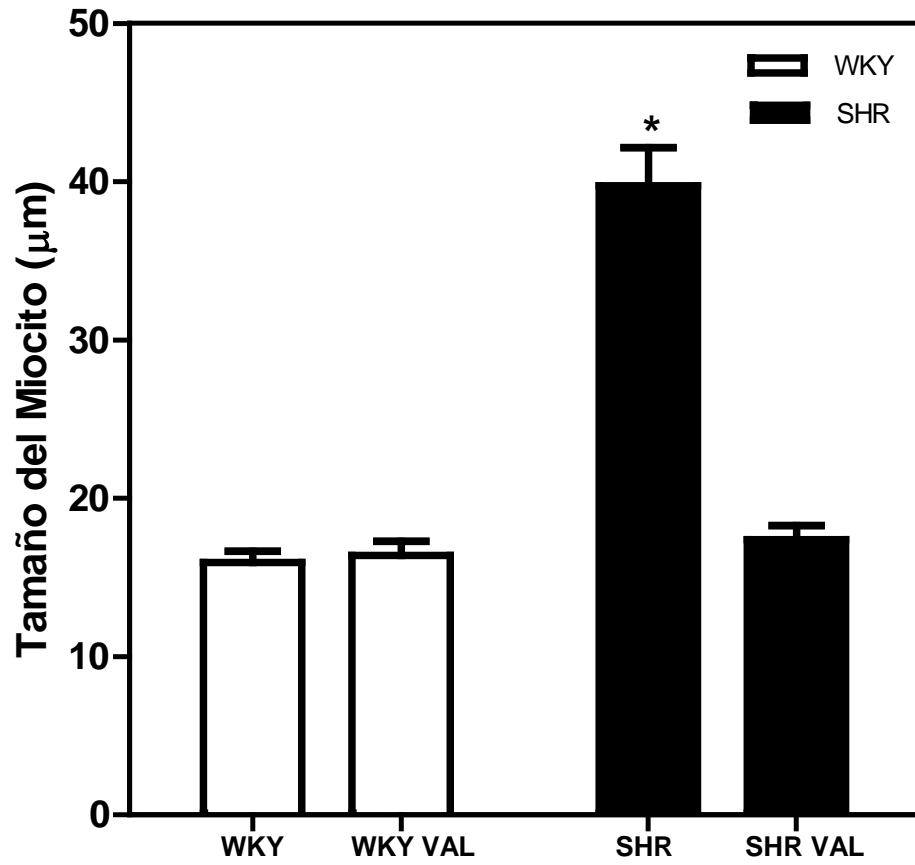
GRUPO	Peso Corporal (Kg)	Peso Corazón (g)	Peso Corazón /Peso Corporal
WKY	0,374 $\pm$ 0,007	1,335 $\pm$ 0,006	3,590 $\pm$ 0,09
WKY AMLO	0,384 $\pm$ 0,003	1,350 $\pm$ 0,013	3,525 $\pm$ 0,062
SHR	0,383 $\pm$ 0,004	1,833 $\pm$ 0,028*	4,812 $\pm$ 0,091*
SHR AMLO	0,369 $\pm$ 0,082	1,357 $\pm$ 0,014#	3,696 $\pm$ 0,081#

**4.7. Efecto de la administración *in vivo* de valsartán y amlodipina sobre el tamaño de los miocitos cardíacos de ventrículo izquierdo en ratas SHR y WKY adultas.**

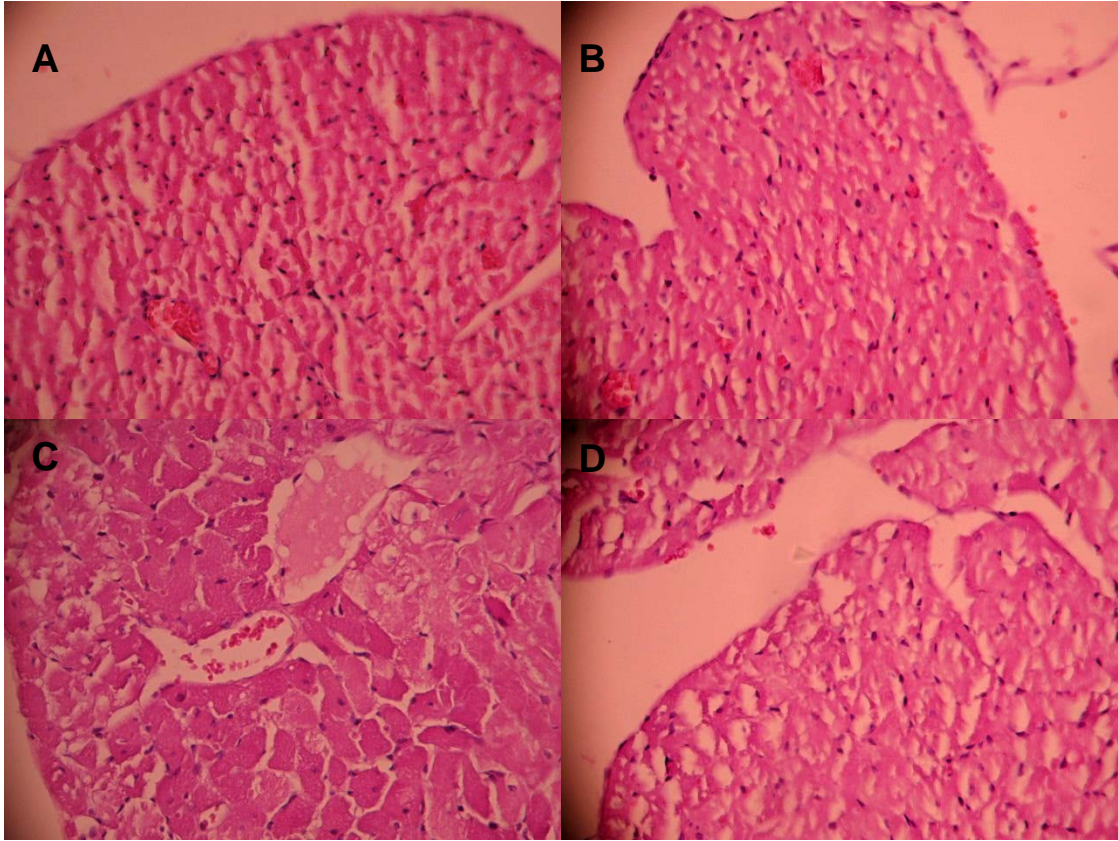
Se evaluó el efecto que ejerce la administración oral *in vivo* de dos antihipertensivos con mecanismos de acción diferentes (valsartán y amlodipina) sobre el tamaño de miocitos cardíacos del ventrículo izquierdo en las ratas WKY y SHR adultas. En las figuras 61 a 64 se muestra que las ratas SHR tienen valores significativamente superiores del tamaño de los miocitos cuando se compara con los WKY (N=6.  $p < 0,05$ ). Por su parte, la administración *in vivo* de valsartán (60 mg/Kg/día) o amlodipina (5mg/Kg/día) durante 11 días revirtió el incremento de dicho parámetro.



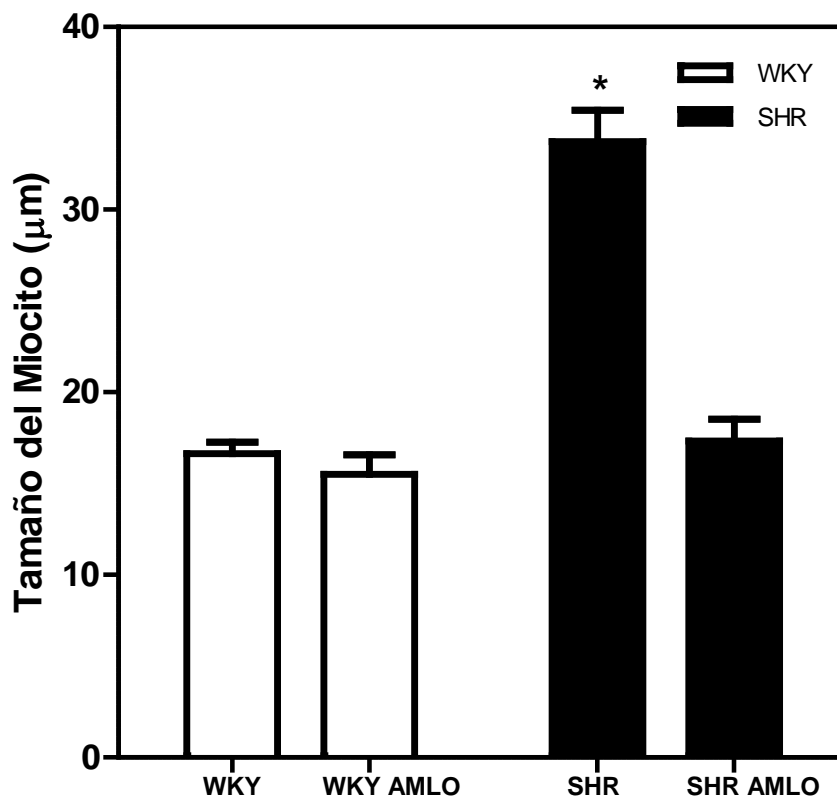
**Fig. 61.** Cortes histológicos de ventrículo izquierdo de ratas tratadas con valsartán (VAL) *in vivo*. Ventrículo izquierdo de ratas WKY (Panel A), WKY VAL (Panel B), SHR (Panel C) y SHR VAL (Panel D). Secciones transversales de miocitos de ventrículo izquierdo. Hematoxilina – Eosina (H-E), 40X. (N= 6).



**Fig. 62.** Efecto del tratamiento oral con valsartán (VAL) sobre el tamaño de miocitos de ventrículo izquierdo de ratas WKY, WKY VAL, SHR y SHR VAL. (N= 6). \* $p < 0,001$  vs. WKY.



**Fig. 63.** Cortes histológicos de ventrículo izquierdo de ratas tratadas con amlodipina (AMLO) *in vivo*. Ventrículo izquierdo de ratas WKY (Panel A), WKY AMLO (Panel B), SHR (Panel C) y SHR AMLO (Panel D). Secciones transversales de miocitos de ventrículo izquierdo. Hematoxilina – Eosina (H-E), 40X. (N= 6).

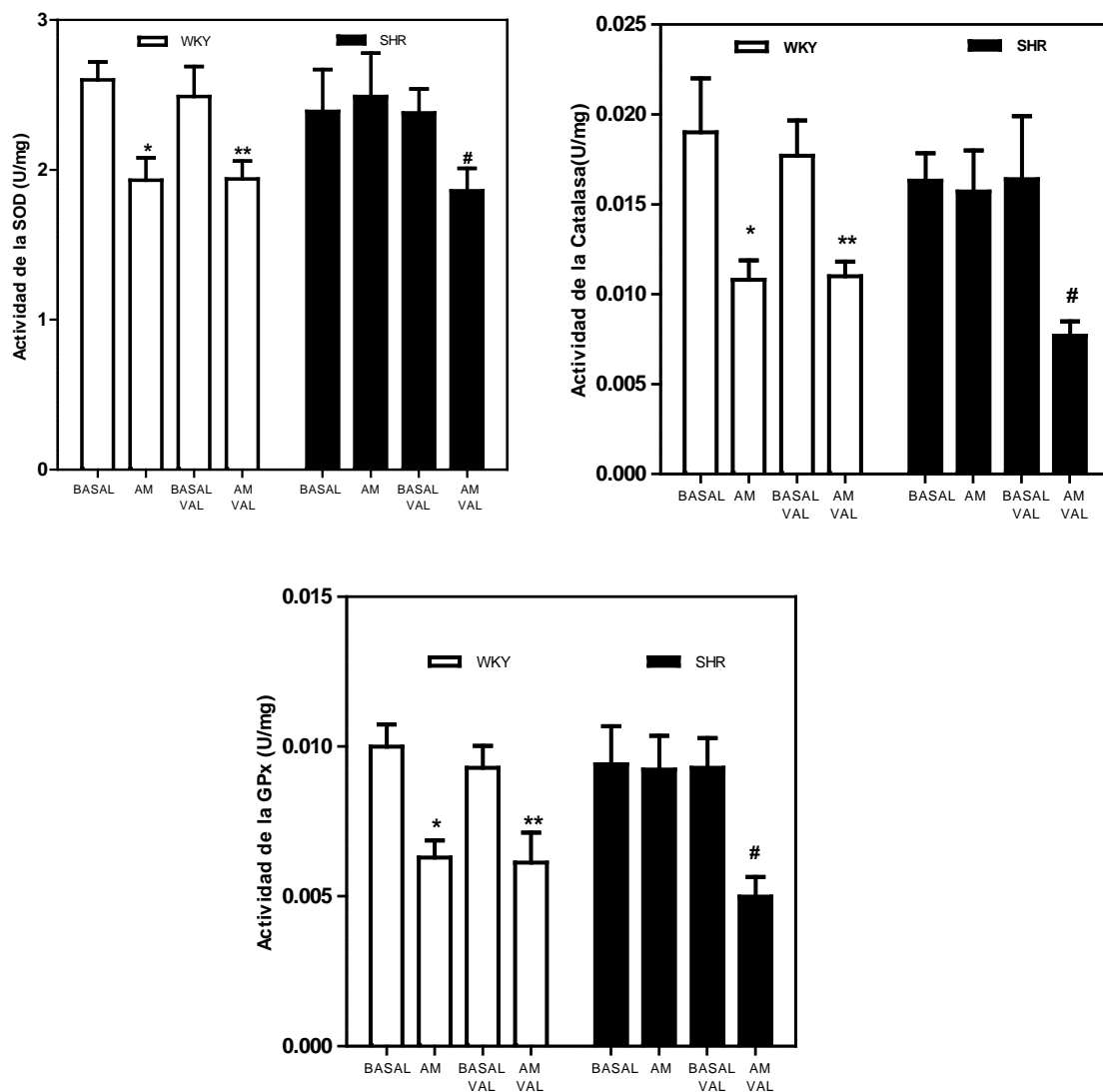


**Fig. 64.** Efecto del tratamiento oral con amlodipina (AMLO) sobre el tamaño de miocitos de ventrículo izquierdo de ratas WKY, WKY AMLO, SHR y SHR AMLO. \* $p < 0,001$  vs. WKY. (N= 6).

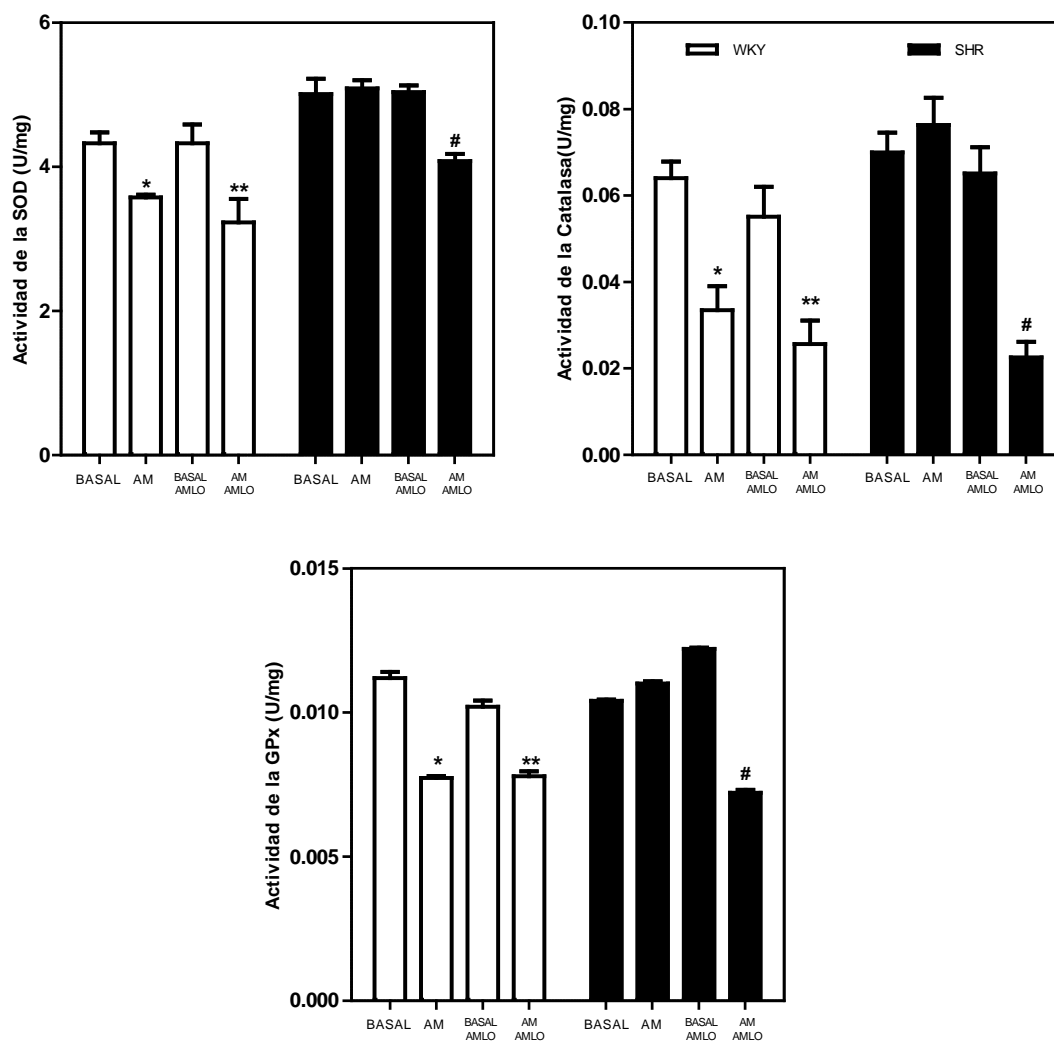
**4.8. Efecto de la administración *in vivo* de valsartán y amlodipina sobre la acción de la AM sobre la actividad de las enzimas antioxidantes *in vitro*, en ratas SHR y WKY adultas.**

Se evaluó el efecto que ejerce la reducción de la presión arterial inducida por la administración *in vivo* de dos antihipertensivos con mecanismos de acción diferentes (valsartán y amlodipina) sobre la ausencia del efecto reductor de la AM sobre las enzimas antioxidantes en las ratas SHR. Como se observa en las

figuras 65 y 66, la administración *in vivo* de valsartán (60 mg/Kg/día) durante 11 días, revirtió la ausencia de respuesta de las enzimas antioxidantes inducida por la AM en ratas SHR, pues la incubación del vermis cerebelar de las ratas con AM ( $2 \times 10^{-7} \text{M}$ ) provocó una disminución significativa en la actividad de las enzimas antioxidantes en las ratas SHR tratadas con valsartán a niveles similares a los obtenidos con las ratas WKY ( $p < 0,001$ ). Asimismo, este efecto fue observado tras la administración *in vivo* de amlodipina (5 mg/Kg/día) durante 11 días ( $p < 0,0001$ ). Ninguno de los tratamientos afectó la actividad de las enzimas antioxidantes, basal o la inducida por la AM, en las ratas WKY.



**Fig. 65.** Efecto del tratamiento con valsartán (VAL) *in vivo*, sobre la actividad de las enzimas antioxidantes, SOD, CAT y GPx basal e inducida por la AM en el vermis de cerebelo de ratas WKY y SHR. Ratas WKY y SHR de 16 semanas de edad fueron tratadas durante 11 días con VAL (60 mg/Kg/día), posteriormente, se sacrificaron y el vermis cerebelar fue incubado con AM ( $2 \times 10^{-7} M$ ) durante 5 min. Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  error estándar de la actividad específica de las enzimas. (N=9). \* $p < 0,0001$  vs. control (Basal WKY). \*\* $p < 0,0001$  vs. control VAL (Basal VAL WKY). #  $p < 0,0001$  vs. control VAL (Basal VAL SHR).

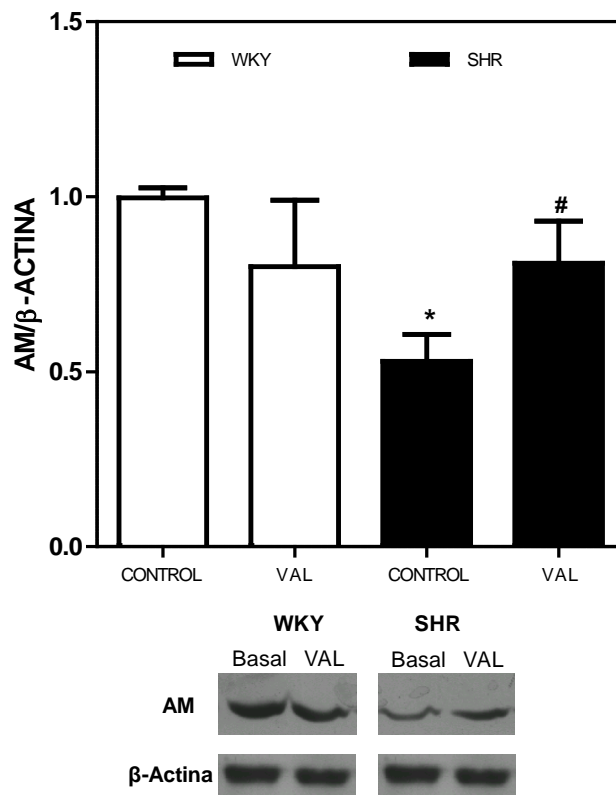


**Fig. 66.** Efecto del tratamiento con amlodipina (AMLO) *in vivo*, sobre la actividad de las enzimas antioxidantes, SOD, CAT y GPx basal e inducida por la AM en el vermis de cerebelo de ratas WKY y SHR. Ratas WKY y SHR de 16 semanas de edad fueron tratadas durante 11 días con AMLO (5mg/Kg/día), posteriormente, se sacrificaron y el vermis cerebelar fue incubado con AM  $2 \times 10^{-7} M$  durante 5 min. Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  error estándar de la actividad específica de las enzimas. (N=8). \* $p < 0,0001$  vs. control (Basal WKY). \*\* $p < 0,0001$  vs. control AMLO (Basal AMLO WKY). #  $p < 0,0001$  vs. control AMLO (Basal AMLO SHR).



#### 4.9. Efecto de la administración *in vivo* de valsartán sobre la expresión de AM y los componentes de su receptor en el vermis de cerebelo de ratas SHR y WKY adultas.

Se evaluó el efecto que ejerce la reducción de la presión arterial inducida por la administración *in vivo* de valsartán sobre los cambios en la expresión de la AM y los componentes de sus receptores en las ratas SHR. Como se observa en la figura 67, la administración *in vivo* de valsartán (60 mg/Kg/día) durante 11 días, revirtió los cambios en la expresión de AM observados en las ratas SHR (N= 10;  $p < 0,001$ ), pues la administración de valsartán durante 11 días provocó un aumento significativo de la expresión de AM (Fig. 67) en el vermis cerebelar de las ratas SHR tratadas con valsartán a niveles similares a los obtenidos con las ratas WKY.

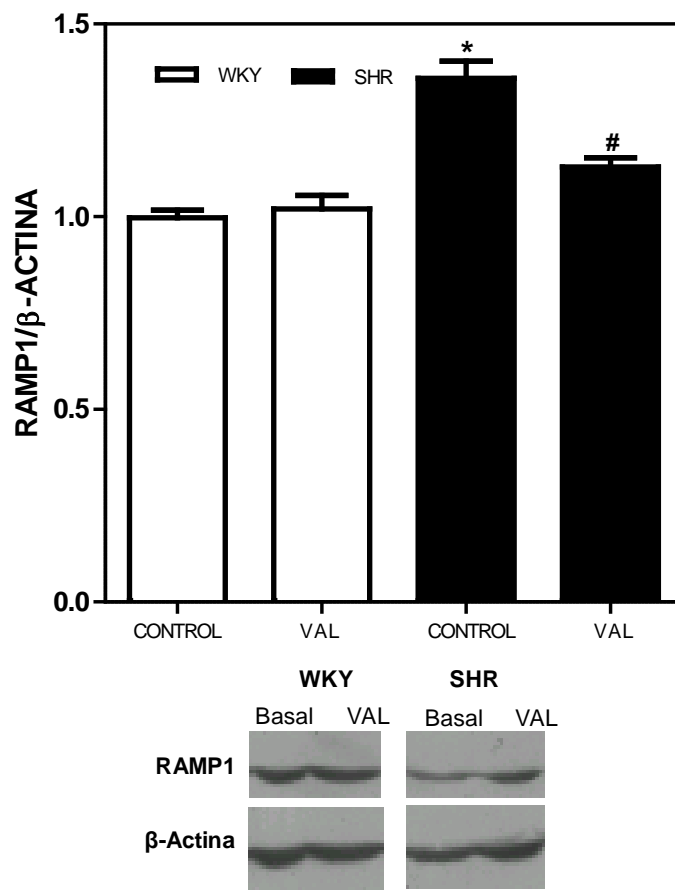


**Fig. 67.** Efecto del tratamiento con valsartán (VAL) *in vivo*, sobre la expresión de la AM en el vermis de cerebelo de ratas WKY y SHR. Ratas WKY y SHR de

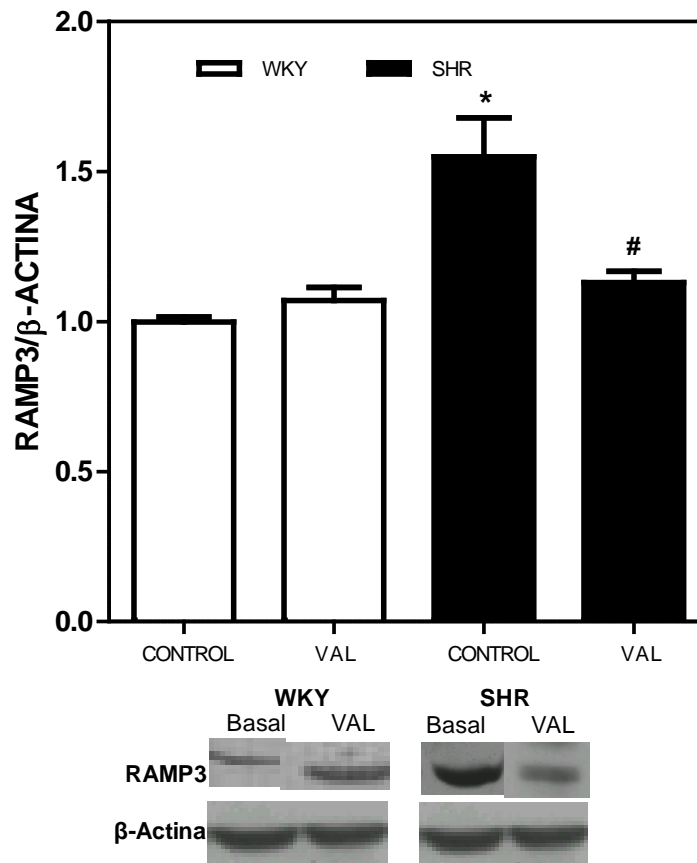
16 semanas de edad fueron tratadas durante 11 días con VAL (60 mg/Kg/día), posteriormente, se sacrificaron y el vermis cerebelar fue destinado para determinación de AM. 100 µg de proteínas provenientes del vermis cerebelar de las ratas WKY y SHR fueron empleados para el western blotting. Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  error estándar de la media. La expresión de la AM fue normalizada con la de la  $\beta$ -actina. (N=10). \* $p < 0,001$  vs. control WKY. # $p < 0,0001$  vs. control SHR.

Adicionalmente, se observa que la administración de valsartán revirtió la expresión de los componentes de los receptores en ratas SHR cuando se compara con WKY, pues la administración de valsartán durante 11 días provocó una disminución significativa de la expresión de RAMP1 (Fig. 68), RAMP3 (Fig. 69) y CRLR (Fig. 70) en el vermis cerebelar de las ratas SHR tratadas con valsartán a niveles similares a los obtenidos con las ratas WKY.

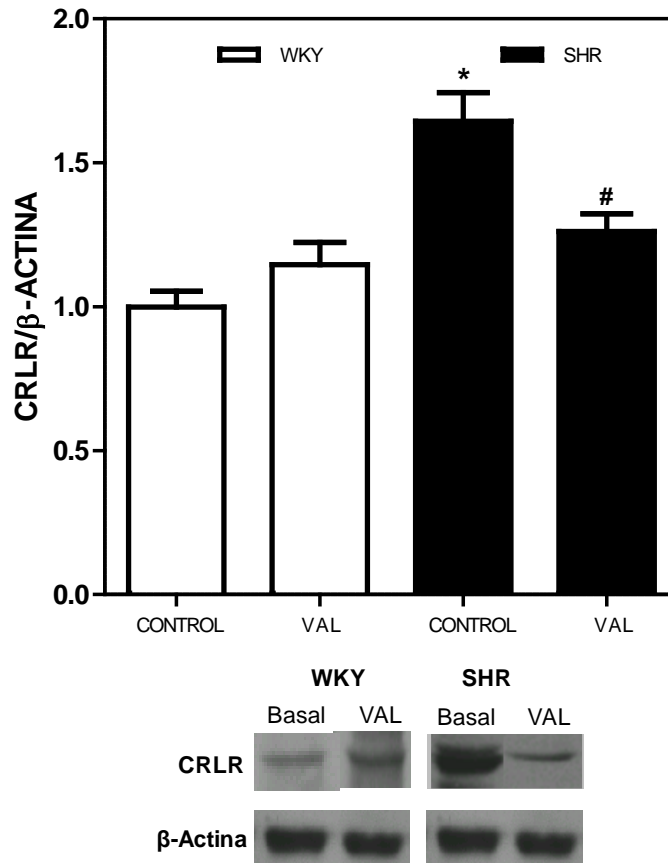
En relación a la RAMP2, el valsartán revirtió la expresión reducida de las RAMP2 observada en las ratas SHR llevándola a niveles similares a los obtenidos con las ratas WKY (N= 10;  $p < 0,01$ ) (Fig. 71).



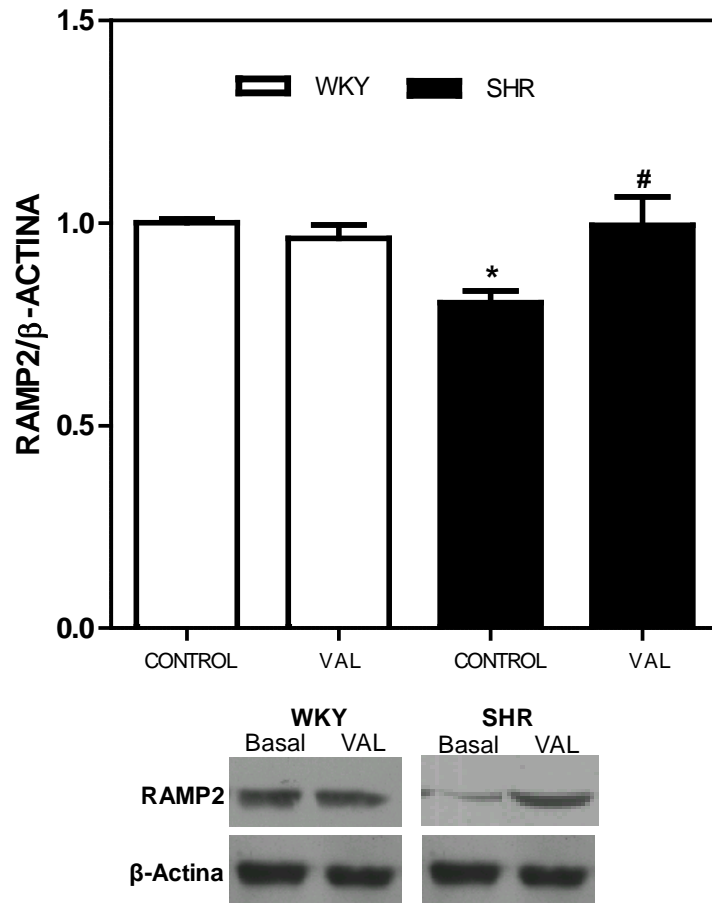
**Fig. 68.** Efecto del tratamiento con valsartán (VAL) *in vivo*, sobre la expresión de la RAMP1 en el vermis de cerebelo de ratas WKY y SHR. Ratas WKY y SHR de 16 semanas de edad fueron tratadas durante 11 días con VAL (60 mg/Kg/día), posteriormente, se sacrificaron y el vermis cerebelar fue destinado para determinación de RAMP1. 100 µg de proteínas provenientes del vermis cerebelar de las ratas WKY y SHR fueron empleados para el western blotting. Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  error estándar de la media. La expresión de la RAMP1 fue normalizada con la de la  $\beta$ -actina. (N=10). \* $p < 0,0001$  vs. control WKY. # $p < 0,0001$  vs. control SHR.



**Fig. 69.** Efecto del tratamiento con valsartán (VAL) *in vivo*, sobre la expresión de RAMP3 en el vermis de cerebelo de ratas WKY y SHR. Ratas WKY y SHR de 16 semanas de edad fueron tratadas durante 11 días con VAL (60 mg/Kg/día), posteriormente, se sacrificaron y el vermis cerebelar fue destinado para determinación de RAMP3. 100 µg de proteínas provenientes del vermis cerebelar de las ratas WKY y SHR fueron empleados para el western blotting. Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  error estándar de la media. La expresión de la RAMP3 fue normalizada con la de la  $\beta$ -actina. (N=10). \* $p < 0,0001$  vs. control WKY. # $p < 0,0001$  vs. control SHR.



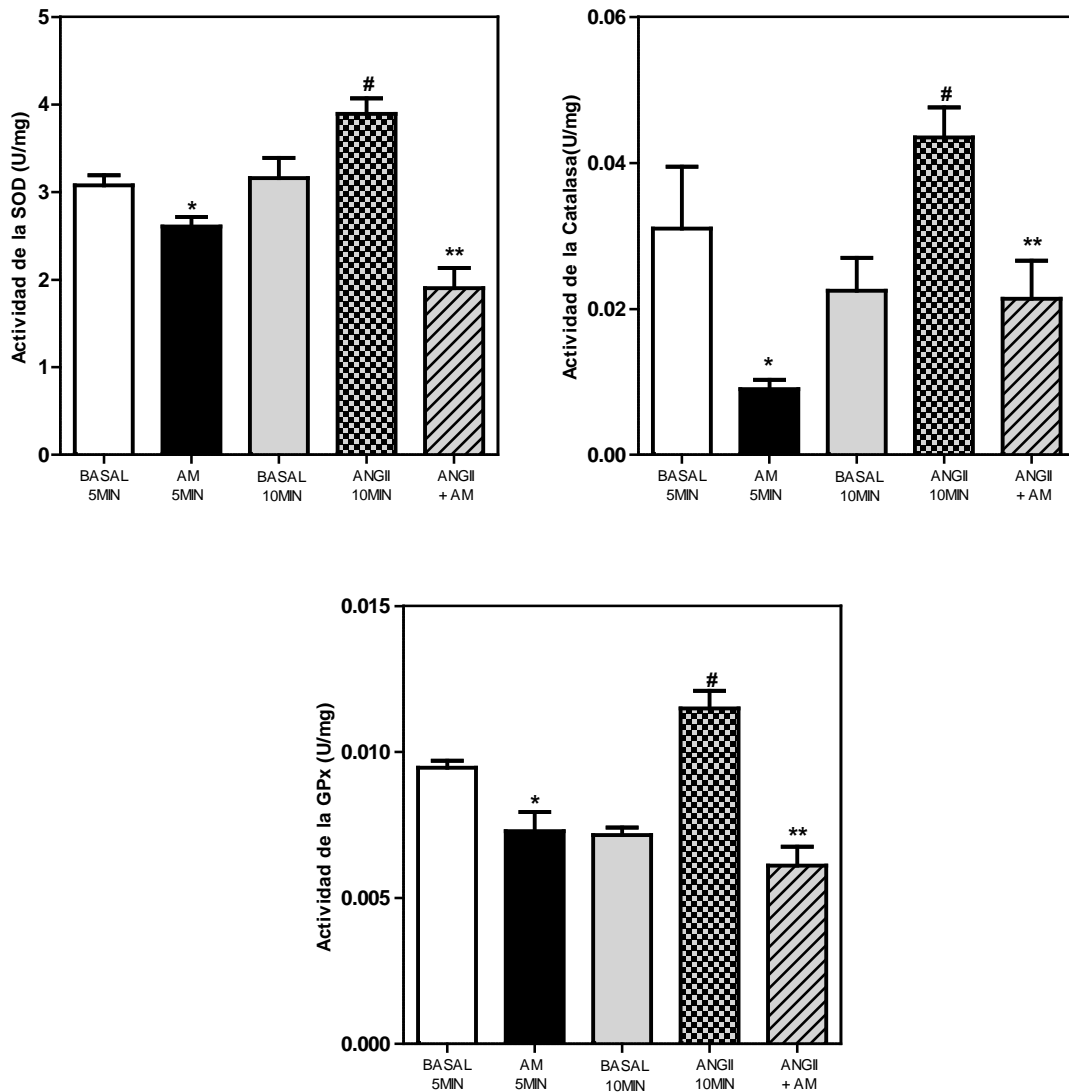
**Fig. 70.** Efecto del tratamiento con valsartán (VAL) *in vivo*, sobre la expresión de CRLR en el vermis de cerebelo de ratas WKY y SHR. Ratas WKY y SHR de 16 semanas de edad fueron tratadas durante 11 días con VAL (60 mg/Kg/día), posteriormente, se sacrificaron y el vermis cerebelar fue destinado para determinación de CRLR. 100 µg de proteínas provenientes del vermis cerebelar de las ratas WKY y SHR fueron empleados para el western blotting. Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  error estándar de la media. La expresión de la CRLR fue normalizada con la de la  $\beta$ -actina. (N=10). \* $p < 0,0001$  vs. control WKY. # $p < 0,0001$  vs. control SHR.



**Fig. 71.** Efecto del tratamiento con valsartán (VAL) *in vivo*, sobre la expresión de RAMP2 en el vermis de cerebelo de ratas WKY y SHR. Ratas WKY y SHR de 16 semanas de edad fueron tratadas durante 11 días con VAL (60 mg/Kg/día), posteriormente, se sacrificaron y el vermis cerebelar fue destinado para determinación de RAMP2. 100 µg de proteínas provenientes del vermis cerebelar de las ratas WKY y SHR fueron empleados para el western blotting. Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  error estándar de la media. La expresión de la RAMP2 fue normalizada con la de la  $\beta$ -actina. (N=10). \* $p < 0,01$  vs. control WKY. # $p < 0,01$  vs. control SHR.

#### **4.10. Efecto de la AM sobre la actividad de las enzimas antioxidantes en el vermis cerebeloso en ratas Sprague - Dawley. Papel de la angiotensina II.**

Se evaluó el efecto de la AM sobre la actividad de las enzimas antioxidantes SOD, CAT y GPx en el vermis cerebelar de la rata Sprague - Dawley. Como se observa en la figura 72, la preincubación del tejido con AM ( $2 \times 10^{-7}$  M), redujo significativamente la actividad de las tres enzimas antioxidantes evaluadas. Por su parte la ANGII ( $2 \times 10^{-7}$  M), incrementó significativamente dichas actividades y a su vez revirtió la disminución de la actividad de las enzimas antioxidantes inducida por la AM.



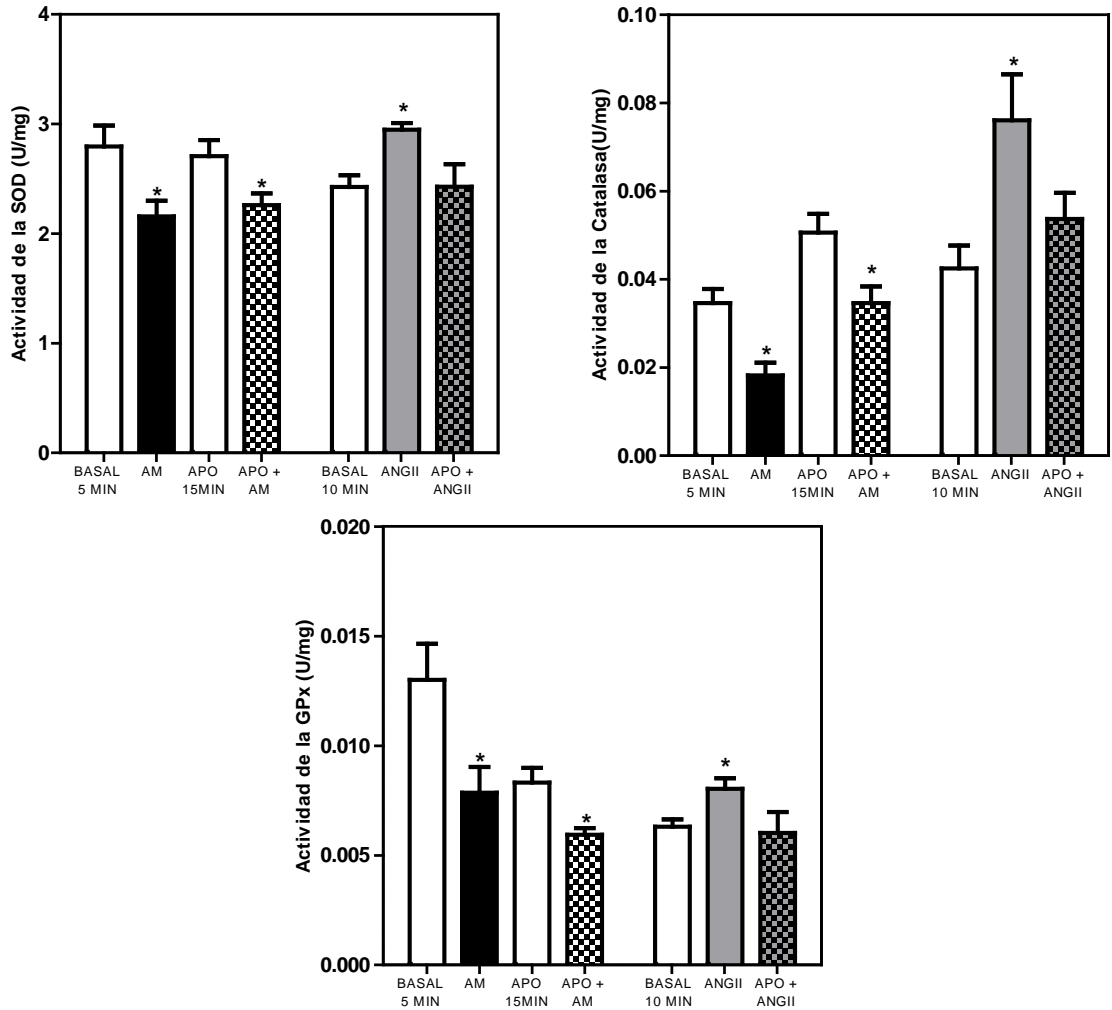
**Fig. 72.** Efecto de la AM y ANG II sobre la actividad de las enzimas antioxidantes, SOD, CAT y GPx en el vermis de cerebelo de ratas Sprague - Dawley. El vermis cerebelar fue incubado con AM ( $2 \times 10^{-7}$  M durante 5 min), ANGII ( $2 \times 10^{-7}$  M durante 10 min) y AM+ANGII ( $2 \times 10^{-7}$  M). Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  error estándar de la actividad específica de las enzimas. \* $p < 0,05$  vs. control (Basal 5 min). #  $p < 0,001$  vs. control (Basal 10min). (N=11). \*\* $p < 0,001$  vs. ANGII.



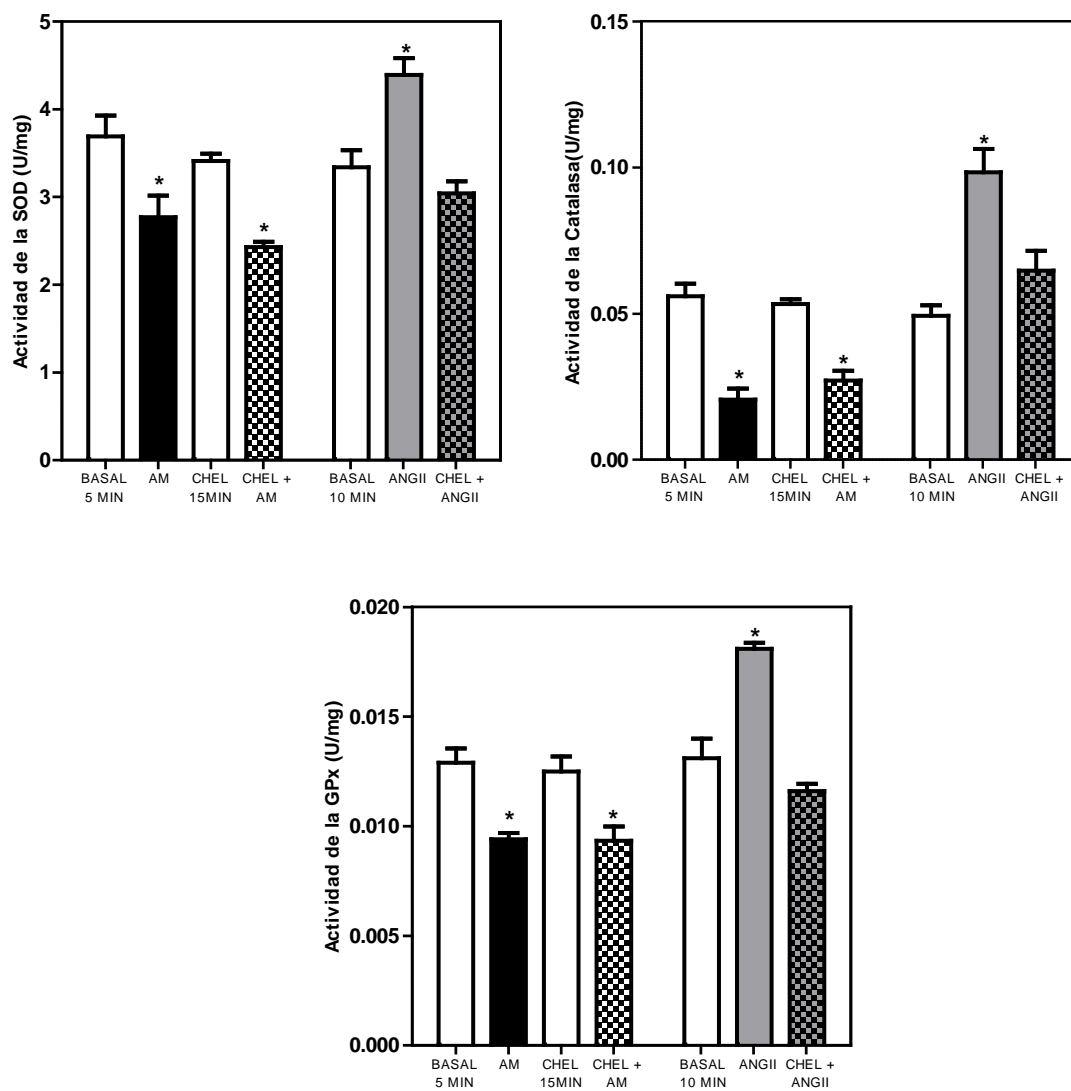
#### **4.11. Papel de la NADP(H) oxidasa, la PKA y la PKC en la acción de la AM y la ANG II sobre la actividad de las enzimas antioxidantes en el vermis del cerebelo de la rata Sprague - Dawley.**

Se evaluó el papel de la NADP(H) oxidasa y la proteína kinasa C (PKC) en la acción de la AM y la ANGII sobre la actividad de las enzimas antioxidantes. Tal y como se muestra en las figuras 73 y 74, la AM ( $2 \times 10^{-7} \text{M}$ ) redujo y la ANG II ( $2 \times 10^{-7} \text{M}$ ) incrementó significativamente la actividad de las tres enzimas antioxidantes ( $p < 0,0001$ ). La preincubación del vermis cerebelar de ratas Sprague - Dawley con apocinina ( $1 \times 10^{-4} \text{M}$ ), un inhibidor de la NAD(P)H oxidasa, o con la chelerritrina ( $6,5 \mu\text{M}$ ), un inhibidor de la PKC, no alteró el efecto reductor de la actividad de las enzimas antioxidantes (SOD, CAT y GPx) inducida por la AM, pero bloqueó completamente la acción estimuladora de la ANG II sobre dichas actividades enzimáticas.

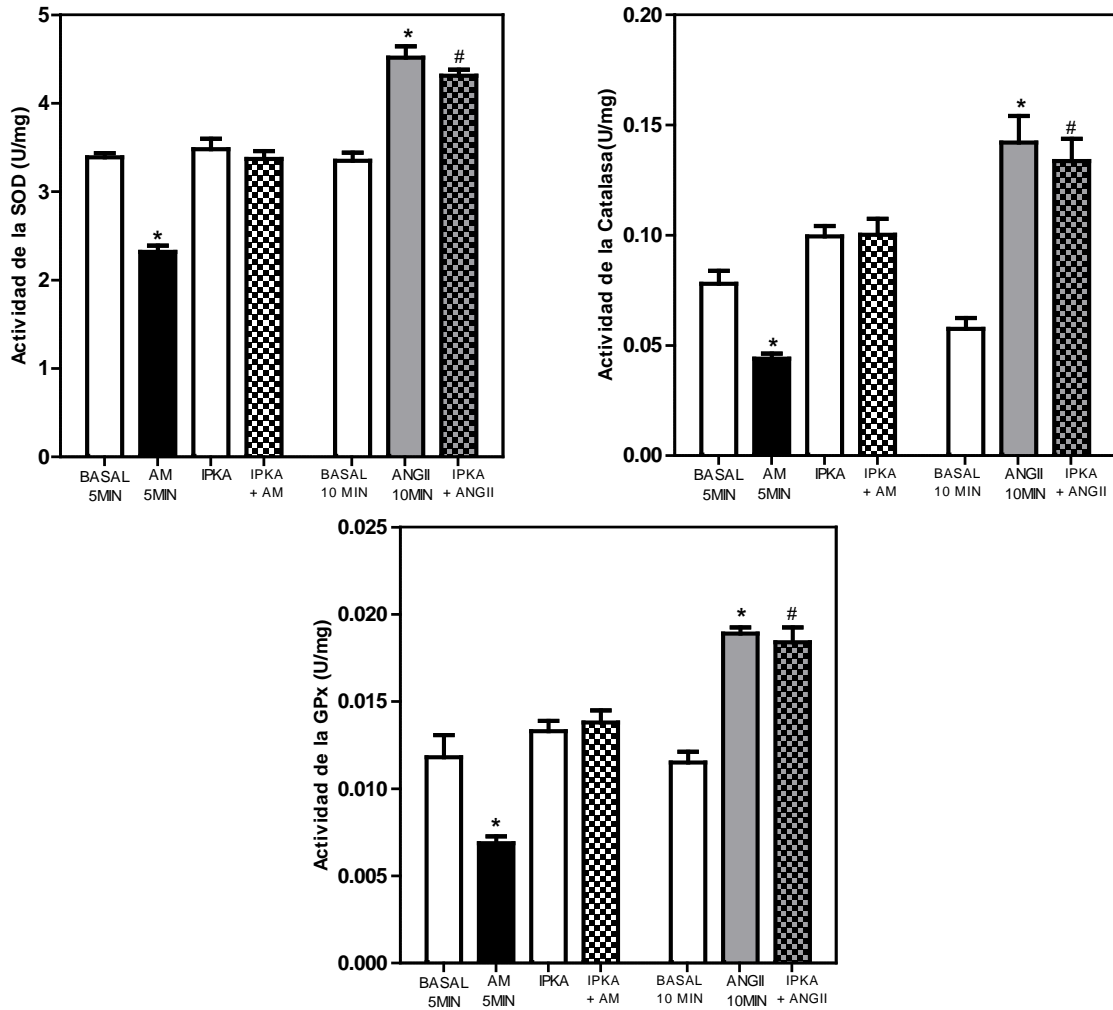
Por otra parte, al evaluar el posible papel de la proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA) sobre la acción de la AM y ANGII sobre la actividad de las enzimas antioxidantes, observamos que la preincubación con un inhibidor de la PKA (PKI-(6-22)-amide) ( $20 \mu\text{M}$ ), bloqueó completamente el efecto inhibitorio de la AM sobre la actividad de las enzimas antioxidantes y no alteró el efecto estimulador de la ANGII (Fig. 75).



**Fig. 73.** Efecto de la apocinina sobre el efecto inducido por la AM y ANG II sobre la actividad de las enzimas antioxidantes, SOD, CAT y GPx en el vermis de cerebelo de ratas Sprague - Dawley. El vermis cerebelar fue incubado con apocinina ( $1 \times 10^{-4}$  M) durante 15 min en presencia o ausencia de AM ( $2 \times 10^{-7}$  M) durante 5 min o ANGIO  $2 \times 10^{-7}$  M durante 10 min. Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  error estándar de la actividad específica de las enzimas. (N=9). \* $p < 0,0001$  vs. respectivo control.



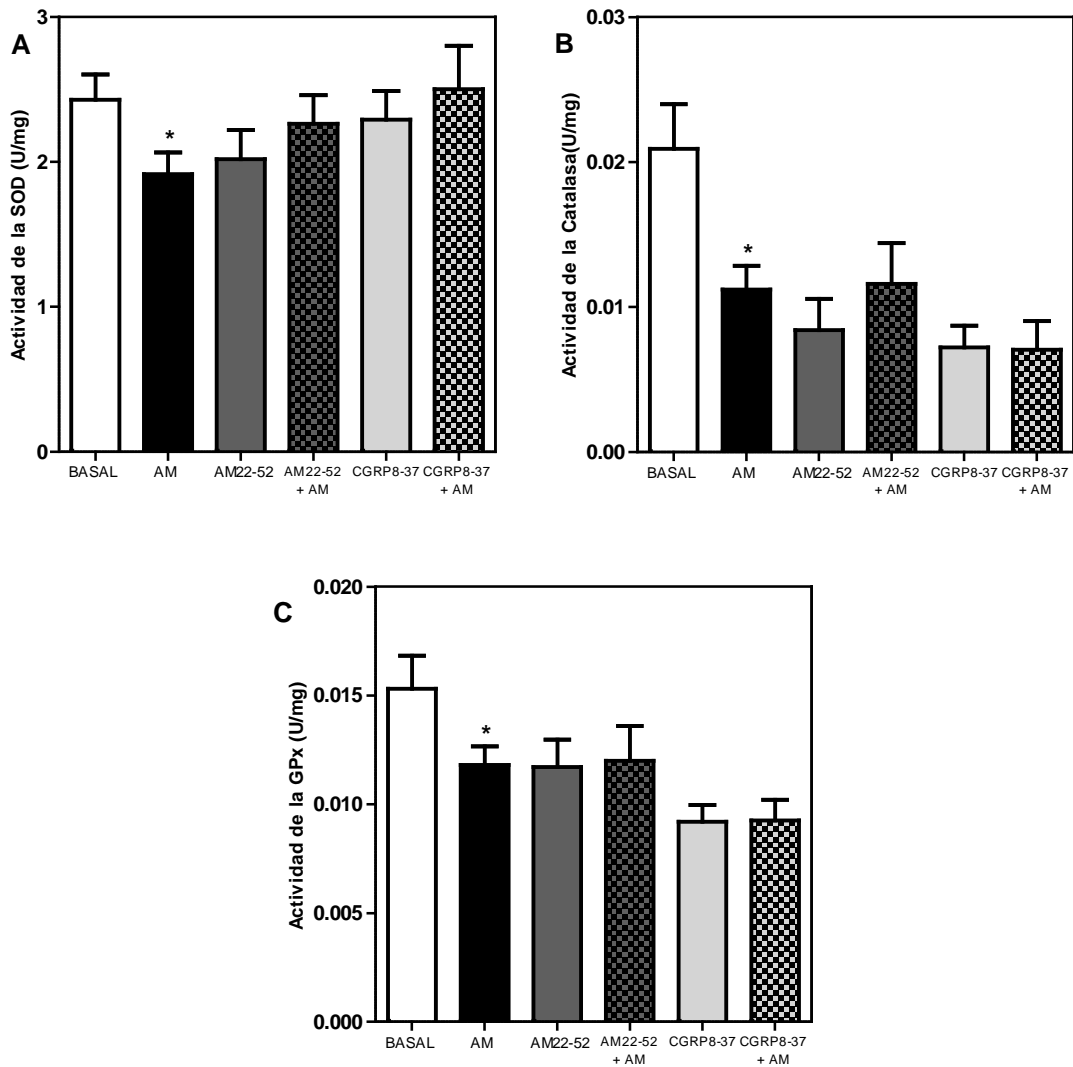
**Fig. 74.** Efecto de la chelitrina sobre el efecto inducido por la AM y ANG II sobre la actividad de las enzimas antioxidantes, SOD, CAT y GPx en el vermis de cerebelo de ratas Sprague - Dawley. El vermis cerebelar fue incubado con chelitrina (6,5  $\mu\text{M}$ ) durante 15 min en presencia o ausencia de AM ( $2 \times 10^{-7} \text{M}$ ) durante 5 min o ANGII ( $2 \times 10^{-7} \text{M}$ ) durante 10 min. Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  error estándar de la actividad específica de las enzimas. (N=8). \* $p < 0,0001$  vs. respectivo control.



**Fig. 75.** Efecto del inhibidor de la PKA (iPKA) sobre el efecto inducido por la AM y ANG II sobre la actividad de las enzimas antioxidantes, SOD, CAT y GPx en el vermis de cerebelo de ratas Sprague - Dawley. El vermis cerebelar fue incubado con iPKA (20  $\mu$ M) durante 15 min en presencia o ausencia de AM ( $2 \times 10^{-7}$ M) durante 5 min o ANGII ( $2 \times 10^{-7}$ M) durante 10 min. Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  error estándar de la actividad específica de las enzimas. (N=8). \* $p < 0,0001$  vs. respectivo control. # $p < 0,001$  vs. respectivo control iPKA

#### **4.12. Subtipos de receptores que median la acción de la AM sobre la actividad de las enzimas antioxidantes en el cerebelo de la rata.**

Se evaluó la posible participación de los subtipos de receptores de AM en la acción de la AM sobre la actividad de las enzimas antioxidantes, SOD, CAT y GPx. Como se observa en la figura 76 el pretratamiento con la AM<sub>22-52</sub> y CGRP<sub>8-37</sub>, antagonista de los receptores de AM y CGRP, respectivamente revirtió el efecto reductor inducido por la AM sobre la actividad de las enzimas antioxidantes (N=31 \*p<0,001).

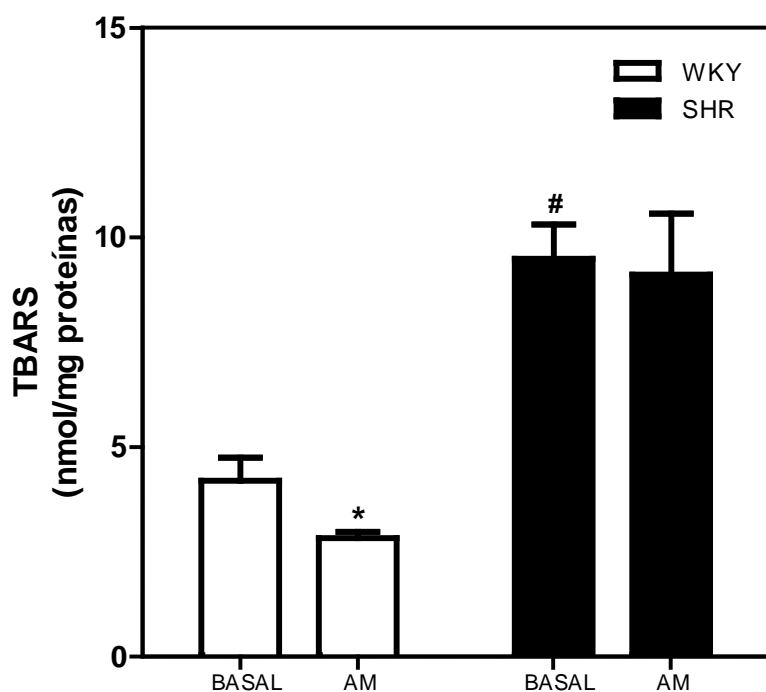


**Fig. 76.** Subtipos de receptores de AM involucrados en la disminución de la actividad de las enzimas antioxidantes, SOD (Panel A), CAT (Panel B) y GPx (Panel C) inducida por la AM en el vermis de cerebelo de ratas Sprague – Dawley. El vermis cerebelar fue preincubado con AM<sub>22-52</sub> ( $1 \times 10^{-6} \text{M}$ ) o CGRP<sub>8-37</sub> ( $1 \times 10^{-6} \text{M}$ ) durante 10 min en presencia y ausencia de AM ( $2 \times 10^{-7} \text{M}$ ) durante 5 min. Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  error estándar de la actividad específica de las enzimas. (N=31). \* $p < 0,0001$  vs. control (Basal 5 min).

#### **4.13. Efecto de la AM sobre la producción de TBARS en el vermis cerebelar de la rata SHR y controles normotensos, WKY adultos.**

Se evaluó el efecto de la AM sobre la producción de TBARS en el vermis cerebelar de ratas SHR y WKY. Como se observa, la incubación del vermis cerebelar con AM ( $2 \times 10^{-7} \text{M}$ ) durante 10 min, disminuyó significativamente la producción de TBARS ( $4,20 \pm 0,55$  vs.  $2,83 \pm 0,15$  Basal 10min vs. AM 10min) (Fig. 77), en las ratas WKY de 16 semanas de edad con respecto a su basal ( $p < 0,05$ . N=6).

Contrariamente, en las ratas SHR la adición al baño de incubación de la AM no alteró la producción de TBARS ( $9,49 \pm 0,82$  vs.  $9,11 \pm 1,46$  Basal 10min vs. AM 10min). Asimismo, se puede observar que los niveles basales de TBARS en las ratas SHR son 2,25 veces mayores que los encontrados en las ratas WKY ( $p < 0,05$ . N=6).



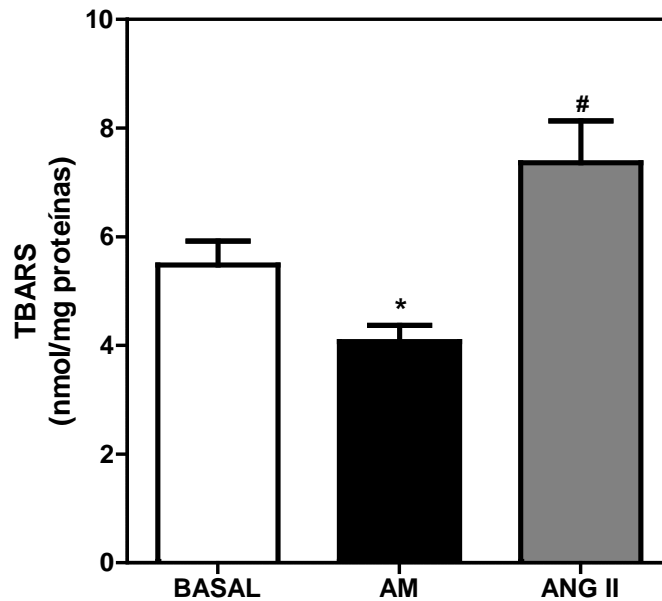
**Fig. 77.** Efecto de la AM sobre la producción de TBARS en el vermis de cerebelo de ratas WKY y SHR. El vermis cerebelar fue incubado con AM ( $2 \times 10^{-7} \text{M}$ ) durante 10 min. Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  error estándar de la producción de TBARS (nmol/mg proteínas). \* $p < 0,05$  vs. control (Basal WKY 10 min). (N=6). #  $p < 0,05$  Basal WKY.

#### 4.14. Efecto de la AM y ANG II sobre la producción de TBARS en el vermis cerebelar de la rata Sprague – Dawley.

Se evaluó el efecto de la AM y ANG II sobre la producción de TBARS en el vermis cerebelar de ratas Sprague - Dawley. Como se observa, la incubación del vermis cerebelar con AM ( $2 \times 10^{-7} \text{M}$ ) durante 10 min, disminuyó significativamente la producción de TBARS ( $5,48 \pm 0,44$  vs.  $4,07 \pm 0,30$  Basal 10min vs. AM 10min) (Fig. 78), en las ratas con respecto a su basal ( $p < 0,05$ . N=6). Ahora bien, la incubación del vermis cerebelar con ANG II ( $2 \times 10^{-7} \text{M}$ ),



incrementó significativamente la producción de TBARS ( $5,48 \pm 0,44$  vs.  $7,36 \pm 0,77$ ; Basal 10min vs. ANG II 10min).

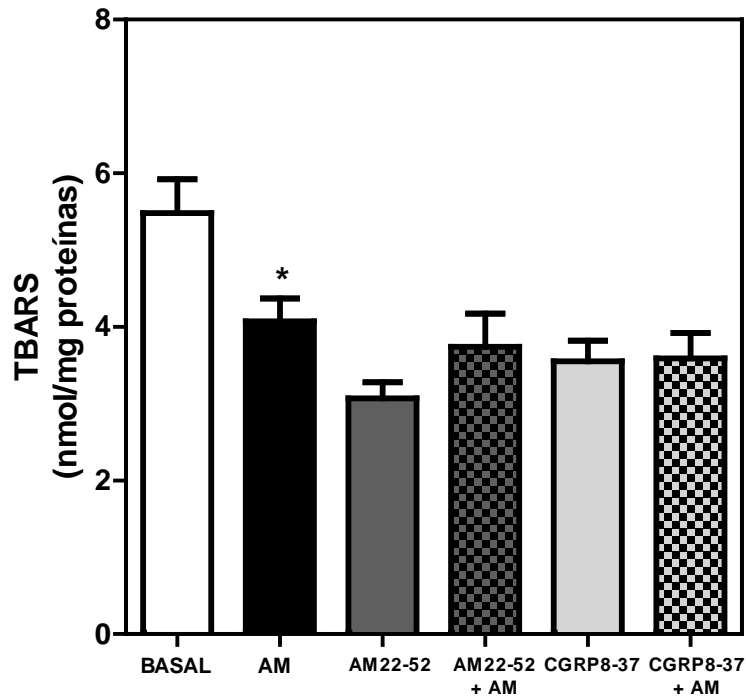


**Fig. 78.** Efecto de la AM y ANG II sobre la producción de TBARS en el vermis de cerebelo de ratas Sprague-Dawley. El vermis cerebelar fue incubado con AM o ANG II ( $2 \times 10^{-7} M$ ) durante 10 min. Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  error estándar de la producción de TBARS (nmol/mg proteínas). \* $p < 0,05$  vs. control (Basal 10 min) (N=6).

#### 4.15. Subtipos de receptores que median la acción de la AM sobre la producción de TBARS en el cerebelo de la rata.

Se evaluó la posible participación de los subtipos de receptores de AM en la acción de la AM sobre la producción de TBARS. Como se observa en la figura 79, el pretratamiento con la  $AM_{22-52}$  y  $CGRP_{8-37}$ , antagonista de los receptores

de AM y CGRP, respectivamente revirtió el efecto reductor inducido por la AM sobre la producción de TBARS (N=6 \*p<0,05).

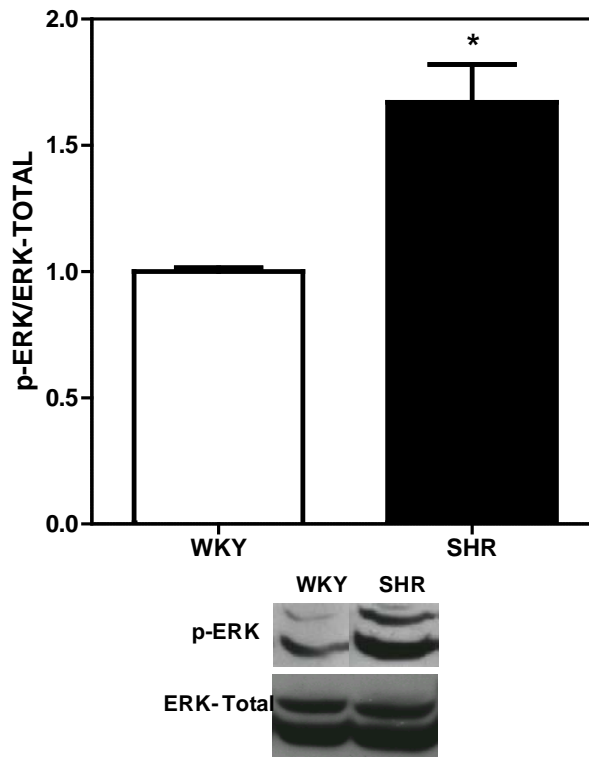


**Fig. 79.** Subtipos de receptores de AM involucrados en la disminución de la producción de TBARS inducida por la AM en el vermis de cerebelo de ratas Sprague – Dawley. El vermis cerebelar fue preincubado con AM<sub>22-52</sub> (1X10<sup>-6</sup>M) o CGRP<sub>8-37</sub> (1X10<sup>-6</sup>M) durante 15 min en presencia y ausencia de AM (2X10<sup>-7</sup>M) durante 10 min. Los resultados fueron expresados como la media ± error estándar de la producción de TBARS (nmol/mg proteínas). \*p<0,05 vs. control (Basal 10 min) (N=6).

#### 4.16. Papel de la hipertensión sobre la activación basal de las ERK en el vermis del cerebelo de la rata.

En la figura 80 se muestran los resultados de los inmunoblots analizados en el vermis del cerebelo contra anticuerpos anti-p-ERK en ratas SHR y WKY de 16

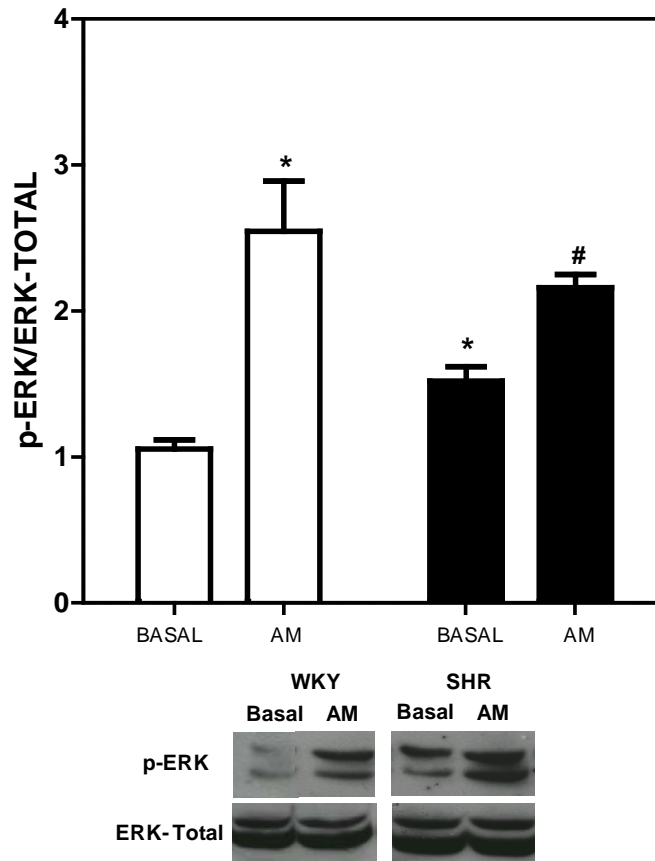
semanas de edad. Se muestran los resultados del análisis densitométrico de los datos normalizados con la expresión de la ERK-total. Como se observa, la expresión de la ERK en el vermis del cerebelo fue significativamente mayor en las ratas SHR ( $1,67 \pm 0,14$  vs.  $1,00 \pm 0,01$ ), cuando se compara con las WKY ( $N=10$ ;  $p<0,0001$ ). Los resultados de los western blot fueron expresados como la media  $\pm$  error estándar de la misma y normalizados con el respectivo control.



**Fig. 80.** Efecto de la hipertensión sobre la expresión basal de las p-ERK en el vermis de cerebelo de ratas WKY y SHR. 100  $\mu$ g de proteínas provenientes del vermis cerebelar de las ratas WKY y SHR de 16 semanas de edad fueron empleados para el western blotting. Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  error estándar de la media. La expresión de la p-ERK fue normalizada con la de la ERK-total. ( $N=10$ ). \* $p<0,0001$  vs. WKY.

#### **4.17. Efecto de la AM sobre la activación de la vía de señalización ERK en el vermis cerebeloso en ratas SHR y WKY.**

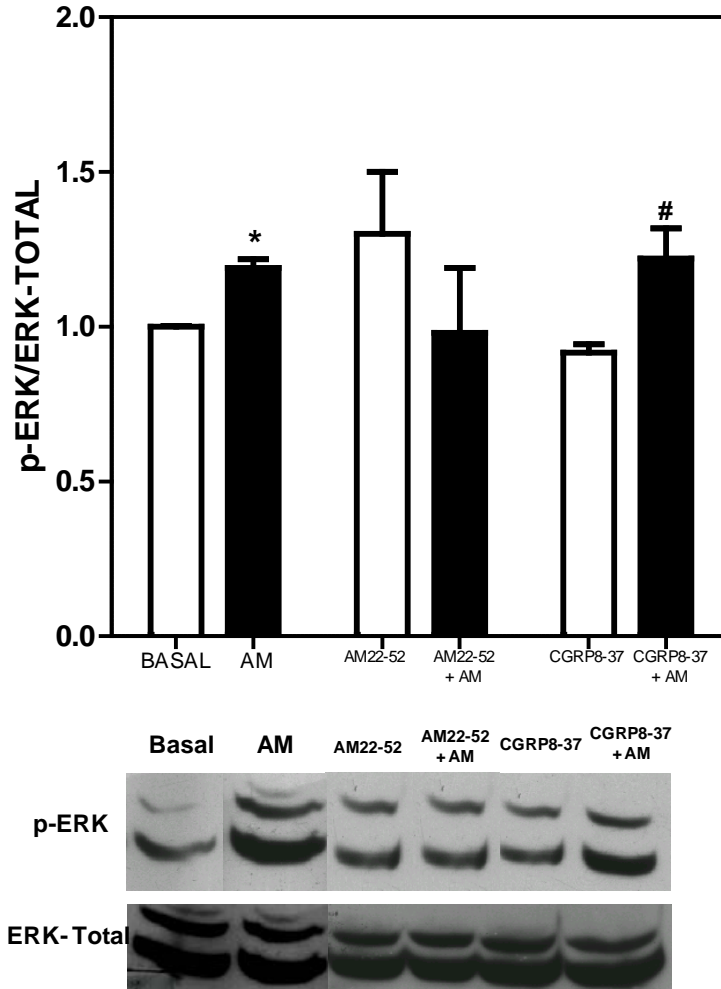
Se evaluó el efecto de la AM sobre la activación de las ERK en el vermis cerebelar de ratas SHR y WKY adultas. Como se puede apreciar, la incubación del vermis cerebelar con AM ( $2 \times 10^{-7}$  M) durante 5 min, activó de manera significativa las ERK ( $1,05 \pm 0,06$  vs.  $2,54 \pm 0,34$  Basal vs. AM) (Fig. 81) en las ratas WKY de 16 semanas de edad con respecto a su control ( $p < 0,001$ . N=17). De igual manera, en las ratas SHR la adición al baño de incubación de la AM incrementó la fosforilación de las ERK cuando se compara con su basal ( $1,52 \pm 0,09$  vs.  $2,16 \pm 0,10$  Basal vs. AM). Sin embargo, la magnitud de su activación resultó ser significativamente menor cuando se compara con la de las WKY.



**Fig. 81.** Efecto de la AM sobre la activación (fosforilación) de las ERK en el vermis de cerebelo de ratas WKY y SHR. El vermis cerebelar fue incubado con AM ( $2 \times 10^{-7}$  M durante 5 min). 100  $\mu$ g de proteínas provenientes del vermis cerebelar de las ratas WKY y SHR de 16 semanas de edad fueron empleados para el western blotting. Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  error estándar de la media. La expresión de la p-ERK fue normalizada con la de la ERK-total. (N=17). \* $p < 0,001$  vs. WKY Basal. #  $p < 0,001$  vs. SHR Basal.

#### **4.18. Subtipos de receptores que median la acción de la AM sobre la activación de la ERK en el cerebelo de la rata.**

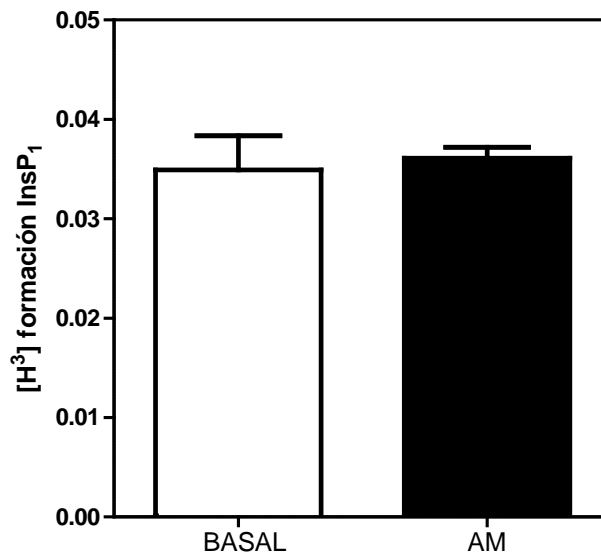
Se evaluó la posible participación de los subtipos de receptores de AM en las acciones de la AM sobre la activación de las ERK. Como se observa en la figura 82, el pretratamiento con la  $AM_{22-52}$ , antagonista de los receptores de AM, durante 10 min, bloqueó completamente la activación de las ERK inducida por la AM en el vermis cerebelar de ratas Sprague - Dawley ( $1,3 \pm 0,2$  vs.  $0,98 \pm 0,21$   $AM_{22-52}$  vs.  $AM_{22-52}+AM$ ). Por su parte, la adición de  $CGRP_{8-37}$ , antagonista del receptor CGRP, no alteró la activación de las ERK inducida por la AM ( $0,91 \pm 0,02$  vs.  $1,22 \pm 0,09$   $CGRP_{8-37}$  vs.  $CGRP_{8-37} + AM$ ) (N=12 \* $p < 0,001$ ).



**Fig. 82.** Subtipos de receptores de AM involucrados en la activación (fosforilación) de las ERK en el vermis de cerebelo de ratas Sprague – Dawley. El vermis cerebelar fue incubado con AM<sub>22-52</sub> ( $1 \times 10^{-6} \text{M}$ ) o CGRP<sub>8-37</sub> ( $1 \times 10^{-6} \text{M}$ ) durante 10 min en presencia y ausencia de AM ( $2 \times 10^{-7} \text{M}$ ) durante 5 min. 100  $\mu\text{g}$  de proteínas provenientes del vermis cerebelar de las ratas fueron empleados para el western blotting. Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  error estándar de la media. La expresión de la p-ERK fue normalizada con la de la ERK-total. (N=12). \* $p < 0,001$  vs. Basal. #  $p < 0,0001$  vs. CGRP<sub>8-37</sub>.

#### 4.19. Efecto de la AM sobre la activación de la producción de fosfoinositol en el vermis cerebeloso en la rata.

Se evaluó el efecto de la AM sobre la activación de la vía de señalización fosfatidilinositol en el vermis de cerebelo de ratas Sprague – Dawley. Como se observa, en la figura 83 la incubación del vermis cerebelar con AM ( $2 \times 10^{-7}$  M) durante 5 min, no alteró la acumulación de monofosfato de inositol cuando se compara con su basal ( $0,035 \pm 0,003$  vs.  $0,036 \pm 0,001$  Basal vs. AM). (N=6).



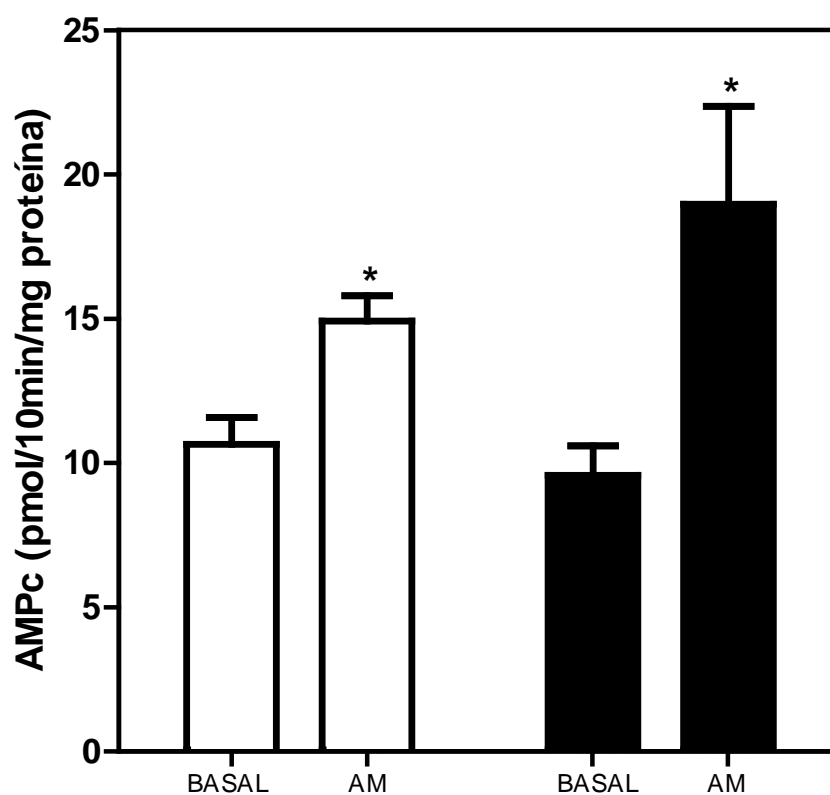
**Fig. 83.** Efecto de la AM sobre la activación de la producción de monofosfato de inositol en el vermis de cerebelo de ratas Sprague - Dawley. El vermis cerebelar fue incubado con AM ( $2 \times 10^{-7}$  M durante 5 min) o vehículo (Basal). Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  error estándar de la acumulación de  $[H^3]$  InsP<sub>1</sub> (N=6).

#### 4.20. Efecto de la AM sobre la producción de AMPc en el vermis cerebeloso de ratas WKY y SHR.

Se evaluó el efecto de la AM sobre la producción de AMPc en el vermis de cerebelo de ratas SHR y WKY de 16 semanas de edad. Como se observa, en la



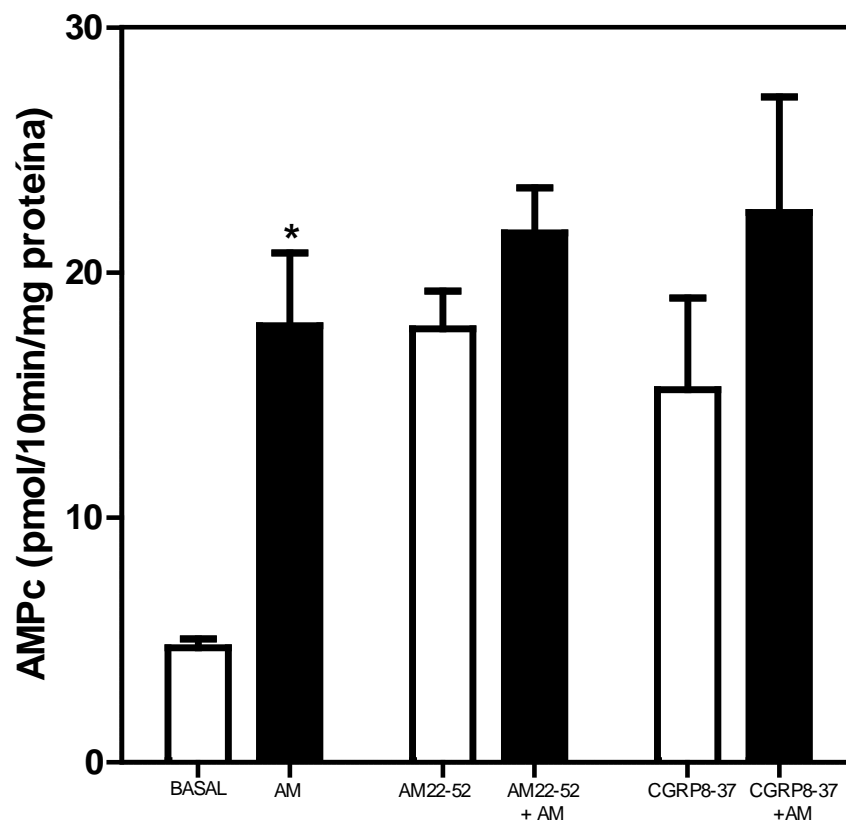
figura 84 la incubación del vermis cerebelar con AM ( $2 \times 10^{-7}$  M) durante 10 min, provocó un incremento significativo en la acumulación del AMPc cuando se compara con su basal en las ratas WKY ( $10,64 \pm 0,93$  vs.  $14,92 \pm 0,87$  Basal vs. AM) (N=6).  $p < 0,05$ . De igual modo, en las ratas SHR la adición al baño de incubación de la AM provocó un incremento en la acumulación del AMPc ( $9,57 \pm 1,03$  vs.  $18,96 \pm 3,40$  Basal vs. AM).



**Fig. 84.** Efecto de la AM sobre la producción de AMPc en el vermis de cerebelo de ratas WKY y SHR. El vermis cerebelar fue incubado con AM ( $2 \times 10^{-7}$  M) o vehículo durante 10 min. Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  error estándar de la acumulación de AMPc/mg proteína. (N=6). \* $p < 0,05$  vs. respectivo Basal.

#### **4.21. Subtipos de receptores que median la acción de la AM sobre la producción de AMPc en el cerebelo de la rata Sprague - Dawley.**

Se evaluó la posible participación de los subtipos de receptores de AM en los efectos de la AM sobre la acumulación del AMPc en el vermis de cerebelo de ratas Sprague - Dawley. Como se observa en la figura 85, el pretratamiento con la AM<sub>22-52</sub>, antagonista de los receptores de AM, durante 10 min, bloqueó la acumulación del AMPc inducida por la AM en el vermis cerebelar de ratas Sprague - Dawley a niveles comparables a sus valores basales (17,70 ± 1,53 vs. 21,60 ± 1,84 AM<sub>22-52</sub> vs. AM<sub>22-52</sub>+AM). De igual manera, la adición de CGRP<sub>8-37</sub>, antagonista del receptor CGRP, bloqueó la acumulación de AMPc inducido por la AM (15,22 ± 3,74 vs. 22,45 ± 4,71 CGRP<sub>8-37</sub> vs. CGRP<sub>8-37</sub> + AM) (N=7 \*p<0,0001).



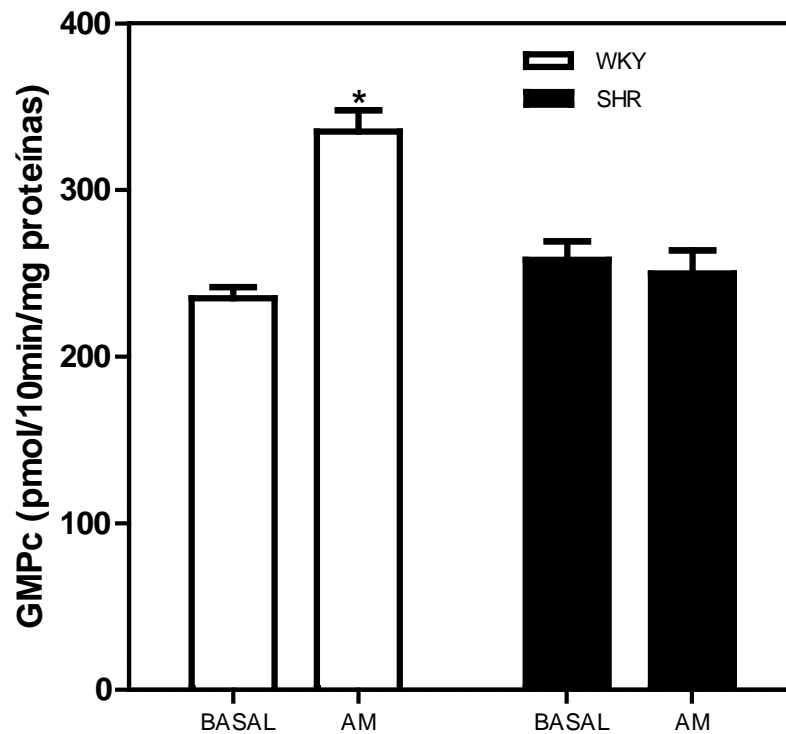
**Fig. 85.** Subtipos de receptores de AM involucrados en la producción de AMPc en el vermis de cerebelo de ratas Sprague – Dawley. El vermis cerebelar fue incubado con AM<sub>22-52</sub> ( $1 \times 10^{-6} \text{M}$ ) o CGRP<sub>8-37</sub> ( $1 \times 10^{-6} \text{M}$ ) durante 10 min en presencia y ausencia de AM ( $2 \times 10^{-7} \text{M}$ ). Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  error estándar de la acumulación de AMPc. (N=7). \* $p < 0,0001$  vs. Basal.

#### 4.22. Efecto de la AM sobre la activación de la guanilil ciclasa en el vermis cerebeloso de ratas WKY y SHR.

Se evaluó el efecto de la AM sobre la activación de la guanilil ciclasa en el vermis de cerebelo de ratas SHR y WKY de 16 semanas de edad. Como se observa, en la figura 86 la incubación del vermis cerebelar con AM ( $2 \times 10^{-7} \text{M}$ )

durante 10 min, provocó un incremento significativo de la acumulación del GMPc cuando se compara con su basal en las ratas WKY ( $235,11 \pm 6,55$  vs.  $335,00 \pm 12,81$  Basal vs. AM), pues la acumulación de GMPc en las ratas WKY incubadas con AM es 43% mayor con respecto a su basal (N=11).  $p < 0,001$ .

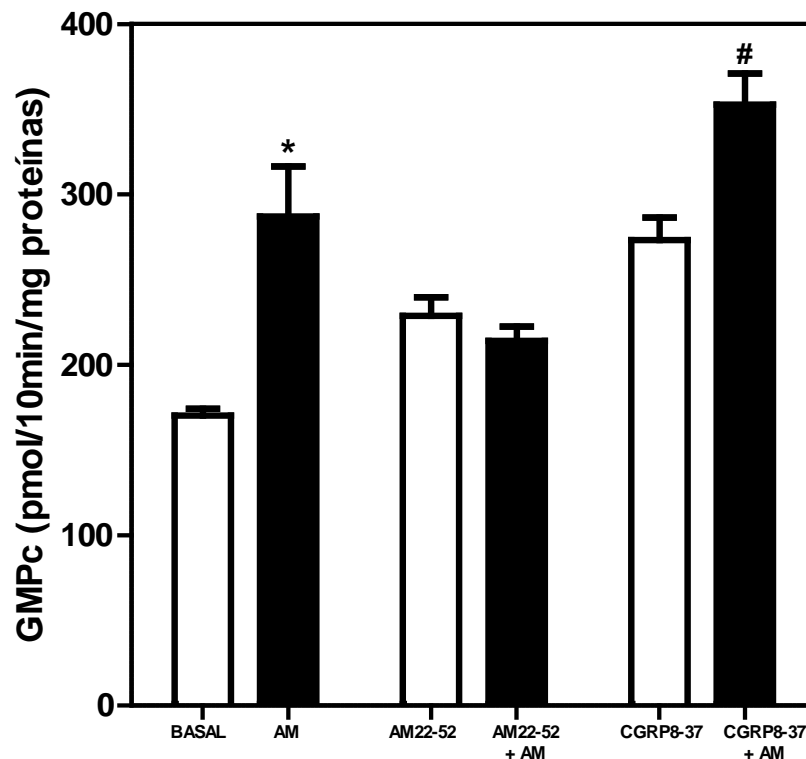
Contrariamente, en las ratas SHR la adición al baño de incubación de la AM no alteró la acumulación del GMPc ( $258,14 \pm 11,14$  vs.  $249,91 \pm 13,91$  Basal vs. AM).



**Fig. 86.** Efecto de la AM sobre la activación de la guanilil ciclasa en el vermis de cerebelo de ratas WKY y SHR. El vermis cerebelar fue incubado con AM ( $2 \times 10^{-7}$  M) o vehículo durante 10 min. Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  error estándar de la acumulación de GMPc. (N=11). \* $p < 0,001$  vs. Basal WKY.

#### **4.23. Subtipos de receptores que median la acción de la AM sobre la activación de la guanilil ciclasa en el cerebelo de la rata Sprague - Dawley.**

Se evaluó la posible participación de los subtipos de receptores de AM en los efectos de la AM sobre la acumulación del GMPc en el vermis de cerebelo de ratas Sprague - Dawley. Como se observa en la figura 87, el pretratamiento con la AM<sub>22-52</sub>, antagonista de los receptores de AM, durante 10 min, bloqueó la acumulación del GMPc inducida por la AM en el vermis cerebelar de ratas Sprague - Dawley a niveles comparables a sus valores basales (228,82 ± 10,91 vs. 214,00 ± 8,37 AM<sub>22-52</sub> vs. AM<sub>22-52</sub>+AM). Por su parte, la adición de CGRP<sub>8-37</sub>, antagonista del receptor CGRP, no alteró la acumulación de GMPc inducido por la AM (273,30 ± 13,09 vs. 352,80 ± 18,20 CGRP<sub>8-37</sub> vs. CGRP<sub>8-37</sub> + AM) (N=23 \*p<0,0001).



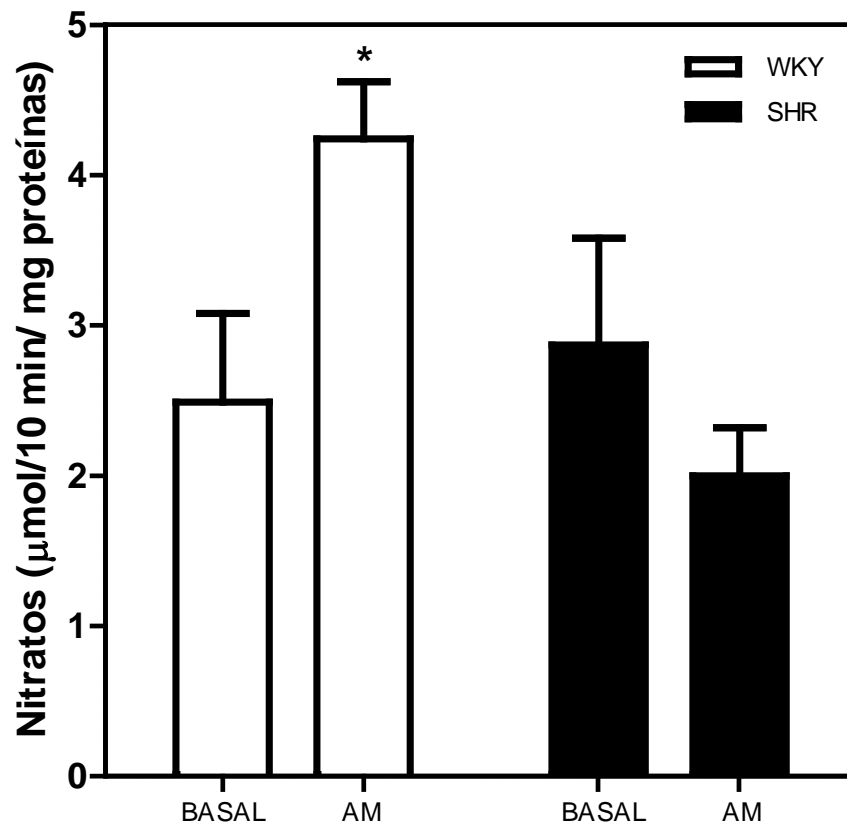
**Fig. 87.** Subtipos de receptores de AM involucrados en la activación de la guanilil ciclasa en el vermis de cerebello de ratas Sprague – Dawley. El vermis cerebelar fue incubado con AM<sub>22-52</sub> ( $1 \times 10^{-6}$  M) o CGRP<sub>8-37</sub> ( $1 \times 10^{-6}$  M) durante 10 min en presencia y ausencia de AM ( $2 \times 10^{-7}$  M). Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  error estándar de la acumulación de GMPc. (N=23). \* $p < 0,0001$  vs. Basal. #  $p < 0,0001$  vs. CGRP<sub>8-37</sub>.

#### 4.24. Efecto de la AM sobre la producción de NO en el vermis cerebeloso de ratas WKY y SHR.

Se evaluó el efecto de la AM sobre la producción de NO en el vermis de cerebello de ratas SHR y WKY de 16 semanas de edad. Como se observa, en la figura 88 la incubación del vermis cerebelar con AM ( $2 \times 10^{-7}$  M) durante 10 min, provocó un incremento significativo de la acumulación de nitratos cuando se compara con su basal en las ratas WKY ( $2,49 \pm 0,59$  vs.  $4,24 \pm 0,38$  Basal vs.

AM), pues la acumulación de nitratos en las ratas WKY incubadas con AM es 70% mayor con respecto a su basal (N=5).  $p < 0,05$ .

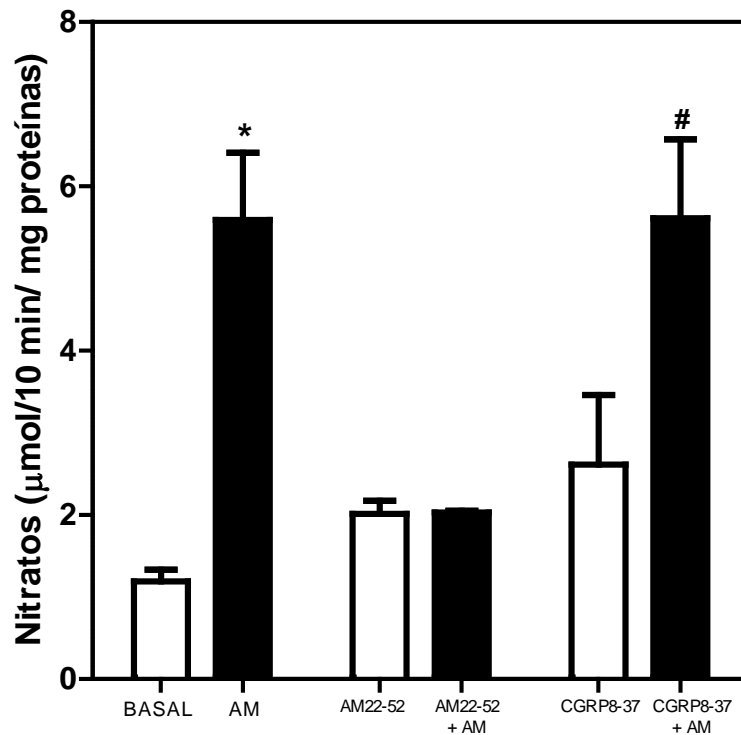
Contrariamente, en las ratas SHR la adición al baño de incubación de la AM no alteró la acumulación de nitrato ( $2,87 \pm 0,72$  vs.  $2,00 \pm 0,32$  Basal vs. AM).



**Fig. 88.** Efecto de la AM sobre la producción de nitratos en el vermis de cerebelo de ratas WKY y SHR. El vermis cerebelar fue incubado con AM ( $2 \times 10^{-7} \text{M}$ ) o vehículo durante 10 min. Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  error estándar de la producción de nitratos. (N=5). \* $p < 0,05$  vs. Basal WKY.

#### 4.25. Subtipos de receptores que median la acción de la AM sobre la producción de NO en el cerebelo de la rata Sprague - Dawley.

Se evaluó la posible participación de los subtipos de receptores de AM en los efectos de la AM sobre la producción de NO en el vermis de cerebelo de ratas Sprague - Dawley. Como se observa en la figura 89, el pretratamiento con la AM<sub>22-52</sub>, antagonista de los receptores de AM, durante 10 min, bloqueó la acumulación del NO inducida por la AM en el vermis cerebelar de ratas Sprague - Dawley a niveles comparables a sus valores basales (2,01 ± 0,16 vs. 2,03 ± 0,02 AM<sub>22-52</sub> vs. AM<sub>22-52</sub>+AM). Por su parte, la adición de CGRP<sub>8-37</sub>, antagonista del receptor CGRP, no alteró la producción de NO inducido por la AM (2,61 ± 0,85 vs. 5,61 ± 0,96 CGRP<sub>8-37</sub> vs. CGRP<sub>8-37</sub> + AM) (N=5 \*p<0,05).



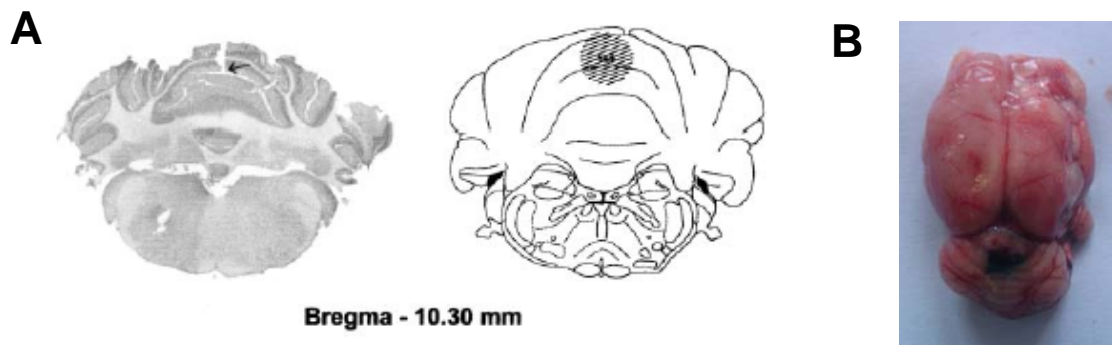
**Fig. 89.** Subtipos de receptores de AM involucrados en la producción de NO en el vermis de cerebelo de ratas Sprague – Dawley. El vermis cerebelar fue incubado con AM<sub>22-52</sub> (1X10<sup>-6</sup>M) o CGRP<sub>8-37</sub> (1X10<sup>-6</sup>M) durante 15 min en presencia y ausencia de AM (2 X10<sup>-7</sup>M). Los resultados fueron expresados



como la media  $\pm$  error estándar de la producción de nitratos. (N=5). \*p<0,05 vs. Basal. # p<0,05 vs. CGRP<sub>8-37</sub>.

#### 4.26. Efecto de la administración intracerebelar de AM sobre la presión arterial en ratas Sprague - Dawley, WKY y SHR adultas.

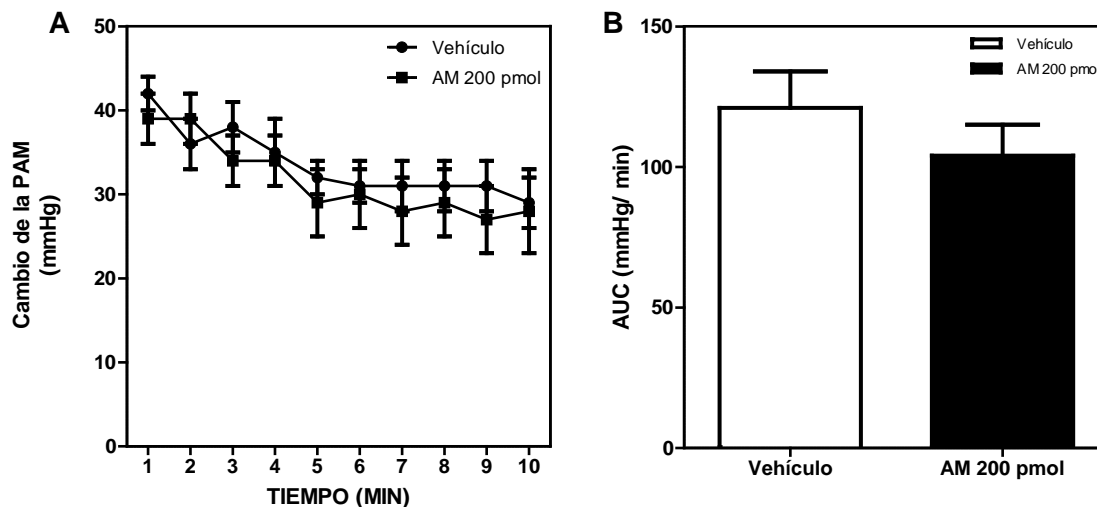
Se evaluó el efecto de la administración *in situ* de AM en el vermis de cerebelo sobre la presión arterial en ratas Sprague - Dawley, WKY y SHR de 16 semanas de edad *in vivo*. Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  error estándar del cambio de la PAM (mmHg) con respecto a sus valores basales (antes de la administración de AM o vehículo). Únicamente se tomaron los datos de aquellos animales en los que el colorante se localizó en el vermis cerebeloso (Fig. 90).



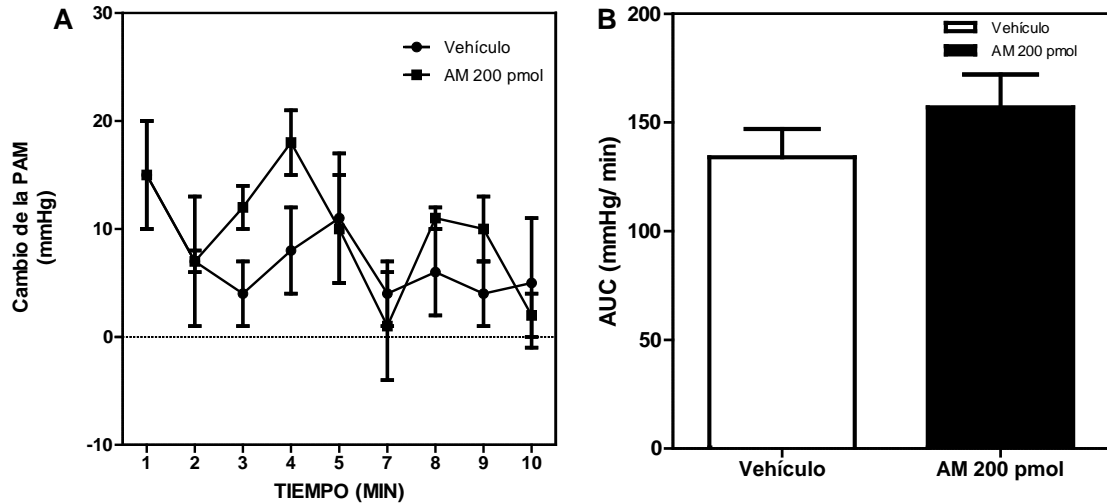
**Fig. 90.** Coordenadas Estereotáficas empleadas para la canulación de los animales. Coordenadas estereotáficas (Panel A) (Sacchetti y col., 2002). Confirmación del sitio de la canulación con la tinción *green fast* (5  $\mu$ L).

Como se observa, en las figuras 91 y 92 la administración intracerebelar de vehículo o AM (200 pmol/5 $\mu$ L), en ratas Sprague-Dawley (SD) y WKY, ocasionó incrementos de la PAM, expresada como delta de incremento sobre su propio

basal. Aún más, los incrementos ocasionados por el vehículo y la AM no fueron diferentes entre sí. Esto se muestra en la figura de la derecha donde se expresan los resultados como área bajo la curva (AUC) ( $V=121 \pm 13$ ;  $AM-SD=104 \pm 11$  y  $V=134 \pm 13$  y  $WKY-AM=157 \pm 15$ ) ( $N=10$ ).

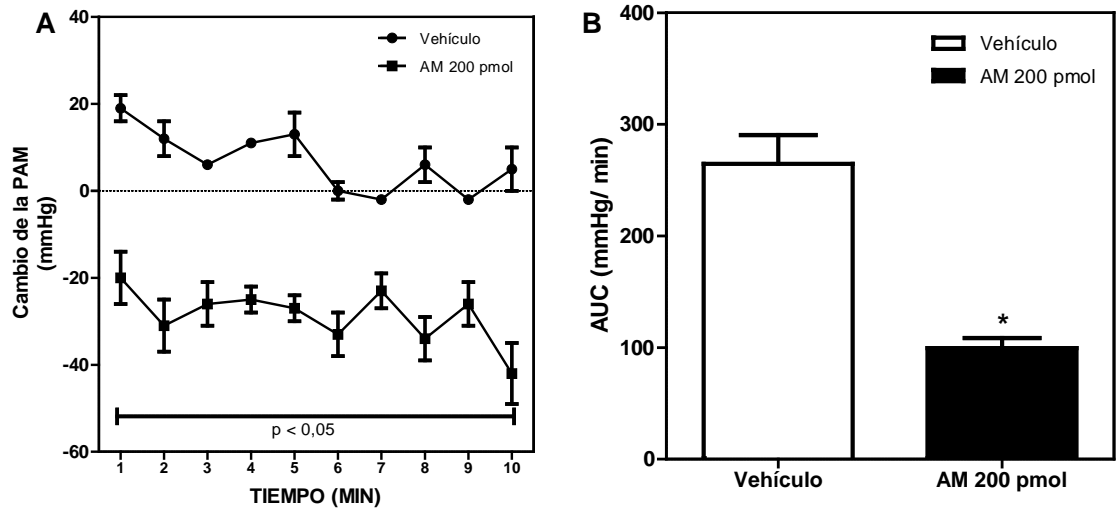


**Fig. 91.** Efecto de la administración *in situ* de AM en el vermis de cerebelo de ratas Sprague - Dawley sobre la presión arterial media. Se administró AM (200 pmol/5 $\mu$ L) o vehículo en ratas canuladas en el vermis de cerebelo, se determinó la PAM antes y después (durante 10min) de la administración de los fármacos, y se determinó el cambio de la PAM como la diferencia de la PAM después y antes de la administración de los tratamientos. Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  error estándar del cambio de PAM (Panel A). Se determinó el área bajo la curva (AUC) del cambio de la PAM para cada tratamiento (Panel B). Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  error estándar de la AUC. ( $N=10$ ).

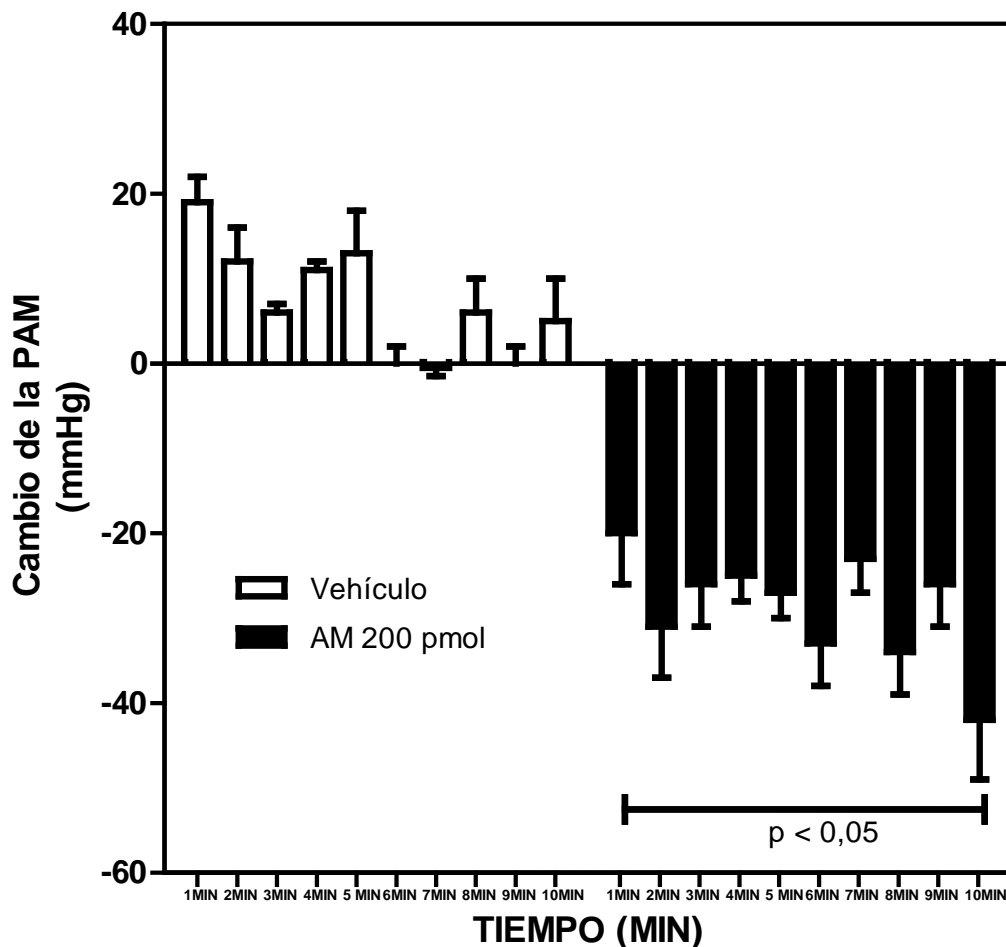


**Fig. 92.** Efecto de la administración *in situ* de AM en el vermis de cerebelo de ratas WKY sobre la presión arterial media. Se administró AM (200 pmol/5 $\mu$ L) o vehículo en ratas canuladas en el vermis de cerebelo, se determinó la PAM antes y después (durante 10min) de la administración de los fármacos, y se determinó el cambio de la PAM como la diferencia de la PAM después y antes de la administración de los tratamientos. Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  error estándar del cambio de PAM (Panel A). Se determinó el área bajo la curva (AUC) del cambio de la PAM para cada tratamiento (Panel B). Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  error estándar de la AUC. (N=10).

Por su parte, en las ratas SHR la administración intracerebelar de AM (200 pmol/5 $\mu$ L) ocasionó una disminución estadísticamente significativa en el cambio de PAM cuando se compara con el vehículo, siendo la caída en la PAM de 20 a 40 mmHg (Fig. 93 y 94). Al expresar los resultados como AUC del delta de PAM, se evidencia una reducción significativa (V=264,50  $\pm$  26,0 vs. SHR-AM=99,5  $\pm$  8). (N=17, p<0,05) (Fig. 93 y 94).



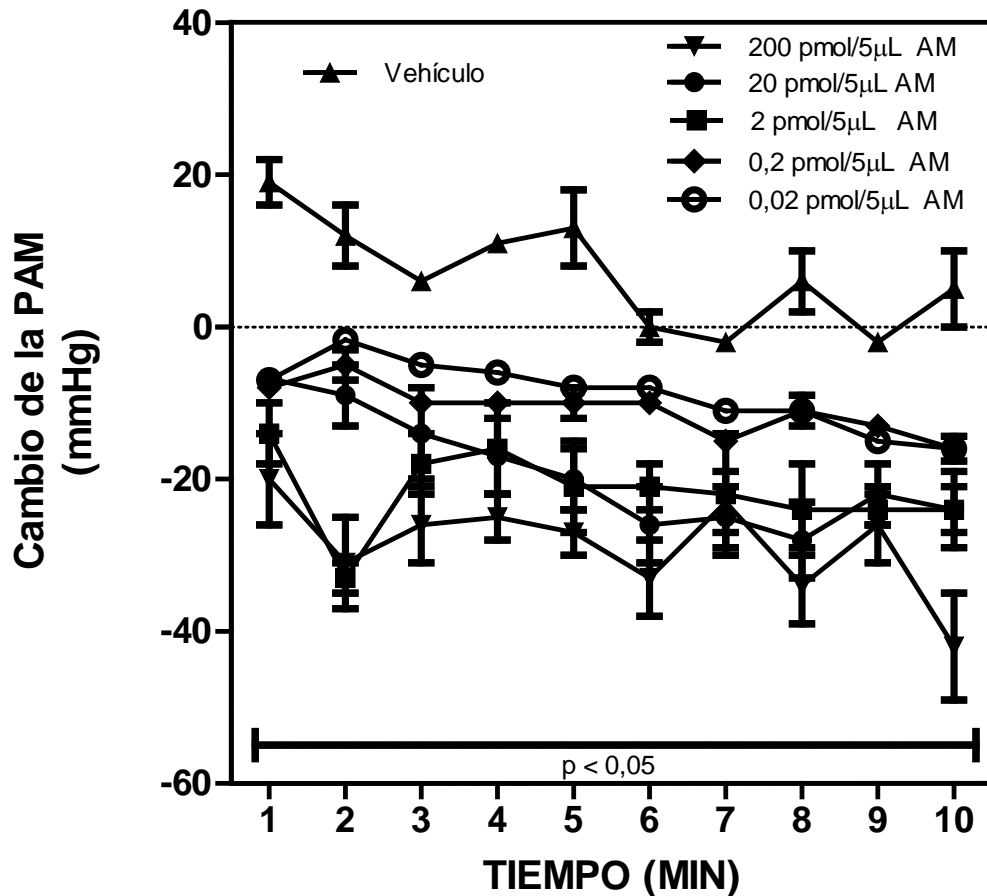
**Fig. 93.** Efecto de la administración *in situ* de AM en el vermis de cerebelo de ratas SHR sobre la presión arterial media. Se administró AM (200 pmol) o vehículo en ratas canuladas en el vermis de cerebelo, se determinó la PAM antes y después (durante 10min) de la administración de los fármacos, y se determinó el cambio de la PAM como la diferencia de la PAM después y antes de la administración de los tratamientos. Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  error estándar del cambio de PAM (Panel A). Se determinó el área bajo la curva (AUC) del cambio de la PAM para cada tratamiento (Panel B). Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  error estándar de la AUC. (N=17). \*p<0,05 vs. Vehículo.



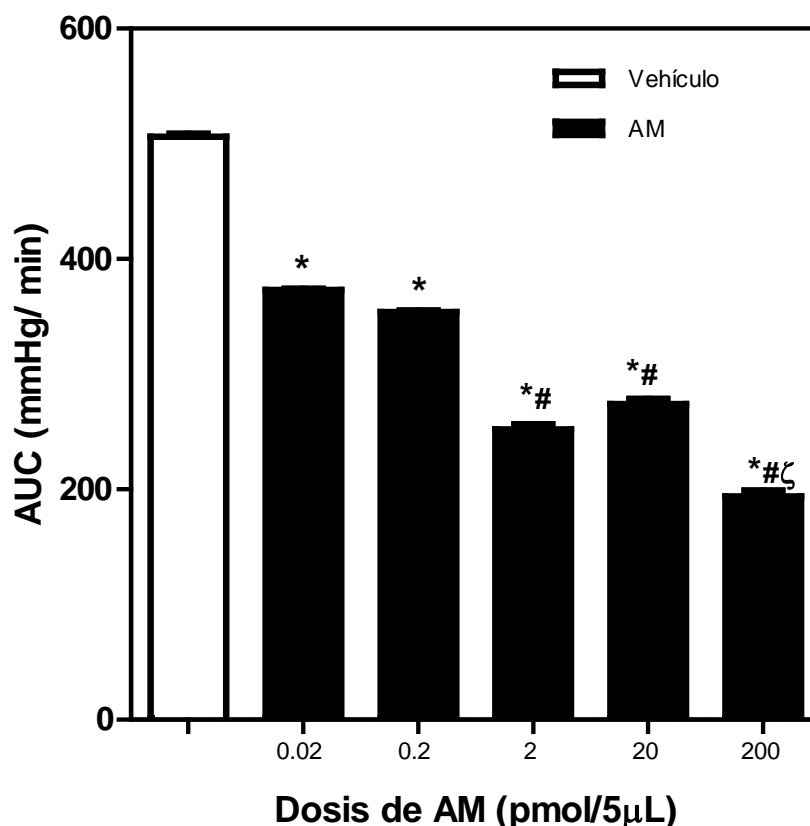
**Fig. 94.** Efecto de la administración *in situ* de AM en el vermis de cerebelo de ratas SHR sobre la presión arterial media en el tiempo. Se administró AM (200 pmol/5 $\mu$ L) o vehículo en ratas canuladas en el vermis de cerebelo, se determinó la PAM antes y después (durante 10min) de la administración de los fármacos, y se determinó el cambio de la PAM como la diferencia de la PAM después y antes de la administración de los tratamientos. Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  error estándar del cambio de PAM. (N=17). \* $p < 0,05$  vs. Vehículo.

Se evaluó si la acción de la AM sobre la PAM es dependiente de la dosis, y efectivamente se puede observar en las figuras 95 y 96, que la administración de AM en un rango de dosis comprendido entre 200 – 0,02 pmol/5 $\mu$ L, ocasionó

una caída significativa de la PAM con respecto al vehículo, la cual fue dependiente de la dosis. Esto se observa tanto en el curso temporal como expresado como AUC.



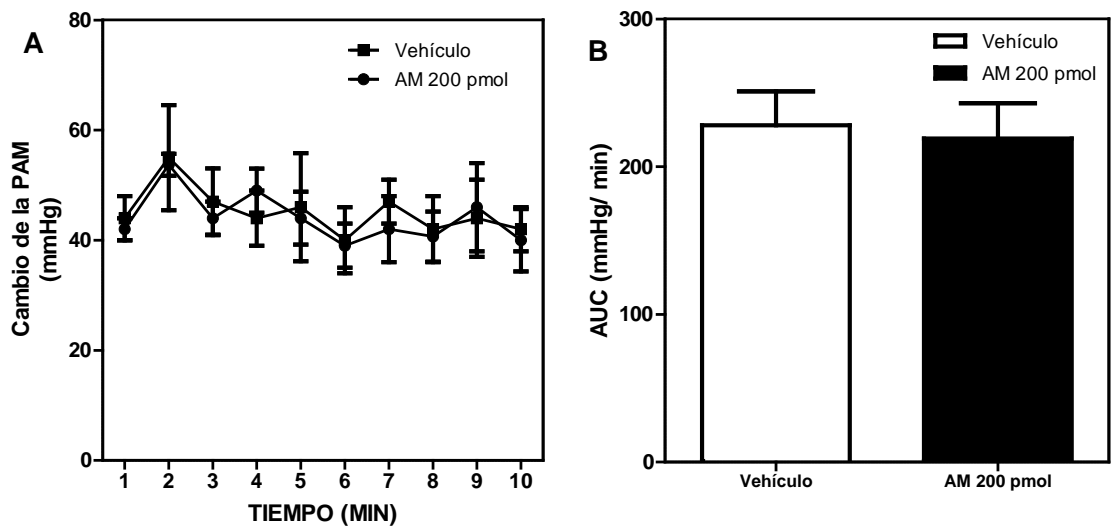
**Fig. 95.** Efecto de la administración *in situ* de varias dosis de AM en el vermis de cerebelo de ratas SHR sobre la presión arterial media. Se administró AM (0,02 - 200 pmol/5µL) o vehículo en ratas canuladas en el vermis de cerebelo, se determinó la PAM antes y después (durante 10min) de la administración de los fármacos, y se determinó el cambio de la PAM como la diferencia de la PAM después y antes de la administración de los tratamientos. Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  error estándar del cambio de PAM. (N=17). \*p<0,05 vs. Vehículo.



**Fig. 96.** Efecto de la administración *in situ* de varias dosis de AM en el vermis de cerebelo de ratas SHR sobre la AUC del cambio de presión arterial media. Se administró AM (0,02 - 200 pmol/5µL) o vehículo en ratas canuladas en el vermis de cerebelo, se determinó la PAM antes y después (durante 10min) de la administración de los fármacos, y se determinó el cambio de la PAM como la diferencia de la PAM después y antes de la administración de los tratamientos. Se determinó el área bajo la curva (AUC) del cambio de la PAM para cada tratamiento. Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  error estándar de la AUC. (N=17). \*p<0,05 vs. Vehículo. #p<0,05 vs. AM 0,02 y 0,2 pmol. ζ p<0,05 vs. AM 2 y 20 pmol.

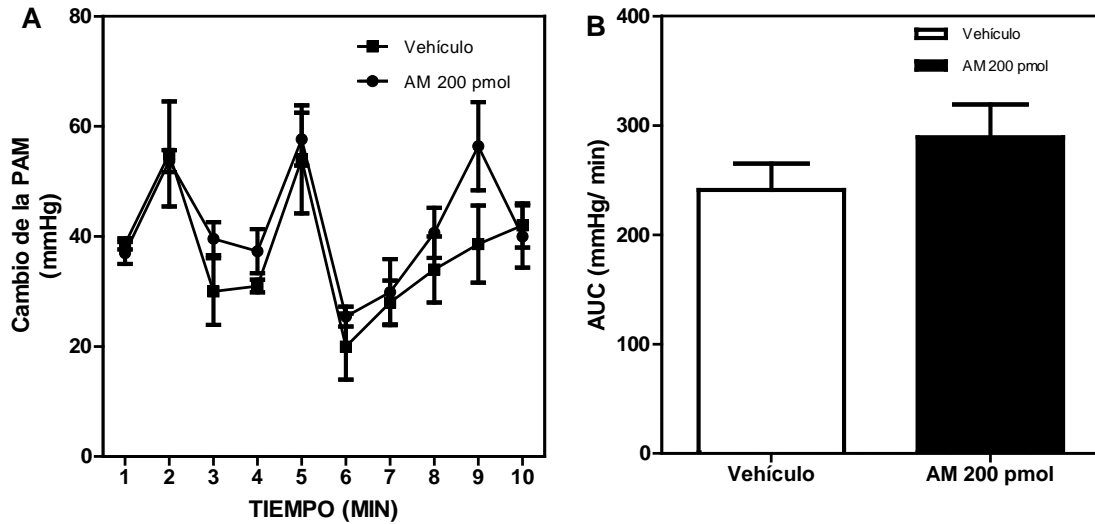
Para evaluar si los cambios en la PAM inducidos tras la administración de AM eran sitio específico, se evaluó el efecto de la administración *in situ* de AM fuera del vermis de cerebelo sobre la presión arterial en ratas Sprague - Dawley, WKY y SHR de 16 semanas de edad *in vivo*. Como se observa en las

figuras 97, 98 y 99, la administración de AM (200 pmol) fuera del vermis cerebelar de ratas Sprague - Dawley, WKY y SHR, no ocasionó cambios en la PAM cuando se compara con el vehículo (N=10). Únicamente se tomó los datos de aquellos animales en los que el colorante se localizó fuera del vermis cerebeloso.

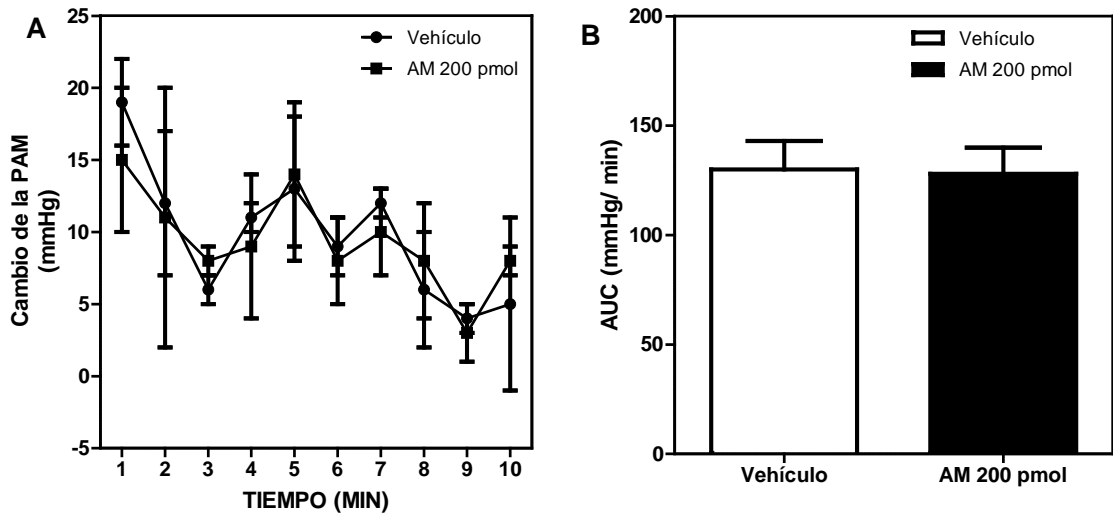


**Fig. 97.** Efecto de la administración *in situ* de AM fuera del vermis de cerebelo de ratas Sprague - Dawley sobre la presión arterial media. Se administró AM (200 pmol/5 $\mu$ L) o vehículo en ratas canuladas fuera del vermis de cerebelo, se determinó la PAM antes y después (durante 10min) de la administración de los tratamientos, y se determinó el cambio de la PAM como la diferencia de la PAM después y antes de la administración de los tratamientos. Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  error estándar del cambio de PAM (Panel A). Se determinó el área bajo la curva (AUC) del cambio de la PAM para cada tratamiento (Panel B). Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  error estándar de la AUC. (N=10).





**Fig. 98.** Efecto de la administración *in situ* de AM fuera del vermis de cerebelo de ratas WKY sobre la presión arterial media. Se administró AM (200 pmol/5 $\mu$ L) o vehículo en ratas canuladas fuera del vermis de cerebelo, se determinó la PAM antes y después (durante 10min) de la administración de los tratamientos, y se determinó el cambio de la PAM como la diferencia de la PAM después y antes de la administración de los tratamientos. Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  error estándar del cambio de PAM (Panel A). Se determinó el área bajo la curva (AUC) del cambio de la PAM para cada tratamiento (Panel B). Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  error estándar de la AUC. (N=10).



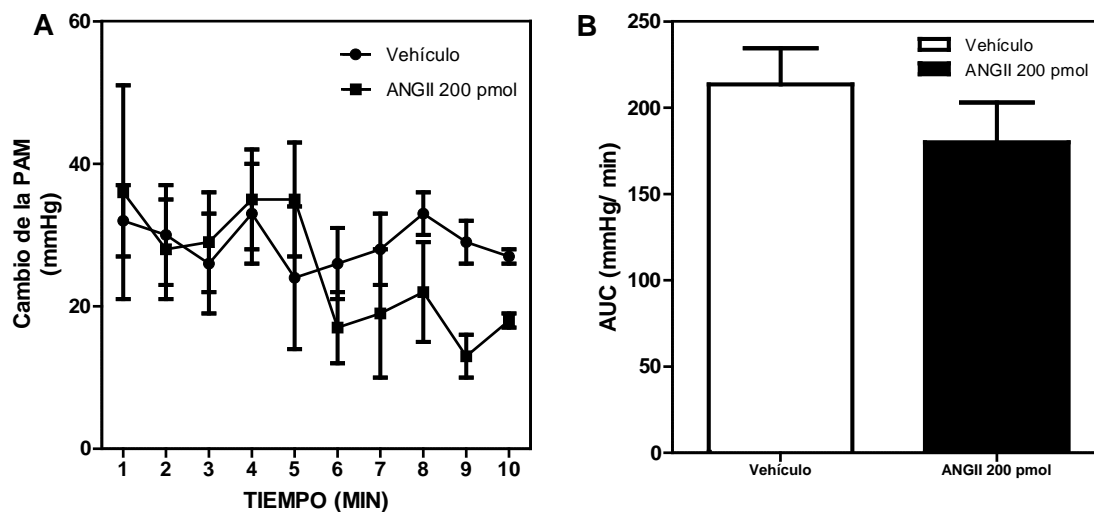
**Fig. 99.** Efecto de la administración *in situ* de AM fuera del vermis de cerebelo de ratas SHR sobre la presión arterial media. Se administró AM (200 pmol/5 $\mu$ L) o vehículo en ratas canuladas fuera del vermis de cerebelo, se determinó la PAM antes y después (durante 10min) de la administración de los tratamientos, y se determinó el cambio de la PAM como la diferencia de la PAM después y antes de la administración de los tratamientos. Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  error estándar del cambio de PAM (Panel A). Se determinó el área bajo la curva (AUC) del cambio de la PAM para cada tratamiento (Panel B). Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  error estándar de la AUC. (N=10).

#### 4.27. Efecto de la administración intracerebelar de ANG II sobre la presión arterial media en ratas Sprague-Dawley, WKY y SHR adultas.

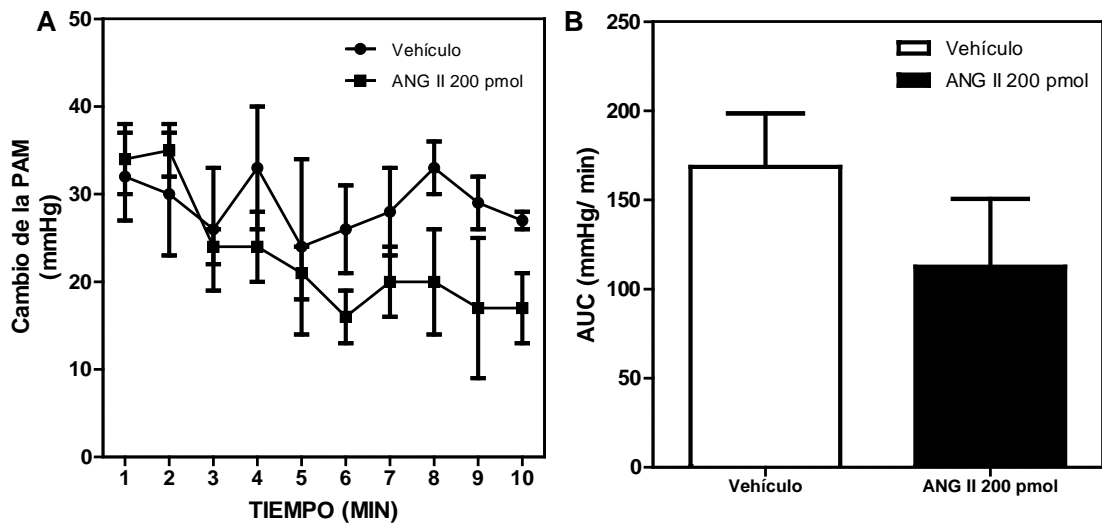
Se evaluó el efecto de la administración *in situ* de ANG II en el vermis de cerebelo sobre la presión arterial en ratas Sprague - Dawley, WKY y SHR de 16 semanas de edad *in vivo*. Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  error estándar del cambio de la PAM (mmHg) con respecto a sus valores basales (antes de la administración de ANGII o vehículo). Únicamente se

tomaron los datos de aquellos animales en los que el colorante se localizó en el vermis cerebeloso (Fig. 90).

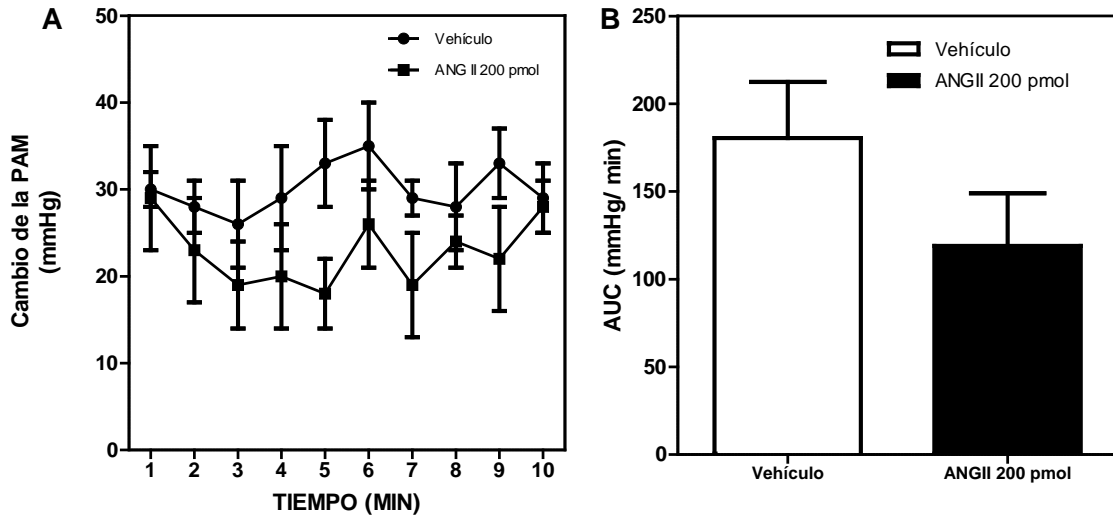
Como se observa en la figuras 100, 101 y 102, la administración intracerebelar de ANGII (200 pmol/5 $\mu$ L) en ratas Sprague-Dawley, WKY y SHR, provocó cambios en la PAM de la misma magnitud al producido por el vehículo (N=10). Estos hallazgos se observan tanto en el curso temporal del efecto de la ANGII como en la representación de AUC.



**Fig. 100.** Efecto de la administración *in situ* de ANGII en el vermis de cerebelo de ratas Sprague-Dawley sobre la presión arterial media. Se administró ANG II (200 pmol/5 $\mu$ L) o vehículo en ratas canuladas en el vermis de cerebelo, se determinó la PAM antes y después (durante 10min) de la administración de los fármacos, y se determinó el cambio de la PAM como la diferencia de la PAM después y antes de la administración de los tratamientos. Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  error estándar del cambio de PAM (Panel A). Se determinó el área bajo la curva (AUC) del cambio de la PAM para cada tratamiento (Panel B). Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  error estándar de la AUC. (N=10).



**Fig. 101.** Efecto de la administración *in situ* de ANG II en el vermis de cerebelo de ratas WKY sobre la presión arterial media. Se administró ANG II (200 pmol/5 $\mu$ L) o vehículo en ratas canuladas en el vermis de cerebelo, se determinó la PAM antes y después (durante 10min) de la administración de los fármacos, y se determinó el cambio de la PAM como la diferencia de la PAM después y antes de la administración de los tratamientos. Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  error estándar del cambio de PAM (Panel A). Se determinó el área bajo la curva (AUC) del cambio de la PAM para cada tratamiento (Panel B). Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  error estándar de la AUC. (N=10).



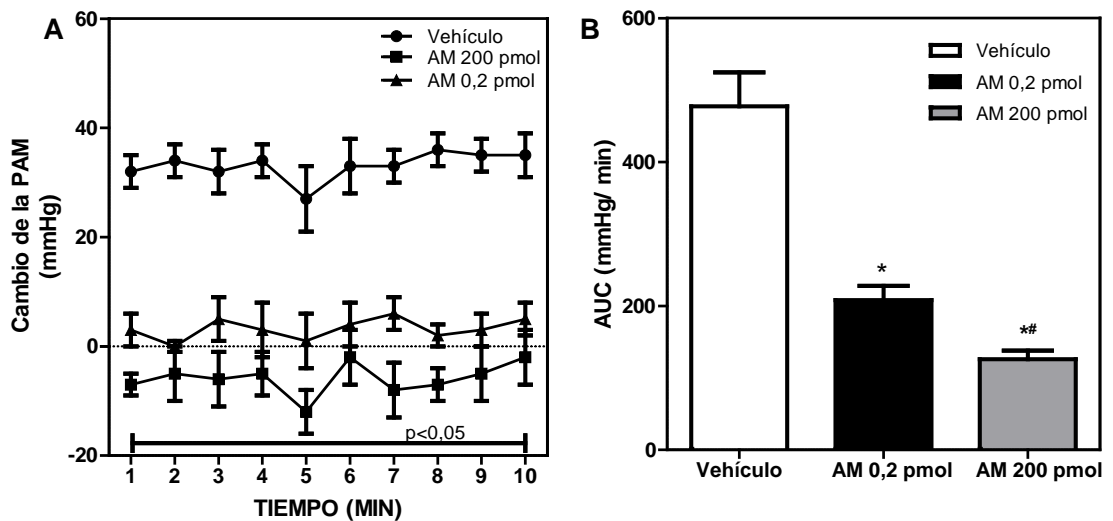
**Fig. 102.** Efecto de la administración *in situ* de ANG II en el vermis de cerebelo de ratas SHR sobre la presión arterial media. Se administró ANG II (200 pmol/5 $\mu$ L) o vehículo en ratas canuladas en el vermis de cerebelo, se determinó la PAM antes y después (durante 10min) de la administración de los fármacos, y se determinó el cambio de la PAM como la diferencia de la PAM después y antes de la administración de los tratamientos. Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  error estándar del cambio de PAM (Panel A). Se determinó el área bajo la curva (AUC) del cambio de la PAM para cada tratamiento (Panel B). Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  error estándar de la AUC. (N=10).

#### 4.28. Efecto de la administración intracerebelar de AM sobre la presión arterial media en ratas Sprague-Dawley, WKY y SHR adultas sometidas a estrés por estímulo eléctrico plantar (EEP).

Se evaluó el efecto de la administración *in situ* de AM en el vermis de cerebelo sobre la respuesta presora inducida por el EEP *in vivo* en ratas Sprague-Dawley, WKY y SHR. Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  error estándar del cambio de la PAM (mmHg) con respecto a sus valores basales (antes de la administración de AM o vehículo). Únicamente se tomaron los

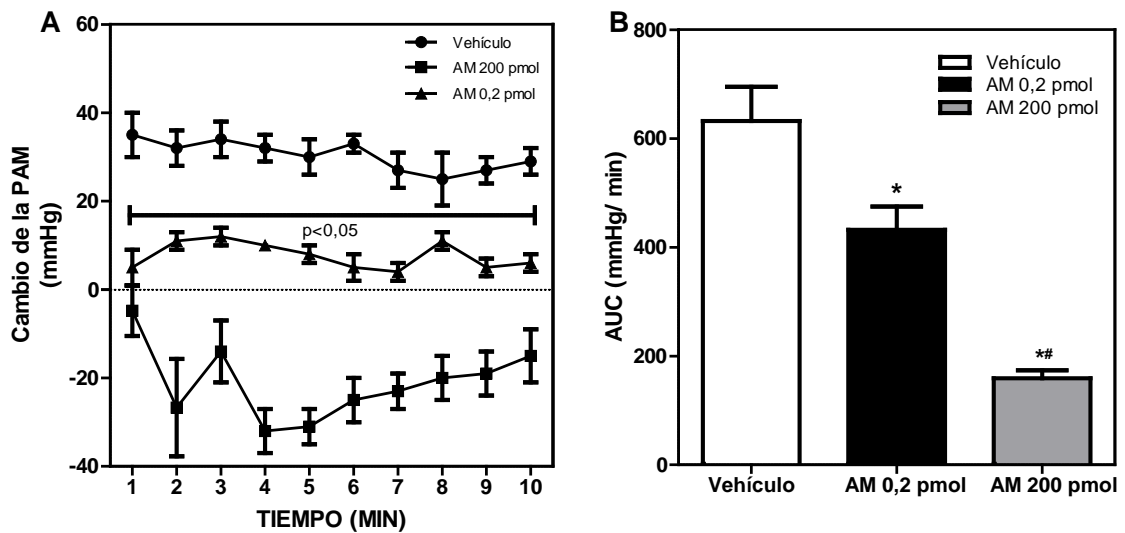
datos de aquellos animales en los que el colorante se localizó en el vermis cerebeloso (Fig. 90).

Como se observa en las figuras 103, 104 y 105, el EEP produjo una respuesta presora significativa de unos 35 mmHg. La administración intracerebelar de AM a la dosis de 0,2 pmol/5µL bloqueó completamente la respuesta presora frente al EEP. Aún más, la administración de AM a una dosis de 200 pmol/5µL no solo bloqueó la respuesta presora frente al estrés sino que produjo una respuesta hipotensora profunda y significativa. Este efecto de la AM frente a la respuesta presora al EEP fue similar en las tres cepas evaluadas: ratas Sprague- Dawley, WKY y SHR. La acción de la AM sobre la respuesta presora se indica en el gráfico AUC que demuestra claramente el efecto dependiente de la dosis (N=10, p<0,05).

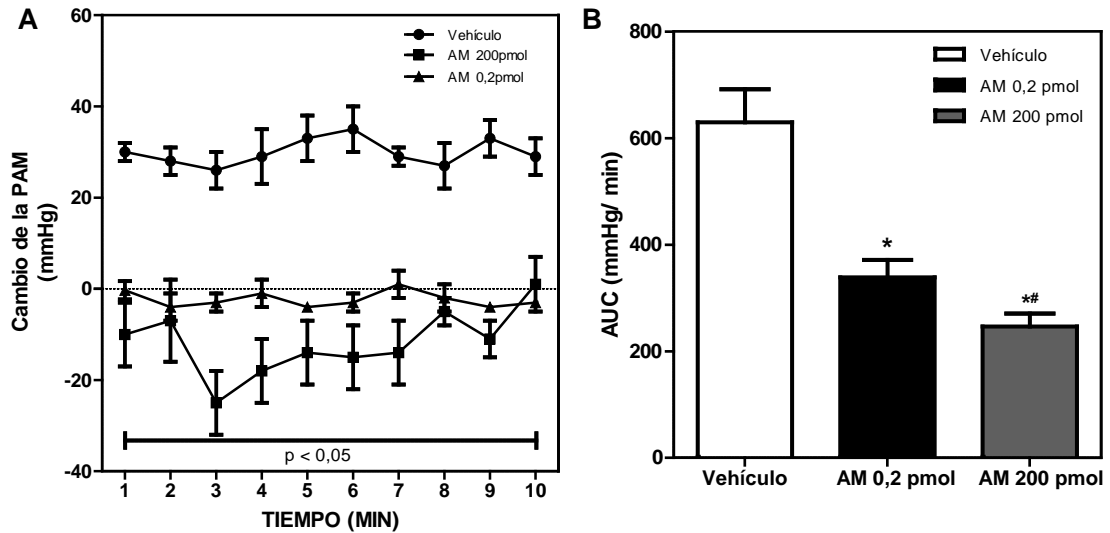


**Fig. 103.** Efecto de la administración *in situ* de AM en el vermis de cerebelo de ratas Sprague-Dawley sometidas a estrés por EEP sobre la presión arterial media. Se determinó la PAM basal y se administró AM (200 pmol/5µL o 0,2 pmol/5µL) o vehículo en ratas canuladas en el vermis de cerebelo, se sometió a

las ratas a EEP durante 4 min y se determinó la PAM (durante 10min). El cambio de la PAM se calculó como la diferencia de la PAM después y antes de la administración de los tratamientos. Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  error estándar del cambio de PAM (Panel A). Se determinó el área bajo la curva (AUC) del cambio de la PAM para cada tratamiento (Panel B). Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  error estándar de la AUC. (N=10). \* $p < 0,05$  vs. Vehículo. # $p < 0,05$  vs. AM 0,2 pmol.



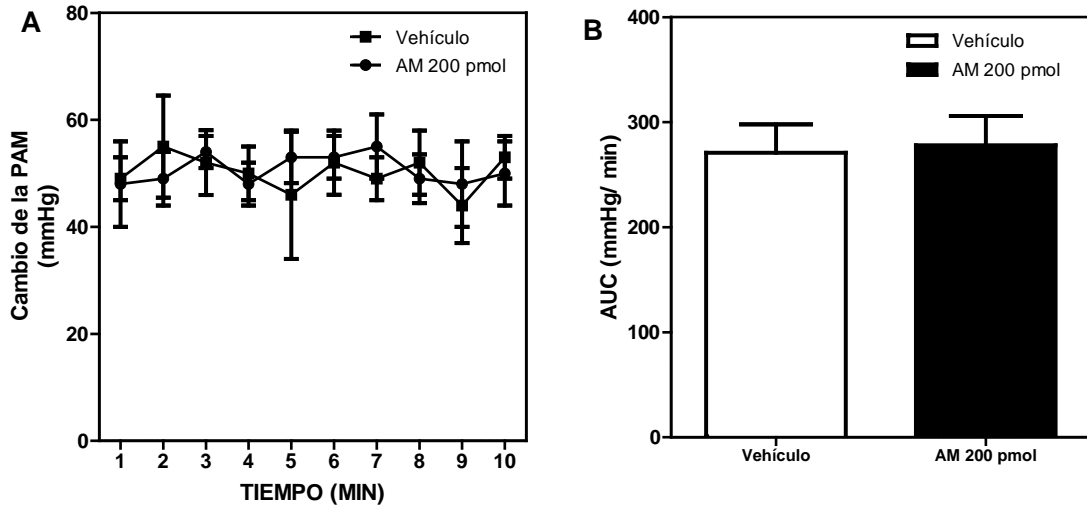
**Fig. 104.** Efecto de la administración *in situ* de AM en el vermis de cerebelo de ratas WKY sometidas a estrés por EEP sobre la presión arterial media. Se determinó la PAM basal y se administró AM (200 pmol/5  $\mu$ L y 0,2 pmol/5  $\mu$ L) o vehículo en ratas canuladas en el vermis de cerebelo, se sometió a las ratas a EEP durante 4 min y se determinó la PAM (durante 10min). El cambio de la PAM se calculó como la diferencia de la PAM después y antes de la administración de los tratamientos. Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  error estándar del cambio de PAM (Panel A). Se determinó el área bajo la curva (AUC) del cambio de la PAM para cada tratamiento (Panel B). Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  error estándar de la AUC. (N=10). \* $p < 0,05$  vs. Vehículo. # $p < 0,05$  vs. AM 0,2 pmol.



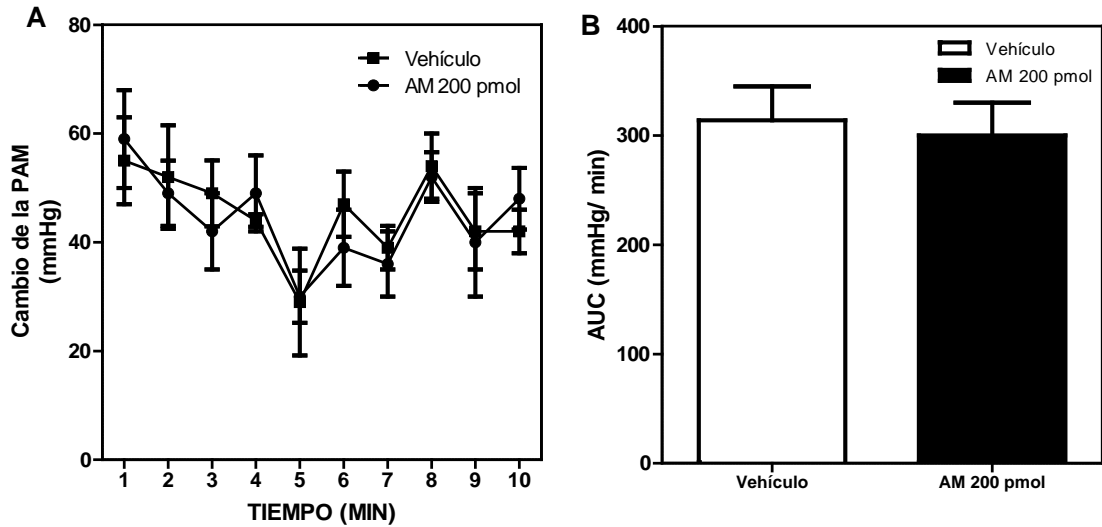
**Fig. 105.** Efecto de la administración *in situ* de AM en el vermis de cerebelo de ratas SHR sometidas a estrés por EEP sobre la presión arterial media. Se determinó la PAM basal y se administró AM (200 pmol/5  $\mu$ L y 0,2 pmol/5  $\mu$ L) o vehículo en ratas canuladas en el vermis de cerebelo, se sometió a las ratas a EEP durante 4 min y se determinó la PAM (durante 10 min). El cambio de la PAM se calculó como la diferencia de la PAM después y antes de la administración de los tratamientos. Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  error estándar del cambio de PAM (Panel A). Se determinó el área bajo la curva (AUC) del cambio de la PAM para cada tratamiento (Panel B). Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  error estándar de la AUC. (N=10). \* $p < 0,05$  vs. Vehículo. # $p < 0,05$  vs. AM 0,2 pmol.

Para evaluar si los cambios en la PAM inducidos tras la administración de AM eran sitio específico, se evaluó el efecto de la administración *in situ* de AM fuera del vermis de cerebelo sobre la presión arterial media en ratas Sprague-Dawley, WKY y SHR de 16 semanas de edad *in vivo* sometidas a estrés por EEP. Como se observa en las Fig. 106, 107 y 108, la administración de AM (200 pmol) fuera del vermis cerebelar de ratas Sprague-Dawley, WKY y SHR, no fue capaz de alterar la respuesta presora inducida por el EEP (N=10).

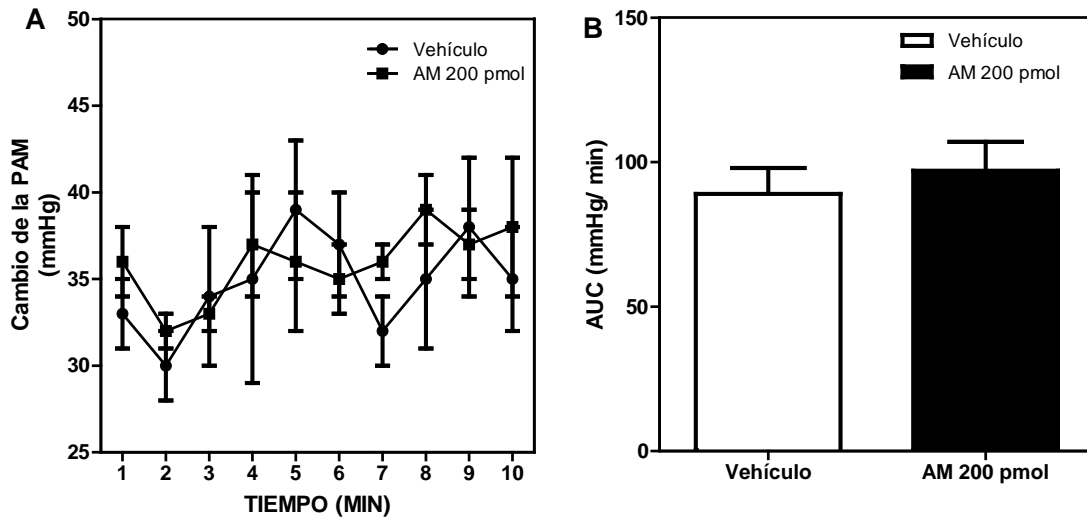




**Fig. 106.** Efecto de la administración *in situ* de AM fuera del vermis de cerebelo de ratas Sprague-Dawley sometidas a estrés por EEP sobre la presión arterial media. Se determinó la PAM basal y se administró AM (200  $\mu\text{mol}$ ) o vehículo en ratas canuladas en el vermis de cerebelo, se sometió a las ratas a EEP durante 4 min y se determinó la PAM (durante 10min). El cambio de la PAM se calculó como la diferencia de la PAM después y antes de la administración de los tratamientos. Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  error estándar del cambio de PAM (Panel A). Se determinó el área bajo la curva (AUC) del cambio de la PAM para cada tratamiento (Panel B). Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  error estándar de la AUC. (N=10).



**Fig. 107.** Efecto de la administración *in situ* de AM fuera del vermis de cerebelo de ratas WKY sometidas a estrés por EEP sobre la presión arterial media. Se determinó la PAM basal y se administró AM (200 pmol/5µL) o vehículo en ratas canuladas en el vermis de cerebelo, se sometió a las ratas a EEP durante 4 min y se determinó la PAM (durante 10min). El cambio de la PAM se calculó como la diferencia de la PAM después y antes de la administración de los tratamientos. Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  error estándar del cambio de PAM (Panel A). Se determinó el área bajo la curva (AUC) del cambio de la PAM para cada tratamiento (Panel B). Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  error estándar de la AUC. (N=10).



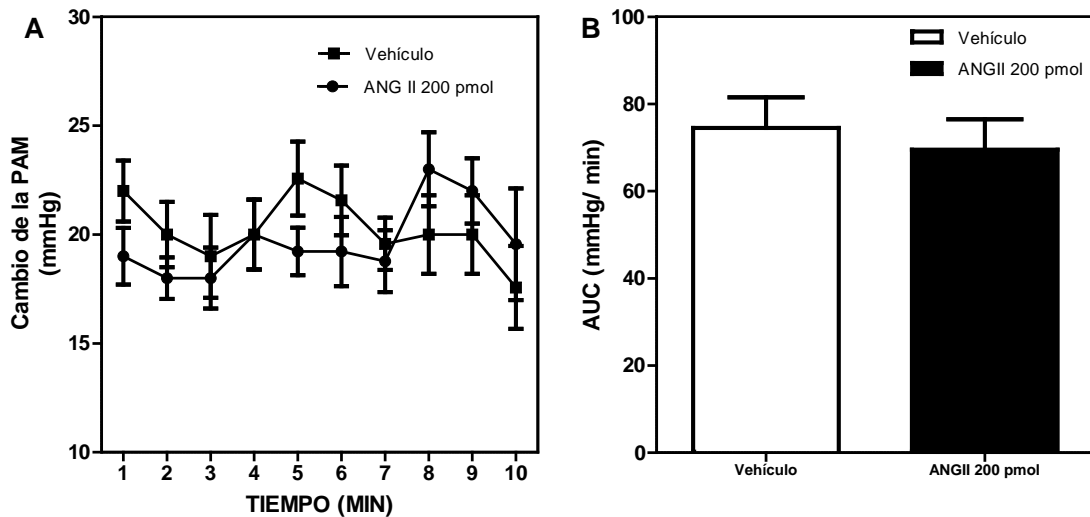
**Fig. 108.** Efecto de la administración *in situ* de AM fuera del vermis de cerebelo de ratas SHR sometidas a estrés por EEP sobre la presión arterial media. Se determinó la PAM basal y se administró AM (200 pmol/5µL) o vehículo en ratas canuladas en el vermis de cerebelo, se sometió a las ratas a EEP durante 4 min y se determinó la PAM (durante 10min). El cambio de la PAM se calculó como la diferencia de la PAM después y antes de la administración de los tratamientos. Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  error estándar del cambio de PAM (Panel A). Se determinó el área bajo la curva (AUC) del cambio de la PAM para cada tratamiento (Panel B). Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  error estándar de la AUC. (N=10).

#### 4.29. Efecto de la administración intracerebelar de ANG II sobre la presión arterial media en ratas SHR adultas sometidas a estrés por estímulo eléctrico plantar (EEP).

Se evaluó el efecto de la administración *in situ* de ANG II en el vermis de cerebelo sobre el cambio de presión arterial en ratas SHR sometidas a estrés por EEP *vivo*. Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  error estándar del cambio de la PAM (mmHg) con respecto a sus valores basales (antes de la administración de ANG II o vehículo). Únicamente se tomaron los datos de

aquellos animales en los que el colorante se localizó en el vermis cerebeloso (Fig. 90).

Como se observa, en la figura 109 la administración intracerebelar de vehículo o ANGII (200 pmol/5 $\mu$ L), en las ratas SHR sometidas a EEP, no provocó cambios en la PAM cuando se compara con el vehículo (N=10).



**Fig. 109.** Efecto de la administración *in situ* de ANG II en el vermis de cerebelo de ratas SHR sometidas a estrés por EEP sobre la presión arterial. Se determinó la PAM basal y se administró ANG II (200 pmol/5 $\mu$ L) o vehículo en ratas canuladas en el vermis de cerebelo, se sometió a las ratas a EEP durante 4 min y se determinó la PAM (durante 10min). El cambio de la PAM se calculó como la diferencia de la PAM después y antes de la administración de los tratamientos. Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  error estándar del cambio de PAM (Panel A). Se determinó el área bajo la curva (AUC) del cambio de la PAM para cada tratamiento. Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  error estándar de la AUC. (N=10).

## 5. DISCUSIÓN

La AM es un péptido ubicuo de 52 residuos de aminoácidos en el humano y de 50 residuos de aminoácidos en la rata al que se le han atribuido importantes funciones en la regulación de la función CDV a través de efectos tanto a nivel periférico como central. Diversos estudios han indicado que la AM cumple diversas acciones biológicas entre las que se incluyen hipotensión, vasodilatación, inhibición de la secreción de endotelina, diuresis, natriuresis, broncodilatación, regulación del crecimiento y proliferación celular (Cases y col., 2001; Beltowski y col., 2004).

Las funciones de la AM son mediadas a través de la unión del péptido a sus receptores, los cuales están constituidos por el CRLR y una RAMP. Los receptores específicos de la AM, AM1 y AM2, están formados por el CRLR con RAMP2 y CRLR con RAMP3, respectivamente. Asimismo, la AM ejerce diversas acciones a través de su unión con el receptor de CGRP, constituido por CRLR y RAMP1 (Zimmermann y col., 1996; Belloni y col., 1999). Todos estos receptores son proteínas de siete dominios transmembrana acoplados a proteína G, que fueron inicialmente caracterizados como receptores huérfanos (Ishizaka y col., 1994; Dang y col., 1999).

Diversos estudios han indicado que la AM y los componentes de su receptores se encuentran expresados en diferentes órganos y tejidos como la glándula suprarrenal, corazón, riñón, pulmón, aorta, páncreas, intestino delgado, hígado, bazo, tiroides, testículo, vasos sanguíneos, células endoteliales y de músculo liso, entre otros (Kitamura y col., 1993<sup>B</sup>; Sakata y col., 1993; Eguchi y col., 1994; Ichiki y col., 1994; Sakata y col., 1994). Asimismo, a nivel central, diversos estudios han demostrado la expresión de AM y sus receptores en

regiones como el tálamo, hipotálamo, adeno y neurohipófisis, plexo coroides, revestimiento del tercer, cuarto y ventrículo lateral y en la capa de células granulares del cerebelo (Sone y col., 1997; Juaneda y col., 2001; Uezono y col., 2001; Beltowski y col., 2004).

De hecho, estudios iniciales sobre la distribución de la AM en el cerebro indicaban que este péptido se encontraba ausente; sin embargo estudios posteriores demostraron que la AM se encontraba presente y ampliamente distribuida en el cerebro humano y de animales como ratas, ratones y sapo; evidenciándose en regiones como la corteza frontal, temporal, occipital, bulbo olfatorio accesorio y principal, en las áreas posterior, medial dorsal, lateral y ventral del núcleo olfatorio, núcleo accumbens y la estría terminal, área septal, caudado-putamen, tubérculo olfatorio, pálido ventral, banda diagonal de Broca, globo pálido, sustancia innominata, hipocampo, amígdala, tálamo, hipotálamo, mesencéfalo, bulbo raquídeo, órganos circunventriculares (en el órgano subfornical y el AP) y en el cerebelo (Ueta y col., 1995; Samson y col., 1997; Hinson y col., 2000; Serrano y col., 2000; Takahashi, 2001; Serrano y col., 2002; Juaneda y col., 2003; Serrano y col., 2003; Macchi y col., 2006).

Por otro lado, varios estudios han demostrado una amplia inmunoreactividad y expresión de los receptores de la AM a nivel central (Oliver y col., 2002; Juaneda y col., 2003). En este sentido, Sone y col., (1997), demostraron sitios de unión específicos a la AM en varias regiones del cerebro humano como corteza cerebral, tálamo, hipotálamo, tallo, bulbo raquídeo y cerebelo. De hecho, Ueda y col., (2001) encontraron que el ARNm de RAMP1 muestra una amplia distribución en el cerebro localizándose en hipocampo, núcleo accumbens, tubérculo olfatorio, caudado putamen, corteza cerebral, cerebelo y epéndimo ventricular. Por su parte, el ARNm de RAMP2 se encuentra en regiones como hipocampo, bulbo olfatorio, plexos coroides de los ventrículos

cerebrales, cerebelo y vasos sanguíneos. Por su parte, el ARNm del RAMP3 se demostró en la corteza cerebral, tálamo y cerebelo. Evidenciándose la colocalización del CRLR con RAMP1 en el caudado putamen y núcleo amigdalóide, y con el RAMP2 en los plexos coroides ventricular y en la pared de los vasos sanguíneos.

Nuestros resultados demuestran por primera vez en las ratas WKY y SHR la presencia de AM y los componentes de su receptor en un área específica del cerebelo como lo es el vermis, lo cual confirma la presencia de receptores de CGRP, AM1 y AM2 en dicha región cerebelosa, tal y como ha sido reportado previamente en ratas Sprague-Dawley (Sakata y col., 1994; Juaneda y col., 2001; Serrano y col., 2003; Edvinsson y col., 2010). De hecho, Serrano y col., (2000) encontraron inmunoreactividad a la AM en las células de Purkinje en el cerebelo de la rata, en la capa granular (en las terminales de las fibras musgosas y en las células de Golgi) y en los núcleos cerebelares lateral, interpósito y medial del cerebelo (Serrano y col., 2000). Evidenciándose colocalización de la AM con el factor H en las células de Purkinje de cerebelo de la rata, siendo el factor H un importante regulador de las funciones de la AM, pues se ha demostrado que algunos eventos mediados por el receptor, tales como la elevación del AMPc, crecimiento de células cancerígenas o inhibición de la liberación de insulina desde los islotes pancreáticos, el factor H aumenta la actividad de la AM (Martínez y col., 2001; Serrano y col., 2003).

Asimismo, la evidencia indica que los componentes de los receptores de CGRP, AM1 y AM2 se encuentran localizados a nivel del cerebelo, pues se ha demostrado el ARNm para RAMP1 y RAMP2 en la capa de las células de Purkinje del cerebelo; por su parte, el ARNm de RAMP3 se evidenció en la capa granular del cerebelo (Ueda y col., 2001). Por otra parte, Edvinsson y col., (2010) demostraron inmunoreactividad en las células de Purkinje de cerebelo

de rata para el CRLR y RAMP1, los cuales son los componentes del receptor de CGRP; demostrándose además su localización a nivel de la capa molecular de la corteza cerebelar de ratas, evidenciándose la expresión del receptor en las células de Purkinje, interneuronas y astrocitos (Morara y col., 1998).

Por lo tanto, la presencia de AM así como los componentes de su receptores sugieren que la AM podría cumplir un papel funcional a nivel de esta estructura y sugiere que este péptido puede influir en las funciones cerebelares como un factor autocrino / paracrino.

Si ello es así, la expresión y la función de los componentes del sistema adrenomedulérgico podría estar alterada en situaciones patológicas y durante el crecimiento. Nuestros resultados apuntan a esta posibilidad ya que demuestran que la expresión de RAMP1, RAMP3 y CRLR en el vermis de cerebelo de las ratas aumenta con la edad de las mismas, no observando el mismo comportamiento con la AM y la RAMP2. En este sentido, diversos estudios han demostrado cambios en el sistema adrenomedulinérgico local en las distintas edades de la rata, pues se ha demostrado que el receptor de CGRP (CRLR/RAMP1) expresado en las neuronas y glías de la capa cortical del cerebelo, sufre marcadas variaciones durante el desarrollo del cerebelo. De hecho, los estudios de inmunohistoquímica y autoradiografía demuestran que el número de receptores en la capa de células de Purkinje/capa molecular es bajo en las etapas iniciales del desarrollo e incrementa con la madurez, mientras que disminuye durante el mismo período en la sustancia blanca, lo cual sugiere que el CGRP liberado desde las fibras trepadoras puede cumplir un papel en el desarrollo cerebelar, pues el patrón de la conectividad adulta del cerebelo es alcanzado a través de una serie de procesos que tienen lugar en la última fase embrionaria y en el período postnatal (Morara y col., 2000). Por lo que la expresión del receptor CGRP en el cerebelo de ratas adultas puede estar



regulado por la activación de las neuronas provenientes de la oliva inferior, cuyos axones constituyen las fibras trepadoras que hacen sinapsis sobre las dendritas de las células de Purkinje (Morara y col., 1998).

Resultados similares se han descrito en la periferia, así Hwang y col., (2007) encontraron que la expresión de AM en pulmón de ratas de 3, 12 y 20 meses aumenta con la edad, mientras que los componentes de su receptor disminuyeron con la edad de las mismas. Por su parte, en los testículos de la rata, la expresión de AM incrementó con la edad, observándose una disminución en las glándulas sexuales accesorias; igualmente, la expresión del receptor de CGRP incrementó en los testículos y disminuyó en la próstata, por su parte, la expresión del receptor de AM disminuyó en las vesículas seminales, de acuerdo a la edad (Li y col., 2007). De igual manera, Wong y col., (2012<sup>A</sup>) encontraron que la expresión de AM, incrementó con la edad en los pulmones de ratas con 1, 7 y 21 días, pero disminuyó con la edad en los riñones, glándulas suprarrenales y en el corazón; sin embargo, la expresión fue menor en las ratas adulta. Aún más, la expresión del CRLR y RAMP2 aumentó con la edad en los pulmones, riñones y corazón, pero disminuyó con la edad en las glándulas suprarrenales, indicando que la expresión de AM y los componentes de su receptor siguen diferentes patrones de cambios durante el desarrollo. Por lo tanto, la evidencia en la literatura y nuestros hallazgos sugieren que el patrón de cambios en la expresión de la AM y los componentes de sus receptores se ve afectado por la edad de la rata y además son órgano-específico, lo cual puede evidenciar cambios en los patrones de expresión propios de la edad a nivel del tejido que pueden tener relación con la función del péptido, condición del individuo y con el desarrollo del tejido.

La presencia de AM y los componentes de sus receptores en el cerebelo de ratas WKY y SHR sugiere que este péptido cumple un papel en las funciones

cerebelares. De hecho, algunos estudios indican que el cerebelo participa en el control CDV, pues la estimulación eléctrica de diversas zonas cerebelosas conlleva cambios en la presión arterial y frecuencia cardíaca (Nisimaru, 2004; Rector y col., 2006; Tandon y col., 2006). Así, la estimulación eléctrica de la corteza cerebelar posterior a nivel del lóbulo IX del vermis cerebelar, en conejos anestesiados provoca bradicardia, caída de la presión arterial e inhibición transitoria de la actividad simpática renal (Bradley y col., 1987<sup>A</sup>; Rocha y col., 2008). Por su parte, la estimulación eléctrica de la porción rostral del NF en conejos anestesiados desencadena una respuesta presora (Bradley y col., 1987<sup>B</sup>). Estos hallazgos constituyen evidencias claras del papel del cerebelo, específicamente el vermis cerebelar en la regulación de la presión arterial.

Algunos estudios han indicado que la hipertensión puede influir en la expresión de la AM y los componentes de su receptor en diferentes órganos y en la periferia; en este sentido se ha indicado que la elevación de la AM plasmática constituye un marcador predictivo de diversas enfermedades y sus niveles se correlacionan con la severidad de la enfermedad (Gibbons y col., 2007). De hecho, se ha postulado que el incremento plasmáticos de la AM puede ayudar a regular los cambios en la presión arterial que acompañan las enfermedades CDV (Caron y col., 2007).

Diversos estudios han indicado que la expresión de AM y sus receptores se encuentra alterada durante la hipertensión, pues se ha demostrado un incremento en la producción de AM y mayor expresión del péptido y los componentes de su receptores (CRLR, RAMP2 y RAMP3) en tejido aórtico y ventrículo cardíaco durante la hipertensión inducida con L-NAME (Pan y col., 2005); sin embargo, la expresión de RAMP1 se ha encontrado incrementada en la aorta y no se vio alterada en el ventrículo de ratas hipertensas. Por su parte, Bell y col., (2006) demostraron que la expresión de RAMP2 y RAMP3 aumentó

en cardiomiocitos de ratas hipertensas, mientras que la expresión de RAMP1 y CRLR no se modificaron. Por su parte, Cueille y col., (2002) reportaron un incremento en la expresión de RAMP1 y RAMP3 pero no de RAMP2 y CRLR en aorta de ratas con insuficiencia cardíaca congestiva.

Asimismo, a nivel central, la evidencia muestra alteración en la expresión del sistema adrenomedulinérgico durante la hipertensión. De hecho, Shan y col., (2001) encontraron una menor expresión del ARNm que codifica a la AM en regiones centrales como el PVN, SFO, AP y NTS en ratas sometidas a estresores fisiológicos. Por su parte, de acuerdo a Stachniak y col., (2003) la expresión del ARNm de RAMP2 en el cerebro se ve alterada por los cambios en la presión arterial, pues el consecutivo incremento en la presión arterial durante 6 días tras la infusión intravenosa de fenilefrina provocó una disminución en la expresión del RAMP2 en el PVN y NTS, sugiriendo que la alteración en la expresión del ARNm RAMP2 puede afectar la capacidad de la AM central en regular la actividad simpática. Asimismo, se ha observado que en la hipertensión inducida por estrés crónico existe un incremento en la expresión del ARNm de la pre-pro-AM en el hipotálamo, glándula pituitaria y glándula suprarrenal; mientras que se encuentra disminuída en bulbo raquídeo y mesencéfalo. Por su parte, la expresión del CRLR fue mayor en el bulbo y disminuyó en el hipotálamo y mesencéfalo, mientras que la expresión de RAMP2 y RAMP3 aumentó en el hipotálamo y disminuyó en la médula suprarrenal (Li y col., 2004).

En el SNC, Pastorello y col., (2007) encontraron que la densidad de los sitios de unión a la AM en el cerebelo se encontraba alterada en la hipertensión, demostrando incrementos en los sitios de unión a la AM en el cerebelo de un modelo experimental de hipertensión genética, SHR, al compararlos con las ratas normotensas WKY. La alteración observada en la densidad de los

receptores de AM en el cerebelo de las ratas SHR parece indicar que la AM podría estar participando en el mantenimiento de la hipertensión genética. Estos hallazgos soportan la hipótesis de un papel funcional, no descrito hasta ahora, para los receptores de AM en el cerebelo, cuyo incremento en la hipertensión podría representar un mecanismo de regulación hacia arriba de los receptores para compensar el incremento de la presión arterial de las ratas SHR; o alternativamente constituir la alteración primaria cuya consecuencia secundaria resultaría en una alteración de los mecanismos de regulación autonómica que ocurren en el cerebelo y que traería como consecuencia un incremento de la presión arterial.

En apoyo a esto, están nuestros resultados en los que se demuestra que la expresión de CRLR, RAMP1 y RAMP3 es mayor en las ratas hipertensas con respecto a las normotensas, lo que sugiere una mayor expresión de receptores de CGRP (CRLR + RAMP1) y AM2 (CRLR + RAMP3) en el cerebelo. Por el contrario, la expresión de RAMP2 y AM resultó ser menor en las ratas SHR, sugiriendo una reducción de la expresión del receptor de AM1 (CRLR + RAMP2) a nivel cerebeloso. La reducción en la expresión de AM en el cerebelo de las ratas hipertensas podría ser la responsable de la regulación “hacia arriba” de los receptores AM2 y de los sitios de unión observados por autoradiografía (Pastorello y col., 2007 y presente estudio). Igualmente estos hallazgos apoyan el papel importante en la regulación de la presión arterial del sistema adrenomedulinérgico, así como su posible desregulación en la hipertensión.

Diversos investigadores han descrito que la AM endógena juega un papel importante en la protección del corazón y riñón del daño ocasionado por condiciones como la hipertensión; de hecho algunos estudios han indicado que ratones heterocigotos para el gen de la AM ( $AM^{+/-}$ ) son más susceptibles que

los homocigotos ( $AM^{+/+}$ ) a la hipertrofia cardíaca, fibrosis y el daño renal inducidos por la constricción aórtica o la infusión de ANG II (Kim y col., 2002; Caron y col., 2004). Asimismo, ratones heterocigotos para el gen de la AM transfectados con el gen de renina, presentan mayor grado de hipertrofia cardíaca comparado con ratones homocigotos para el gen de la AM transfectados con el gen de renina (Caron y col., 2007); por lo tanto la deficiencia de la AM se relaciona con mayor alteración en la función CDV.

Por su parte, Li y col., (2004), encontraron que el aumento de la pre-pro-AM, RAMP2 y RAMP3 en el hipotálamo podría constituir un mecanismo de protección para reajustar el incremento en la presión arterial por el estrés crónico a través de un mecanismo de acción directo o indirecto sobre la función CDV. Por su parte, la disminución en la expresión de la pre-proAM en el bulbo, donde la administración de AM en AP y RVLM provoca un incremento en la presión arterial por incremento del eflujo simpático, podría reflejar un mecanismo protector de la AM en reajustar la presión arterial. Por lo tanto, los cambios en la expresión de la AM y los componentes de su receptor observados en el presente estudio demuestran que son sitio-específicos y sugieren que están relacionados con la posible función que desempeña la AM en a ese nivel, sugiriendo un posible papel de la AM cerebelar en el control de la presión arterial.

Ahora bien, se conoce que los niveles de AM pueden ser regulados de dos maneras, modificando su producción y/o su degradación. La hidrólisis por proteasas ha sido descrita como una importante vía de depuración de la AM tisular; de hecho, se han observado niveles plasmáticos de AM incrementados tras la inhibición de la NEP, lo cual confirma que la AM es un sustrato de esta enzima (Lisy y col., 1998). Jiang y col., (2004) encontraron que en ratas SHR la concentración de AM tisular puede ser diferencialmente regulada por la NEP,

pues encontraron menor expresión y actividad de esta enzima en aorta, yeyuno y ventrículo izquierdo, lo cual estaba acompañado de un aumento en la expresión del ARNm AM.

Asimismo, factores como la enzima convertidora de ANG II, diacilglicerol, forbol - 12 miristato, son capaces de disminuir la actividad de la NEP. De igual manera, el IFN- $\gamma$  reduce la expresión de ARNm para la NEP. Por su parte, los activadores de la AC o la PKA, glucocorticoides, trombina y citoquinas como la interleuquina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) y factor estimulante de colonias de macrófagos, pueden incrementar la expresión y actividad de la NEP (Bernard y col., 1993). Por lo tanto, en el presente estudio, es posible que los menores niveles de AM en el cerebelo de ratas hipertensas puedan ser producidos por un incremento en la expresión y/o actividad de la NEP a nivel local, por lo que sería interesante determinar su expresión y actividad en el cerebelo.

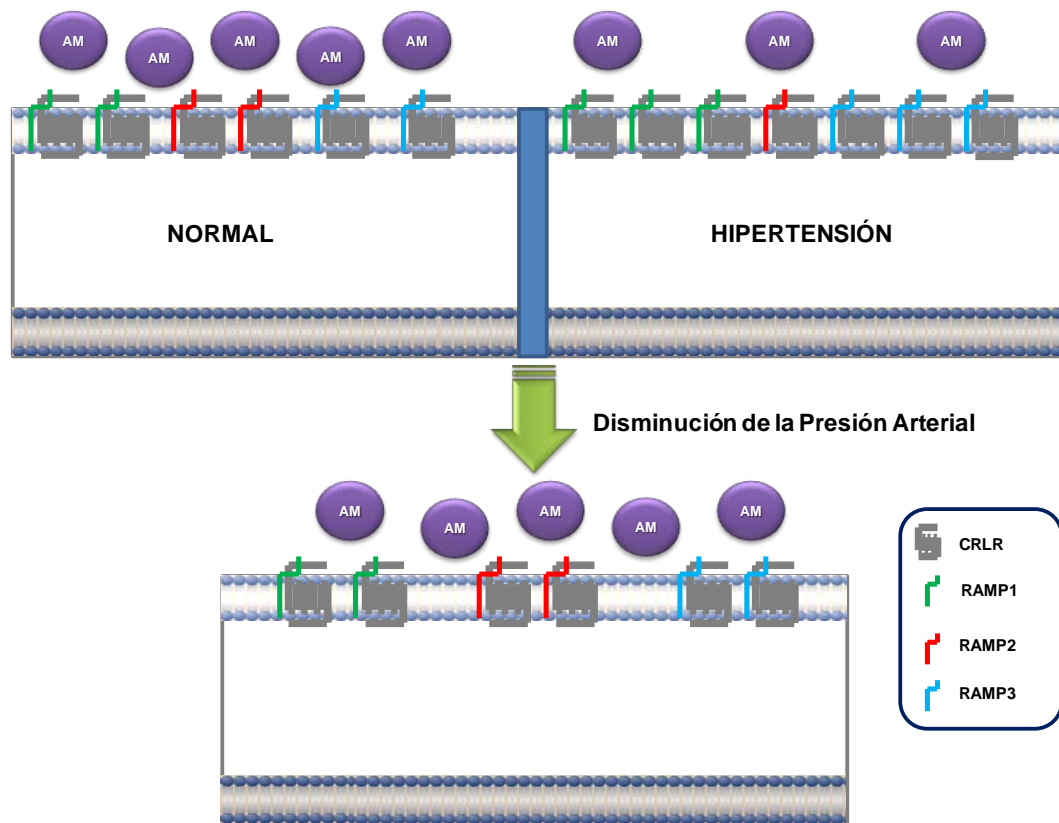
Asimismo, diversos factores neuro-humorales pueden regular la expresión de la AM y los componentes de su receptor; pues se ha demostrado que la ANG II puede incrementar la expresión génica de RAMP1 y RAMP3, a través del receptor AT1 en cultivos de cardiomiocitos de rata (Mishima y col., 2003). Por otro lado, se ha descrito que la endotelina-1 incrementa la expresión de CRLR y RAMP3 y disminuye la expresión de RAMP2 en cardiomiocitos de rata (Mishima y col., 2001); por lo que, el incremento en la expresión de CRLR, RAMP1 y RAMP3 y la disminución de RAMP2 observados en el presente estudio, podrían igualmente estar regulados por factores neuro-humorales presentes durante la hipertensión.

Es conocido que la AM está involucrada en la regulación de la presión arterial, tanto por mecanismos periféricos como centrales, pues la infusión de AM provoca una poderosa y sostenida respuesta vasodilatadora e hipotensora (Haynes y col., 1995; Hirata y col., 1995; Lainchbury y col., 1997; Hinson y col., 2000; Nagaya y col., 2000; Cases y col., 2001; Beltowski y col., 2004; Martínez y col., 2004; Nicholls, 2004). Por su parte, los efectos de la AM a nivel central no pueden ser predichos por sus efectos a nivel periférico, pues dependen del sitio de administración, ya que la AM es capaz de desencadenar una respuesta hipertensora tras su administración *icv*, en el RVLM o AP (Samson y col., 1998; Yang y col., 2003; Xu y col., 2004<sup>A</sup>); mientras que inducen un efecto hipotensor tras su administración a nivel del PVN (Xu y col., 2004<sup>B</sup>).

Hasta el presente, no existe ningún estudio que describa el papel de la AM cerebelosa en la regulación de la presión arterial. Por lo tanto, la menor expresión de AM y RAMP2 encontrados en este estudio, sugieren que estos cambios pueden constituir un mecanismo que contribuye con el desarrollo de la hipertensión genética, y apoya el concepto que este péptido participa en la regulación de la presión arterial a nivel cerebelar. Por otra parte, los incrementos en la expresión de la CRLR, RAMP1 y RAMP3 podrían representar un mecanismo compensatorio a la hipertensión con la finalidad de regular la elevación de la presión arterial. Asimismo, es importante señalar que estos cambios pueden constituir la alteración inicial que traería como consecuencia la desregulación de los mecanismos de control de la presión arterial con la consecuente hipertensión, ya que dichos cambios se encuentran presentes desde las etapas tempranas (8 semanas) de vida de las ratas hipertensas.

Si eso es así, el tratamiento con un agente antihipertensivo debería prevenir o revertir la desregulación del sistema adrenomedulérgico cerebeloso. De hecho, nuestros resultados muestran que la administración oral de un antihipertensivo como lo es el valsartán, un bloqueante de los receptores de ANG II, revirtió los

cambios en la expresión de la AM y de los componentes de su receptor observados en las ratas hipertensas (Fig. 110); lo cual sugiere que la hipertensión induce cambios adaptativos para tratar de compensar la elevación de la presión arterial. En efecto, durante la hipertensión genética, el aumento en la expresión de CRLR/ RAMP1 y RAMP3 podría promover la interacción de la AM con los receptores de CGRP y AM2, en lugar con el receptor AM1, y favorecer las respuestas mediadas a través de estos receptores, posiblemente para contrarregular el incremento de la presión arterial. Por su parte, el tratamiento antihipertensivo, al restaurar la expresión de la AM y los componentes de sus receptores incrementando la expresión de RAMP2, promovería a la AM a interactuar con el receptor de AM1 y favorecer así las respuestas mediadas a través de este receptor.



**Fig. 110.** Efecto de la hipertensión y de la disminución de la presión arterial sobre la expresión de la AM y los componentes de su receptor en el vermis de



cerebelo. La expresión de AM y los componentes de su receptor, CRLR, RAMP1, RAMP2 y RAMP3 se encuentran alterados en las ratas SHR con respecto a las normotensas. En las ratas hipertensas hay menor expresión de AM y RAMP2. Por su parte, el CRLR, RAMP1 y RAMP3 muestran mayor expresión durante la hipertensión. Sin embargo, la disminución de la presión arterial con valsartán, revierte la expresión de la AM y los componentes de receptor de AM a niveles similares encontrados en condiciones normales (WKY).

La evidencia indica que el complejo CRLR/RAMP2 representa el complejo de señalización más probable involucrado en la traducción de la actividad biológica de la AM, y se ha postulado que alteraciones en la expresión de las RAMPs están asociadas con alteraciones en la respuesta de la AM (Gibbons y col., 2007). En este sentido, y tal como lo reportaron Gibbons y col., (2007) nuestros resultados pueden sugerir que para la adecuada señalización y respuesta de la AM cerebelar, la RAMP2 es expresada predominantemente en condiciones normales; sin embargo, bajo ciertas condiciones o enfermedades como la hipertensión, la expresión de RAMP3 se ve incrementada y la RAMP2 disminuida; por lo que durante la hipertensión la célula cambia de un fenotipo de alta respuesta a la AM (expresión alta de RAMP2) a otro de baja respuesta (alta expresión de RAMP3). Existen mecanismos que regulan a los receptores de AM, así se sabe que el RAMP3 se enlaza con el NHERF, una proteína adaptadora que contiene dos dominios en tándem PDZ, cuya interacción resulta en la inhibición de la internalización del receptor. Igualmente se ha demostrado que el RAMP3 puede interactuar con el factor sensible a N-etilmaleimida (NSF) de manera de promover un reciclaje lento del receptor. Estos mecanismos podrían ser responsables de mantener el receptor AM2 desensibilizado en la membrana, y para el mantenimiento de un nivel de baja respuesta a la AM, o alternativamente para actuar como un mecanismo de reciclaje del receptor (Gibbons y col., 2007).

Aún más, diversos estudios a nivel periférico han demostrado que la normalización de la presión arterial desde la periferia puede restaurar el patrón de expresión de la AM y sus receptores a nivel periférico. De hecho, Zhao y col., (2006) reportaron un incremento en la expresión de RAMP2, RAMP3 y CRLR en el ventrículo izquierdo de ratas hipertensas inducidas con L-NAME, siendo dicho patrón de expresión normalizado tras la reducción farmacológica de la presión arterial.

Por lo tanto, nuestros resultados demuestran que el control periférico de la presión arterial tras la administración oral de valsartán, fue capaz de revertir los cambios en la expresión de la AM y los componentes de su receptor en el cerebelo de las ratas hipertensas; indicando que la alteración en la expresión de la AM y los componentes de su receptor en el cerebelo constituyen la alteración primaria que lleva a la hipertensión; por lo tanto su reversión con la administración periférica de un antihipertensivo, representaría una estrategia para revertir la alteración primaria en el control de la presión arterial y abre la posibilidad de un mecanismo novedoso en la terapéutica antihipertensiva.

Diferentes estudios tanto a nivel central como periférico indican que la AM puede iniciar diversas vías de señalización como la activación de la vía del AMPc-PKA, el factor nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) (Pleguezuelos y col., 2004), PTK (Iwasaki y col., 2001), proteína fosfatasa 2A (Parameswaran y col., 2000) y PIK3/Akt (Okumura y col., 2004; Yin y col., 2004) dependiendo del tipo de células y las condiciones experimentales. Asimismo, la AM ha demostrado influir sobre la producción de EROs a nivel celular (Yoshimoto y col., 2004; Liu y col., 2007).

Es conocido que diversas formas de estrés celular constituyen las señales primarias que son traducidas en el citoplasma celular y alteran la expresión de genes específicos a nivel del núcleo. Una de esas formas de estrés celular es la producción de EROs (Kunsch y col., 1999). Se ha identificado que células como las endoteliales, fibroblastos y células de músculo liso producen EROs a niveles relativamente bajos en respuesta a señales de activación celular; por lo que estas moléculas actúan como segundos mensajeros para regular las vías de transducción que controlan en última instancia la expresión génica, estando además implicadas en una variedad de enfermedades entre las que se incluyen la hipertensión (Kunsch y col., 1999).

Por lo tanto, un gran cuerpo de evidencias han reportado que las EROs pueden ser consideradas como moléculas de señalización que acoplan la información de señales extracelulares y celulares a señales nucleares con la finalidad de incrementar la producción y expresión de productos pro-inflamatorios (Kunsch y col., 1999). De hecho, se ha postulado que las EROs actúan como segundos mensajeros en la inducción de numerosos procesos celulares, pues podrían estar involucrados en la modulación de factores de transcripción redox sensibles como el NF- $\kappa$ B (Krawiec y col., 2000), la proteína adaptadora -1 (AP-1) y transductores de señal y activadores de la transcripción (STATs), lo cual conlleva la transcripción de genes que codifican citoquinas, factores de crecimiento y moléculas de adhesión celular (Ferroni y col., 2006).

Adicionalmente, las EROs pueden afectar múltiples vía de señalización aguas arribas de los factores de transcripción nuclear, incluyendo señales de modulación de calcio, proteína quinasas y fosfatasas (Kunsch y col., 1999). De hecho, la evidencia muestra que las EROs están involucradas en la señalización intracelular, mediante la activación de receptores de tirosina quinasas y no tirosina quinasas, inhibiendo fosfatasas de tirosina,

incrementando la actividad de quinasas regulatorias, incluyendo la PKC y PKA (Hongpaisan y col., 2004) y regulando la homeostasis del calcio intracelular (Gelband y col., 1997; Griendling y col., 2000<sup>A</sup>; Droge, 2002). Asimismo, las EROs están implicadas en mecanismos de señalización que involucran la activación de las MAPK, incluyendo a las ERK1/2 o p42/p44, las JNK y la p38 MAPK (Griendling y col., 2000<sup>A,B</sup>; Yoshizumi y col., 2001).

Por lo tanto, las EROs pueden funcionar como un regulador fisiológico y patológico de la expresión mediante la modulación de vías de señalización redox sensible y eventos de regulación transcripcional (Kunsch y col., 1999).

Es conocido que las células producen EROs, tales como el anión superóxido y peróxido de hidrógeno, en respuesta a factores de crecimiento y citoquinas (Mohazzab y col., 1994). Se han identificado diversas fuentes intracelulares productoras de EROs, como la NAD(P)H oxidasa, SON desacoplada, ciclooxigenasa, lipooxigenasa, xantina oxidasa, cadena de transporte de electrones mitocondrial, entre otros (Higashi y col., 2009).

La NAD(P)H oxidasa ha sido reportada como la principal fuente de EROs en la vasculatura, esta enzima cataliza la reducción del oxígeno molecular a anión superóxido. Se han identificado expresión de isoformas de la NAD(P)H oxidasa en muchos órganos, incluyendo tejidos neuronales, CDV, riñón, entre otros. Estas enzimas están compuestas por dos proteínas catalíticas transmembrana, gp91 phox y p22 phox, y tres subunidades citosólicas asociadas, p47phox, p67phox y p40 phox. La activación de la NAD(P)H oxidasa típica es dependiente del ensamblaje de las subunidades, la cual requiere la fosforilación de la subunidad p47phox regulatoria. Además de la gp91 phox, (también llamada Nox 2), se han identificado otras proteínas homólogas como Nox1,

Nox4 y Nox 5 en las células endoteliales y de músculo liso vascular. Las Nox han sido identificadas como una de las enzimas más importantes en la producción de anión superóxido en la vasculatura bajo condiciones fisiológicas y patológicas para ejercer una acción regulatoria redox sobre la función vascular o en estado patológico (Mohazzab y col., 1994; Droge, 2002; Zhang y col., 2008).

Uno de los principales activadores de la NAD(P)H oxidasa es la ANG II en el cerebro y tejidos periféricos (Griendling y col., 2000<sup>A</sup>). Este péptido participa en diversas funciones cardiorrenales, neurales y endocrinas para mantener la homeostasis del organismo. Un gran cuerpo de evidencias indican que las EROs y en particular el anión superóxido y el peróxido de hidrógeno son segundos mensajeros intracelulares importantes que median muchas de las acciones de la ANG II (Griendling y col., 2000<sup>A,B</sup>; Zimmerman y col., 2002).

De hecho, la ANG II es un mediador importante de la función de las células de músculo liso vascular, siendo un gran número de efectos mediados a través de la generación de EROs (Ushio-Fukai y col., 1996; Frank y col., 2001), pues se ha demostrado que la respuesta del incremento del calcio intracelular mediado por la ANG II en arteriolas aferentes renales, está relacionada con la producción de anión superóxido, pues dicho efecto es inhibido con el pre-tratamiento con apocinina, un inhibidor de la NAD(P)H oxidasa (Fellner y col., 2005). Asimismo, el efecto natriurético y kaliurético tras la administración *icv* de la ANG II es mediado a través de la estimulación de la NAD(P)H oxidasa y la producción de anión superóxido, pues este efecto es inhibido con el pretratamiento con apocinina o tempol, inhibidor de la NAD(P)H oxidasa y un mimético de la SOD, respectivamente (Israel y col., 2009). Por otra parte, se ha observado que la hipertrofia inducida por ANG II es inhibida por la sobreexpresión de la CAT, la cual hidroliza el peróxido de hidrógeno, o a través de la inhibición de la

NAD(P)H oxidasa, indicando el papel de las EROs como vías de señalización en los efectos inducidos por la ANG II (Ushio-Fukai y col., 1996; Liu y col., 2007).

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 (Zimmerman y col., 2002; Erdös y col., 2006). Así, los cambios que induce la administración *icv* de ANG II sobre la presión arterial media y la frecuencia cardíaca pueden ser abolidos por la sobreexpresión mediada por un vector de la SOD (Zimmerman y col., 2002). 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.

Por su parte, la AM es un péptido con efectos pleiotrópicos que incluyen crecimiento celular, migración, apoptosis, inflamación, angiogénesis y secreción de hormonas. Se ha descrito, que ratones heterocigotos para la AM presentan inflamación perivascular en arterias coronarias y un incremento del estrés oxidativo sistémico y local, el cual es revertido con la suplementación de AM, lo cual sugiere que la AM puede jugar un papel protector contra el estrés oxidativo como un antioxidante endógeno *in vivo* (Shimosawa y col., 2002). De hecho, la AM ha sido descrita como una sustancia antioxidante endógena (Shimosawa y col., 2002; Kato y col., 2003), pues, Nishimatsu y col., (2002) demostraron que la AM endógena fue citoprotectora contra el daño a órganos, por lo que la AM podría constituir un candidato como agente terapéutico para el tratamiento de la enfermedad CDV.

Si ello es así, entonces la estimulación aguda de la vía de la NAD(P)H oxidasa-enzimas antioxidantes estimulada por la AM debería estar disminuida, mientras

que la estimulada por la ANG II debería estar estimulada. Nuestros resultados apoyan esta aseveración. En efecto, demostramos, por primera vez, que la AM disminuyó la actividad de las enzimas antioxidantes, SOD, CAT y GPx en el vermis de cerebelo de ratas Sprague-Dawley, tal y como lo han reportado otros investigadores en otros órganos como riñón e hígado (Yurekli y col., 2009; Cikcikoglu y col., 2010). Esta disminución en la actividad de las enzimas sugiere que la AM es capaz de disminuir la producción de EROs, pues la disminución de la actividad de las enzimas antioxidantes se acompañó de una disminución en la producción de productos de peroxidación lipídica. De hecho, se ha descrito que la AM tiene propiedades antioxidantes (Ando y col., 2004), pues la AM reduce la sobreproducción de EROs (Ando y col., 1998; Chun y col., 2000) y dichos efectos pueden proteger a diferentes órganos del daño inducido por estresores (Dogru y col., 2007), sugiriendo que la AM posee acciones protectoras contra la respuesta vascular al daño, posiblemente a través de la inhibición de la producción del estrés oxidativo (Kawai y col., 2004). Aún más, esta disminución en la actividad de las enzimas antioxidantes, sugiere una menor producción de EROs, y por lo tanto una disminución en la activación de cascadas de señalización activadas por estas moléculas.

Por su parte, nuestros resultados demostraron que la estimulación aguda con ANG II incrementó la actividad de las enzimas antioxidantes en el vermis de cerebelo de la rata; lo cual sugiere que la ANG II incrementa la producción de EROs en el vermis de cerebelo de la rata, ya que este efecto estuvo asociado además a un incremento en la producción de productos de peroxidación lipídica inducida por la ANG II, lo cual sugiere que la ANG II es capaz de incrementar la producción de EROs, las cuales a su vez pueden activar diversas vías de señalización a nivel del vermis cerebelar. De hecho, diversos estudios han indicado que la activación de las ERK1/2 y subsecuente expresión de genes en las células de músculo liso vascular inducida por la ANG II es inhibida con el

pretratamiento con antioxidantes (Frank y col., 2001), sugiriendo su señalización redox sensible.

Por su parte, se ha documentado que la exposición a las EROs incrementa la expresión de enzimas antioxidantes (Talalay y col., 2003; Bae y col., 2004), pues los genes que codifican estas enzimas son regulados por los elementos de respuesta antioxidantes (ARE) en sus regiones regulatorias (Lee y col., 2004), un proceso que ocurre a través de la activación del factor de transcripción factor 2 relacionado NF-E2 (Nrf2). La unión de Nrf2 a estos sitios ARE conlleva un incremento en la expresión de las enzimas antioxidantes para compensar la toxicidad de las EROs (Lee y col., 2004). Por lo tanto, nuestros resultados pueden indicar que la ANG II induce un incremento en la actividad de las enzimas antioxidantes, como efecto contrarregulador al incremento en la producción de EROs, pues la SOD es capaz de convertir el anión superóxido a peróxido de hidrógeno, el cual es detoxificado a agua por acción de la CAT y GPx (Griendling y col., 1994; Babior, 1999).

Es importante destacar que diferentes estudios han indicado que el cerebelo de rata contiene todos los componentes del sistema renina – angiotensina. Es conocido que la ANG II ejerce sus funciones en diferentes tejidos a través de su unión con sus receptores de membrana, el receptor AT<sub>1</sub> y AT<sub>2</sub>, los cuales son receptores de 7 dominios transmembrana acoplados a proteína G (Arce y col., 2001). Efectivamente, se ha demostrado la presencia de inmunoreactividad a la ANGII en neuronas cerebelares y mediante técnicas de autoradiografía e hibridación *in situ* se ha descrito la presencia de ambos subtipos de receptores de ANG II en el cerebelo de ratas jóvenes (Erdmann y col., 1996; Johren y col., 1996<sup>A,B</sup>; Arce y col., 2001; Arce y col., 2011), evidenciándose el receptor AT<sub>1</sub> en la capa molecular y AT<sub>2</sub> en la capa de las células de Purkinje del cerebelo. De hecho, estudios recientes han indicado que el receptor AT<sub>2</sub> podría jugar un



papel importante en el establecimiento de conexiones, migración e interacciones neuronales (Arce y col., 2011), ya que ratones deficientes del receptor  $AT_2$  presentan anomalías neurológicas, y que lesiones químicas en la oliva inferior reduce la unión de la ANG II a los receptores  $AT_2$  no sólo en la oliva inferior, sino en la corteza cerebelar de ratas jóvenes, lo que sugiere que los receptores  $AT_2$  presentes en la capa molecular del cerebelo son producidos por las neuronas de la oliva inferior y transportados a través de las fibras trepadoras (Arce y col., 2001). De igual manera, se ha evidenciado la presencia de ambos subtipos de receptores de ANGII en el cerebelo de ratas adultas (Arce y col., 2011).

Por otra parte, diversos estudios han indicado que la AM tiene un efecto contrarregulador de las acciones inducidas por la ANG II a diversos niveles y localizaciones, pues se ha indicado que la AM es capaz de disminuir el incremento en la expresión de genes redox sensibles como la molécula de adhesión intercelular -1 (ICAM-1), molécula de adhesión celular vascular-1 (VCAM-1) y la MCP-1, inducidos por la ANG II en células endoteliales de aorta de rata (Yoshimoto y col., 2005). Por su parte, Rossi y col., (2006<sup>A,B</sup>) encontraron que la AM ejerce un potente efecto inhibitorio sobre la contracción y proliferación celular en células quiescentes de músculo liso de aorta inducida por la ANG II, a través de la vía AMPc/PKA. Igualmente, Tsuruda y col., (2005) encontraron que la AM disminuyó el depósito de colágeno en arterias coronarias inducida por la ANG II.

La existencia en el SNC de efectos contraregulatorios entre la AM y la ANGII se ratifica en el presente estudio, ya que demostramos que la AM fue capaz de inhibir el efecto estimulador inducido por la ANGII en la actividad de las enzimas antioxidantes. Esto sugiere que la AM es capaz de disminuir la producción de EROs estimulada por ANGII en el vermis de cerebelo de la rata,

tal y como lo han reportado otros investigadores en otros tejidos. Al respecto, Yoshimoto y col., (2005), encontraron que la AM fue capaz de disminuir el incremento en la producción de EROs, inducido por la ANG II en células endoteliales de aorta de rata. Por su parte, Yoshimoto y col., (2004), encontraron que la AM inhibió directamente la generación intracelular de EROs inducida por ANG II, a través de un mecanismo dependiente del receptor de AM y la activación de la vía dependiente de AMPc- PKA en las células de músculo liso vascular, y que la AM con su potente acción antioxidante inhibe la activación JNK redox sensible y la expresión de genes como la MCP-1 y Nox1 inducido por la ANG II, sugiriendo que la AM juega un papel protector como un antioxidante endógeno en el daño vascular inducido por la ANG II, por lo que la acción antioxidante de la AM es en parte responsable del bloqueo de las vías de señalización redox - sensible. Por lo tanto, el efecto contrarregulador de la AM sobre el incremento en la actividad de las enzimas antioxidantes inducido por la ANG II en el vermis de cerebelo de la rata, sugiere que la AM juega un papel importante en contrarrestar el incremento en la producción de EROs inducido por la ANG II, modulando sus efectos.

Diversas son la vías que podrían mediar la acción contrarreguladora de la AM sobre la acción estimuladora de la ANG II sobre la actividad de las enzimas antioxidantes en el vermis de cerebelo de ratas. Nuestros resultados en los que se demuestra que el pretratamiento con PKI-(6-22)-amida, un inhibidor de la PKA, fue capaz de revertir el efecto inhibitorio de la AM sobre la actividad de las enzimas antioxidantes sin afectar la acción de la ANG II, parecen indicar que el efecto de la AM es mediado a través de la vía de PKA, tal y como lo han reportado otros estudios en otros tejidos (Chini y col., 1997; Shimosawa y col., 2002; Yoshimoto y col., 2004), pues diversas evidencias señalan que la AM posee propiedades protectoras contra el daño a órganos producida por un gran número de condiciones fisiopatológicas, a través de la inhibición del estrés oxidativo (Shimosawa y col., 2002; Kawai y col., 2004; Matsui y col., 2004), ya

que en las células mesangiales, la AM suprime la producción de EROs a través de la vía AMPc-PKA (Chini y col., 1997). Sin embargo, en el ventrículo de la rata, el incrementado estrés oxidativo causado por el daño isquemia – reperusión puede ser atenuado por la inhibición de la NAD(P)H oxidasa mediado por la AM a través de una vía NO-GMPc (Kato y col., 2003); por lo que los mecanismos que median esta actividad varían dependiendo de las condiciones experimentales y el tipo de célula (Liu y col., 2007).

Si el iPKA no afectó la acción de la ANG II, su efecto sobre las enzimas antioxidantes podría estar mediado a través de la vía de la NAD(P)H oxidasa/PKC, tal y como se ha descrito en otros tejidos. Efectivamente nuestros resultados demuestran que el pretratamiento con apocinina y cheleritrina, inhibidores de la NAD(P)H oxidasa y PKC, respectivamente, bloquearon completamente el efecto de la ANG II sobre la actividad de las enzimas antioxidantes en el vermis cerebelar y no afectaron la acción inhibitoria de la AM (Fig. 105).

Diversos estudios a nivel central y periférico han indicado que la generación intracelular de EROs estimulada por ANG II es mediada a través de la vía de la NAD(P)H oxidasa (Griendling y col., 1994; Ushio-Fukai y col., 1996; Ishida y col., 1998; Lassegue y col., 2003), tal y como lo reportamos en el presente estudio; pues, Chan y col., (2005) encontraron que la microinyección de difenileneiodonio (DPI) u oligonucleótidos antisentido a las subunidades p22phox o p47phox de la NAD(P)H oxidasa en el RVLM previno parcialmente el incremento en la producción local de anión superóxido inducido por la ANG II (Chan y col., 2005). Asimismo, la administración de DPI y apocinina, inhibidores de la NAD(P)H oxidasa en el RVLM o en los ventrículos cerebrales atenuó la respuesta presora a la ANG II en ratas (Chan y col., 2005; Erdös y col., 2006). De igual manera, Liu y col., (2007) encontraron que el pretratamiento con alopurinol o con rotenona, inhibidor de la xantina oxidasa y de las EROs

derivadas de la mitocondria, respectivamente, no tuvieron efecto sobre la producción de EROs estimuladas por la ANG II; en contraste el pre-tratamiento con apocinina, un inhibidor específico de la NAD(P)H oxidasa, redujo la producción de EROs estimuladas por la ANG II (Liu y col., 2007).

Por lo tanto, desde que se conoce que la NAD(P)H oxidasa cataliza la reducción del oxígeno molecular a superóxido, el cual por acción de la SOD es convertido a peróxido de hidrógeno; y a su vez este último convertido en agua por acción de la enzima CAT o GPx (Fridovich, 1997; Babior, 1999), es plausible proponer que la cascada de la NAD(P)H oxidasa está involucrada en la señalización de la ANG II 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, tal y como lo observamos en nuestro estudio. De hecho, se ha demostrado que la preincubación del tejido hipotalámico con un desacoplante del ensamblaje de la NAD(P)H oxidasa, como la apocinina, inhibió completamente el efecto estimulador de la ANG II sobre la actividad de las enzimas antioxidantes: CAT, SOD y GPX (Silva y col., 2009; Silva y col., 2010).

Existe evidencia que sugiere que la NAD(P)H oxidasa periférica y central es regulada por la PKC, enzima que es activada por la ANG II (Griendling y col., 2000<sup>A,B</sup>; Sumners y col., 2002; Lassegue y col., 2003; Silva y col., 2009; Silva y col., 2010). De hecho, diversos estudios han indicado que algunas acciones de la ANG II son mediadas a través de la activación de la PKC, pues el incremento en la tasa de disparo de neuronas en el hipotálamo y tallo cerebral de ratas inducido por la ANG II, es inhibido con el pre-tratamiento de un inhibidor de la PKC (Sumners y col., 1996; Wang y col., 1997<sup>A,B</sup>). Asimismo, el efecto natriurético, kaliurético inducido por la administración central de la ANG II es mediado a través de la estimulación de los receptores AT1 en el cerebro, por una vía que involucra la activación de la PKC, pues el efecto es inhibido por la

cheleritrina, inhibidor de la PKC (Barbella y col., 1993; Israel y col., 2009). Igualmente, el efecto dipsogénico inducido tras la administración central de ANG II es mediado a través de la vía de la PKC (Fleegal y col., 2003). Todos estos hallazgos y los presentados en el presente estudio en el vermis de cerebelo de la rata, demuestran de forma inequívoca que el incremento en la actividad de las enzimas antioxidantes inducido por la ANG II es mediado a través de la vía PKC/NAD(P)H oxidasa.

Se ha postulado que la NAD(P)H oxidasa es un posible blanco de los efectos antioxidantes de la AM. De hecho, se ha encontrado que la ANG II a través de un mecanismo redox sensible, aumenta la expresión de la Nox1, miembro de la familia gp91 phox de la NAD(P)H oxidasa, siendo dicho efecto bloqueado con el pretratamiento de AM (Yoshimoto y col., 2004).

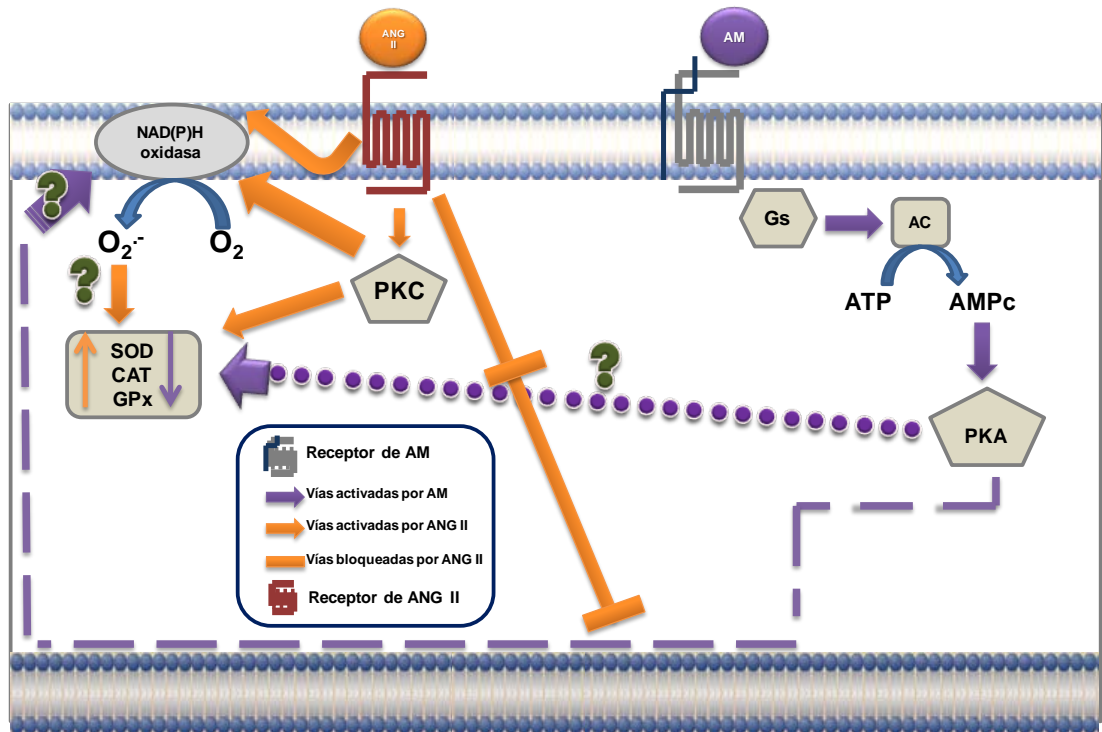
Asimismo, varias moléculas de señalización tales como la fosfolipasa D, PKC, fosfolipasa A<sub>2</sub> y PIK3 están implicados en la activación de la NAD(P)H oxidasa evocada por la ANG II (Touyz y col., 1999; Griendling y col., 2000<sup>A</sup>; Touyz y col., 2001; Touyz y col., 2002<sup>A,B</sup>); sin embargo, múltiples evidencias indican que el Src (el cual influye en todas estas moléculas de señalización), es un mediador común aguas arribas (Seshiah y col., 2002).

Las Src quinasas son una familia de no receptores tirosina quinasas, de los cuales el prototipo c-Src, es la principal isoforma en la vaculatura (Oda y col., 1999; Okumura y col., 2004). La Src puede cambiarse de un estado inactivo a uno activo a través del control de la fosforilación de dos sitios principales, Tyr 416 y Tyr 527. La fosforilación en el residuo de Tyr 416 activa la Src; por su parte, la fosforilación de Tyr 527 inactiva a esta tirosina quinasa. La quinasa Src COOH-terminal (Csk) es una enzima clave que fosforila a Src en el residuo

Tyr 527 (Martin, 2001). En las células de músculo liso vascular se ha descrito que la c-Src es activada rápidamente por la ANG II y juega un papel importante en la señalización del crecimiento (Ishida y col., 1998). Adicionalmente, se ha descrito que la PKA intercepta la señalización Src en células de mamíferos (Abrahamsen y col., 2003).

En este sentido, se ha descrito en células de músculo liso vascular que la NAD(P)H oxidasa es la principal fuente del marcado incremento en las EROs inducido por el tratamiento con ANG II, siendo este efecto inhibido por la AM a través de la vía AMPc-PKA (Yoshimoto y col., 2004). Adicionalmente, el Src es la principal molécula de señalización aguas arriba que media la incrementada generación de EROs inducida por la ANG II a través de la NAD(P)H oxidasa (Seshiah y col., 2002); y la atenuación de la actividad de Src en células de músculo liso vascular tratadas con ANG II es regulada por la fosforilación y subsecuente activación de Csk, el cual es dependiente de la AM a través de la vía AMPc-PKA; por lo que jugaría un papel auto regulatorio mediante la iniciación de un asa de control negativa (Liu y col., 2007).

Por lo tanto, el efecto antagónico entre la AM y ANG II sobre la actividad de las enzimas antioxidantes observados en el presente estudio, sugiere que debe existir una molécula que intercepta la vía de señalización de la AM sobre la vía activada por la ANG II; es posible que esta molécula sea la Src, tal como lo encontró Liu y col., (2007) en células de músculo liso vascular, pues la vía AMPc-PKA es la principal vía de señalización que media la inhibición de la producción de EROs por parte de la AM, y la PKA regula la actividad de Csk a través de su fosforilación. Por lo que la inactivación de c-Src a través de la vía Csk a través de la PKA, podría ser un candidato a través del cual la AM intercepta la señalización de EROs estimulada por ANG II (Liu y col., 2007). (Fig. 111).



**Fig. 111.** Propuesta del mecanismo de la vía de acción de la AM en el vermis de cerebelo de la rata. La ANG II es capaz de incrementar la actividad de la SOD, CAT y GPx a través de una vía dependiente de PKC y NAD(P)H oxidasa. Por su parte, la AM es capaz de inhibir la actividad de dichas enzimas mediante un mecanismo dependiente de la PKA, evidenciando un efecto antagónico de la ANGII sobre la AM.

No se ha establecido hasta el presente los subtipos de receptores que median la acción de la AM sobre la actividad de las enzimas antioxidantes. Al respecto, nuestros resultados demostraron que dicho efecto es mediado a través de los receptores de CGRP y AM, pues fue completamente inhibido tras el pretratamiento con CGRP8-37 y AM22-52, inhibidores de los receptores de CGRP y AM, respectivamente. Esto indica claramente que la disminución de la actividad de las enzimas antioxidantes inducida por la AM observadas en el vermis de cerebelo de ratas es mediado por ambos subtipos de receptores de la AM y por el receptor CGRP. De hecho se ha reportado en células de músculo liso vascular de rata, que el efecto inhibitorio de la AM sobre la generación de

EROs estimulada por ANG II es mediado por los receptores de AM y el receptor de CGRP (Liu y col., 2007).

Es importante considerar que durante la hipertensión, diferentes estudios han indicado que la AM protege del daño CDV mediante la disminución de la producción de EROs mediada por la NAD(P)H oxidasa (Shimosawa y col., 2002; Kato y col., 2003; Kawai y col., 2004; Yoshimoto y col., 2004; Yoshimoto y col., 2005; Rahman y col., 2006). De hecho, Cao y col., (2005) y Rahman y col., (2006) demostraron que la infusión de AM disminuyó los niveles de TBARS y atenuó la producción de EROs mediada por NAD(P)H oxidasa en ratas hipertensas, mediante la disminución de su actividad y la expresión de p22phox y gp91phox, componentes de la NAD(P)H oxidasa.

Por otra parte, diversas líneas de evidencia demuestran que el estrés oxidativo y las EROs participan en la patogénesis de las enfermedades CDV, tales como la hipertensión (Griendling y col., 2000<sup>A,B</sup>; Rodrigo y col., 2007), pues es conocido que el anión superóxido inactiva el NO, por lo que el estrés oxidativo puede llevar a la disfunción endotelial (Zicha y col., 2001).

Se ha propuesto que las EROs están involucradas en el desarrollo de la hipertensión, pues se ha demostrado una elevada producción de EROs en diversos modelos animales con hipertensión (Somers y col., 2000). De hecho, el estrés vascular oxidativo ha sido asociado con un gran número de modelos animales de hipertensión tales como las ratas SHR y las ratas hipertensas Dahl sal –sensibles (Schnackenberg y col., 2002). Y el tratamiento con tempol, un mimético de la SOD, es capaz de disminuir la presión arterial y la producción de EROs en las ratas SHR (Schnackenberg y col., 1999).



Así, se ha demostrado un incremento en la expresión de los componentes de la NAD(P)H oxidasa en aorta de ratas SHR, y se ha asociado la disfunción endotelial con un incremento en la producción de EROs en lugar de una disminución en la producción de NO (Zalba y col., 2000). Asimismo, se ha demostrado que las alteraciones estructurales en los vasos de resistencia (remodelado vascular) que ocurren durante la hipertensión, han sido asociados con el incremento de muchas de las vías de señalización de la ANG II; ya que ha sido demostrado la hiperactivación mediada por ANGII de la NADP(H) oxidasa vascular, la generación de EROs y subsecuente activación de MAPK, PTK, fosfatasas y factores de transcripción (Touyz y col., 2003).

Aunado a los resultados descritos, nuestros resultados del presente estudio apoyan el concepto de un incremento del estrés oxidativo durante la hipertensión, no sólo en estructuras periféricas sino específicamente en el cerebelo de la rata. Efectivamente, nuestros hallazgos demuestran que las ratas hipertensas presentan mayor producción de marcadores de peroxidación lipídica en el vermis cerebelar con respecto a las controles normotensas, lo cual sugiere un incremento en la producción de EROs basal durante la hipertensión. Aún más, el efecto antioxidante basal de la AM podría estar alterado durante la hipertensión. Nuestros hallazgos parecen indicar esto, ya que se pudo observar que durante la hipertensión arterial, la AM no fue capaz de reducir la actividad basal de las enzimas antioxidantes, SOD, CAT y GPx, y ni de disminuir la peroxidación lipídica; sin embargo, la AM fue capaz de disminuir la actividad de las enzimas antioxidantes estimulada por la ANGII en el cerebelo de ratas hipertensas. Por lo tanto, en la hipertensión, parece ocurrir una desregulación de la capacidad antioxidante basal de la AM reflejada sobre el control y la regulación de la actividad de las enzimas antioxidantes; sin embargo, ante un sistema estimulado previamente con ANG II, el control ejercido por la AM está preservado. Estos resultados demuestran además que los receptores de AM en el vermis cerebelar son funcionales durante la hipertensión.

Es importante tener en cuenta que, Touyz y col., (2002<sup>B</sup>), encontraron que la ANG II es capaz de fosforilar a la Tyr416 de la Src, activándola, siendo este efecto mucho mayor en las ratas SHR en comparación a las WKY. Sin embargo la ANG II ha demostrado incrementar la fosforilación de la Csk dos o tres veces en las WKY, pero no en las SHR; por lo que el crecimiento celular dependiente de Src y la fosforilación de la c-Src seguido tras el tratamiento con ANG II está incrementado en ratas SHR y estos procesos están asociados con el bloqueo de la fosforilación de la Csk inducido por ANG II (Touyz y col., 2002<sup>B</sup>). Por lo tanto, es posible que exista otra vía que esté perturbada en la hipertensión y que explique la ausencia del efecto de la AM sobre la actividad de las enzimas antioxidantes basal durante la hipertensión.

Alternativamente, la ausencia de respuesta a la AM sobre la actividad de las enzimas antioxidantes basal en el vermis cerebelar de las ratas SHR pudo ser debido al cambio en el patrón de expresión de los componentes de los receptores de AM observados en el vermis cerebelar durante la hipertensión, pues como hemos demostrado, durante la hipertensión existe un incremento en la expresión de receptor de CGRP (CRLR+RAMP1) y AM2 (CRLR+RAMP3), y menor expresión del receptor AM1 (CRLR+RAMP2). Al respecto, el hecho que la reducción de la presión arterial tras el tratamiento con dos antihipertensivos de diferente mecanismo de acción como lo son la amlodipina, un bloqueante de los canales de calcio o el valsartán, un antagonista de los receptores AT1 de ANG II, restituyó la respuesta de la AM (para ambos) y la expresión de los componentes del receptor (valsartán) (presente estudio), sugiere que la expresión óptima del receptor de AM2 es necesaria para la adecuada señalización de la AM, la cual no parece ser dependiente de la vía de la ANG II, sino de la disminución de la presión arterial. Diversas evidencias han demostrado que fármacos antihipertensivos como el valsartán, son capaces de disminuir el estrés oxidativo, por lo que se le ha atribuido propiedades antioxidantes (Dohi y col., 2003; Rodrigo y col., 2007).

Se ha demostrado que la AM es capaz de activar diversas vías de señalización intracelular. Una de las principales vías a través de la cual la AM ejerce sus efectos es la activación de la vía AC/AMPc (Wong y col., 2012<sup>B</sup>). Sin embargo, se sabe que la AM es capaz de activar otras vías de señalización en diversos órganos y tejidos, tales como la PLC (Shimekake y col., 1995), GC (Shimekake y col., 1995; Ikenouchi y col., 1997), ERK (Iwasaki y col., 1998) y las p38, JNK (Parameswaran y col., 1999). De igual manera, se ha demostrado que la AM es capaz de activar otros mecanismos de señalización intracelular, incluyendo los canales de potasio sensibles a ATP (Sakai y col., 1998). Sin embargo, se desconoce la vía de señalización de la AM en el cerebelo.

Las proteínas quinasas cumplen una función importante en el organismo y juegan un papel crucial en diferentes señales de transducción. Es conocido que las MAPK son componentes principales de las vías de control de embriogénesis, diferenciación, proliferación y muerte celular (Pearson y col., 2001). Existen diferentes miembros de la familia de las MAPK entre las que destaca las ERK, JNK y p38 (Otani y col., 2002). Estas proteínas son activadas por fosforilación en respuesta a una variedad de estímulos mitogénicos. Una vez que son activadas, las ERK son translocadas al núcleo y pueden fosforilar una gran variedad de factores de transcripción, entre los que se incluyen Elk-1, proteínas de unión de elementos de respuesta al AMPc (CREB) y factores de transcripción activados (ATF) (Hill y col., 1993; Kyosseva y col., 2001).

Las ERK1/2 son proteínas serina/treonina quinasas de 43 y 41KDa, que son activadas en respuesta a factores de crecimiento (Boulton y col., 1991), el estrés oxidativo (Aikawa y col., 1997) y por el incremento del calcio intracelular (Kurino y col., 1995). Estas proteínas de señalización juegan un papel importante en la supervivencia, proliferación y diferenciación de varios tipos celulares (Otani y col., 2002).

Diferentes estudios muestran que las ERK1/2 están ampliamente expresadas en tejidos periféricos y centrales. A nivel del cerebelo, existe una alta distribución celular e intracelular de las ERK tanto en ratas jóvenes como adultas. De hecho, estudios de inmunohistoquímica han demostrado que las células de Purkinje, granulosas y gliales del cerebelo de la rata son inmunoreactivas a las p-ERK1/2 (Zsarnovszky y col., 2004). Asimismo, algunos estudios han indicado que el inicio de la activación de las ERK coincide con los eventos de desarrollo cerebeloso, lo cual sugiere que las vías de las ERK juega un papel muy importante en la regulación de la migración y proliferación celular, y en la maduración sináptica en el desarrollo del cerebelo. Sin embargo, se ha postulado que en el cerebelo adulto la señalización de las ERK podría mediar el procesamiento de la información postsináptica (Zsarnovszky y col., 2004)

Existe evidencia que indica que la activación de las ERK1/2 en tejidos periféricos está asociada a la hipertensión. En este sentido, Xu y col., (1996) encontraron que la activación de las ERK en la pared vascular durante la hipertensión fue seguida de la expresión de genes *c-fos* y *c-jun*, por lo que la activación de las ERK puede contribuir directamente a los cambios patológicos que ocurren durante la hipertensión, como la hipertrofia y proliferación de las células de músculo liso asociado con el remodelado de arterias mayores. Es conocido que las proteínas Fos y Jun se combinan para formar un heterodímero AP-1 estable, el cual se une a las secuencias consenso AP-1 presente en numerosos genes asociados con proliferación celular y respuesta hipertrófica (Bishopric y col., 1992). Por lo que la activación de la AP-1 podría conllevar una significativa alteración en el programa genético de las células de músculo liso que resulta en cambios fenotípicos y proliferación celular. De hecho, Hamaguchi y col., (1998) reportaron que la activación de las ERK a través de la activación de la AP-1 en el riñón de ratas durante la hipertensión, puede ser responsable del daño glomerular. Asimismo, Jing y col., (2011) encontraron mayor activación de las ERK1/2 y mayor expresión de las ERK en las células de músculo liso

vascular y en células endoteliales de arterias renales en las ratas hipertensas con respecto a las normotensas. Aún más, el hecho de que el tratamiento con un inhibidor de las ERK en las ratas hipertensas, redujo el engrosamiento de la pared vascular inducido por la hipertensión, lo cual fue asociado con supresión de la expresión de la ERK y la fosforilación de las ERK1/2 en las células de músculo liso vascular y endotelial de las arterias renales, sugiere que las ERK1/2 juegan un papel importante en el remodelado vascular de las arterias renales durante la hipertensión.

En relación al SNC, algunos estudios han reportado que las MAPK a nivel central pueden cumplir un importante papel en la regulación de la presión arterial, pues Seyedabadi y col., (2001), demostraron que la inhibición de las MAPK en el RVLM es vital para el mantenimiento de los niveles tónicos de presión arterial en ratas SHR y WKY. Igualmente, se ha demostrado que las cascadas de las ERK1/2 tienen importancia en la modulación de la potenciación a largo plazo en el área CA1 del hipocampo y es requerida para varias formas de aprendizaje y memoria. Asimismo, se ha indicado que la cascada de las ERK participa en el daño neuronal inducido por isquemia y en la generación de actividad convulsivante en cultivos de neuronas de hipocampo (Vanhoose y col., 2002). Ahora bien, el posible papel de la activación de las ERK1/2 cerebelosa durante la hipertensión no ha sido establecido hasta el presente. Nuestros hallazgos demuestran un incremento en la activación de las ERK1/2 en el vermis de cerebelo tanto de las ratas SHR como las WKY, lo que apoya el papel fundamental de esta señalización en la regulación de la presión arterial mediada por el cerebelo, de forma similar a lo reportado por otros investigadores en otros órganos (Xu y col., 1996; Hamaguchi y col., 1998; Yano y col., 1998; Parenti y col., 2000; Ding y col., 2007; Fernández y col., 2009).

La señal precisa responsable de la activación de las quinasas durante la hipertensión aguda no es totalmente clara; sin embargo, se ha descrito un efecto directo de la presión arterial. Igualmente, se conoce que el estrés oxidativo está involucrado en la señalización de las ERK1/2 (Zhang y col., 1998<sup>A</sup>; Song y col., 2005), pues se ha demostrado que las ERK pueden ser activadas por las EROs (Sundaresan y col., 1995; Ushio-Fukai y col., 1998; Griending y col., 2000<sup>A,B</sup>; Viedt y col., 2000; Frank y col., 2001; Song y col., 2005). Asimismo, se ha demostrado que las MAPK son activadas en la hipertensión experimental (Nishiyama y col., 2004). Por ello podríamos inferir que la mayor fosforilación de las ERK1/2 en el vermis de cerebelo de ratas hipertensas con respecto a las normotensas puede ser atribuida a la mayor producción de EROs en las ratas SHR, sugiriendo un posible papel de las EROs en esta activación. En este sentido, el peróxido de hidrógeno ha demostrado activar las ERK en diferentes tipos celulares como células de músculo liso de aorta (Guyton y col., 1996), pulmón (Zhang y col., 1998<sup>B</sup>), ileal (Song y col., 2005) y miocitos traqueales (Abe y col., 1998).

Además del estrés oxidativo, existe evidencia que indica que el estiramiento (estrés mecánico) de células en cultivo puede activar a las MAPK (Adam y col., 1995; Yamazaki y col., 1996) e inducir la expresión de genes como *c-fos* y *c-jun* (Komuro y col., 1993). Asimismo, agentes como la ANG II han mostrado que son capaces de activar las ERK e inducir la expresión de genes en cultivo celular (Tsuda y col., 1992). De hecho, se ha sugerido que la activación de las MAPK en la pared arterial ocurre como una respuesta fisiológica a la hipertensión aguda. Por otra parte, la familia de las proteínas Ras puede activar diversas vías de señalización intracelulares como las ERK. Esta familia de proteínas está formada por un grupo de pequeñas GTPasas que funcionan como transductores de señales extracelulares que regulan eventos como supervivencia, crecimiento y diferenciación celular. Aún más, las Ras parecen estar involucradas en el desarrollo de la hipertensión, pues su activación

contribuye con el desarrollo de la hipertensión dependiente de ANGII y está asociada con patología vascular; por su parte, la inhibición de la señalización mediada por Ras-GTPasa puede atenuar el daño a órganos durante la hipertensión (Fernández y col., 2009).

En relación al receptor que media el efecto de la AM sobre las ERK1/2 en el vermis de cerebelo de ratas, nuestros resultados demuestran que dicho efecto fue mediado principalmente por el receptor de AM1, ya que fue completamente bloqueado por el AM22-52, un inhibidor de los receptores específicos de la AM y no por el pre-tratamiento con CGRP8-37, un bloqueante del receptor CGRP; pues en la rata el receptor CGRP es sensible al CGRP8-37, el receptor AM1 es sensible a AM22-52, mientras que el receptor AM2 es sensible a ambos antagonistas, en especial al CGRP8-37 (Kuwasako y col., 2004). Nuestros hallazgos, son los primeros que describen el efecto de la AM en el SNC y están avalados por lo obtenido previamente en otros tejidos y órganos donde la AM activa a las ERK1/2. Así, Yoshimoto y col., (2004), encontraron que la AM activó las ERK1/2 en células de músculo liso. De igual manera, Iwasaki y col., (1998), encontraron que la AM estimuló la actividad de las MAPK, la expresión de *c-fos* y subsiguiente proliferación de células de músculo liso vascular a través de una vía dependiente de PTK, y no a través de la vía AMPc/PKA o a través de la vía calcio/PKC.

Existe evidencia que indica que la AM es capaz de incrementar los niveles de calcio intracelular y activar la PKC (Shimekake y col., 1995). De hecho, se ha demostrado que la activación de los receptores de AM en células endoteliales de bovino, provoca un incremento en la concentración de calcio intracelular y la activación de la PKC a través de la vía IP3 y producción de diacilglicerol (Shimekake y col., 1995), lo que sugiere que la AM puede activar la PLC. En efecto, Shimekake y col., (1995) encontraron en células endoteliales de aorta

de bovino que la AM ejerce un efecto bifásico sobre la elevación del calcio intracelular, pues la AM fue capaz de activar la PLC a través de su receptor específico acoplado a proteína G sensible a la toxina del cólera (CTX) y acelerar la formación de IP3 para estimular la liberación de calcio intracelular de sus depósitos intracelulares en el retículo endoplasmático, a través del receptor IP3 sensible a taspigargina (fase de rápido incremento), y por otra parte, a través de un canal iónico sobre la membrana plasmática que promueve la entrada de calcio (segunda fase de incremento prolongado). De igual manera, Uezono y col., (1998) encontraron que la AM fue capaz de incrementar la concentración intracelular de calcio y la producción de IP3 en la línea celular humana de oligodendroglial, KG-1C. Aún más, Ji y col., (2005), demostraron en cultivo de neuronas de hipocampo, que la AM fue capaz de disminuir la concentración de calcio intracelular inducidas por alta concentración de potasio o por IP3 a través de los receptores de AM; lo que sugiere que la AM puede suprimir la liberación de calcio de los depósitos intracelulares, sensibles a IP3, y además la AM puede bloquear la entrada externa de calcio a la célula mediada por canales de calcio dependientes de voltaje. Aún cuando la evidencia sugiere la relación de la AM con la estimulación de la vía del IP3, bajo nuestras condiciones experimentales en el vermis cerebeloso, la AM no fue capaz de alterar el metabolismo de los fosfoinosítidos, lo que sugiere que la AM no afecta la actividad de la PLC en el vermis de cerebelo de la rata. En apoyo a nuestros resultados, Iwasaki y col., (1998) encontraron que la AM no provocó cambios en la producción de IP3 y de calcio intracelular en células de músculo liso vascular.

Diversos estudios han indicado que la AM es capaz de activar la vía de la SON/GMPc y mediar diversos efectos de la AM (Shimekake y col., 1995; Hayakawa y col., 1999). En efecto, Kato y col., (2003) demostraron que la AM fue capaz de incrementar los niveles de GMPc en células cardíacas de ratas. Asimismo, Shimekake y col., (1995) encontraron en células endoteliales de



aorta de bovino, que la AM incrementó la generación de GMPc mediada por NO, pues la acumulación de GMPc inducida por AM fue inhibida con el pretratamiento con N-nitro-L-metil arginina, un inhibidor de la SON, sugiriendo que este incremento puede mediar la acción hipotensora de la AM. De hecho, los investigadores sugieren que la AM puede actuar sobre las células endoteliales y causar un incremento en las concentraciones intracelulares de calcio que conlleva la activación de la SON y la producción de NO.

Los efectos de la AM sobre la producción de NO en el cerebro no son claros; sin embargo se ha demostrado un efecto estimulador directo de la AM sobre la producción de NO en células de neuroblastoma humano SK-N-SH *in vitro* (Xu y col., 2005). Igualmente, se sabe que la administración *icv* de AM incrementa la expresión de *c-fos* en el hipotálamo y tallo cerebral y activa neuronas que producen NO en los PVN, NSO y NTS, siendo dicho efecto mediado por los receptores de CGRP (Ji y col., 2004). Por su parte, Serino y col., (1999), demostraron que la administración *icv* de AM causó una marcada inducción de inmunoreactividad *c-fos* en el PVN y en la porción dorsal de NSO, siendo este efecto dependiente de los receptores específicos de AM, lo cual sugiere que la AM central es responsable de la activación de células neurosecretoras en los PVN y NSO del hipotálamo, a través de receptores específicos de la AM. Aún más, se ha demostrado que la AM activa neuronas que producen NO en el PVN y estimula la producción de NO en el hipotálamo (Shan y col., 2001). Adicionalmente, se ha descrito que los efectos hipotensores inducidos por la microinyección de AM en el PVN son atenuados por la inhibición de la síntesis del NO (Xu y col., 2004<sup>B</sup>), mientras que los efectos hipertensores de la AM en el RVLM también fueron asociados a la cascada NO-GMPc (Xu y col., 2004<sup>A</sup>). Aún más, Mathison y col., (2006), demostraron que la AM incrementó la actividad de la SON y la producción de GMPc en la eminencia media de la rata y Shan y col., (2001), encontraron que la administración *icv* de AM en ratas, incrementó la concentración de nitratos y nitritos en el hipotálamo, así como la

expresión inmunohistoquímica de la NAD(P)H diaforasa en las neuronas productoras de NO en el PVN.

Por lo tanto, la evidencia indica que el NO está involucrado en numerosas funciones fisiológicas en el SNC desempeñando un importante papel en la regulación de funciones autonómicas (Krukoff, 1999; Wehlage y col., 2011). Una de las funciones principales es activar la vía GC-GMPc-PKG; de hecho, Endo y col., (2003) encontraron que la vía NO-GMPc-PKG juega un papel importante en la activación de las ERK1/2 en las células de Purkinje del cerebelo de ratas.

La NO/GMPc podría actuar como un neurotransmisor en el cerebelo (Moncada y col., 1993). En este sentido, se ha encontrado alta expresión del sistema de señalización relacionado con el NO en el cerebelo, pues existe altos niveles de la enzima GC (Nakane y col., 1983) y del GMPc (Ferrendelli, 1974) en las células de Purkinje. Por otra parte, estudios de inmunohistoquímica revelan alta expresión de la proteína quinasa dependiente de GMPc en las células de Purkinje del cerebelo (Lohmann y col., 1981). Adicionalmente la SON y GC soluble activada por NO muestran colocalización en diversas regiones del cerebelo (Rodrigo y col., 1994; de Vente y col., 1998). En contraste con el AMPc, el cual se encuentra homogéneamente distribuido en diferentes áreas del cerebro, el GMPc se encuentra 10 a 50 veces más concentrado en el cerebelo que en otras áreas del cerebro. Se cree que el GMPc ejerce sus efectos a través de proteínas quinasas dependientes de GMPc (cGK), cuya actividad y expresión ha sido detectada en el cerebro, especialmente en el cerebelo, concentradas principalmente en las células de Purkinje (Lohmann y col., 1981).

Ahora bien, la coincidencia anatómica entre la SON y elementos celulares que presentan receptores para la AM en el cerebelo, sugiere un posible papel de la misma en la regulación de la función celular mediante la posible generación de NO/GMPc (Pastorello y col., 2007). Sin embargo, el efecto de la AM sobre la vía NO/GMPc en el cerebelo en la hipertensión y su posible papel en la regulación de la presión arterial no han sido descritos hasta el presente. Nuestros resultados parecen apuntar a un papel importante, ya que la AM fue capaz de incrementar la producción de NO y GMPc en el cerebelo de ratas normotensas pero dicha acción fue abolida completamente en las ratas hipertensas, sugiriendo una desregulación de esta vía de señalización en la hipertensión. Alternativamente, la falta de respuesta de la AM en el vermis de cerebelo de ratas hipertensas, puede ser debido al cambio en el patrón de expresión de los componentes de receptores de las AM durante la hipertensión como los reportados en el presente estudio.

El efecto de la AM sobre la producción de NO y GMPc cerebeloso en las ratas normotensas fue mediado por el receptor AM1, pues fue bloqueado con AM22-52. Similares hallazgos fueron reportados previamente por Pastorello y col., (2007), quienes encontraron que la AM estimula la actividad de la SON cerebelosa, a través de la estimulación de su receptor específico. Por lo que se podría especular que la menor activación en la producción de NO y GMPc por parte de la AM en el vermis de cerebelo de rata hipertensa, sea principalmente mediada por la AM a través del receptor AM1 (CRLR+RAMP2), cuya expresión es menor durante la hipertensión.

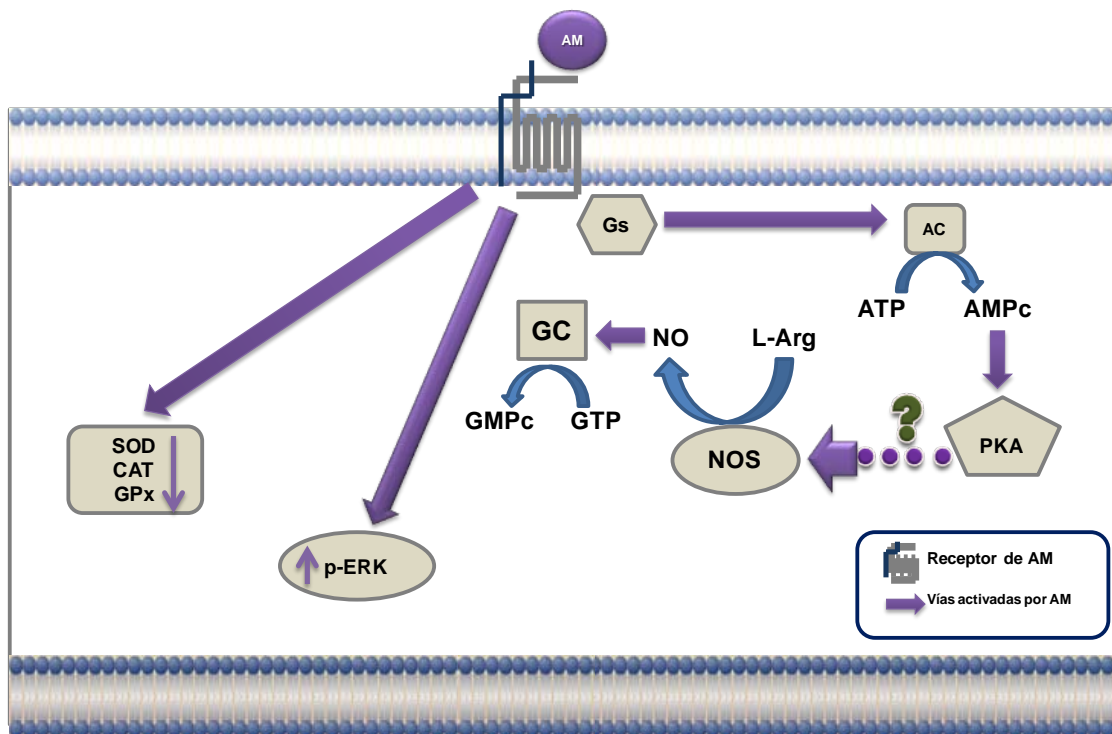
El mecanismo íntimo mediante el cual el NO y su desregulación en el cerebelo participa en la regulación de la presión arterial aún no ha sido establecido, ni nuestros resultados permiten inferirlo. Sin embargo, en otras áreas del SNC parece estar relacionado con la regulación del eflujo simpático. En efecto, la

inhibición no específica de la SON, a través de la administración sistémica de análogos de la L-arginina, provoca una respuesta vasoconstrictora e incremento en la presión arterial tanto en humanos como en animales (Cunha y col., 1993; Castellano y col., 1995; Chowdhary y col., 1999), debido a la remoción de la vasodilatación tónica que resulta de la producción de NO endotelial aunado a la activación del sistema nervioso simpático. Efectivamente, el NO neuronal ejerce un efecto inhibitorio tónico sobre la actividad nerviosa simpática, pues el bloqueo ganglionar farmacológico agudo o el bloqueo beta adrenérgico causó una mayor caída de la presión arterial durante la inhibición de la SON con L-NAME que en los animales controles (Cunha y col., 1993). Asimismo, la respuesta hipertensiva a la ingestión crónica de L-NAME fue mayormente atenuada en ratas previamente simpatectomizadas, mientras que la respuesta vascular al estímulo mediado por NO permaneció intacto (Sander y col., 1995; Zanzinge, 1999).

Estudios empleando la microinyección de agentes que afecten la vía del NO en diversos sitios del SNC han permitido localizar posibles regiones de modulación nitrérgica de la actividad simpática. En este sentido, la administración de L-NMMA en el NTS o en RVLM provocó un incremento en la presión arterial; por su parte, la estimulación de la actividad endógena de la SON por la inyección directa de L-arginina en el NTS o en RVLM causó una disminución de la presión arterial y de la actividad simpática (Tseng y col., 1996); sin embargo, la administración de donantes de NO en la porción caudal de la médula ventrolateral causó un incremento en la actividad renal simpática, sugiriendo que el NO atenúa la actividad en este sitio inhibitorio (Shapoval y col., 1991); por lo tanto, la administración central de moduladores de la vía del NO, tanto dentro de los ventrículos o en sitios específicos de procesamiento autonómico, soportan el concepto de la inhibición tónica del eflujo simpático central por parte del NO (Chowdhary y col., 1999). En relación al PVN, la perfusión del PVN con NO ha demostrado incrementar la concentración de algunos aminoácidos en el

perfusato, incluyendo el GABA (Horn y col., 1994). La evidencia indica que el sistema GABAérgico endógeno dentro del PVN ejerce un efecto inhibitorio tónico sobre el sistema nervioso simpático (Martin y col., 1991), por lo que se ha propuesto que el efecto del NO dentro del PVN puede ser mediado por la liberación de GABA (Horn y col., 1994; Zhang y col., 1998<sup>B</sup>).

En resumen, en el presente estudio se demuestra que la AM es capaz de disminuir la actividad de las enzimas antioxidantes, activar las ERK1/2, incrementar la producción de NO y GMPc en el vermis de cerebelo de la rata normotensa y que todos estos efectos de la AM se encuentran alterados en la hipertensión, lo que apoya un papel de la AM cerebelosa en la regulación de la presión arterial y su desregulación durante la hipertensión (Fig. 112).



**Fig. 112.** Vías de señalización activadas por la AM en el vermis de cerebelo de la rata. La AM es capaz de inhibir la actividad de las enzimas, SOD, CAT y GPx. Asimismo, la AM es capaz de activar la vía de las ERK y la producción de AMPc, NO y GMPc.

La AM es un péptido que cumple funciones muy importantes en la regulación de la función CDV. A nivel periférico, la administración de AM disminuye la presión arterial debido a una disminución en la resistencia vascular periférica (Haynes y col., 1995; Hanna y col., 1996; Beltowski y col., 2004). Se ha demostrado que la AM ejerce su acción vasodilatadora a través de mecanismos dependientes e independientes del endotelio. En este sentido, la mayoría de los estudios han indicado que la AM induce vasodilatación independiente del endotelio mediante la activación de los receptores de CGRP con la consecuente activación del AMPc en las células de músculo liso vascular. Asimismo, la AM puede activar canales de potasio en células de músculo liso causando hiperpolarización (Sakai y col., 1998). Adicionalmente, la AM a través de sus receptores específicos en las células endoteliales induce la vasodilatación dependiente del endotelio (Hayakawa y col., 1999), pues la AM activa la SON endotelial (SONe) mediante al menos dos mecanismos. En primer lugar, la AM incrementa los niveles de calcio intracelular, lo cual estimula la actividad de la SONE (Shimekake y col., 1995), y en segundo lugar, la AM activa la PIK3 /Akt, la cual fosforila la SONE e incrementa la actividad de la enzima, aún a bajas concentraciones de calcio (Nishimatsu y col., 2001). De hecho, Hayakawa y col., (1999) encontraron que la AM relajó la aorta de ratas, pre-contráidas con fenilefrina de manera dependiente de la dosis, observando que la denudación del endotelio atenuó la respuesta vasodilatadora, lo cual sugiere que la vía NO-GMPc está involucrada en el mecanismo de la vasorelajación inducida por AM en aorta. Por otro lado, la AM es capaz de inhibir la producción de vasoconstrictores como la endotelina-1 (Beltowski y col., 2004).

Ahora bien, los efectos de la AM a nivel central no se pueden predecir por los efectos inducidos por este péptido a nivel periférico (Hanna y col., 1996). A nivel central diversos estudios han demostrado la existencia de sitios de unión específicos para la AM, y la expresión del ARNm para los componentes de los receptores de AM. Aunado a ello, se ha determinado la AM en el plasma y en el

LCR (Eguchi y col., 1994; Ichiki y col., 1994). Aún más diferentes estudios han demostrado que la AM cumple funciones a nivel central, pues la administración *icv* de este péptido provoca inhibición de la ingesta de agua (Murphy y col., 1995) y del apetito por la sal (Samson y col., 1997), inhibición de la secreción de arginina-vasopresina inducida por estímulos hipovolémico y osmótico (Yokoi y col., 1996), provoca la excitación de neuronas que secretan oxitocina en el hipotálamo de la rata (Serino y col., 1999), natriuresis (Israel y col., 2000) y regulación de la presión arterial (Saita y col., 1998; Samson y col., 1998; Smith y col., 2001; Xu y col., 2004<sup>B</sup>). Esta evidencia sugiere que la AM central puede actuar en las neuronas como un neurotransmisor y/o neuromodulador, que participa en la red neuronal para provocar diversas respuestas fisiológicas como CDV, de comportamiento y neuroendocrina (Taylor y col., 2001; Ueta y col., 2001), sugiriendo la existencia de un sistema adrenomedulinérgico central. Por lo tanto, la presencia de AM en el cerebro en regiones involucradas en el control de la función CDV, sugieren que este péptido cumple una función importante en la regulación de la presión arterial.

Así, la administración de AM a nivel del AP (Allen y col., 1997; Yang y col., 2003) o *icv* (Samson y col., 1998; Samson, 1999; Israel y col., 2000) causó un incremento en la presión arterial de manera dependiente de la dosis, un efecto mediado a través del receptor CGRP (Takahashi y col., 1994; Saita y col., 1998). Contrariamente, Samson (1999) reportó que la administración de AM en el ventrículo lateral y en el cuarto ventrículo eleva la presión arterial en ratas conscientes, y este efecto no fue bloqueado por el antagonista del receptor CGRP, lo que sugiere que la acción hipertensora central es mediada a través de los receptores específicos de la AM.

Por su parte, Xu y col., (2004<sup>A</sup>) demostraron que la administración de AM en el RVLM incrementó la presión arterial y la frecuencia cardíaca de manera

dependiente de la dosis a través de un mecanismo mediado por los receptores específicos de AM, interviniendo el glutamato a través de la vía que involucra los receptores de NMDA y no NMDA; adicionalmente el NO derivado de la SONn contribuye con el efecto vasopresor inducido por la AM a través de una vía de señalización asociada con la GC soluble. Esto indica que la AM en el RVLM causa un efecto hipertensor debido a la potenciación de la neurotransmisión glutamatérgica y nitrérgica, pues tanto la inhibición glutamatérgica y nitrérgica bloqueó los efectos inducidos por la AM en el RVLM (Xu y col., 2004<sup>A</sup>).

Por su parte, la administración de AM en el PVN ha demostrado provocar una disminución de la presión arterial (Smith y col., 2001) que es mediada por el NO y GABA, pues el bloqueo de los receptores GABA<sub>A</sub> y la inhibición de la producción de NO atenuó la disminución de la presión arterial inducida por la AM, sugiriendo que la AM en el PVN activa células productoras de NO, las cuales producen y liberan NO, incrementando la neurotransmisión GABAérgica dentro del PVN y disminuyendo la presión arterial (Xu y col., 2004<sup>A</sup>). Aún más, se ha demostrado que la administración *icv* de AM estimula la producción de NO en el hipotálamo y activa neuronas que producen NO en el PVN (Shan y col., 2001). Asimismo, la microinyección de nitroprusiato de sodio, un donador de NO en el PVN disminuye la presión arterial y frecuencia cardíaca (Zhang y col., 1997), lo cual sugiere que el NO en este núcleo es uno de los candidatos que media el efecto hipotensor de la AM. Aún más, el GABA ejerce un efecto inhibitorio tónico sobre el sistema nervioso simpático a nivel del PVN (Martin y col., 1991; Chen y col., 2003), de hecho, el antagonista selectivo del receptor GABA<sub>A</sub>, la bicuculina, bloqueó la hiperpolarización de las neuronas magnocelulares en el PVN inducida por la AM, lo cual sugiere que el GABA puede contribuir al efecto hipotensor de la AM dentro del PVN (Follwell y col., 2002).



Hasta la fecha no existen reportes sobre el posible efecto que ejerce la administración de la AM a nivel del cerebelo sobre la presión arterial, sin embargo la evidencia anatómica y los resultados *in vitro* del presente estudio apunta a un papel funcional de la misma en la regulación de la presión arterial.

En relación a las evidencias anatómicas de un posible papel del cerebelo en la función de la regulación CDV, se ha demostrado que la estimulación eléctrica de diversas zonas cerebelosas conlleva cambios en la presión arterial y frecuencia cardíaca (Nisimaru, 2004; Rector y col., 2006; Tandon y col., 2006). Aún más, evidencias anatómicas indica la existencia de cinco módulos en el cerebelo dedicados al control CDV. En efecto, en el cerebelo se han identificado diversos módulos CDV, como el NF, vermis anterior, vermis posterior, úvula (lóbulo IX), nódulo (lóbulo X); pues la estimulación de estas estructuras conlleva cambios en la presión arterial, frecuencia respiratoria y resistencia vascular (Nisimaru, 2004). Así, de los cinco módulos se sabe que el primero está formado por la porción rostral del NF y la porción medial del vermis anterior (lóbulo I, II y III) que en conjunto forman un módulo que controla el baroreflejo. El segundo está formado por el vermis anterior que forma un microcomplejo con el núcleo parabraquial. El tercero está formado por la porción caudal del NF y la porción medial del vermis posterior (lóbulo VII y VIII) que forma un módulo que controla los reflejos vestibulo-simpáticos. El cuarto módulo, está formado por la porción medial de la úvula la cual forma un módulo con el NTS y el núcleo parabraquial. En el quinto módulo, el nódulo y la úvula junto con el núcleo parabraquial y vestibular forman un microcomplejo CDV que controla la actividad nerviosa simpática y la presión arterial ante los cambios de postura (Nisimaru, 2004).

Adicionalmente, se ha demostrado que la corteza cerebelar puede influir en el sistema CDV, pues lesiones en diferentes regiones del cerebelo han

demostrado modificar la presión arterial. En este sentido, la estimulación eléctrica del vermis anterior en gatos ha demostrado provocar una respuesta depresora (Rasheed y col., 1970); en contraste, la estimulación del vermis anterior en conejos evoca una respuesta presora (Ramu y col., 1967). Por su parte, Nisimaru y col., (1984) demostró una caída en la presión arterial e inhibición de la actividad simpática renal tras la estimulación de los lóbulos I, II y III de la corteza del vermis anterior del cerebelo en conejos anestesiados.

Aún más la evidencia muestra que el vermis posterior participa en el control CDV, pues la estimulación de esta área del vermis en gatos anestesiados provoca una respuesta depresora (Bradley y col., 1987<sup>B</sup>); asimismo, Nisimaru y col., (1984) describieron una caída en la presión arterial e inhibición de la actividad simpática renal durante la estimulación de los lóbulos VII y VIII del vermis posterior en conejos, asimismo, resultados similares se han obtenido tras la estimulación del lóbulo X del vermis cerebelar (Nisimaru y col., 1985). Aún más Bradley y col., (1987<sup>A</sup>) demostraron que la estimulación eléctrica del lóbulo IX (úvula) en conejos ocasionó bradicardia, disminución en la presión arterial e inhibición de la actividad simpática. Asimismo, Rocha y col., (2008) encontraron que la estimulación del vermis posterior provocó una respuesta CDV caracterizada por hipotensión y bradicardia.

Está bien establecido que el vermis posterior proyecta a la porción caudal del NF, y el vermis anterior proyecta hacia la porción rostral del NF (Bradley y col., 1987<sup>A</sup>). En este sentido, la evidencia ha demostrado que la estimulación eléctrica de la porción rostral del NF en gatos y conejos (Bradley y col., 1987<sup>B</sup>) provocó una respuesta presora; sin embargo esta respuesta presora es abolida ante el bloqueo alfa adrenérgico o la simpatectomía, lo cual indica que esta acción está mediada por la actividad del sistema nervioso simpático (Nisimaru, 2004). Por lo tanto, estos hallazgos constituyen evidencias claras del papel del

cerebelo, específicamente el vermis cerebelar en la regulación de la presión arterial.

Ahora bien, si existe el sustrato anatómico y vías de señalización que responden a la AM en el cerebelo, es lógico pensar que la AM administrada al cerebelo debería ejercer alguna función en la regulación CDV. Al respecto, en el presente estudio se demostró por primera vez que la microinyección de AM en el vermis del cerebelo de ratas hipertensas provocó una poderosa respuesta hipotensora, la cual fue específica y dependiente de la dosis. Por el contrario, la AM no fue capaz de reducir la presión arterial en las ratas normotensas tras la microinyección en el vermis cerebeloso. La especificidad de la acción hipotensora de la AM administrada en el vermis cerebeloso se apoya aún más por el hecho de que la administración del péptido fuera del vermis no ocasionó el efecto hipotensor en las ratas SHR y la administración *in vivo* de un péptido presor como la ANG II en el vermis de cerebelo tampoco ocasionó cambios en la presión arterial. Estos resultados constituyen la primera evidencia funcional *in vivo* del papel de la AM en el vermis cerebeloso en el control de la presión arterial.

La causa de la diferencia en la acción de la AM entre las ratas normotensas e hipertensas puede ser variable y ha sido descrito para otras estructuras cerebrales. Así, He y col., (1995) encontraron que la infusión de AM disminuyó la presión arterial tanto en ratas normotensas como en las hipertensas de manera dependiente de la dosis; sin embargo la caída en la presión arterial fue mayor en las ratas hipertensas con respecto a las normotensas. De igual manera, Chan y col., (1991) demostraron que las neuronas del RVLM de las ratas SHR son más sensibles y tienen mayor respuesta a la ANGII con respecto a las WKY. Asimismo, Seyedabadi y col., (2001), reportaron que la administración en el RVLM de wortmanina, inhibidor de la PIK3 produjo una

caída de la presión arterial en las ratas SHR, pero no en las WKY; lo cual sugiere que la PIK3 no es activa en el RVLM en ratas WKY. Por lo tanto, el efecto hipotensor inducido por la administración intracerebelar de la AM en las ratas SHR podría ser debido a un incremento en la sensibilidad y respuesta del cerebelo de las ratas SHR a la AM con respecto a las ratas WKY. Alternativamente, esta respuesta diferencial podría ser la manifestación de la desregulación de las vías de señalización y de la expresión de AM y los receptores de AM1, cuya expresión está reducida en la hipertensión (resultados presentes).

El mecanismo hipotensor de la AM en el vermis cerebeloso en ratas hipertensas no se ha podido establecer hasta el presente, pero podría estar asociado a la regulación de la actividad o eflujo simpático y parece requerir de un sistema estimulado. Si ello es así, la administración de AM en el vermis cerebeloso debería contrarrestar la respuesta presora producida por el estrés agudo inducido por el EEP en ratas, cuyo respuesta efectora neuroendocrino es el sistema simpático – adrenal y que se manifiesta con un incremento en la frecuencia cardíaca, presión arterial y respiración, alteraciones del flujo sanguíneo a los tejidos, aumento de la glicemia, disminución de la motilidad intestinal (McCarty y col., 1996). Nuestros resultados apuntan a esa posibilidad. En efecto, el estrés agudo producido por el EEP incrementó la presión arterial en las ratas Sprague Dawley, SHR y WKY (McCarty y col., 1996; Verago y col., 2001; Penna y col., 2010), posiblemente debido a un incremento en la liberación de catecolaminas a la circulación (Kvetnansky y col., 1978; Lee y col., 1989; Sabban, 2007). Lo más interesante de nuestros resultados consiste en el hecho de que la microinyección de la AM en el vermis cerebeloso fue capaz de disminuir la respuesta presora frente al EEP, tanto en las ratas normotensas como hipertensas, lo cual sugiere que la AM intracerebelar puede actuar inhibiendo el eflujo simpático. Nuevamente este efecto fue específico ya que la administración de ANG II en el vermis cerebeloso no modificó la respuesta

presora al estrés agudo inducido por EEP, aún cuando se sabe que existen receptores para la ANG II en el cerebelo. En este sentido, existen estudios que demuestran que la aplicación microiontoforética de ANG II en el cerebelo causa depresión de la tasa de disparo de las células de Purkinje (Ito, 2009).

Contrario a nuestros hallazgos la literatura más bien indica que la AM en otras regiones del cerebro aumenta la actividad simpática y el eflujo simpático renal, Efectivamente, se ha demostrado que la administración de AM en el RVLM aumenta la presión arterial, lo que sugiere que la AM estimula neuronas del RVLM, las cuales controlan la actividad simpática cardíaca (Xu y col., 2004<sup>B</sup>; Ji y col., 2002). Asimismo, la administración de AM *icv* provocó una elevación en la presión arterial, lo cual parece ser mediado por el incremento de la actividad simpática (Takahashi y col., 1994; Saita y col., 1998; Shan y col., 2001) ya que fue bloqueado por la administración periférica de un bloqueante alfa adrenérgico como la fentolamina (Samson y col., 1998); sugiriendo que la AM está involucrada como un neuropéptido en la regulación central de la función CDV y simpática renal. Asimismo, Taylor y col., (2004) encontraron que la administración *icv* de AM fue capaz de incrementar los niveles plasmáticos de corticoesterona, sugiriendo que la AM actúa dentro del hipotálamo estimulando la liberación de la CRH, y por lo tanto incrementando la actividad del eje hipotálamo – hipófisis – adrenal. Aún más, la administración *icv* de AM estimula el eflujo simpático y la descarga simpática renal y abdominal (Takahashi y col., 1994; Saita y col., 1998; Samson y col., 1998; Shan y col., 2001) e incrementa la sensibilidad del baroreflejo (Matsumura y col., 1999). Adicionalmente, la administración *icv* de AM activa neuronas en el PVN, el cual está asociado con regulación CDV y simpática central (Shan y col., 2001). Asimismo, se ha demostrado que la microinyección de AM *icv* estimula la expresión del gen tirosina hidroxilasa, la enzima biosintética de la noradrenalina, a nivel del locus coeruleus (Shan y col., 2001). Como las neuronas noradrenérgicas del locus coeruleus participan en importantes procesos

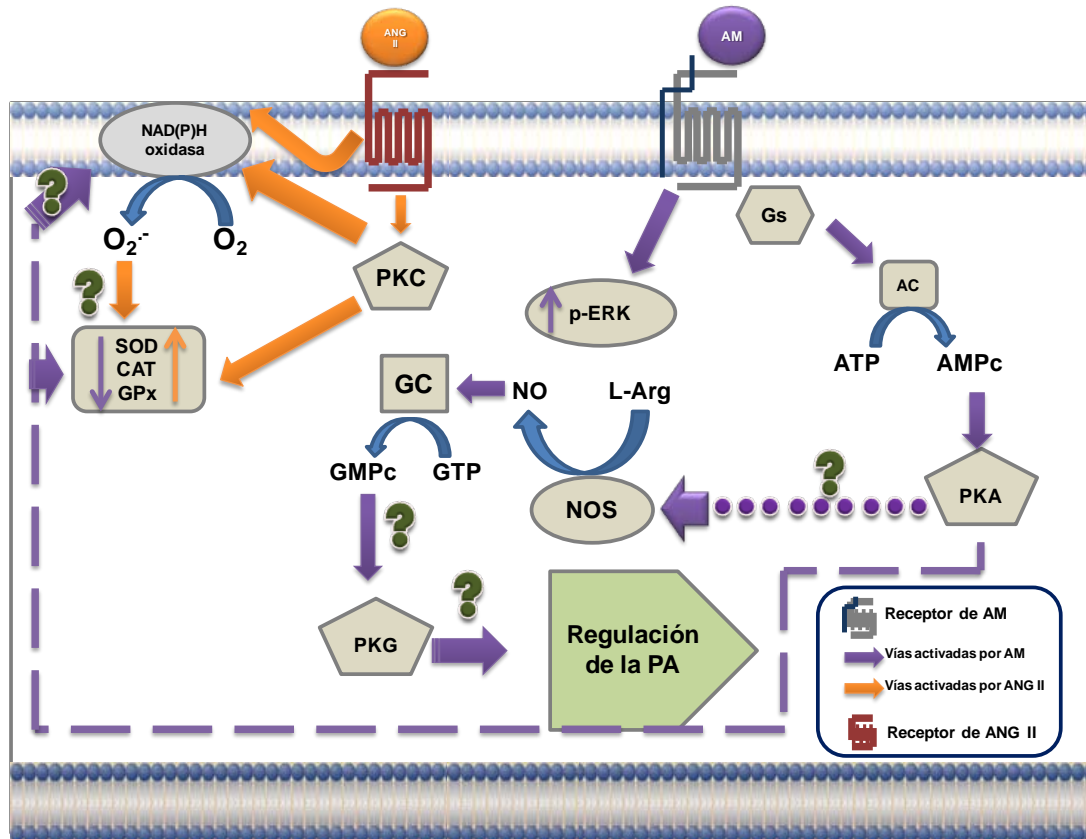
regulando la función CDV, es posible que la AM puede mediar algunos de sus efectos a través de sus acciones en el sistema catecolaminérgico del locus coeruleus (Aston y col., 1991; Shan y col., 2003).

Ahora bien, el efecto hipotensor e inhibidor de la respuesta simpatoadrenal observado en el presente trabajo es difícil de explicar con la evidencia, pero podríamos especular que el cerebelo a través de sus conexiones neuroanatómicas desde el NF y mediado a través de la vía de señalización del NO/GMPc podría constituir un sistema potente contraregulator de los efectos excitatorios de los núcleos cerebrales que participan en la regulación de la presión arterial. Se sabe que el NF cumple un importante papel en la regulación del sistema nervioso autónomo, pues este núcleo proyecta a estructuras del tallo cerebral como el RVLM, el cual a su vez recibe inervación de los núcleos PVN y NSO hipotalámico (Nisimaru, 2004). Aunado a ello, las neuronas que producen NO se encuentran en centros autonómicos que incluyen el PVN, NSO, NTS, VLM y la columna intermediolateral de la médula espinal (Krukoff, 1999). En el PVN, el NO inhibe la actividad simpática a través de la estimulación de interneuronas GABAérgicas (Bains y col., 1997; Zhang y col., 1998<sup>B</sup>). Por su parte, en el NTS y VLM, el NO tiene efectos tanto simpato-excitatorios como simpato-inhibitorios, sugiriendo que en el tallo cerebral, el NO regula el eflujo simpático, a través de un balance de las salidas de estos centros autonómicos (Krukoff, 1999). Aún más, la AM *icv* estimula la producción de NO en el hipotálamo y activa neuronas productoras de NO en el PVN (Shan y col., 2001). La estimulación del eflujo simpático mediante la administración *icv* de AM junto con la inhibición del eflujo simpático por el NO en el PVN, sugiere que la estimulación inducida por la AM del sistema nitrérgico en el hipotálamo, puede ser parte de un mecanismo de retroalimentación, que actúa para restablecer el equilibrio homeostático (Shan y col., 2003). En apoyo a ello, se ha reportado que la administración de *icv* de AM a bajas dosis causa inhibición de la actividad simpática renal (Mitsuhiko y col., 1998). Adicionalmente, Fujita y

col., (2005) encontraron que la AM endógena en el cerebro puede inhibir la activación simpática a través de su acción antioxidante. Por su parte, Xu y col., (2006) indicaron que la AM en el RVLM ejerce un efecto inhibitorio sobre la actividad del baroreflejo a través de un mecanismo mediado por los receptores específicos de AM, donde la activación de la PKA está involucrada.

Basados en la evidencia del papel de la administración intracerebelar de AM como un poderoso hipotensor y atenuador del eflujo simpático, es razonable asumir que la disminución en la expresión de AM en el cerebelo durante la hipertensión, pueda constituir la alteración primaria que conlleva a un fallo en el control cerebelar de la presión arterial, y que su reversión tras el tratamiento con valsartán podría constituir un mecanismo compensatorio para reajustar la respuesta de la AM a este nivel.

Por otro lado, basados en el hecho de que la AM ejerce la mayoría de sus acciones a través de un mecanismo acoplado a la AMPc-PKA, y que éste se encuentre asociado como un mediador de la hipotensión inducida por la AM a nivel periférico y central, es posible que el efecto hipotensor de la AM en el vermis del cerebelo sea mediado a través de esta vía (Fig. 113); sin embargo, se requiere de otros estudios para confirmar esta hipótesis.



**Fig. 113.** Propuesta del mecanismo de la vía de acción de la AM en el vermis de cerebelo de la rata. La ANG II es capaz de incrementar la actividad de la SOD, CAT y GPx a través de una vía dependiente de PKC y NAD(P)H oxidasa. Por su parte, la AM es capaz de inhibir la actividad de dichas enzimas mediante un mecanismo dependiente de la PKA, evidenciando un efecto antagónico de la ANGII sobre la AM. Asimismo, la AM es capaz de activar a las ERK y activa la producción de NO, AMPc y GMPc, lo cual posiblemente puede regular la presión arterial.



## **6. CONCLUSIONES**

- 6.1.** La AM y los componentes de sus receptores se expresan a nivel del vermis del cerebelo de la rata.
- 6.2.** Durante la hipertensión existe una alteración en la expresión de la AM y los componentes de sus receptores en el cerebelo: aumento en la expresión de CRLR/ RAMP1 y RAMP3 y reducción de la expresión de AM y de CRLR/ RAMP2. Estas alteraciones pueden constituir un efecto compensatorio a la hipertensión arterial, o alternativamente la alteración inicial que traería como consecuencia la desregulación de los mecanismos de control de la presión arterial con la consecuente hipertensión.
- 6.3.** La desregulación del sistema adrenomedulérgico cerebeloso se encuentra presente desde las etapas tempranas (8 semanas) de vida de las ratas hipertensas.
- 6.4.** Los cambios en la reducción de la expresión de la AM, y los componentes de sus receptores parecen ser producto del incremento de la presión arterial, pues fue revertido por el tratamiento con valsartán, sugiriendo que la hipertensión induce cambios adaptativos para tratar de compensar la elevación de la presión arterial.
- 6.5.** La AM redujo la actividad de las enzimas antioxidantes y disminuyó la producción de EROs en el vermis de cerebelo de ratas normotensas.
- 6.6.** La AM produjo un efecto contrarregulador sobre el incremento de la actividad de las enzimas antioxidantes inducido por la ANG II en el vermis de cerebelo de la rata, lo que sugiere que la AM juega un papel importante en contrarrestar el incremento en la producción de EROs inducido por la ANG II.

- 6.7.** La administración *in vivo* de un antagonista de los receptores de ANG II o de un bloqueante de los canales de calcio, redujo la presión arterial y revirtió la ausencia de respuesta a la AM sobre la actividad de las enzimas antioxidantes basal en el vermis cerebelar de ratas hipertensas, sugiriendo que la disminución de la presión arterial restauró el patrón de expresión de la AM y sus componentes de receptores a los encontrados en condiciones controles, lo cual sugiere que la expresión óptima del receptor de AM1 es necesaria para la adecuada señalización de la AM.
- 6.8.** Se demostró que la disminución de la actividad de las enzimas antioxidantes inducido por AM es mediado por la PKA, mientras que el incremento en la actividad de las enzimas antioxidantes inducido por la ANG II es mediado a través de la vía PKC/NAD(P)H oxidasa, en el vermis de cerebelo de la rata.
- 6.9.** El pretratamiento con la AM22-52 y CGR8-37, revirtió el efecto reductor inducido por la AM sobre la actividad de las enzimas antioxidantes y producción de TBARS, lo que apoya la mediación de todos los subtipos de receptores, CGRP, AM1 y AM2, en la señalización de la AM mediada por EROs en el cerebelo.
- 6.10.** Se demostró que los receptores de AM son funcionales, pues activan a las MAPK y aumenta la producción de GMPc y NO. El pretratamiento con la AM22-52, bloqueó el efecto de la AM sobre la producción de GMPc y NO y la activación de las MAPK, lo que apoya la mediación de los receptores AM1.
- 6.11.** La hipertensión inhibió la capacidad de la AM de estimular la actividad de las enzimas antioxidantes, la producción de EROs, NO y GMPc en el vermis cerebelar.
- 6.12.** Se sugiere que la falta de respuesta a la AM sobre la producción de NO y GMPc en el vermis de cerebelo de ratas hipertensas, se debe al

cambio en el patrón de expresión de los componentes de receptores de las AM durante la hipertensión, por lo que se podría especular que la activación en la producción de NO y GMPc por parte de la AM en el vermis de cerebelo de rata, sea principalmente mediada por la AM a través del receptor AM1 (CRLR+RAMP2), cuya expresión es menor durante la hipertensión.

- 6.13.** La administración *in situ in vivo* de AM en el cerebelo ocasionó un efecto hipotensor en ratas hipertensas y sometidas a estrés agudo que fue específico del vermis cerebelar y dependiente de la dosis.
- 6.14.** La administración *in situ in vivo* de AM en el cerebelo ocasionó un efecto hipotensor únicamente en ratas hipertensas, lo que sugiere un incremento en la sensibilidad y respuesta del cerebelo de las ratas SHR a la AM con respecto a las ratas WKY, y /o a que la AM ejerza un efecto hipotensor en el vermis de cerebelo únicamente ante un sistema previamente estimulado, pues la administración *in situ in vivo* de AM en el cerebelo de las ratas SHR y/o ratas normotensas sometidas a estrés agudo produjo un efecto hipotensor.
- 6.15.** Se sugiere que el efecto hipotensor inducido por la administración intracerebelar de AM puede estar mediado por la activación de la vía GMPc/NO en las ratas normotensas y durante el estrés agudo, y/o a través de otras vías de señalización como la activación de la AMPc/PKA, debido a la falta de activación de la vía GMPc/NO durante la hipertensión.
- 6.16.** Nuestros hallazgos sugieren que la AM cerebelosa cumple un papel importante en la regulación de la presión arterial y demuestra la existencia de un sistema adrenomedulinérgico funcional a nivel del cerebelo, el cual está involucrado en la regulación de la presión arterial.

## 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abe M, Chao T, Solway J, Rosner M, Hershenson M. Hydrogen peroxide stimulates mitogen-activated protein kinase in bovine tracheal myocytes: implications for human airway disease. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998; 11: 577–585.

Abrahamsen H, Vang T, Tasken K. Protein kinase A intersects Src signaling in membrane microdomains. *J Biol Chem* 2003; 278: 17170–17177.

Adam L, Franklin M, Raff G, Hathaway D. Activation of mitogen-activated protein kinase in porcine carotid arteries. *Circ. Res.* 1995; 76:183–190

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

Aikawa R, Komuro I, Yamazaki T, Zou Y, Kudoh S, Tanaka M, Shiojima I, Hiroi Y, Yazaki Y. Oxidative stress activates extracellular signal-regulated kinases through *Src* and *Ras* in cultured cardiac myocytes of neonatal rats. *J Clin Invest* 1997; 100: 1813– 1821.

Aiyar N, Disa J, Pullen M, Nambi P. Receptor activity modifying proteins interaction with human and porcine calcitonin receptor like receptor (CRLR) in HEK-293 cells. *Mol Cell Biochem* 2001; 224: 123-133.

Aiyar N, Rand K, Elshourbagy N, Zeng Z, Adamou J, Bergsma D, Li Y. A cDNA encoding the calcitonin gene related peptide type 1 receptor. *J Biol Chem* 1996; 271: 11325-11329.

Allen M, Smith P, Ferguson A. Adrenomedullin microinjection into the area postrema increases blood pressure. *Am J Physiol* 1997; 272: R1698 – R1703.

Ando K, Ito Y, Kumada M, Fujita T. Oxidative stress increases adrenomedullin mRNA levels in cultured rat vascular smooth muscle cells. *Hypertens Res.* 1998; 21: 187–191.

Ando K, Shimosawa T, Fujita T. Adrenomedullin in vascular disease. *Curr Hypertens Rep* 2004; 6 (1): 55 – 59.

Arce M, Sánchez S, López F, Seguin L, Seltzer A, Ciuffo G. Purkinje cells express angiotensin II AT2 receptors at different developmental stages. *Neuropeptides* 2011; 45: 69-76.

Arce M, Sánchez S, Seltzer A, Ciuffo G. Autoradiographic localization of angiotensin II receptors in developing rat cerebellum and brainstem. *Regul Pept* 2001; 99: 53 – 60.

Aston G, Shipley M, Chouvet G, Ennis M, Van Bockstaele E, Pieribone V. Afferent regulation of locus coeruleus neurones: anatomy, physiology and pharmacology. *Prog Brain Res* 1991; 88: 47 – 75.

Babior BM. NADPH oxidase: an update. *Blood* 1999; 93: 1464-1476.

Bae I, Fan S, Meng Q. BRCA1 induces antioxidant gene expression and resistance to oxidative stress. *Cancer Res* 2004; 64: 7893 – 7909.

Bains J, Ferguson A. Nitric oxide regulates NMDA- driven GABAergic inputs to tyoe I neurons of the rat paraventricular nucleus. *J Physiol* 1997; 499: 733 – 746.

Ballester M. Antioxidants, free radicals, and health. A chemical, organic and physical approach. *Med Clin* 1996; 107: 509 – 515.

Barbella Y, Cierco M, Israel A. Effects of losartan, a nonpeptide angiotensin II receptor antagonist, on drinking behavior and renal actions of central administered renin. *Proc Soc Exp Biol Med* 1993; 202: 401-406.

Baumel Y, Jacobson G, Cohen D. Implications of functional anatomy on information processing in the deep cerebellar nuclei. *Front Cell Neurosci* 2009; 3: 1 – 8.

Bell D, Zhao Y, Kelso E, McHenry E, Rush L, Lamont V, Nicholls P, McDermott B. Upregulation of adrenomedullin and its receptor components during cardiomyocyte hypertrophy induced by chronic inhibition of nitric oxide synthesis in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 290: H904 – H914.

Belloni A, Andreis P, Meneghelli V, Champion H, Kadowitz P, Coy D, Murphy W, Nussdorfer G. Adrenomedullin and calcitonin gene – related peptide (CGRP)

interact with a common receptor of the CGRP1 subtype in the human adrenal zona glomerulosa. *Endocr Res* 1999; 25: 29 – 34.

Beltowski J, Jamroz A. Adrenomedullin – What do we know 10 years since its discovery? *Pol J Pharmacol* 2004; 56: 5 – 27.

Bernard P, Florence N, Valerie D. Neutral endopeptidase 24.11: structure, inhibition, and experimental and clinical pharmacology. *Pharmacol Rev* 1993; 45: 87 – 146.

Bishopric N, Jayasena V, Webster K. Positive regulation of the skeletal alpha-actin gene by Fos and Jun in Cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.* 1992; 267: 25535–25540.

Bomberger J<sup>A</sup>, Spielman WS, Hall CS, Weinman EJ, Parameswaran N. Receptor activity-modifying protein (RAMP) isoform-specific regulation of adrenomedullin receptor trafficking by NHERF-1. *J Biol Chem* 2005; 280: 23926–23935.

Bomberger J<sup>B</sup>, Parameswaran N, Hall CS, Aiyar N, Spielman WS. Novel function for receptor activity modifying proteins (RAMPs) in post-endocytic receptor trafficking. *J Biol Chem* 2005; 280: 9297–9307.

Boulton TG, Nye SH, Robbins DJ. ERKs: a family of proteinserine/ threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell* 1991; 65: 663–675.

Bradley D<sup>A</sup>, Ghelarducci B, Paton J, Spyer K. The cardiovascular response elicited from the posterior cerebellar cortex in the anaesthetized and decerebrate rabbit. *J Physiol* 1987; 383: 537 – 550.

Bradley D<sup>B</sup>, Paton J, Spyer K. Cardiovascular responses evoked from the fastigial region of the cerebellum in anaesthetized and decerebrate rabbits. *J Physiol* 1987; 392: 475 – 491.

Bradley D, Ghelarducci B, Spyer K. The role of the posterior cerebellar vermis in cardiovascular control. *Neurosci Res* 1991; 12 (1): 45 – 56.

Brain SD, Cambridge H. Calcitonin gene – related peptide: vasoactive effects and potential therapeutic role. *Gen Pharmacol* 1996; 27: 607-611.

Cameron V, Fleming A. Novel sites of adrenomedullin gene expression in mouse and rat tissues. *Endocrinology* 1998, 139: 2253 – 2264.

Cao Y, Kitamura K, Ito K, Kato J, Hashida S, Morishita K, Eto T. Glycine extended adrenomedullin exerts vasodilator effect through amidation in the rat aorta. *Regul Pept* 2003; 113: 109 – 114.

Cao Y, Kuwasako K, Kato J, Yanagita T, Tsuruda T, Kawano J, Nagoshi Y, Chen A, Wada A, Suganuma T, Eto T, Kitamura K. Beyond vasodilation: The antioxidant effect of adrenomedullin in Dahl salt – sensitive rat aorta. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 332: 866 – 872.

Carey R, Siragy H. Newly recognized components of the renin – angiotensin system: potential roles in cardiovascular and renal regulation. *Endocr Rev* 2003; 24: 261 – 271.

Caron K, Hagaman J, Nishikimi T, Kim H, Smithies O. Adrenomedullin gene expression differences in mice do not affect blood pressure but modulate hypertension – induced pathology in males. *PNAS* 2007; 104 (7): 3420 – 3425.

Caron K, James L, Kim H, Knowles J, Uhlir R, Mao L, Hagaman J, Cascio W, Rockman H, Smithies O. Cardiac hypertrophy and sudden death in mice with a genetically clamped renin transgene. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 3106 – 3111.

Carretero O, Oparil S. Essential Hypertension. Part I: Definition and Etiology. *Circulation* 2000; 101: 329 – 335.

Cases A, Mora-Macía J. Adrenomedulina: un Nuevo péptido vasoactivo. *Nefrología* 2001; XXI (1); 16 – 25.

Castellano M, Rizzoni D, Beschi M. Relationship between sympathetic nervous system activity, baroreflex and cardiovascular effects after acute nitric oxide synthesis inhibition in humans. *J. Hypertens.* 1995; 13: 1153-1161.

Chakravarty P, Suthar T, Coppock H, Nicholl C, Bloom S, Legon S, Smith D. CGRP and adrenomedullin binding correlates with transcript levels for calcitonin receptor – like receptor (CRLR) and receptor activity modifying proteins (RAMPs) in rat tissues. *Br J Pharmacol* 2000; 130: 189 – 195.

Chan R, Chan Y, Wong T. Responses of cardiovascular neurons in the rostral ventrolateral medulla of the normotensive Wistar Kyoto and spontaneously hypertensive rats to iontophoretic application of angiotensin II. *Brain Res* 1991; 556: 145 – 150.

Chan S, Hsu K, Huang C, Wang L, Ou C, 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 C, Pearce R, O`Connell S, Rosenfeld M. Identification of a seven transmembrane helix receptor for corticotrophin – releasing factor and sauvagine in mammalian brain. *Neuron* 1993; 11: 1187 – 1195.

Chen QH, Haywood JR, Toney GM. Sympathoexcitation by PVN injected bicuculline requires activation of excitatory amino acid receptors. *Hypertension* 2003; 42: 725– 731.

Chini EN, Chini CC, Bolliger C. Cytoprotective effects of adrenomedullin in glomerular cell injury: central role of cAMP signaling pathway. *Kidney Int* 1997; 52: 917–925.

Chowdhary S, Townend J. Role of nitric oxide in the regulation of cardiovascular autonomic control. *Clinical Science* 1999; 97: 5–17.

Chun TH, Itoh H, Saito T, Yamahara K, Doi K, Mori Y, Ogawa Y, Yamashita J, Tanaka T, Inoue M, Masatsugu K, Sawada N, Fukunaga Y, Nakao K. Oxidative stress augments secretion of endothelium-derived relaxing peptides, C-type natriuretic peptide and adrenomedullin. *J Hypertens.* 2000; 18: 575–580.

Cikcikoglu N, Yurekli M, Yildirim N. Investigation of some antioxidant enzymes activities depending on adrenomedullin treatment and cold stress in rat liver tissue. *Turk J Biochem* 2010; 35 (2): 140 -144.

Cross C, Halliwell B, Borish E, Pryor W, Ames B, Saul R. Oxygen radicals and human disease. *Ann Intern Med* 1987; 107: 526 – 545.

Cueille C, Pidoux E, de Vernejoul M, Ventura-Clapier R, Garel J. Increased myocardial expression of RAMP1 and RAMP3 in rats with chronic heart failure. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 294: 340 – 346.



Cui J, Mukai C, Iwase S, Sawasaki N, Kitazawa H, Mano T, Sugiyama Y, Wada Y. Response to vestibular stimulation of sympathetic outflow to muscle in humans. *J Auton Nerv Syst* 1997; 66: 154 – 162.

Cunha R, Cabral A, Vasquez E. Evidence that the autonomic nervous system plays a major role in the L-NAME-induced hypertension in conscious rats. *Am. J. Hypertens.* 1993; 6: 806- 809.

Dang K, Disa J, Gout B, Aiyar N. Comparative affinities of adrenomedullin (AM) and calcitonin gene related – peptide (CGRP) for (125I) CGRP specific binding sites in porcine tissues. *J Recept Signal Transduct Res* 1999; 19: 803 – 817.

Davis R. The mitogen – activated protein kinase signal transduction pathway. *J Biol Chem* 1993; 268: 14533 – 14556.

de Vente J, Hopkins D, Markerink-van M, Emson P, Schmidt H, Steinbusch H. Distribution of nitric oxide synthase and nitric oxide-receptive, cyclic GMP producing structures in the rat brain. *Neuroscience* 1998; 87 (1): 207 – 241.

Dennis TB, Fournier A, St Pierre S, Quirion R. Structure-activity profile of calcitonin gene related peptide in peripheral and brain tissues. Evidence for receptor multiplicity. *J Pharmacol Exp Ther* 1989; 251: 718-725.

Díaz E, Israel A. Effect of adrenomedullin receptor and calcitonin gene – related peptide receptor antagonists on centrally mediated adrenomedullin renal action. *Brain Res Bull* 2001; 55 (1): 29 – 35.

Díaz E, Israel A. La adrenomedulina: un péptido multifuncional. *Rev Fac Far* 2006; 69: 54 – 63.

Ding L, Chapman A, Boyd R, Wang H. ERK activation contributes to regulation of spontaneous contractile tone via superoxide anion in isolated rat aorta of angiotensin II-induced hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; 292: H2997–H3005.

Dogru M, Kocagun D, Gul M, Esrefoglu M, Yurekli M, Erdogan S, Ates B. the effect of adrenomedullin on rats exposed to lead. *J Appl Toxic* 2007; 28 (2): 140 – 146.

Dohi Y, Ohashi M, Sugiyama M, Takase H, Sato K, Ueda R. Candesartan reduces oxidative stress and inflammation in patients with essential hypertension. *Hypertens Res* 2003; 26: 691 – 697.

Dormer K. Modulation of cardiovascular response to dynamic exercise by fastigial nucleus. *J. Appl. Physiol.* 1984; 56: 1369 – 1377.

Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002; 82: 47–95.

Dupuis J, Caron A, Ruël N. Biodistribution, plasma kinetics and quantification of single – pass pulmonary clearance of adrenomedullin. *Clin Sci* 2005; 109: 97 – 102.

Edvinsson L, Eftekhari S, Salvatore C, Warfvinge K. Cerebellar distribution of calcitonin gene – related peptide (CGRP) and its receptor components calcitonin receptor – like receptor (CLR) and receptor activity modifying protein 1 (RAMP1) in rat. *Molecular and Cellular Neuroscience* 2010; 5: 1-7.

Eguchi S, Hirata Y, Kano H, Sato K, Watanabe Y, Watanabe T, Nakajima K, Sakakibara S, Marumo F. Specific receptors for adrenomedullin in cultured rat vascular smooth muscle cells. *FEBS Letters* 1994; 340: 226 – 230.

Endo S, Launey T. Nitric oxide activates extracellular signal – regulated kinase  $\frac{1}{2}$  and enhances declustering of ionotropic glutamate receptor subunit 2/3 in rat cerebellar Purkinje cells. *Neurosc Lett* 2003; 350: 122 – 126.

Entzeroth M, Doods HN, Wieland HA, Wienen W. Adrenomedullin mediates vasodilatation via CGRP1 receptors. *Life Sci* 1995; 56: L19-L25.

Erdmann B, Fuxe K, Ganten D. Subcellular localization of angiotensin II immunoreactivity in the rat cerebellar cortex. *Hypertension* 1996; 28: 818–824.

Erdös B, Broxson Ch, King M, Scarpace P, Tumer 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 Hypertension.* 2006; 24:109-116.

Eto T. A review of the biological properties and clinical implications of adrenomedullin and proadrenomedullin N terminal 20 peptide (PAMP), hypotensive and vasodilating peptides. *Peptides* 2001; 22: 1693 – 1711.

Fellner S, Arendshorst W. Angiotensin II, reactive oxygen species, and Ca<sup>2+</sup> signaling in afferent arterioles. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005; 289: F1012–F1019.

Fernández L, Grande M, Diego J, Fuentes I, Macias J, Sánchez A, Grande J, García L, López J, Martínez C. Effect of different antihypertensive treatments on Ras, MAPK and Akt activation in hypertension and diabetes. *Clinical Science* 2009; 116: 165–173.

Ferrendelli JA. Distribution and regulation of cyclic GMP in the central nervous system. *Adv Cyclic Nucleotide Res.* 1978; 9: 453-464.

Ferroni P, Basili S, Paoletti V, Davi G. Endothelial dysfunction and oxidative stress in arterial hypertension. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2006; 16: 222 - 233.

Figueira L. El Resveratrol: Papel en Enfermedades Cardiovasculares y el Cáncer. *INFORMED* 2010; 2 (12): 73 – 83.

Figueira L, González J. Efecto del extracto de *Pinus maritime*, Vitamina C y E, sobre la concentración sérica de LDLox, PCR, Selectina-E, IL-6 y formación de ateromas en conejos con dieta hiperlipidémica. *INFORMED* 2008; 10 (10): 593 – 607.

Figueira L, Villalobos J, Colina V. Sistema Renina Angiotensina Renal: El papel de la Angiotensina 1-7. *Vitae* 2009; 38: 1-15.

Fleegal MA, Sumners C. Drinking behavior elicited by central injection of angiotensin II: roles for protein kinase C and Ca<sup>2+</sup>/calmodulin dependent protein kinase II. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003; 285: 632-640.

Flohé L, Gunzler W. Assays of glutathione peroxidase. *Meth. Enzymol* 1984; 77: 398 – 404.

Follwell MJ, Ferguson AV. Adrenomedullin influences magnocellular and parvocellular neurons of paraventricular nucleus via separate mechanisms. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2002; 283: R1293– R1302.

Frank G, Eguchi S, Inagami T, Motley E. N-acetylcysteine inhibits angiotensin II – mediated activation of extracellular signal – regulated kinase and epidermal growth factor receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 280: 1116 – 1119.

Fridovich I. Superoxide anion radical ( $O_2^{\cdot-}$ ), superoxide dismutase, and related matters. *J Biol Chem* 1997; 272: 18515 – 18517.

Fujita M, Kuwaki T, Ando K, Fujita T. Sympatho – inhibitory action of endogenous adrenomedullin through inhibition of oxidative stress in the brain. *Hypertension* 2005; 45: 1165 – 1172.

Fukai N, Shichiri M, Ozawa N, Matsushita M, Hirata Y. Coexpression of calcitonin receptor like receptor and receptor activity modifying protein 2 or 3 mediates the antimigratory effect of adrenomedullin. *Endocrinology* 2003; 144: 447 – 453.

Gao Y, Li X. Administration of adrenomedullin into subfornical organ inhibits  $Na^+K^+$  ATPase activity in single proximal renal tubule of rats. *Acta Physiol Sinica* 2009; 61 (1): 94 – 98.

Garayoa M, Bodegas E, Cuttitta F, Montuenga L. Adrenomedullin in mammalian embryogenesis. *Microsc Res Tech* 2002; 57: 40–54.

Gelband CH, Sumners C, Lu D and Raizada MK. Angiotensin receptors and norepinephrine neuromodulation: implications of functional coupling. *Regul Pept* 1997; 72: 139-145.

Gibbons C, Dackor R, Dunworth W, Fritz-Six K, Caron K. Receptor Activity – modifying proteins: RAMPing up Adrenomedullin signaling. *Mol Endocrinol* 2007; 21 (4): 783-796.

González J, Figueira L, Reigosa A. Selectina-E, VCAM-1, FNT- $\alpha$ , IL-6, PCR y Fibrinógeno plasmático como marcadores de inflamación en la aterosclerosis, en conejos machos Nueva Zelanda, expuestos a una dieta hiperlipidémica. *Salus* 2008; 12 (2): 50 – 57.

González W, Soleilhac J, Fournie Z, et al. Characterization of neutral endopeptidase in vascular cells, modulation of vasoactive peptide levels. *Eur J Pharmacol* 1998; 345: 323 – 331.

Green L, Wagner A, Glogowski J, Skipper P, Whisnok J, Tannenbaum S. Analysis of Nitrate, Nitrite and Nitrate in Biological Fluids. *Anal Biochem* 1982; 126: 131-138.

Griendling K, Minieri CA, Ollerenshaw JD, and Alexander RW. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1994; 74: 1141–1148.

Griendling K<sup>A</sup>, Ushio-Fukai M. Reactive oxygen species as mediators of angiotensin II signaling. *Regul Pept* 2000; 91: 21-27.

Griendling K<sup>B</sup>, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase: Role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* 2000; 86: 494-501.

Guyton KZ, Liu Y, Gorospe M, Xu Q, and Holbrook N. Activation of mitogenactivated protein kinase by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Role in cell survival following oxidant injury. *J Biol Chem* 1996; 271: 4138–4142.

Halliwell B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause or consequence?. *Lancet* 1994; 344: 721 - 724.

Hamaguchi A, Kim S, Yano M, Yamanaka S, Iwao H. Activation of Glomerular Mitogen-Activated Protein Kinases in Angiotensin TI-Mediated Hypertension. *Am Soc Nephrol* 1998; 9: 372-380.

Hamid S, Baxter G. Adrenomedullin: regulator of systemic and cardiac homeostasis in acute myocardial infarction. *Pharmacol Ther* 2005; 95 – 112.

Hanna F, Buchanan K. Adrenomedullin: a novel cardiovascular regulatory peptide. *Q J Med* 1996; 89: 881 – 884.

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

Hayakawa H, Hirata Y, Kakoki M, Suzuki Y, Nishimatsu H, Nagata D, Suzuki E, Kikuchi K, Nagano T, Kangawa K, Matsuo H, Sugimoto T, Omata M. Role of nitric oxide-cGMP pathway in adrenomedullin-induced vasodilation in the rat. *Hypertension* 1999; 33: 689–693.

Haynes J, Cooper M. Adrenomedullin and calcitonin gene – related peptide in the rat isolated kidney and in the anaesthetized rat: *in vitro* and *in vivo* effects. *Eur J Pharmacol* 1995; 280: 91 – 94.

He H, Bessho H, Fujisawa Y, Horiuchi K, Tomohiro A, Kita T, Aki Y, Kimura S, Tamaki T, Abe Y. Effects of a synthetic rat adrenomedullin on regional hemodynamics in rats. *Eur J Pharmacol* 1995; 273: 209 – 214.

Hernández R. II Norma Venezolana para el Tratamiento de la Hipertensión. *Sociedad Venezolana de Hipertensión*; 2009: 1 – 70.

Higashi Y, Noma K, Yoshizumi M, Kihara Y. Endothelial function and oxidative stress in cardiovascular diseases. *Circ J*. 2009; 73 (3): 411-418.

Hilariret S<sup>A</sup>, Belanger C, Bertrand J, Laperriere A, Food SM, Bouvier M. Agonist – promoted internalization of a ternary complex between calcitonin receptor – like receptor, receptor activity – modifying protein 1 (RAMP1), and  $\beta$ -arrestin. *J Biol Chem* 2001; 276: 29575-29581.

Hilariret S<sup>B</sup>, Foord SM, Marshall FH, Bouvier M. Protein – protein interaction and not glycosylation determines the binding selectivity of heterodimers between the calcitonin receptor – like receptor and the receptor activity modifying proteins. *J Biol Chem* 2001; 276: 29575 – 29581.

Hill C, Marais S, John J, Wynne S, Dalton R, Treisman R. Functional analysis of a growth factor-responsive transcription factor complex. *Cell* 1993; 73: 395–406.

Hinson J, Kapas S, Smith D. Adrenomedullin, a multifunctional regulatory peptide. *Endocr Rev* 2000; 21 (2): 138 – 167.

Hirata Y Hayakawa H, Suzuki Y, Suzuki E, Ikenouchi H, Kohmoto O, Kimura K, Kitamura K, Eto T, Kangawa K, Matsuo H, Omata M. Mechanisms of Adrenomedullin-Induced Vasodilation in the Rat Kidney. *Hypertension* 1995; 25:790-795.

Hirayama N, Kitamura K, Imamura T, Kato J, Koiwaya Y, Eto T. Secretion and clearance of the mature form of adrenomedullin in humans. *Life Sci* 1999; 64: 2505 – 2509.

Hongpaisan J, Winters C, Andrews B. Strong Calcium Entry Activates Mitochondrial Superoxide Generation, Upregulating Kinase Signaling in Hippocampal Neurons. *J. Neurosci.* 2004; 24 (48):19878 –10887.

Horio T, Kohno M, Kano H, Ikeda M, Yasunari K, Yokokawa K, Minami M, Takeda T. Adrenomedullin as a novel antimigration factor of vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 1995; 77 (4): 660-664.

Horn T, Smith PM, McLaughlin BE, Bauce L, Marks GS, Pittman QJ, Ferguson AV. Nitric oxide actions in paraventricular nucleus: Cardiovascular and neurochemical implications. *Am J Physiol* 1994; 266: R306– R313.

Hwang IS, Fung ML, Liong EC, Tipoe GL, Tang F. Age-related changes in adrenomedullin expression and hypoxia-inducible factor-1 activity in the rat lung and their responses to hypoxia. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2007; 62 (1):41-49.

Ichiki Y, Kitamura K, Kangawa K, Kawamoto M, Matsuo H, Eto T. Distribution and characterization of immunoreactive adrenomedullin in human tissue and plasma. *FEBS Lett* 1994; 338: 6 – 10.

Ignarro L, Balesstrieri M, Napoli C. Nutrition, physical activity, and cardiovascular disease: An update. *Cardiovasc Res* 2007; 73: 326 – 340.

Ikenouchi H, Kangawa K, Matsuo H, Hirata Y. Negative inotropic effect of adrenomedullin in isolated adult rabbit cardiac ventricular myocytes. *Circulation* 1997; 95: 2318–2324.

Ishida M, Ishida T, Thomas S, Berk B. Activation of extracellular signal regulated kinases (ERK1/2) by Ang II is dependent on c-Src in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1998; 82: 7–12.

Ishimitsu T, Kojima M, Kangawa K, Hino J, Matsuoka H, Kitamura K, Eto T, Matsuo H. Genomic structure of human adrenomedullin gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 203: 631 – 639.

Ishizaka Y, Ishizaka Y, Tanaka M, Kitamura K, Kangawa K, Minamino N, Matsuo H, Eto T. Adrenomedullin stimulates cyclic AMP formation in rat vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 200: 642 – 646.

Israel A, Arzola J, De Jesús S, Varela M. Role of oxidative stress in the natriuresis induced by central administration of angiotensin II *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2009; 10 (1): 9 – 14.

Israel A, Diaz E. Diuretic and natriuretic action of adrenomedullin administered intracerebroventricularly in conscious rats. *Regul Pept* 2000; 89: 13–18.

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

Ito M. Functional roles of neuropeptides in cerebellar circuits. *Neuroscience* 2009; 162: 666 – 672.

Iwasaki H, Eguchi S, Shichiri M, Marumo F, Hirata Y. Adrenomedullin as a Novel Growth-Promoting Factor for Cultured Vascular Smooth Muscle Cells: Role of Tyrosine Kinase-Mediated Mitogen-Activated Protein Kinase Activation. *Endocrinology* 1998; 139 (8): 3432-3441.

Iwasaki H, Shichiri M, Marumo F, Hirata Y. Adrenomedullin Stimulates Proline-Rich Tyrosine Kinase 2 in Vascular Smooth Muscle Cells. *Endocrinology* 2001; 142 (2): 564-572.

Jensen BL, Kramer BK, Kurtz A: Adrenomedullin stimulates renin release and renin mRNA in mouse juxtaglomerula granular cells. *Hypertension* 1997; 29: 1148-1155.

Ji S, He R. Microinjection of adrenomedullin in rostral ventrolateral medulla increases blood pressure, heart rate and renal sympathetic nerve activity in rats. *Acta Physiol Sin* 2002; 54 (6): 460 – 466.

Ji S, Wang Z, Li X, He R. Intracerebroventricular administration of adrenomedullin increases the expression of c-fos and activates nitric oxide – producing neurons in rat cardiovascular related brain nuclei. *Acta Physiol Sin* 2004; 56 (3): 328 – 334.

Ji, S, Xue J, Wang C, Su S, He R. Adrenomedullin reduces intracellular calcium concentration in cultured hippocampal neurons. *Acta Physiol Sin* 2005; 57 (3): 340 – 345.



Jiang W, Jiang H, Pan C, Cai C, Qi Y, Pang Y, Tang C. Relationship between the contents of adrenomedullin and distributions of neutral endopeptidase in blood and tissues of spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res* 2004; 27: 109 – 117.

Jing L, Zhang J, Sun J, Guo F, An X, Yang K, Li P. Inhibition of Extracellular Signal-Regulated Kinases Ameliorates Hypertension-Induced Renal Vascular Remodeling in Rat Models. *Int. J. Mol. Sci.* 2011; 12: 8333-8346.

Johren O <sup>A</sup>, Inagami T, Saavedra JM. Localization of AT<sub>2</sub> angiotensin II receptor gene expression in rat brain by in situ hybridization histochemistry. *Mol Brain Res* 1996; 37: 192–200.

Johren O <sup>B</sup>, Saavedra JM. Gene expression of angiotensin II receptor subtypes in the cerebellar cortex of young rats. *NeuroReport* 1996; 7: 1349–1352.

Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Pressure. The Sixth Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Pressure (JNC VI). *Arch Intern Med* 1997; 157: 2413 – 2446.

Jougasaki M, Burnett J. Adrenomedullin as a renal regulator peptide. *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15: 293 – 295.

Juaneda C, Dumont Y, Chabot J, Fournier A, Quirion R. Adrenomedullin receptor binding sites in rat brain and peripheral tissues. *Eur J Pharmacol* 2003; 474: 165 – 174.

Juaneda C, Dumont Y, Chabot J, Quirion R. Autoradiographic distribution of adrenomedullin receptors in the rat brain. *Eur J Pharmacol* 2001; 421: R1 – R2.

Juaneda C, Dumont Y, Quirion R. The molecular pharmacology of CGRP and related peptide receptor subtypes. *Trends Pharmacol Sci* 2000; 21 (11): 432 – 438.

Kapas S, Brown D, Farthing P, Hagi-Pavli E. Adrenomedullin has mitogenic effects on human oral keratinocytes: involvement of cyclic AMP. *FEBS Letters* 1997; 418: 287- 290.

Kato H, Shichiri M, Marumo F, Hirata Y. Adrenomedullin as an autocrine/paracrine apoptosis survival factor for rat endothelial cells. *Endocrinology*. 1997; 138 (6): 2615-2620.

Kato K, Yin H, Agata J, Yoshida H, Chao L, Chao J. Adrenomedullin gene delivery attenuates myocardial infarction and apoptosis after ischemia and reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; 285: H1506– H1514.

Kawai J, Ando K, Tojo A, Shimosawa T, Takahashi K, Onozato M, Yamasaki M, Ogita T, Nakaota T, Fujita T. Endogenous adrenomedullin protects against vascular response to injury in mice. *Circulation* 2004; 109: 1147 – 1153.

Kim H, Lee G, John S, Maeda N, Smithies O. Molecular phenotyping for analyzing subtle genetic effects in mice: Application to an angiotensinogen gene titration. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 4602 – 4607.

Kis B, Abraham C, Deli M, Kobayashi H, Niwa M, Yamashita H, Busija D, Ueta Y. Adrenomedullin, an autocrine mediators of blood – brain barrier function. *Hyperten Res* 2003; 26: S61 – S70.

Kitamura K<sup>A</sup>, Kangawa K, Kawamoto M, Ichiki Y, Nakamura S, Matsuo H, Eto T. Adrenomedullin: a novel hypotensive peptide isolated from human pheochromocytoma. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 192: 553 – 560.

Kitamura K, Kangawa K, Kojima M, Ichiki Y, Matsuo H, Eto T. Complete amino acid sequence of porcine adrenomedullin and cloning of cDNA encoding its precursor. *FEBS Letters* 1994; 338: 6 – 10.

Kitamura K<sup>B</sup>, Sakata J, Kangawa K, Kojima M, Matsuo H, Eto T. Cloning and characterization of cDNA encoding a precursor for human adrenomedullin. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 194:720–725.

Kitamura K<sup>C</sup> Kato K, Kawamoto M, Tanaka , Chino N, Kangaa K, Eto T. The intermediate form of glycine – extended adrenomedullin is the major circulating molecular form in human plasma. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 244: 551 – 555.

Kohno M, Yasunari K, Minami M, Kano H, Maeda K, Mandel A, Inoki K, Haneda M, Yoshikawa J. Regulation of rat mesangial cell migration by platelet – derived

growth factor, angiotensin II, and adrenomedullin. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10: 2495 – 2502.

Kohno M, Yokokawa K, Hiroaki Kano H, Yasunari K, Minami M, Hanehira T, Yoshikawa J. Adrenomedullin Is a Potent Inhibitor of Angiotensin II–Induced Migration of Human Coronary Artery Smooth Muscle Cells. *Hypertension* 1997; 29: 1309-1313.

Kojo S. Vitamin C: Basic metabolism and its function as an index of oxidative stress. *Curr Med Chem* 2004; 1: 1041 – 1064.

Komuro I, Yazaki Y. Control of cardiac gene expression by mechanical stress. *Annu. Rev. Physiol.* 1993; 55: 55–75.

Krawiec Z, Biliński T, Schüller C, Ruis H. Reactive oxygen species as second messengers? Induction of the expression of yeast catalase T gene by heat and hyperosmotic stress does not require oxygen. *Acta Biochim Pol* 2000; 47 (1): 201 – 207.

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

Kunsch C, Medford R. Oxidative stress as a regulator of gene expression in the vasculature. *Circ Res* 1999; 85: 753 – 766.

Kureishi Y, Kobayashi S, Nishimura J, Nakano T & Kanaide H. Adrenomedullin decreases both cytosolic Ca(2+) concentration and Ca(2+)-sensitivity in pig coronary arterial smooth muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 212: 572-579.

Kurino M, Fukunaga K, Ushio Y, Miyamoto E. Activation of mitogen-activated protein kinase in cultured rat hippocampal neurons by stimulation of glutamate receptors. *J Neurochem* 1995; 65:1282– 1289

Kuwasako K, Cao YN, Chu CP, Iwatsubo S, Eto T, Kitamura K. Functions of the cytoplasmic tails of the human receptor activity-modifying protein components of calcitonin gene-related peptide and adrenomedullin receptors. *J Biol Chem* 2006; 281:7205–7213

Kuwasako K, Cao YN, Nagoshi Y, Kitamura K, Eto T. Adrenomedullin receptors: pharmacological features and possible pathophysiological roles. *Peptides* 2004; 25: 2003-2012.

Kuwasako K, Kitamura K, Nagoshi Y, Eto T. Novel calcitonin-(8-32) sensitive adrenomedullin receptors derived from co-expression of calcitonin receptor with receptor activity modifying protein. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 301: 460-464.

Kuwasako K, Kitamura K, Uemura T, Yanagita Y, Kato Y, Sakata T, Eto T. The Seven Amino Acids of Human RAMP2 (86) and RAMP3 (59) Are Critical for Agonist Binding to Human Adrenomedullin Receptors. *J Biol Chem* 2001; 276: 49459 – 49465.

Kuwasako K, Shimekake Y, Masuda M, Nakahara K, Yoshida T, Kitaura M, Kitamura K, Eto T, Sakata T. Visualization of the Calcitonin Receptor-like Receptor and Its Receptor Activity-modifying Proteins during Internalization and Recycling. *J Biol Chem* 2000; 275: 29602 – 29609.

Kvetnansky R, Sun C, Lake C, Thoa N, Torda T, Kopin I. Effect of handling and forced immobilization on rat plasma levels of epinephrine, norepinephrine, and dopamine-beta-hydroxylase. *Endocrinology* 1978; 103: 1868-1874.

Kyosseva S, Owens M, Elbein A, Karson C. Differential and Region-Specific Activation of Mitogen-Activated Protein Kinases Following Chronic Administration of Phencyclidine in Rat Brain. *Neuropsychopharmacology* 2001; 24: 267–277.

Lainchbury JG, Cooper GJS, Coy DH, Jiang NY, Lewis LK, Yandle TG, Richards AM, Nicholls MG. Adrenomedullin a hypotensive hormone in man. *Clin Sci* 1997; 92: 467 – 472.

Lang M, Paterno R, Faraci F, Heistad D. Mechanisms of adrenomedullin – induced dilatation of cerebral arterioles. *Stroke* 1997; 28: 181 – 185.

Lapointe N, Rouleau J. Cardioprotective effects of vasopeptidase inhibitors. *Can J Cardiol* 2002; 18: 415 – 420.

Larson A, Symons D, Jalili T. Quercetin: A treatment for hypertension. A review of efficacy and mechanisms. *Pharmaceuticals* 2010; 3: 237 – 250.

Lassegue B, Clempus RE. Vascular NAD(P)H oxidase: specific features, expression, and regulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003; 285: R277-R297.

Latinen J, Torda T, Saavedra J. Cholinergic stimulation of phosphoinositide hydrolysis in the rat pineal gland. *Eur J Pharmacol* 1989; 161: 237 – 240.

Lee J, Johnson J. An important role of Nrf2-ARE pathway in the cellular defense mechanism. *J Biochem Mol Biol* 2004; 37: 139 – 143.

Lee J, Konarska M, McCarty R. Physiological responses to acute stress in alloxan and streptozotocin diabetic rats. *Physiol Behav* 1989; 45: 483 – 489.

Leuthäuser K, Gujer R, aldecoa A, Mckinney A, Muff R, Fischer J, Born W. Receptor-activity-modifying protein 1 forms heterodimers with two G-protein-coupled receptors to define ligand recognition. *Biochem. J.* 2000; 351: 347–351.

Lewis L, Smith M, Brennan S, Yandle T, Richards A, Nicholls M. Degradation of human adrenomedullin (1-52) by plasma membrane enzymes and identification of metabolites. *Peptides* 1997; 18: 733 – 739.

Li X, Li L, Shen L, Qian Y, Cao Y, Zhu D. Changes of adrenomedullin and its receptor components mRNAs expression in the brain stem and hypothalamus-pituitary – adrenal axis of stress - induced hypertensive rats. *Acta Physiol Sin* 2004; 56 (6): 723 – 729.

Li Y, O W, Tang F. Effect of aging on the expression of adrenomedullin and its receptor component proteins in the male reproductive system of the rat. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2007; 62 (12): 1346-1351.

Lin H, Harris T, Flannery M, Aruffo A, Kaji E, Gorn A, Kolakowski Jr , Lodish H, Goldring S. Expression cloning of an adenylate cyclase – coupled calcitonin receptor. *Science* 1991; 254: 1022- 1024.

Lisy O, Jougasaki M, Schirger J. Neutral endopeptidase inhibition potentiates the natriuretic actions of adrenomedullin. *Am J Physiol* 1998; 275: F410 –F414.

Liu J, Shimosawa T, Matsui H, Meng F, Supowit S, DiPette D, Ando K, Fujita T. Adrenomedullin inhibits angiotensin II- induced oxidative stress via Csk-

mediated inhibition of Src activity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; 292: H1714–H1721.

Lohmann S, Walter U, Miller P, Greengard P, De Camilli P. Immunohistochemical localization of cyclic GMP-dependent protein kinase in mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1981; 78(1): 653–657.

Lowry O, Rosebrough N, Farr A, Randall R. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951; 193: 265-275

Luna L. The Histological Staining Manual. Methods of the Armed Forces Institute of Pathology. 1968 Cap 1-4: 11-37. Editions McGraw-Hill. New York. USA.

Macchi V, Porzionato A, Belloni A, Stecco C, Parenti A, De Caro R. Immunohistochemical mapping of adrenomedullin in the human medulla oblongata. *Peptides* 2006; 27: 1397 – 1404.

Macri CJ, Martínez A, Moody TW, Gray KD, Miller MJ, Gallagher M, Cuttitta F. Detection of adrenomedullin, a hypotensive peptide, in amniotic fluid and fetal membranes. *Am J Obstet Gynecol* 1996; 175: 906 – 911.

Malpas S. What sets the long term level of sympathetic nerve activity: is there a role for arterial baroreceptors?. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004; 286: R1 – R12.

Martin DS. The hunting of the Src. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2: 467–475.

Martin DS, Segura T, Haywood JR. Cardiovascular responses to bicuculline in the paraventricular nucleus of the rat. *Hypertension* 1991; 18: 48– 55.

Martin DS, Segura T, Haywood JR. Cardiovascular responses to bicuculline in the paraventricular nucleus of the rat. *Hypertension* 1991; 18: 48– 55.

Martínez A, Julián M, Bregonzio C, Notari L, Moody T, Cuttitta F. Identification of vasoactive nonpeptidic positive and negative modulators of adrenomedullin using a neutralizing antibody – based screening strategy. *Endocrinology* 2004; 145: 3858 – 3865.

Martínez A, Miller M, Unsworth EJ, Siegfried JM, Cuttitta F. Expression of adrenomedullin in normal human lung and in pulmonary tumors. *Endocrinology* 1995; 136: 4099 – 4105.

Martínez A, Pío R, López J, Cuttitta F. Expression of the adrenomedullin binding protein, complement factor H, in the pancreas and its physiological impact on insulin secretion . *J Endocrinol* 2001; 170: 503 – 511.

Mathison Y, Israel A. Role of endothelin type B receptor in nitric oxide/cGMP signaling pathway in rat median eminence. *Cell Mol. Neurobiol* 2002; 22: 783 – 795.

Mathison Y, Israel A. Señalización de la adrenomedulina en la eminencia media de la rata. *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica* 2006; 25 (2): 45 – 53.

Matsui H, Shimosawa T, Itakura K, Xing GQ, Ando K, Fujita T. Adrenomedullin can protect against pulmonary vascular remodeling induced by hypoxia. *Circulation* 2004; 109: 2246–2251.

Matsumura K, Abe I, Tsuchihashi T, Fujishima M. Central adrenomedullin augments the baroreceptor reflex in conscious rabbits. *Hypertension* 1999; 33: 992 – 997.

McCarty R, Gold P. Catecholamine, stress, and disease: A Psychobiological perspective. *Psychosom Med* 1996; 58: 590 – 597.

McLatchie L, Fraser N, Main M, Wise A, Brown J, Thompson N, Solari R, Lee M, Foord S. RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor. *Nature*. 1998; 393 (6683): 333-339.

Meeran K, O'Shea D, Upton P, Small C, Ghatei M, Byfield P, Bloom S. Circulating adrenomedullin does not regulate systemic blood pressure but increases plasma prolactin after intravenous infusion in human: a pharmacokinetic study. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 95-100.

Mishima K, Kato J, Kuwasako K, Imamura T, Kitamura K, Eto T. Angiotensin II modulates gene expression of adrenomedullin receptor components in rat cardiomyocytes. *Life Sciences* 2003; 73 (13): 1629 – 1635.

Mishima K, Kato J, Kuwasako K, Ito K, Imamura T, Kitamura K, Eto T. effect of endothelin on adrenomedullin secretion and expression of adrenomedullin receptors in rat cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 287: 264 – 269.

Mitsuhiko S, Shimokawa A, Kunitake T, Kato K, Hanamori T, Kitamura K, Eto T, Kannan H. Central actions of adrenomedullin on cardiovascular parameters and sympathetic outflow in conscious rats. *Am J Physiol (Regulatory Integrative Comp Physiol)* 1998; 274: R979 – R984.

Miyashita K, Itoh H, Sawada N, Fukunaga Y, Sone M, Yamahara K, Yurugi-Kobayashi T, Park K, Nakao K. Adrenomedullin provokes endothelial Akt activation and promotes vascular regeneration both *in vitro* and *in vivo*. *FEBS Letters* 2003; 544: 86-92.

Mohazzab K, Kaminski P, Wolin M. NADH oxidoreductase is a major source of superoxide anion in bovine coronary artery endothelium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1994; 266: H2568 – H2572.

Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med.* 1993; 329 (27): 2002-2012.

Morara S, Rosina A, Provini L, Forloni G, Caretti A, Wimalawansa S. Calcitonin gene – related peptide receptor expression in the neurons and glia of developing rat cerebellum: an autoradiographic and immunohistochemical analysis. *Neuroscience* 2000; 100 (2): 381 – 391.

Morara S, Wimalawansa S, Rosina A. Monoclonal antibodies reveal expression of the CGRP receptor in Purkinje cells, interneurons and astrocytes of rat cerebellar cortex. *NeuroReport* 1998; 9: 3755 – 3759.

Mori Y, Nishikimi T, Kobayashi N, Ono H, Kangawa K, Matsuoka H. Long term adrenomedullin infusion improves survival in malignant hypertensive rats. *Hypertension* 2002; 40: 107 – 113.

Muff R, Born W, Fischer J. Adrenomedullin and related peptides: receptors and accessory proteins. *Peptides* 2001; 22: 1765-1772.

Murphy TC, Samson WK. The novel vasoactive hormone, adrenomedullin, inhibits water drinking in the rat. *Endocrinology* 1995; 136: 2459–2463.



Nagata N, Kato J, Kitamura K, Kawamoto M, Tanaka N, Eto T, Takasaki M. Dissociation of adrenomedullin concentrations in plasma and cerebrospinal fluid in pregnant and non – pregnant women. *Eur J Endocrinol* 1998; 139: 611 – 614.

Nagaya N, Satoh T, Nishikimi T, Uematsu M, Furuichi S, Sakamaki F, Oya H, Kyotani S, Nakanishi N, Goto Y, Masusa Y, Miyakate K, Kangawa K. Hemodynamic, renal and hormonal effects of adrenomedullin infusion in patients with congestive heart failure. *Circulation* 2000; 101: 498-503.

Nakane M, Ichikawa M, Deguchi T. Light and electron microscopic demonstration of guanylate cyclase in rat brain. *Brain Res.* 1983; 273 (1): 9-15.

Nicholls M. Hemodynamic and hormonal actions of adrenomedullin. *Braz J Med Biol Res* 2004; 37: 1247 – 1253.

NIH Guide for the care and use of animals. 1996. Institute of Laboratory Animal Resources. National Research Council. National Academy Press, Washington DC, USA.

Nishikimi T, Kitamura K, Sairo Y, Shimada K, Ishimitsu T, Takamiya M, Kangawa K, Matsuo H, Eto T, Omae T, Matsuoka H. Clinical studies on the sites of production and clearance of circulating adrenomedullin in human subjects. *Hypertension* 1994; 24: 600 – 604.

Nishikimi T, Matsuoka H, Shimada K, Matsuo H, Kangawa K. Production and clearance sites of two molecular forms of adrenomedullin in human plasma. *Am J Hypertens* 2004; 13: 1032 – 1034.

Nishikimi T, Yoshihara F, Kanazawa A, Okano I, Horio T, Nagaya N, Yutani C, Matsuo H, Matsuoka H, Kangawa K. Role of increased circulating and renal adrenomedullin in rats with malignant hypertension. *Am J Physiol – Regul Integr C* 2001; 281: R2079 – R2087.

Nishimatsu H, Shindo T, Takeuchi T, Moriyama N, Hirata Y, Kitamura T. Role of endogenous adrenomedullin in the regulation of ischemic renal injury – studies on transgenic and knockout mice of adrenomedullin gene. *J Urol* 2002; 167: 97 – 97.

Nishimatsu H, Suzuki E, Nagata D, Moriyama N, Satonaka H, Walsh K, Sata M, Kangawa K, Matsuo H, Goto A, Kitamura T, Hirata Y. Adrenomedullin induces

endothelium-dependent vasorelaxation via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent pathway in rat aorta. *Circ Res* 2001; 89: 63–70.

Nishiyama A, Yao L, Nagai Y, Miyata K, Yoshizumi M, Kagami S, Kondo S, Kiyomoto H, Shokoji T, Kimura S, Kohno M, Abe Y. Possible contributions of reactive oxygen species and mitogen-activated protein kinase to renal injury in aldosterone/salt-induced hypertensive rats. *Hypertension*. 2004; 43 (4): 841-848.

Nisimaru N. Cardiovascular modules in the cerebellum. *Jpn J Physiol* 2004; 54: 431 – 448.

Nisimaru N, Watnabe Y. Inhibitory effects of cerebellar nodulus (lobule X) stimulation on sympathetic nerve activity and systemic blood pressure in rabbit. *J Physiol Soc J* 1985; 47: 447.

Nisimaru N, Yamamoto M, Shimoyama I. Inhibitory effects of cerebellar cortical stimulation on sympathetic nerve activity in rabbits. *Jpn J Physiol* 1984; 34: 539 – 551.

Oberley L, Spitz D. Assay of superoxide dismutase activity in tumor tissue. *Meth Enzymol* 1984; 105: 457 – 464.

Oda Y, Renaux B, Bjorge J, Saifeddine M, Fujita DJ, Hollenberg MD. c-Src is a major cytosolic tyrosine kinase in vascular tissue. *Can J Physiol Pharmacol* 1999; 77: 606–617.

Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*. 1979; 95: 351-358.

Okumura H, Nagaya N, Itoh T, Okano I, Hino J, Mori K, Tsukamoto Y, Ishibashi-Ueda H, Miwa S, Tambara K, Toyokuni S, Yutani C, Kangawa K. Adrenomedullin infusion attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent pathway. *Circulation*. 2004; 109 (2): 242- 248.

Oliver K, Wainwright A, Edvinsson L, Pickard J, Hill R. Immunohistochemical localization of calcitonin receptor like receptor and receptor activity – modifying proteins in the human cerebral vasculature. *J Cereb Blood Flow Metab* 2002; 22: 620 – 629.

Oparil S, Zaman A, Calhoun D. Pathogenesis of Hypertension. *Ann Intern Med* 2003; 139: 761 – 776.

Otani N, Nawashiro H, Fukui S, Nomura N, Yano A, Miyazawa T, Shima K. Differential Activation of Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways After Traumatic Brain Injury in the Rat Hippocampus. *Journal Cereb Blood Flow Metab* 2002; 22: 327–334.

Owji A, Gardiner J, Upton P, Mahmoodi M, Ghatei M, Bloom S, Smith D. Characterization and molecular identification of adrenomedullin binding sites in the rat spinal cord: A comparison with calcitonin gene – related peptide receptors. *J Neurochem* 1996; 67: 2172 – 2179.

Owji A, Smith D, Coppock H, Morgan D, Bhogal R, Ghatei M, Bloom S. An abundant and specific binding site for the novel vasodilator adrenomedullin in the rat. *Endocrinology* 1995; 136: 2127 – 2134.

Pan C, Jaing W, Zhong G, Zhao J, Pang Y, Tang C, Qi Y. Hypertension induced by nitric oxide synthase inhibitor increases responsiveness of ventricular myocardium and aorta of rat tissue to adrenomedullin stimulation *in vitro*. *Life Science* 2005; 78: 398 – 405.

Parameswaran N, Nambi P, Hall CS, Brooks DP, Spielman WS. Adrenomedullin decreases extracellular signal-regulated kinase activity through an increase in protein phosphatase-2A activity in mesangial cells. *Eur J Pharmacol* 2000; 388: 133–138.

Parameswaran N, Spielman W. RAMPs: the past, present and future. *Trends Biochem Sci* 2006; 31 (11): 631-638.

Parameswaran N, Spielman W, Brooks DP, Nambi P. SB203580 reverses adrenomedullin's effect on proliferation and apoptosis in cultured mesangial cells. *Eur J Pharmacol* 1999; 371:75–82

Parenti A, Cui X, Hopfer U, Ziche M, Douglas J. Activation of MAPKs in Proximal Tubule Cells From Spontaneously Hypertensive and Control Wistar-Kyoto Rats. *Hypertension*. 2000; 35: 1160-1166.

Pastorello M, Díaz E, Csibi A, Garrido M, Chabot J, Quirion R, Israel A. Papel de la adrenomedulina cerebelosa en la hipertensión arterial. *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica* 2007; 26 (2): 98 – 104.

Pearson G, Robinson F, Gibson T, Xu B, Karandikar M, Berman K, Cobb M. Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase Pathways: Regulation and Physiological Functions. *Endocrine Rev* 2001; 22: 153–183.

Pellegrino L, Pellegrino A, Cushman A. 1979. A Stereotaxic Atlas of the rat brain. New York and London. Plenum Press. Springer.

Penna L, Bassani R. Increased spontaneous activity and reduced inotropic response to catecholamines in ventricular myocytes from fooshock – stressed rats. *Stress* 2010; 13 (1): 73 – 82.

Pinto A, Sekizawa K, Yamaya M, Ohrui T, Jia Y, Sasaki H. Effects of adrenomedullin and calcitonin gene related peptide on airway and pulmonary vascular smooth muscle in guinea pigs. *Br J Pharmacol* 1996; 119: 1477 – 1483.

Pío R, Elsasser T, Martínez A, Cuttitta F. Identification, characterization, and physiological actions of Factor H as an adrenomedullin binding protein present in human plasma. *Microsc. Res. Tech.* 2002; 57: 23 – 27.

Pleguezuelos O, Hagi-Pavli E, Crowther G, Kapas S. Adrenomedullin signals through NF-kappaB in epithelial cells. *FEBS Lett* 2004; 577: 249–254.

Poyner D, Sexton P, Marshall I, Smith D, Quirion R, Born W, Muff R, Fisher J, Foord S. International Union of Pharmacology. XXXII. The Mammalian Calcitonin Gene – related peptides, adrenomedullin, amylin, and calcitonin receptors. *Pharmacol Rev* 2002; 54: 233 – 246.

Prado M, Evans – Bain B, Oliver K, Dickerson I. The role of the CGRP-receptor component protein (RCP) in adrenomedullin receptor signal transduction. *Peptides* 2001; 22 (11): 1773 – 1783.

Rahman , Nishiyama A, Guo P, Nagai Y, Xing G, Fujisawa Y, Yan Y, Kimura S, Hosomi N, Omori K, Abe Y, Kohno . Effects of adrenomedullin on cardiac oxidative stress and collagen accumulation in aldosterone – dependent malignant hypertensive rats. *J Phamacol Exp Ther* 2006; 318: 1323 – 1329.

Ramu A, Bergman F. The role of the cerebellum in blood pressure regulation. *Experientia* 1967; 23: 383 – 384.

Rasheed B, Manchada S, Anand B. Effects of stimulation of paleo cerebellum on certain vegetative functions in the cat. *Brain Res* 1970; 20: 293 – 308.

Rector D, Richard C, Harper R. Cerebellar fastigial nuclei activity during blood pressure challenges. *J Appl Physiol* 2006; 101: 549 – 555.

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

Rocha I, Goncalves V, Bettencourt M, Silva L. Effect of stimulation of sublobule IX-b of the cerebellar vermis on cardiac function. *Physiol Res* 2008; 57: 701 – 707.

Rodrigo J, Springall DR, Uttenthal O, Bentura ML, Abadia-Molina F, Riveros-Moreno V, Martínez-Murillo R, Polak JM, Moncada S. Localization of nitric oxide synthase in the adult rat brain. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1994; 345 (1312): 175-221.

Rodrigo R, Prat H, Passalacqua W, Araya J, Guichard C, Bachler J. Relationship between oxidative stress and essential hypertension. *Hypertens Res* 2007; 30: 1159 – 1167.

Roh J, Chang C, Bhalla A, Klein C, Hsu S. Intermedin Is a calcitonin / Calcitonin gene related peptide family peptide acting through the calcitonin receptor like receptor / receptor activity modifying protein receptor complexes. *J Biol Chem* 2004; 279: 7264 – 7274.

Roques B, Noble F, Daugé V, Fournié M, Beaumont A. Neutral endopeptidase 24.11: structure, inhibition, and experimental and clinical pharmacology. *Pharmacol Rev* 1993; 45: 87 – 146.

Rossi F<sup>A</sup>, Bertone C, Petricca S, Santiemma V . Adrenomedullin antagonizes angiotensin II -stimulated proliferation of human aortic smooth muscle cells. *Peptides* 2006; 27 (11): 2935-2941.

Rossi F<sup>B</sup>, Zappa C, Ferraresi A, Santiemma V. Adrenomedullin inhibits angiotensinII -induced contraction in human aortic smooth muscle cells. *Regul Pept.* 2006; 133 (1-3): 155-159.

Sabban E. Catecholamines in stress: molecular mechanisms of gene expression. *Endocrine Regulation* 2007; 41: 61 – 73.

Sacchetti B, Baldi E, Lorenzini C, Bucherelli C. Cerebellar role in fear – conditioning consolidation. *PNAS* 2002; 12: 8406 – 8411.

Saita M, Shimokawa A, Kunitake T, Kato K, Hanamori T, Kitamura K, Eto T, Kannan H. Central actions of adrenomedullin on cardiovascular parameters and sympathetic outflow in conscious rats. *Am J Physiol* 1998; 274: R979 – R984.

Sakai K, Saito K, Ishizuka N. Adrenomedullin synergistically interacts with endogenous vasodilators in rats: a possible role of K(ATP) channels. *Eur J Pharmacol* 1998; 359, 151–159.

Sakata J, Shimokubo T, Kitamura K, Nakamura S, Kangawa K, Matsuo H, Eto T. Molecular cloning and biological activities of rat adrenomedullin, a hypotensive peptide. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 195: 921–927.

Sakata J, Shimokubo T, Kitamura K, Nishizono M, Iehiki Y, Kangawa K, Matsuo H, Eto T. Distribution and characterization of immunoreactive rat adrenomedullin in tissue and plasma. *FEBS Letters* 1994; 352: 105 – 108.

Samson W. Adrenomedullin and the control of fluid and electrolyte homeostasis. *Annu Rev Physiol* 1999; 61: 363 – 389.

Samson W, Murphy T. Adrenomedullin inhibits salt appetite. *Endocrinology* 1997; 138: 613–616.

Samson W, Murphy T, Resch Z. Central mechanisms for the hypertensive effects of preproadrenomedullin – derived peptides in conscious rats. *Am J Physiol* 1998; 274: R1505 – R1509.

Sanchez R, Ayala M, Baglivo H, Velazquez C, Burlando G, Kohlmann O, Jimenez J, Jaramillo P, Brandao A, Valdes G, Alcocer L, Bendersky M, Ramirez

A, Zanchetti A, on behalf of the Latin America Expert Group. Latin American guidelines on hypertension. *J Hypertens* 2009; 27: 905–922.

Sander M, Hansen P, Victor R. Sympathetically mediated hypertension caused by chronic inhibition of nitric oxide. *Hypertension* 1995; 26: 691-695.

Satoh F, Takahashi O, Murakami K, Totsune M, Sone M, Ohneda H, Abe K, Miura Y, Hayashi Y, Sasano T, Mouri T. Adrenomedullin in human brain, adrenal glands and tumor tissues of pheochromocytoma, ganglioneuroblastoma and neuroblastoma. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80: 1750 – 1752.

Satoh F, Takahashi O, Murakami K, Totsune M, Sone M, Ohneda H, Sasano T, Mouri T. Immunocytochemical localization of adrenomedullin – like immunoreactivity in the human hypothalamus and the adrenal gland. *Neurosci Lett* 1996; 23: 207 – 210.

Schnackenberg CG. Physiological and pathophysiological roles of oxygen radicals in the renal microvasculature. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2002; 282: R335–R342.

Schnackenberg CG, Wilcox CS. Two-week administration of tempol attenuates both hypertension and renal excretion of 8-Iso prostaglandin F<sub>2</sub>. *Hypertension* 1999; 33: 424–428.

Serino R, Ueta Y, Hara Y, Nomura M, Yamamoto Y, Shibuya I, Hattori Y, Kitamura K, Kangawa K, Russell J, Yamashita H. Centrally administered adrenomedullin increases plasma oxytocin level with induction of c-fos messenger ribonucleic acid in the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat. *Endocrinology* 1999; 140: 2334 – 2342.

Serrano J, Alonso D, Fernández A, Encinas J, López J, Castro – Blanco S, Fernández – Vizarra P, Richart A, Santacana M, Uttenthal L, Bentura M, Martínez – Murillo R, Martínez A, Cuttitta F, Rodrigo J. Adrenomedullin in the central nervous system. *Microsc Res Tech* 2002; 57 (2): 76 – 79.

Serrano J, Encinas J, Fernández A, Castro S, Alonso D, Fernández P, Richart A, Bentura M, Santacana M, Cuttitta F, Martínez A, Rodrigo J. Distribution of immunoreactivity for the adrenomedullin binding protein, complement factor H, in the rat brain. *Neuroscience* 2003; 116: 947 – 962.

Serrano J, Uttenthal O, Martínez A, Fernández P, Martínez J, Alonso D, Bentura M, Santacana M, Gallardo J, Martínez R, Cutitta F, Rodrigo J. Distribution of adrenomedullin – like immunoreactivity in the rat central nervous system by light and electron microscopy. *Brain Res* 2000; 853: 245 – 268.

Seshiah PN, Weber DS, Rocic P, Valppu L, Taniyama Y, Griendling KK. Angiotensin II stimulation of NAD(P)H oxidase activity: upstream mediators. *Circ Res* 2002; 91: 406–413.

Sexton PM, Albiston A, Morfis M, Tilakaratne N. Receptor activity modifying proteins. *Cell Signal* 2001; 13: 73-83.

Seyedabadi M, Goodchild A, Pilowsky P. Differential role of kinases in brain stem oh hypertensive and normotensive rats. *Hypertensive* 2001; 38: 1087 – 1092.

Shan J, Krukoff T. Distribution of preproadrenomedullin mRNA in the rat central nervous system and its modulation by physiological stressors. *J Comp Neurol* 2001; 432: 88 – 100.

Shan J, Stachniak T, Jhamandas J, Krukoff T. Autonomic and neuroendocrine actions of adrenomedullin in the brain: mechanisms for homeostasis. *Regulatory Peptides* 2003; 112: 33 – 40.

Shapoval L, Sagach V, Pobegailo L. Nitric oxide influences ventrolateral medullary mechanisms of vasomotor control in the cat. *Neurosci. Lett.* 1991; 132: 47-50.

Shichiri M, Hirata Y. Regulation of cell growth and apoptosis by adrenomedullin. *Hypertens Res.* 2003; 26: S9-14.

Shimekake Y, Nagata K , Ohta S, Kambayashi Y, Teraoka H, Kitamura K, Eto T, Kangawa K, Matsuo H. Adrenomedullin stimulates two signal transduction pathways, cAMP accumulation and Ca(2+) mobilization, in bovine aortic endothelial cells. *J Biol Chem* 1995; 270: 4412-4417.

Shimosawa T, Shibagaki Y, Ishibashi K, Kitamura K, Kangawa K, Kato S, Ando K, Fujita T. Adrenomedullin, an Endogenous Peptide, Counteracts Cardiovascular Damage. *Circulation* 2002; 105: 106-111.



Siekmeier R, Steffen C, März W. Role of oxidants and antioxidants in atherosclerosis: results of *in vitro* and *in vivo* investigations. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 2007;12 (4):265-82.

Silva J, Pastorello M, Arzola J, Zavala L, De Jesús S, Varela M, Matos M, Garrido M, Israel A. AT1 receptor and NAD(P)H oxidase mediate angiotensin II-stimulated antioxidant enzymes and mitogen-activated protein kinase activity in the rat hypothalamus. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2010; 11 (4): 234 – 242.

Silva J, Pastorello M, Matos M, Varela M, De Jesús S, Garrido M, Israel A. Papel del receptor AT1 en la activación de las enzimas antioxidantes por la angiotensina II en el hipotálamo de la rata. *Revista Facultad de Farmacia* 2009; 72 (1): 43 -51.

Smith PM, Ferguson AV. Adrenomedullin acts in the rat paraventricular nucleus to decrease blood pressure. *J Neuroendocrinol.* 2001; 13: 467–471.

Somers MJ, Mavromatis K, Galis ZS, Harrison DG. Vascular superoxide production and vasomotor function in hypertension induced by deoxycorticosterone acetate-salt. *Circulation.* 2000; 101: 1722–1728.

Sone M, Takahashi K, Satoh F, Murakami O, Totsune K, Ohneda M, Sasano H, Ito H, Mouri T. Specific adrenomedullin binding sites in the human brain. *Peptides* 1997; 18 (8): 1125 – 1129.

Song H, Lee T, Jeong J, Min Y, Shin C, Sohn U. Hydrogen peroxide – induced extracellular signal – regulated kinase activation in cultures feline ileal smooth muscle cells. *JPET* 2005; 312 (1): 391 – 398.

Stachniak T, Krukoff T. receptor activity modifying protein 2 distribution in the rat central nervous system and regulation by changes in blood pressure. *J Neuroendocrinol* 2003; 15 (9): 840 – 850.

Steiner A, Parker C, Kipnis D. Radioimmunoassay for cyclic nucleotides. *J Biol Chem* 1972; 247: 1106 – 1113.

Steiner S, Muff R, Gujer R, Fischer JA, Born W. The transmembrane domain of receptor-activity-modifying protein 1 is essential for the functional expression of a calcitonin gene-related peptide receptor. *Biochemistry* 2002; 41:11398–11404.

Stengel D, Guenet L, Desmier M, Insel P, Hanoune J. Forskolin requires more than the catalytic unit to activate adenylate cyclase. *Mol Cell Endocrinol.* 1982; 28 (3): 681–690.

Sugo S, Minamino N, Shoji H, Kangawa K, Kitamura K, Eto T, Matsuo H. Interleukin 1, tumor necrosis factor and lipopolysaccharide additively stimulate production of adrenomedullin in vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 207: 25 – 32.

Sugo S, Minamino N, Shoji H, Kangawa K, Kitamura K, Eto T, Matsuo H. Production and secretion of adrenomedullin from vascular smooth muscle cells. Augmented production by tumor necrosis factor alpha. *Biophys Res Commun* 1994; 203: 719 – 726.

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

Sumners C, Zhu M, Gelband CH, Posner P. Angiotensin II type 1 receptor modulation of neuronal K<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> currents: intracellular mechanisms. *Am J Physiol Cell Physiol* 1996; 271: C154-C163.

Sundaresan M, Yu Z, Ferrans V, Irani K, Finkel T. Requirement for generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for platelet – derived growth factor signal transduction. *Science* 1995; 270: 298 – 301.

Szokodi I, Kinnunen P, Tavi P, Weckstrom M, Toth M, Ruskoaho H. Evidence for cAMP-independent mechanisms mediating the effects of adrenomedullin, a new inotropic peptide. *Circulation* 1998; 97: 1062–1070.

Takahashi H. Adrenomedullin from a pheochromocytoma to the eye: implications of the adrenomedullin research for endocrinology in the 21<sup>st</sup> century. *Tohoku J Exp Med* 2001; 193: 79 – 114.

Takahashi H, Watanabe T, Nishimura M, Nakanishi T, Sakamoto M, Yoshimura Y, Masuda M, Murakani T. Centrally induced vasopressor and sympathetic responses to a novel endogenous peptide, adrenomedullin, in anesthetized rats. *Am J Hypertens* 1994; 7: 478-482.

Takei Y, Inoue K, Ogoshi M, Kawahara T, Bannai H, Miyano S. Identification of novel adrenomedullin in mammals: a potent cardiovascular and renal regulator. *FEBS Lett* 2004; 56: 53 – 58.

Talalay P, Dinkova A, Holtzclaw W. Importance of phase 2 gene regulation in protection against electrophile and reactive oxygen toxicity and carcinogenesis. *Adv Enzyme Regul* 2003; 43: 121 – 134.

Tandon O, Malhotra V, Bhaskar V, Shankar P. Cerebellar control of visceral response – possible mechanisms involved. *Indian J Exp Biol* 2006; 44: 429 – 435.

Taylor M, Samson W. A possible mechanism for the action of adrenomedullin in brain to stimulate stress hormone secretion. *Endocrinology* 2004; 145: 4890 – 4896.

Taylor M, Samson W. Adrenomedullin and central cardiovascular regulation. *Peptides* 2001; 22: 1803 – 1207.

Taylor M, Samson W. Ribozyme compromise of adrenomedullin mRNA reveals a physiological role in the regulation of water intake. *Am J Physiol – Regul Integr C* 2002; 282: R1739–R1745.

Thomas K, Hunt S. The regional distribution of extracellularly regulated kinase-1 and -2 messenger RNA in the adult rat central nervous system. *Neuroscience* 1993; 56: 741 – 757.

Thrasher T. Unloading arterial baroreceptors cause neurogenic hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2002; 282: R1044 – R1053.

Touyz R<sup>A</sup>, Chen X, Tabet F, Yao G, He G, Quinn MT, Pagano PJ, Schiffrin EL. Expression of a functionally active gp91phox-containing neutrophil-type NAD(P)H oxidase in smooth muscle cells from human resistance arteries: regulation by angiotensin II. *Circ Res* 2002; 90: 1205–1213.

Touyz R<sup>B</sup>, Wu XH, He G, Salomon S, Schiffrin EL. Increased angiotensin II-mediated Src signaling via epidermal growth factor receptor transactivation is associated with decreased C-terminal Src kinase activity in vascular smooth

muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 2002; 39: 479–485.

Touyz R, Schiffrin E. Ang II-stimulated generation of reactive oxygen species in human vascular smooth muscle cells is mediated via PLD dependent pathways. *Hypertension* 1999; 34: 976–982.

Touyz R, Schiffrin E. Increased generation of superoxide by angiotensin II in smooth muscle cells from resistance arteries of hypertensive patients role of phospholipase D-dependent, NAD(P)H oxidase-sensitive pathways. *J Hypertens* 2001; 19: 1245–1254.

Touyz R, Tabet F, Schiffrin EL. Redox-dependent signalling by angiotensin II and vascular remodelling in hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2003; 30: 860–866.

Tseng C, Liu H, Lin H, Ger L, Tung C, Yen M. Cardiovascular effects of nitric oxide in the brain stem nuclei of rats. *Hypertension* 1996; 27: 36-42.

Tsuda T, Kawahara K, Ishida Y, Koide M, Shii K, Yokoyama M. Angiotensin II stimulates two myelin basic protein/microtubule-associated protein 2 kinases in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.* 1992; 71: 620–630.

Tsuruda T, Kato J, Hatakeyama K, Masuyama H, Cao YN, Imamura T, Kitamura K, Asada Y, Eto T. Antifibrotic effect of adrenomedullin on coronary adventitia in angiotensin II-induced hypertensive rats. *Cardiovasc Res.* 2005; 65 (4): 921-929.

Tsuruda T, Kato J, Kitamura K, Kuwasako K, Imamura T, Koiwaya Y, Tsuji T, Kangawa K, Eto T. Adrenomedullin: a possible autocrine or paracrine inhibitor of hypertrophy of cardiomyocytes. *Hypertension* 1998; 31: 505–510.

Ueda T, Ugawa S, Saishin Y, Shimada S. Expression of receptor – activity modifying protein (RAMP) mRNAs in the mouse brain. *Mol Brain Res* 2001; 93: 36 – 45.

Uemura T, Kato J, Kuwasako K, Kitamura K, Kangawa K, Eto T. Aldosterone augments adrenomedullin production without stimulating pro adrenomedullin N terminal 20 peptide secretion in vascular smooth muscle cells. *J Hypertens* 2002; 20: 1209 – 1214.

Ueta Y, Hara Y, Kitamura K, Kangawa K, Eto T, Hattori Y, Yamashita H. Action sites of adrenomedullin in the rat brain: functional mapping by Fos expression. *Peptides* 2001; 22: 1817 – 1824.

Ueta Y, Kitamura K, Isse T, Shibuya I, Kabashima N, Yamamoto S, Kangawa K, Matsuo H, Eto T, Yamashita H. Adrenomedullin – immunoreactive neurons in the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat. *Neurosci Lett* 1995; 202: 37 – 40.

Uezono Y, Nakamura E, Ueda Y, Shibuya I, Ueta Y, Yokoo H, Yanagita T, Toyohira Y, Kobayashi H, Yanagihara N, Wada A. Production of cAMP by adrenomedullin in human oligodendroglial cell line KG1C: Comparison with calcitonin gene – related peptide and amylin. *Brain Res. Mol. Brain Res* 2001; 97: 59 – 69.

Uezono Y, Shibuya I, Ueda Y, Tanaka K, Oishi Y, Yanagihara N, Ueno S, Toyohira Y, Nakamura T, Yamashita H, Izumi F. Adrenomedullin increases intracellular Ca<sup>2+</sup> and inositol 1,4,5 – triphosphate in human oligodendroglial cell line KG-1C. *Brain Res* 1998; 786: 230 – 234.

Ushio-Fukai M, Alexander R, Akers M, Griendling K. p38 mitogen – activated protein kinase is a critical component of the redox – sensitive signaling pathways activated by angiotensin II. Role in vascular smooth muscle cell hypertrophy. *J Biol Chem* 1998; 273: 15022 – 15029.

Ushio-Fukai M, Zafari A, Fukui T, Ishizaka N, Griendling K. p22 phox is a critical component of the superoxide – generating NADH/NADPH oxidase system and regulates angiotensin II – induced hypertrophy in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1996; 271: 23317 – 23321.

Vanhoose A, Emery M, Jimenez L, Winder D. ERK Activation by G-protein-coupled Receptors in Mouse Brain Is Receptor Identity-specific. *J Biol Chem* 2002; 277 (11): 9049–9053.

Vargas F, Rivas C, Nursama A, Zoltan T. Reacciones de radicales libres con relevancia biológica en la teoría del envejecimiento. *Avances en Química* 2007; 2 (2): 3 -15.

Verago J, Grassi D, Spadari R. Metabolic markers following beta – adrenoceptor agonist infusion in footshock – stressed rat. *Braz J Med Biol Res* 2001; 34: 1197 – 1207.

Vesely D, Blankenship M, Douglas M, McCormick M, Rodríguez – Paz G, Schocken D. Atrial natriuretic peptide increases adrenomedullin in the circulation of healthy humans. *Life Sci* 1996; 59: 243 – 254.

Viedt C, Soto U, Krieger H, Fei J, Elsing C, Kubler W, Kreuzer J. Differential activation of mitogen – activated protein kinases in smooth muscle cells by angiotensin II: involvement of p22phox and reactive oxygen species. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 940 – 948.

Wang D<sup>A</sup>, 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 D<sup>B</sup>, Sumners C, Posner P, Gelband CH. A-type K<sup>+</sup> current in neurons cultured from neonatal rat hypothalamus and brain stem: modulation by angiotensin II. *J Neurophysiol* 1997; 78: 1021-1029.

Wangensteen R, Quesada A, Sainz J, Duarte J, Vargas F, Osuna A. Role of endothelium-derived relaxing factors in adrenomedullin-induced vasodilation in the rat kidney. *Eur J Pharmacol* 2002; 444: 97–102.

Wehlage S, Smith F. Nitric oxide and angiotensin II regulate cardiovascular homeostasis and the arterial baroreflex control of heart rate in conscious lambs. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2011; 13 (1): 99–106.

Wimalawansa S. Calcitonin gene-related peptide and its receptors: molecular genetics, physiology, pathophysiology, and therapeutic potentials. *Endocr Rev* 1996; 17: 533-585.

Withers D, Coppock H, Seufferlein T, Smith D, Bloom S, Rozengurt E. Adrenomedullin stimulates DNA synthesis and cell proliferation via elevation of cAMP in Swiss 3T3 cells. *FEBS Letters* 1996; 378:83 – 87.

Wong P<sup>A</sup>, Tang F. An ontogenic study of adrenomedullin gene expression in the rat lung, adrenal, kidney, and heart. *Endocrine* 2012 ; 41 (2): 256-265.

Wong P<sup>B</sup>, Cheung T, Cheung B. Adrenomedullin and cardiovascular diseases. *J R Soc Med Cardiovasc Dis* 2012; 1: 14 – 20.

Xu Q, Liu Y, Gorospe M, Udelsman R, Holbrook N. Acute Hypertension Activates Mitogen-activated Protein Kinases in Arterial Wall. *J Clin Invest* 1996; 97 (2): 508–514.

Xu Y<sup>A</sup>, Krukoff T. Adrenomedullin in the rostral ventrolateral medulla increases arterial pressure and heart rate: roles of glutamate and nitric oxide. *Am J Physiol* 2004; 287 R729 – R734.

Xu Y<sup>B</sup>, Krukoff TL. Decrease in arterial pressure induced by adrenomedullin in the hypothalamic paraventricular nucleus is mediated by nitric oxide and GABA. *Regul Pept* 2004; 119 (1-2): 21-30.

Xu Y, Krukoff T. Adrenomedullin in the rostral ventrolateral medulla inhibits baroreflex control of heart rate: a role for protein kinase A. *Br J Pharmacol* 2006; 148: 70 – 77.

Xu Y, Krukoff T. Adrenomedullin stimulates nitric oxide production from primary rat hypothalamic neurons: role of calcium and phosphatases. *Mol Pharmacol* 2007; 72: 112 – 120.

Xu Y, Krukoff T. Adrenomedullin stimulates nitric oxide release from SK-N-SH human neuroblastoma cells by modulating intracellular calcium mobilization. *Endocrinology* 2005; 146:2295–2305

Yamazaki, T., I. Komuro, S. Kudoh, Y. Zou, I. Shiojima, T. Mizuno, H. Takano, Y. Hiroi, K. Ueki, K. Tobe, T. Kadowaki, R. Nagai, and Y. Yazaki. Angiotensin II partly mediates mechanical stress-induced cardiac hypertrophy. *Cir. Res.* 1996; 77:258–265.

Yang B, Ferguson A. Adrenomedullin influences dissociated rat area postrema neurons. *Regul Pept* 2003; 112: 9 – 17.

Yang B, Lipton H, Gumusel B, Hyman A, Mehta JL. Adrenomedullin dilates rat pulmonary artery rings during hypoxia: role of nitric oxide and vasodilator prostaglandins. *J Cardiovasc Pharmacol* 1996; 28: 458–462.

Yano M, Kim S, Izumi Y, Yamanaka S, Iwao H. Differential Activation of Cardiac c-Jun Amino-Terminal Kinase and Extracellular Signal-Regulated Kinase in Angiotensin II–Mediated Hypertension. *Circ Res*. 1998; 83: 752-760.

Yin H, Chao L, Chao J. Adrenomedullin protects against myocardial apoptosis after ischemia/reperfusion through activation of Akt-GSK signaling. *Hypertension* 2004; 43: 109–116.

Yokoi H, Arima H, Murase T, Kondo K, Iwasaki Y, Oiso Y. Intracerebroventricular injection of adrenomedullin inhibits vasopressin release in conscious rats. *Neurosci Lett* 1996; 216: 65 – 67.

Yoshimoto T, Fukai N, Sato R, Sugiyama T, Ozawa N, Shichiri M, Hirata Y. Antioxidant Effect of Adrenomedullin on Angiotensin II-Induced Reactive Oxygen Species Generation in Vascular Smooth Muscle Cells. *Endocrinology* 2004; 145 (7): 3331-3337.

Yoshimoto T, Gochou N, Fukai N, Sugiyama T, Shichiri M, Hirata Y. Adrenomedullin inhibits angiotensin II-induced oxidative stress and gene expression in rat endothelial cells. *Hypertens Res*. 2005; 28 (2): 165-172.

Yoshizumi M, Tsuchiya K and Tamaki T. Signal transduction of reactive oxygen species and mitogen-activated protein kinases in cardiovascular disease. *J Med Invest* 2001; 48: 11-24.

Yurekli M, Esrefoglu M, Dogru M, Dogru A, Gul M, Whidden M. Adrenomedullin reduces antioxidant defense system and enhances kidney tissue damage in cadmium and lead exposed rats. *Environ Toxicol* 2009; 24: 279 – 286.

Zago, A.S.; Zanesco, A. Nitric oxide, cardiovascular disease and physical exercise. *Arq. Bras. Cardiol*. 2006; 87: 264–270.

Zalba G, Beaumont F, San José G y col. Vascular NADH/NADPH oxidase is involved in enhanced superoxide production in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 2000; 35: 1055 – 1061.

Zalba G, San José G, Moreno M, Díaz J. Papel del anión superóxido en la fisiopatología de las enfermedades cardiovasculares. *Nefrología* 2002; 22 (7): 13 – 20.



Zanzinge J. Role of nitric oxide in the neural control of cardiovascular function. *Cardiovas Res* 1999; 43: 639–649.

Zhang F, Jin S, Yi F, Xia M, Dewey W, Li P. Local production of  $O_2^{\cdot-}$  by NAD(P)H Oxidase in the sarcoplasmic reticulum of coronary arterial myocytes: cADPR-Mediated  $Ca_2^+$  regulation *Cell Signal*. 2008; 20 (4): 637–644.

Zhang J<sup>A</sup>, Jin N, Liu Y, and Rhoades RA. Hydrogen peroxide stimulates extracellular signal-regulated protein kinases in pulmonary arterial smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998; 19: 324–332.

Zhang J<sup>B</sup>, Patel K. Effect of nitric oxide within the paraventricular nucleus on renal sympathetic nerve discharge: role of GABA. *Am J Physiol* 1998; 275: R728 – R734.

Zhang K, Mayhan WG, Patel KP. Nitric oxide within the paraventricular nucleus mediates changes in renal sympathetic nerve activity. *Am J Physiol* 1997; 273: R864–R872.

Zhao Y, Bell D, Smith L, Zhao L, Devine A, McHenry E, Nicholls P, McDermott B. Differential expression of components of the cardiomyocyte adrenomedullin / intermedin receptor system following blood pressure reduction in nitric oxide – deficient hypertension. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; 316: 1269 – 1281.

Zicha J, Dobesova Z, Kunes J. Relative deficiency of nitric oxide – dependent vasodilation in salt – hypertensive Dahl rats: the possible role of superoxide anions. *J Hypertens* 2001; 19: 247 – 254.

Zimmerman MC, Lazartigues E, Lang JA. Superoxide mediates the actions of angiotensin II in the central nervous system. *Circ Res* 2002; 91:1038-45

Zimmermann U, Fischer J, Frei K, Fischer A, Reinscheid R, Muff R. Identification of adrenomedullin receptors in cultured rat astrocytes and in neuroblastoma x glioma hybrid cell (NG 108-15). *Brain Res* 1996; 724: 238 - 245.

Zsarnovszky A, Belcher S. Spatial, temporal, and cellular distribution of the activated extracellular signal regulated kinases 1 and 2 in the developing and mature rat cerebellum. *Brain Res Dev Brain Res* 2004; 150: 199 – 209.