

Efecto de la adrenomedulina sobre la actividad de las enzimas antioxidantes cerebelosas

Effect of adrenomedullin on antioxidant enzymes activity in cerebellum

LETICIA FIGUEIRA Y ANITA ISRAEL

Resumen

La adrenomedulina (AM) es un péptido de 52 residuos de aminoácidos que participa en la regulación de la función cardiovascular. En el cerebelo de la rata existen todos los componentes del sistema adrenomedulinérgico. El receptor de la AM se expresa en regiones localizadas y está formado por el receptor-similar al receptor de calcitonina (CRLR) y la proteína que modifica la actividad del receptor (RAMP) 2 ó 3, denominados receptor AM1 y AM2, respectivamente. Adicionalmente, la AM presenta afinidad por el receptor del péptido relacionado con el gen de la calcitonina 1 (CGRP1), compuesto por CRLR + RAMP1. Se ha reportado que la AM ejerce efectos antioxidantes. Sin embargo, se conoce poco acerca del papel de la AM cerebelosa en la regulación del metabolismo de las especies reactivas de oxígeno. Por ello, se evaluó el efecto de la AM sobre la producción de productos de peroxidación lipídica que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBARS) y sobre la actividad de las enzimas antioxidantes, catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx) y superóxido dismutasa (SOD) en el vermis de cerebelo de ratas *Sprague-Dawley*, así como los receptores que median dicha acción. Igualmente, se estudió la posible interacción entre la AM y la angiotensina II (ANG II) en la regulación de la producción de los TBARS y la actividad de las enzimas antioxidantes cerebelosas, así como la participación de la vía NAD(P)H oxidasa/PKC y de la PKA en la acción de la AM y ANG II. Nuestros hallazgos muestran que la AM redujo y la ANG II incrementó la producción de TBARS y la actividad basal de la CAT, GPx y la SOD en el vermis de la rata. De igual forma la AM antagonizó parcialmente el incremento de la actividad de las enzimas antioxidantes inducidas por la ANG II. El efecto de la AM fue mediado por la PKA mientras que el efecto de la ANG II por la vía PKC/NAD(P)H oxidasa, ya que el pretratamiento con PKI-(6-22)-amida fue capaz de revertir el efecto inhibitorio de la AM sobre la actividad de las enzimas antioxidantes sin afectar la acción de la ANG II; mientras que la apocinina y la chelitrina inhibieron exclusivamente la acción de la ANG II. El efecto de la AM fue mediado a través de los receptores de CGRP₁ y AM, pues fue completamente inhibido tras el pretratamiento con CGRP₈₋₃₇ y AM22-52. Nuestros resultados apoyan el papel de la AM como regulador de la actividad de las enzimas antioxidantes en el cerebelo de la rata, y sugieren un posible papel funcional de la AM cerebelosa.

Palabras clave: Adrenomedulina, cerebelo, apocinina, chelitrina, angiotensina II.

Abstract

Human adrenomedullin (AM) is a 52-amino acid peptide involved in cardiovascular control. AM has two specific receptors formed by the calcitonin-receptor-like receptor (CRLR) and receptor activity-modifying protein (RAMP) 2 or 3. These are known as AM1 and AM2 receptors, respectively. In addition, AM has appreciable affinity for the calcitonin gene-I related peptide receptor (CGRP1), composed of CRLR and RAMP1. In brain, AM and their receptors are expressed in several localized regions, including the cerebellum. AM has been reported as an antioxidant. Little is known about the role of AM in the regulation of cerebellar metabolism of reactive oxygen species. Therefore, we assessed the effect of AM on TBARS production and the activity of three antioxidant enzymes: catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) and superoxide dismutase (SOD), in the vermis of the cerebellum of male *Sprague Dawley* rats. In addition, we assessed the role of ANG II, AM receptor subtypes receptor, PKA activity and the PKC/NAD(P)H oxidase pathway in the AM action. Our findings demonstrate that in cerebellum, AM decreased and ANG II increased TBARS production and CAT, GPx and SOD basal activity. Likewise, AM antagonized ANG II-induced increased antioxidant enzyme activity. AM action was mediated through PKA activity, while ANG II induced stimulation through PKC/NAD(P)H oxidase pathway, since iPKA blunted AM action and apocynin and chelitrine reverted ANG II action. In addition, AM₂₂₋₅₀ and CGRP₈₋₃₇ blunted AM-induced decrease of antioxidant enzymes activity indicating that AM-induced decrease of antioxidant enzymes activity is mediated through stimulation of both, AM and CGRP₁, receptors. Our results support the role of AM in the regulation of cerebellar antioxidant enzyme activity and suggest a physiological role for AM in cerebellum.

Key words: Adrenomedullin, cerebellum, apocynin, chelitrine, angiotensin II.

Laboratorio de Neuropeptidos. Facultad de Farmacia. Universidad Central de Venezuela. Caracas-Venezuela.

* Correspondencia: Apartado Postal 50176, Sabana Grande 1050A, Caracas, Venezuela. E-mail: astern88@gmail.com

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 al que se le han atribuido importantes funciones en la regulación de la función cardiovascular a través de efectos tanto a nivel periférico como central. Diversos estudios han indicado que la AM cumple diversas acciones biológicas entre las que se incluyen hipotensión, vasodilatación, inhibición de la secreción de endotelina, diuresis, natriuresis, broncodilatación, regulación del crecimiento y proliferación celular (Cases y col., 2001; Beltowski y col., 2004).

Las funciones de la AM son mediadas a través de la unión del péptido a sus receptores, los cuales están constituidos por el receptor similar al receptor de calcitonina (CRLR) y una de las proteínas accesorias, las proteínas que modifica la actividad del receptor (RAMP). Los receptores específicos de la AM, AM1 y AM2, están formados por el CRLR con RAMP2 y CRLR con RAMP3, respectivamente. Asimismo, la AM ejerce diversas acciones a través de su unión con el receptor del péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP₁), constituido por CRLR y RAMP1 (Zimmermann y col., 1996; Belloni y col., 1999).

La AM y los componentes de sus receptores se encuentran expresados en diferentes órganos y tejidos como la glándula suprarrenal, corazón, riñón, pulmón, aorta, páncreas, intestino delgado, hígado, bazo, tiroides, testículo, vasos sanguíneos, células endoteliales y de músculo liso, entre otros (Kitamura y col., 1993; Eguchi y col., 1994; Sakata y col., 1994). A nivel del sistema nervioso central, se ha demostrado que la AM se encuentra presente y ampliamente distribuida en el cerebro humano y de animales como ratas, ratones y sapo; evidenciándose en regiones como la corteza frontal, temporal, occipital, bulbo olfatorio accesorio y principal, en las áreas posterior, medial dorsal, lateral y ventral del núcleo olfatorio, núcleo accumbens y la estría terminal, área septal, caudado-putamen, tubérculo olfatorio, pálido ventral, banda diagonal de Broca, globo pálido, sustancia innominata, hipocampo, amígdala, tálamo, hipotálamo, mesencéfalo, bulbo raquídeo, órganos circumventriculares como en el órgano subfornical y el área postrema y 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 el hipocampo, núcleo accumbens, tubérculo olfatorio, caudado putamen, corteza cerebral, cerebelo y epéndimo ventricular. Por su parte, el ARNm de RAMP2 se encuentra en regiones como hipocampo, bulbo olfatorio, plexos coroides de los ventrículos cerebrales, cerebelo y vasos sanguíneos. Por su parte, el ARNm del RAMP3 se demostró en la corteza cerebral, tálamo y cerebelo. Evidenciándose la colocalización del CRLR con RAMP1 en el caudado putamen y núcleo amigdaloides, y con el RAMP2 en los plexos coroides ventricular y en la pared de los vasos sanguíneos.

A nivel del cerebelo, pocos han sido los estudios que se han llevado a cabo con la AM, los estudios en animales de experimentación han demostrado la presencia de sitios de unión a la AM e inmunoreactividad a la AM en cerebelo de ratas normotensas (Sakata y col., 1994; Sone y col., 1997; Serrano y col., 2003), así como la expresión del CRLR, RAMP2 y RAMP3 a este nivel (Chakravarty y col., 2000; Uezono y col., 2001). Igualmente, la inmunoreactividad a la AM se ha evidenciado en los núcleos lateral, interpósito y medial cerebelar; así como en las capas molecular, de las células de Purkinje y en la granular de la corteza cerebelar (Serrano y col., 2002).

Aunque la distribución de los sitios de unión de la AM en el sistema nervioso central ha sido bien documentada, su presencia en el cerebelo así como los mecanismos de señales de transducción de los receptores de este péptido en el mismo no han sido clarificados y se conoce todavía menos de los segundos mensajeros intracelulares relacionados con sus acciones biológicas. Al respecto, la AM ha demostrado tener efecto sobre la producción de radicales libres, pues es capaz de disminuir la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) mediada por NAD(P)H oxidasa, a través de la inhibición de la actividad de la enzima (Rahman y col., 2006). De igual manera, se ha demostrado que la AM posee propiedades protectoras contra el daño a órganos producidos por condiciones fisiopatológicas, mediante la inhibición del estrés oxidativo. El mecanismo que subyace a esta actividad varía dependiendo de la célula. En células mesangiales, la AM suprime la producción de EROs a través de la vía AMPc/PKA, mientras que en el ventrículo de la rata, la AM inhibe la NAD(P)H oxidasa a través de la vía NO/GMPc. Por otra parte, se ha descrito que la AM inhibe la estimulación de la NAD(P)H oxidasa inducida por ANG II en células de músculo liso (Liu y col., 2007).

Con el fin de aportar evidencias acerca del papel de la AM cerebelosa, en el presente trabajo se evaluó el posible papel de las enzimas antioxidantes en la

acción de la AM cerebelosa y los posibles mecanismos involucrados en dicha acción.

Materiales y métodos

ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Se emplearon ratas macho Sprague-Dawley de 250 g, provenientes del Bioterio del Instituto Nacional de Higiene Dr. Rafael Rangel. Los animales fueron mantenidos en jaulas a temperatura ambiente con ciclos de 12 horas luz / oscuridad. La dieta de los animales consistió en Ratarina® y agua *ad libitum*. Los experimentos fueron realizados siguiendo las buenas prácticas para el manejo de animales de laboratorio (NIH Guide, 1996) y la aprobación del Comité de Bioterio de la Facultad de Farmacia de la UCV. Las ratas se sacrificaron por decapitación, los cerebros fueron extraídos y el vermis del cerebelo se disecó mediante microdissección bajo control estereomicroscópico y mantenido en Buffer Krebs-Ringer (KBR) burbujeado con 95% O₂ y 5% CO₂. Posteriormente, cada muestra fue preincubada a 37°C en presencia o ausencia de los antagonistas o inhibidores y posterior estimulación con el agonista. El vermis cerebeloso fue homogenizado mediante sonicación en buffer fosfato 10 mM pH 7,0 –triton al 1%, centrifugado a 10.000 rpm durante 30 min y el sobrenadante recolectado fue utilizado como muestra.

ENSAYO DE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA CATALASA (CAT)

La actividad de la CAT fue determinada empleando una modificación del método de Aebi (1984). Para ello, se añadió 25 µL del homogenizado de cerebelo a 725 µL de la mezcla de incubación (10 mM H₂O₂ en buffer fosfato 10 mM a pH 7) y se monitoreó el cambio de absorbancia a 240 nm a los 0, 60, 120 y 180 segundos, utilizando la constante de reacción de primer orden (k) como la unidad de actividad de la CAT ($k = (1/t) (2,3 \times \log A_1/A_2)$), donde t es el intervalo de tiempo medido (seg), A₁ y A₂ son las absorbancias del H₂O₂ en los tiempos t₁ y t₂. Los resultados se expresaron en actividad específica.

ENSAYO DE LA ACTIVIDAD DE LA SUPERÓXIDO DISMUTASA TOTAL (SOD)

La actividad de la SOD se determinó por la capacidad de esta enzima de inhibir la reducción del azul de nitrotetrazolio (NBT) a formazán a 595 nm, por los aniones superóxido generados por el sistema de la xantina-xantina oxidasa (Oberley y col., 1984). Para ello, se mezclaron 166 µL de la mezcla de incubación (xantina 0,3 mM, EDTA 0,6 mM, NBT 150mM, albúmina 0,1% y NaHCO₃ 400 mM) con 33 µL del homogeneizado del vermis del cerebelo. La reacción se inició con la adición de 10 µL de la enzima xantina

oxidasa. Los tubos se incubaron durante 30 minutos, seguidos de la adición de 66 µL CuCl₂ 2H₂O 0,8 mM que detuvo la reacción y se midió la absorbancia a 595 nm. Los resultados se expresaron como actividad específica. Una unidad de SOD se define como la cantidad de SOD necesaria para inhibir en un 50% la formación de los cristales de formazán.

ENSAYO DE LA ACTIVIDAD DE LA GLUTATIÓN PEROXIDASA (GPx)

La actividad de la GPx de las muestras fue determinada de forma indirecta de acuerdo al método descrito por Flohé y col. (1984), mediante una reacción acoplada con la GSH-Rx. El método se basa en determinar la disminución de la absorbancia a 340 nm debido a la desaparición de NAD(P)H. Los resultados fueron expresados como la actividad específica de la enzima en U/mg de proteína, donde 1 U=µmol de NAD(P)H oxidado/min.

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PRODUCTOS DE PEROXIDACIÓN LIPÍDICA QUE REACCIONAN CON EL ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS)

La concentración de los productos de peroxidación lipídica que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBARS) fue evaluada por un método colorimétrico descrito por Ohkawa y col. (1979), el cual consiste en evaluar el efecto de las especies reactivas de oxígeno (EROs) sobre los lípidos, que resulta en la producción de varias sustancias que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico y que pueden ser medidas por espectrofotometría. Para ello, muestras de homogeneizado del vermis de cerebelo fueron tratadas con ácido tricloroacético al 10% y centrifugadas a 1.600 g durante 15 min a 4 °C. Seguidamente, el sobrenadante fue incubado con ácido tiobarbitúrico 0,67% durante 10 min a 100 °C. Paralelamente se construyó una curva patrón con malonildialdehído. Se determinó la densidad óptica a 532 nm y la concentración de los productos de peroxidación lipídica fueron calculados y expresados como malonildialdehído formado. Los resultados de los TBARS fueron expresados como nmol/mg de proteínas del tejido.

DETERMINACIÓN DE LAS PROTEÍNAS TISULARES

Las proteínas tisulares totales fueron determinadas por el método de Lowry y col. (1951), utilizando albúmina sérica de bovino como patrón.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados fueron expresados como la media ± E.E.M. La significancia de los resultados fue analizada mediante el análisis de varianza de una vía (ANOVA) y la prueba de Bonferroni. Un valor de $p < 0,05$

fue considerado significativo. El análisis de los resultados y la elaboración de los gráficos se realizaron empleando el programa Graph Pad Prism versión 5.1.

Resultados

EFFECTO DE LA AM SOBRE LA ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES EN EL VERMIS CEREBELOSO DE LA RATA. PAPEL DE LA ANGIOTENSINA II

Se evaluó el efecto de la AM sobre la actividad de las enzimas antioxidantes SOD, CAT y GPx en el vermis cerebelar de la rata. Como se observa en la figura 1, la incubación del tejido con AM (2×10^{-7} M), redujo significativamente la actividad de las tres enzimas antioxidantes evaluadas. Por su parte la ANG II (2×10^{-7} M), incrementó significativamente dichas actividades y a su vez revirtió la disminución de la actividad de las enzimas antioxidantes inducidas por la AM.

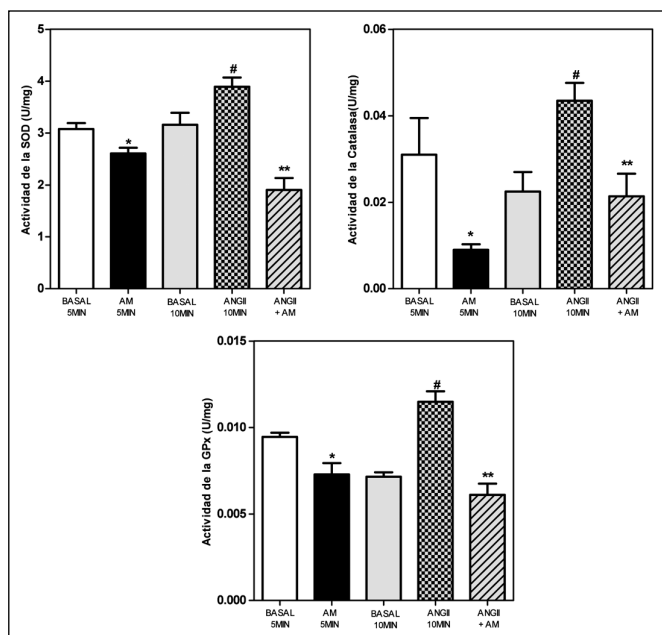


Figura 1. Efecto de la AM y ANG II sobre la actividad de las enzimas antioxidantes, SOD, CAT y GPx en el vermis de cerebelo de la rata. El vermis cerebelar fue incubado con AM (2×10^{-7} M durante 5 min), ANGII (2×10^{-7} M durante 10 min) y AM+ANGII (2×10^{-7} M). Los resultados fueron expresados como la media \pm EEM. * $p < 0,05$ vs. control (Basal 5 min). # $p < 0,001$ vs. control (Basal 10min). (N=11). ** $p < 0,001$ vs. ANGII.

EFFECTO DE LA AM Y ANG II SOBRE LA PRODUCCIÓN DE TBARS EN EL VERMIS CEREBELAR DE LA RATA

Se evaluó el efecto de la AM y ANG II sobre la producción de TBARS en el vermis cerebelar de la rata. Como se observa en la figura 2, la incubación del vermis cerebelar con AM (2×10^{-7} M) durante 10 min, disminuyó significativamente la producción de TBARS ($5,48 \pm 0,44$ vs. $4,07 \pm 0,30$ Basal 10min vs. AM

10min), en las ratas con respecto a su basal ($p < 0,05$, N=6). Ahora bien, la incubación del vermis cerebelar con ANG II (2×10^{-7} M), incrementó significativamente la producción de TBARS ($5,48 \pm 0,44$ vs. $7,36 \pm 0,77$; Basal 10min vs. ANG II 10min).

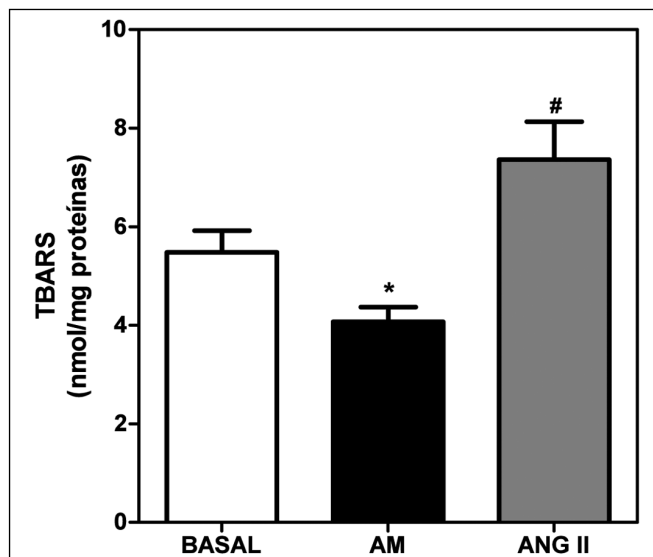


Figura 2. Efecto de la AM y ANG II sobre la producción de TBARS en el vermis de cerebelo de la rata. El vermis cerebelar fue incubado con AM o ANG II (2×10^{-7} M) durante 10 min. Los resultados fueron expresados como la media \pm EEM. * $p < 0,05$ vs. control (Basal 10 min) (N=6).

PAPEL DE LA NADP(H) OXIDASA, LA PKA Y LA PKC EN LA ACCIÓN DE LA AM Y LA ANG II SOBRE LA ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES EN EL VERMIS DEL CEREBELO DE LA RATA

Se evaluó el papel de la NADP(H) oxidasa y la proteína quinasa C (PKC) en la acción de la AM y la ANGII sobre la actividad de las enzimas antioxidantes. Tal y como se muestra en las figuras 3 y 4, la AM (2×10^{-7} M) redujo y la ANG II (2×10^{-7} M) incrementó significativamente la actividad de las tres enzimas antioxidantes ($p < 0,0001$). La preincubación del vermis cerebelar con apocinina (1×10^{-4} M), un inhibidor de la NAD(P)H oxidasa, o con la chelerritrina ($6,5 \mu\text{M}$), un inhibidor de la PKC, no alteró el efecto reductor de la actividad de las enzimas antioxidantes (SOD, CAT y GPx) inducida por la AM, pero bloqueó completamente la acción estimuladora de la ANG II sobre dichas actividades enzimáticas.

Por otra parte, al evaluar el posible papel de la proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA) sobre la acción de la AM y ANGII sobre la actividad de las enzimas antioxidantes, observamos que la preincubación con un inhibidor de la PKA (PKI-(6-22)-amida) ($20 \mu\text{M}$), bloqueó completamente el efecto inhibitorio de la AM sobre la actividad de las enzimas antioxidantes y no alteró el efecto estimulador de la ANG II (Fig. 5).

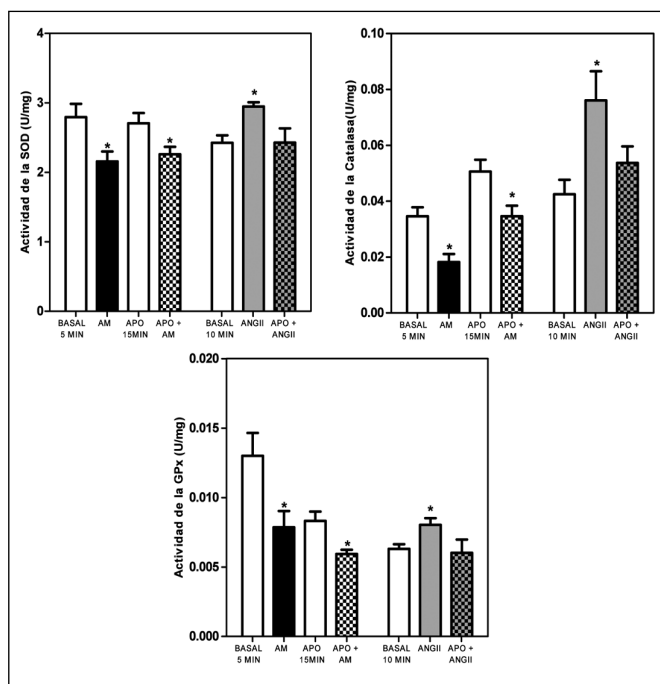


Figura 3. Efecto de la apocinina sobre el efecto inducido por la AM y ANG II sobre la actividad de las enzimas antioxidantes, SOD, CAT y GPx en el vermis de cerebelo de la rata. El vermis cerebelar fue incubado con apocinina (1×10^{-4} M) durante 15 min en presencia o ausencia de AM (2×10^{-7} M) durante 5 min o ANGII 2×10^{-7} M durante 10 min. Los resultados fueron expresados como la media \pm EEM. (N=9). * $p < 0,0001$ vs. respectivo control.

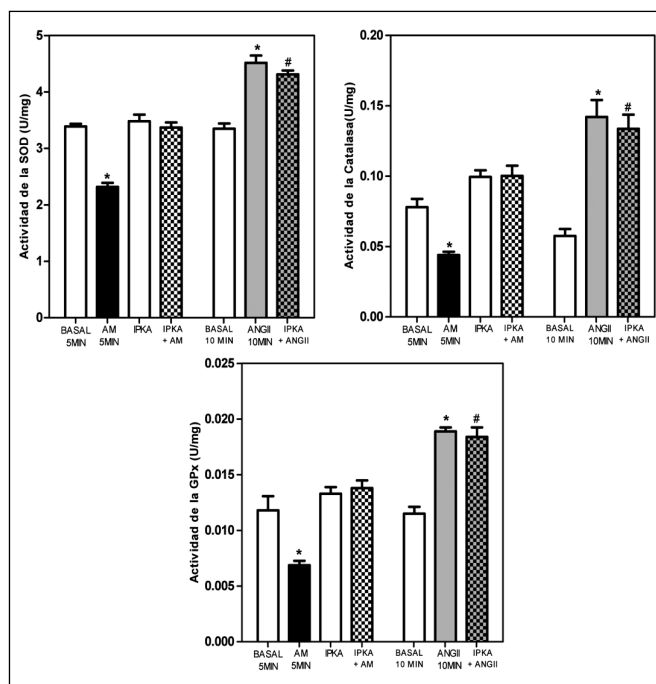


Figura 5. Efecto del inhibidor de la PKA (iPKA) sobre el efecto inducido por la AM y ANG II sobre la actividad de las enzimas antioxidantes, SOD, CAT y GPx en el vermis de cerebelo de la rata. El vermis cerebelar fue incubado con iPKA ($20 \mu\text{M}$) durante 15 min en presencia o ausencia de AM (2×10^{-7}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

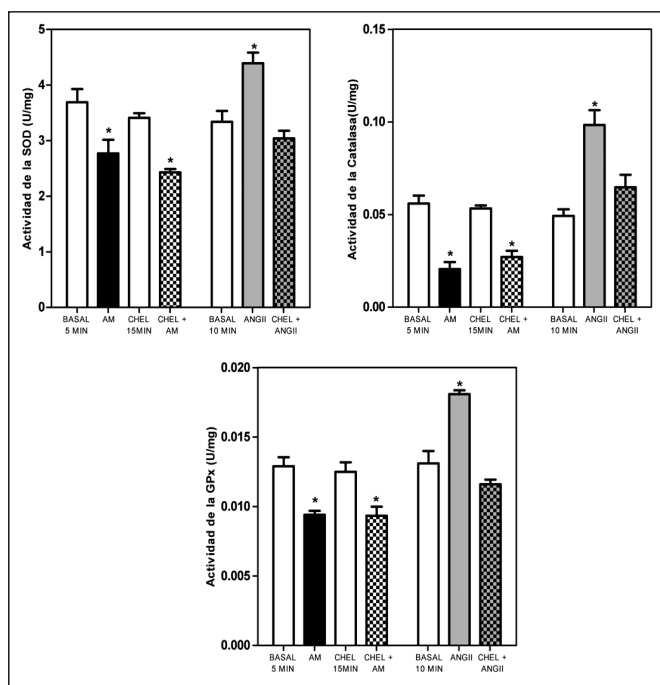


Figura 4. Efecto de la chelitrina sobre el efecto inducido por la AM y ANG II sobre la actividad de las enzimas antioxidantes, SOD, CAT y GPx en el vermis de cerebelo de las ratas. El vermis cerebelar fue incubado con chelitrina ($6,5 \mu\text{M}$) durante 15 min en presencia o ausencia de AM (2×10^{-7} M) durante 5 min o ANGII (2×10^{-7} M) durante 10 min. Los resultados fueron expresados como la media \pm EEM. (N=8). * $p < 0,0001$ vs. respectivo control.

SUBTIPOS DE RECEPTORES QUE MEDIAN LA ACCIÓN DE LA AM SOBRE LA ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES Y LA PRODUCCIÓN DE TBARS EN EL CEREBELO DE LA RATA

Se evaluó la posible participación de los subtipos de receptores de AM en la acción de la AM sobre la actividad de las enzimas antioxidantes, SOD, CAT y GPx y la producción de TBARS. Como se observa en la figura 6 el pretratamiento con la AM₂₂₋₅₂ y CGRP₈₋₃₇, antagonista de los receptores de AM y CGRP₁, respectivamente previno el efecto reductor inducido por la AM sobre la actividad de las enzimas antioxidantes (N=31, * $p < 0,001$), así como el efecto reductor inducido por la AM sobre la producción de TBARS (N=6 * $p < 0,05$) (Fig. 7).

Discusión

Es conocido que diversas formas de estrés celular constituyen las señales primarias que son traducidas en el citoplasma celular y alteran la expresión de genes específicos a nivel del núcleo. Una de esas formas de estrés celular es la producción de EROs (Kunsch y col., 1999). Se ha identificado que células como las endoteliales, fibroblastos y células de músculo liso producen EROs a niveles relativamente bajos en respuesta a señales de activación celular; por lo que estas moléculas actúan como segun-

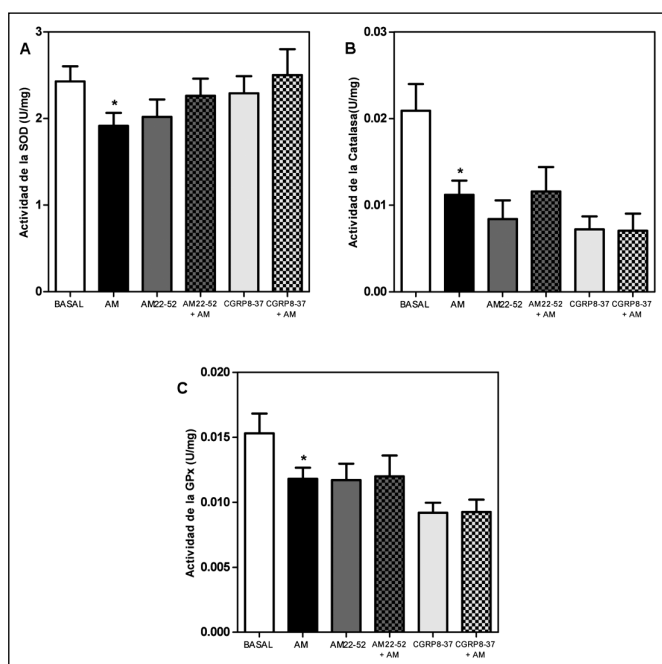


Figura 6. Subtipos de receptores de AM involucrados en la disminución de la actividad de las enzimas antioxidantes, SOD (Panel A), CAT (Panel B) y GPx (Panel C) inducida por la AM en el vermis de cerebelo de la rata. El vermis cerebelar fue preincubado con AM₂₂₋₅₂ ($1 \times 10^{-6} \text{M}$) o CGRP₈₋₃₇ ($1 \times 10^{-6} \text{M}$) durante 10 min en presencia y ausencia de AM ($2 \times 10^{-7} \text{M}$) durante 5 min. Los resultados fueron expresados como la media \pm EEM. (N=31). * $p < 0,0001$ vs. control (Basal 5 min).

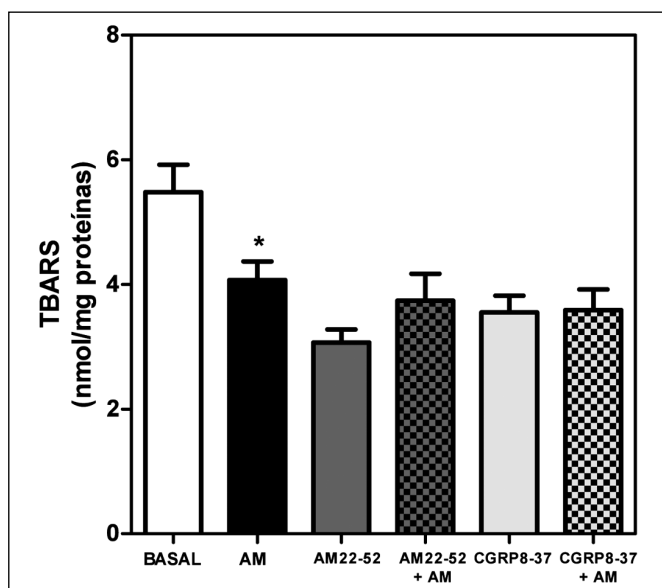


Fig. 7. Subtipos de receptores de AM involucrados en la disminución de la producción de TBARS inducida por la AM en el vermis de cerebelo de ratas Sprague-Dawley. El vermis cerebelar fue preincubado con AM₂₂₋₅₂ ($1 \times 10^{-6} \text{M}$) o CGRP₈₋₃₇ ($1 \times 10^{-6} \text{M}$) durante 15 min en presencia y ausencia de AM ($2 \times 10^{-7} \text{M}$) durante 10 min. Los resultados fueron expresados como la media \pm EEM. * $p < 0,05$ vs. control (Basal 10 min) (N=6).

dos mensajeros para regular las vías de transducción que controlan en última instancia la expresión génica, estando además implicadas en una variedad de enfermedades entre las que se incluyen la hiperten-

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

Adicionalmente, las EROs pueden afectar múltiples vías de señalización aguas arriba de los factores de transcripción nuclear, incluyendo señales de modulación de calcio, proteínas quinasas y fosfatasa (Kunsch y col., 1999). De hecho, la evidencia muestra que las EROs están involucradas en la señalización intracelular, mediante la activación de receptores de tirosina quinasas y no tirosina quinasas, inhibiendo fosfatasa de tirosina, incrementando la actividad de quinasas regulatorias, incluyendo la PKC y PKA (Hongpaisan y col., 2004) y regulando la homeostasis del calcio intracelular (Griendling y col., 2000^A; Droge, 2002). Asimismo, las EROs están implicadas en mecanismos de señalización que involucran la activación de las MAPK, incluyendo a las ERK1/2 o p42/p44, las JNK y la p38 MAPK (Griendling y col., 2000^{A,B}; Yoshizumi y col., 2001).

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

Se han identificado diversas fuentes intracelulares productoras de EROs, como la NAD(P)H oxidasa, SON desacoplada, ciclooxigenasa, lipooxigenasa, xantina oxidasa, cadena de transporte de electrones mitocondrial, entre otros (Higashi y col., 2009). La NAD(P)H oxidasa, la enzima que cataliza la reducción del oxígeno molecular a anión superóxido, ha sido reportada como la principal fuente de EROs en la vasculatura. La ANG II constituye uno de los principales activadores de la NAD(P)H oxidasa en el cerebro y en tejidos periféricos (Griendling y col., 2000^A), siendo el anión superóxido y el peróxido de hidrógeno segundos mensajeros intracelulares importantes que median muchas de las acciones de la ANG II (Griendling y col., 2000^{A,B}; Zimmerman y col., 2002). Así, se ha reportado que numerosos efectos de la ANG II

en el músculo liso vascular, son mediados a través de la generación de EROs, ya que son inhibidos por la apocinina, un inhibidor de la NAD(P)H oxidasa (Fellner y col., 2005) o por la sobreexpresión de la CAT (Ushio-Fukai y col., 1996; Liu y col., 2007).

Por otra parte, la AM es un péptido con efectos pleiotrópicos que incluyen crecimiento celular, migración, apoptosis, inflamación, angiogénesis y secreción de hormonas. Se ha descrito, que ratones heterocigotos para la AM presentan inflamación perivascular en arterias coronarias y un incremento del estrés oxidativo sistémico y local, el cual es revertido con la suplementación de AM, lo que indica que la AM juega un papel protector contra el estrés oxidativo actuando como un antioxidante endógeno *in vivo*. En efecto, la AM ha sido descrita como una sustancia antioxidante endógena pues es citoprotectora contra el daño a órganos (Shimosawa y col., 2002; Nishimatsu y col., 2002).

De acuerdo a lo anterior, la estimulación aguda con AM de la vía de la NAD(P)H oxidasa-enzimas antioxidantes debería estar disminuida, mientras que la estimulada por la ANG II debería estar incrementada. Nuestros resultados apoyan esta aseveración. En efecto, demostramos, por primera vez, que la AM disminuyó la actividad de las enzimas antioxidantes, SOD, CAT y GPx en el vermis de cerebelo de la rata, tal y como lo han reportado otros investigadores en otros órganos como riñón e hígado (Yurekli y col., 2009; Cikcikoglu y col., 2010). La disminución en la actividad de las enzimas sugiere que la AM es capaz de disminuir la producción de EROs, pues la disminución de la actividad de las enzimas antioxidantes se acompañó de una disminución en la producción de productos de peroxidación lipídica. De hecho, se ha descrito que la AM tiene propiedades antioxidantes pues la AM reduce la sobreproducción de EROs (Ando y col., 1998, 2004) y dichos efectos pueden proteger a diferentes órganos del daño inducido por estresores (Dogru y col., 2007), sugiriendo que la AM posee acciones protectoras contra la respuesta vascular al daño, posiblemente a través de la inhibición de la producción del estrés oxidativo (Kawai y col., 2004).

Por otra parte, nuestros resultados demostraron que la estimulación aguda con ANG II incrementó la actividad de las enzimas antioxidantes en el vermis de cerebelo de la rata; lo cual sugiere que la ANG II incrementa la producción de EROs en el vermis de cerebelo de la rata, ya que este efecto estuvo asociado además a un incremento en la producción de productos de peroxidación lipídica inducida por la ANG II. El incremento de las EROs inducida por la ANG II a su vez puede activar diversas vías de señalización a nivel del vermis cerebelar. De hecho, diversos estudios

han indicado que la activación de las ERK1/2 y subsecuente expresión de genes en las células de músculo liso vascular inducida por la ANG II es inhibida con el pretratamiento con antioxidantes (Frank y col., 2001), sugiriendo su señalización redox sensible.

Existe evidencia que indica que la AM ejerce efectos contrarreguladores de las acciones inducidas por la ANG II a diversos niveles y localizaciones, ya que es capaz de disminuir el incremento en la expresión de genes redox sensibles como la molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1), molécula de adhesión celular vascular-1 (VCAM-1) y la expresión de genes como la proteína quimiotáctica de monocitos-1 (MCP-1), inducidos por la ANG II en células endoteliales de aorta de rata siendo dicho efecto mediado por la vía dependiente de receptor y de AMPc-PKA (Yoshimoto y col., 2005). Igualmente, se ha demostrado este efecto inhibitorio de la AM sobre la contracción y proliferación celular en células quiescentes de músculo liso de aorta inducida por la ANG II, es mediado a través de la vía AMPc/PKA (Rossi y col., 2006^{A,B}), así como el depósito de colágeno en las arterias coronarias inducida por la ANG II (Tsuruda y col., 2005).

Nuestros resultados en el vermis cerebeloso ratifican este efecto inhibitorio de la AM, ya que ésta fue capaz de inhibir el efecto estimulador inducido por la ANG II en la actividad de las enzimas antioxidantes. En forma similar, Yoshimoto y col., (2005), encontraron que la AM fue capaz de disminuir el incremento en la producción de EROs, inducido por la ANG II en células endoteliales de aorta de rata. Este efecto parece estar mediado por la vía dependiente de receptor y de AMPc-PKA (Yoshimoto y col., 2004). Efectivamente, la AM con su potente acción antioxidante inhibe la activación JNK redox sensible y la expresión de genes como la MCP-1 y Nox1 inducido por la ANG II, sugiriendo que la AM juega un papel protector como un antioxidante endógeno en el daño vascular inducido por la ANG II.

Diversas son las vías que podrían mediar la acción inhibitoria de la AM sobre la acción estimuladora de la ANG II sobre la actividad de las enzimas antioxidantes en el vermis de cerebelo de ratas. Nuestros resultados apuntan hacia la mediación de la PKA, ya que el pretratamiento con PKI-(6-22)-amida, un inhibidor de la PKA, fue capaz de revertir el efecto inhibitorio de la AM sobre la actividad de las enzimas antioxidantes sin afectar la acción de la ANG II, tal y como lo han reportado otros estudios en otros tejidos (Shimosawa y col., 2002; Yoshimoto y col., 2004).

Desde que el iPKA no afectó la acción de la ANG II, su efecto sobre las enzimas antioxidantes podría estar mediado a través de la vía de la NAD(P)H oxida-

sa/PKC. Efectivamente nuestros resultados apoyan esta posibilidad ya que demuestran que el pretratamiento con apocinina y chelitrina, inhibidores de la NAD(P)H oxidasa y PKC, respectivamente, bloquearon completamente el efecto de la ANG II sobre la actividad de las enzimas antioxidantes en el vermis cerebelar y no afectaron la acción inhibitoria de la AM. En apoyo a nuestros hallazgos diversos estudios a nivel central y periférico han indicado que la generación intracelular de EROs estimulada por ANG II es mediada a través de la vía de la NAD(P)H oxidasa (Griendling y col., 2000^{A,B}; Ushio-Fukai y col., 1996; Lassegue y col., 2003). Efectivamente, la microinyección de difenileneiodonio (DPI) u oligonucleótidos antisentido a las subunidades p22phox o p47phox de la NAD(P)H oxidasa en la región rostro-ventrolateral del bulbo (RVLM) previno parcialmente el incremento en la producción local de anión superóxido inducido por la ANG II (Chan y col., 2005). Asimismo, la administración de DPI y apocinina, en el RVLM o en los ventrículos cerebrales atenuó la respuesta presora a la ANG II en ratas (Chan y col., 2005). Aún más, la preincubación del tejido hipotalámico con la apocinina, inhibió completamente el efecto estimulador de la ANG II sobre la actividad de las enzimas antioxidantes: CAT, SOD y GPx (Silva y col., 2010). Por lo tanto, es plausible proponer que la cascada de la NAD(P)H oxidasa está involucrada en la señalización de la ANG II en las neuronas cerebelosas, lo que explicaría el incremento de la actividad de las enzimas antioxidantes como la CAT, SOD y la GPx.

Existe evidencia que sugiere que la NAD(P)H oxidasa periférica y central es regulada por la PKC, enzima que es activada por la ANG II (Griendling y col., 2000^{A,B}; Lassegue y col., 2003). Nuestros resultados en el que se demuestra que la chelitrina bloquea el incremento de la actividad de las tres enzimas antioxidantes estimuladas por ANG II en el cerebelo apuntan a esta posibilidad. En apoyo a nuestros hallazgos están los estudios que demuestran que el incremento en la tasa de disparo de neuronas en el hipotálamo y tallo cerebral de ratas inducido por la ANG II, o el efecto natriurético y dipsogénico de la ANG II administrada por vía intracerebroventricular son inhibidos mediante el pretratamiento con un inhibidor de la PKC (Sumners y col., 1996; Israel y col., 2009). Estos hallazgos y los presentados en el presente estudio en el vermis de cerebelo de la rata, demuestran de forma inequívoca que el incremento en la actividad de las enzimas antioxidantes inducido por la ANG II es mediado a través de la vía PKC/NAD(P)H oxidasa. En la figura 8 se propone el posible mecanismo de la vía de acción de la AM en el vermis de cerebelo de la rata.

Por su parte, el efecto antagónico entre la AM y ANG II sobre la actividad de las enzimas antioxidan-

tes sugiere la existencia de una molécula que podría interceptar la vía de señalización de la AM sobre la vía activada por la ANG II. Aun cuando en el presente estudio no se evaluó esta vía de señalización, los resultados de Liu y col. (2007) sugieren que esta molécula podría ser la Src. Efectivamente, en células de músculo liso vascular, la vía AMPc-PKA es la principal vía de señalización que media la inhibición de la producción de EROs por parte de la AM, y la PKA regula la actividad de Csk a través de su fosforilación. Por lo que la inactivación de c-Src a través de la vía Csk mediada por la PKA, podría ser un candidato a través del cual la AM intercepta la señalización de EROs estimulada por ANG II (Liu y col., 2007).

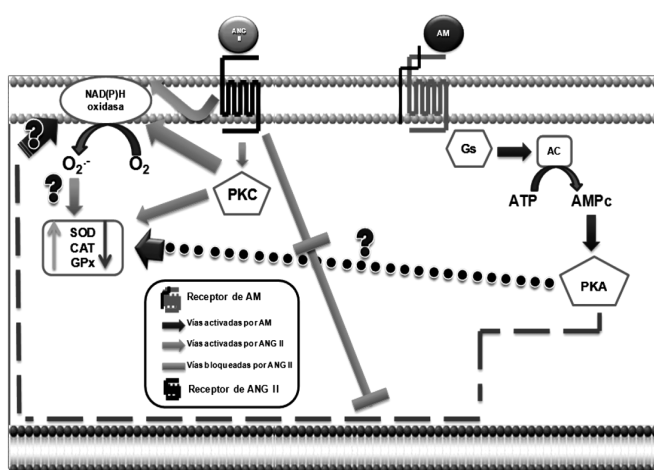


Fig. 8. Propuesta del mecanismo de la vía de acción de la AM en el vermis de cerebelo de la rata. La ANG II es capaz de incrementar la actividad de la SOD, CAT y GPx a través de una vía dependiente de PKC y NAD(P)H oxidasa. Por su parte, la AM es capaz de inhibir la actividad de dichas enzimas mediante un mecanismo dependiente de la PKA, evidenciando un efecto antagónico de la ANGII sobre la AM.

No se ha establecido hasta el presente los subtipos de receptores que median la acción de la AM sobre la actividad de las enzimas antioxidantes en el cerebelo y la producción de TBARS. Al respecto, nuestros resultados demostraron que dicho efecto es mediado a través de los receptores de CGRP₁ y AM, pues fue completamente inhibido tras el pretratamiento con CGRP₈₋₃₇ y AM₂₂₋₅₂, inhibidores de los receptores de CGRP y AM, respectivamente. Esto indica claramente que la disminución de la actividad de las enzimas antioxidantes y de la producción de TBARS inducida por la AM observadas en el vermis de cerebelo de ratas es mediado por ambos subtipos de receptores de la AM y por el receptor CGRP₁. De hecho, se ha reportado en células de músculo liso vascular de rata, que el efecto inhibitorio de la AM sobre la generación de EROs estimulada por ANG II es mediado por los receptores de AM y el receptor de CGRP (Liu y col., 2007).

En conclusión, la AM en el cerebelo participa en la regulación del estrés oxidativo por lo que se puede inferir que este péptido ejerce un papel funcional importante en esta estructura del sistema nervioso.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Sr. Banny Caraballo por su ayuda técnica en los experimentos. Este trabajo fue subvencionado por el Ministerio Popular de Ciencia Tecnología e Industrias, Proyecto Misión Ciencia, Sub-proyecto 7, ECCV N° 2007001585.

Referencias bibliográficas

- Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984. 105: 121-126.
- Ando K, Ito Y, Kumada M, Fujita T. 1998. Oxidative stress increases adrenomedullin mRNA levels in cultured rat vascular smooth muscle cells. *Hypertens Res* 21: 187-191.
- Ando K, Shimosawa T, Fujita T. 2004. Adrenomedullin in vascular disease. *Curr Hypertens Rep* 6 (1): 55-59.
- 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.
- Chakravarty P, Suthar T, Coppock H, Nicholl C, Bloom S, Legon S, Smith D. 2000. CGRP and adrenomedullin binding correlates with transcript levels for calcitonin receptor – like receptor (CRLR) and receptor activity modifying proteins (RAMPs) in rat tissues. *Br J Pharmacol* 130: 189-195.
- Chan S, Hsu K, Huang C, Wang L, Ou C, Chan J. 2005. NADPH oxidase-derived superoxide anion mediates angiotensin II-induced pressor effect via activation of p38 mitogen activated protein kinase in the rostral ventrolateral medulla. *Circ Res* 97: 772-780.
- Cikcikoglu N, Yurekli M, Yildirim N. 2010. Investigation of some antioxidant enzymes activities depending on adrenomedullin treatment and cold stress in rat liver tissue. *Turk J Biochem* 35 (2): 140-144.
- Dogru M, Kocagun D, Gul M, Esrefoglu M, Yurekli M, Erdogan S, Ates B. 2007. The effect of adrenomedullin on rats exposed to lead. *J Appl Toxic* 28 (2): 140-146.
- Droge W. 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82: 47-95.
- Eguchi S, Hirata Y, Kano H, Sato K, Watanabe Y, Watanabe T, Nakajima K, Sakakibara S, Marumo F. 1994. Specific receptors for adrenomedullin in cultured rat vascular smooth muscle cells. *FEBS Letters* 340: 226-230.
- Fellner S. 2005. Arendshorst W. Angiotensin II, reactive oxygen species, and Ca²⁺ signaling in afferent arterioles. *Am J Physiol Renal Physiol* 289: F1012-F1019.
- Ferroni P, Basili S, Paoletti V, Davi G. 2006. Endothelial dysfunction and oxidative stress in arterial hypertension. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 16: 222-233.
- Flohé L, Gunzler W. 1984. Assays of glutathione peroxidase. *Meth. Enzymol* 77: 398-404.
- Frank G, Eguchi S, Inagami T, Motley E. 2001. N-acetylcysteine inhibits angiotensin II – mediated activation of extracellular signal – regulated kinase and epidermal growth factor receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 280: 1116-1119.
- Griendling K, Sorescu D, Ushio-Fukai M. 2000^B. NAD(P)H oxidase: Role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* 86: 494-501.
- Griendling K, Ushio-Fukai M. 2000^A. Reactive oxygen species as mediators of angiotensin II signaling. *Regul Pept* 91: 21-27.
- Higashi Y, Noma K, Yoshizumi M, Kihara Y. 2009. Endothelial function and oxidative stress in cardiovascular diseases. *Circ J.* 73 (3): 411-418.
- Hongpaisan J, Winters C, Andrews B. 2004. Strong Calcium Entry Activates Mitochondrial Superoxide Generation, Upregulating Kinase Signaling in Hippocampal Neurons. *J Neurosci* 24 (48): 19878-10887.
- Israel A, Arzola J, De Jesús S, Varela M. 2009. Role of oxidative stress in the natriuresis induced by central administration of angiotensin II. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 10 (1): 9-14.
- Kawai J, Ando K, Tojo A, Shimosawa T, Takahashi K, Onozato M, Yamasaki M, Ogita T, Nakaota T, Fujita T. 2004. Endogenous adrenomedullin protects against vascular response to injury in mice. *Circulation* 109: 1147-1153.
- Kitamura K, Sakata J, Kangawa K, Kojima M, Matsuo H, Eto T. 1993. Cloning and characterization of cDNA encoding a precursor for human adrenomedullin. *Biochem Biophys Res Commun* 194:720-725.
- Krawiec Z, Biliński T, Schüller C, Ruis H. 2000. Reactive oxygen species as second messengers? Induction of the expression of yeast catalase T gene by heat and hyperosmotic stress does not require oxygen. *Acta Biochim Pol* 47 (1): 201-207.
- Kunsch C, Medford R. 1999. Oxidative stress as a regulator of gene expression in the vasculature. *Circ Res* 85: 753-766.
- Lassegue B, Clempus RE. 2003. Vascular NAD(P)H oxidase: specific features, expression, and regulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 285: R277-R297.
- Liu J, Shimosawa T, Matsui H, Meng F, Supowit S, DiPette D, Ando K, Fujita T. 2007. Adrenomedullin inhibits angiotensin II- induced oxidative stress via Csk- mediated inhibition of Src activity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292: H1714-H1721.
- Lowry O, Rosebrough N, Farr A, Randall R. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275.

- Macchi V, Porzionato A, Belloni A, Stecco C, Parenti A, De Caro R. 2006. Immunohistochemical mapping of adrenomedullin in the human medulla oblongata. *Peptides* 27: 1397-1404.
- Nishimatsu H, Shindo T, Takeuchi T, Moriyama N, Hirata Y, Kitamura T. 2002. Role of endogenous adrenomedullin in the regulation of ischemic renal injury – studies on transgenic and knockout mice of adrenomedullin gene. *J Urol* 167: 97-97.
- Oberley L, Spitz D. Assay of superoxide dismutase activity in tumor tissue. *Meth Enzymol* 1984; 105: 457-464.
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95: 351-358.
- Rahman D, Nishiyama A, Guo P, Nagai Y, Xing G, Fujisawa Y, Yan Y, Kimura S, Hosomi N, Omori K, Abe Y, Kohno. 2006. Effects of adrenomedullin on cardiac oxidative stress and collagen accumulation in aldosterone-dependent malignant hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther* 318: 1323-1329.
- Rossi F, Bertone C, Petricca S, Santemma V. 2006^A. Adrenomedullin antagonizes angiotensin II-stimulated proliferation of human aortic smooth muscle cells. *Peptides* 27 (11): 2935-2941.
- Rossi F, Zappa C, Ferraresi A, Santemma V. 2006^B. Adrenomedullin inhibits angiotensin II-induced contraction in human aortic smooth muscle cells. *Regul Pept.* 133 (1-3): 155-159.
- Sakata J, Shimokubo T, Kitamura K, Nishizono M, Iehiki Y, Kangawa K, Matsuo H, Eto T. 1994. Distribution and characterization of immunoreactive rat adrenomedullin in tissue and plasma. *FEBS Letters* 352: 105-108.
- Serrano J, Alonso D, Fernández A, Encinas J, López J, Castro-Blanco S, Fernández-Vizcarra 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: 947-962.
- Shimosawa T, Shibagaki Y, Ishibashi K, Kitamura K, Kangawa K, Kato S, Ando K, Fujita T. 2002. Adrenomedullin, an Endogenous Peptide, Counteracts Cardiovascular Damage. *Circulation* 105: 106-111.
- Silva J, Pastorello M, Arzola J, Zavala L, De Jesús S, Varela M, Matos M, Garrido M, Israel A. 2010. AT1 receptor and NAD(P)H oxidase mediate angiotensin II-stimulated antioxidant enzymes and mitogen-activated protein kinase activity in the rat hypothalamus. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 11 (4): 234-242.
- 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.
- Summers C, Zhu M, Gelband CH, Posner P. 1996. Angiotensin II type 1 receptor modulation of neuronal K⁺ and Ca²⁺ currents: intracellular mechanisms. *Am J Physiol Cell Physiol* 271: C154-C163.
- Tsuruda T, Kato J, Hatakeyama K, Masuyama H, Cao YN, Imamura T, Kitamura K, Asada Y, Eto T. 2005. Antifibrotic effect of adrenomedullin on coronary adventitia in angiotensin II-induced hypertensive rats. *Cardiovasc Res.* 65 (4): 921-929.
- Ueda T, Ugawa S, Saishin Y, Shimada S. Expression of receptor – activity modifying protein (RAMP) mRNAs in the mouse brain. *Mol Brain Res* 2001; 93: 36-45.
- Uezono Y, Nakamura E, Ueda Y, Shibuya I, Ueta Y, Yokoo H, Yanagita T, Oyohira Y, Kobayashi H, Yanagihara N, Wada A. 2001. Production of cAMP by adrenomedullin in human oligodendroglial cell line KG1C: Comparison with calcitonin gene – related peptide and amylin. *Brain Res Mol Brain Res* 97: 59-69.
- Ushio-Fukai M, Zafari AM, Fukui T, Ishizaka N, Griendling KK. 1996. p22phox is a critical component of the superoxide-generating NADH/NADPH oxidase system and regulates angiotensin II-induced hypertrophy in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 271(38): 23317-21.
- Yoshimoto T, Fukai N, Sato R, Sugiyama T, Ozawa N, Shichiri M, Hirata Y. 2004. Antioxidant effect of adrenomedullin on angiotensin II-induced reactive oxygen species generation in vascular smooth muscle cells. *Endocrinology* 145 (7): 3331-3337.
- Yoshimoto T, Gochou N, Fukai N, Sugiyama T, Shichiri M, Hirata Y. 2005. Adrenomedullin inhibits angiotensin II-induced oxidative stress and gene expression in rat endothelial cells. *Hypertens Res* 28 (2): 165-172.
- Yoshizumi M, Tsuchiya K and Tamaki T. 2001. Signal transduction of reactive oxygen species and mitogen-activated protein kinases in cardiovascular disease. *J Med Invest* 48: 11-24.
- Yurekli M, Esrefoglu M, Dogru M, Dogru A, Gul M, Whidden M. 2009. Adrenomedullin reduces antioxidant defense system and enhances kidney tissue damage in cadmium and lead exposed rats. *Environ Toxicol* 24: 279-286.
- Zimmerman MC, Lazartigues E, Lang JA. 2002. Superoxide mediates the actions of angiotensin II in the central nervous system. *Circ Res* 91:1038-1045.
- 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.

Recibido: 25 de octubre de 2012
Aceptado: 28 de noviembre de 2012