

# Efecto de la adrenomedulina sobre la producción de AMPc en el cerebelo de la rata durante la hipertensión

## Effect of adrenomedullin on cAMP production in rat cerebellum during hypertension

LETICIA FIGUEIRA\*, ANITA ISRAEL

### RESUMEN

La adrenomedulina (AM) es un péptido ubicuo que se encuentra en el cerebelo y que ejerce sus acciones a través de la activación de diversas vías de señalización, entre ellas la adenilil ciclasa (AC) /adenosina monofosfato cíclico (AMPc); sin embargo, en el cerebelo de ratas hipertensas esta vía aún es desconocida. En el vermis cerebeloso de ratas hipertensas existe alteración en la expresión de la AM, los receptores de AM y de sus componentes, lo que sugiere un 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 en el cerebelo, por lo que en el presente estudio se evaluó el efecto de la AM cerebelosa sobre la producción de AMPc durante la hipertensión. Para ello, ratas macho adultas controles normotensas Wistar Kyoto (WKY) y espontáneamente hipertensas (SHR) fueron sacrificadas, se disecó el vermis cerebeloso y estimuló el tejido *in vitro* con AM. Posteriormente, se determinó la producción de AMPc y proteínas tisulares. Se demostró que la AM incrementó, de forma similar, la producción de AMPc en el vermis de cerebelo de las ratas WKY y SHR. Es efecto fue bloqueado por la AM(22-52) y el CGRP(8-37), lo que indica que es mediado a través de la estimulación de los tres subtipos de receptores de AM, AM1, AM2 y CGRP. Nuestros resultados demuestran la participación de esta vía de señalización en los efectos inducidos por la AM y descartan su asociación con la desregulación de los receptores durante la hipertensión.

**Palabras clave:** Adrenomedulina, cerebelo, adenosina monofosfato cíclico, hipertensión.

### ABSTRACT

Adrenomedullin (AM) is a ubiquitous peptide expressed in cerebellum. AM signals through several pathways, such as adenylate cyclase (AC)/cyclic adenosine monophosphate (cAMP) production; however, in the hypertensive rat cerebellar vermis this pathway is still elusive. It is known that there is an alteration in the expression of AM, AM receptors and their receptors components in the cerebellum during hypertension, suggesting a possible role of cerebellar adrenomedullinergic system in blood pressure regulation. This alteration may be associated with the signaling mechanisms of AM in cerebellum, thus in the present study we assessed the effect of AM on cAMP production in cerebellar vermis of hypertensive rat. Adult male Wistar Kyoto (WKY) and spontaneously hypertensive rats (SHR) were sacrificed, the cerebellar vermis was dissected under stereomicroscopic control and the tissue was stimulated *in vitro* with AM. cAMP production were assayed. AM increased in similar magnitude cAMP production in cerebellar vermis of WKY and SHR rats. This action was blocked by AM(22-52) and CGRP(8-37), indicating that is mediated through the stimulation of the three AM receptor subtypes, AM1, AM2 and CGRP. Our results demonstrate the involvement of this signaling pathway in the AM induced actions and discards its association with the dysregulation of AM receptors during hypertension.

**Key words:** Adrenomedullin, cerebellum, cyclic adenosine monophosphate, hypertension.

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

\* Escuela de Bioanálisis, Laboratorio de Investigación y Postgrado de la Escuela de Bioanálisis (LIPEB), Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo, Venezuela

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

E-mail: figueiraleticia@gmail.com

## Introducción

La adrenomedulina (AM) es un péptido de 52-(humano) y 50-(rata) residuos de aminoácidos, perteneciente a la familia de los péptidos de la calcitonina, (Roh y col., 2004; Takei y col., 2004), el cual fue aislado por primera vez en el feocromocitoma humano y que tiene la capacidad de incrementar la producción de adenosina monofosfato cíclico (AMPC) plaquetario (Kitamura y col., 1993).

Inicialmente, los estudios con la AM sugerían que sus efectos son mediados a través de su unión a receptores acoplados a proteína G, y se creía que éstos eran receptores de péptidos pertenecientes a su misma familia. Hoy está claro que la AM ejerce su acción principalmente mediante su unión con tres subtipos de receptores, el receptor de AM tipo 1 (AM1), tipo 2 (AM2) y el receptor del péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP), los cuales están formados por la co-expresión del receptor similar al receptor de calcitonina (CRLR) y una proteína accesoria, la proteína que modifica la actividad del receptor (RAMPs) tipo 2 (RAMP2), tipo 3 (RAMP3) y tipo 1 (RAMP1), respectivamente (Kuwasako y col., 2004, Parameswaran y col., 2006, Gibbons y col., 2007).

Uno de los mecanismos de acción a través del cual actúa la AM y por el cual fue descubierto, es su capacidad de elevar los niveles de AMPC (Kitamura y col., 1993). Adicionalmente, en varios tipos de células, la AM ha demostrado activar otras vías de señalización como 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). Por lo tanto, los mecanismos de señalización por los cuales la AM media sus funciones varían entre especies y tejido, pero generalmente involucran al AMPC, óxido nítrico (NO) y mecanismos dependientes de calcio (Gibbons y col., 2007).

La evidencia indica que tanto la AM como los componentes de sus receptores se encuentran ampliamente distribuidos en diversas localizaciones como la aurícula y ventrículo cardíaco, aorta, pulmón, riñón, páncreas, intestino delgado, hígado, bazo, tiroides, testículo y músculo (Sakata y col., 1993; Ichiki y col., 1994; Sakata y col., 1994, Oliver y col., 2002).

A nivel del sistema nervioso central (SNC), se ha descrito sitios de unión para la AM y el péptido en áreas como la corteza cerebral, cerebelo, tálamo, hipotálamo, amígdala, bulbo raquídeo y en el puente de Varolio (Sone y col., 1997, Serrano y col., 2002; Juaneda y col., 2003; Macchi y col., 2006). En el cerebelo, la AM se localiza en las células de Purkinje. Igualmente, la capa granular contiene dos tipos de

estructuras neurales inmunoreactivas a la AM, los terminales de las fibras musgosas y las células de Golgi. Aún más, 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 nivel del cerebelo.

Se ha demostrado la existencia de un sistema adrenomedulinérgico a nivel local que señala por diferentes vías. En este sentido Figueira e Israel (2014a) han demostrado que en el vermis cerebeloso de la rata, la AM es capaz de activar la producción de AMPC, guanosina monofosfato cíclico (GMPc), NO, la activación mediante fosforilación de las ERK1/2 y disminuir la actividad de las enzimas antioxidantes, catalasa, superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa (Figueira e Israel, 2013a, Figueira e Israel, 2015a).

Ahora bien, la evidencia demuestra que la expresión de la AM y de los componentes de sus receptores en el vermis de cerebelo de ratas espontáneamente hipertensas (SHR) se encuentra alterada cuando se compara con sus controles normotensos, Wistar Kyoto (WKY), lo que sugiere que la AM podría estar participando en mecanismos que subyacen en la hipertensión (Figueira e Israel 2013b, Figueira e Israel, 2015b). Aún más, se ha demostrado que durante la hipertensión existe una alteración de las vías de señalización de GMPc/NO, ERK1/2 estimulada por la AM, así como sobre el efecto antioxidante de la AM cerebelosa (Figueira e Israel 2014b, Figueira e Israel, 2015c,d), lo que sugiere una asociación funcional entre la alteración en la expresión de la AM y los componentes de sus receptores y su señalización, la cual podría ser responsable de la respuesta diferencial de este péptido durante la hipertensión.

Hasta los momentos se desconoce el efecto de la hipertensión sobre la producción de AMPC inducida por la AM en el cerebelo; es por ello, que en el presente estudio se evaluó el efecto de la AM sobre la producción de este segundo mensajero en el vermis del cerebelo de ratas hipertensas.

## Materiales y métodos

### ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Se emplearon ratas macho controles normotensos WKY y SHR, de 16 semanas de edad, provenientes del Bioterio del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC) y ratas *Spague Dawley* provenientes del Instituto Nacional de Higiene «Rafael Rangel» (Caracas-Venezuela). Los animales fueron mantenidos en jaulas a temperatura ambiente ( $25 \pm 1$  °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), 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) (conteniendo en mM: NaCl 125; KCl 3,5;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,25;  $\text{MgSO}_4$  1,20;  $\text{CaCl}_2$  0,75;  $\text{NaHCO}_3$  25; glucosa 10 y teofilina 1,6) burbujeado con 95%  $\text{O}_2$  : 5%  $\text{CO}_2$ .

#### ENSAYO DE LA ADENILIL CICLASA

Para el ensayo de la activación de la adenilil ciclasa (AC) cada vermis del cerebelo fue transferido individualmente a tubos Eppendorf conteniendo 180  $\mu\text{L}$  de buffer KBR, sometiéndose a pre-incubación durante 10 minutos a 37 °C, en cuyo período se añadieron los antagonistas respectivos. La reacción se inició con el agregado del agonista (20  $\mu\text{L}$ ), o buffer para los controles, al medio de incubación seguidos de 10 minutos adicionales de incubación. La reacción se detuvo agregando 20  $\mu\text{L}$  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 AMPc.

#### DETERMINACIÓN DEL AMPc

El contenido de AMPc se cuantificó por ensayo inmunoenzimático (ELISA), utilizando un kit comercial (Arbor Assay, USA). Para ello, se incubó 50  $\mu\text{L}$  de muestra en una placa de 96 pozos cubierta con un anticuerpo para captura. Posteriormente se agregó un conjugado AMPc - peroxidasa. La reacción de unión fue iniciada con la adición de anticuerpo al AMPc. Después de 2 horas de incubación, la placa fue lavada y el sustrato añadido. La absorbancia fue leída a 450 nm. La cantidad de AMPc se calculó utilizando una curva estándar (rango de 0 a 150 pmol/mL). La producción de AMPc se reportó como pmoles de AMPc formados/10 min/mg de proteínas.

#### 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 sistóli-

ca (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).

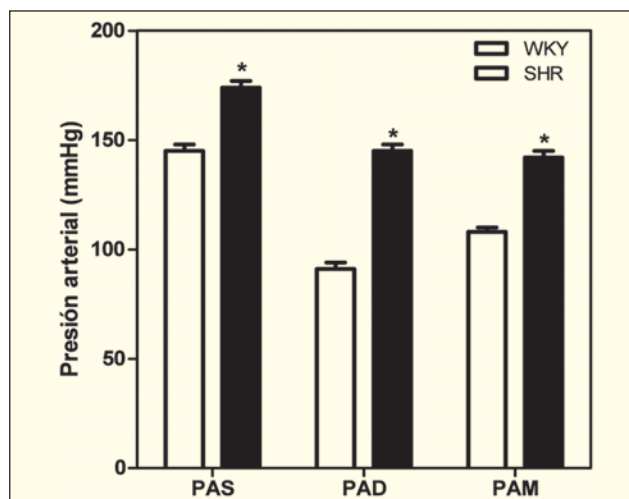
#### ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  error estándar (E.E.M.) Se realizó pruebas de normalidad para evaluar la distribución de las variables. Se utilizó la prueba de Kruskal - Wallis para comparar los valores de los grupos, con análisis post hoc mediante la prueba de U- de Mann-Whitney sobre cada par de grupos. 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 presenta los valores de la media  $\pm$  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 ( $N=6$ ;  $p < 0,0001$ ).

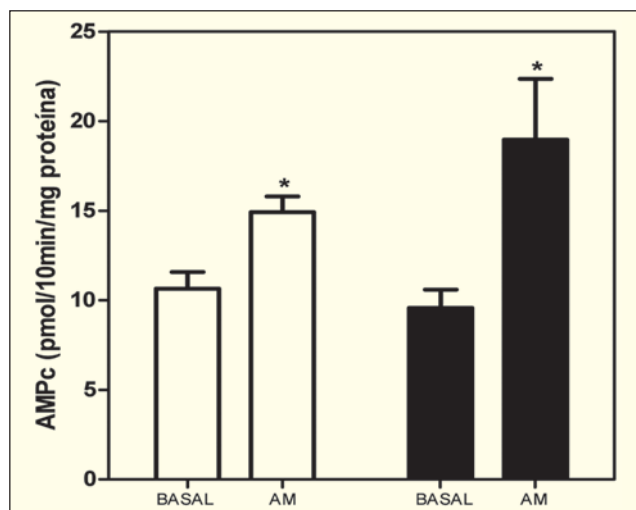


**Fig. 1.** Características de las ratas WKY y SHR de 16 semanas de edad. Se determinó PAS, PAD y PAM (mmHg). Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  E.E.M. ( $N=6$ ). \* $p < 0,0001$  vs. WKY.

#### EFECTO DE LA AM SOBRE LA PRODUCCIÓN DE AMPc EN EL CEREBELO DE LAS RATAS WKY Y SHR

Se evaluó el efecto de la AM sobre la activación de la AC en el vermis cerebelar de ratas WKY y SHR

adultas. Como se puede apreciar en la figura 2, la incubación del vermis cerebelar con AM ( $2 \times 10^{-7}$  M) durante 10 min, provocó un incremento significativo en la acumulación del AMPc cuando se comparó con su basal en las ratas WKY ( $10,64 \pm 0,93$  vs.  $14,92 \pm 0,87$ , basal vs. AM) ( $p < 0,05$ ,  $N = 6$ ). De igual modo, en las ratas SHR la adición al baño de incubación de la AM provocó un incremento en la acumulación del AMPc ( $9,57 \pm 1,03$  vs.  $18,96 \pm 3,40$ , basal vs. AM) ( $p < 0,05$ ,  $N = 6$ ).



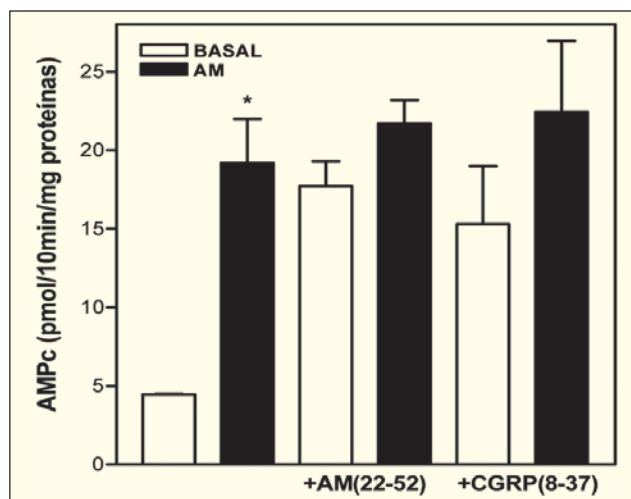
**Fig. 2.** Efecto de la AM sobre la producción de AMPc en el vermis de cerebelo de ratas WKY y SHR. El vermis cerebelar fue incubado con AM ( $2 \times 10^{-7}$  M) o vehículo durante 10 min. Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  E.E.M. de la acumulación de AMPc/mg proteína. ( $N=6$ ). \* $p < 0,05$  vs. respecto al basal.

#### SUBTIPOS DE RECEPTORES QUE MEDIAN LA ACCIÓN DE LA AM SOBRE LA PRODUCCIÓN DE AMPc EN EL CEREBELO DE LA RATA SPRAGUE - DAWLEY

Se evaluó la posible participación de los subtipos de receptores de AM en los efectos de la AM sobre la acumulación del AMPc en el vermis de cerebelo de ratas *Sprague Dawley*. Como se observa en la figura 3, el pretratamiento con la AM(22-52), antagonista de los receptores de AM, durante 10 min, bloqueó la acumulación del AMPc inducida por la AM en el vermis cerebelar de ratas *Sprague Dawley* a niveles comparables a sus valores basales ( $17,70 \pm 1,53$  vs.  $21,60 \pm 1,84$  AM(22-52) vs. AM(22-52)+AM). De igual manera, la adición de CGRP(8-37), antagonista del receptor CGRP, bloqueó la acumulación de AMPc inducido por la AM ( $15,22 \pm 3,74$  vs.  $22,45 \pm 4,71$  CGRP(8-37) vs. CGRP(8-37) + AM) ( $N=7$  \* $p < 0,0001$ ).

#### Discusión

La AM es un péptido ubicuo al que se le han atribuido importantes funciones en la regulación de la función cardiovascular a través de efectos tanto a ni-



**Fig. 3.** Subtipos de receptores de AM involucrados en la producción de AMPc en el vermis de cerebelo de ratas *Sprague Dawley*. El vermis cerebelar fue incubado con AM(22-52) ( $1 \times 10^{-6}$  M) o CGRP(8-37) ( $1 \times 10^{-6}$  M) durante 10 min en presencia y ausencia de AM ( $2 \times 10^{-7}$  M). Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  error estándar de la acumulación de AMPc ( $N=7$ ). \* $p < 0,0001$  vs. Basal.

vel 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).

Los mecanismos de señalización por los cuales la AM media sus funciones varían entre especies y tejido, 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- $\kappa$ 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 especies reactivas de oxígeno (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 col., 1999).

Desde el descubrimiento de la AM, el AMPc fue considerado inicialmente como la principal molécula de señalización intracelular de este péptido. La AM activa la AC en células de músculo liso vascular produciendo un incremento en los niveles de AMPc; sugi-

riéndose que el receptor de AM está acoplado a la AC a través de una proteína G estimuladora (Gs) sensible a toxina de cólera, que activa la proteína AC con producción de AMPc y activación de la proteína quinasa A (PKA) (Hinson y col., 2000). Adicionalmente se ha demostrado en una línea celular de oligodendrocitos, KG1C, que el incremento de los niveles de AMPc inducido por la AM es mediado por el receptor de AM y el CGRP; ya que este efecto es inhibido por antagonista de los receptores de AM y CGRP, AM(22-52) y CGRP(8-37) respectivamente, pero no por el antagonista del receptor de amilina, amilina(8-37) (Uezono y col., 2001).

Por otra parte, se ha descrito que la AC transmembrana está involucrada en la regulación de múltiples procesos cerebrales tales como la plasticidad sináptica, aprendizaje y memoria; y está ampliamente distribuida en el cerebro, siendo especialmente abundante en corteza, hipocampo, núcleo talámico y en la capa granular del cerebelo (Sanabra y col., 2011). Adicionalmente, se ha descrito que las neuronas expresan la AC soluble (Kamenetsky y col., 2006). De hecho, en el cerebro adulto, esta proteína es expresada en los astrocitos y en los axones de neuronas en el hipocampo, corteza visual y en el cerebelo (Chen y col., 2013). Asimismo, se encuentra presente en neuronas del ganglio de la raíz dorsal y médula espinal (Wu y col., 2006), y se ha demostrado que desempeñan un importante papel en la supervivencia y el crecimiento axonal de las células ganglionares de la retina (Corredor y col., 2012; Martínez y col., 2014).

En el presente estudio se demostró que la AM fue capaz de incrementar la producción de AMPc tanto en el vermis cerebeloso de ratas normotensas como de las hipertensas; sugiriendo que la activación de esta vía de señalización por parte de la AM no se encuentra afectada durante este estado patológico. En este sentido, algunos estudios han indicado que la hipertensión puede influir en la expresión de la AM y los componentes de su receptor a nivel periférico y central (Gibbons y col., 2007). De hecho, Shan y col., (2001) encontraron una menor expresión del ARNm que codifica a la AM en regiones centrales como el núcleo paraventricular (PVN), área postrema (AP) y el núcleo del tracto solitario (NTS) en ratas sometidas a estresores fisiológicos. Por su parte, de acuerdo a Stachniak y col., (2003) la expresión del ARNm de RAMP2 en el cerebro se ve alterada por los cambios en la presión arterial, pues el consecutivo incremento en la presión arterial durante 6 días tras la infusión intravenosa de fenilefrina provocó una disminución en la expresión del RAMP2 en el PVN y NTS, sugiriendo que la alteración en la expresión del ARNm del RAMP2 puede afectar la capacidad de la AM central en regular la actividad simpática. Por otra parte,

Figueira e Israel (2013b y 2015b) demostraron una desregulación del sistema adrenomedulinérgico cerebelar durante la hipertensión, pues encontraron una menor expresión de la AM y RAMP2, y una mayor expresión de CRLR, RAMP1 y RAMP3 en el vermis de cerebelo de ratas SHR con respecto a las WKY. La menor expresión de AM y RAMP2 durante la hipertensión sugiere que estos cambios podrían constituir un mecanismo que contribuye con el desarrollo de la hipertensión arterial y apoya el concepto que este péptido participa en la regulación de la presión arterial a nivel cerebelar. Por otro lado, los incrementos en la expresión de la CRLR, RAMP1 y RAMP3 durante la hipertensión arterial podrían promover la interacción de la AM con los receptores de CGRP y AM2 y constituir un mecanismo compensatorio al incremento de la presión arterial. Alternativamente, estos cambios podrían constituir la alteración inicial que traería como consecuencia la desregulación de los mecanismos de control de la presión arterial, ya que dichos cambios se encuentran presentes desde las etapas tempranas (8 semanas) de vida de las ratas hipertensas (Figueira e Israel, 2013b y 2015b). Adicionalmente, estos cambios podrían ser responsables de la ausencia de respuesta de la AM sobre la activación de las vías de señalización GMPc/NO y enzimas antioxidantes: catalasa, superóxido dismutasa, y glutatión peroxidasa y de la alteración en la activación de las ERK1/2 inducida por la AM en el vermis cerebeloso de ratas hipertensas (Figueira e Israel, 2014b, 2015c,d).

El hecho que la activación de la vía de señalización AC/AMPc inducida por la AM en el vermis cerebeloso no se encuentra alterada durante la hipertensión parece indicar que esta vía de señalización no se asocia con la desregulación del sistema adrenomedulinérgico cerebeloso, por lo que podría ser el responsable principal de los efectos hipotensores de este péptido a nivel local descritos previamente (Figueira e Israel, 2013c y 2015b). De hecho, la evidencia demuestra que la acción vasodilatadora y la acción mitogénica de la AM son mediadas por el AMPc. Efectivamente, estudios en células Swiss 3T3 han demostrado que la AM incrementa la síntesis de ácido desoxirribonucleico (ADN) y la proliferación celular, siendo estos efectos sensibles a agentes que elevan el AMPc y bloqueados por un inhibidor de la PKA (H-89) (Withers y col., 1996). Sin embargo, la vía AMPc/PKA es conocida como un regulador negativo del crecimiento celular; en este sentido la AM ha demostrado inhibir la síntesis de ADN en células de músculo liso vascular que crecen de manera asincrónica y suplementada con suero que contiene varios factores de crecimiento (Iwasaki y col., 1998; Shichiri y col., 2003). En vista de ello, se ha sugerido que el papel

bi-funcional de la AM para el control del crecimiento celular depende del tipo celular y del estado del ciclo celular; ya que en células quiescentes la AM ejerce su acción mitótica mediante la vía proteína tirosina quinasa (PTK)/ERK, mientras que la AM ejerce su acción anti-mitogénica mediante la vía AMPc/PKA en células que crecen asincrónicamente (Shichiri y col., 2003).

Nuestros hallazgos indican que la AM es capaz de incrementar la producción de AMPc en el vermis cerebeloso de la rata, a través de la estimulación de los tres subtipos de receptores de AM, AM1, AM2 y CGRP, ya que dicho efecto fue totalmente inhibido por el pretratamiento *in vitro* con AM(22-52) y CGRP(8-37), lo cual sugiere que en el vermis cerebeloso la AM es capaz de activar la vía AC/AMPc/PKA, cumpliendo una relevante función a este nivel (Presente resultados, Figueira e Israel, 2014a).

La vía de señalización AMPc/PKA de la AM ha sido postulada como el principal mecanismo de transducción de la AM para sus efectos biológicos, sin embargo, no es la única vía de señalización. A pesar de que los efectos cardiovasculares de la AM tales como la vasodilatación y el inotropismo positivo generalmente se acompañan de elevación del AMPc, hay pocos estudios que indican que tales acciones son bloqueadas tanto por inhibidores de la PKA o por antagonistas del AMPc. Por lo tanto, se ha sugerido que las acciones pleiotrópicas de la AM (crecimiento celular, migración y apoptosis) son independientes de la vía AMPc/PKA (Gibbons y col., 2007).

En conclusión, en el presente estudio se demostró que la AM fue capaz de incrementar la producción de AMPc en el vermis del cerebelo tanto en la rata normotensa como hipertensa, lo que sugiere la independencia de esta vía de señalización de la desregulación del sistema adrenomedulinérgico cerebeloso observado 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, Subproyecto 7, ECCV No. 2007001585, PEII-20122000760 and CDCH-UCV AIA-06.8402.2012.

## Referencias bibliográficas

Beltowski J, Jamroz A. 2004. Adrenomedullin – What do we know 10 years since its discovery? *Pol J Pharmacol* 56: 5-27.

Cases A, Mora-Macia J. 2001. Adrenomedulina: un nuevo péptido vasoactivo. *Nefrología* 21 (1): 16-25.

Chen J, Martínez J, Milner TA, Buck J, Levin LR. 2013. Neuronal expression of soluble adenylyl cyclase in the mammalian brain. *Brain Res* 1518:1-8.

Código de ética para la vida. 2011. Ministerio del Poder Popular para la Ciencia, Tecnología e Industrias Intermedias. República Bolivariana de Venezuela.

Corredor RG, Trakhtenberg EF, Pita-Thomas W, Jin X, Hu Y, Goldberg JL. 2012. Soluble adenylyl cyclase activity is necessary for retinal ganglion cell survival and axon growth. *J Neurosci* 32:7734-7744.

Figueira L, Israel A. 2013a. Efecto de la adrenomedulina sobre la actividad de las enzimas antioxidantes cerebelosas. *Rev Fac Farm* 76 (1,2):40-49.

Figueira L, Israel A. 2013b. Desregulación del sistema adrenomedulinérgico cerebeloso en la hipertensión arterial. *Rev Lat Hipert* 8:9-15.

Figueira L, Israel A. 2013c. Efecto hipotensor de la adrenomedulina cerebelosa. *Rev Latinoamer Hipert* 8: 62-67.

Figueira L, Israel A. 2014a. Señalización de la adrenomedulina en el vermis del cerebelo de la rata. *Arch Venezol Farmacol Terap* 33(3):92-97.

Figueira L, Israel A. 2014b. Efecto de la adrenomedulina cerebelosa sobre las quinasas reguladas por señales extracelulares en la hipertensión. *Rev Fac Farm* 77 (1-2):46-53.

Figueira L, Israel A. 2015a. Cerebellar adrenomedullin: New target for blood pressure regulation. *The Targets Neurol Diseases* 2015a 2: e1039. doi:10.14800/tnd.1039.

Figueira F, Israel A. 2015b. Role of cerebellar adrenomedullin in blood pressure regulation. *Neuropeptides* 54: 59-66.

Figueira L, Israel A. 2015c. Efecto de la hipertensión sobre la acción antioxidante de la adrenomedulina cerebelosa. *Rev Fac Farmacia* 78(1-2):43-50.

Figueira L, Israel A. 2015d. Efecto de la adrenomedulina sobre la producción de GMPc/óxido nítrico en el vermis de cerebelo durante la hipertensión. *Rev Fac Farmacia* 78(1-2):77-83.

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.

Hinson J, Kapas S, Smith D. 2000. Adrenomedullin, a multifunctional regulatory peptide. *Endocr Rev* 21 (2):138-167.

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.

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.

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.

Kamenetsky M, Middelhaufe S, Bank EM, Levin LR, Buck J, Steegborn C. 2006. Molecular details of cAMP genera-

- tion in mammalian cells: A tale of two systems. *J Mol Biol* 362:623-639.
- 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 YN, 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.
- 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.
- Martinez J, Stessin A, Campana A, Hou J, Nikulina E, Buck J, Levin L, Filbin M. 2014. Soluble Adenylyl Cyclase Is Necessary and Sufficient to Overcome the Block of Axonal Growth by Myelin-Associated Factors. *J Neurosci* 34(28):9281-9289.
- NIH Guide for the care and use of animals. 1996. Institute of Laboratory Animal Resources. National Research Council. National Academy Press, Washington DC, USA.
- 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.
- Oliver K, Wainwright A, Edvinsson L, Pickard J, Hill R. 2002. Immunohistochemical localization of calcitonin receptor like receptor and receptor activity-modifying proteins in the human cerebral vasculature. *J Cereb Blood Flow Metab* 22:620-629.
- 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, Hagi-Pavli E, Crowther G, Kapas S. 2004. Adrenomedullin signals through NF-kappaB in epithelial cells. *FEBS Lett* 577:249-254.
- Roh J, Chang C, Bhalla A, Klein C, Hsu S. 2004. Intermedin is a calcitonin / calcitonin gene related peptide family peptide acting through the calcitonin receptor like receptor / receptor activity modifying protein receptor complexes. *J Biol Chem* 279:7264-7274.
- Sanabra C, Mengod G. 2011. Neuroanatomical distribution and neurochemical characterization of cells expressing adenylyl cyclase isoforms in mouse and rat brain. *J Chem Neuroanat* 41 (1): 43-54.
- 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-Vizarrá 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, 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.
- 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.
- Shichiri M, Hirata Y. 2003. Regulation of cell growth and apoptosis by adrenomedullin. *Hypertens Res*. 26:S9-14.
- 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.
- Stachniak T, Krukoff T. 2003. Receptor activity modifying protein 2 distribution in the rat central nervous system and regulation by changes in blood pressure. *J Neuroendocrinol* 15 (9): 840-850.
- 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.
- 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.
- Withers D, Coppock H, Seufferlein T, Smith D, Bloom S, Rozengurt E. 1996. Adrenomedullin stimulates DNA synthesis and cell proliferation via elevation of cAMP in Swiss 3T3 cells. *FEBS Letters* 378:83-87.
- Wu KY, Zippin JH, Huron DR, Kamenetsky M, Hengst U, Buck J, Levin LR, Jaffrey SR. 2006. Soluble adenylyl cyclase is required for netrin-1 signaling in nerve growth cones. *Nat Neurosci* 9:1257-1264.
- 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.

**Recibido:** 15 de abril de 2016  
**Aceptado:** 20 de julio de 2016