

Efecto de la hipertensión sobre la acción antioxidante de la adrenomedulina cerebelosa

Effect of hypertension on the antioxidative action of cerebellar adrenomedullin

LETICIA FIGUEIRA y ANITA ISRAEL

RESUMEN

La adrenomedulina (AM) es un péptido ubicuo que cumple un importante papel en la regulación de la función cardiovascular y posee propiedades antioxidantes. La AM se encuentra presente en el sistema nervioso central. En el cerebelo, la densidad de los sitios de unión de la AM se encuentra aumentada durante la hipertensión, sugiriendo un posible papel del sistema adrenomedulinérgico cerebelar en la regulación de la presión arterial. La AM es capaz de activar diversas vías de señalización intracelular, al tiempo que modula la producción de especies reactivas de oxígeno, tanto a nivel periférico como central; sin embargo, poco se sabe acerca de estas vías en el vermis cerebeloso durante la hipertensión. Por ello, se evaluó el efecto de la AM sobre la actividad de las enzimas antioxidantes y la producción de productos que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBARS) en el vermis del cerebelo de ratas hipertensas. Ratas macho adultas espontáneamente hipertensas (SHR) y controles normotensas Wistar Kyoto (WKY) fueron sacrificadas, se disecó el vermis cerebeloso y estimuló el tejido *in vitro* con AM. Posteriormente, se determinó la actividad de las enzimas antioxidantes, superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx), la concentración de TBARS y las proteínas tisulares. Se demostró que en el vermis cerebeloso en las ratas normotensas, la AM disminuyó la actividad de las enzimas antioxidantes y la producción de TBARS, mientras que en las ratas hipertensas estos efectos de la AM no se evidenciaron. De igual manera, se apreció una mayor producción basal de TBARS en el vermis de cerebelo de la rata SHR con respecto a las WKY. Nuestros resultados indican que durante la hipertensión existe una alteración del efecto antioxidante y de la señalización de la AM cerebelosa.

Palabras clave: Adrenomedulina, cerebelo, enzimas antioxidantes, especies reactivas de oxígeno, hipertensión.

ABSTRACT

Adrenomedullin (AM) is a ubiquitous peptide involved in cardiovascular control and has been reported as an antioxidant. AM binding sites are increased in cerebellum during hypertension, suggesting a role for cerebellar adrenomedullinergic system in the blood pressure regulation. AM signals through several pathways and regulates reactive oxygen species metabolism, both peripherally and centrally. However, little is known about these pathways in the cerebellar vermis during hypertension. Therefore, we assessed the effect of AM on thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) production and antioxidant enzymes activity in the cerebellar vermis during hypertension. Adult male spontaneously hypertensive rats (SHR) and Wistar Kyoto rats (WKY) were sacrificed, the cerebellar vermis was dissected under stereomicroscopic control and the tissue was stimulated *in vitro* with AM. Antioxidant enzymes activity: superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx), TBARS production and tissues proteins was assessed. Our findings demonstrate that in cerebellar vermis of the WKY rats, AM decreases TBARS production and the activity of three antioxidant enzymes, while in SHR rats AM was unable to affect this signaling pathways. We also found increase basal TBARS production in the cerebellar vermis SHR rats when compared to WKY. Our results indicated an alteration of AM induced TBARS production and activity of antioxidant enzymes during hypertension.

Key words: Adrenomedullin, cerebellum, antioxidant enzyme, reactive oxygen species, hypertension.

* Laboratorio de Neuropéptidos. Facultad de Farmacia. Universidad Central de Venezuela. Caracas - Venezuela.
E-mail: figueiraleticia@gmail.com; astern88@gmail.com

Introducción

La adrenomedulina (AM) humana es un péptido de 52 residuos de aminoácidos de bajo peso molecular perteneciente a la familia de los péptidos de la calcitonina (Takei y col., 2004; Díaz e Israel, 2006), el cual ejerce sus acciones a través de su unión a tres subtipos de receptores, el receptor del péptido relacionado al gen de la calcitonina tipo 1 (CGRP₁), el receptor de AM tipo 1 (AM₁) y tipo 2 (AM₂); los cuales están constituidos por dos proteínas, el receptor similar al receptor de calcitonina (CRLR) y la proteína que modifica la actividad del receptor (RAMPs). El CGRP₁ está formado por el receptor similar al receptor de calcitonina (CRLR) y la proteína que modifica la actividad del receptor tipo 1 (RAMP₁); por su parte, los complejos CRLR/RAMP₂ y CRLR/RAMP₃ constituyen los receptores de AM, denominados AM₁ y AM₂, respectivamente (Kuwasako y col., 2004).

Uno de los mecanismos de acción a través del cual actúa la AM y por el cual fue descubierto fue a través de su capacidad de elevar los niveles de adenosina monofosfato cíclico (AMPc) (Kitamura y col., 1993); sin embargo, la AM puede activar diversas vías de señalización, entre ellas la activación de la fosfolipasa C (PLC), guanilil ciclasa (GC), quinasa regulada por señales extracelulares (ERK) y otras proteínas de la familia de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) como MAPK p38 y la proteína quinasa c-Jun NH2 terminal (JNK) (Iwasaki y col., 2001). Asimismo, 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 la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido (NAD(P)H) oxidasa, a través de la inhibición de la actividad de la enzima (Rahman y col., 2006).

Actualmente, la evidencia reconoce a las EROs como moduladores del estado redox intracelular, los cuales tienen una importante función como segundos mensajeros en regular las vías de señalización y la subsecuente expresión de genes (Kunsch y Medford, 1999); pues, se ha evidenciado la modulación de la expresión de un conjunto selectivo de genes inflamatorios vasculares por señales oxidativas intracelulares. En este sentido, los radicales libres se comportan como segundos mensajeros que regulan cascadas de señalización intracelulares, afectando la actividad transcripcional celular (Kunsch y Medford, 1999).

De igual manera, se ha demostrado que la AM posee propiedades protectoras contra el daño a órganos producido por condiciones fisiopatológicas, mediante la inhibición del estrés oxidativo. El mecanismo que subyace a esta actividad varía dependien-

do de la célula. En células mesangiales, la AM suprime la producción de EROs a través de la vía AMPc/proteína quinasa A (PKA), mientras que en el ventrículo de la rata, la AM inhibe la NAD(P)H oxidasa a través de la vía óxido nítrico (NO)/ guanosina monofosfato cíclico (GMPc) (Liu y col., 2007).

La AM y los componentes de sus receptores son ubicuos, pues se expresan en diversos órganos y tejidos como la aurícula y ventrículo cardíaco, aorta, pulmón, riñón, páncreas, intestino delgado, hígado, bazo, tiroides, testículo y músculo (Sakata y col., 1994; Parameswaran y Spielman, 2006; Gibbons y col., 2007). A nivel del sistema nervioso central (SNC), se han descrito sitios de unión para la AM en localizaciones como la corteza cerebral, tálamo, hipotálamo, bulbo raquídeo, puente de Varolio y en el cerebelo (Sone y col., 1997). En este último, diferentes estudios en animales de experimentación han demostrado la presencia de sitios de unión a la AM (Sakata y col., 1994; Sone y col., 1997; Serrano y col., 2000; Chakravarty y col., 2000; Uezono y col., 2001; Serrano y col., 2003); e inmunoreactividad a la AM en los núcleos lateral, interpósito y medial cerebelar; así como en las capas molecular, de las células de Purkinje y en la granular de la corteza cerebelar (Serrano y col., 2000), sugiriendo la existencia de un sistema adrenomedulinérgico cerebelar de importancia funcional. Adicionalmente, algunos estudios han descrito un importante papel del cerebelo en la regulación de la función cardiovascular; pues se han identificado diversos módulos cardiovasculares, como el núcleo fastigio (NF), vermis anterior, vermis posterior, úvula (lóbulo IX), nódulo (lóbulo X); ya que la estimulación de estas estructuras conlleva cambios en la presión arterial, frecuencia respiratoria y resistencia vascular (Nisimaru, 2004).

En el vermis de cerebelo de la rata normotensa, estudios previos han descrito que la AM es capaz de incrementar la producción de AMPc, GMPc y NO (Figueira e Israel, 2013a). Asimismo, la AM es capaz de disminuir la producción de productos de peroxidación lipídica que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBARS) y la actividad de las enzimas antioxidantes; siendo dichos efectos mediados a través de los receptores CGRP₁ y de AM, lo cual sugiere la existencia de un sistema adrenomedulinérgico cerebelar de importancia fisiológica (Figueira e Israel, 2013b). Sin embargo, se desconoce el efecto de la AM sobre las enzimas antioxidantes durante la hipertensión. En este sentido, diversos estudios han encontrado un aumento en la expresión de la AM y de los componentes de sus receptores, que se cree se debe a una respuesta de adaptación cardiovascular compensatoria al proceso fisiopatológico. Dichos cambios se han

evidenciado en tejidos periféricos como la aorta, el ventrículo (Pan y col., 2005; Gibbons y col., 2007), así como a nivel del SNC (Cases y Mora-Macía, 2001). En el cerebelo, estudios previos demostraron por primera vez una desregulación en la expresión de la AM y los componentes de sus receptores en el vermis de cerebelo de ratas espontáneamente hipertensas (SHR) con respecto a sus controles normotensos, WKY, lo cual sugiere un posible papel de la AM en la regulación de la presión arterial (Figueira e Israel, 2013c). Asimismo, se ha descrito que la microinyección de AM *in situ* en el vermis cerebeloso ocasiona un poderoso efecto hipotensor únicamente en ratas hipertensas, lo cual podría ser la manifestación de la desregulación de la expresión de la AM y sus receptores; sugiriendo que durante la hipertensión podría existir una alteración en la señalización inducida por la AM (Figueira e Israel, 2013d).

Hasta los momentos se desconoce el efecto de la hipertensión sobre la activación de las enzimas antioxidantes inducida por la AM en el cerebelo; es por ello, que en el presente estudio se evaluó el efecto de la AM sobre la actividad de las enzimas antioxidantes y la producción de TBARS en el vermis del cerebelo de ratas SHR y WKY.

Materiales y métodos

ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Se emplearon ratas macho SHR y sus controles normotensos WKY de 16 semanas de edad, provenientes del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC) (Caracas, Venezuela). 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), el Código de ética para la vida (2011) 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 la AM. El vermis cerebeloso fue homogeneizado mediante sonicación en buffer fosfato 10 mM pH 7,0 -tritón al 1%, centrifugado a 10.000 rpm durante 30 min y el sobrenadante recolectado fue utilizado para determinar la actividad enzimática.

ENSAYO DE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA CATALASA (CAT)

La actividad de la CAT fue determinada emplean-

do 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 Spitz, 1984). Para ello, se mezclaron 166 µL de la mezcla de incubación (xantina 0,3 mM, EDTA 0,6 mM, NBT 150 mM, 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 Gunzler (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 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 TBARS fue evaluada por un método colorimétrico descrito por Ohkawa y col., (1979), el cual consiste en evaluar el efecto de las especies reactivas de oxígeno sobre los lípidos, que resulta en la producción de varias sustancias que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico y que pueden ser medidas por espectrofotometría. Para ello, muestras

de homogeneizado de vermis de cerebelo fueron tratadas con ácido tricloroacético al 10% y centrifugadas a 1.600 g durante 15 min a 4 °C. Seguidamente, el sobrenadante fue incubado con ácido tiobarbitúrico 0,67% durante 10 min a 100 °C. Paralelamente se construyó una curva patrón con malonildialdehído. Se determinó la densidad óptica a 532 nm y la concentración de los productos de peroxidación lipídica fueron calculados y expresados como malonildialdehído formado. Los resultados de los TBARS fueron expresados como nmol/mg de proteínas del tejido.

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.

DETERMINACIÓN DE LA PRESIÓN ARTERIAL

El registro de los parámetros cardiovasculares, presión arterial y frecuencia cardíaca se realizó en las ratas conscientes por un método no invasivo mediante el uso de un plestimógrafo digital de cola (Digital Pressure Meter LE 5002 LETICA®, Panlab, S.L. Barcelona - España). Registrándose la presión arterial sistólica (PAS), presión arterial diastólica (PAD) y la presión arterial media (PAM). La semana previa al experimento, se determinó diariamente la presión arterial y frecuencia cardíaca, para minimizar el estrés asociado al manejo y al movimiento de la cola (período de adaptación a la toma de la presión arterial y de la frecuencia cardíaca).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados fueron expresados como la media \pm E.E.M. Se realizaron pruebas de normalidad para evaluar la distribución de las variables. La significancia de los resultados fue analizada mediante el análisis de Kruskal-Wallis y la U de Mann-Whitney. 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

CARACTERÍSTICAS DE LAS RATAS SHR Y WKY

Se evaluaron los valores de presión arterial en las ratas SHR y WKY, evidenciándose que las ratas SHR presentaron valores de PAD, PAS y PAM estadísticamente superiores cuando se comparó con las ratas WKY (PAD: 126 ± 3 mmHg vs. 91 ± 3 mmHg SHR vs. WKY; PAS: 174 ± 3 mmHg vs. 145 ± 3 mmHg SHR vs. WKY; PAM: 142 ± 3 mmHg vs. 108 ± 2 mmHg SHR vs. WKY) (N=17; $p < 0,0001$).

EFFECTO DE LA AM SOBRE LA ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES SOD, CAT Y GPX EN EL VERMIS CEREBELAR DE LA RATA SHR Y WKY

Se evaluó el efecto de la AM sobre la actividad de las enzimas antioxidantes SOD, CAT y GPx en el vermis cerebelar de ratas SHR y WKY. Como se observa, la incubación del vermis cerebelar con AM (2×10^{-7} M) durante 5 min, disminuyó significativamente la actividad de las enzimas antioxidantes SOD ($2,572 \pm 0,1620$ vs. $1,838 \pm 0,212$ Basal 5 min vs. AM 5 min) (Figura 1), CAT ($0,0152 \pm 0,001937$ vs. $0,0101 \pm 0,000679$ Basal 5 min vs. AM 5 min) (Figura 2) y GPx ($0,0110 \pm 0,00082$ vs. $0,0057 \pm 0,0006$; Basal 5 min vs. AM 5 min) (Figura 3) en las ratas WKY de 16 semanas de edad con respecto a su basal ($p < 0,001$, N=17). Contrariamente, en las ratas SHR la adición al baño de incubación de la AM no alteró la actividad de ninguna de las tres enzimas antioxidantes ($2,1190 \pm 0,1722$ vs. $2,1818 \pm 0,149$ Basal 5 min vs. AM 5 min; $0,0133 \pm 0,0005341$ vs. $0,0122 \pm 0,00079$ Basal 5 min vs. AM 5 min; $0,0128 \pm 0,00184$ vs. $0,0103 \pm 0,00153$ Basal 5 min vs. AM 5 min para SOD, CAT y GPx, respectivamente).

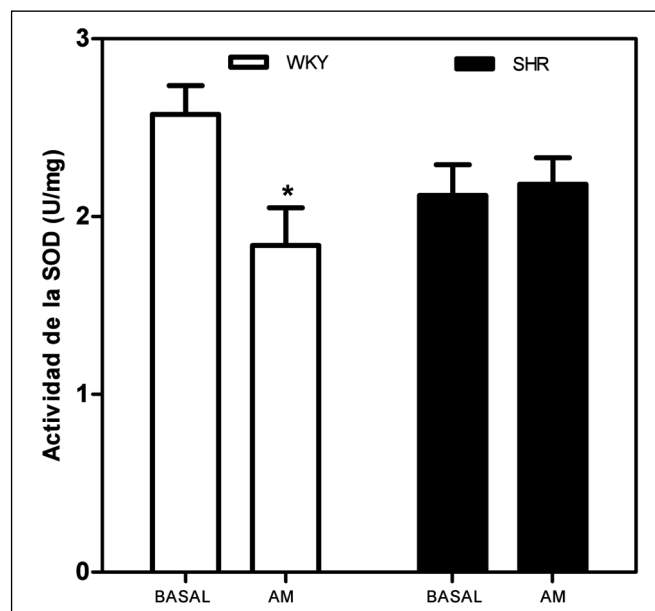


Figura 1. Efecto de la AM sobre la actividad SOD en el vermis de cerebelo de ratas WKY y SHR. El vermis cerebelar fue incubado en presencia y ausencia de AM (2×10^{-7} M) durante 5 min. Los resultados fueron expresados como la media \pm E.E.M. de la actividad específica de las enzimas. * $p < 0,001$ vs. control (Basal 5 min). (N=17).

EFFECTO DE LA AM SOBRE LA PRODUCCIÓN DE TBARS EN EL VERMIS CEREBELAR DE LA RATA SHR Y WKY

Se evaluó el efecto de la AM sobre la producción de TBARS en el vermis cerebelar de ratas SHR y WKY. Como se observa, en la Figura 4 la incubación del vermis cerebelar con AM (2×10^{-7} M) durante 10 min,

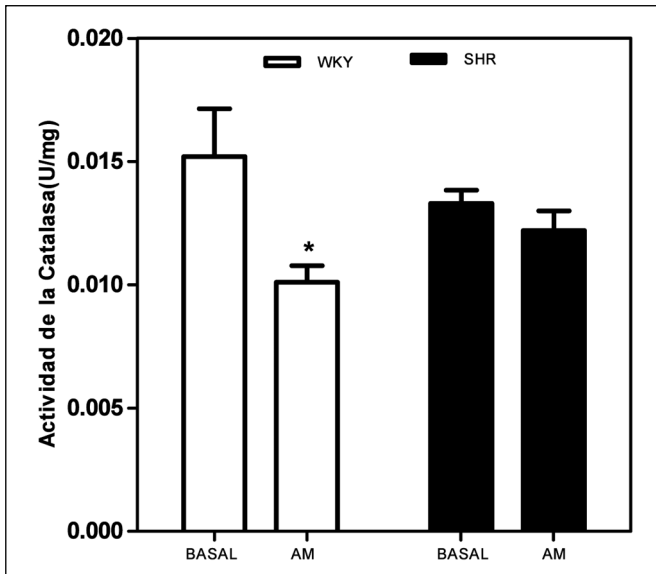


Figura 2. Efecto de la AM sobre la actividad CAT en el vermis de cerebelo de ratas WKY y SHR. El vermis cerebelar fue incubado en presencia y ausencia de AM ($2 \times 10^{-7} \text{ M}$) durante 5 min. Los resultados fueron expresados como la media \pm E.E.M. de la actividad específica de las enzimas.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

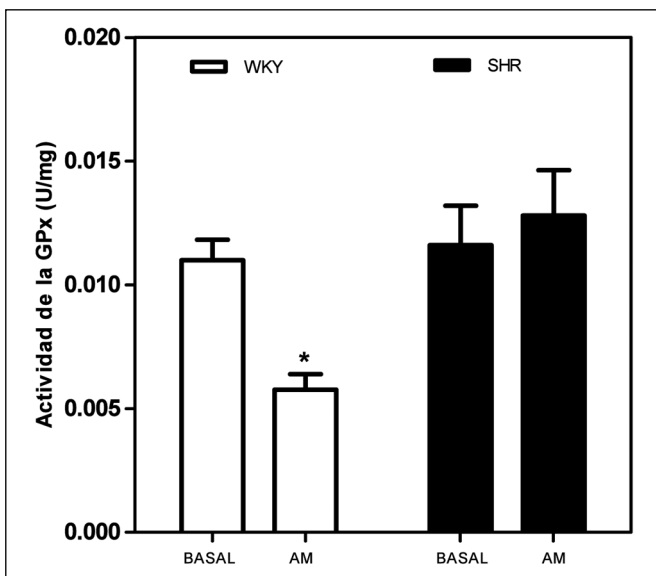


Figura 3. Efecto de la AM sobre la actividad GPx en el vermis de cerebelo de ratas WKY y SHR. El vermis cerebelar fue incubado en presencia y ausencia de AM ($2 \times 10^{-7} \text{ M}$) durante 5 min. Los resultados fueron expresados como la media \pm E.E.M. de la actividad específica de las enzimas. * $p < 0,001$ vs. control (Basal 5 min). (N=17).

disminuyó significativamente la producción de TBARS ($4,20 \pm 0,55$ vs. $2,83 \pm 0,15$ Basal 10 min vs. AM 10 min) en las ratas WKY de 16 semanas de edad con respecto a su basal ($p < 0,05$, N=6). Por su parte, la adición al baño de incubación de la AM en las ratas SHR no alteró la producción de TBARS ($9,49 \pm 0,82$ vs. $9,11 \pm 1,46$ Basal 10 min vs. AM 10 min). Asimismo, se puede observar que los niveles basales de TBARS

en las ratas SHR son 2,25 veces mayores que los encontrados en las ratas WKY ($p < 0,05$, N=6).

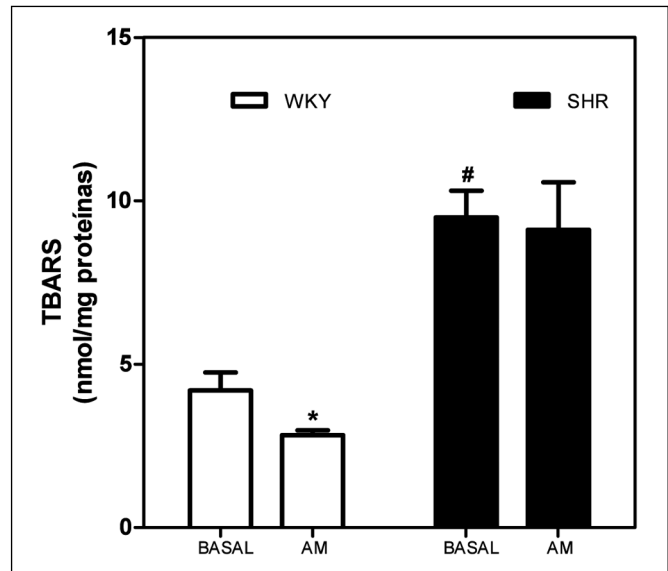


Figura 4. Efecto de la AM sobre la producción de TBARS en el vermis de cerebelo de ratas WKY y SHR. El vermis cerebelar fue incubado con AM ($2 \times 10^{-7} \text{ M}$) durante 10 min. Los resultados fueron expresados como la media \pm E.E.M. de la producción de TBARS (nmol/mg proteínas). * $p < 0,05$ vs. control (Basal WKY 10 min). (N=6). # $p < 0,05$ Basal WKY.

Discusión

Los mecanismos de señalización por los cuales la AM media sus funciones varían entre especies y sitio anatómico, pero generalmente involucran al AMPc, NO y mecanismos dependientes de calcio; asimismo, este péptido es capaz de activar diversas vías de señalización como la activación del factor nuclear kappa B (NF- κ B) (Pleguezuelos y col., 2004), proteína tirosina quinasa (PTK) (Iwasaki y col., 2001), proteína fosfatasa 2A (Parameswaran y col., 2000) y fosfatidilinositol - 3 quinasa (PIK3)/Akt (Okumura y col., 2004; Yin y col., 2004) dependiendo del tipo de células y las condiciones experimentales. De igual manera, la AM ha demostrado influir sobre la producción de EROs a nivel celular (Yoshimoto y col., 2004; Liu y col., 2007); estas moléculas actúan como segundos mensajeros para regular las vías de transducción que controlan en última instancia la expresión génica, encontrándose además implicadas en una variedad de enfermedades entre las que se incluyen la hipertensión (Kunsch y Medford, 1999).

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 Medford, 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 a la proteína quinasa C (PKC) y PKA (Hongpaisan y col., 2004) y regulando la homeostasis del calcio intracelular (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 (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 Medford, 1999).

Por su parte, la AM es un péptido con efectos pleiotrópicos que incluyen crecimiento celular, migración, apoptosis, inflamación, angiogénesis, secreción de hormonas y antioxidantes. En este sentido, se ha descrito que ratones heterocigotos para la AM presentan inflamación perivascular en arterias coronarias y un incremento del estrés oxidativo sistémico y local, el cual es revertido con la suplementación de AM, lo cual sugiere que la AM puede jugar un papel protector contra el estrés oxidativo como un antioxidante endógeno *in vivo* (Shimosawa y col., 2002). De hecho, la AM ha sido descrita como una sustancia antioxidante endógena (Shimosawa y col., 2002; Kato y col., 2003), pues, Nishimatsu y col., (2002) demostraron que la AM endógena fue citoprotectora contra el daño a órganos, por lo que la AM podría constituir un candidato como agente terapéutico para el tratamiento de la enfermedad cardiovascular. De hecho, en estudios previos hemos demostrado que la AM fue capaz de disminuir la actividad de las enzimas antioxidantes, SOD, CAT y GPx en el vermis de cerebelo de ratas Sprague-Dawley, lo cual 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. Aún más, esta disminución en la actividad de las enzimas antioxidantes, sugiere una menor producción de EROs, y por lo tanto una disminución en la activación de cascadas de señalización activadas por estas moléculas (Figueira e Israel, 2013b).

Asimismo, diferentes estudios han indicado que la AM protege del daño cardiovascular mediante la disminución de la producción de EROs mediada por la NAD(P)H oxidasa (Shimosawa y col., 2002; Kato y col., 2003; Yoshimoto y col., 2004; Rahman y col., 2006). De hecho, Cao y col., (2005) y Rahman y col., (2006) demostraron que la infusión de AM disminuyó los niveles de TBARS y atenuó la producción de EROs mediada por NAD(P)H oxidasa en ratas hipertensas,

mediante la disminución de su actividad y la expresión de p22phox y gp91phox, componentes de la NAD(P)H oxidasa.

La importancia de las EROs en la función vascular y el desarrollo de hipertensión ha sido ampliamente descrita (Rodrigo y col., 2007); ya que la elevada producción de EROs ha sido demostrada en varios modelos de hipertensión animal (Zalba y col., 2002); pues la expresión de la subunidad p22phox y la actividad de la NAD(P)H oxidasa se han encontrado aumentadas en la aorta de ratas SHR (Zalba y col., 2000); por su parte, el tratamiento oral o la inyección intravenosa de 4- hidroxil-2,2,6,6- tetrametilpiperidina - N-oxil (tempol), un mimético de la SOD, ha demostrado disminuir la presión arterial y la actividad nerviosa simpática en ratas SHR (Fujita y col., 2005); de igual manera, en la región ventrolateral rostral del bulbo raquídeo (RVLM) de ratas SHR se ha reportado elevados niveles de EROs; sin embargo, la inyección de tempol en RVLM ha demostrado disminuir la presión arterial (Fujita y col., 2005). Asimismo, se ha demostrado que las alteraciones estructurales en los vasos de resistencia que ocurren durante la hipertensión, han sido asociados con una hiperactivación de la NAD(P)H oxidasa vascular, generación de EROs y subsecuente activación de MAPK, fosfatasa y factores de transcripción (Touyz y col., 2003).

Aunado a los resultados descritos, los resultados del presente estudio apoyan el concepto de un incremento del estrés oxidativo durante la hipertensión en el cerebelo de la rata. Efectivamente, nuestros hallazgos demuestran que las ratas hipertensas presentan mayor producción de marcadores de peroxidación lipídica en el vermis cerebelar con respecto a las controles normotensas, lo cual sugiere un incremento en la producción de EROs basal durante la hipertensión.

Ahora bien, el efecto antioxidante basal de la AM podría estar alterado durante la hipertensión. Nuestros hallazgos apoyan esta posibilidad, ya que se pudo observar que durante la hipertensión arterial, la AM no fue capaz de reducir la actividad basal de las enzimas antioxidantes, SOD, CAT y GPx, y ni de disminuir la peroxidación lipídica; por lo tanto, en la hipertensión, parece ocurrir una desregulación de la capacidad antioxidante basal de la AM reflejada sobre el control y la regulación de la actividad de las enzimas antioxidantes. Alternativamente, la ausencia de respuesta a la AM sobre la actividad de las enzimas antioxidantes basal en el vermis cerebelar de las ratas SHR pudo ser debido al cambio en el patrón de expresión de los componentes de los receptores de AM observados en el vermis cerebelar durante la hipertensión, pues como hemos demostrado previamente, durante la hipertensión existe un incremento

en la expresión del receptor de CGRP₁ (CRLR+RAMP₁) y AM₂ (CRLR+RAMP₃), y menor expresión del receptor AM₁ (CRLR+RAMP₂), sugiriendo que la expresión óptima del receptor de AM₂ es necesaria para la adecuada señalización de la AM (Figueira e Israel, 2013c).

De hecho, estudios previos muestran diferencias en la señalización inducida por la AM durante la hipertensión; pues la AM es capaz de incrementar la fosforilación de las ERK1/2 en el vermis de cerebelo; siendo dicho efecto de menor magnitud en las ratas hipertensas con respecto a las normotensas (Figueira e Israel, 2014).

En conclusión, nuestros resultados demuestran que la AM disminuye la actividad de las enzimas antioxidantes y la producción de TBARS en el cerebelo de ratas normotensas; sin embargo, durante la hipertensión existe un incremento en la producción de productos de peroxidación lipídica y una alteración del efecto antioxidante de la AM cerebelosa. Estos hallazgos apoyan aún más el concepto que la AM en el cerebelo participa en la regulación del estrés oxidativo.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Sr. Bany 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 No. 2007001585.

Referencias bibliográficas

- Aebi H. 1984. Catalase *in vitro*. *Methods Enzymol* 105: 121-126.
- Cao Y, Kuwasako K, Kato J, Yanagita T, Tsuruda T, Kawano J, Nagoshi Y, Chen A, Wada A, Suganuma T, Eto T, Kitamura K. 2005. Beyond vasodilation: The antioxidant effect of adrenomedullin in Dahl salt – sensitive rat aorta. *Biochem Biophys Res Commun* 332: 866-872.
- Cases A, Mora-Macia 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.
- Código de ética para la vida. Ministerio del Poder Popular para la Ciencia, Tecnología e Industrias Intermedias: Venezuela, 2011.
- Díaz E, Israel A. 2006. La adrenomedulina: un péptido multifuncional. *Rev Fac Farm* 69: 54-63.
- Droge W. 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82: 47-95.
- Figueira L, Israel A. 2013a. Señalización de la adrenomedulina en el vermis del cerebelo de la rata. *Arch Ven Farmacol Terap* 32. En prensa.
- Figueira L, Israel A. 2013b. Efecto de la adrenomedulina sobre la actividad de las enzimas antioxidantes cerebelosas. *Rev Fac Farm* 76 (1 y 2): 40-49.
- Figueira L, Israel A. 2013c. Desregulación del sistema adrenomedulinérgico cerebeloso en la hipertensión arterial. *Revista Latinoamericana de Hipertensión* 8(1): 9-15.
- Figueira L, Israel A. 2013d. Efecto hipotensor de la adrenomedulina cerebelosa. *Rev Lat Hipert* 8(3): 62-67.
- Figueira L, Israel A. 2014. Efecto de la adrenomedulina cerebelosa sobre las quinasas reguladas por señales extracelulares en la hipertensión. *Rev Fac Farm* 77 (1 y 2): 46-53.
- Flohé L, Gunzler W. 1984. Assays of glutathione peroxidase. *Meth Enzymol* 77: 398-404.
- Fujita M, Kuwaki T, Ando K, Fujita T. 2005. Sympatho – inhibitory action of endogenous adrenomedullin through inhibition of oxidative stress in the brain. *Hypertension* 45: 1165-1172.
- Gibbons C, Dackor R, Dunworth W, Fritz-Six K, Caron K. 2007. Receptor activity – modifying proteins: RAMPing up adrenomedullin signaling. *Mol Endocrinol* 21 (4): 783-796.
- 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.
- Iwasaki H, Shichiri M, Marumo F, Hirata Y. 2001. Adrenomedullin stimulates proline-rich tyrosine kinase 2 in vascular smooth muscle cells. *Endocrinology* 142(2): 564-572.
- Kato K, Yin H, Agata J, Yoshida H, Chao L, Chao J. 2003. Adrenomedullin gene delivery attenuates myocardial infarction and apoptosis after ischemia and reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285: H1506-H1514.
- Kitamura K, Kangawa K, Kawamoto M, Ichiki Y, Nakamura S, Matsuo H, Eto T. 1993. Adrenomedullin: a novel hypotensive peptide isolated from human pheochromocytoma. *Biochem Biophys Res Commun* 192: 553-560.
- Kunsch C, Medford R. 1999. Oxidative stress as a regulator of gene expression in the vasculature. *Circ Res* 85: 753-766.
- Kuwasako K, Cao Y, Nagoshi Y, Kitamura K, Eto T. 2004. Adrenomedullin receptors: pharmacological features and possible pathophysiological roles. *Peptides* 25: 2003-2012.
- 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.
- NIH Guide for the care and use of animals. Institute of Laboratory Animal Resources, National Research Council, National Academy Press: Washington DC, USA, 1996.
- 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.

- Nisimaru N. 2004. Cardiovascular modules in the cerebellum. *Jpn J Physiol* 54: 431-448.
- Oberley L, Spitz D. 1984. Assay of superoxide dismutase activity in tumor tissue. *Meth Enzymol* 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.
- Okumura H, Nagaya N, Itoh T, Okano I, Hino J, Mori K, Tsukamoto Y, Ishibashi-Ueda H, Miwa S, Tambara K, Toyokuni S, Yutani C, Kangawa K. 2004. Adrenomedullin infusion attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent pathway. *Circulation* 109(2): 242-248.
- Pan C, Jaing W, Zhong G, Zhao J, Pang Y, Tang C, Qi Y. 2005. Hypertension induced by nitric oxide synthase inhibitor increases responsiveness of ventricular myocardium and aorta of rat tissue to adrenomedullin stimulation *in vitro*. *Life Science* 78: 398-405.
- Parameswaran N, Nambi P, Hall CS, Brooks DP, Spielman WS. 2000. Adrenomedullin decreases extracellular signal-regulated kinase activity through an increase in protein phosphatase-2A activity in mesangial cells. *Eur J Pharmacol* 388: 133-138.
- Parameswaran N, Spielman W. 2006. RAMPs: the past, present and future. *Trends Biochem Sci* 31(11): 631-638.
- Pleguezuelos O, Haqi-Pavli E, Crowther G, Kapas S. 2004. Adrenomedullin signals through NF-kappaB in epithelial cells. *FEBS Lett* 577: 249-254.
- Rahman M, 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.
- Rodrigo R, Prat H, Passalacqua W, Araya J, Guichard C, Bachler J. 2007. Relationship between oxidative stress and essential hypertension. *Hypertens Res* 30: 1159-1167.
- 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, 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.
- Serrano J, Uttenthal O, Martínez A, Fernández P, Martínez J, Alonso D, Bentura M, Santacana M, Gallardo J, Martínez R, Cuttitta F, Rodrigo J. 2000. Distribution of adrenomedullin – like immunoreactivity in the rat central nervous system by light and electron microscopy. *Brain Res* 853: 245-268.
- 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.
- 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.
- 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* 56: 53-58.
- Touyz R, Tabet F, Schiffrin E. 2003. Redox-dependent signalling by angiotensin II and vascular remodelling in hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 30: 860-866.
- 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.
- Yin H, Chao L, Chao J. 2004. Adrenomedullin protects against myocardial apoptosis after ischemia/reperfusion through activation of Akt-GSK signaling. *Hypertension* 43: 109-116.
- 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.
- 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.
- Zalba G, Beaumont F, San José G. 2000. Vascular NADH/NADPH oxidase is involved in enhanced superoxide production in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 35: 1055-1061.
- Zalba G, San José G, Moreno M, Díaz J. 2002. Papel del anión superóxido en la fisiopatología de las enfermedades cardiovasculares. *Nefrología* 22(7): 13-20.