

La oxitocina media la natriuresis inducida por la adrenomedulina administrada centralmente

Oxytocin mediates natriuresis induced by central administration of adrenomedullin

EMILIA DÍAZ^A, ANITA ISRAEL^{A,*}

Resumen

El sistema adrenomedulinérgico cerebral es uno de los sistemas que participan en la regulación del balance hidromineral. La administración central de adrenomedulina (AM) aumenta la presión arterial, produce natriuresis, liberación de oxitocina y vasopresina desde el núcleo paraventricular hipotalámico. La evidencia indica que la oxitocina es una hormona natriurética. Por ello, estudiamos el papel de la oxitocina como posible efector humoral de la natriuresis inducida por la administración intracerebroventricular (ICV) de AM en ratas euvoémicas, mediante el uso del atosiban (AT), un antagonista selectivo de los receptores de oxitocina. El péptido natriurético auricular (PNA) fue propuesto como la hormona efectora que media la acción de la AM sobre el volumen urinario y la excreción de sodio. Considerando la premisa de que un incremento en la excreción urinaria del GMPc es consecuencia de un aumento en los niveles plasmáticos de PNA, evaluamos esta posibilidad. Nuestros resultados muestran que la administración central de AM produjo diuresis a las 3 y 6 horas y un aumento en la excreción urinaria de sodio y de potasio a las 1, 3 y 6 horas. El AT no alteró el efecto diurético, pero inhibió la natriuresis y kaliuresis inducidas por la AM. No se observaron cambios en la excreción urinaria de GMPc posteriores a la administración de la AM-ICV, lo que indica que la administración de AM-ICV no está asociada a la liberación hacia la circulación del péptido natriurético auricular. Nuestros hallazgos apoyan el papel de la oxitocina como efector de la acción natriurética mediada por el sistema adrenomedulinérgico cerebral.

Palabras Clave: Adrenomedulina, atosiban, natriuresis, oxitocina

Abstract

Brain adrenomedulinergic system is one of the systems that participate in the regulation of hydromineral balance. Central adrenomedullin (AM) administration increases blood pressure, produces natriuresis, and releases oxytocin and vasopressin from the hypothalamic paraventricular nucleus. Evidence indicates that oxytocin is a natriuretic hormone. Therefore, we studied the role of oxytocin as a possible humoral effector of the natriuresis induced by intracerebroventricular administration of AM in euvolemic rats, through the use of atosiban (AT), a selective oxytocin receptor antagonist. Atrial natriuretic peptide (ANP) was proposed as the effector hormone that mediates the action of AM on urinary volume and sodium excretion. Considering the premise that an increase in urinary excretion of cGMP is a consequence of an increase in plasma PNA levels, we evaluated this possibility. Our results show that central administration of AM produced a diuretic effect at 3 and 6 hours and an increase in urinary sodium and potassium excretion at 1, 3 and 6 hours. AT did not alter the diuretic effect, but inhibited natriuresis and kaliuresis induced by AM. No changes were observed in urinary excretion of cGMP after administration of AM-ICV, indicating that AM-ICV administration is not associated with the release to the circulation of atrial natriuretic peptide. Our results support the role of oxytocin as an effector of the natriuretic action mediated by the cerebral adrenomedullinergic system.

Key words: Adrenomedullin, atosiban, natriuresis, oxytocin

^A Laboratorio de Neuropeptidos, Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela. e-mail: astern88@gmail.com.

* Correspondencia: Apartado Postal 50176, Sabana Grande 1050A, Caracas, Venezuela.

Introducción

La adrenomedulina (AM) es un péptido ubicuo de 52 residuos de aminoácidos en el humano y de 50 residuos de aminoácidos en la rata que originalmente fue identificado en los extractos del feocromocitoma y además es producido en numerosos órganos y en el sistema nervioso central (SNC) (Hinson y col., 2000). Diversos estudios han indicado que la AM tiene múltiples efectos fisiológicos que contribuyen a respuestas homeostáticas. Así, la AM es considerada actualmente como un potente péptido vasoactivo porque la administración periférica del péptido disminuye la presión arterial; además inhibe el flujo urinario, disminuye la ingesta de alimentos y suprime la actividad gástrica, inhibe la secreción de endotelina, produce vasodilatación, diuresis, natriuresis, broncodilatación, regula el crecimiento y proliferación celular (Takahashi y col., 1994; Saita y col., 1998; Cases y Moramacia, 2001; Beltowski y Jamroz, 2004; Takey y col., 2004).

Las funciones de la AM son mediadas a través de la unión del péptido a sus receptores, los cuales son heterodímeros constituidos por el receptor similar al receptor de calcitonina (CRLR) y una de las proteínas accesorias, las proteínas que modifica la actividad del receptor (RAMP). Las proteínas RAMPs controlan el transporte y estado de glicosilación del CRLR, el cual se correlaciona con el fenotipo del receptor. 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 del péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP), constituido por CRLR y RAMP1 (Zimmermann y col., 1996; Belloni y col., 1999; Kuwasako y col., 2011).

Parte de las acciones fisiológicas de la AM podrían estar mediadas a través del sistema nervioso central (SNC). Efectivamente, se ha demostrado que la AM y los componentes de su receptores se encuentran altamente expresada y ampliamente distribuida en el SNC; todas las células las células cerebrovasculares, neuronas y glías secretan AM, 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 como en el órgano subfornical y el área postrema, así como en el cerebelo (Serrano y col., 2002; Juaneda y col., 2003; Serrano y col., 2003; Macchi y col., 2006). En relación a los receptores de AM, Sone y col. (1997) demostraron sitios de unión específicos a la AM en varias regiones del cerebro humano como la 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 co-localización del CRLR con RAMP1 en el caudado putamen y núcleo amigdaloides, y con el RAMP2 en los plexos coroides ventricular y en la pared de los vasos sanguíneos.

La evidencia demuestra que existe en el cerebro un sistema adrenomedulinérgico activo. Así, la AM está involucrada anatómicamente y funcionalmente con estructuras del sistema nervioso central relacionadas con los circuitos osmorreguladores y vías que integran áreas efectoras de la función renal. Todos los componentes del sistema adrenomedulinérgico se encuentran en núcleos circunventriculares responsables de la percepción de la sed. Así está presente este sistema en núcleos hipotalámicos relacionados con la actividad simpática renal mediada por la percepción de la deshidratación. Más aún, la AM en el núcleo supraóptico (NSO) y NPV estimula las neuronas. La administración ICV de AM causa hipertensión y taquicardia (Saita y col., 1998; Takei y col., 2004; Taylor y col., 2005), altera la ingesta de agua, el apetito por la sal, la ingesta de alimentos. Aún más, la administración ICV de AM inhibe la ingesta de agua en ratas estimuladas mediante restricción de agua durante la noche (Murphy y Samson, 1995). Además de estas acciones se sabe que la AM ejerce efectos sobre la liberación de hormonas que a su vez pueden alterar el balance hidromineral. Efectivamente, la administración ICV de AM aumenta la expresión del ARNm del c-fos y la proteína FOS en áreas del hipotálamo que incluyen los NSO y NPV, los cuales contienen las neuronas productoras de oxitocina y vasopresina (Serino y col., 1999; Ueta y col., 1995, 2000; Hashimoto y col., 2012). Aún más, la AM administrada centralmente activa neuronas de oxitocina (OX) (Serino y col., 1999; Ueta y col., 2000), y causa una elevación de los niveles plasmáticos de OX en ratas (Serino y col., 1999, White y Samson, 2009). Estos efectos parecen estar mediados por los receptores AM y CGRP (Takahashi y col., 1994; Murphy y Samson, 1995; Samson y Murphy, 1997; Saita y col., 1998; Serino y col., 1999; Taylor y col., 2005).

La oxitocina es un nonapéptido sintetizado en los NSO y NPV del hipotálamo que es liberada a la circulación desde terminales nerviosos de la hipófisis posterior (Baribeau y Anagnostou, 2015). Se han identificado receptores para OX en muchos tejidos, entre los que se encuentran el riñón, el corazón, el timo, el páncreas, los adipositos y el miometrio (Gimpl y Fahrenholz, 2001). La OX ejerce acciones fisiológicas durante el parto estimulando las contracciones uterinas y posteriormente en la eyección de la leche. Sin embargo, su localización a concentraciones similares en la hipófisis y en el plasma circulante de animales machos, indica que la OX ejerce otras acciones además de las descritas. De hecho, resultados de estudios recientes vinculan a esta hormona en procesos tales como el aprendizaje, la memoria, y la conducta sexual y materna (Meyer-Lindenberg y col., 2011), además de la regulación de la homeostasis hidromineral (Gutkoswska y col., 2000; McCann y col., 2003).

Existe evidencia experimental que ha permitido establecer una relación entre la AM, la liberación hipotalámica de OX y la consecuente secreción del péptido natriurético auricular (PNA). Este último es una hormona producida y liberada desde el corazón, con demostrados efectos diuréticos y natriuréticos. En este sentido, en experimentos en los que se induce expansión de volumen mediante la administración de solución salina isosmótica o hiperosmótica, los cuales desencadenan la estimulación de los baroreceptores ubicados en las arterias, se ha demostrado que el aumento de la concentración plasmática del péptido natriurético auricular se asocia a la liberación de oxitocina (Haanwinckel y col., 1995; McCann y col., 2003).

Igualmente, la inyección intravenosa de OX incrementa los niveles plasmáticos de PNA en forma dependiente de la dosis, y la administración intraperitoneal de OX a ratas con sobrecarga de agua induce natriuresis, kaliuresis, e incrementa la osmolaridad urinaria que se acompaña con incrementos plasmáticos de PNA (Windle y col., 1997). Estos efectos parecen estar mediados exclusivamente por el receptor de la OX, ya que la natriuresis inducida por la administración de AVP u OX a dosis fisiológicas, en ratas conscientes, no involucra a ninguno de los subtipos de receptores de vasopresina, V1/V2, sin embargo la respuesta a la OX puede ser bloqueada por antagonistas de sus receptores (Balment y col., 1984; Verbalis y col., 1991). El mecanismo primario que desencadena el incremento en los niveles circulantes del PNA no está esclarecido hasta el presente, posiblemente sea de naturaleza multifactorial, de forma que podría involucrar la acción sobre el corazón de hormonas como la vasopresina y/o de la oxitocina. En apoyo a este planteamiento se ha demostrado que en las ratas hipofisectomizadas se produce la eliminación total de la respuesta natriurética y diurética frente a la expansión de volumen, asociada a retención de sodio y a la caída en la presión sanguínea (Dietz y Nazian, 1990).

Todo lo anterior parece indicar que, tanto la OX como el PNA se encuentran involucrados en la respuesta fisiológica renal a la administración central de AM específicamente en su participación en el control hidromineral (Gutkoswska y col., 2000; Mecawi y col., 2015). Por ello, planteamos la hipótesis que la OX constituye uno de los efectores de la respuesta natriurética que ocurre tras la administración central de AM.

Materiales y métodos

ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Se utilizaron ratas machos de la cepa Sprague-Dawley, entre 200 y 250 g de peso corporal procedentes del bioterio de la Facultad de Farmacia de la UCV, las cuales se mantuvieron con agua y alimento estándar para animales de laboratorio (Ratarina®) *ad libitum*. Los experimentos fueron realizados siguiendo las buenas prácticas para el manejo de animales de laboratorio (NIH, 1996) y la aprobación del Comité de Bioterio de la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela.

CANULACIÓN INTRACEREBROVENTRICULAR (ICV)

Los animales fueron canulados, bajo anestesia con pentobarbital sódico (40 mg/kg, i.p.), mediante el uso de un aparato estereotáxico (David Kopf Instruments®) (Severs y col., 1970). Como cánula se utilizó una aguja hipodérmica de 20 GA, 4 mm de longitud y que se colocó en el ventrículo lateral izquierdo, a 1 mm caudal a la sutura coronal y a 1,5 mm lateral a la sutura sagital. La administración ICV de los diferentes tratamientos se realizó con una inyectora Hamilton, acondicionada para permitir su adecuada penetración a través de la cánula. En todos los casos, se confirmó la canulación *post mortem* mediante administración de 5 µl de solución colorante Fast Green (Sigma Chemicals Co., MO, USA) incluyendo aquellos animales en los que se observó una distribución uniforme en los ventrículos cerebrales.

Los animales de experimentación fueron divididos al azar en cuatro grupos experimentales para la administración de los tratamientos a seguir: Grupo 1: Solución Fisiológica (NaCl 0,9%), 5 µl ICV;

Grupo 2: AM (100 pmol/5µl); Grupo 3: Atosiban, 500 µg/kg, s.c., 30 minutos antes del inicio del experimento, 1 minuto antes de AM y 3 hr después; Grupo 4: Atosiban + AM. El atosiban es un antagonista de los receptores de oxitocina, compuesto sintético, de fórmula: [Mpa¹, D-Tyr (Et)², Thr⁴, Orn⁸] oxitocina.

DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE Na⁺ Y K⁺ URINARIO

La cantidad de sodio y potasio en las muestras de orina recolectadas se determinó por fotometría de llama. Los resultados se expresan en µEq/ml de orina y corregidos por peso corporal (µEq/ml/100 g.p.c.).

EFFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN CENTRAL DE AM SOBRE LA EXCRECIÓN URINARIA DE GMPc

Los animales fueron canulados intracerebroventricularmente tres días antes del experimento y fueron divididos en los siguientes grupos: Control (n=5), solución fisiológica, 5µl ICV y adrenomedulina (n=7) 100 pmol/5µl, ICV. Se siguió con el mismo protocolo para la recolección de orina y se determinó el contenido de GMPc urinario.

DETERMINACIÓN DE GMPc URINARIO

Se recolectaron las muestras de orina a diferentes períodos según el protocolo para la determinación de la excreción urinaria de GMPc. El contenido de GMPc se cuantificó por radioinmunoensayo (RIA) utilizando para ello un paquete comercial (Amersham® International plc, UK). El método se fundamenta en la competencia que se establece entre el GMPc no marcado de la muestra y una cantidad fija de GMPc marcado con ³H, por su unión a un anticuerpo altamente específico para éste nucleótido. La cantidad de GMPc

unido al anticuerpo es inversamente proporcional a la cantidad de GMPc presente en la muestra. Brevemente, las muestras a una dilución 1:10 en solución buffer Tris/EDTA (50 mM Tris/HCl, 4 mM EDTA, pH 7.5), se incubaron en hielo con 50 µl de ³H-GMPc y 50 µl de anticuerpo específico para GMPc por 90 minutos (volumen final: 200 µl). Se separó el GMPc unido al anticuerpo por precipitación con (NH₄)₂SO₄ y posterior centrifugación (12000 rpm/5 min a 4°C). Se descartó el sobrenadante y los precipitados fueron reconstituidos con agua destilada a la que se les añadió 1 ml de líquido de centelleo. La radioactividad se cuantificó mediante espectrometría de centelleo líquido (Packard® Tricarb 2700TR). La cantidad de GMPc fue calculada utilizando una curva estándar (rango de 0 a 4 pmol/tubo). Los resultados son expresados en picomoles por mililitro de orina por 100 gramos de peso corporal (pmol/100 g.p.c.).

Análisis estadístico

Todos los resultados se expresan como la media más o menos el error estándar de la media ($x \pm E.E.M.$). La significancia de las diferencias de las medias entre los distintos tratamientos, se obtuvieron utilizando el análisis de varianza (ANOVA) de una vía y el rango estadístico de Student-Newman-Keuls. Se consideró como estadísticamente significativos los valores de p menores de 0,05 ($p < 0,05$).

Resultados

EFFECTO DEL ATOSIBAN SOBRE LA RESPUESTA URINARIA A LA ADMINISTRACIÓN CENTRAL DE AM

En la **figura 1** se muestran los efectos del atosiban sobre el volumen urinario, la excreción urinaria de sodio y potasio y la relación sodio/potasio. El volumen urinario está expresado en ml/100g de p.c.

de rata de la orina recolectada a la 1, 3 y 6 horas después de la administración ICV de solución salina o AM, en ratas tratadas o no con atosiban. La administración central de AM incrementó el volumen urinario a las 3 y 6 horas. El pre-tratamiento con atosiban no alteró la diuresis inducida por la AM. La administración central de AM produjo un aumento significativo de la excreción urinaria de sodio y de potasio a las 1, 3 y 6 horas. El atosiban inhibió el efecto natriurético y kaliurético, en todos los períodos de recolección. La relación sodio/potasio no sufrió cambios significativos por el pretratamiento con el antagonista (n=8 por grupo).

EFFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN CENTRAL DE AM SOBRE LA EXCRECIÓN URINARIA DE GMPc

La administración central de AM (100 pmol/5µl) no alteró la excreción urinaria de GMPc a los diferentes períodos de recolección de orina (Tabla I).

Tabla I.

Efecto de la administración central de la adrenomedulina sobre los niveles urinarios de GMPc

Tiempo de recolección	GMPc (pmol /ml/100g)	
	Control	AM
1 hora	25,14 ± 2,22	18,94 ± 1,14
3 horas	66,64 ± 15,63	52,21 ± 5,62
6 horas	110,66 ± 23,0	103,15 ± 15,92

Discusión

Los cambios en el comportamiento son integrados en el sistema nervioso central, las aferencias neurales de los mecanorreceptores monitorean los cambios en la presión sanguínea y el volumen circulante, casi simultáneamente modulan la actividad simpatoexcitatoria

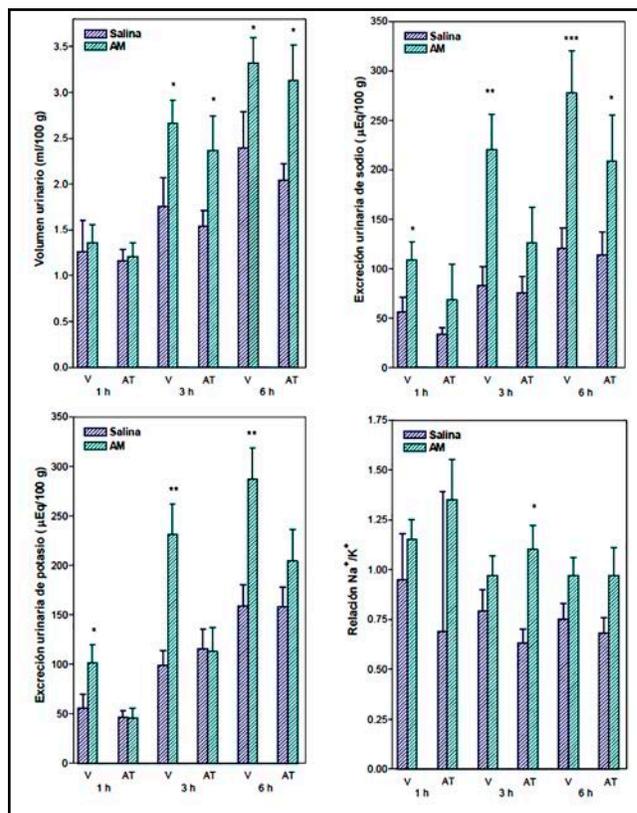


Figura 1: Efecto del atosiban sobre la respuesta urinaria a la administración central de AM. Los resultados se expresan como la medias ± E.E.M. de n= 8 animales por grupo. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, comparado con su basal. V: vehiculo; AT: atosiban.

y simpatoinhibitoria de los núcleos cerebrales produciendo efectos en el gasto cardíaco y la resistencia vascular periférica. En paralelo las respuestas renales son activadas para modular la excreción de sodio y agua, lo cual ocurre por efectos directo de elementos neurales y mecanismos renales intrínsecos, así como por respuestas mediadas por el sistema neuroendocrino (Mecawi y col., 2015). Uno de los sistemas neurohumorales que participa de estos mecanismos compensatorios tanto a nivel central como periférico, es el sistema adrenomedulinérgico cerebral, cuyo efector principal es la adrenomedulina, por lo que le confiere un papel relevante en el control de la homeostasis de fluidos y electrolitos (Antunes-Rodrigues y col., 1996).

La administración central de AM tiene efectos marcados sobre la hidratación corporal y el equilibrio hidromineral. Así, la AM-ICV inhibe la ingesta de agua y el apetito por la sal (Murphy y Samson, 1995; Samson y Murphy, 1997); además produce diuresis, natriuresis y kaliuresis (Israel y Díaz, 2000) y la liberación desde la neurohipófisis de dos hormonas, la oxitocina y la vasopresina (Ueta y col., 1995; Serino y col., 1999; Ueta y col., 2000; White and Samson, 2009), ambas hormonas con acciones claras sobre la excreción urinaria de agua y sal, lo que plantea que dichas hormonas podrían estar vinculadas con el papel funcional del sistema adrenomedulinérgico cerebral en el control del balance hidromineral del organismo. Adicionalmente, se demostró la coexistencia de la AM y la OX en el NSO y NPV en ratas (Hashimoto y col., 2012), lo que sugiere que la AM ejerce acciones autocrinas y paracrinas en dichas estructuras del hipotálamo involucradas con la regulación hidroelectrolítica.

La oxitocina es una hormona que participa en el control del balance hidromineral, y su administración a dosis fisiológicas en ratas conscientes produce un incremento significativo de la excreción urinaria de sodio (Verbalis y col., 1991). De igual manera, se ha demostrado que el corazón de la rata es un sitio de almacenaje y liberación de oxitocina, donde también se expresan los receptores de dicha hormona (Jankowski y col., 1998). La acción natriurética de la oxitocina podría estar mediada a través de su acción directa sobre el riñón, o indirecta a través de la estimulación de los receptores de oxitocina cardíacos (Gutkowska y col., 1997). Nuestros resultados apoyan esta posibilidad ya que demuestran que el efecto natriurético y kaliurético inducido por la administración central de AM es completamente

bloqueado por un antagonista del receptor a oxitocina, el atosiban. La participación de los receptores renales de oxitocina en su acción renal fue demostrado en ratas infundidas con solución salina hipertónica, donde la oxitocina incrementa la excreción urinaria de sodio y el flujo urinario y esta acción fue inhibida por tres antagonistas del receptor de oxitocina (Windle y col., 1997). En conjunto estos hallazgos parecen indicar que la estimulación del sistema adrenomedulinérgico cerebral a través de la acción del péptido efector de este sistema, la adrenomedulina, estimula la liberación de oxitocina, hormona que actuaría como efector periférico estimulando los receptores de oxitocina renal y mediando así las acciones centrales de la AM.

La AM en el SNC ejerce diversas funciones, entre las que se destaca la modulación neuroendocrina. Se conocen algunas de estas funciones endocrinas de la AM administrada centralmente en animales conscientes. La administración ICV de AM incrementa los niveles plasmáticos de ACTH, el cortisol y el PNA en ovejas (Charles y col., 1998). La administración intravenosa de la AM incrementa los niveles plasmáticos del PNA (Radeemarker y col., 1997) y la AM es capaz de suprimir la expresión del gen del PNA en cardiomiocitos de rata (Sato y col., 1997), lo que indica la existencia de una interrelación entre ambos péptidos, AM y PNA. Si esto es así, se puede postular que los mecanismos subyacentes a los efectos urinarios de la AM podrían estar relacionados, en parte, con el incremento en los niveles plasmáticos de PNA. La mayoría de las acciones biológicas del PNA están mediadas por la estimulación de la guanilil ciclasa (GC-A) y el subsecuente incremento intracelular del 3'-5' monofosfato guanosina (GMPc); por ello este segundo mensajero ha

sido considerado como marcador de la liberación y acción del PNA. Numerosos estudios han indicado que el principal mecanismo mediante el cual el PNA induce sus efectos renales implica a un receptor acoplado a la guanilil ciclasa particulada (receptor PNA-A/GC-A) localizado en las células tubulares del riñón y la acumulación intracelular de GMPc (Anand-Srivastava y Trachte, 1993; Wedel y Garbers, 1997; Soares y col., 1999). El riñón es una rica fuente de guanilil ciclasa particulada sensible a PNA (Sagnella y col., 1992) y la determinación de los niveles de GMPc urinario se ha utilizado ampliamente como marcador biológico de la actividad renal de este péptido. El incremento de los niveles de GMPc activaría proteínas kinasas dependientes de GMPc (PKG), que producirían el cierre de los canales de sodio, lo que a su vez induciría natriuresis (Misono, 2002; Tremblay y col., 2002). Por lo tanto la excreción urinaria de GMPc, constituye un índice indirecto de la acción renal del PNA. Adicionalmente, se ha demostrado en ratones transgénicos carentes del receptor GC-A, que la infusión de PNA no es capaz de incrementar la excreción urinaria de agua y sodio (Kishimoto y col., 1996), sugiriendo que la señalización a través de GC-A/GMPc es indispensable para la función regulatoria del PNA sobre el balance de los fluidos y electrolitos (McCann y col., 2003). Contrario a lo postulado por nosotros, nuestros resultados en los que se muestra que la AM-ICV no altera los niveles de GMPc urinario, indica que la liberación del PNA a la circulación y el consecuente incremento en los niveles urinarios de GMPc, no constituyen la vía efectora de la acción diurética y natriurética de la AM-ICV. Lo que nos lleva a especular que la oxitocina liberada por la administración central de AM, podría estar actuando directamente en el control hidromineral a través de mediadores que son capaces de

generar aumento en los niveles de otros segundos mensajeros en varios sistemas biológicos, cuya identidad queda por determinar.

En conclusión, el presente estudio permite sugerir que la estimulación del sistema adrenomedulinérgico cerebral a través de la acción del péptido efector de este sistema, la adrenomedulina, estimula la liberación de oxitocina. Este neuropéptido, al interactuar de forma selectiva con su receptor a nivel renal podría inducir el incremento en la excreción urinaria de sodio y potasio.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Sr. Banny Caraballo por su ayuda técnica en los experimentos. Este trabajo fue subvencionado por el CDCH-UCV y el Proyecto de Estímulo a la Investigación PEI No. 20122000760.

Referencias bibliográficas

- Anand-Srivastava M, Trachte G. 1993. Atrial natriuretic factor receptors and signal transduction mechanisms. *Pharmacol Rev* 45 (4): 455-449.
- Antunes-Rodrigues J, Favaretto AL, Ballejo G, Gutkowska J, McCann SM. 1996. ANP as a neuroendocrine modulator of body fluid homeostasis. *Rev Bras Biol* 56: 221-31.
- Balment RJ, Brimble MJ, Forsling ML, Musabayane CT. 1984. Natriuretic response of the rat to plasma concentration of arginine-vasopressin whitening the physiological range. *J Physiol* 352: 517-526.
- Baribeau DA, Anagnostou E. 2015. Oxytocin and vasopressin: linking pituitary neuropeptides and their receptors to social neurocircuits. *Front Neurosci* 9: 335.
- Belloni A, Andreis P, Meneghelli V, Champion H, Kadowitz P, Coy D, Murphy W, Nussdorfer G. 1999. Adrenomedullin and calcitonin gene-related peptide (CGRP) interact with a common receptor of the CGRP1 subtype

- in the human adrenal zona glomerulosa. *Endocr Res* 25: 29–34.
- Beltowski J, Jamroz A. 2004. Adrenomedullin - What do we know 10 years since its discovery? *Pol J Pharmacol* 56: 5–27.
- Cases A, Mora-Macía J. 2001. Adrenomedulina: un nuevo péptido vasoactivo. *Nefrología XXI* (1): 16–25.
- Charles CJ, Rademaker MT, Richards AM, Cooper GJ, Coy DH, Nicholls MG. 1998. Hemodynamic, hormonal, and renal effects of intracerebroventricular adrenomedullin in conscious sheep. *Endocrinology* 139(4): 1746–1751.
- Dietz JR, Nazian SJ. 1990. Studies on the role of the pituitary in the control of atrial natriuretic factor secretion and sodium excretion. *Proc Soc Exp Biol Med* 194: 232–239.
- Gimpl G, Fahrenholz F. 2001. The oxytocin receptor system: Structure, function and regulation. *Physiol Rev* 8(2): 629–683.
- Gutkowska J, Jankowski M, Mukaddam-Daher S, McCann SM. 2000. Oxytocin is a cardiovascular hormone. *Brazilian J Med Biol Res* 33: 625–633.
- Gutkowska J, Jankowski M, Mukaddam-Daher S, McCann SM, Chantal L, Zingg HH, McCann SM. 1997. Oxytocin release atrial natriuretic peptide by combining with oxytocin receptors in the heart. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 11704–11709.
- Haanwinckel M, Elias LK, Favaretto ALV, Gutkowska J, McCann SM, Antunes-Rodrigues J. 1995. Oxytocin mediates atrial natriuretic peptide release and natriuresis after volume expansion in the rat. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 7902–7906.
- Hashimoto H, Uezono Y, Ueta Y. 2012. Pathophysiological function of oxytocin secreted by neuropeptides: A mini review. *Pathophysiology* 19(4): 283–298.
- Hinson JP, Kapas S, Smith DM. 2000. Adrenomedullin, a multifunctional regulatory peptide. *Endocr Rev* 21(2):138–167.
- Jankowski M, Haljar F, Al Kawas S, Mukaddam-Daher S, Hoffman G, McCann S, Gutkowska J. 1998. Rat heart: A site of oxytocin production and action. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 14558–14563.
- Juaneda C, Dumont Y, Chabot JG, Fournier A, Quirion R. 2003. Adrenomedullin receptor binding sites in rat brain and peripheral tissues. *Eur J Pharmacol* 474(2-3): 165–174.
- Israel A, Díaz E. 2000. Diuretic and natriuretic action of adrenomedullin administered intracerebroventricularly in conscious rats. *Regulatory Peptides* 89(1-3): 13–18.
- Kishimoto I, Dubois S, Garbers D. 1996. The heart communicates with the kidney exclusively through the guanylyl cyclase-A receptor: acute handling of sodium and water in response to volume expansion. *Proc Natl Acad Sci* 93: 6215–6219.
- Kuwasaki K, Kitamura K, Nagata S, Hikosaka T, Takei Y, Kato J. 2011. Shared and separate functions of the RAMP-based adrenomedullin receptors. *Peptides* 32(7): 1540–1550.
- Macchi V, Porzionato A, Belloni AS, Stecco C, Parenti A, De Caro R. 2006. Immunohistochemical mapping of adrenomedullin in the human medulla oblongata. *Peptides* 27(6): 1397–404.
- McCann SM, Gutkowska J, Antunes-Rodrigues J. 2003. Neuroendocrine control of body fluid homeostasis. *Braz J Med Biol Res* 36(2): 165–181.
- Meyer-Lindenberg A, Domes G, Kirsch P, Heinrichs M. 2011. Oxytocin and vasopressin in the human brain: social neuropeptides for translational medicine. *Nat Rev Neurosci* 12: 524–538.
- Mecawi Ade S, Ruginsk SG, Elias LL, Varanda WA, Antunes-Rodrigues J. 2015. Neuroendocrine Regulation of hydromineral homeostasis. *Compr Physiol* 5(3): 1465–516.
- Misono K. 2002. Natriuretic peptide receptor: structure and signaling. *Mol Cell Biochem* 230: 49–60.
- Murphy TC, Samson WK. 1995. The novel vasoactive hormone, adrenomedullin, inhibits water drinking in the rat. *Endocrinology* 136(6): 2459–2463.
- NIH Guide for the care and use of animals. Institute of Laboratory Animal Resources.

- National Research Council. National Academy Press: Washington DC, USA. 1996.
- Rademaker MT, Charles CJ, Lewis LK, Yandle TG, Cooper GJ, Coy DH, Richards AM, Nicholls MG. 1997. Beneficial hemodynamic and renal effects of adrenomedullin in an ovine model of heart failure. *Circulation* 96(6): 1983–1990.
- Sagnella G, Singer D, Markandu N, Buckley M, McGregor G. 1992. Is atrial natriuretic peptide guanosine 3'-5'-cyclic monophosphate coupling a determinant of urinary sodium excretion in essential hypertension? *J Hypertens* 10: 349–354.
- Saita M, Shimokawa A, Kunitake T, Kato K, Hanamori T, Kitamura K, Eto T, Kannan H. 1998. Central actions of adrenomedullin on cardiovascular parameters and sympathetic outflow in conscious rats. *Am J Physiol* 274(4 Pt 2): R979–984.
- Sato A, Canny BJ, Autelitano DJ. 1997. Adrenomedullin stimulates cAMP accumulation and inhibits atrial natriuretic peptide gene expression in cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 230(2): 311–314.
- Samson WK, Murphy TC. 1997. Adrenomedullin inhibits salt appetite. *Endocrinology* 138(2): 613–616.
- Serino R, Ueta Y, Hara Y, Nomura M, Yamamoto Y, Shibuya I, Hattori Y, Kitamura K, Kangawa K, Russell JA, Yamashita H. 1999. 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* 140(5): 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. 2002. Adrenomedullin in the central nervous system. *Microsc Res Tech* 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. 2003. Distribution of immunoreactivity for the adrenomedullin binding protein, complement factor H, in the rat brain. *Neuroscience* 116: 947–949.
- Severs WB, Summy-Long J, Taylor JS, Connor JD. 1970. A central effect of angiotensin: release of pituitary pressor material. *J Pharmacol Exp Ther* 174: 27–34.
- Soares TJ, Coimbra TM, Martins AR, Pereira AGF, Carnio EC, Branco LGS, Albuquerque-Araujo WIC, Nucci G, Gutkowska J, McCann SM, Antunes-Rodrigues J. 1999. Atrial natriuretic peptide and oxytocin induce natriuresis by release of GMPc. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 278–283.
- Sone M, Takahashi K, Satoh F, Murakami O, Totsune K, Ohneda M, Sasano H, Ito H, Mouri T. 1997. Specific adrenomedullin binding sites in the human brain. *Peptides* 18(8): 1125–1129.
- Takahashi H, Watanabe TX, Nishimura M, Nakanishi T, Sakamoto M, Yoshimura M, Komiyama Y, Masuda M, Murakami T. 1994. Centrally induced vasopressor and sympathetic responses to a novel endogenous peptide, adrenomedullin, in anesthetized rats. *Am J Hypertens* 7(5): 478–482.
- Takei Y, Inoue K, Ogoshi M, Kawahara T, Bannai H, Miyano S. 2004. Identification of novel adrenomedullin in mammals: a potent cardiovascular and renal regulator. *FEBS Lett* 556(1-3): 53–58.
- Taylor MM, Bagley SL, Samson WK. 2005. Intermedin/adrenomedullin-2 acts within central nervous system to elevate blood pressure and inhibit food and water intake. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288(4): R919–927.
- Tremblay J, Desjardins R, Hum D, Gutkowska J, Hamet P. 2002. Biochemistry and physiology of the natriuretic peptide receptor guanylyl cyclases. *Mol Cell Biochem* 230: 31–47.
- Ueda T, Ugawa S, Saishin Y, Shimada S. 2001. Expression of receptor-activity modifying protein (RAMP) mRNAs in the mouse brain. *Brain Res Mol Brain Res* 93(1): 36–45.
- Ueta Y, Kitamura K, Isse T, Shibuya I, Kabashima N, Yamamoto S, Kangawa K, Matsuo H, Eto T, Yamashita H. 1995. Adrenomedullin-immunoreactive neurons in the paraventricular and supraoptic

- nuclei of the rat. *Neurosci Lett* 202(1-2): 37–40.
- Ueta Y, Serino R, Shibuya I, Kitamura K, Kangawa K, Russell JA, Yamashita H. 2000. A physiological role for adrenomedullin in rats; a potent hypotensive peptide in the hypothalamo-neurohypophysial system. *Exp Physiol* 85 Spec No: 163S–169S.
- Verbalis JG, Mangione MP, Stricker M. 1991. Oxytocin produces natriuresis in rats at physiological plasma concentration. *Endocrinology* 128: 1317–1322.
- Wedel B, Garbers D. 1997. New insights on the functions of the guanylyl cyclase receptor. *FEBS Lett* 410: 29–33.
- Windle RJ, Judah JM, Forsling MI. 1997. Effect of oxytocin receptor antagonists on the renal actions of oxytocin and vasopressin in the rat. *J Endocrinol* 151: 257–264.
- White MM, Samson WK. 2009. A possible relationship between brain-derived adrenomedullin and oxytocin in the regulation of sodium balance. *J Endocrinol* 203(2): 253–262.
- Zimmermann U, Fischer J, Frei K, Fischer A, Reinscheid R, Muff R. 1996. Identification of adrenomedullin receptors in cultured rat astrocytes and in neuroblastoma x glioma hybrid cell (NG 108-15). *Brain Res* 724: 238–245.