

Papel de la adrenomedulina cerebelosa en la hipertensión arterial

¹Pastorello Mariella, ¹Díaz Emilia, ¹Csibi Alfredo, ¹Garrido María del Rosario, ²Chabot Jean-Guy, ²Quirion Rémi e ^{1*}Israel Anita.

¹Laboratorio de Neuropeptidos, Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela y ²Douglas Hospital Research Center and Department of Psychiatry, Faculty of Medicine, McGill University, Canadá.

*Correspondencia a: Dra. Anita Israel, Apartado Postal 50176, Sabana Grande 1050A, Caracas Venezuela, e-mail: astern88@hotmail.com

Recibido: 14/04/2007 Aceptado: 14/06/2007

Resumen

La adrenomedulina (AM) y el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) pertenecen a la superfamilia de los péptidos de CGRP. En el SNC, los sitios de unión para la AM y el CGRP se encuentran presentes en áreas hipotalámicas y en la corteza cerebelosa de la rata. La administración central de AM o de CGRP en ratas induce diuresis, natriuresis e incremento de la presión arterial. El papel de la AM en el cerebelo se desconoce. Con el fin de establecer la posible relación de la AM y CGRP cerebelosa y la regulación cardiovascular, en el presente estudio evaluamos la densidad de sitios de unión para la AM y el CGRP en el cerebelo de ratas espontáneamente hipertensas (SHR) y sus controles normotensos Wistar Kyoto (WKY) adultos de 16 semanas, mediante el uso de técnicas autoradiográficas y empleando ¹²⁵I-hCGRP α y ¹²⁵I-hAM₁₃₋₅₂ como radioligandos. Los cortes coronales de cerebelo fueron incubados con 35 pM de [¹²⁵I]-hCGRP α o [¹²⁵I]-hAM₁₃₋₅₂ durante 90 y 120 minutos, respectivamente. La unión no específica fue determinada en presencia de 1 μ M del ligando no marcado. El análisis densitométrico demostró que existe una colocalización de los sitios de unión para el [¹²⁵I]-hCGRP α y la [¹²⁵I]-hAM₁₃₋₅₂ en la corteza cerebelosa. En el cerebelo la unión de la [¹²⁵I]-hAM₁₃₋₅₂ en las ratas SHR fue significativamente mayor que las WKY, indicando una mayor expresión de los receptores para la AM en el cerebelo de animales hipertensos. En relación a la unión de [¹²⁵I]-hCGRP α , se observó también un pequeño incremento significativo en las ratas SHR en relación a las WKY. Con el fin de establecer la posible vía de señalización de la AM en la corteza cerebelosa, se evaluó la actividad de la óxido nítrico sintasa inducida por la AM. La AM incrementó la actividad de la óxido nítrico sintasa del cerebelo de la rata, y este efecto fue mediado por el receptor específico de la AM, ya que el AM₂₂₋₅₆, un antagonista selectivo del receptor de AM, bloqueó dicha acción. Se determinó la expresión de las ERK1/2 y las ERK-fosforiladas del cerebelo en las ratas WKY y SHR. Se demostró que en las ratas SHR se produce aumento de las fosfo-ERK cuando se compara con las ratas WKY control. Nuestros resultados sugieren, por primera vez, que la AM en el cerebelo participa en la regulación cardiovascular.

Palabras claves: adrenomedulina, hipertensión, cerebelo, óxido nítrico, MAPK

Abstract

Adrenomedullin (AM) and calcitonin gene-related peptide (CGRP) belong to CGRP superfamily. Both peptides have overlapping biological actions particularly in regard to their very potent vasodilator properties. AM and CGRP binding sites are widely expressed in the central nervous system, in areas such as the hypothalamus and the rat cerebellar cortex. Central administration of AM or CGRP induces diuresis, natriuresis and increases arterial blood pressure. The functional role of AM in the cerebellum is unknown. The aim of the present study was to establish the possible relationship between cerebellar AM and CGRP and the regulation of cardiovascular function. To do so, we investigated the distribution and levels of CGRP and AM receptor binding sites in the brain 16-week-old normotensive (WKY) and SHR rats, using ¹²⁵I-hCGRP α and ¹²⁵I-hAM₁₃₋₅₂ as radioligands. As previously reported, CGRP and AM receptor sites are discretely and differentially distributed in the rat cerebellum cortex, with a preponderance of AM binding sites. Levels of CGRP receptor sites are found to be slightly higher in SHR, and higher levels of AM binding sites are detected in the granular cell layer of the cerebellum of SHR. To establish the possible signaling pathway of AM in cerebellum, we assessed AM-induced nitric oxide synthase activity (NOS). AM increased NOS activity, and this effect was blocked by the selective AM receptor antagonist AM₂₂₋₅₆. The expression of ERK1/2 and p-ERK activated was determined in WKY and SHR rat cerebellum. We show that in SHR rats an increased expression of p-ERK when compared with WKY control rats. It thus appears that levels of CGRP and AM binding sites, and p-ERK 1/2 expression are differentially altered in cerebellum of SHR rats. Our data show for the first time a role for cerebellar AM in the cardiovascular regulation.

Key words: adrenomedullin, hypertension, cerebellum, nitric oxide, MAPK

El cerebelo es un componente importante del sistema nervioso autónomo cuyo papel en el control de las funciones autonómicas ha sido subestimado (Spyer, 1999). Un amplio rango de funciones autonómicas implican vías que pasan por el cerebelo, como por ejemplo, las respuestas cardiovasculares (Lisander y Martner, 1975; Bradley y col., 1987, 1991; Harper y col., 1998), el control postural de la presión arterial y de la frecuencia cardíaca (Nisimaru y col., 1998), y la modulación de los componentes autonómicos del comportamiento emocional (Martner, 1975). Igualmente, se ha implicado a la región del vermis cerebeloso en el control de la respuesta cardiovascular frente al condicionamiento aversivo (Bradley y col., 1987, 1991). Estudios que implican la estimulación eléctrica y química de regiones cerebelosas, han permitido establecer un nuevo concepto en el que se propone que el cerebelo contiene cinco módulos independientes dedicados al control cardiovascular y a la regulación de la función barorefleja y vestíbulo-simpática (Nisimaru, 2004).

Existe evidencia que indica que el cerebelo contiene numerosos péptidos, que incluyen el neuropéptido Y, la sustancia P, la somatostatina, el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) y la adrenomedulina (AM) (Chedotal y Sotelo, 1992; Inagaki y col., 1982a; Morara y col., 1997). Estos péptidos se expresan de forma transitoria o bien son sobre-expresados en la fibras aferentes que llegan al cerebelo a través de la proyección olivo-cerebelar durante el período de desarrollo, lo que sugiere un papel en la diferenciación de los circuitos neuronales cerebelosos (Inagaki y col., 1982b; Morara y col., 1989). La localización de dichos péptidos, en especial aquellos pertenecientes a la familia que incluye el CGRP, la AM y la amilina, en regiones modulares de la corteza cerebelosa, ha permitido inferir un papel en la regulación cardiovascular.

La AM es un péptido de 52 aminoácidos en el humano y 50 aminoácidos en la rata, que se encuentra distribuido ampliamente en todo el sistema nervioso central (SNC) (Takahashi y col., 1997; Oliver y col., 1998). Se ha demostrado la presencia de inmunorreactividad a la AM (AM-IR) en el SNC, encontrándose concentraciones elevadas del péptido en el cerebelo (Rodrigo y col., 1998, Serrano y col., 2000; Hwang and Tang, 1999; Satoh y col., 1996; Ueta y col., 1995). En efecto, Serrano y col., (2002) demostraron la presencia de AM-IR en las células de Purkinje, en las fibras musgosas y en las células de Golgi de la capa granulosa del cerebelo. De igual manera, las neuronas y las fibras de los núcleos cerebelosos lateral e interposito presentan AM-IR. El gen de la AM se transcribe y se expresa en el cerebro (Hwang y Tang, 1999, Kitamura y col., 1993) y muestra una amplia distribución que coincide con la localización de la AM en el SNC de la rata (Serrano y col., 2000). El ARNm de la AM es detectable en la corteza cerebral y el cerebelo (Hwang y Tang, 1999). La AM también es producida en regiones del cerebro humano como la corteza cerebral y cerebelosa. Los hallazgos soportan la idea que la AM actúa como un neurotransmisor, un neuromodulador o una neurohormona en el SNC (Takahashi y col., 1994).

Los receptores específicos de la AM (AM-R), los cuales difieren del CGRP₁, se encuentran en el cerebro humano en áreas diversas, entre las cuales se destaca la corteza cere-

bral y el cerebelo (Sone y col., 1997; Wimalawansa, 1996). De igual manera los AM-R se encuentran en varios tejidos de la rata incluyendo el cerebro, la médula espinal y el cerebelo (Nuki y col., 1993). Mediante técnicas autoradiográficas se encontró una distribución muy discreta de los receptores de la AM en el cerebro de la rata de la cepa Sprague-Dawley, con las regiones más ricas en el plexo coroideo y la capa de células granulosas del cerebelo (Juaneda y col., 2001).

Se sabe que la AM muestra homología en su estructura química con el CGRP (Kitamura y col., 1993). Mediante técnicas autoradiográficas también se ha descrito la presencia de una alta densidad de receptores para CGRP en el cerebelo de la rata adulta, especialmente en la capa molecular. Técnicas recientes empleando anticuerpos monoclonales contra el receptor purificado de CGRP, revelaron que dicho receptor se encuentra presente en las células de Purkinje y en las interneuronas de la capa molecular, así como en los astrocitos de las capas moleculares y granulosas (Morara y col., 1998).

Aunque la distribución de los sitios de unión de la AM en el SNC ha sido bien documentada, su papel funcional en el cerebelo así como los mecanismos de señales de transducción de este péptido no han sido clarificados, y se conoce mucho menos de los segundos mensajeros intracelulares relacionados con sus acciones biológicas.

Con el fin de establecer el posible papel funcional de la AM en la regulación cardiovascular mediada por el cerebelo, en el presente trabajo se estudió la localización de los receptores de AM y CGRP en cortes coronales del cerebelo de la rata normotensa (WKY) y espontáneamente hipertensa (SHR), mediante técnicas autoradiográficas. Igualmente, se evaluó la posible señalización del receptor de la AM y se determinó la posible activación de las ERK 1/2 en el cerebelo de las ratas WKY y SHR.

Materiales y métodos

Animales

Como animales de experimentación se utilizaron ratas albinas, machos, de las cepas Sprague-Dawley, WKY y SHR (adultos de 16 semanas), de 200-250 g de peso, provenientes de los Bioterios de la Facultad de Medicina de la Universidad de McGill, Canada, del Instituto Nacional de Higiene, o del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC); las cuales fueron mantenidas en condiciones adecuadas, permitiéndoles el libre acceso al agua y a la comida. Los animales fueron sacrificados mediante decapitación, entre las 9:00 y las 11:00 horas. Los cerebros fueron inmediatamente removidos y se procedió a la microdissección del vermis cerebeloso, en un tiempo no superior a los tres minutos.

Determinación autoradiográfica de los subtipos de receptores para adrenomedulina

Se empleó el método de autoradiografía aclopada a la densitometría óptica según lo descrito por Juaneda y col. (2001). Las ratas fueron decapitadas y los cerebros removidos inmediatamente. Después de su remoción fueron congelados en 2-metil-isopentano a -40°C. El cerebro fue cortado en secciones de 20 µm de grosor mediante el uso de un criostato a -20 °C, para luego ser colocados sobre un portaobje-

to previamente cubierto de polilisina. Posteriormente fueron secados, al vacío y a 4°C, durante la noche. Las secciones de cerebro fueron marcadas *in vitro* con [¹²⁵I]hAM₁₃₋₅₂ o con [¹²⁵I]CGRPα. Brevemente, las secciones fueron preincubadas en buffer Tris-HCl 50 mM, pH 7.4, conteniendo NaCl 100 mM y MgCl₂ 4 mM, seguidamente se incubaron en buffer fresco con [¹²⁵I]hAM₁₃₋₅₂ (35 pM), o de con [¹²⁵I]hCGRPα (35 pM), durante 120 minutos a 22 °C que contenía 0.4 mM de bacitracina, 0.2% de albúmina sérica de bovino, 2 µg/ml de quimostatina y 4 µg/ml de leupeptina. La unión no específica se determinó en secciones consecutivas mediante la incubación igual a la descrita pero en presencia de 1 µM de AM o CGRP, no marcado. Después de la incubación, las secciones fueron lavadas 4 veces consecutivas, 1 minuto cada una, en buffer Tris-HCl 50 mM frío, seguido por un lavado de 30 segundos en agua fría. Finalizados los lavados las secciones fueron secadas mediante corriente de aire frío.

Las secciones fueron contrapuestas a una película sensible a tritio (Hyperfil-H³) (Amersham Corp., Arlington Heights, IL) simultáneamente con un grupo de patrones de [¹²⁵I] y colocados en una caja metálica de rayos X. Las películas fueron reveladas con revelador Kodak D19 a 0°C. Las densidades ópticas se determinaron mediante microdensitometría computarizada y los resultados se expresaron en fmol/mg de proteína después de ser comparados con los patrones de [¹²⁵I].

Ensayo de la actividad de la Sintasa del Oxido Nítrico (SON)

Inmediatamente después de la extracción, el cerebro fue colocado sobre hielo y el vermis del cerebelo fue extraído mediante control estereomicroscópico. Una vez obtenida la estructura se mantiene en frío, en buffer Hepes 50 mM, pH 7,1 y EDTA 1mM hasta el momento del ensayo.

La actividad de la SON se determinó mediante la cuantificación de la conversión de arginina radiomarcada a citrulina, utilizando una modificación del método descrito por Bredt y Snyder (1990) y modificado por Mathison e Israel (2002).

Los tejidos fueron mantenidos en buffer Hepes 50 mM, pH 7,1 + EDTA 1mM. Posteriormente cada muestra fue preincubada por 30 minutos a 37°C en buffer Hepes 50mM, pH 7,1 conteniendo ditioneitol 1mM, β-NADPH 0,5 mM; CaCl₂ 1,25 mM y 10 µg/ml de calmodulina, [³H]-arginina 0,12µM y arginina 0,3 µM, seguido de un período de incubación de 10 minutos. Para determinar la estimulación de la actividad de la SON, los agonistas fueron agregados al iniciar los 10 minutos de incubación, y los antagonistas cuando fuera el caso en el período de preincubación. La reacción fue detenida agregando buffer Hepes 20 mM, pH 5,5; EDTA 4mM, frío y calentando durante 5 min a 90°C. Los tejidos fueron sonificados, centrifugados a 12.000 rpm durante cuatro minutos y el sobrenadante pasado a través de una columna de Dowex 50, forma Na⁺ (RBI), desde donde fue eluído con 2 ml de agua. La [³H]-citrulina formada fue cuantificada mediante espectroscopia de centelleo líquido.

La identificación de la [³H]-citrulina se confirmó mediante cromatografía en papel. El porcentaje de recuperación es determinado utilizando [³H]-citrulina. La actividad de la sintasa del óxido nítrico se expresó como pmol de citrulina formada/hora/mg de proteínas.

Determinación de la expresión de las ERK1/2 y ERK-FOSFORILADAS mediante de Western Blot

Inmediatamente después de la extracción, los tejidos fueron colocados sobre hielo y los cerebelos (vermis) fueron disecados mediante control estereomicroscópico. Una vez obtenido el tejido fue mantenido en frío, en el buffer Krebs adecuado para el ensayo o almacenado a -80°C para su posterior homogenización.

El tejido cerebeloso fue homogenizado en frío, con 100 a 300 µl de buffer de lisis (50 mM Tris base, 5 mM EDTA, 1 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, mezcla de inhibidores de proteasas compuesto por pepstatina A, aprotinina, leupeptina y Tritón X-100 al 1%, pH 7.4), centrifugados a 4°C, a 5.000 rpm por 10 minutos, para obtener el sobrenadante. Para el análisis por Western blot, alícuotas del lisado (50 µg proteínas) diluidas 1:1 con buffer de muestra Laemmli fueron separadas por electroforesis en gel SDS–poliacrilamida 10% y trasferidas a una membrana de PVDF (difluoruro de polivilideno), durante 1 hora. Se verificó la transferencia incubando las membranas en Rojo Ponceau. Después del bloqueo con leche descremada al 10%, las membranas se incubaron con anticuerpo policlonal anti-fosfo-ERK y anti-ERK de conejo (Cell Signaling), diluidos en solución de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación suave. Las membranas fueron lavadas con TBS-Tween 0,1% e incubadas con anticuerpo anticonejo conjugado con peroxidasa de rábano (1:100.000). Las proteínas fueron visualizadas por quimoluminiscencia (SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate) y cuantificadas mediante el análisis desintométrico.

Determinación de proteínas

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

Expresión de los resultados y análisis estadístico

Los resultados se expresan como la media ± E.E.M., y fueron analizados mediante la prueba de t-Student y el análisis de varianza de una vía (ANOVA). Se consideró como significativo un valor de p<0.05.

Resultados

Determinación autoradiográfica de los subtipos de receptores en ratas WKY Y SHR

Se investigó la distribución y la densidad de los sitios de unión para el CGRP y AM en el cerebelo de las ratas normotensas (WKY) e hipertensas (SHR) de 16 semanas de edad, usando como ligandos el [¹²⁵I]-hCGRPα y el [¹²⁵I]-hAM₁₃₋₅₂. Como se observa en la figura 1, los sitios de unión de la AM se encuentran principalmente distribuidos en la en la corteza cerebelosa, siendo la densidad de receptores significativamente mayor en el cerebelo de las ratas SHR comparada con la ratas normotensas WKY. En efecto, el valor de la unión relativa a una concentración de 10⁻⁷M fue WKY= 0.95 ± 0.1 y en las SHR: 1.84 ± 0.1 (p<0.01) (figura 3). En relación a los sitios de unión para el CGRP la distribución fue similar a la de la AM, sin embargo, el incremento de la densidad de los receptores en las ratas SHR fue levemente menor: WKY= 0.94 ± 0.15 y en las SHR: 1.52 ± 0.2 (p<0.05) (figuras 2 y 3).

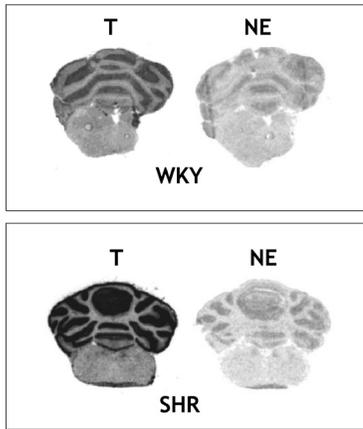


Figura 1. Unión del 125I-hAM13-52 al cerebelo de la rata. Se muestran secciones coronales del cerebelo de ratas controles (WKY) y espontáneamente hipertensas (SHR). Unión T: total, NE: unión no específica.

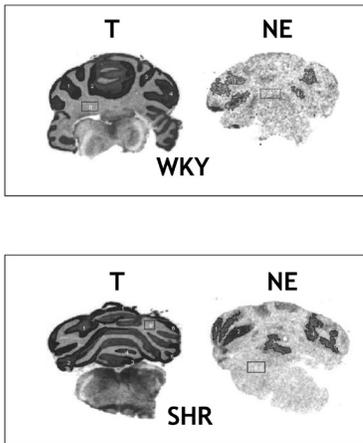


Figura 2. Unión del 125I-hCGRPα al cerebelo de la rata. Se muestran secciones coronales del cerebelo de ratas WKY y SHR. Unión T: total, NE: unión no específica.

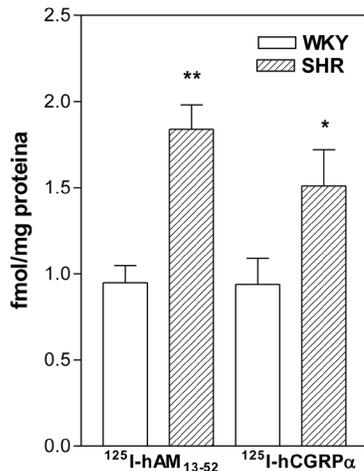


Figura 3. Unión de 125I-hAM13-52 y de 125I-hCGRPα al cerebelo de la rata WKY y SHR. (N= 6 por grupo).

Efecto de la adrenomedulina sobre la actividad de la Sin-tasa del Oxido Nítrico (SON), en el cerebelo de la rata.

Como se muestra en la figura 4, en el cerebelo de la rata la AM estimula la actividad de la SON expresada como producción de [³H]citrulina. La adición a la mezcla de incubación del AM₍₂₂₋₅₂₎ (10⁻⁵M), un antagonista selectivo del receptor de la AM, inhibió significativamente la actividad de la SON inducida por la AM (N= 6, por grupo).

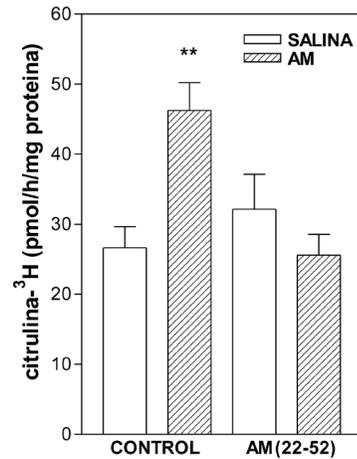


Figura 4. Efecto del antagonista selectivo del receptor de AM, el AM(22-52), sobre la actividad de la SON estimulada por la AM en el cerebelo de la rata. Se añadió a la mezcla de incubación el AM(22-52) (10⁻⁵M), un antagonista selectivo del receptor de la AM, 10 minutos antes de la AM (N= 6, por grupo). **p<0.01 comparado con salina.

Expresión de las ERK 1/2 y las FOSFO-ERK 1/2 en el cerebelo de ratas WKY Y SHR

La figura 5 muestra los inmunoblots que ilustran la expresión de las ERK 1/2 y las fosfo-ERK 1/2 en muestras provenientes del vermis del cerebelo de las ratas WKY y SHR. Como se observa, la expresión de las ERK-fosforiladas y la relación pERK/ERK, resultó significativamente mayor en las ratas SHR cuando se comparan con las ratas controles WKY (relación pERK/ERK= WKY= 1 y SHR=2,5). Esto indica una mayor fosforilación de las ERK en las ratas hipertensas.

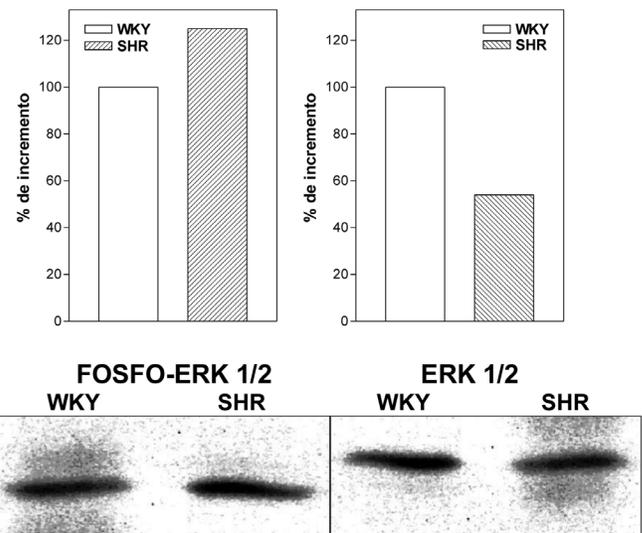


FIGURA 5. Fosforilación de las ERK1/2 en el cerebelo de la rata WKY y SHR. Se muestra un experimento típico que fue replicado 3 veces. Relación pERK/ERK= WKY= 1 y SHR= 2,5.

En el presente trabajo se confirman estudios previos sobre la existencia de receptores de AM y CGRP en el cerebelo de la rata (Morara y col., 2000; Juaneda y col., 2001). La presencia de receptores de AM y CGRP en el cerebelo de la rata aporta evidencia de un posible papel de estos péptidos en las funciones cerebelares. Nuestros resultados proveen evidencia, por primera vez, de un incremento en la concentración de los receptores para AM, y en menor proporción, de los receptores de CGRP, en el cerebelo en un modelo de hipertensión arterial como lo son las ratas SHR, al compararlas con las ratas normotensas WKY. La alteración observada

en la densidad de los receptores de AM en el cerebelo de las ratas SHR sugiere que la AM y los péptidos relacionados podrían estar participando en el mantenimiento de la hipertensión genética. Estos hallazgos soportan la hipótesis de un papel funcional, no descrito hasta ahora, para los receptores de AM en el cerebelo, cuyo incremento en la hipertensión podría representar un mecanismo de regulación hacia arriba de los receptores para compensar el incremento de la presión arterial de las ratas SHR; o alternativamente constituir la alteración primaria cuya consecuencia secundaria resultaría en una alteración de los mecanismos de regulación autonómica que ocurren en el cerebelo y que traería como consecuencia un incremento de la presión arterial.

Aunque el papel en la regulación cardiovascular de la AM y CGRP en el cerebelo no ha sido reportado hasta el presente, existe evidencia de la participación de estos péptidos en la regulación central de la presión arterial. Así, en un estudio de la acción central de la AM sobre los parámetros cardiovasculares y el eflujo simpático en ratas conscientes, se demostró que el péptido induce hipertensión, acompañada de una respuesta bifásica de la actividad nerviosa simpática de los nervios renales, con una disminución inicial, seguida por un incremento (Saita y col., 1998). Igualmente, se demostró que en conejos y ratas conscientes, la administración ICV de la AM y del CGRP aumenta la presión arterial y la actividad simpática renal, efecto que se acompañan con un incremento del control baroreflejo, de la actividad simpática renal y de la frecuencia cardíaca (Matsumura y col., 1999). Estos efectos son bloqueados por la administración periférica de fentolamina, indicando que en el cerebro los péptidos estimulan la función del sistema nervioso simpático (Samson y col., 1998). Estos hallazgos sugieren que la AM participa en la regulación cardiovascular y simpática, no solamente por su efecto en el músculo liso vascular sino también por sus acciones en el sistema nervioso central (Matsumura y col., 1999).

Los mecanismos fisiológicos involucrados en las acciones de la AM en el cerebelo aun no han sido esclarecidos y podrían ser múltiples y complejos. Más aun, hay poca información acerca del papel del cerebelo en la regulación cardiovascular. Sin embargo, existe alguna evidencia proveniente de modelos animales y humanos que demuestra que el sistema vestibular y sus conexiones cerebelosas contribuyen al control cardiovascular durante el movimiento y la alteración de la postura (Cui y col., 1997). Varias regiones del cerebro que participan en el control cardiovascular reciben señales nerviosas desde el cerebelo específicamente desde el núcleo fastigio y la corteza cerebelosa posterior (Dormir, 1984, Bradley y col., 1991; Bradley y col., 1987a,b). Aun mas, evidencias anatómicas apoyan el papel del núcleo fastigio en la función cardiovascular. En efecto, las neuronas rostrales del núcleo fastigio se proyectan al núcleo del tracto solitario y a través de esta conexión controlan el baroreflejo (Nisimaru, 2004). Mas recientemente se ha enfocado a las regiones anterior y posterior del vermis cerebeloso y a la úvula y el nódulo, como predominantemente implicadas en la regulación cardiovascular. La estimulación eléctrica de la región anterior o posterior del vermis inhibe la actividad simpática y produce vasodepresión y dicha respuesta se manifiestan en regiones del tallo cerebral relacionadas con el control de la presión arterial y de la actividad simpática (Nisimaru, 2004).

Aunque la distribución de los sitios de unión de la AM en el SNC ha sido bien documentada, su presencia en el cerebelo así como los mecanismos de señales de transducción de los receptores de este péptido en el mismo no han sido clarificados y se conoce todavía menos de los segundos mensajeros intracelulares relacionados con sus acciones biológicas.

La AM fue inicialmente aislada desde una fracción extraída de un tejido capaz de inducir la síntesis de AMPc en las plaquetas (Kitamura y col., 1993). Los receptores de AM también están relacionados a la señalización mediante canales iónicos y con una variedad de sistemas de segundos mensajeros a través de efectos directos sobre enzimas acopladas a proteínas G, activación de una proteína Gs, la adenilil ciclasa y una proteína quinasa A (PKA) (Hinson y col., 2000). La AM es capaz de activar a la adenilil ciclasa y a la fosfolipasa C. Como resultado de la generación de IP_3 la concentración de calcio se eleva inicialmente y los canales de calcio se mantienen abiertos en la membrana celular. Estos incrementos en los niveles de calcio citosólico activarían la SON y en consecuencia se activaría la vía ON/GMPc, efecto que estaría mediado directamente por una proteína G (Shimekake y col., 1995). Al igual que otras hormonas vasoactivas, el fenotipo de la célula receptora determina la vía de segundos mensajeros activada por la unión del péptido (Samson, 1999).

Existe evidencia de que el ON/GMPc actúa como un neurotransmisor en el sistema periférico y sistema nervioso central, especialmente en el cerebelo (Moncada y col., 1991; Moncada y Higgs, 1993). Se ha demostrado que en el cerebelo se expresan altos niveles del sistema de señalización asociado al ON. Así, se ha descrito la presencia de niveles altos de la enzima guanilil ciclasa (Nakane y col., 1983) y de GMPc en la células de Purkinje (Ferrendelli, 1974). Estudios inmunohistoquímicos en las células de Purkinje han revelado una alta concentración de proteína quinasa dependiente de GMPc y su sustrato proteínico (Nairn y col., 1985). La SON y la guanilil ciclasa soluble activada por ON, están localizadas en las estructuras cerebrales en estrecha superposición, excepto en las células grano del cerebelo, las cuales se encontraron ocasionalmente positivas a GMPc (de Vente y col., 1998). El estudio de la distribución de la inmunoreactividad de la óxido nítrico sintasa en el cerebelo demuestra su presencia en las células estrelladas y en células en cesto. De igual modo, se encontró inmunoreactividad a la SON en las células de Purkinje en las regiones del vermis y parafloclares, así como en la capa granulosa las células granulares (Rodrigo y col., 1994).

La presencia de actividad de la SON en el cerebelo, en elementos celulares que presentan receptores para la AM, indica un posible papel de la misma en la regulación de la función celular mediante la posible generación de óxido nítrico/GMPc, como mediadores de los efectos de dicho péptido. Nuestros resultados en los que se muestra un incremento de la actividad SON inducida por la AM en el cerebelo de rata apuntan a esta posibilidad. Aun más, el hecho que el antagonista selectivo de dicho receptor, el AM_{22-52} , bloqueó la activación de la SON inducida por la AM, nos permite inferir que la producción de ON inducida por la AM en el cerebelo ocurre mediante la estimulación de su receptor específico.

Ahora bien, se sabe que el ON esta involucrado en numerosas funciones fisiológicas en el SNC, donde es capaz de ac-

tivar la vía de señalización de la guanilil ciclase-GMPc-PKG (Prast y Philippu, 2001). Reportes recientes indican que la vía ON-GMPc-PKG participa en la regulación de la actividad de las kinasas reguladas por señales extracelulares 1 y 2 (ERK 1/2) en varios tipos celulares resultando en una alteración de su expresión (Zaragoza y col., 2002), lo cual podría también ocurrir en el cerebelo (Endo y Launey, 2003).

Las ERK1/2 son miembros importantes de una cascada intracelular implicada en muchos aspectos de la fisiología celular y en el desarrollo de neuronas y glías. Las ERK1/2 y su RNAm se expresan en numerosas regiones del SNC entre las cuales se incluye el cerebelo (Davis, 1993, Thomas y Hunt, 1994), sin embargo su papel en la función cardiovascular del cerebelo es totalmente desconocido. Se ha postulado que en el cerebelo adulto la señalización de ERK podría mediar el procesamiento de información postsináptica (Zsarnovzky y Belcher, 2004). Estudios inmunohistoquímicos usando anticuerpos específicos contra la ERK1/2-activada (pERK) permitieron demostrar que la pERK-IR se encuentra confinada a la capa de las células Purkinje (Zsarnovzky y Belcher, 2004) en donde también se ha demostrado la presencia de una alta actividad de PKG (Endo y Launey, 2003). Nuestros resultados muestran la expresión de la ERK 1/2 y su forma activada p-ERK en la corteza del cerebelo, con un incremento de la activación de las ERK en las ratas hipertensas SHR, al compararlas con la normotensas WKY.

Nuestros hallazgos nos permiten postular que, si la hipertensión genética (SHR) se asocia a un aumento de los receptores de AM en el cerebelo (figuras 1,2,3), traería como consecuencia que la producción de ON asociada al receptor de AM estaría aumentada. A su vez, el incremento de la vía de señalización ON-GMPc-PKG, podría ser la responsable de la regulación hacia arriba de la activación de las ERK en el cerebelo durante la hipertensión. Esto estaría en concordancia con el papel propuesto de la AM y la señalización del ON-ERK cerebelar en la regulación cardiovascular.

En conclusión, los receptores de AM y CGRP se encuentran ampliamente distribuidos en el cerebelo de la rata y su concentración se encuentra alterada en la rata hipertensa SHR. La estimulación del receptor de AM en el cerebelo de la rata desencadena una vía de señalización acoplada a la producción de ON. De igual forma, el cerebelo de la rata expresa ERKs y la forma fosforilada (activa), la cual está alterada en la hipertensión. Estos hallazgos permiten inferir un papel funcional de la AM cerebelosa en la regulación cardiovascular.

Agradecimientos. Este trabajo fue subvencionado por el Proyecto FONACIT S1-200000503, del Ministerio del Poder Popular de Ciencia y Tecnología.

Referencias

- Bradley DJ, Ghelarducci B y Spyer KM. The role of posterior cerebellar vermis in cardiovascular control. *Neurosc. Res.* 12: 45-56, 1987a.
- Bradley DJ, Ghelarducci B, Paton JFR y Spyer KM. The cardiovascular responses elicited from posterior cerebellar cortex in the anaesthetized and decerebrated rabbit. *J. Physiol.* 383: 537-550, 1987b.
- Bradley DJ, Paton JF y Spyer KM. Cardiovascular responses evoked from fastigial region of the cerebellum in anaesthetized and decerebrated rabbits. *J Physiol* 392: 475-479, 1991.
- Bredt D y Snyder S: Isolation of nitric oxide synthase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 682-685, 1990.
- Chedotal A y Sotelo C. Early development of olivocerebellar in the fetal rat using CGRP immunocytochemistry. *Eur J Neurosci.* 4: 1159-1179.
- Cui J, Mukai C, Iwase S, Sawasaki N, Kitazawa H, Mano T, Sugiyama Y y Wada Y. Response to vestibular stimulation of sympathetic outflow to muscle in humans. *J Autonom Nerv Syst* 66:154-162, 1997.
- Davis RJ. The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J. Biol. Chem.* 268:14533-14556, 1993.
- Dormer KJ. Modulation of cardiovascular response to dynamic exercise by fastigial nucleus. *J. Appl. Physiol.* 56:1369-1377, 1984.
- de Vente J, Hopkins D, Markerink-Van Ittersum M, Emson P, Schmidt H y Steinbusch H: Distribution of nitric oxide synthase and nitric oxide-receptive, cyclic GMP-producing structures in the rat brain. *Neuroscience.* 87: 207-241, 1998.
- Endo S y Launey T. Nitric oxide activates extracellular signal-regulated kinase 1/2 and enhances de-clustering of ionotropic glutamate receptor subunit 2/3 in rat cerebellar Purkinje cells. *Neurosc. Lett.* 350: 122-126, 2003.
- Ferrendelli JA. Distribution and regulation of cyclic GMP in the central nervous system. *Adv. Cyclic Nucleotide Res* 9:453-464, 1978.
- Harper RM, Gozal D, Bandler R, Spriggs D, Lee J y Alger J. Regional brain activation in humans during respiratory and blood pressure challenges. *Clin Exp Pharmacol. Physiol.* 25: 483-486, 1998.
- Hinson J, Kapas S y Smith D. Adrenomedullin, a multifunctional regulatory peptide. *Endocrine Rev.* 21: 138-167, 2000.
- Hwang IS y Tang F. The distribution and gene expression of adrenomedullin in the rat brain: peptide/mRNA and precursor/active peptide relationships. *Neurosci. Lett.* 267: 85-88; 1999.
- Inagaki S, Sakanaka M, Shiosaka S, Senba E, Takagi H, Takatsuki K, Kawai Y, Matsuzaki T, Iida H, Hara Y y Tohyama M. Experimental and immunohistochemical studies on the cerebellar substance P of the rat: localization, postnatal ontogeny and ways of entry to the cerebellum. *Neuroscience* 7: 639-645, 1982a.
- Inagaki S, Shiosaka S, Takatsuki K, Iida H, Sakanaka M, Senba E, Hara Y, Matsuzaki T, Kawai Y y Tohyama M. Ontogeny of somatostatin-containing neuron system of the rat cerebellum including its fiber connections: an experimental and immunohistochemical analysis. *Dev. Brain Res.* 3: 509-527, 1982b.
- Juaneda C, Dumont Y, Chabot JG, Quirion R. Autoradiographic distribution of adrenomedullin receptors in the rat brain. *Eur J Pharmacol.* 421:R1-R2, 2001.
- Kitamura K, Sakata J, Kangawa K, Kojima H, Matsuo H y Eto T. Cloning and characterization of cDNA encoding a precursor for human adrenomedullin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 194: 720-725, 1993.
- Lisander B y Martner J. Integrated somatomotor cardiovascular and gastrointestinal adjustment induced from the cerebellar fastigial nucleus. *Acta Physiol. Scand* 94: 358-367, 1975.
- Lowry O, Rosebrough N, Farr A y Randall R: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275, 1951.
- Martner J. Cerebellar influences on autonomic mechanisms. *Acta Physiol Scand, supp* 425: 1-43, 1975.
- Mathison Y e Israel A. Role of endothelin type B receptor in nitric oxide/cGMP signaling pathway in rat median eminence. *Cell. Mol. Neurobiol.* 22: 783-795, 2002.
- Matsumara K, Abe I, Tsuchihashi T y Fujishima M. Central adrenomedullin augments the baroreceptor reflex in conscious rabbits. *Hypertension*, 33:992-997, 1999.
- Morara S, Provini L y Rosina A. CGRP expression in the rat olivocerebellar system during postnatal development. *Brain Res.* 504:315-319, 1989.

25. Morara S, Marcotti W, Provini L, Rosina A. Neuropeptide Y (NPY) expression is up-regulated in the rat inferior olive during development. *NeuroReport* 8:3743-3747, 1997.
26. Morara S, Wimalawanga S y Rosina A. Monoclonal antibodies reveal expression of the CGRP receptor in Purkinje cells, interneurons and astrocytes of rat cerebellum cortex. *NeuroReport* 9: 3755-3759, 1998.
27. Morara S, Rosina A, Provini L, Forloni G, Caretti A y Wimalawanga S. Calcitonin gene-related peptide receptor expression in the neurons and glia of developing rat cerebellum: an autoradiographic and immunohistochemical analysis. *Neurosci* 100: 381-391, 2000.
28. Moncada S, Palmer R y Higgs, E. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 43:109-137, 1991.
29. Moncada S y Higgs E. The L-arginine oxide pathway. *New Engl. J. Med.* 2002-2012, 1993.
30. Moncada S, Higgs A y Furchgott R: XIV International Union of Pharmacology. Nomenclature in nitric oxide research. *Pharmacol Rev* 49:137-142, 1997.
31. Nakane M, Ichikawa M y Deguchi T. Light and electron microscopic demonstration of guanylate cyclase in rat brain. *Brain Res.* 273: 9-15, 1983.
32. Nairn AC, Hemmings HC y Greengard P. Protein kinases in the brain. *Annu. Rev. Biochem.* 54:931-76, 1985
33. Nisimaru N, Okahara K y Yanai S. Cerebellar control of cardiovascular responses during postural changes in conscious rabbits. *Neurosci. Res.* 32: 267-271, 1998.
34. Nisimaru N. Cardiovascular modules in the cerebellum. *Japanese J Physiol* 54: 431-448, 2004.
35. Nuki C, Kawasaki H, Kitamura K, Takrnaga M, Kangawa K, Eto T y Wada A. Vasodilator effect of adrenomedullin and calcitonin gene-related receptors in rat mesenteric vascular bed. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 196:245-251, 1993.
36. Oliver KV, Wainwright A, Heavens RP, Hill RG y Sirinathsinghji DJS. Distribution of novel CGRP₁ receptor and adrenomedullin receptor mRNAs in the rat central nervous system. *Mol. Brain Res.* 57:149-154; 1998.
37. Prast H y Philippu A. Nitric oxide as modulator of neuronal function, *Prog. Neurobiol.* 64:51-68, 2001.
38. Rodrigo J, Springall DR, Utenthal O, Bentura ML, Abadia-Molina F, Riveros-Moreno V, Martinez-Murillo R, Polak JM y Moncada S. Localization of nitric oxide synthase in the adult rat brain. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biol. Sciences.* 345: 175-221, 1994.
39. Saita M, Shimokawa A, Kunitake T, Kato K, Hanamori T, Kitamura K, Eto T y Kannan H. Central actions of adrenomedullin on cardiovascular parameters and sympathetic outflow in conscious rats. *Am. J. Physiol. (Regulatory Integrative Comp. Physiol.)* 43. 274: R979-R984, 1998.
40. Samson WK, Murphy TC y Schell DA. Central mechanisms for the hypertensive effects of preproadrenomedullin derived peptides in conscious rats. *Am. J. Physiol.* 274: R1505-R1509, 1998.
41. Samson WK. Adrenomedullin and the control of fluid and electrolyte homeostasis. *Annu. Rev. Physiol.* 61: 363-389, 1999.
42. Satoh F, Takahashi K, Murakami O, Totsune K, Sone M, Ohneda M, Susano H y Mouri T. Immunocytochemical localization of adrenomedullin-like immunoreactivity in the human hypothalamus and the adrenal gland. *Neurosci. Lett.* 203: 207-210, 1996.
43. Shimekake Y, Nagata K, Ohta S, Kambayashi Y, Teraoka H, Kitamura K, Eto T, Kangawa K y Matsuo H. Adrenomedullin stimulates two signal transduction pathways, cAMP accumulation and Ca²⁺ mobilization, in bovine aortic endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 270: 4412-4417, 1995.
44. Serrano J, Utenthal LO, Martinez A, Fernandez AP, Martinez de Velasco J, Alonso D, Bentura ML, Santacana M, Gallardo JR, Martinez-Murillo R, Cuttitta F y Rodrigo J. Distribution of adrenomedullin-like immunoreactivity in the rat central nervous system by light and electron microscopy. *Brain Res.* 853:245-68, 2000.
45. Serrano J, Alonso D, Fernandez AP, Encinas JM, Lopez JC, Castro-Blanco S, Fernandez-Vizarrá P, Richart A, Santacana M, Utenthal LO, Bentura ML, Martinez-Murillo R, Martinez A, Cuttitta F y Rodrigo J. Adrenomedullin in the central nervous system. *Microsc Res Tech.* 57:76-90, 2002.
46. Sone M, Takahashi K, Satoh F, Murakami O, Totsune K, Ohneda M, Sasano H, Ito H y Mouri T. Specific adrenomedullin binding sites in human brain. *Peptides* 18: 1125-1129, 1997.
47. Takahashi H, Watanabe T, Nishimura M, Nakanishi T, Sakamoto M, Yoshimura M, Komiyama Y, Masuda M y Murakami T. Centrally induced vasopressor and sympathetic responses to a novel endogenous peptide, adrenomedullin, in anesthetized rats. *Am. J. Hypertension.* 7: 478-482, 1994.
48. Takahashi K, Satoh F, Sone M, Murakami O, Sasano H, Mouri T y Shibahara S. Expression of adrenomedullin mRNA in the human brain and pituitary. *Peptide* 18: 1051-1053, 1997.
49. Thomas KL y Hunt SP. The regional distribution of extracellularly regulated kinase-1 and -2 messenger RNA in the adult rat central nervous system. *Neuroscience* 56:741-757, 1993.
50. Ueta Y, Kitamura K, Isse T, Shibuya I, Kabashima N, Yamamoto S, Kangawa K, Matsuo H, Eto T y Yamashita H. Adrenomedullin-immunoreactive neurons in the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat. *Neurosci. Lett.* 202: 37-40, 1995.
51. Wimalawansa S.J. Calcitonin gene-related peptide and its receptors: molecular, genetics, physiology, pathophysiology, and therapeutic potentials. *Endocrin. Rev.* 17: 533-585, 1996.
52. Zaragoza C, Soria E, Lopez E, Browning D, Balbin M, Lopez-Otin C y Lamas S. Activation of the mitogen activated protein kinase extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 by the nitric oxide-cGMP-cGMP-dependent protein kinase axis regulates the expression of matrix metalloproteinase 13 in vascular endothelial cells. *Mol. Pharm.* 62:927-935, 2002.
53. Zsarnovzky A y Belcher SM. 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, 2004.