

Efecto de la adrenomedulina sobre la producción de GMPc/óxido nítrico en el vermis del cerebelo durante la hipertensión

(Effect of adrenomedullin on cGMP/nitric oxide production in cerebellar vermis during hypertension)

LETICIA FIGUEIRA y ANITA ISRAEL

RESUMEN

La adrenomedulina (AM) es un péptido que se encuentra en el cerebelo y que ejerce sus acciones a través de la activación de diversas vías de señalización, entre ellas la guanosina monofosfato cíclico (GMPc) / óxido nítrico (NO). En el vermis de cerebelo de ratas hipertensas esta vía aún es desconocida. Se sabe que existe alteración en la expresión de la AM y de sus receptores en el cerebelo en ratas hipertensas, lo que sugiere un posible papel del sistema adrenomedulinérgico cerebelar en la regulación de la presión arterial. Esta alteración podría estar asociada a los mecanismos de señalización de la AM, por lo que en el presente estudio se evaluó el efecto de la AM cerebelosa sobre la producción de GMPc/NO durante la hipertensión. Para ello, ratas macho adultas espontáneamente hipertensas (SHR) y controles normotensos Wistar Kyoto (WKY) fueron sacrificados, se disecó el vermis cerebeloso y estimuló el tejido *in vitro* con AM. Posteriormente, se determinó la producción de GMPc y NO, y proteínas tisulares. Se demostró que la AM incrementó la producción de GMPc/NO en el vermis de cerebelo de las ratas WKY ($p < 0,05$), mientras que en las ratas SHR la AM fue incapaz de estimular esta vía de señalización. Nuestros resultados indican que durante la hipertensión, en el vermis cerebeloso ocurre una alteración de la señalización de la vía de GMPc/NO inducida por la AM. Ratificando así la hipótesis de la desregulación del sistema adrenomedulinérgico cerebeloso en la hipertensión.

Palabras clave: Adrenomedulina, cerebelo, guanosina monofosfato cíclico, óxido nítrico, hipertensión.

ABSTRACT

Adrenomedullin (AM) is a peptide expressed in cerebellum. AM signals through several pathways, such as cyclic guanosine monophosphate (cGMP) / nitric oxide (NO) activation; however, in the hypertensive rat cerebellar vermis this pathway is still unknown. It is known that there is an alteration in the expression of AM and their receptors in the cerebellum in hypertensive rats, suggesting a possible role of cerebellar adrenomedulinergic system in blood pressure regulation. This alteration may be associated with the signaling mechanisms of the AM, so in the present study we assessed the effect of AM on cGMP/NO production in cerebellum vermis of the hypertensive rat. In the present experimental study, 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. cGMP and NO production were assayed. Our findings demonstrated that in cerebellar vermis of the WKY rats, AM increased cGMP/NO production, ($p < 0,05$), while in SHR rats AM was unable to stimulate this signaling pathway. Our results indicate that during hypertension, in cerebellar vermis AM induced cGMP/NO signaling pathway is impaired. Thus confirming the hypothesis of deregulation of adrenomedulergic cerebellar system during hypertension.

Key words: Adrenomedullin, cerebellum, cyclic guanosine monophosphate, nitric oxide, hypertension.

Introducción

La AM es un péptido perteneciente a la familia de los péptidos de la calcitonina, de 52 residuos de aminoácidos de bajo peso molecular (alrededor de 6 kDa), que se caracteriza por tener una estructura de anillo cíclico de seis residuos de aminoácidos, formado por un puente disulfuro intramolecular entre la Cys 16 y 21; además posee una Tyr amidada en su extremo carboxilo terminal, siendo estas características esenciales para su actividad biológica y unión a su receptor (Kitamura y col., 1993; Díaz e Israel, 2006).

La identificación y caracterización de los receptores específicos para la AM no ha sido una tarea sencilla; en este sentido, se ha descrito al receptor similar al receptor de calcitonina (CRLR) y una proteína accesorio, las proteínas que modifican la actividad del receptor (RAMP). Los receptores específicos de la AM, AM1 y AM2, están formados por el heterodímero CRLR/RAMP2 y CRLR/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 (CcGRP), constituido por el complejo CRLR/RAMP1 (Zimmermann y col., 1996; Belloni y col., 1999).

La AM puede activar diversas vías de señalización al unirse a sus receptores en diferentes órganos y tejidos como la adenilil ciclasa (AC), fosfolipasa C (PLC), guanilil ciclasa (GC), quinasas reguladas 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) ocasionando diversas respuestas biológicas.

La AM y su sistema de receptores son ubicuos, pues se encuentran expresados en diversos tejidos y órganos a nivel periférico como la aurícula y ventrículo cardíaco, aorta, pulmón, riñón, páncreas, intestino delgado, hígado, bazo, tiroides, testículo, glándula suprarrenal, músculo, entre otros (Sakata y col., 1993; Ichiki y col., 1994; Sakata y col., 1994). A nivel central, se ha encontrado en la corteza cerebral, cerebelo, glándula pituitaria (Sakata y col., 1994), bulbo raquídeo, hipotálamo y amígdala (Serrano y col., 2002; Juaneda y col., 2003; Macchi y col., 2006). En el cerebelo, la AM se localiza en las células de Purkinje; de hecho, la capa granular, contiene dos tipos de estructuras neurales inmunoreactivas a la AM, las terminales de las fibras musgosas y las células de Golgi. Asimismo, los núcleos cerebelares lateral, interpósito y medial contienen neuronas inmunoreactivas a la AM (Serrano y col., 2000), lo cual sugiere un posible papel de este péptido a este nivel.

Pocos estudios se han enfocado en estudiar el efecto de la AM en el vermis del cerebelo; en este sentido, se ha descrito que la AM es capaz de incrementar la activación mediante fosforilación de las

ERK1/2 y la producción de adenosina monofosfato cíclico (AMPC), guanosina monofosfato cíclico (GMPc), óxido nítrico (NO) y disminuir la actividad de las enzimas antioxidantes, catalasa, superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa, lo cual sugiere la existencia de un sistema adrenomedulinérgico cerebelar de importancia fisiológica (Figueira e Israel, 2013a; 2013b). Sin embargo, muy poco se conoce sobre los efectos de la AM en el cerebelo de ratas hipertensas, todavía más se desconocen los mecanismos de señales de transducción de los receptores de este péptido y los segundos mensajeros intracelulares relacionados con sus acciones biológicas. Al respecto en un estudio previo, se demostró por primera vez una alteración 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, Wistar Kyoto (WKY), lo cual sugiere que la AM podría estar participando en mecanismos que subyacen en la hipertensión (Figueira e Israel 2013c). De igual manera, se ha descrito que la microinyección de AM en el vermis de cerebelo fue capaz de provocar un marcado efecto hipotensor únicamente durante la hipertensión (Figueira e Israel, 2013d); lo cual sugiere que la alteración en la expresión de la AM y los componentes de sus receptores podría ser responsable de la respuesta diferencial de este péptido durante la hipertensión. La alteración de los componentes del sistema de AM del vermis cerebeloso en la hipertensión podría estar asociada a una alteración en la vía de señalización de la AM. Por ello, en presente trabajo se evaluó el efecto de la AM sobre la producción de GMPc/NO en el vermis cerebeloso durante la hipertensión.

Materiales y métodos

ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Se emplearon ratas macho SHR y sus controles normotensos WKY de 16 semanas de edad, provenientes del Bioterio del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC) (Caracas - Venezuela). Los animales fueron mantenidos en jaulas a temperatura ambiente (25 ± 1 °C) 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) (conteniendo en mM: NaCl 125; KCl 3,5; KH₂PO₄ 1,25; MgSO₄ 1,20; CaCl₂ 0,75; NaHCO₃ 25; glucosa 10 y teofilina 1,6) burbujeado con 95% O₂ : 5% CO₂.

ENSAYO DE LA GUANILIL CICLASA

Para el ensayo de la activación de la GC cada vermis del cerebelo fue transferido individualmente a tubos Eppendorf conteniendo 180 μ L de buffer KBR, sometándose a pre-incubación durante 10 minutos a 37 °C. La reacción se inició con el agregado del agonista (20 μ L), o buffer para los controles, al medio de incubación seguidos de 10 minutos adicionales de incubación. La reacción se detuvo agregando 20 μ L EDTA (166 mM, pH 7,5) y calentando a 90 °C durante 3 min. Las muestras fueron mantenidas en hielo y posteriormente homogeneizadas mediante sonicación y congeladas a -20 °C para la posterior determinación del GMPc.

DETERMINACIÓN DEL GMPc

Se tomó una alícuota de 100 μ L para la determinación del GMPc. El contenido de GMPc se cuantificó por radioinmunoensayo (RIA) por el método descrito por Steiner y col. (1972), utilizando un kit comercial (Amersham® International plc, UK). El ensayo se fundamenta en la competencia entre el GMPc no radioactivo (muestra) y una cantidad fija del compuesto marcado, por la unión a un anticuerpo que posee alta especificidad y afinidad por el GMPc. La cantidad de GMPc radioactivo unido al anticuerpo está relacionada inversamente con la concentración de GMPc presente en la muestra. La cantidad de GMPc se calculó utilizando una curva estándar (rango de 0 a 4 pmol/tubo). La actividad GC se expresó como pmoles de GMPc formados/10 min/mg de proteínas.

ENSAYO PARA LA DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE NO

La producción de NO fue determinado colorimétricamente como una medida de la producción de nitrato/nitrito formado. Este ensayo consiste en determinar la acumulación de nitrito (producto final estable de la síntesis de NO) en el sobrenadante mediante la reacción de Griess (Green y col., 1982).

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).

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 \pm E.E.M. Se realizó la prueba de Shapiro-Will, 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

En la Figura 1 se presentan los valores de la media y el error estándar de la media de los valores de PAS, PAD y PAM de las ratas WKY y SHR de 16 semanas de edad. Como se puede observar, las ratas SHR presentan valores estadísticamente superiores de PAS, PAD y PAM cuando se comparó con las ratas WKY ($N=11$; $p < 0,0001$).

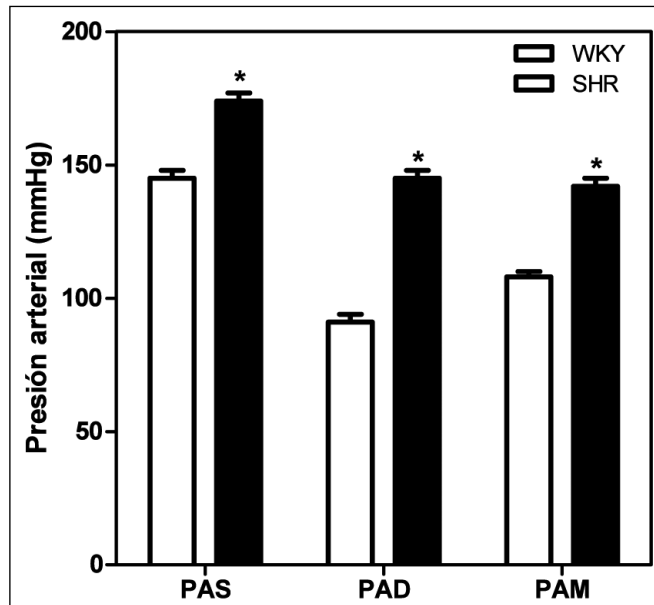


Figura 1. Características de las ratas WKY y SHR de 16 semanas de edad. Se determinó PAS, PAD y PAM (mmHg). Los resultados fueron expresados como la media \pm E.E.M. ($N=11$). * $p < 0,0001$ vs. WKY.

EFECTO DE LA AM SOBRE LA ACTIVACIÓN DE LA GC EN EL CEREBELO DE LAS RATAS SHR Y WKY.

Se evaluó el efecto de la AM sobre la activación de la GC en el vermis cerebelar de ratas SHR y WKY adultas. Como se puede apreciar en la Figura 2, la

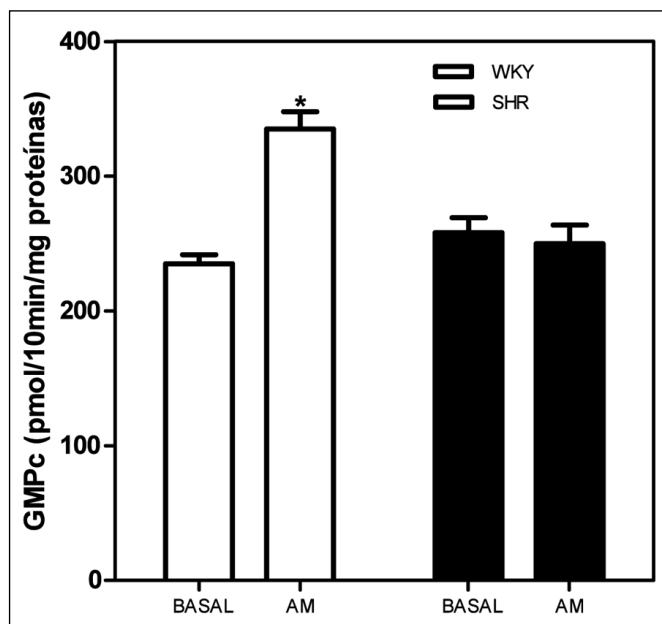


Figura 2. Efecto de la AM sobre la producción de GMPc en el vermis de cerebelo de ratas WKY y SHR. El vermis cerebelar fue incubado con AM (2×10^{-7} M) o vehículo durante 10 min. Los resultados fueron expresados como la media \pm E.E.M. de la acumulación de GMPc (N=11). * $p < 0,001$ vs. Basal WKY.

incubación del vermis cerebelar con AM (2×10^{-7} M) durante 10 min, incrementó significativamente la acumulación del GMPc en el vermis de cerebelo de las ratas WKY de 16 semanas de edad con respecto a su basal ($235,11 \pm 6,55$ vs. $335,00 \pm 12,81$, Basal vs. AM), ($p < 0,001$, N=11). Sin embargo, en las ratas SHR la adición al baño de incubación de la AM no alteró la acumulación del GMPc ($258,14 \pm 11,14$ vs. $249,91 \pm 13,91$; Basal vs. AM).

EFFECTO DE LA AM SOBRE LA PRODUCCIÓN DE NO EN EL VERMIS CEREBELOSO DE LA RATA.

Como se observa, en la figura 3 la incubación del vermis cerebelar con AM (2×10^{-7} M) durante 10 min, ocasionó un incremento significativo de la acumulación de nitratos cuando se compara con su basal en las ratas WKY ($2,49 \pm 0,59$ vs. $4,24 \pm 0,38$; Basal vs. AM), ($p < 0,05$, N=5). Contrariamente, en las ratas SHR la adición al baño de incubación de la AM no alteró la acumulación de nitratos ($2,87 \pm 0,72$ vs. $2,00 \pm 0,32$; Basal vs. AM).

Discusión

La AM es un péptido que es capaz de activar diversas vías de señalización intracelular. Una de las principales vías a través de la cual la AM ejerce sus efectos es la activación de la vía AC/AMPC (Wong y col., 2012). Sin embargo, se sabe que la AM es capaz de activar otras vías de señalización en diversos órganos y tejidos, tales como la PLC (Shimekake y col., 1995), GC (Shimekake y col., 1995; Ikenouchi y col., 1997), ERK (Iwasaki y col., 1998) p38 y JNK (Para-

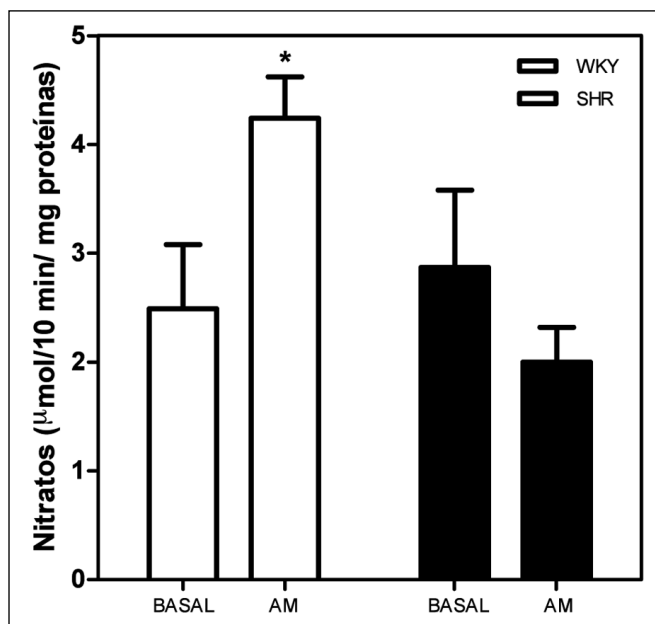


Figura 3. Efecto de la AM sobre la producción de nitratos en el vermis de cerebelo de ratas WKY y SHR. El vermis cerebelar fue incubado con AM (2×10^{-7} M) o vehículo durante 10 min. Los resultados fueron expresados como la media \pm E.E.M. de la producción de nitratos (N=5). * $p < 0,05$ vs. Basal WKY.

meswaran y col., 1999). Algunos estudios han indicado que la AM es capaz de activar la vía de la sintasa de óxido nítrico (SON)/GMPc y mediar diversos efectos de la AM a nivel periférico (Shimekake y col., 1995); pues este péptido es capaz de incrementar los niveles de GMPc/NO en células cardíacas de ratas (Kato y col., 2003) y en células endoteliales de aorta de bovino, sugiriendo que este incremento puede mediar la acción hipotensora de la AM en la periferia (Shimekake y col., 1995).

Los efectos de la AM sobre la producción de NO en el cerebro no son claros; sin embargo se ha demostrado un efecto estimulador directo de la AM sobre la producción de NO en células de neuroblastoma humano SK-N-SH *in vitro* (Xu y Krukoff, 2005). Igualmente, se sabe que la administración icv de AM es capaz de incrementar la expresión de c-fos en el hipotálamo y tallo cerebral y de activar neuronas que producen NO en los núcleos paraventricular (PVN), supraóptico (NSO) y del tracto solitario (NTS), siendo dicho efecto mediado por los receptores de CGRP (Ji y col., 2004). De igual manera, se ha demostrado que la AM activa neuronas que producen NO en el PVN y estimula la producción de NO en el hipotálamo (Shan y Krukoff, 2001). De hecho, se ha descrito que los efectos hipotensores inducidos por la microinyección de AM en el PVN son atenuados por la inhibición de la síntesis del NO (Xu y Krukoff, 2004a), mientras que los efectos hipertensores de la AM en la región ventrolateral rostral del bulbo raquídeo (RVLM) también fueron asociados a la cascada NO-GMPc (Xu y Krukoff, 2004b). Aún más, Mathison e Israel (2006), demostraron que la AM incrementó la actividad de la

SON y la producción de GMPc en la eminencia media de la rata, y Shan y Krukoff (2001), encontraron que la administración icv de AM en ratas, incrementó la concentración de nitratos y nitritos en el hipotálamo, así como la expresión inmunohistoquímica de la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido (NAD(P)H) diaforasa en las neuronas productoras de NO en el PVN. Por lo tanto, la evidencia indica que el NO estimulado por la AM, está involucrado en numerosas funciones fisiológicas en el sistema nervioso central (SNC) desempeñando un importante papel en la regulación de funciones autonómicas (Wehlage y Smith, 2011).

Recientemente, Figueira e Israel (2013a) demostraron que la AM es capaz de incrementar la producción de GMPc y NO a través de la estimulación del receptor AM1 en el vermis del cerebelo, lo cual sugiere que este péptido podría mediar funciones importantes a través de esta vía de señalización en esta localización. En este sentido, Endo y Launey (2003) encontraron que la vía NO-GMPc-proteína quinasa G (PKG) juega un papel importante en la activación de las ERK1/2 en las células de Purkinje del cerebelo de ratas. Por otra parte, se ha descrito que la NO/GMPc podría actuar como un neurotransmisor en el cerebelo (Moncada y Higgs, 1993), pues, se ha encontrado alta expresión del sistema de señalización relacionado con el NO en el cerebelo, ya que existe altos niveles de la enzima GC (Nakane y col., 1983) y del GMPc (Ferrendelli, 1978) en las células de Purkinje. Asimismo, estudios de inmunohistoquímica revelan alta expresión de la proteína quinasa dependiente de GMPc en las células de Purkinje del cerebelo (Lohmann y col., 1981). Adicionalmente la SON y GC soluble activada por NO muestran colocación en diversas regiones del cerebelo (de Vente y col., 1998). En contraste con el AMPc, el cual se encuentra homogéneamente distribuido en diferentes áreas del cerebro, el GMPc se encuentra 10 a 50 veces más concentrado en el cerebelo que en otras áreas del cerebro. Se cree que el GMPc ejerce sus efectos a través de proteínas quinasas dependientes de GMPc (cGK), cuya actividad y expresión ha sido detectada especialmente en el cerebelo, concentradas principalmente en las células de Purkinje (Lohmann y col., 1981).

Ahora bien, la coincidencia anatómica entre la SON y elementos celulares que presentan receptores para la AM en el cerebelo, sugiere un posible papel de la misma en la regulación de la función celular mediante la posible generación de NO/GMPc (Pastorello y col., 2007). Hasta el presente, no se ha elucidado el efecto de la AM sobre la vía NO/GMPc cerebelosa en la hipertensión. Nuestros resultados parecen apuntar a un papel importante, ya que la AM fue capaz de incrementar la producción de NO y GMPc en el cerebelo de ratas normotensas, pero dicha acción fue abolida completamente en las ratas hipertensas, sugiriendo una desregulación de esta vía de señalización

en la hipertensión. La falta de respuesta de la AM sobre la producción de GMPc/NO en el vermis de cerebelo de la rata hipertensa podría guardar relación con la desregulación de la expresión de la AM y los componentes de los receptores manifestada durante la hipertensión, la cual podría ocasionar una alteración en la respuesta de este péptido a nivel local. Efectivamente, Figueira e Israel (2013c) demostraron que durante la hipertensión ocurre un cambio en el patrón de expresión de la AM y los componentes de receptores de las AM en el vermis del cerebelo, alteración que estuvo acompañada de la alteración en la activación de las ERK1/2 inducida por la AM (Figueira e Israel, 2014). Aún más, estos cambios se ven reflejados en la respuesta funcional de la AM, ya que la microinyección de AM en el vermis del cerebelo de ratas hipertensas provocó una poderosa y significativa respuesta hipotensora. Esta acción fue específica y dependiente de la dosis; ya que en ratas normotensas la microinyección de la AM en el vermis cerebeloso no fue capaz de reducir la presión arterial (Figueira e Israel, 2013d).

El mecanismo íntimo mediante el cual el NO y su desregulación en el cerebelo participa en la regulación de la presión arterial aún no ha sido establecido, ni nuestros resultados permiten inferirlo. Sin embargo, en otras áreas del SNC parece estar relacionado con la regulación del eflujo simpático. En efecto, la inhibición no específica de la SON, a través de la administración sistémica de análogos de la L-arginina, provoca una respuesta vasoconstrictora e incremento en la presión arterial tanto en humanos como en animales (Chowdhary y Townend, 1999), debido a la remoción de la vasodilatación tónica que resulta de la producción de NO endotelial aunado a la activación del sistema nervioso simpático. Efectivamente, el NO neuronal ejerce un efecto inhibitorio tónico sobre la actividad nerviosa simpática, pues el bloqueo ganglionar farmacológico agudo o el bloqueo beta adrenérgico es capaz de causar una mayor caída en la presión arterial durante la inhibición de la SON con L-NG-nitroarginina metil éster (L-NAME) que en los animales controles (Cunha y col., 1993). Asimismo, la respuesta hipertensiva a la ingestión crónica de L-NAME es mayormente atenuada en ratas previamente simpatectomizadas, mientras que la respuesta vascular al estímulo mediado por NO permanece intacto (Zanzinge, 1999).

En resumen, en el presente estudio se demostró que la AM fue capaz de incrementar la producción de GMPc y NO en el vermis de cerebelo de la rata normotensa; sin embargo, este efecto se encuentra alterado durante la hipertensión, lo que apoya un papel de la AM cerebelosa en la regulación de la presión arterial y su desregulación durante la hipertensión.

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 N° 2007001585.

Referencias bibliográficas

- 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.
- Chowdhary S, Townend J. 1999. Role of nitric oxide in the regulation of cardiovascular autonomic control. *Cli Sci* 97: 5-17.
- Cunha R, Cabral A, Vásquez E. 1993. Evidence that the autonomic nervous system plays a major role in the L-NAME-induced hypertension in conscious rats. *Am J Hypertens* 6: 806-809.
- de Vente J, Hopkins D, Markerink-van M, Emson P, Schmidt H, Steinbusch H. 1998. Distribution of nitric oxide synthase and nitric oxide-receptive, cyclic GMP producing structures in the rat brain. *Neurosci* 87(1): 207-241.
- Díaz E, Israel A. 2006. La adrenomedulina: un péptido multifuncional. *Rev Fac Farm* 69: 54-63.
- Endo S, Launey T. 2003. Nitric oxide activates extracellular signal – regulated kinase $\frac{1}{2}$ and enhances declustering of ionotropic glutamate receptor subunit 2/3 in rat cerebellar Purkinje cells. *Neurosci Lett* 350: 122-126.
- Ferrendelli JA. 1978. Distribution and regulation of cyclic GMP in the central nervous system. *Adv Cyclic Nucleotide Res* 9: 453-464.
- 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.
- Green L, Wagner A, Glogowski J, Skipper P, Whisnok J, Tannenbaum S. 1982. Analysis of nitrate, nitrite and nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 126: 131-138.
- Ichiki Y, Kitamura K, Kangawa K, Kawamoto M, Matsuo H, Eto T. 1994. Distribution and characterization of immunoreactive adrenomedullin in human tissue and plasma. *FEBS Lett* 338: 6-10.
- Ikenouchi H, Kangawa K, Matsuo H, Hirata Y. 1997. Negative inotropic effect of adrenomedullin in isolated adult rabbit cardiac ventricular myocytes. *Circulation* 95: 2318-2324.
- Iwasaki H, Eguchi S, Shichiri M, Marumo F, Hirata Y. 1998. Adrenomedullin as a novel growth-promoting factor for cultured vascular smooth muscle cells: role of tyrosine kinase-mediated mitogen-activated protein kinase activation. *Endocrinology* 139(8): 3432-3441.
- 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.
- Ji S, Wang Z, Li X, He R. 2004. Intracerebroventricular administration of adrenomedullin increases the expression of c-fos and activates nitric oxide – producing neurons in rat cardiovascular related brain nuclei. *Acta Physiol Sin* 56 (3): 328-334.
- Juaneda C, Dumont Y, Chabot J, Fournier A, Quirion R. 2003. Adrenomedullin receptor binding sites in rat brain and peripheral tissues. *Eur J Pharmacol* 474: 165-174.
- 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.
- Lohmann S, Walter U, Miller P, Greengard P, De Camilli P. 1981. Immunohistochemical localization of cyclic GMP-dependent protein kinase in mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 78(1): 653-657.
- 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.
- Mathison Y, Israel A. 2006. Señalización de la adrenomedulina en la eminencia media de la rata. *Arch Ven Farmacol Terap* 25(2): 45-53.
- Moncada S, Higgs A. 1993. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 329(27): 2002-2012.
- Nakane M, Ichikawa M, Deguchi T. 1983. Light and electron microscopic demonstration of guanylate cyclase in rat brain. *Brain Res* 273(1): 9-15.
- NIH Guide for the care and use of animals. Institute of Laboratory Animal Resources, National Research Council, National Academy Press: Washington DC, USA, 1996.
- Parameswaran N, Spielman W, Brooks DP, Nambi P. 1999. SB203580 reverses adrenomedullin's effect on proliferation and apoptosis in cultured mesangial cells. *Eur J Pharmacol* 371:75-82.
- Pastorello M, Díaz E, Csibi A, Garrido M, Chabot J, Quirion R, Israel A. 2007. Papel de la adrenomedulina cerebelosa en la hipertensión arterial. *Arch Ven Farmacol Terap* 26(2): 98-104.
- Sakata J, Shimokubo T, Kitamura K, Nakamura S, Kangawa K, Matsuo H, Eto T. 1993. Molecular cloning and biological activities of rat adrenomedullin, a hypotensive peptide. *Biochem Biophys Res Commun* 195: 921-927.
- Sakata J, Shimokubo T, Kitamura K, Nishizono M, Ichiki 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, Uttenthal O, Martínez A, Fernández P, Martínez J, Alonso D, Bentura M, Santacana M, Gallardo J, Martínez R, Cutitta 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.
- Shan J, Krukoff T. 2001. Distribution of preproadrenomedullin mRNA in the rat central nervous system and its modulation by physiological stressors. *J Comp Neurol* 432: 88-100.
- Shimekake Y, Nagata K, Ohta S, Kambayashi Y, Teraoka H, Kitamura K, Eto T, Kangawa K, Matsuo H. 1995. Adrenomedullin stimulates two signal transduction pathways, cAMP accumulation and Ca(2+) mobilization, in bovine aortic endothelial cells. *J Biol Chem* 270: 4412-4417.
- Steiner A, Parker C, Kipnis D. 1972. Radioimmunoassay for cyclic nucleotides. *J Biol Chem* 247: 1106-1113.
- Wehlage S, Smith F. 2011. Nitric oxide and angiotensin II regulate cardiovascular homeostasis and the arterial baroreflex control of heart rate in conscious lambs. *J Renin Angiot Aldos Syst* 13(1): 99-106.
- Wong P, Cheung T, Cheung B. 2012. Adrenomedullin and cardiovascular diseases. *J R Soc Med Cardiovasc Dis* 1: 14-20.
- Xu Y, Krukoff T. 2004a. Decrease in arterial pressure induced by adrenomedullin in the hypothalamic paraventricular nucleus is mediated by nitric oxide and GABA. *Regul Pept* 119(1-2): 21-30.
- Xu Y, Krukoff T. 2004b. Adrenomedullin in the rostral ventrolateral medulla increases arterial pressure and heart rate: roles of glutamate and nitric oxide. *Am J Physiol* 287: R729-R734.
- Xu Y, Krukoff T. 2005. Adrenomedullin stimulates nitric oxide release from SK-N-SH human neuroblastoma cells by modulating intracellular calcium mobilization. *Endocrinology* 146: 2295-2305.
- Zanzinge J. 1999. Role of nitric oxide in the neural control of cardiovascular function. *Cardiovas Res* 43: 639-649.
- 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.