

# Efecto de la adrenomedulina cerebelosa sobre las quinasas reguladas por señales extracelulares en la hipertensión

## Effect of cerebellar adrenomedullin on extracellular signals regulated kinases activation 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, como las quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK); sin embargo, en el vermis cerebeloso de ratas hipertensas esta vía aún es desconocida. En el cerebelo, la densidad de los receptores de la AM se encuentra aumentada durante la hipertensión, sugiriendo un posible papel del sistema adrenomedulinérgico cerebelar en la regulación de la presión arterial. En el presente estudio se evaluó la vía de señalización de las ERK, basal y activada por la AM en el vermis del cerebelo de ratas hipertensas. Para ello, ratas macho adultas espontáneamente hipertensas (SHR) y controles normotensos Wistar Kyoto (WKY) fueron sacrificados, se diseccionó el vermis cerebeloso y estimuló el tejido *in vitro* con AM. Posteriormente, se determinó la activación de las ERK1/2 y proteínas tisulares. Se demostró mayor activación basal de las ERK1/2 en el vermis de cerebelo de la rata SHR con respecto a las WKY (N=10; p<0,0001). Asimismo, se encontró que la AM activó a las ERK1/2 en el vermis de cerebelo de las ratas SHR y WKY, siendo dicho efecto de menor magnitud en las ratas hipertensas con respecto a las normotensas (p<0,001; N=17). Nuestros resultados indican una alteración de la señalización de la vía de las ERK, basal y activada por la AM cerebelosa, durante la hipertensión.

**Palabras claves:** Adrenomedulina, cerebelo, ERK1/2, hipertensión.

### Abstract

Adrenomedullin (AM) is a ubiquitous peptide. In brain, AM is expressed in several localized regions, including the cerebellum. AM signals through several pathways, like extracellular signals regulated kinases (ERK) activation; however, in the hypertensive rat cerebellar vermis this pathway is still unknown. AM binding sites are increased in cerebellum during hypertension, suggesting a role for cerebellar adrenomedullinergic system in the blood pressure regulation. The aim of the present study was to establish the effect of hypertension of the signaling pathway through ERK1/2, basal or AM activated, 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. ERK1/2 activation was assayed by western blot. Our findings demonstrate that increased basal activation ERK1/2 in the cerebellar vermis SHR rats compared to WKY (N=10; p<0,0001). We also found that in cerebellum of the SHR and WKY, AM increased ERK1/2 activation. This effect is smaller in magnitude in hypertensive rats (p<0,001. N=17). Our results indicate an alteration of cerebellum ERK signaling pathway, both basal and AM activates, during hypertension.

**Keywords:** Adrenomedullin, cerebellum, ERK1/2, hypertension.

### Introducción

La adrenomedulina (AM) es un péptido multifuncional de 52 residuos de aminoácidos, que media sus acciones a través de su unión con 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); éstos están formados por un heterodímero constituido por el receptor relacionado al gen de la calcitonina (CRLR) y la proteína que modifica la actividad del receptor (RAMP). El CGRP1

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

está formado por el complejo CRLR/RAMP1. La co-expresión de CRLR con RAMP2 o RAMP3, produce los receptores de AM1 o AM2, respectivamente (Ichiki y col., 1994; McLatchie y col., 1998).

La AM y sus receptores son ubicuos, pues su expresión se ha demostrado en una amplia variedad de células y tejidos, como el endotelio, corazón, aorta, pulmón, riñón, glándula suprarrenal (Kitamura y col., 1993<sup>A,B</sup>; Ichiki y col., 1994; Sakata y col., 1994); además se ha encontrado AM en circulación, orina, saliva, fluido cerebroespinal y amniótico (Kitamura y col., 1994; Nagata y col., 1998). 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, amígdala y cerebelo (Samson y Murphy, 1997; Serrano y col., 2002; Juaneda y col., 2003; Macchi y col., 2006). En el cerebelo, la inmunoreactividad a la AM se ha apreciado 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).

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<sup>A</sup>) en diferentes tipos celulares como plaquetas, células de músculo liso vascular, endoteliales, tubulares renales, mesangiales, estelares hepáticas y líneas celulares como la oligodendroglial humana KG-1C, entre otras (Uezono y col., 2001; Beltowski y Jamroz, 2004). La vía de señalización AMPC/proteína quinasa A (PKA) de la AM ha sido postulada como el principal mecanismo de transducción de la AM para sus efectos biológicos; de hecho, la acción vasodilatadora, mitogénica, inotrópica positiva y antioxidante de la AM es ejercida mediante esta vía de señalización (Kapas y col., 1997; Shimosawa y col., 2002).

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; Gibbons y col., 2007); de hecho, los efectos mitogénicos de la AM en células de músculo liso vascular son mediados a través de la vía Proteína Tirosina Quinasa (PTK)/Quinasa regulada por señales extracelulares (ERK) (PTK/ERK) (Iwasaki y col., 2001).

Por otra parte, la AM ha demostrado tener efecto sobre la producción de radicales libres, pues ha sido 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). El mecanismo que subyace a esta actividad varía dependiendo de la célula. En células mesangiales, la AM suprime la producción de EROs a través de la vía AMPC/PKA, mientras que en el ventrículo de la rata, la AM inhibe la NAD(P)H oxidasa a través de la vía óxido nítrico (NO)/ guanosina monofosfato cíclico (GMPc) (Liu y col., 2006).

En el cerebelo, se ha descrito que la AM es capaz de incrementar la producción de AMPC, GMPc, NO y disminuir la actividad de las enzimas antioxidantes, lo cual sugiere la existencia de un sistema adrenomedulinérgico cerebelar de importancia biológica (Figueira e Israel, 2013<sup>A,B</sup>). Por otro lado, se ha descrito que la activación de las ERK1/2 en tejidos periféricos está asociada con la hipertensión (Xu y col., 1996; Jing y col., 2011); sin embargo, se desconoce cómo se encuentra su estatus basal en el cerebelo de ratas hipertensas. Por otra parte, se ha descrito que la AM incrementa la activación mediante fosforilación de las ERK en el vermis de cerebelo, siendo dicho efecto mediado por los receptores de AM1 (Figueira e Israel, 2013<sup>A</sup>); sin embargo, muy pocos han sido los estudios sobre la AM en el cerebelo de ratas hipertensas, e incluso 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 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, Wistar Kyoto (WKY), lo cual sugiere un posible papel de la AM en la regulación de la presión arterial (Figueira e Israel, 2013<sup>C</sup>). Es por ello que en el presente estudio se evaluó el efecto de la hipertensión sobre la vía de señalización de las ERK, basales y activadas por la AM, en el vermis del cerebelo de ratas SHR y sus controles normotensos, WKY.

## Materiales y métodos

### ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Se emplearon ratas macho SHR y sus controles normotensos WKY adultos 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 ( $25 \pm 1$  °C) con ciclos de 12 horas luz / oscuridad. La dieta de los animales consistió en Ratarina<sup>®</sup> 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 Bioética 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% O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub>.

#### DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LA ERK1/2

La determinación de la ERK1/2 total y fosforilada se realizó por Western blot. Para ello el tejido estimulado o no con AM fue homogeneizado en frío mediante sonicación, en buffer de lisis para ERK (Tris Base 50 mM, 5mM EDTA, 1mM NaF, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, Tritón X-100 1% y mezcla de inhibidores de proteasas compuesto por pepstatina A 5μM, aprotinina 10μg/ml, leupeptina 10μM, PMSF 2mM, pH 7.4). El homogeneizado fue centrifugado a 4 °C, a 10.000 rpm durante 10 minutos, para obtener el sobrenadante, el cual fue congelado a -70°C hasta el momento de su procesamiento. Para el análisis por Western blot, alícuotas del homogeneizado fueron separadas por electroforesis en gel SDS-poliacrilamida al 10% y transferidas a una membrana de nitrocelulosa. Las membranas fueron bloqueadas con leche descremada al 10%, y posteriormente se incubaron durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario anti-fosfo-ERK1/2 y anti-ERK1/2 de conejos (Cell Signaling) diluido en solución de albúmina sérica bovina al 3% en TBS-Tween al 0,1% (Dilución 1:1000). Las membranas fueron lavadas con TBS-Tween al 0,1% e incubadas con anticuerpo secundario anti conejo conjugado con peroxidasa de rábano, diluido en solución de albúmina sérica bovina al 1,5% en TBS-Tween al 0,1% (Dilución 1:1000) durante 1 hora en agitación lenta a temperatura ambiente. Las proteínas fueron visualizadas por quimioluminiscencia (SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate) a través de películas para rayos X y cuantificadas mediante análisis densitométrico (Quantity One 1-D®- BioRad). La expresión de la ERK1/2 fosforilada fue normalizada con la ERK1/2 total.

#### 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 median-

te 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 ± E.E.M. Se utilizó el análisis de Kruskal-Wallis con análisis *post hoc* y el análisis de Wilcoxon Rank Sum para comparar los valores de las variables sujetas a estudio. 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 Tabla I se presenta 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. Como se puede observar, las ratas SHR presentan valores estadísticamente superiores de PAS, PAD y PAM cuando se comparó con las ratas WKY.

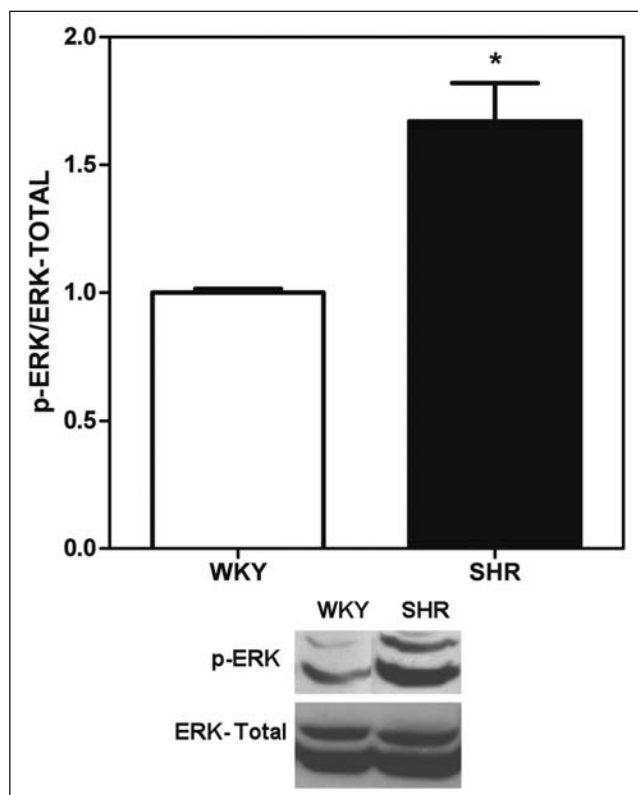
Tabla I

**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 ± error estándar. (N= 19). \* $p < 0,0001$  vs. WKY**

GRUPO	PAD (mmHg)	PAS (mmHg)	PAM (mmHg)
WKY	91 ± 3	145 ± 3	108 ± 2
SHR	126 ± 3*	174 ± 3*	142 ± 3*

#### EFFECTO DE LA HIPERTENSIÓN SOBRE LA ACTIVACIÓN BASAL DE LAS ERK1/2 EN EL VERMIS DEL CEREBELO DE LA RATA

Se evaluó el efecto de la hipertensión sobre la activación basal de las ERK1/2 en el vermis cerebelar de la rata. Como se observa en la figura 1, la expresión de la p-ERK1/2 en el vermis del cerebelo fue significativamente mayor en las ratas SHR ( $1,67 \pm 0,14$  vs.  $1,00 \pm 0,01$ ), cuando se compara con las WKY (N=10;  $p < 0,0001$ ).



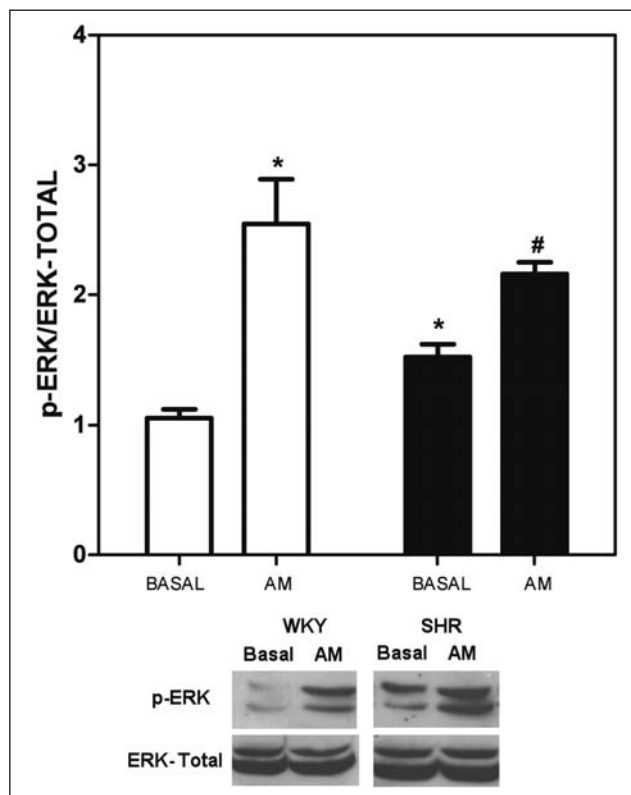
**Figura 1.** Efecto de la hipertensión sobre la expresión basal de las p-ERK1/2 en el vermis de cerebelo de ratas WKY y SHR. 100 µg de proteínas provenientes del vermis cerebelar de las ratas WKY y SHR de 16 semanas de edad fueron empleados para el *western blotting*. Los resultados fueron expresados como la media ± E.E.M. La expresión de la p-ERK1/2 fue normalizada con la de la ERK1/2-total. (N=10). \*p<0,0001 vs. WKY

#### EFECTO DE LA AM SOBRE LA ACTIVACIÓN DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN ERK1/2 EN EL VERMIS CEREBELOSO EN RATAS SHR Y WKY.

Se evaluó el efecto de la AM sobre la activación de las ERK1/2 en el vermis cerebelar de ratas SHR y WKY adultas. Como se puede apreciar, la incubación del vermis cerebelar con AM ( $2 \times 10^{-7}$  M) durante 5 min, activó de manera significativa las ERK1/2 (Basal:  $1,05 \pm 0,06$  vs. AM:  $2,54 \pm 0,34$ ) (Figura 2) en las ratas WKY de 16 semanas de edad con respecto a su control ( $p < 0,001$ , N=17). De igual manera, en las ratas SHR la adición al baño de incubación de la AM incrementó la fosforilación de las ERK1/2 cuando se comparó con su basal ( $1,52 \pm 0,09$  vs.  $2,16 \pm 0,10$  Basal vs. AM). Sin embargo, la magnitud de su activación resultó ser significativamente menor cuando se comparó con la de las WKY.

#### Discusión

Las MAPK cumplen funciones importantes en el organismo y juegan un papel crucial en diferentes señales de transducción, pues son componentes prin-



**Figura 2.** Efecto de la AM sobre la activación (fosforilación) de las ERK1/2 en el vermis de cerebelo de ratas WKY y SHR. El vermis cerebelar fue incubado con AM ( $2 \times 10^{-7}$  M durante 5 min). 100 µg de proteínas provenientes del vermis cerebelar de las ratas WKY y SHR de 16 semanas de edad fueron empleados para el *western blotting*. Los resultados fueron expresados como la media ± E.E.M. La expresión de la p-ERK1/2 fue normalizada con la de la ERK1/2-total. (N=17). \*p<0,001 vs. WKY Basal. # p<0,001 vs. SHR Basal.

cipales de las vías de control de embriogénesis, diferenciación, proliferación y muerte celular (Pearson y col., 2001). Las ERK1/2 son proteínas serina/treonina quinasas, que son activadas en respuesta a factores de crecimiento, estrés oxidativo e incremento del calcio intracelular (Kurino y col., 1995). Estas proteínas de señalización juegan un papel importante en la supervivencia, proliferación y diferenciación de varios tipos celulares (Otani y col., 2002). Diferentes estudios muestran que las ERK1/2 están ampliamente expresadas en tejidos periféricos y centrales. A nivel del cerebelo, existe una alta distribución celular e intracelular de las ERK tanto en ratas jóvenes como adultas; de hecho, estudios de inmunohistoquímica han demostrado que las células de Purkinje, granulosas y gliales del cerebelo de la rata son inmunoreactivas a las p-ERK1/2 (Zsarnovszky y Belcher, 2004). Asimismo, algunos estudios han indicado que el inicio de la activación de las ERK coincide con los eventos de desarrollo cerebeloso, lo cual sugiere que la señalización de las ERK juega un papel muy importante en la regulación de la migración y proliferación celular, y en la maduración sináptica en el desarrollo

del cerebelo. Sin embargo, se ha postulado que en el cerebelo adulto la señalización de las ERK podría mediar el procesamiento de la información postsináptica (Zsarnovszky y Belcher, 2004).

Existe evidencia que indica que la activación de las ERK1/2 en tejidos periféricos está asociada a la hipertensión. En este sentido, Xu y col. (1996) encontraron que la activación de las ERK en la pared vascular durante la hipertensión fue seguida de la expresión de genes *c-fos* y *c-jun*; por lo que la activación de las ERK podría contribuir directamente con los cambios patológicos que ocurren durante la hipertensión, como la hipertrofia y proliferación de las células de músculo liso asociado con el remodelado de arterias mayores. Es conocido que las proteínas Fos y Jun se combinan para formar un heterodímero proteína adaptadora - 1 (AP-1) estable, el cual se une a las secuencias consenso AP-1 presente en numerosos genes asociados con la proliferación celular y la respuesta hipertrófica (Bishopric y col., 1992); por lo que la activación de la AP-1 podría conllevar una significativa alteración en el programa genético de las células del músculo liso, que resulta en cambios fenotípicos y proliferación celular. De hecho, Hamaguchi y col. (1998) reportaron que la fosforilación de las ERK a través de la activación de la AP-1 en el riñón de ratas durante la hipertensión, puede ser responsable del daño glomerular. Asimismo, Jing y col. (2011) encontraron mayor activación de las ERK1/2 y mayor expresión de las ERK en las células de músculo liso vascular y en células endoteliales de arterias renales en las ratas hipertensas con respecto a las normotensas. Aún más, el hecho de que el tratamiento con un inhibidor de las ERK en las ratas hipertensas, redujo el engrosamiento de la pared vascular inducido por la hipertensión, lo cual fue asociado con supresión de la expresión de la ERK y la fosforilación de las ERK1/2 en las células de músculo liso vascular y endotelial de las arterias renales; sugiere que las ERK1/2 juegan un papel importante en el remodelado vascular de las arterias renales durante la hipertensión (Jing y col., 2011).

En relación al SNC, algunos estudios han reportado que las MAPK a nivel central pueden cumplir un papel importante en la regulación de la presión arterial, pues Seyedabadi y col., (2001), demostraron que la inhibición de las MAPK en la región ventrolateral rostral del bulbo raquídeo (RVLM) es vital para el mantenimiento de los niveles tónicos de presión arterial en ratas SHR y WKY. Igualmente, se ha demostrado que las cascadas de las ERK1/2 tienen importancia en la modulación de la potenciación a largo plazo en el área CA1 del hipocampo y es requerida para varias formas de aprendizaje y memoria. Asimismo, se

ha indicado que la cascada de las ERK participa en el daño neuronal inducido por isquemia y en la generación de actividad convulsivante en cultivos de neuronas de hipocampo (Vanhoose y col., 2002).

Ahora bien, hasta los momentos, no se ha descrito el estatus basal de la activación de las ERK1/2 en el vermis de cerebelo durante la hipertensión. Al respecto, nuestros hallazgos demuestran, por primera vez, un incremento en la activación de las ERK1/2 basal en el vermis de cerebelo de ratas hipertensas comparado con las WKY normotensas, lo cual sugiere un posible papel de esta vía de señalización en la regulación de la presión arterial mediada por el cerebelo, de forma similar a lo reportado por otros investigadores en otros órganos (Parenti y col., 2000; Ding y col., 2007; Fernández y col., 2009).

La señal precisa responsable de la activación de las quinasas durante la hipertensión aguda no es totalmente clara; sin embargo, se ha descrito un efecto directo de la presión arterial sobre las ERK y las MAPK (Nishiyama y col., 2004). Igualmente, se ha sugerido la participación del estrés oxidativo en la señalización de las ERK1/2 (Song y col., 2005), pues se ha demostrado que las ERK pueden ser activadas por las EROs (Viedt y col., 2000; Frank y col., 2001; Song y col., 2005). Por ello podríamos inferir que la mayor fosforilación de las ERK1/2 en el vermis de cerebelo de ratas hipertensas con respecto a las normotensas podría ser atribuida a una mayor producción de EROs en las ratas hipertensas, sugiriendo un posible papel del estrés oxidativo en esta activación. En este sentido, el peróxido de hidrógeno ha demostrado activar las ERK en diferentes tipos celulares como células de músculo liso de aorta, pulmón, íleo y miocitos traqueales (Abe y col., 1998; Song y col., 2005).

Además del estrés oxidativo, existe evidencia que indica que el estiramiento (estrés mecánico) de células en cultivo podría activar a las MAPK (Yamazaki y col., 1996) e inducir la expresión de genes como *c-fos* y *c-jun* (Komuro y Yazaki, 1993). Asimismo, agentes como la angiotensina II (ANG II) han mostrado que son capaces de activar las ERK e inducir la expresión de dichos genes en cultivo celular (Tsuda y col., 1992); de hecho, se ha sugerido que la activación de las MAPK en la pared arterial ocurre como respuesta fisiológica a la hipertensión aguda (Tsuda y col., 1992).

Por otra parte, diversos estudios han demostrado que la AM 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, GC, ERK, las p38, JNK y los canales de potasio sensibles a ATP (Shimekake y col., 1995; Ikenouchi y col., 1997; Iwasaki y col., 1998).

En un estudio previo, se describió por primera vez que la AM fue capaz de incrementar la activación de las ERK1/2 y la producción de GMPc y NO en el vermis cerebelar a través de la estimulación del receptor AM1; e incrementó la producción del AMPc a través de los tres subtipos de receptores de AM, lo cual sugiere que en el cerebelo, la AM ejerce acciones a través de la activación de las vías NO/GMPc, AC/AMPc y ERK, sugiriendo la existencia de un sistema adrenomedulinérgico cerebelar de importancia fisiológica (Figueira e Israel, 2013<sup>A</sup>). Adicionalmente, hemos descrito que la AM en el cerebelo participa en la regulación de la señalización de las EROs, pues este péptido fue capaz de disminuir la actividad de las enzimas antioxidantes y la producción de productos de peroxidación lipídica que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBARS) en el vermis de cerebelo de rata; siendo dicho efecto mediado por ambos subtipos de receptores de AM y por el receptor de CGRP (Figueira e Israel, 2013<sup>B</sup>).

Ahora bien, el posible papel de la activación de las ERK1/2 cerebelosa inducido por la AM durante la hipertensión no ha sido establecido hasta el presente. Nuestros hallazgos demuestran, por primera vez, que la AM fue capaz de incrementar la fosforilación de las ERK1/2 en el vermis de cerebelo tanto de las ratas hipertensas como en las normotensas; siendo dicho efecto de menor magnitud en las ratas hipertensas. Dicha activación de las ERK por la AM ha sido demostrada previamente en otros tejidos y modelos experimentales (Iwasaki y col., 1998; Figueira e Israel, 2013<sup>A</sup>; Yoshimoto y col., 2004).

El incremento de menor magnitud en la activación de las ERK1/2 en el vermis de cerebelo de ratas hipertensas comparado con las WKY normotensas observado en el presente estudio, no sólo sugiere una posible desregulación, sino que apoya el papel fundamental de esta señalización en la regulación de la presión arterial mediada por el cerebelo. En este sentido, es preciso señalar que Figueira e Israel (2013<sup>C</sup>) demostraron la 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

otra parte, 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, 2013<sup>C</sup>).

Es conocido que el complejo CRLR/RAMP2 constituye la vía de traducción de la actividad biológica de la AM, y se ha postulado que alteraciones en la expresión de las RAMPs se asocia con alteraciones en la respuesta de la AM (Gibbons y col., 2007). En este sentido, nuestros resultados parecen indicar que para la adecuada señalización y respuesta de la AM cerebelar, la expresión de la RAMP2 ocurre en condiciones normales; sin embargo, bajo ciertas condiciones patológicas como la hipertensión, la expresión de RAMP3 incrementa y la RAMP2 disminuye. Esto indica que durante la hipertensión arterial, la célula cerebelosa cambia de un fenotipo de alta respuesta a la AM (expresión alta de RAMP2) a otro de baja respuesta (alta expresión de RAMP3) (Figueira e Israel, 2013<sup>C</sup>); de hecho, se ha descrito que la microinyección *in situ* de AM en el vermis de cerebelo fue capaz de provocar un marcado efecto hipotensor únicamente en las ratas hipertensas (SHR) y no en las normotensas (WKY) (Figueira e Israel, 2014). Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que la disminución de la activación de las ERK1/2 en el vermis de cerebelo de ratas hipertensas parece responder a la desregulación del sistema adrenomedulínérgico previamente descrito en el cerebelo de estas ratas (Figueira e Israel, 2013<sup>A,B,C</sup>, 2014).

En conclusión, nuestros resultados demuestran que durante la hipertensión existe un incremento en la fosforilación basal de las ERK1/2 en el vermis de cerebelo, y que la activación de las ERK1/2 inducida por la AM en el vermis de cerebelo se encuentra alterada en la hipertensión. Estos hallazgos sugieren que la vía de señalización ERK activada por la AM cumple un papel funcional en la regulación de la presión arterial mediada por el cerebelo.

## 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

- Abe M, Chao T, Solway J, Rosner M, Hershenson M. 1998. Hydrogen peroxide stimulates mitogen-activated protein kinase in bovine tracheal myocytes: implications for human airway disease. *Am J Respir Cell Mol Biol* 11: 577-585.
- Beltowski J, Jamroz A. 2004. Adrenomedullin – What do we know 10 years since its discovery? *Pol J Pharmacol* 56: 5-27.
- Bishopric N, Jayasena V, Webster K. 1992. Positive regulation of the skeletal alpha-actin gene by Fos and Jun in cardiac myocytes. *J Biol Chem* 267: 25535-25540.
- Ding L, Chapman A, Boyd R, Wang H. 2007. ERK activation contributes to regulation of spontaneous contractile tone via superoxide anion in isolated rat aorta of angiotensin II-induced hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292: H2997-H3005.
- Fernández L, Grande M, Diego J, Fuentes I, Macías J, Sánchez A, Grande J, García L, López J, Martínez C. 2009. Effect of different antihypertensive treatments on Ras, MAPK and Akt activation in hypertension and diabetes. *Clin Sci* 116: 165-173.
- Figueira L, Israel A. 2014. Efecto hipotensor de la adrenomedulina cerebelosa. *Revista Latinoamericana de Hipertensión*. En prensa.
- Figueira L<sup>A</sup>, Israel A. 2013. Señalización de la adrenomedulina en el vermis del cerebelo de la rata. *Arch Ven Farmacol Terap* 23. En prensa.
- Figueira L<sup>B</sup>, Israel A. 2013. Efecto de la adrenomedulina sobre la actividad de las enzimas antioxidantes cerebelosas. *Rev Fac Farm* 76 (1,2): 40-49.
- Figueira L<sup>C</sup>, Israel A. 2013. Desregulación del sistema adrenomedulinérgico cerebeloso en la hipertensión arterial. *Acta Cient Ven* 64. En prensa.
- Frank G, Eguchi S, Inagami T, Motley E. 2001. N-acetylcysteine inhibits angiotensin II-mediated activation of extracellular signal-regulated kinase and epidermal growth factor receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 280: 1116-1119.
- 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.
- Hamaguchi A, Kim S, Yano M, Yamanaka S, Iwao H. 1998. Activation of glomerular mitogen-activated protein kinases in angiotensin II-mediated Hypertension. *Am Soc Nephrol* 9: 372-380.
- 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.
- Jing L, Zhang J, Sun J, Guo F, An X, Yang K, Li P. 2011. Inhibition of extracellular signal-regulated kinases ameliorates hypertension-induced renal vascular remodeling in rat models. *Int J Mol Sci* 12: 8333-8346.
- 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.
- Kapas S, Brown D, Farthing P, Hagi-Pavli E. 1997. Adrenomedullin has mitogenic effects on human oral keratinocytes: involvement of cyclic AMP. *FEBS Letters* 418: 287-290.
- Kitamura K<sup>A</sup>, 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.
- Kitamura K, Kangawa K, Kojima M, Ichiki Y, Matsuo H, Eto T. 1994. Complete amino acid sequence of porcine adrenomedullin and cloning of cDNA encoding its precursor. *FEBS Letters* 338: 6-10.
- Kitamura K<sup>B</sup>, Sakata J, Kangawa K, Kojima M, Matsuo H, Eto T. 1993. Cloning and characterization of cDNA encoding a precursor for human adrenomedullin. *Biochem Biophys Res Commun* 194: 720-725.
- Komuro I, Yazaki Y. 1993. Control of cardiac gene expression by mechanical stress. *Ann Rev Physiology* 55: 55-75.
- Kurino M, Fukunaga K, Ushio Y, Miyamoto E. 1995. Activation of mitogen-activated protein kinase in cultured rat hippocampal neurons by stimulation of glutamate receptors. *J Neurochem* 65: 1282-1289.
- Liu J, Shimosawa T, Matsui H, Supowit S, Dipette D, Ando D, Fujita T. 2006. Adrenomedullin inhibits Angiotensin II-induced ROS production via modulation of Src activation. *FASEB Journal* 20: 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.
- McLatchie L, Fraser N, Main M, Wise A, Brown J, Thompson N, Solari R, Lee M, Foord S. 1998. RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor. *Nature* 393 (6683): 333-339.
- Nagata N, Kato J, Kitamura K, Kawamoto M, Tanaka N, Eto T, Takasaki M. 1998. Dissociation of adrenomedullin concentrations in plasma and cerebrospinal fluid in pregnant and non-pregnant women. *Eur J Endocrinol* 139: 611-614.
- NIH Guide for the care and use of animals. 1996. Institute of Laboratory Animal Resources. National Research Council. National Academy Press, Washington DC, USA.
- Nishiyama A, Yao L, Nagai Y, Miyata K, Yoshizumi M, Kagami S, Kondo S, Kiyomoto H, Shokoji T, Kimura S, Kohno M, Abe Y. 2004. Possible contributions of reactive oxygen

- species and mitogen-activated protein kinase to renal injury in aldosterone/salt-induced hypertensive rats. *Hypertension* 43 (4): 841-848.
- Otani N, Nawashiro H, Fukui S, Nomura N, Yano A, Miyazawa T, Shima K. 2002. Differential activation of mitogen-activated protein kinase pathways after traumatic brain injury in the rat hippocampus. *J Cereb Blood Flow Metab* 22: 327-334.
- Parenti A, Cui X, Hopfer U, Ziche M, Douglas J. 2000. Activation of MAPKs in proximal tubule cells from spontaneously hypertensive and control wistar-kyoto rats. *Hypertension* 35: 1160-1166.
- Pearson G, Robinson F, Gibson T, Xu B, Karandikar M, Berman K, Cobb M. 2001. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocrine Rev* 22: 153-183.
- Rahman M, Nishiyama A, Guo P, Nagai Y, Xing G, Fujisawa Y, Yan Y, Kimura S, Hosomi N, Omori K, Abe Y, Kohno M. 2006. Effects of adrenomedullin on cardiac oxidative stress and collagen accumulation in aldosterone-dependent malignant hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther* 318: 1323-1329.
- 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.
- Samson W, Murphy T. 1997. Adrenomedullin inhibits salt appetite. *Endocrinology* 138: 613-616.
- 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.
- Syedabadi M, Goodchild A, Pilowsky P. 2001. Differential role of kinases in brain stem of hypertensive and normotensive rats. *Hypertension* 38: 1087-1092.
- 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.
- 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.
- Song H, Lee T, Jeong J, Min Y, Shin C, Sohn U. 2005. Hydrogen peroxide-induced extracellular signal-regulated kinase activation in cultured feline ileal smooth muscle cells. *J Pharmacol Exp Ther* 312 (1): 391-398.
- Tsuda T, Kawahara K, Ishida Y, Koide M, Shii K, Yokoyama M. 1992. Angiotensin II stimulates two myelin basic protein/microtubule associated protein 2 kinases in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 71: 620-630.
- 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.
- Vanhoose A, Emery M, Jiménez L, Winder D. 2002. ERK Activation by G-protein-coupled Receptors in Mouse Brain Is Receptor Identity-specific. *J Biol Chem* 277 (11): 9049-9053.
- Viedt C, Soto U, Krieger H, Fei J, Elsing C, Kubler W, Kreuzer J. 2000. Differential activation of mitogen-activated protein kinases in smooth muscle cells by angiotensin II: involvement of p22phox and reactive oxygen species. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20: 940-948.
- Xu Q, Liu Y, Gorospe M, Udelsman R, Holbrook N. 1996. Acute Hypertension Activates Mitogen-activated Protein Kinases in Arterial Wall. *J Clin Invest* 97(2): 508-514.
- Wong P, Cheung T, Cheung B. 2012. Adrenomedullin and cardiovascular diseases. *J R Soc Med Cardiovasc Dis* 1: 14-20.
- Yamazaki T, Komuro I, Kudoh S, Zou Y, Shiojima I, Mizuno T, Takano H, Hiroi Y, Ueki K, Tobe K, Kadowaki T, Nagai R, Yazaki Y. 1996. Angiotensin II partly mediates mechanical stress-induced cardiac hypertrophy. *Circ Res* 77: 258-265.
- Yoshimoto T, Fukui 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.
- Zsarnovszky A, Belcher S. 2004. Spatial, temporal, and cellular distribution of the activated extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 in the developing and mature rat cerebellum. *Brain Res Dev Brain Res* 150: 199-209.