

Antagonismo entre la angiotensina II y el péptido natriurético auricular en la generación del GMPc en la oliva inferior de la rata

Angiotensin II and atrial natriuretic peptide antagonism in the cGMP generation in rat inferior olive

MARÍA DEL ROSARIO GARRIDO* y ANITA ISRAEL

Resumen

La angiotensina II (ANG II) y el péptido natriurético auricular (PNA) son péptidos vasoactivos con acciones biológicas ampliamente conocidas y otras emergentes, como son el control del crecimiento y la diferenciación neuronal. Estos dos sistemas peptidérgicos son antagonistas fisiológicos y se postula que su interacción puede ocurrir a nivel de las vías de señalización intracelular. Se ha propuesto la participación de mecanismos de fosforilación y desfosforilación en dicho antagonismo. En el presente trabajo evaluamos las acciones que ejercen la ANG II y el CGP 41221A (CGP), dos ligandos del receptor AT_2 , sobre la síntesis de GMPc basal o la inducida por el PNA, en la oliva inferior de ratas de 12 días de nacidas. Nuestros hallazgos apoyan la interacción, ya que demuestran que cuando se añaden ligandos como la ANG II y el CGP a la preparación de la oliva inferior de ratas de 12 días de nacidas se reduce la producción de GMPc, tanto basal como estimulada por el PNA. Desde que estos efectos fueron inhibidos tanto por el ortovanadato de sodio como por el ácido okadaico, se sugiere que mecanismos de desfosforilación mediada por fosfatasa, tanto del tipo PTPasas como PP2A, pueden estar involucrados.

Palabras clave: Péptido natriurético auricular, angiotensina II, receptor AT_2 , GMPc.

Abstract

Angiotensin II (ANG II) and the atrial natriuretic peptide (PNA) are vasoactive peptides with a broad and well established diversity of biological actions and other emergent ones such as the control of the growth and the neuronal differentiation. These two peptidergic systems are physiological antagonists and it is postulated that the interaction among them could be at the level of their intracellular signaling pathways. It has been proposed that phosphorylation and dephosphorylation reactions mediate this antagonism. In the present work we evaluate the actions of ANG II and the CGP 41221A, two ligands which selective bind AT_2 receptor, on the basal or PNA-induced cGMP synthesis, in the inferior olive of the 12 days born rats. Our results are in favor of this interaction since when the ligands are added to the inferior olive preparation, a reduction in basal and PNA-stimulated cGMP production is observed. Since these effects were inhibited by sodium orthovanadate and by okadaic acid, it is suggested the involvement of phosphatases of the PTPasas and PP2A type.

Key words: Atrial natriuretic Peptide, Angiotensin II, AT_2 receptor, cGMP.

INTRODUCCIÓN

La angiotensina II (ANG II), el octapéptido biológicamente activo del sistema renina-angiotensina, posee una amplia variedad de acciones en los sistemas biológicos. Aunque la mayoría de las acciones conocidas de la ANG II están relacionadas con el

control de la secreción hormonal, de la presión arterial y la homeostasis de fluidos, la evidencia reciente sugiere que las acciones centrales de la angiotensina II abarcan aspectos relacionados con la modulación del estrés, del comportamiento sexual, del aprendizaje y la memoria, de la migración celular y de la

Laboratorio de Neuropeptidos, Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela.

* A quién debe dirigirse la correspondencia: e-mail: mrgarrido11@hotmail.com

sinaptogénesis neuronal (Pan, 2004; von Bohlen y Albrecht, 2006; Daniels y col., 2007).

La ANG II ejerce sus diferentes acciones en los tejidos blancos mediante la interacción con receptores de membrana. La heterogeneidad de los receptores de la ANG II tiene importantes implicaciones fisiológicas y farmacológicas. Los dos subtipos de receptores de la ANG II, el AT₁ y el AT₂, pertenecen a la superfamilia de receptores heptahelicales (Bumpus y col., 1991), y ambos unen a la angiotensina II con igual afinidad; sin embargo, los residuos homólogos entre ellos son de apenas 30% y difieren significativamente en sus mecanismos de señalización (von Bohlen y Albrecht, 2006; Metha y Griendling, 2006; Daniels y col., 2007).

La mayoría de los efectos centrales conocidos de la ANG II están mediados por el subtipo de receptor AT₁, localizado en áreas relacionadas con la regulación de la presión arterial, la homeostasis de los fluidos y electrolitos y la liberación de hormonas (Saavedra y col., 1992; Daniels y col., 2007). Del mismo modo existe evidencia substancial de que la ANG II, vía este subtipo de receptor, actúa como factor de crecimiento, mediado por diferentes vías de señalización (Bedecs y col., 1997; Ishida y col., 1998).

Asimismo se han atribuido a la estimulación del receptor AT₁ mecanismos de señalización tales como la estimulación de la fosfolipasa C (mediada por proteínas G), la producción de inositol 1,4,5-trifosfato y diacilglicerol, la movilización de Ca⁺⁺ intracelular (Alexander y col., 1985), la inhibición de la actividad de la adenilil ciclasa, el incremento del GMPc intracelular, la liberación de ácido araquidónico y prostaciclina, y la activación de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) (Timmermans y col., 1993).

La función de los receptores AT₂, sin embargo, permanece elusiva y controversial. Los receptores AT₂ han sido señalados como responsables de la diferenciación celular, de la regeneración neuronal y tisular (Stroth y col., 1998), promueven la regeneración axonal (Lucius y col., 1998) y su activación resulta en la inhibición del crecimiento y promoción de la apoptosis (Schmitz y Berk, 1997).

Los receptores AT₂ están ampliamente expresados en áreas del cerebro adulto relacionadas con el aprendizaje y el control de la actividad motora (Tsutsumi y Saavedra, 1991; Wright y Harding, 1995). Se ha reportado la presencia de inmunorreactividad a la ANG II en las neuronas cerebelosas (Erdmann y col., 1996), así como la presencia de ambos subtipos de receptores en ratas de dos semanas de nacidas (Tsutsumi y col., 1993, Jöhren y col., 1996). Adicio-

nalmente, Nuyt y col. (1999) demostraron que el ARNm para el AT₂ persiste hasta la madurez cerebral en núcleos relacionados con las funciones motoras y con la integración sensorial. Mientras que estudios recientes han demostrado la presencia de mutaciones del receptor AT₂ localizadas en el cromosoma X de pacientes masculinos con retraso mental (Vervoort y col., 2002), y la presencia de anomalías neurológicas centrales en ratones AT₂KO, deficientes en el receptor AT₂ (Ichiki y col., 1995), sugiriendo que el gen del receptor AT₂ está involucrado en el desarrollo cerebral y el desarrollo neuronal.

Los receptores AT₂ de la angiotensina II se expresan abundantemente en el cerebro fetal, donde probablemente contribuyen al desarrollo cerebral. Igualmente, éstos receptores son capaces de expresarse en condiciones patológicas con el fin de proteger al cerebro de accidentes cerebrovasculares; sin embargo, los mecanismos subyacentes a estas acciones no están claramente dilucidados (Li y col., 2006).

Poco se conoce sobre la señalización intracelular del receptor AT₂ específicamente en relación al crecimiento y diferenciación, sin embargo la evidencia reciente apoya un papel en la fosforilación/desfosforilación proteica (Marrero y col., 1995; Nahmias y col., 1995; Ciuffo y col., 1998; Zielinski y col., 2001; Álvarez y col., 2003). Varios reportes sugieren que el receptor AT₂ está asociado con la modulación de los niveles de GMPc. Así, en cultivos de células neuronales del cerebro de ratas de un día de nacidas, y en células PC12W, se ha demostrado que la ANG II, vía la estimulación del receptor AT₂, disminuye la actividad de la guanilil ciclasa particulada, postulándose que este efecto es debido a la estimulación de la actividad de fosfotirosina fosfatasa y sugiriendo una posible interacción entre el receptor AT₂ de la ANG II y los receptores de los péptidos natriuréticos (PNs) (Bottari y col., 1992; Brechler y col., 1993).

Adicionalmente a sus acciones inhibitorias sobre el sistema renina-angiotensina-aldosterona, los estudios recientes han ampliado el conocimiento sobre el papel homeostático de los PNs. Se sabe que estos péptidos modulan las acciones de diversas hormonas, citoquinas y factores de crecimiento. Más aún, los PNs contrarrestan los estímulos fibróticos e inflamatorios responsables de las respuestas de remodelación cardíaca (Molketin, 2003; Holtwick y col., 2003), promueven el crecimiento óseo (principalmente el PNC) (Chusho y col., 2001; Tamura y col., 2004; Maack, 2006), juegan un papel importante en el desarrollo del sistema reproductor (Schulz, 2005) y poseen un potente efecto lipolítico en los humanos (Lafontan y col., 2005).

Las diversas acciones biológicas de los péptidos natriuréticos son mediadas por la unión a sus receptores/guanilil ciclasas A y B, también designados NPR-A o GC-A y NPR-B o GC-B, mientras que el receptor NPR-C ha sido descrito como un receptor de aclaramiento. El PNA se une selectivamente a la GC-A, y la identificación de los sitios de unión para este péptido en el sistema nervioso central ha sido muy relevante en cuanto al entendimiento de sus funciones. En la rata se presenta una alta densidad de receptores para el péptido natriurético auricular en diversos núcleos relacionados con el control cardiovascular y neuroendocrino (Kurihara y col., 1987; Brown y Zuo, 1993; Herman y col., 1996). Adicionalmente, mediante métodos de hibridación *in situ* se ha reportado la presencia de ARNm para NPR-A y NPR-B en el cerebelo de la rata (Wilcox y col., 1991) y el mono (Abdelalim y col., 2007), así como la presencia de inmunorreactividad al PNA en neuronas y astrocitos del cerebelo y del complejo de la oliva inferior en el humano (McKenzie y col., 2001).

Adicionalmente a sus bien establecidas funciones en la regulación cardiovascular, neuroendocrina y del balance electrolítico (Imura y col., 1992; Gutkowska y col., 1997; Levin y col., 1998), los PNs pueden estar involucrados en varios tipos de plasticidad neuronal y no neuronal a nivel del sistema nervioso central. Así, estos péptidos inhiben la proliferación de astrocitos inducida por las MAPKs, vía su receptor NPR-C (Prins y col., 1996), e inhiben la apoptosis de células PC12 y de las células embrionarias cerebrales (Fiscus y col., 2001).

Más aún, se ha demostrado que transcritos para el PNA y el NPR-A, pueden ser regulados hacia arriba por períodos prolongados en la corteza cerebral de la rata, en casos de depresión cortical aguda (Wiggins y col., 2003), y que el ARNm y los sitios de unión para el PNA están diferencialmente distribuidos durante el desarrollo pre y postnatal en el cerebro de la rata (Brown y Zuo 1993, 1995; Ryan y Gundlach, 1998), sugiriendo un papel para el PNA en la plasticidad neuronal.

Es bien conocido que el PNA actúa como un antagonista funcional del sistema renina angiotensina, inhibiendo la secreción de renina por el riñón y la secreción de aldosterona por la glándula suprarrenal. El PNA también antagoniza todos los efectos conocidos de la ANG II, incluyendo la vasoconstricción periférica, la actividad mitogénica y los efectos dipsogénicos centrales (Maack y col., 1984; Burnet y col., 1984; Maack, 1986). Muchas son las vías y los mecanismos implicados en este antagonismo, entre los cuales se postula la interacción a nivel de los segundos mensajeros.

Se ha demostrado que los niveles de GMPc pueden incrementar o disminuir en diferentes tipos celulares en respuesta a la activación de los receptores AT₂. Así, estudios sobre la señalización mediada por el receptor AT₂ resulta en una reducción de los niveles de GMPc en oocitos de *Xenopus* (Pulakat y col., 2002; 2005), en la neointima de ratas posterior a angioplastia (Moroi y col., 1997), en las células PC12W (Brechler y col., 1994) y en las células cromafines suprarrenales (Ishii y col., 2001). En las células PC12W se demostró que la activación del receptor AT₂ resulta en inhibición de la guanilil ciclasa particulada (Bottari y col., 1992; Brechler y col., 1994). En contraste, en las células NG108-15 (Chaki e Inagami, 1993) y en las células de neuroblastoma neuro-2A, la activación de este subtipo de receptor por acción de la angiotensina II resulta en una activación de la guanilil ciclasa soluble vía la síntesis del óxido nítrico. Así, mientras está clara la capacidad del receptor AT₂ de influenciar los niveles de GMPc, la dirección del cambio de los niveles de este nucleótido cíclico o las moléculas efectoras varía dependiendo del tipo celular.

Con el fin de esclarecer aún más la posible señalización del receptor AT₂, así como la regulación de dicha señalización, en el presente estudio evaluamos si la angiotensina II y un ligando del receptor AT₂, el CGP 41221A, afecta la producción de GMPc basal o la inducida por el péptido natriurético auricular, en una estructura cerebral rica en receptores AT₂ como lo es la oliva inferior de ratas de 12 días de nacidas.

Materiales y Métodos

Ratas Sprague-Dawley, macho, de doce días de nacidas (20-23 g), fueron mantenidas bajo períodos alternativos de luz y oscuridad, con libre acceso a la leche materna. Los animales fueron sacrificados por decapitación entre las 09:00 y las 10:00 h y los cerebros inmediatamente removidos. Se obtuvieron secciones coronales de cerebro (20 µm) a 4 °C. La oliva inferior fue obtenida mediante la técnica del *punch* utilizando una aguja con un diámetro interno de 0,75 mm. El tejido fue rápidamente homogeneizado en buffer Tris HCl, 50 mM, pH 7,5, conteniendo 1 mM EDTA, 250 mM de sacarosa, 1,6 mM de teofilina y 50 µg/ml de leupeptina. Se determinaron las proteínas utilizando albúmina sérica de bovino como patrón (Lowry y col., 1951) y el contenido proteico fue ajustado a 10-20 µg proteína/10 µl. La actividad de guanilil ciclasa y la cantidad de GMPc formada fue determinada por radioinmunoensayo (Steiner y col., 1972) usando un kit comercial de Amersham Corp.

(Arlington Heights, IL). El análisis estadístico de los datos se realizó mediante análisis de variancia de una vía (ANOVA) y la prueba de Newman Keul. Los resultados fueron expresados como la media \pm EEM. La actividad de guanilil ciclasa es reportada como pmoles de GMPc formados/5 min/mg de proteína.

Resultados

EFFECTOS DE LA ANGIOTENSINA II O DEL CGP 42112A SOBRE LA FORMACIÓN DE GMPc, BASAL Y ESTIMULADO POR EL PÉPTIDO NATRIURÉTICO AURICULAR EN LA OLIVA INFERIOR DE LA RATA

Como se muestra en la figura 1, en el homogeneizado de la oliva inferior de las ratas de 12 días de nacidas, la adición al medio de incubación del péptido natriurético auricular (PNA) (10^{-7} M) incrementó significativamente la formación de GMPc (56%) ($p < 0,01$). Por el contrario, la estimulación con ANG II (10^{-7} M) o con CGP 41221A (10^{-8} M) redujo significativamente la formación del GMPc basal (40% y 50%, respectivamente, $p < 0,01$). Aún mas, la adición simultánea de la ANG + CGP, produjo una disminución en la producción basal del GMPc de magnitud similar a la que se observa al adicionar cada uno de los ligandos en forma individual.

La adición de la ANG II (10^{-7} M) o del CGP 42112A (10^{-8} M) al medio de incubación, redujo el incremento en la formación de GMPc inducido por el PNA en un 73% y 40%, respectivamente ($p < 0,01$ y $p < 0,05$).

Finalmente, la adición del bloqueante del receptor AT_1 , el losartan (10^{-7} M), al medio de incubación no afectó el nivel basal del nucleótido cíclico, ni la reducción de los niveles de GMPc inducidos por la ANG II ($p < 0,05$).

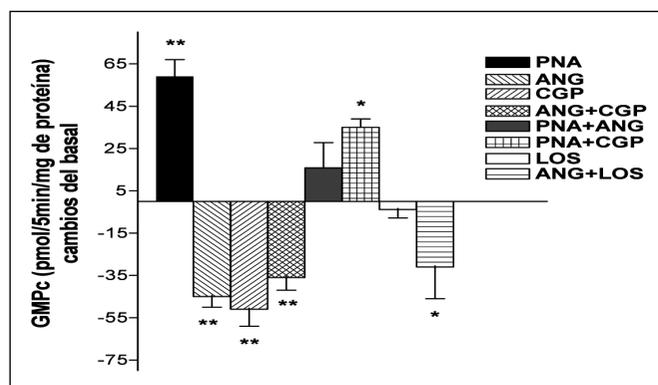


Figura 1. Efectos de la angiotensina II o del CGP 42112A sobre la formación de GMPc basal o estimulada por el péptido natriurético auricular en la oliva inferior de la rata. La producción del GMPc fue medida en homogeneizados de oliva inferior de ratas de 12 días de nacidas. Los valores son expresados como cambio promedio sobre el basal \pm EEM. PNA (10^{-7} M, n=20); ANG II (10^{-7} M, n=17); CGP 42112A (10^{-8} M, n=10); LOS (10^{-7} M, n=6); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ comparado con el basal.

EFFECTO DEL ORTOVANADATO DE SODIO SOBRE LA ACCIÓN INHIBITORIA INDUCIDA POR LA ANG II O EL CGP 42112A, SOBRE LA FORMACIÓN DE GMPc BASAL O ESTIMULADA POR EL PNA

Con el fin de evaluar la posibilidad de que procesos de desfosforilación estén involucrados en la disminución inducida por la ANG II de la producción de GMPc, estudiamos el efecto del ortovanadato de sodio (10^{-4} M), un inhibidor selectivo de las fosfotirosina fosfatasas (PTPasas). Así observamos que la acción inhibitoria de la ANG II y del CGP 42112A sobre la formación de GMPc tanto basal como la inducida por el PNA, fue completamente revertida por la adición del ortovanadato de sodio (figura 2). El ortovanadato de sodio no afectó el efecto estimulador del PNA sobre la producción de GMPc.

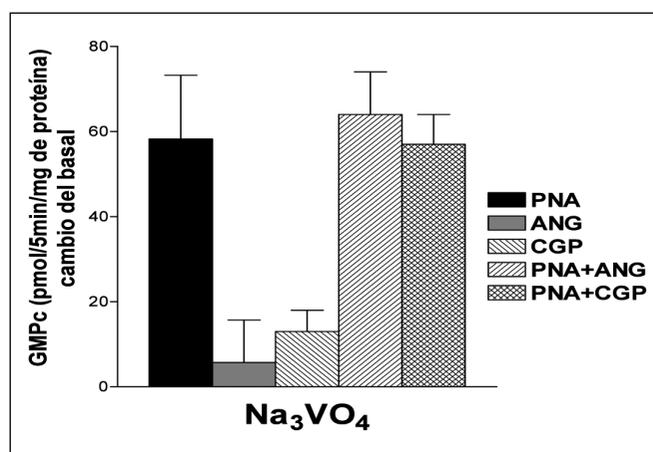


Figura 2. Efecto del ortovanadato de sodio sobre la acción inhibitoria inducida por la ANG II o el CGP 42112A, sobre la formación de GMPc basal o estimulada por el PNA. La producción de GMPc fue medida en homogeneizados de oliva inferior de ratas de 12 días de nacidas. Las muestras fueron preincubadas por 10 min a 37°C en presencia de Na_3VO_4 (10^{-4} M). Los resultados son expresados como la media \pm EEM del GMPc formado (n=4-7).

EFFECTO DEL ÁCIDO OKADAICO SOBRE LA ACCIÓN INHIBITORIA INDUCIDA POR LA ANG II SOBRE LA FORMACIÓN DE GMPc BASAL O ESTIMULADA POR EL PNA

A fin de establecer la posible participación de otros tipos de fosfatasas en la acción de los ligandos de angiotensina II, se incubó la preparación en presencia del ácido okadaico, un inhibidor selectivo de fosfatasas tipo 2A (figura 3). El ácido okadaico, potenció ligeramente la producción de GMPc inducida por el PNA ($P > 0,05$). La adición del inhibidor previno la disminución en la síntesis del nucleótido cíclico inducida tanto por la ANG II como por la adición simultánea de PNA + ANG II.

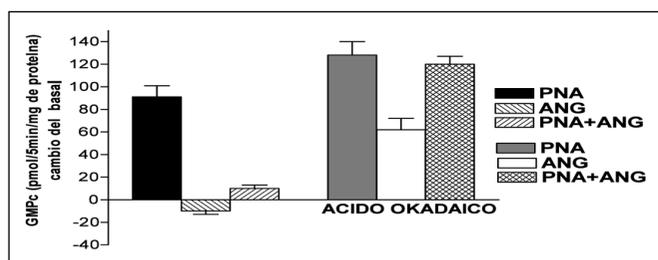


Figura 3. Efecto del ácido okadaico sobre la acción inhibitoria inducida por la ANG II sobre la formación de GMPc basal o estimulada por el PNA. La producción de GMPc fue medida en homogeneizados de oliva inferior de ratas de 12 días de nacidas. Las muestras fueron preincubadas por 10 min. a 37 °C en presencia de ácido okadaico (10^{-7} M). Los resultados son expresados como la media \pm EEM del GMPc formado (n=4-7).

Discusión

La angiotensina II es un péptido vasoactivo potente que presenta una gran variedad de funciones en el sistema nervioso central, entre las cuales podemos citar el crecimiento, la diferenciación y la maduración neuronal. Se ha sugerido un papel de la ANG II en el desarrollo neurobiológico, en el cual resulta de importancia la regulación de la ordenación espacial de las conexiones (von Bohlen y Halbach, 2006). La evidencia apunta a un papel del receptor AT_2 cerebral en estos procesos neurobiológicos. En efecto, se ha demostrado que ratones deficientes en el receptor AT_2 presentan un incremento en la densidad celular en regiones cerebrales tales como la corteza, el hipocampo, la amígdala y el tálamo (Bohlen y Halbach, 2001), efectos que parecen ser consecuencia de alteraciones en los mecanismos de inhibición del crecimiento, disminución de la apoptosis y/o defectos en la migración celular (Gendron y col., 2003).

Específicamente en relación al cerebelo, se ha establecido que la neurogénesis de esta región encefálica ocurre en el período postnatal, y que durante las primeras tres semanas del nacimiento se establece el 97% de las células del cerebelo adulto (Altman, 1972). En este proceso, la conexión olivo-cerebelar tiene gran relevancia funcional (Sotelo y Chedotal, 1997; Goldwitz y Hamre, 1998). En efecto, la oliva inferior constituye la fuente principal, si no única, de las fibras trepadoras que se proyectan y hacen sinapsis en las células de Purkinje en la corteza cerebelosa y han sido implicadas en funciones tales como el aprendizaje y el control de los movimientos (Welsh y Harvey, 1998).

Varias líneas de evidencia han demostrado la existencia en la oliva inferior de sistemas péptidérgicos tales como la angiotensina II y el péptido natriurético auricular, sugiriendo que esos péptidos

podrían participar en la función fisiológica de esta estructura cerebelar. Así, se ha demostrado la presencia de inmunorreactividad a la ANG II en neuronas cerebelosas (Erdmann y col., 1996), y de ambos subtipos de receptores de la angiotensina II en secciones del cerebelo (De Gasparo, 1994; Jöhren y Saavedra, 1996). En la oliva inferior del cerebelo de la rata se ha demostrado la expresión del ARNm y los receptores AT_2 , la cual hace pico a los 12 días de nacidas (Jöhren y col., 1996; Tsutsumi y Saavedra, 1991a). Aún mas, un estudio ontogénico sobre la expresión del ARNm para el receptor AT_2 de la ANG II determinó que este receptor persiste hasta la madurez cerebral en núcleos involucrados con las funciones motoras y la integración sensorial (Nuyt y col., 1999).

Debido a que la máxima expresión de los receptores AT_2 en la OI ocurre durante el establecimiento de las conexiones entre las fibras trepadoras y las células de Purkinje, se ha propuesto la participación de los receptores AT_2 en la diferenciación de este sistema relacionado con las funciones motoras y sensoriales. En apoyo a esto, diversos estudios han mostrado la participación de dichos receptores en la inducción de cambios morfológicos tales como la elongación y la ramificación neuronal (Laflamme y col., 1996; Dehmelt y Halpain, 2004; Plouffe y col., 2006). Así, las lesiones químicas en la oliva inferior reducen la unión de la ANG II a sus receptores AT_2 , tanto en la OI como en el cerebelo de ratas jóvenes, sugiriendo que los receptores AT_2 presentes en la capa molecular del cerebelo son producidos por neuronas de la OI y transportados por las fibras trepadoras (Jöhren y col., 1998). De manera coincidente, Arce y col. (2001) detectaron la presencia de receptores AT_2 en los pedúnculos cerebelosos; y debido a que éstos están constituidos principalmente por fibras, se sugiere la existencia de transporte axonal de receptores.

Por otra parte, se demostró mediante hibridización *in situ* que el ARNm para el PNA está altamente expresado en la oliva inferior (Langub y col., 1995). Asimismo, mediante técnicas autorradiográficas se encontraron receptores para el PNA en la oliva inferior de mamíferos (Quirion y col., 1986) y se ha detectado inmunorreactividad para el receptor NPR-A en regiones del tallo cerebral no relacionadas con funciones cardiovasculares tales como el núcleo rojo y el núcleo oculomotor en monos (Abdelalim y col., 2007). Asimismo se ha reportado hibridización *in situ* del ARNm para los receptores A y B de los PNs en el cerebelo del mono (Wilcox y col., 1991). El núcleo rojo posee conexiones con el cerebelo y el núcleo de la oliva inferior, lo que sugiere que el receptor NPR-A

ejerce un papel en la modulación de la función cerebelar. La presencia de receptores para el PNA en las neuronas de los núcleos oculomotor e hipogloso, sugiere su posible papel en la regulación de la función motora. De modo interesante, se ha descrito la presencia de los PNs y de sus receptores en estructuras oculares (Fernández-Durango y col., 1995; Kuriyayashi y col., 2006), pudiendo estar relacionados con la función ocular.

Diversos reportes han demostrado la existencia de la mutua regulación entre la ANG II y los sistemas generadores de GMPc (Kim y col., 2005; Yan y col., 2003); estos sistemas están presentes en la OI, sin embargo, se desconoce cómo ellos coordinan sus actividades a fin de mantener el balance entre sus vías de señalización. Al respecto, se ha reportado la existencia de reacciones de fosforilación/ desfosforilación en ambos sentidos.

La evidencia apunta a un papel del PNA en la inhibición del crecimiento inducido por la ANG II en diversos tipos celulares. En efecto, Hannken y col. (2001) demostraron que el PNA atenúa la hipertrofia inducida por la ANG II en las células de los túbulos renales, a través de la fosforilación de las quinasas activadas por mitógenos (MAPKs), inducida por este péptido, previniéndose el pico de la fosforilación con el incremento de la expresión de la fosfatasa MKP-1, enzima que se encuentra involucrada en la desfosforilación de las ERK 1/2. Un efecto similar fue demostrado por Hayashi y col. (2004) en cultivos de cardiomiocitos. En ambos estudios los efectos del PNA fueron mimetizados por el 8-Br-GMPc, un análogo no hidrolizable del GMPc, sugiriendo un papel para este nucleótido cíclico en los efectos del PNA. Al respecto, se ha demostrado la existencia de una interacción directa entre los receptores AT₂ de la ANG II y el receptor/GC-A del PNA en las células de la zona glomerulosa de la glándula suprarrenal de la rata y en las células PC12W, a través de la acción de fosfatasa del tipo fosfotirosina fosfatasa (PTPasas) (Bottari y col., 1992).

En forma similar, nuestros resultados sugieren esta interacción entre la señalización peptidérgica, ya que muestran una reducción en la producción de GMPc basal y estimulada por el PNA cuando se añaden ligandos como la ANG II y el CGP 42112A en la oliva inferior de ratas de 12 días de nacidas. Desde que estos efectos fueron inhibidos tanto por el ortovanadato de sodio como por el ácido okadaico se infiere que, a diferencia de lo reportado por Bottari y col. (1992), en esta interacción participan tanto las PTPasas como las PP2A, coincidiendo con los reportes en cultivos de podocitos de rata donde la ANG II

suprime la síntesis de GMPc inducida por el PNA (Golos y col., 2002; Lewko y col., 2006).

Nuestros resultados sugieren la mediación del receptor AT₂ en el efecto antagónico de la ANG II sobre la producción de GMPc basal y estimulada por el PNA. En efecto, en primer lugar este receptor se expresa casi exclusivamente en la oliva inferior de la rata recién nacida, y en segundo lugar, el bloqueo del receptor AT₁ con losartán no afectó la acción del PNA y fue incapaz de revertir las acciones inhibitorias de la ANG II sobre la producción de GMPc basal o estimulado por el PNA. Esto difiere de lo observado en cultivos de podocitos, donde fue reportado que la acción inhibitoria de la ANG II ocurre a través de la estimulación de ambos subtipos de receptores de la angiotensina II, el AT₁ y el AT₂ (Golos y col., 2002; Lewko y col., 2006).

El mecanismo mediante el cual el receptor AT₂ podría mediar la desfosforilación del receptor de PNA no se ha esclarecido completamente. Se sabe que el receptor para el PNA (guanilil ciclase A) existe en forma altamente fosforilada, y la adición de su agonista, el PNA, induce una desfosforilación y como consecuencia, desensibilización del receptor. Diversos autores involucran en este proceso de desfosforilación a fosfatasa tipo 2A, sensibles al ácido okadaico, en especial en preparaciones de células embrionarias 293 (Potter y Garbers, 1992) y en la fracción soluble de homogeneizado del cerebro de la rata (Dautzenberg y col., 1993).

Se ha reportado que la estimulación del receptor AT₂ induce la desfosforilación de las tirosinas en numerosas proteínas con pesos moleculares asociados a los receptores tirosina-kinasa en las células de neuroblastoma N1E-115 (Nahmias y col., 1995). Asimismo, se ha observado que la estimulación del receptor AT₂ inhibe la proliferación celular estimulada por el factor de crecimiento básico de fibroblastos en cultivos de células R3T3 que expresan el receptor AT₂, vía la activación de una proteína-tirosina fosfatasa (Tsuzuki y col., 1996). Aún más, varias fosfatasa, del tipo PP2A y particularmente la tirosina fosfatasa-1 que contiene el dominio homólogo a Src 2 (SHP-1), se asocian a menudo con las cascadas de señalización del receptor AT₂ (Cui y col., 2001; Shibasaki y col., 2001; Fen y col., 2002; Plouffe y col., 2006).

Aunado a la evidencia anterior, recientemente se ha descrito un nuevo mecanismo de señalización en la diferenciación neuronal inducida por el receptor AT₂, mediado por la formación de un complejo entre las proteínas recientemente descubiertas que interactúan con el receptor AT₂ (ATIP) (Nouet y col., 2004)

y la SHP-1, el cual se traslada al núcleo para inducir la expresión de la MMS2, una variante de las enzimas que conjugan a la ubiquitina. La interrupción de este proceso mediante técnicas genéticas o el uso del ortovanadato de sodio conduce a alteraciones en el crecimiento de neuritas y de la formación de las sinapsis (Li y col., 2006).

En resumen, la alta expresión de receptores para el PNA y los receptores AT₂ de la angiotensina II en la oliva inferior del cerebro de la rata de dos semanas de nacida, momento crítico para el desarrollo del cerebelo y el establecimiento de las conexiones neuronales, así como su desaparición en el adulto, sugiere un posible papel para estos péptidos en la migración celular y las interacciones neuronales. El papel del receptor AT₂ en estos procesos está avalado por nuestros resultados en la oliva inferior de ratas de 12 días de nacidas, los cuales demuestran que la angiotensina II inhibe la formación del GMPC, tanto basal como la inducida por el péptido natriurético auricular; y estos efectos parecen estar relacionados con procesos de desfosforilación a través de la estimulación de varios tipos de fosfatasa, principalmente PP2A y PTPasas.

Agradecimientos

Este trabajo fue subvencionado por el Instituto de Investigaciones Farmacéuticas y por el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico, Proyecto Institucional Tipo A N° CDCH N° 06.30.2006.

Referencias bibliográficas

- Abdelalim EM, Osman AHK, Takada T, Torii R, Tooyama I. 2007. Immunohistochemical mapping of natriuretic peptide receptor-a in the brainstem of macaca fascicularis. *Neuroscience*. 145:1087-1096.
- Alexander RW, Brock TA, Gimbrone MA Jr, Rittenhouse SE. 1985. Angiotensin increases inositol trisphosphate and calcium in vascular smooth muscle. *Hypertension*. 7:447-451.
- Altman J. 1972. Postnatal development of the cerebellar cortex in the rat: I. Phases in the maturation of Purkinje cells and of the molecular layer. *J Comp Neurol*: 145:399-463.
- Álvarez SE, Fuentes LB, Ciuffo GM. 2003. Angiotensin II mediates Tyr-dephosphorylation in rat fetal kidney membranes. *Mol Cell Biochem*. 254:137-143.
- Arce ME, Sánchez S, Seltzer A, Ciuffo GM. 2001. Autoradiographic localization of angiotensin II receptors in developing rat cerebellum and brainstem. *Regulatory Peptides* 99:53-60.
- Bedecs K, Elbaz N, Sutren M, Masson M, Susini C, Strosberg AD, et al. 1997. Angiotensin II type 2 receptors mediate inhibition of mitogen activated kinase cascade and functional activation of SHP-1 tyrosine phosphatase. *Biochem J*. 325:449-454.
- Bottari SP, King IN, Reichlin S, Dahlström I, Lydon NA, de Gasparo M. 1992. The angiotensin AT₂ receptor stimulates protein tyrosine phosphatase activity and mediates inhibition of particulate guanylate cyclase. *Biochem Biophys Res Commun* 183:206-211.
- Brechler V, Levens NR, de Gasparo M, Bottari SP. 1994. Angiotensin AT₂ receptor mediate inhibition of particulate guanylate cyclase: a link with protein tyrosine phosphatase stimulation? *Receptors Channels* 2:79-87.
- Brechler V, Reichlin S, de Gasparo M, Bottari SP. 1994. Angiotensin II stimulates protein tyrosine phosphatase activity through a G-protein independent mechanism. *Receptors Channels* 2:89-98.
- Brown J, Zuo Z. 1993. C-type natriuretic peptide and atrial natriuretic peptide receptors of rat brain. *Am J Physiol* 264:R513-R523.
- BROWN J, ZUO Z. 1995. Natriuretic peptide receptors are expressed during cerebral growth in the fetal rat. *Am J Physiol* 269(2 Pt 2):R261-R273.
- Bumpus FM, Catt KJ, Chiu AT, de Gasparo M, Goodfriend T, Husain A, Peach MJ, Taylor DG Jr., Timmermans PBMW. 1991. Nomenclature for angiotensin receptors. *Hypertension*. 17:720-721.
- Burnett JC Jr, Granger JP, Opgenorth TJ. 1984. Effects of synthetic atrial natriuretic factor on renal function and rennin release. *Am J Physiol* 247:F863-6.
- Chaki S, Inagami T. 1993. New signaling mechanism of angiotensin II in neuroblastoma neuro-2A cells: activation of soluble guanylyl cyclase via nitric oxide synthesis. *Mol Pharmacol* 1993 43:603-608.
- Chusho H, Tamura N, Ogawa Y, Yasoda A, Suda M, Miyazawa T y col. 2001. Dwarfism and early death in mice lacking C-type natriuretic peptide. *Proc Natl Acad Sci USA*. 98:4016-4021.
- Ciuffo GM, Álvarez SE, Fuentes LB. 1998. Angiotensin II receptors induce tyrosine dephosphorylation in rat fetal membranes. *Reg. Peptides* 74: 129-135.
- Cui T, Nakagami H, Iwai M, Takeda Y, Shiuchi T, Daviet L, Nahmias C, Horiuchi M. 2001. Pivotal role of tyrosine phosphatase SHP-1 in AT₂ receptor mediated apoptosis in rat fetal vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res* 49:867-871.
- Daniels D, Yee DK y Fluharty SJ. 2007. Hydromineral Neuroendocrinology: Angiotensin II receptor signaling. *Exp Physiol* 92:523-527.
- Dautzenberg FM, Müller D, Richter D. 1993. Dephosphorylation of phosphorylated atrial natriuretic peptide by protein phosphatase 2A. *Eur J Biochem*. 21:485-90.
- De Gasparo M, Levens NR, Kamber B, Furet P, Whitebread S, Brechler V y col. 1994. In: Saavedra JM, Timmermans PBMWM, editors. *Angiotensin Receptors*. New York: Plenum, pp. 95-117.

- Dehmelt L, Halpain S. 2004. Actin and microtubules in neurite initiation: are MAPs the missing link? *J Neurobiol* 58:18-33.
- Erdmann B, Fuxe K, Ganten D. 1996. Subcellular localization of angiotensin II immunoreactivity in the rat cerebellar cortex. *Hypertension* 28:818-824.
- Feng YH, Sun Y, Douglas JG. 2002. G-beta gamma-independent constitutive association of G-alpha-s with SHP-1 and angiotensin II receptor AT₂ is essential in AT₂-mediated ITIM-independent activation of SHP-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:12049-12054.
- Fernández-Durango R, Núñez DJ, Brown MJ. 1995. Messenger RNAs encoding the natriuretic peptides and their receptors are expressed in the eye. *Exp Eye Res* 61:723-729.
- Fiscus RR, Tu AW, Chew SB. 2001. Natriuretic peptides inhibit apoptosis and prolong the survival of serum-deprived PC12 cells. *Neuroreport* 12:185-189.
- Gendron L, Côté F, Payet MD, GALLO-PAYET N. 2002. Nitric oxide and cyclic GMP are involved in angiotensin II AT₂ receptor effects on neurite outgrowth in NG108-15 cells. *Neuroendocrinology* 75:70-81.
- Goldwitz D, Hamre K. 1998. The cells and molecules that make a cerebellum. *Trends Neurosci* 21:375-382.
- Golos M, Lewko B, Bryl E, Witkowski JM, Dubaniewicz A, Olszewska A y col. 2002. Effect of angiotensin II on ANP-dependent guanylyl cyclase activity in cultured mouse and rat podocytes. *Kidney Blood Press Res* 25:296-302.
- Gutkowska J, Antunes-Rodrigues J, McCann SM. 1997. Atrial natriuretic peptide in brain and pituitary gland. *Physiol Rev* 77:465-515.
- Hannken T, Schroeder R, Stahl R, and Wolf G. 2001. Atrial natriuretic peptide attenuates ANG II-induced hypertrophy of renal tubular cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 281:F81-90.
- Hayashi D, Kudoh S, Shiojima I, Zou Y, Harada K, Shimoyama M, Imai Y, Monzen K, Yamazaki T, Yazaki Y, Nagai R, Komuro I. 2004. Atrial natriuretic peptide inhibits cardiomyocyte hypertrophy through mitogen-activated protein kinase phosphatase-1. *Biochem Biophys Res Commun* 322:310-319.
- Herman JP, Dolgas CM, Rucker D, Langub MC. 1996. Localization of natriuretic peptide-activated guanylate cyclase mRNA in the rat brain. *J Comp Neurol* 369:165-187.
- Holtwick R, Van Eickels M, Skryabin BV, Baba HA, Bubikat A, Begrow F, Schneider MD, Garbers DL, Kuhn M. 2003. Pressure-independent cardiac hypertrophy in mice with cardiomyocyte-restricted inactivation of the atrial natriuretic peptide receptor guanylyl cyclase-A. *J Clin Invest* 111:1399-1407.
- Ichiki, T, Labosky PA, Shiota C, Okuyama S, Imagawa Y, Fogo A, Niimura F, Ichikawa I, Hogan BLM, Inagami T. 1995. Effects on blood pressure and exploratory behavior of mice lacking angiotensin II type-2 receptor. *Nature* 377:748-740.
- Imura H, Nakao K, Itoh H. 1992. The natriuretic peptide system in the brain: implications in the central control of cardiovascular and neuroendocrine functions. *Front Neuroendocrinol* 13:217-49.
- Ishida M, Ishida T, Thomas SM, Berk BC. 1998. Activation of extracellular signal-regulated kinases (ERK1/2) by angiotensin II is dependent on c-Src in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 82:7-12.
- Ishii, K. Takekoshi, K. Shibuya, S. Kawakami, Y. Isobe, K. Nakai, T. 2001. Angiotensin subtype-2 receptor (AT₂) negatively regulates subtype-1 receptor (AT₁) in signal transduction pathways in cultured porcine adrenal medullary chromaffin cells. *J Hypertens* 19:1991-9.
- Jöhren O, Häuser W, Saavedra JM. 1998. Chemical lesion of the inferior olive reduces [¹²⁵I]sarcosine¹-angiotensin II binding to AT₂ receptors in the cerebellar cortex of young rats. *Brain Res.* 793:176-186.
- Johren O, Inagami T, Saavedra JM. 1996. Localization of AT angiotensin 2 II receptor gene expression in rat brain by in situ hybridization histochemistry. *Mol Brain Res* 37:192-200.
- Johren O, Saavedra JM. 1996. Gene expression of angiotensin II receptor subtypes in the cerebellar cortex of young rats. *NeuroReport*. 7:1349-52.
- Kim D, Aizawa T, Wei H, Pi X, Rybalkin SD, Berk BC et. al. 2005. Angiotensin II increases phosphodiesterase 5A expression in vascular smooth muscle cells: a mechanism by which angiotensin II antagonizes cGMP signaling. *J Mol Cell Cardiol* 38:175-184.
- Kuribayashi K, Kitaoka Y, Kumai T, Munemasa Y, Kitaoka Y, Isenoumi K, Motoki M, Kogo J, Hayashi Y, Kobayashi D, Ueno S. 2006. Neuroprotective effect of atrial natriuretic peptide against NMDA-induced neurotoxicity in the rat retina. *Brain Res* 1071:34-41.
- Kurihara M, Saavedra JM, Shigematsu K. 1987. Localization and characterization of atrial natriuretic peptide binding sites in discrete areas of rat brain and pituitary gland by quantitative autoradiography. *Brain Res* 408:31-39.
- Laflamme L, Gasparo M, Gallo JM, Payet MD, Gallo-Payet N. 1996. Angiotensin II induction of neurite outgrowth by AT₂ receptors in NG108-15 cells. Effect counteracted by the AT₁ receptors. *J Biol Chem* 271:22729-22735.
- Lafontan M, Moro C, Sengenès C, Galitzky J, Crampes F, Berlan M. 2005. An unsuspected metabolic role for atrial natriuretic peptides. The control of lipolysis, lipid mobilization, and systemic nonesterified fatty acids levels in humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25:2032-2042.
- Langub MC Jr, Watson RE Jr, Herman JP. 1995. Distribution of natriuretic peptide precursor mRNAs in the rat brain. *J Comp Neurol* 356:183-99.

- Levin ER, Gardner DG, Samson WK. 1998. Natriuretic peptides. *N Engl J Med* 339:21-218.
- Lewko B, Golos M, Latawiec E, Angielski S, Stepinski J. 2006. Regulation of cGMP synthesis in cultured podocytes by vasoactive hormones. *J Physiol Pharmacol* 57:599-610.
- Li JM, Mogi M, Tsukuda K, Tomochika H, Iwanami J, Min LJ, Nahmias C, Iwai M y Horiuchi M. 2006. Angiotensin II-induced neural differentiation via AT₂ receptor-MMS2 Cascade Involving Interaction between AT₂ Receptor-interacting Protein (ATIP) and SHP-1. *Molecular Endocrinology* 21:499-511.
- Lowry O, Rosebrough N, Farr A, Randall R. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275.
- Lucius R, Gallinat S, Rosenstiel P, Herdegen T, Sievers J, Unger T. 1998. The angiotensin II type 2 (AT₂) receptor promotes axonal regeneration in the optic nerve of adult rats. *J Exp Med* 188:661-670.
- Maack T, Marion DN, Camargo MJ, Kleinert HD, Laragh JH, Vaughan EDJr, y col. 1984. Effects of auriculin (atrial natriuretic factor) on blood pressure, renal function, and the renin-aldosterone system in dogs. *Am J Med* 77:1069-75.
- Maack T. 1986. Renal clearance and isolated kidney perfusion techniques. *Kidney Int* 30:142-151.
- Maack T. 1996. Role of atrial natriuretic factor in volume control. *Kidney Int* 49:1732-1737.
- Maack, T. 2006. The Broad Homeostatic Role of Natriuretic Peptides. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 50:198-207.
- Marrero MB, Schieffer B, Paxton WG, Duff JL, Berk BC, Bernstein KE. 1995. The role of tyrosine phosphorylation in angiotensin II-mediated intracellular signalling. *Cardiovasc Res* 30:530-536.
- McKenzie JC, Juan YW, Thomas CR, Berman NE, Klein RM. 2001. Atrial Natriuretic Peptide-like Immunoreactivity in Neurons and Astrocytes of Human Cerebellum and Inferior Olivary Complex, *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 49: 1453-1467.
- Mehta PK, Griendling KK. 2007. Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol* 292: C82-C97.
- Molkentin JD. 2003. A friend within the heart: Natriuretic peptide receptor signaling. *J Clin Invest* 111:1275-1277.
- Moroi M, Fukazawa M, Ishikawa M, Aikawa J, Namiki A, Yamaguchi T. 1997. Stimulation of angiotensin subtype 2 receptor reduces basal cGMP levels in the neointima of rat aorta after balloon injury. *Gen Pharmacol* 28:113-117.
- Nahmias C, Cazaubon SM, Briend-Sutren MM, Lazard D, Villageois P, Strosberg AD. 1995. Angiotensin II AT₂ receptors are functionally coupled to protein tyrosine dephosphorylation in N1E-115 neuroblastoma cells. *Biochem J* 306:87-92.
- Nouet S, Amzallag N, Li JM, Louis S, Seitz I, Cui TX, Alleaume AM, Di Benedetto M, Boden C, Masson M, Strosberg AD, Horiuchi M, Couraud PO, Nahmias C. 2004. Trans-inactivation of receptor tyrosine kinases by novel angiotensin II AT₂ receptor-interacting protein, ATIP. *J Biol Chem*. 279:28989-28997.
- Nuyt AM, Lenkei Z, Palkovits M, Corvol P, Llorens-Cortes C. 1999. Ontogeny of angiotensin II type-2 receptor mRNA expression in fetal and neonatal rat brain. *J Comp Neurol*. 407:193-206.
- Pan HL. 2004. Brain angiotensin II and synaptic transmission. *Neuroscientist*. 10:422-431.
- Plouffe B, Guimond MO, Beaudry H, y Gallo-Payet N. 2006. Role of tyrosine kinase receptors in angiotensin II AT₂ receptor signaling: Involvement in neurite outgrowth and in p42/p44mapk activation in NG108-15 cells. *Endocrinology* 147:4646-4654.
- Potter LR y Garbers DL. 1992. Dephosphorylation of the guanylyl cyclase-A receptor causes desensitization. *J Biol Chem*. 267:14531-14534.
- Prins BA, Weber MJ, Hu RM, Pedram A, Daniels M, Levin ER. 1996. Atrial natriuretic peptide inhibits mitogen-activated protein kinase through the clearance receptor: potential role in the inhibition of astrocyte proliferation. *J Biol Chem* 271:14156-14162.
- Pulakat L, Gray A, Johnson J, Knowle D, Burns V, Gavini N. 2002. Role of C-terminal cytoplasmic domain of the AT₂ receptor in ligand binding and signaling. *FEBS Lett*. 524:73-78.
- Pulakat L, Rahman S, Gray A, Knowle D, Gavini N. 2005. Roles of the intracellular regions of angiotensin II receptor AT₂ in mediating reduction of intracellular cGMP levels. *Cell Signal* 17:395-404.
- Quirion R, Dalpé M, Dam TV. 1986. Characterization and distribution of receptors for the atrial natriuretic peptides in mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:174-178.
- Ryan MC, Gundlach AL. 1998. Ontogenic expression of natriuretic peptide mRNAs in postnatal rat brain: implications for development? *Dev Brain Res*. 105:251-268.
- Saavedra JM, Correa FM, Seltzer A, Pinto JE, Viglione P, Tsutsumi K. 1992. Enhanced angiotensin converting enzyme binding in arteries from spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 10:1353-1359.
- Schmitz U y Berk BC. 1997. Angiotensin II signal transduction: Stimulation of multiple mitogen-activated protein kinase pathways. *Trends Endocrinol Metab* 8:261-266.
- Schulz S. 2005. C-type natriuretic peptide and guanylyl cyclase B receptor. *Peptides* 26:1024-1034.
- Shibasaki Y, Matsubara H, Nozawa Y, Mori Y, Masaki H, Kosaki A, Tsutsumi Y, Uchiyama Y, Fujiyama S, Nose A, Iba O, Tateishi E, Hasegawa T, Horiuchi M, Nahmias C,

- Iwasaka T. 2001. Angiotensin II type 2 receptor inhibits epidermal growth factor receptor transactivation by increasing association of SHP-1 tyrosine phosphatase. *Hypertension* 38:367-372.
- Sotelo C, Chedotal A. 1997. Development of the olivocerebellar projection. *Perspect Dev Neurobiol* 5:57-67.
- Steiner A, Parker C, Kipnis DM. 1972. Radio-immunoassay for cyclic nucleotides. *J Biol Chem* 247:1106-1113.
- Stroth U, Meffert S, Gallinat S, Unger T. 1998. Angiotensin II and NGF differentially influence microtubule proteins in PC12W cells: role of the AT₂ receptor. *Brain Res Mol Brain Res* 53:187-195.
- Tamura N, Doolittle LK, Hammer RE, Shelton JM, Richardson JA, Garbers DL. 2004. Critical roles of the guanylyl cyclase B receptor in endochondral ossification and development of female reproductive organs. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:17300-17305.
- Timmermans PBMW, Wong PC, Chiu AT, Herblin WF, Benfield P, Carini DJ, Lee RJ, Wexler RR, Saye JAM, Smith RD. 1993. Angiotensin II receptors angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacol Rev* 45:205-251.
- Tsutsumi K, Saavedra JM. 1991. Characterization and development of angiotensin II receptor subtypes (AT₁ and AT₂) in rat brain. *Am J Physiol* 261:R209-R216.
- Tsutsumi K, Seltzer A, Saavedra JM. 1993. Angiotensin II receptor subtypes and angiotensin converting enzyme in the fetal rat brain. *Brain Res.* 631:212-220.
- Tsuzuki S, Eguchi S, Inagami T. 1996. Inhibition of cell proliferation and activation of protein tyrosine phosphatase mediated by angiotensin II type 2 (AT₂) receptor in R3T3 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 228:825-830.
- Vervoort VS, Beachem MA, Edwards PS, Ladd S, Miller KE, de Mollerat X, Clarkson K, DuPont B, Schwartz CE, Stevenson RE, Boyd E, Srivastava AK. 2002. AGTR2 mutations in X-linked mental retardation. *Science* 296:2401-2403.
- Von Bohlen und Halbach O, Walther TB, Albrecht D. 2001. Genetic deletion of angiotensin AT₂ receptor leads to increased cell number in different brain structures of mice. *Regul Pept* 99: 209-216.
- Von Bohlen, Halbach O, Albrecht D. 2006. The CNS renin-angiotensin system. *Cell Tissue Res* 326: 599-616.
- Welsh JP, Harvey JA. 1998. Acute inactivation of the inferior olive blocks associative learning. *Eur J Neurosci* 10:3321-32.
- Wilcox JN, Augustine A, Goeddel DV, Lowe DG. 1991. Differential regional expression of three natriuretic peptide receptor genes within primate tissue. *Mol Cell Biol* 11:3454-3462.
- Wiggins AK, Shen PJ, Gundlach AL. 2003. Atrial natriuretic peptide expression is increased in rat cerebral cortex following spreading depression: possible contribution to sd-induced neuroprotection. *Neuroscience.* 118: 715-726.
- Wright JW, Harding JW. 1995. Brain angiotensin receptor subtypes AT₁, AT₂, and AT₄ and their functions. *Regul Pept* 59:269-295.
- Yan C, Kim D, Aizawa T, Berk BC. 2003. Functional interplay between angiotensin II and nitric oxide. Cyclic GMP as a key mediator. *Artheroscler Thromb Vasc Biol* 23:26-36.
- Zielinski B, Berdowska I, Seweryn E, Ceremuga I, Banas T. 2001. Effect of angiotensin II on protein phosphorylation in PC12 cell line. *Folia Histochem Cytobiol.* 39 Suppl 2:156-157.