

## **El Sistema Óxido Nítrico/GMPc como mecanismo de señalización de las Endotelinas en el Sistema Nervioso**

*Y Mathison<sup>1</sup> y A Israel<sup>2</sup>.*

1. Escuela de Medicina José María Vargas.
2. Facultad de Farmacia, Laboratorio de Neuropeptidos, Universidad Central de Venezuela.

### **RESUMEN**

En el presente trabajo investigamos el mecanismo de señalización mediado por receptores de las endotelinas (ETs), en dos estructuras del sistema nervioso relacionadas con la función neuroendocrina, como son la eminencia media y la médula suprarrenal de la rata. Las tres isoformas de ETs incrementaron la producción de GMPc, en una magnitud similar y dependiente de la concentración. El IRL1620, un agonista selectivo del receptor ET<sub>B</sub>, también incrementó la formación de GMPc en ambas estructuras. El antagonista del receptor ET<sub>B</sub>, BQ-788, inhibió completamente el incremento de GMPc inducido por ET-1 o ET-3. Adicionalmente, la ET-1 estimuló la actividad de la sintetasa del óxido nítrico, tanto en la eminencia media como en la médula suprarrenal. En la médula suprarrenal, el incremento en la producción de GMPc inducido por las ETs o por el IRL fue bloqueado por el análogo de la L-arginina, N-nitro-L-arginina (L-NAME) y por dos inhibidores de la guanililciclasa soluble, el azul de metileno y el ODQ.

Nuestros resultados demuestran que en dos estructuras del sistema nervioso, como la eminencia media y la médula suprarrenal, la estimulación del receptor ET<sub>B</sub> de las endotelinas se encuentra asociada a la activación de la sintetasa del óxido nítrico y al consecuente incremento de la formación de GMPc. Estos hallazgos sugieren un papel funcional de las ETs en estructuras del sistema nervioso mediante la formación de óxido nítrico y la activación de la guanililciclasa soluble.

**Palabras Clave:** Endotelina, Óxido nítrico, GMPc, Receptor ET<sub>B</sub>.

### **ABSTRACT**

We investigated the endothelins (ETs) signaling pathway in two structures of the nervous system related to neuroendocrine control, the median eminence (ME) and adrenal medulla (AM) of the rat. The three isoforms of ETs increased cGMP levels in similar degree and in a concentration-dependent manner. IRL-1620, a selective ET<sub>B</sub> receptor agonist, also increased the cGMP formation in both structures. ET<sub>B</sub> receptor antagonist, BQ-788 significantly inhibited the increase in ET-1 or ET-3-induced cGMP generation. Additionally, ET-1 stimulated nitric oxide synthase activity in the median eminence and adrenal medulla. In the adrenal medulla ETs or

IRL-induced cGMP production was inhibited by L-arginine analogue, L-nitro-arginine-methyl-ester (L-NAME) and by two inhibitors of soluble guanylyl cyclase, methylene blue and ODQ.

Our results demonstrated that in median eminence and adrenal medulla, endothelins stimulate NO-induced cGMP generation through ET<sub>B</sub> receptors, and they support the concept that endothelins could play a physiological role in nervous system through nitric oxide formation and soluble guanylyl cyclase activation.

**Key Words:** Endothelins, Nitric oxide, cGMP, ET<sub>B</sub> Receptor.

## INTRODUCCIÓN

Las endotelinas ETs son una familia de péptidos vasoactivos de 21 aminoácidos. Se han identificado tres isoformas de ETs (ET-1, ET-2 y ET-3) que presentan un perfil farmacológico diferente en cuanto a su actividad presora y vasoconstrictora<sup>(1)</sup>. Adicionalmente a sus efectos vasculares<sup>(2,3)</sup>, las ETs intervienen en la regulación de funciones endocrinas y neuroendocrinas<sup>(4,5)</sup>. En efecto, las ETs estimulan la secreción del péptido natriurético auricular desde los miocitos auriculares de la rata<sup>(6)</sup>, de la vasopresina desde la glándula pituitaria<sup>(7,8)</sup>, la biosíntesis y la liberación de aldosterona desde las células de la zona glomerulosa de la corteza suprarrenal<sup>(9-11)</sup>, inhiben la secreción de prolactina<sup>(12)</sup>, y en la médula suprarrenal se han propuesto como un modulador de la secreción de catecolaminas desde las células cromafines<sup>(13)</sup>.

Se ha descrito la presencia de neuronas que contienen inmunoreactividad para ETs en diferentes estructuras cerebrales, siendo mayor la concentración en áreas hipotalámicas<sup>(14-16)</sup>. Adicionalmente, se ha identificado el ARNm para las ETs en áreas del sistema nervioso central (SNC) y en la glándula pituitaria, así como la presencia de receptores para el péptido<sup>(12,16-18)</sup>. Mediante autorradiografía se ha demostrado la presencia de alta densidad de sitios de unión para ETs en órganos circunventriculares como la eminencia media del hipotálamo, el órgano subfornical y los plexos coroideos<sup>(19)</sup> y en áreas localizadas dentro de la barrera hematoencefálica tales como núcleos talámicos e hipotalámicos, la región lateral ventricular, el globo pallidus y el caudado-putamen<sup>(19)</sup>. Estos hallazgos sugieren un posible papel para la ETs en la regulación de la función neurohormonal.

Se ha demostrado la presencia de ETs y de sus receptores en la glándula suprarrenal de humanos<sup>(20,21)</sup>, de la rata<sup>(22)</sup> y en las células cromafines de bovino<sup>(23)</sup>, así como la presencia de actividad de la enzima convertidora de endotelina (ECE) en la médula suprarrenal de bovino<sup>(24)</sup>. Estos hallazgos, junto con el hecho de que la endotelina radiactiva es liberada rápidamente desde la glándula suprarrenal perfundida<sup>(25)</sup> y la presencia de ARNm e inmunoreactividad para ET en células de feocromocitoma humano<sup>(26)</sup>, sugiere la posibilidad de la existencia de un sistema activo de ETs en la médula suprarrenal de mamíferos.

Las ETs ejercen sus efectos mediante la interacción con al menos dos subtipos de receptores caracterizados bioquímicamente, para los cuales han sido clonados sus ADNc<sup>(27-29)</sup>. Estos subtipos de receptores han sido clasificados de acuerdo a su especificidad por ligandos: el receptor ET<sub>A</sub> presenta mayor afinidad por ET-1=ET-2 que por ET-3, mientras que el receptor

ET<sub>B</sub> presenta la misma afinidad por todas las isoformas<sup>(28-30)</sup>. Ambos subtipos de receptores están distribuidos en los diferentes tejidos, de manera similar a la distribución de los isopéptidos<sup>(22)</sup>. En la glándula suprarrenal, se ha demostrado la presencia de los dos subtipos de receptores y mediante técnicas inmunohistoquímicas y autorradiográficas se ha encontrado en la médula suprarrenal de bovino y de la rata, un predominio del receptor ET<sub>A</sub>, junto con una pequeña proporción de ET<sub>B</sub><sup>(22,31)</sup>. Recientemente Yamamoto y col.<sup>(8)</sup>, han demostrado en la región lateral y posterior de la EM la presencia de inmunorreactividad para el receptor ET<sub>B</sub> de las endotelinas colocalizados con fibras que presentan inmunorreactividad para LHRH(hormona luteinizante) y oxitocina. Las diferencias funcionales entre los subtipos de receptores en la EM y en la médula suprarrenal intacta, y los mecanismos de señalización acoplados a cada uno de ellos, no han sido estudiados hasta el momento.

La interacción de las ETs con sus receptores puede activar varios sistemas de señalización tales como activación de la fosfolipasa C, de la fosfolipasa A2 y de la adenililciclase, con la producción de moléculas de segundos mensajeros que incluyen el trifosfato de inositol, el diacilglicerol, el ácido araquidónico y el AMPc<sup>(32)</sup>. Asimismo, las ETs han sido implicadas en la regulación de canales de calcio, tanto dependientes de voltaje, como operados por receptor, y en la modulación de intercambiadores Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup><sup>(32)</sup>.

Los mecanismos de transducción de señales de las ETs en el SNC no están totalmente esclarecidos. Se ha reportado que las ETs incrementan el Ca<sup>+2</sup> intracelular en cultivos celulares de astrocitos y en células C6 de glioma<sup>(2,33)</sup>, este incremento está asociado a la estimulación de la hidrólisis del fosfatidilinositol<sup>(34)</sup>.

Además de los mecanismos conocidos, recientemente se ha demostrado que las ETs pueden activar mecanismos de señalización mediados por el GMPc en diferentes tejidos. Así, se ha demostrado que las ETs incrementan la producción de GMPc en células epiteliales de riñón de porcino, LLC-PK1, y en el glomérulo y la aorta de la rata<sup>(35-37)</sup>. Sin embargo, la capacidad de las ETs de generar nucleótidos cíclicos en estructuras nerviosas como la médula suprarrenal o la EM no ha sido evaluada.

En algunos tejidos, se ha demostrado que el incremento de GMPc inducido por las ETs, es mediado por el óxido nítrico (ON)<sup>(37)</sup>. Está bien establecido, que el ON puede ser sintetizado a partir de la L-arginina, en las células de los mamíferos y actuar como mecanismo de señalización intracelular en diferentes tejidos, tanto periféricos como centrales. Se ha reportado la presencia de actividad de la sintetasa del óxido nítrico (SON) en la EM de la rata<sup>(38)</sup>, así como también existe evidencia de la presencia de SON en haces y las varicosidades de las células que almacenan noradrenalina en la médula suprarrenal<sup>(39)</sup>. Esto sugiere, que las ETs podrían estimular la producción de ON/GMPc a través de un mecanismo mediado por receptores.

Para evaluar esta posibilidad, determinamos la capacidad de las ETs para estimular la actividad de la SON e incrementar la producción de GMPc en dos áreas del sistema nervioso que contienen alta densidad de sitios de unión para estos péptidos, como son la EM y la médula suprarrenal de la rata. Adicionalmente investigamos los posibles mecanismos moleculares

involucrados, incluyendo la determinación del subtipo de receptor de ETs responsable de la generación de GMPc.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La actividad de la guanililciclase y la actividad de la sintetasa del óxido nítrico fueron determinadas como se describió previamente<sup>(40,41)</sup>. Ratas Sprague-Dawley de 180-220 g, mantenidas con períodos alternos de luz y oscuridad, con libre acceso al agua y comida, fueron sacrificadas mediante decapitación entre las 09:00 y 10:00 horas. La médula suprarrenal y la eminencia media, fueron extraídas inmediatamente, mediante microdissección bajo control estereomicroscópico y mantenidas en buffer Krebs-Ringer (KBR; conteniendo en mM: NaCl 125; KCl 3,5; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,25; MgSO<sub>4</sub> 1,20; CaCl<sub>2</sub> 0,75; NaHCO<sub>3</sub> 25; glucosa 10 y teofilina 1,6) gaseado con 95% O<sub>2</sub> : 5% CO<sub>2</sub>.

Para el ensayo de la activación de la guanililciclase cada EM o médula suprarrenal enteras, fueron transferidas individualmente a tubos Eppendorf de 1,5 ml conteniendo 180 µl de buffer KBR, sometándose a preincubación durante 10 min. a 37°C, en presencia o ausencia de los correspondientes antagonistas. La reacción se inició con el agregado de los agonistas (20 µl), o buffer para los controles, al medio de incubación seguidos de 10 minutos adicionales de incubación. La reacción fue detenida agregando 20 µl 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. Se tomó una alícuota de 100 µl para la determinación del GMPc. La cantidad de GMPc formado se determinó mediante radioinmunoensayo<sup>(42)</sup> utilizando un kit comercial suministrado por Amersham Corp. La actividad guanililciclase se reporta como pmoles de GMPc formados/10 min/mg de proteínas.

La actividad de la sintetasa del óxido nítrico (SON) fue determinada mediante la cuantificación de la conversión de arginina radiomarcada a citrulina, utilizando una modificación del método descrito por Bredt y Snyder<sup>(41,43)</sup>.

Los tejidos fueron mantenidos en buffer Hepes 50 mM, pH 7,1 + EDTA 1 mM. Posteriormente cada muestra fue preincubada por 30 minutos a 37°C en buffer Hepes 50 mM, pH 7,1 conteniendo ditiotreitol 1mM, b-NADPH 0,5 mM; CaCl<sub>2</sub>1,25 mM y 10 µg/ml de calmodulina, <sup>3</sup>Harginina 0,12µM y Arginina 0,3 µM, seguido de un período de incubación de 10 minutos. Para determinar la estimulación de la actividad de la SON los agonistas fueron agregados al iniciar los 10 minutos de incubación, y los antagonistas cuando fuera el caso en el período de preincubación. La reacción fue detenida agregando buffer Hepes 20 mM, pH 5,5; EDTA 4 mM, frío y calentando durante 5 min a 90°C. Los tejidos fueron sometidos a sonicación, centrifugados a 12.000 rpm durante cuatro minutos y el sobrenadante pasado a través de una columna de Dowex 50, forma Na<sup>+</sup> (Bio Rad), desde donde fue eluido con 2 ml de agua. La <sup>3</sup>H-citrulina formada fue cuantificada mediante espectroscopia de centelleo líquido.

En ambos casos, las proteínas tisulares fueron determinadas por el método de Lowry y col. (1951), utilizando albúmina sérica de bovino como patrón<sup>(44)</sup>.

El análisis estadístico de los datos se realizó mediante el análisis de varianza de una vía (ANOVA) y la prueba de “t” de Student, utilizando el programa InStat2. Los resultados se expresan como las medias  $\pm$  E.S.M.

## **RESULTADOS**

### **Efectos de las endotelinas sobre la generación de GMPc en la eminencia media y en la médula suprarrenal de la rata**

En la EM todas las isoformas de endotelinas (ET-1, ET-2 y ET-3) ( $2 \times 10^{-7}$  M) estimulan la generación de GMPc en magnitud similar (98%, 95% y 53%) ([Figura 1A](#)). De igual manera en la [figura 1B](#) se muestra la estimulación en la producción de GMPc inducida por las ETs ( $2 \times 10^{-7}$  M) en la médula suprarrenal de la rata, siendo los incrementos de ET-1 = 51%, ET-2 = 71,2% y ET-3 = 44%. Adicionalmente, el agonista selectivo del receptor ET<sub>B</sub>, el IRL-1620 ( $2 \times 10^{-7}$  M), incrementa la producción de GMPc en ambas estructuras, siendo este incremento de 64% en la EM y de 101,3% en la médula suprarrenal ([Figura 1A](#) y [1B](#)).

La estimulación de la producción de GMPc inducida por las ETs es dependiente de la dosis. En efecto, en la figura 2 se muestra la dependencia de la dosis para dos concentraciones ( $2 \times 10^{-7}$  M y  $10^{-6}$  M) de ET-3 en la EM ([figura 2B](#)) y la médula suprarrenal ([figura 2A](#)) de la rata (N=5-16 por grupo).

### **Efecto del antagonista del receptor ET<sub>B</sub>, BQ-788, sobre la producción de GMPc estimulada por las endotelinas, en la eminencia media y en la médula suprarrenal de la rata**

El BQ-788, un antagonista específico del receptor ET<sub>B</sub>, fue utilizado para determinar la participación de este subtipo de receptor en el efecto de las ETs sobre la producción de GMPc en la eminencia media y en la médula suprarrenal de la rata. La preincubación durante 10 minutos con BQ-788 ( $10^{-5}$  M) bloquea el incremento en la producción de GMPc inducida por la ET-1 y la ET-3, tanto en la EM ([figura 3A](#)) como en la médula suprarrenal de la rata ([figura 3B](#)) (N=5-20 por grupo).

### **Efectos de las endotelinas sobre la activación de la sintetasa del óxido nítrico en la eminencia media y en la médula suprarrenal de la rata**

Al evaluar la producción de citrulina radiomarcada como índice de estimulación de la actividad de la enzima sintetasa de óxido nítrico se observa que la ET-1 ( $2 \times 10^{-6}$  M) estimula la actividad de la SON, tanto en la EM como en la MSR de la rata (EM=31,1%; MSR= 45%). Igualmente se observó que en la EM, el IRL 1620, a dosis equimolares, estimula la actividad de la SON de manera similar a la ET-1 (39,4%) ([Figura 4](#)).

### **Efectos del análogo de la L-arginina, L-NAME, sobre la producción de GMPc inducida por las endotelinas y el IRL 1620 en la médula suprarrenal de la rata**

Para ratificar la participación de la vía del óxido nítrico en la generación de GMPc inducida por las ETs o el IRL 1620, utilizamos L-NAME, un análogo de la L-arginina y conocido inhibidor específico de la síntesis de ON. La médula suprarrenal intacta fue incubada en presencia de L-NAME, durante 10 min. antes de añadir las ETs o el IRL 1620 (N= 5-12 por grupo). El L-NAME ( $10^{-5}$  M) produjo una inhibición significativa de la producción de GMPc inducida por las ETs y el IRL 1620 en la médula suprarrenal de la rata ([Figura 5](#)).

### **Efecto de los inhibidores de la guanilciclase soluble sobre la producción de GMPc inducida por los agonistas, en la médula suprarrenal de la rata**

Para determinar si la guanilciclase soluble está involucrada en la estimulación de la producción de GMPc inducida por las ETs, se agregó azul de metileno al medio de incubación. Como se observa en la [Figura 6](#), el azul de metileno ( $10^{-6}$  M) inhibió significativamente la producción de GMPc inducida por la ET-1 y el IRL-1620 (N = 7-12 por grupo). Recientemente se ha descrito la existencia de un nuevo inhibidor que actúa selectivamente a nivel del “receptor” fisiológico para el NO, el 1H-[1,2,4]oxadiazol[4,3-a]quinoxalin-1-ona (ODQ), el cual ha sido utilizado para establecer la participación de la actividad guanilciclase estimulada por el ON<sup>(45)</sup>. Los tejidos fueron preincubados con ODQ ( $10^{-6}$  M) durante 30 min. observándose que este compuesto produjo una inhibición de la producción de GMPc inducida por la ET-1 y el IRL-1620 de manera similar a la observada con el azul de metileno (datos no mostrados).

***[Figura 1:](#) Producción de GMPc inducida por las endotelinas o el IRL-1620 en la eminencia media (panel A) y en la médula suprarrenal (panel B) de la rata.***

*Los datos representan las medias  $\pm$  ESM; N=5-18. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  comparado con el valor basal.*

***[Figura 2:](#) Dependencia de la dosis del efecto de la ET-3 sobre la producción de GMPc en la médula suprarrenal (panel A) y en la eminencia media (panel B) de la rata.***

*Los datos representan las medias  $\pm$  ESM; N=5-16. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  comparado con el valor basal.*

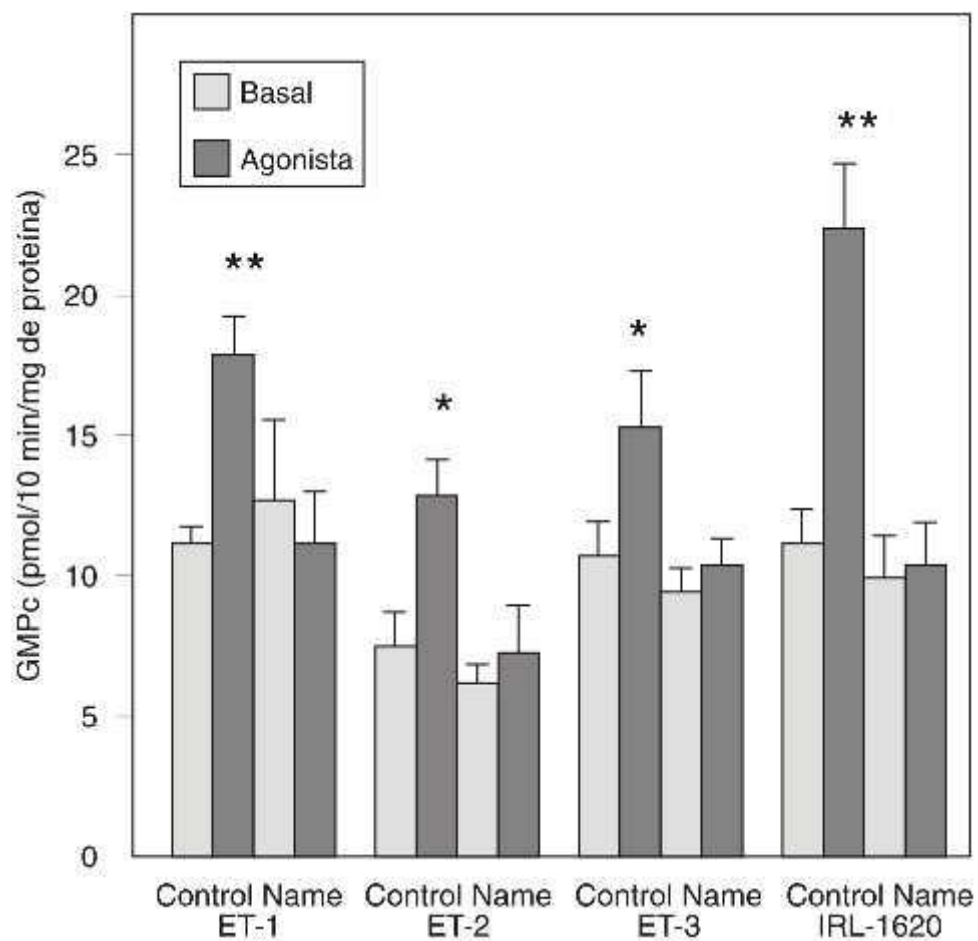
***[Figura 3:](#) Efecto del antagonista del receptor ETB BQ-788, sobre la producción de GMPc estimulada por la ET-1 o la ET-3, en la eminencia media (panel A) y en la médula suprarrenal (panel B) de la rata. BQ-788 ( $10^{-5}$  M), E-T1 y ET-3 ( $2 \times 10^{-7}$  M).***

Los resultados representan las medias  $\pm$  ESM; N=5-20. \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01 comparado con el basal.

**Figura 4:** Efecto de la ET-1 sobre la actividad de la sintetasa del óxido nítrico, en la eminencia media (panel izquierdo) y en la médula suprarrenal (panel derecho) de la rata.

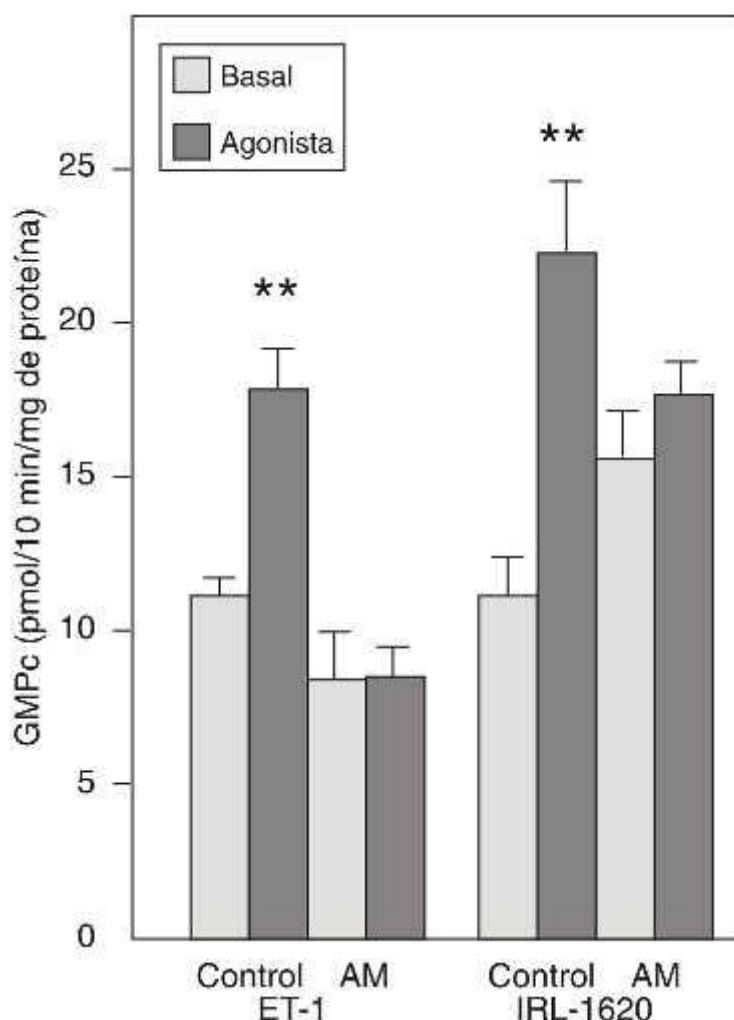
Los resultados representan las medias  $\pm$  ESM; N=5-10. \* $p$ <0.05.

**Figura 5:** Efecto del análogo de la L-arginine, L-NAME, sobre la producción de GMPc inducida por ETs o IRL-1620 en la médula suprarrenal de la rata. L-NAME (10-5 M); ETs y IRL-1620 (2 x 10-7 M)



Los resultados se presentan como las medias  $\pm$  ESM, N= 5-12. \* $p$ <0.05; \*\* $p$ <0.01 comparado con el valor basal.

**Figura 6: Efecto del inhibidor de la guanililciclase soluble; el azul de metileno (AM), sobre la producción de GMPc inducido por la ET-1 en la médula suprarrenal de la rata. Azul de metileno (10-5 M), ET-1 y IRL-1620 (2 x 10-7 M)**



Los resultados representan las medias  $\pm$  ESM, N= 7-12. \*\*\* $p < 0.01$  comparado con el basal.

## DISCUSIÓN

Numerosas hormonas y neurotransmisores estimulan la síntesis de GMPc en diferentes células y tejidos<sup>(46)</sup>. Se ha reportado que las ETs pueden activar mecanismos de señalización mediados por GMPc en preparaciones tales como, las células epiteliales de riñón de porcino<sup>(35)</sup>, en cultivos de células endoteliales de bovino<sup>(47)</sup>, en la aorta de rata<sup>(36,48)</sup> y en glomérulos intactos de rata<sup>(49)</sup>.

Nuestros resultados muestran que en la eminencia media y en la glándula suprarrenal de la rata las ETs incrementan, en forma dependiente de la concentración, la producción de GMPc. Esta observación indica que en estas estructuras las ETs ejercen sus efectos mediante la



activación de receptores acoplados a sistemas de segundos mensajeros que involucran la producción de GMPc y sugiere una acción directa del péptido en estructuras nerviosas. Esto concuerda con reportes previos de incremento en la producción de GMPc inducidos por la ET-1 en células híbridas de glioma de rata y neuroblastoma de ratón<sup>(50)</sup>.

La existencia de al menos dos subtipos de receptores para las ETs<sup>(24,27,51)</sup> y el hecho de que la interacción de estos péptidos con sus receptores puede activar diversos sistemas de señalización<sup>(32)</sup>, sugiere que la activación de un subtipo específico de receptor podría estar asociada a la activación de un sistema de señalización determinado. Los efectos de las ETs sobre la generación de GMPc en la EM y la médula suprarrenal, son mediados por el receptor ET<sub>B</sub>, como lo demuestra el hecho que el agonista del receptor ET<sub>B</sub> (IRL-1620) estimula la producción de GMPc de manera similar a las ETs, mientras que el antagonista específico del receptor ET<sub>B</sub> (BQ-788) bloquea el efecto de estimulación inducidos por la ET-1 y la ET-3. Adicionalmente, nuestros resultados muestran que las tres isoformas de ETs estimulan la formación de GMPc en la misma proporción, lo que concuerda con el hecho de que los tres isopéptidos han mostrado la misma afinidad por el receptor ET<sub>B</sub> en células transfectadas<sup>(29)</sup>.

La presencia de inmunorreactividad para las ETs en áreas localizadas dentro de la barrera hematoencefálica como las neuronas magnocelulares del hipotálamo, las cuales se saben que proyectan a la eminencia media y a la neurohipófisis conjuntamente con nuestros resultados de la producción de GMPc mediado por receptor, sugieren un papel regulador potencial del péptido sobre la secreción de la hipófisis anterior. Así, se ha demostrado un efecto inhibitorio de las ETs sobre la secreción de prolactina, y un efecto estimulante de la secreción de hormona luteinizante y de la hormona del crecimiento en cultivos celulares. Estos hallazgos indican un posible papel de las ETs en el control de la función hipofisiaria en la rata<sup>(12,52-53)</sup>.

La presencia de receptores para las ETs acoplados a la producción de GMPc en la médula suprarrenal sugiere la participación del péptido en la regulación de la función de esta estructura. Las ETs podrían modular la vasodilatación e incrementar el flujo suprarrenal durante la actividad secretoria de la glándula. La cercana asociación de los plexos de fibras varicosas que contienen inmunorreactividad para la sintetasa de óxido nítrico (SON) con elementos celulares de la glándula<sup>(39)</sup>, conjuntamente con la presencia de receptores ET<sub>B</sub><sup>(22,31)</sup>, indica un posible papel del receptor ET<sub>B</sub> en la regulación de la función celular mediante la generación de GMPc, la cual podría estar mediada por el óxido nítrico. Nuestros resultados soportan esta posibilidad, ya que el incremento en la producción de GMPc inducido por las endotelinas es revertido por el inhibidor de la sintetasa del óxido nítrico, el L-NAME y por los inhibidores de la guanililciclase soluble, ODQ y azul de metileno.

La secreción de catecolaminas desde la médula suprarrenal es mediada por mecanismos colinérgicos y no-colinérgicos<sup>(54)</sup>. Mientras el componente colinérgico proviene de las fibras nerviosas preganglionares de la médula espinal, se ha sugerido que el mecanismo no-colinérgico está relacionado con fibras peptidérgicas localizadas en la glándula<sup>(55)</sup>. Las células cromafines no solo responden a los componentes colinérgicos y no-colinérgicos de los nervios esplácnicos, sino también a factores que pueden ser producidos de manera proximal (efectores autocrinos o

paracrinos) o distal (hormonas o factores “tróficos”) a las células cromafines *in vivo*. En este sentido, las ETs podrían ser liberadas desde las células cromafines o elementos cercanos a ellas y ejercer un efecto modulador tónico. Es posible que las ETs, mediante la generación de ON/GMPc, constituya un sistema de transmisión adicional involucrado en la síntesis y secreción de catecolaminas desde la glándula suprarrenal. Esta teoría se soporta por el hecho de que el GMPc activa la tirosina hidroxilasa, que es la enzima que cataliza el paso limitante en la síntesis de catecolaminas. Así, se ha reportado que los derivados de GMPc y la proteína quinasa dependiente de GMPc fosforilan y activan la tirosina hidroxilasa en células PC12<sup>(56)</sup> y el GMPc activa la tirosina hidroxilasa en células de médula suprarrenal de bovino permeabilizadas con digitonina<sup>(57)</sup>. Adicionalmente, estudios previos han demostrado que las ETs estimulan la liberación de norepinefrina y epinefrina en cultivos de células cromafines de bovino<sup>(58)</sup>. Aún más, se ha demostrado que el ON produce un incremento de la secreción de CA en cultivo de células cromafines de bovino, el cual es dependiente de la concentración de ON y se correlaciona de manera significativa con el incremento en la producción de GMPc en la misma preparación<sup>(59)</sup>. Todas estas observaciones sugieren que las endotelinas podrían actuar como una hormona paracrina en la médula suprarrenal.

Al respecto, Belloni y col.<sup>(31)</sup> han demostrado que tanto las ETs y el agonista específico del receptor ET<sub>B</sub>, BQ 3020, producen liberación de catecolaminas (CAs) desde fragmentos de médula suprarrenal de la rata. Debido al hecho de que el incremento en la producción de CAs inducido por la ET-1 es revertido parcialmente por el BQ 123 (antagonista ET<sub>A</sub>) y/o el BQ 788, se ha sugerido que tanto el receptor ET<sub>A</sub> como el receptor ET<sub>B</sub> participan de este efecto. Nuestros resultados, junto con los hallazgos anteriores permiten sugerir que la activación del receptor ET<sub>B</sub> y el subsecuente incremento de ON/GMPc, constituye un mecanismo fisiológico relevante en la regulación de la secreción de las CAs en la médula suprarrenal.

## **AGRADECIMIENTOS**

Los autores agradecen a María Silva y Olga Milena Torres por la asistencia técnica y a la Dirección de Investigación de la Facultad de Medicina y al CDCH (proyecto: 09-11-3335-94) de la Universidad Central de Venezuela, por el financiamiento otorgado.

## **REFERENCIAS BIBLOGRÁFICAS**

1. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T: A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature (London)* 1988; 332: 411-415.
2. Greenberg DA, Chan J, Sampson HA: Endothelins and the nervous system. *Neurology*. 1992; 42: 25-31.
3. Lovenberg W, Miller RC: Endothelin: a review of its effects and possible mechanisms of action. *Neurochem. Res.* 1990; 15: 407-417.

4. Miller RC, Pelton JT, Huggins JP: Endothelins from receptors to medicine. Trends Pharmacol. Sci. 1993; 14: 54-60.
5. Stojilkovic SS, Catt KJ: Neuroendocrine actions of endothelins. Trends Pharmacol. Sci. 1992; 13: 385-391.
6. Gotees K, Wang B, Madwed J, Zhu J, Leadley R: Cardiovascular, renal and endocrine response to intravenous endothelin in conscious dogs. Am J. Physiol 1998; 255: R1064-R1068.
7. Rosi N: Effect of endothelin-3 on vasopressin release *in vitro* and water excretion *in vivo* in Long-Evans rats. J Physiol 1993; 461: 501-551.
8. Yamamoto T, Suzuki H, Uemura H: Endothelin B receptor like immunoreactivity is associated with LHRH-immunoreactive fibers in the rat hypothalamus. Neuroscience Letters 1997; 223: 117-120.
9. Pecci A, Gomez-Sanchez CE, Bedners MEO, Lantos CP, Cozza EN: In vivo stimulation of aldosterone biosynthesis by endothelin: loci of action and effects of doses and infusion rate. J. Steroid Biochem. Molec. Biol. 1993; 45: 555-561.
10. Zeng Z, Naruse M, Guan B, Naruse K, Sun M, Zang M, Demura H, Shi Y: Endothelin stimulates aldosterone secretion *in vitro* from normal adrenocortical tissue, but not adenoma tissue, in primary aldosteronism. J. Clin. Endocrinol. Metab. 1992; 74: 874-878.
11. Belloni A, Rossi G, Andreis P, Neri G, Albertin G, Pessina A, Nusdoffer G: Endothelin adrenocortical secretagogue effect is mediated by the B receptor in rats. Hypertension 1996; 27: 1153-1159.
12. Samson W, Skala C: Comparison of the pituitary effects of the mammalian endothelins: vasoactive intestinal contractor (endothelin-b, rat endothelin-2) is a potent inhibitor of prolactin secretion. Endocrinology 1992; 130: 2964-2970.
13. Yamaguchi N: Inhibition by nifedipine of endothelin-induced adrenal catecholamine secretion in anesthetized dogs. Can. J. Physiol. Pharmacol. 1993; 71: 301-305.
14. Matsumoto H, Suzuki N, Onda H, Fujino M. Abundance of endothelin-3 in rat intestine, pituitary gland and brain. Biochem. Biophys. Res. Commun 1989; 164: 74-80.
15. Yoshimi H, Hirata Y, Fukuda Y, Kawano Y, Emori T, Kuramochi M, Omae T, Marumo F. Regional distribution of immunoreactive endothelin in rats. Peptides 1989; 10:805-808.
16. Lee M, de la Monte S, Bloch K, Quertermous T. Expression of the potent vasoconstrictor endothelin in the human central nervous system. J. Clin. Invest 1990; 86: 141-147.

17. MacCumber M, Ross C, Glaser B, Snyder S. Endothelin: Visualization of mRNA by in situ hybridization provides evidence for local action. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1990; 86: 7285-7289.
18. Takahashi K, Ghatei M, Jones P, Murphy J, Lam H, O'Halloran A, Bloom S: Endothelin in human brain and pituitary gland: presence of immunoreactive endothelin, endothelin messenger ribonucleic acid, and endothelin receptor. *J Clin. Endocrinol. Metab* 1991; 72: 693-699.
19. Koseki Ch, Imai M, Hirata Y, Yanagisawa M, Masaki T. Autoradiographic distribution in rat tissues of binding sites for endothelin: A neuropeptide. *Am. J. Physiol.* 1989; 256: R858-R866.
20. Imai T, Hirata Y, Eguchi S, Kanno Y, Ohta K, Emori T, Sakamoto A, Yanagisawa M, Masaki T, Marumo F. Concomitant expression of receptor subtype and isopeptide of endothelin by human adrenal gland. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1992; 182: 1115-1121.
21. Nuñez DJR, Brown MJ, Davenport AP, Neylon CB, Schofield JP, Wyse RK. Endothelin1 mRNA is widely expressed in porcine and human tissue. *J. Clin. Invest.* 1990; 85: 1537-1541.
22. Hagiwara H, Nagasawa T, Yamamoto T, Mahmud Lodhi K, Ito T, Takemura N, Hirose S. Immunochemical characterization and localization of endothelin ET<sub>B</sub> receptor. *Am. J. Physiol.* 1993; 264: R777-R783.
23. Wilkes LC, Boarder MR. Characterization of the endothelin binding site on bovine adrenomedullary chromaffin cells: comparison with vascular smooth muscle cells. Evidence for receptor heterogeneity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1991; 256: 628-633.
24. Masaki T. Purification and characterization of putative endothelin converting enzyme in bovine adrenal medulla: evidence for a cathepsin D-like enzyme. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1990; 168: 1230-1236.
25. Cameron L, Kapas S, Hinson JP. Endothelin-1 release from the isolated perfused rat adrenal gland is elevated acutely in response to increasing flow rates and ACTH(124). *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1994; 202: 873-879.
26. Amico JA, Clarke MR, Watson CG, Kim NB, Bononi PL, Crowley RS, Horwitz MJ. Endothelin-1 gene expression in human pheochromocytoma. *J. Lab. Clin. Med.* 1993; 122: 667-672.
27. Arai H, Hori S, Aramori I, Ohkubo H, Nakanishi S. Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature (London)* 1990; 348: 730-732.

28. Bard KF, Munger KA, Sugiura M, Snajdar RM, Schwartzberg M, Inagami T. High and low affinity binding sites for endothelin on cultured rat glomerular mesangial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1989; 178: 656-663.
29. Sakurai T, Yanagisawa M, Takuwa Y, Miyazaki H, Kimura S, Goto K, Masaki T. Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor. *Nature* 1990; 348: 732-735.
30. Masaki T, Vane J, Vanhoutte P. International Union of Pharmacology Nomenclature of endothelin receptors. *Pharmacological Review* 1994; 46: 137-142.
31. Belloni A, Galindo Y, Markowska A, Andreis P, Meneghelli V, Malendowicz L, Nussdofe G: Distribution and functional significance of the endothelin receptor subtypes in the rat adrenal gland. *Cell Tissue Res* 1997; 288:345-352.
32. Simonson M, Dunn M. Cellular signaling by peptides of the endothelins gene family. *FASEB J.* 1990; 4: 2989-3000.
33. Supattapone S, Simpson A, Ashley C. Free calcium rise and mitogenesis in glial cells caused by endothelin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1989; 165: 1115-1122.
34. Lin W, Lee C, Chuang D. Comparative studies of phosphoinositide hydrolysis induced by endothelin-related peptides in cultured cerebellar astrocytes, C6 glioma and cerebellar granule cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1990; 168: 512-519.
35. Ishii K, Warner TD, Sheng H, Murad F. Endothelin increases cyclic GMP levels in LLC-PK1 porcine kidney epithelial cells via formation of an endothelium-derived relaxing factor-like substance. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1991; 259: 1102-1108.
36. Fujitani Y, Ueda H, Okada T, Urade Y, Karaki H. A selective agonist of endothelin type B receptor, IRL-1620, stimulates cyclic GMP increase via nitric oxide formation in rat aorta. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1993; 267: 683-689.
37. Owada A, Tomita K, Terada Y, Sakamoto H, Nonoguchi H, Marumo F. Endothelin (ET)-3-stimulates cyclic guanosine 3',5'-monophosphate production via ET<sub>B</sub> receptor by producing nitric oxide in isolated rat glomerulus, and in cultured rat mesangial cells. *J. Clin. Invest.* 1994; 93: 556-563.
38. Kawakami S, Ichikawa M, Yokosuda M, Tsukamura H y Maeda K. Glial and neuronal localization of neuronal nitric oxide synthase immunoreactivity in the median eminence of female rats. *Brain Research* 1998; 789: 322-326.
39. Afework M, Tomlinson A, Belai A, Burnstock G. Colocalization of nitric oxide synthase and NADPH-diaphorase in rat adrenal gland. *Neuro Report* 1992; 3: 893-896.

40. Mathison Y e Israel A. Endothelin ET<sub>B</sub> receptor subtype mediates nitric oxide/cGMP formation in rat adrenal medulla. *Brain Res Bull* 1998; 45(1): 15-19.
41. Mathison Y e Israel A. Las endotelinas activan la formación de óxido nítrico/GMPc en la médula suprarrenal de la rata. *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica* 2001; 20(S1): S38-S43.
42. Steiner A, Parker C, Kipnis DM. Radioimmunoassay for cyclic nucleotides. *J. Biol. Chem.* 1972; 247: 1106-1113.
43. Bredt DS and Snyder SH. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1990; 87(2): 682-685.
44. Lowry O, Rosebrough N, Farr A, Randall R. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951; 193: 265-275.
45. Garthwaite J, Southam E, Boulton CL, Nielsen E, Schmidt K and Mayer B. Pent and selective inhibition of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase by 1H-[1,2,4]oxadiazol[4,3-a]quinoxalin-1-one. *Mol. Pharmacol.* 1995; 48: 184-188.
46. Garbers DL. Guanylate cyclase, a cell surface receptor. *J. Biol. Chem.* 1989; 264: 9102-9106.
47. Hirata Y, Emori T, Eguchi S, Kanno K, Imai T, Ohta K, Marumo F. Endothelin receptor subtype B mediates synthesis of nitric oxide by cultured bovine endothelial cells. *J. Clin Invest.* 1993; 91: 1367-1373.
48. Moritoki H, Miyano H, Takeuchi S, Yamaguchi M, Hisayama T, Kondo W. Endothelin-3-induced relaxation of rat thoracic aorta: a role for nitric oxide formation. *Br. J. Pharmacol.* 1993; 108: 1125-1130.
49. Edwards RM, Pullen M, Nambi P. Activation of endothelin ET<sub>B</sub> receptors increases glomerular cGMP via an L-arginine-dependent pathway. *Am. J. Physiol.* 1992; 263: F1020-F1025.
50. Reiser G. Endothelin and Ca<sup>2+</sup> ionophore raise cyclic GMP levels in a neuronal cell line via formation of nitric oxide. *Br. J. Pharmacol.* 1990; 101: 722-726.
51. Gandhi C, Berkowitz D, Watkins D. Endothelins: Biochemistry and pathophysiologic actions. *Anesthesiology* 1994; 80: 892-905.
52. Samson W, Skala C, Alexander B, Huang S. Possible neuroendocrine actions of endothelin-3. *Endocrinology* 1991; 128: 1465-1473.

53. Samson W. The endothelin-A receptor subtype transduce the effects of the endothelin in the anterior pituitary gland. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1992; 187(2): 590-595.
54. Malhotra R, Wakade A. Non-cholinergic component of rat splanchnic nerves predominates at low neuronal activity and is eliminated by naloxone. *J. Physiol.* 1987; 383: 639-652.
55. Livett B, Marley P, Wan D, Zhou X. Peptide regulation of adrenal medullary function. *J. Neural. Trans* 1990; 29(Suppl): 77-89.
56. Rokoski R, Rokoski L. Activation of tyrosine hydroxylase in PC12 cells by the cyclic GMP and cyclic AMP second messenger system. *J Neurochem.* 1987; 48: 236-242.
57. Yanagihara N, Okazaki M, Terao T, Uezono Y, Wada A, Izumi F. Stimulatory effects of brain natriuretic peptide on cyclic GMP accumulation and tyrosine hydroxylase activity in cultured bovine adrenal medullary cells. *Naunyn-Schmiedeberger's Arch. Pharmacol.* 1991; 343: 289-295.
58. Boarder M and Marriot D. Characterization of endothelin-1 stimulation of catecholamines release from adrenal chromaffin cells. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1989; 13: S223-S224.
59. Oset-Gasque M, Paramón M, Hortelano S, Boscá L and González MP. Nitric oxide implications in the control of neurosecretion by chromaffin cells. *Journal of neurochemistry* 1994; 63: 1693-1700.