

# Deregulación del sistema adrenomedulinérgico cerebeloso en la hipertensión arterial

*Deregulation adrenomedulinérgico cerebellar system in hypertension*

Leticia Figueira y Anita Israel

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

\*Correspondencia: Apartado Postal 50176, Sabana Grande 1050A, Caracas, Venezuela. E-mail: [figueiraleticia@gmail.com](mailto:figueiraleticia@gmail.com)

Recibido: 16/04/2012

Aceptado: 20/06/2012

72

## Resumen

La adrenomedulina (AM) es un péptido involucrado en la regulación cardiovascular. Sus acciones son mediadas a través de su unión con tres subtipos de receptores AM1, AM2 y CGRP, cada uno de los cuales está formado por la combinación de dos proteínas, el receptor similar al receptor de calcitonina (CRLR) y la proteína que modifica la actividad del receptor (RAMP). En el cerebelo la densidad de los receptores de la AM se encuentra alterada durante la hipertensión, sugiriendo un posible papel del sistema adrenomedulinérgico cerebelar en la regulación de la presión arterial. Se evaluó la expresión mediante análisis de Western blotting de la AM y los componentes de sus receptores en el vermis cerebeloso de ratas macho SHR y WKY de 8 y 16 semanas de edad. Los animales se sacrificaron, y se disecó el vermis cerebeloso para la cuantificación de la expresión de AM, CRLR, RAMP1, RAMP2 y RAMP3. Nuestros hallazgos muestran una menor expresión de la AM y RAMP2 y una mayor expresión de CRLR, RAMP1 y RAMP3 en el cerebelo de ratas SHR con respecto a las WKY, tanto a las de 8 y 16 semanas. Estos resultados sugieren la existencia de deregulación de la AM y los componentes de sus receptores durante la hipertensión y apoyan un papel funcional de la AM en la regulación de la presión arterial.

**Palabras Claves:** AM, CRLR, RAMPs, cerebelo, hipertensión.

## Abstract

Adrenomedullin (AM) is a peptide involved in cardiovascular control. AM has three specific receptors, AM1, AM2 and GGRP, each receptor is constituted by the combination of two different proteins, calcitonin-receptor-like receptor (CRLR) and receptor activity-modifying protein (RAMP). AM binding sites are altered in cerebellum during hypertension, suggesting a role for cerebellar adrenomedullinergic system in the blood pressure regulation. We assessed the expression by Western blotting of AM, RAMP1, RAMP2, RAMP3 and CRLR in the cerebellar vermis of 8 and 16 weeks old spontaneously hypertensive (SHR) and normotensive Wistar Kyoto rats (WKY). Animals were sacrificed by decapitation; and cerebellar vermis was dissected for the quantification of AM, CRLR, RAMP1, RAMP2 and RAMP3 expression. Our findings demonstrate a higher expression of CRLR, RAMP1 and RAMP3 in cerebellum of SHR compared to WKY, and a lower AM and RAMP2 expression in the cerebellum of SHR rats than in WKY, both in 8 and 16 week old rats. These findings demonstrate a deregulation of cerebellar AM system during arterial hypertension, and suggest a functional role of cerebellar adrenomedullin in the regulation of blood pressure.

**Keywords:** AM, CRLR, RAMPs, cerebellum, and hypertension.

## Introducción

La adrenomedulina (AM) es un péptido de 52 y 50 aminoácidos en humanos y en la rata respectivamente. La AM pertenece a la familia de los péptidos de la calcitonina (Ichiki y col., 1994; Sakata y col., 1994).

La AM inicialmente fue caracterizada como un péptido hipotensor (Kitamura y col., 1993<sup>A</sup>); sin embargo, se ha descrito otras funciones, entre las que se incluyen proliferación celular, apoptosis, migración, inflamación y angiogénesis (Cases y col., 2001; Beltowski y col., 2004).

La AM ejerce sus acciones mediante su unión a receptores específicos, los cuales están formados por dos proteínas, el receptor similar al receptor de calcitonina (CRLR) y la proteína que modifica la actividad del receptor (RAMPs). Estas últimas son proteínas accesorias requeridas por el CRLR para que este pueda funcionar como un receptor (McLatchie y col., 1998) y que además van a dictar la especificidad de la unión al ligando de los receptores (Gibbons y col., 2007). Por lo tanto, el CRLR funciona como receptor del CGRP o de AM dependiendo de cambios moleculares accesorios debidos a las RAMPs (Cases y col., 2001). En este sentido, el heterodímero CRLR/RAMP1 constituye el receptor del CGRP; por su parte el complejo CRLR/RAMP2 y CRLR/RAMP3 constituyen los receptores de AM, denominados AM1 y AM2, respectivamente.

A nivel del sistema nervioso central (SNC), la evidencia sugiere la existencia de un sistema adrenomedulinérgico, pues se ha demostrado tanto la AM como sus receptores en regiones como la corteza cerebral, la glándula pituitaria, el bulbo raquídeo, el hipotálamo, el tálamo, la médula espinal, la amígdala y el cerebelo (Hinson y col., 2000; Serrano y col., 2000; Juaneda y col., 2003; Macchi y col., 2006; Owji y col., 1996; Xu y col., 2004<sup>A</sup>). En el cerebelo, la AM se localiza en las células de Purkinje. La capa granular, contiene dos tipos de estructuras neurales inmunoreactivas a la AM, los terminales de las fibras musgosas y las células de Golgi. Asimismo, los núcleos cerebelares lateral, interposito y medial contienen neuronas inmunoreactivas a AM (Serrano y col., 2000).

Se ha descrito que la AM cumple diversas funciones a nivel del SNC, pues, la administración central de AM resulta en diversas respuestas neuroendocrinas tales como la inhibición de la secreción de arginina vasopresina inducida por estímulos hipovolémicos y osmóticos, y la excitación de neuronas que secretan oxitocina en el hipotálamo de la rata (Yokoi y col., 1996; Serino y col., 1999). Asimismo, la administración central de AM incrementa la excreción urinaria de agua, sodio y potasio de manera dependiente de la dosis en ratas hidratadas conscientes (Israel y col., 2000; Díaz y col., 2001), y la microinyección de AM en el área postrema y en la porción rostromedial del bulbo raquídeo (RVLM) provoca un efecto hipertensor; mientras que induce un efecto hipotensor cuando se administra en el núcleo paraventricular (NPV) del hipotálamo (Allen y col., 1997; Ji y col., 2002; Xu y col., 2004<sup>B</sup>). Estos hallazgos sugieren que la AM central ejerce un importante papel en la regulación de la presión arterial.

Diferentes estudios experimentales y epidemiológicos han demostrado que la expresión de la AM y los componentes de sus receptores se encuentran alterados en diferentes patologías cardiovasculares tales como la hipertensión arterial (Cases y col., 2001); pues se ha encontrado un aumento en la expresión de la AM y de los componentes de sus receptores en aorta y ventrículo de ratas durante la hipertensión, que se cree se debe a una respuesta de

adaptación cardiovascular compensatoria al proceso fisiopatológico (Pan y col., 2005; Gibbons y col., 2007).

Se ha demostrado la presencia de sitios de unión a la AM e inmunoreactividad a la AM así como la expresión del CRLR, RAMP2 y RAMP3 en cerebelo de ratas normotensas (Sone y col., 1997; Serrano y col., 2000; Chakravarty y col., 2000; Uezono y col., 2001). Sin embargo, muy pocos han sido los estudios sobre la AM en el cerebelo de ratas hipertensas. En un estudio realizado por Pastorello y col. (2007) se demostró por primera vez, un incremento en la densidad de unión a la AM en el cerebelo en de ratas SHR, al compararlas con las ratas normotensas WKY, lo que sugiere un posible papel de la AM cerebelosa en la regulación de la presión arterial. Hasta el presente se desconoce si la expresión de la AM y de los subtipos de receptores de AM se encuentra alterada en la hipertensión. Es por ello, que en el presente estudio se evaluó la expresión de la AM y los componentes de sus receptores en el vermis de cerebelo de las ratas de 8 y 16 semanas de edad durante la hipertensión arterial.

### Animales de Experimentación

Se emplearon ratas macho espontáneamente hipertensas (SHR) y sus controles normotensos Wistar Kyoto (WKY) de 8 y 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® y agua ad libitum. Los experimentos fueron realizados siguiendo las buenas prácticas para el manejo de animales de laboratorio (NIH Guide, 1996) y la aprobación del Comité de Bioterio de la Facultad de Farmacia de la UCV. Las ratas se sacrificaron por decapitación, los cerebros fueron extraídos y el vermis del cerebelo se disecó mediante microdissección bajo control estereomicroscópico y mantenido en Buffer Krebs-Ringer (KBR).

### Determinación de la expresión de la AM y sus receptores

La determinación de CRLR, RAMP1, RAMP2, RAMP3 y AM se realizó por Western Blot mediante una modificación del método descrito por Urrecheaga y col. (2007). El vermis del cerebelo fue disecado y homogenizado en frío mediante sonicación, en Buffer de lisis para receptores (Tris-HCl 200 mM, CHAPS 160 mM, Na<sub>2</sub>EDTA 10 mM, PMSF 5mM y mezcla de inhibidores de proteasas compuesto por pepstatina A 5μM, aprotinina 10μg/mL, leupeptina 10μM pH 7,5) o en Buffer de lisis para AM (NaCl 50mM, Tris-HCl 25 mM, Tritón X-100 1%, PMSF 1mM y mezcla de inhibidores de proteasas compuesto por pepstatina A 5μM, aprotinina 10μg/mL, leupeptina 10μM pH 8,1). 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 nitroce-

lulosa. 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-CRLR, anti-RAMP1, anti-RAMP2, anti-RAMP3 y/o anti-AM de conejos (Santa Cruz, Biotechnology, Inc) 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 incubados 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 CRLR, RAMP1, RAMP2, RAMP3 y AM fueron normalizados con la expresión de  $\beta$ -actina.

### 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) descrita por Israel y col. (2000). Se calculó la presión arterial media (PAM) mediante la siguiente fórmula:  $PAM = PAD + 1/3(PAD - PAD)$ . La semana previa al experimento, se determinó diariamente la presión arterial y frecuencia cardíaca, para minimizar el estrés asociado al manejo.

### Análisis Estadístico

Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  E.E.M. La significancia de los resultados fue analizada mediante el análisis de varianza de una vía (ANOVA) y la prueba de Bonferroni. 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.

### Características de las ratas SHR y WKY de 8 y 16 semanas de edad

En la Tabla I se presenta los valores medios y el error estándar de los valores de peso corporal, PAS, PAD y PAM de las ratas WKY y SHR de 8 y 16 semanas de edad. Como se puede observar, las ratas SHR de 8 y 16 semanas de edad tienen valores estadísticamente superiores de PAS, PAD y PAM cuando se compara con las ratas WKY de 8 y 16 semanas de edad, respectivamente. Asimismo, la PAS, PAD y PAM de las ratas SHR de 16 semanas de edad es estadísticamente mayor que las SHR de 8 semanas de edad.

### Efecto de la edad sobre la expresión de la AM y los componentes de sus receptores en el vermis de cerebelo de ratas WKY y SHR.

Se evaluó el efecto de la edad de las ratas sobre la expresión de la AM y los componentes de sus receptores. Como se observa en las figura 1 la edad no alteró la expresión de la AM y RAMP2 en el vermis cerebelar de las ratas WKY y SHR. Por su parte, la edad de las ratas WKY y SHR afectó la expresión de RAMP1, RAMP3 y CRLR en el vermis del cerebelo; pues, la expresión del RAMP1, RAMP3 y CRLR en el vermis cerebelar tanto de las ratas SHR como las WKY aumenta con la edad de los mismos  $N=10$ .  $p < 0,0001$  (Fig. 1).

### Expresión de la AM y los componentes de sus receptores en el vermis de cerebelo de ratas WKY y SHR.

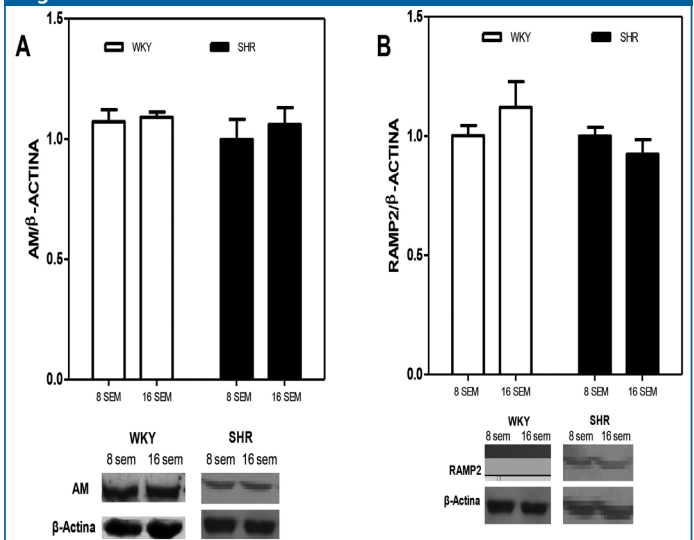
Se cuantificó la expresión de la AM y los componentes del receptor para la AM: RAMP1, RAMP2, RAMP3 y CRLR. Como se puede apreciar, la expresión de la AM y RAMP2 en el vermis del cerebelo fue significativamente menor en las ratas SHR tanto de 8 semanas como de 16 semanas de edad, cuando se compara con las WKY ( $N=10$ ;  $p < 0,0001$ ) (Fig. 3); por su parte, la RAMP1, RAMP3 y el CRLR muestran mayor expresión en el vermis del cerebelo de las ratas SHR tanto de 8 semanas como de 16 semanas de edad con respecto a las WKY de la misma edad ( $N=9$ ,  $p < 0,001$ ) (Fig. 4).

Tabla I. Características de las ratas WKY y SHR de 8 y 16 semanas de edad.

GRUPO	Peso (g)	PAS (mmHg)	PAD (mmHg)	PAM (mmHg)
WKY 8 SEMANAS	282 $\pm$ 2	141 $\pm$ 1	89 $\pm$ 3	106 $\pm$ 2
WKY 16 SEMANAS	415 $\pm$ 24	145 $\pm$ 3	91 $\pm$ 3	108 $\pm$ 2
SHR 8 SEMANAS	221 $\pm$ 4	167 $\pm$ 1*	119 $\pm$ 2*	135 $\pm$ 1*
SHR 16 SEMANAS	366 $\pm$ 11	174 $\pm$ 3 <sup>#</sup>	126 $\pm$ 3 <sup>#</sup>	142 $\pm$ 3 <sup>#</sup>

Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  EEM ( $N=40$ ). \* $p < 0,0001$  vs. WKY 8 semanas. <sup>#</sup> $p < 0,0001$  vs. WKY 16 semanas. <sup>^</sup> $p < 0,0001$  vs. SHR 8 semanas.

Figura 1



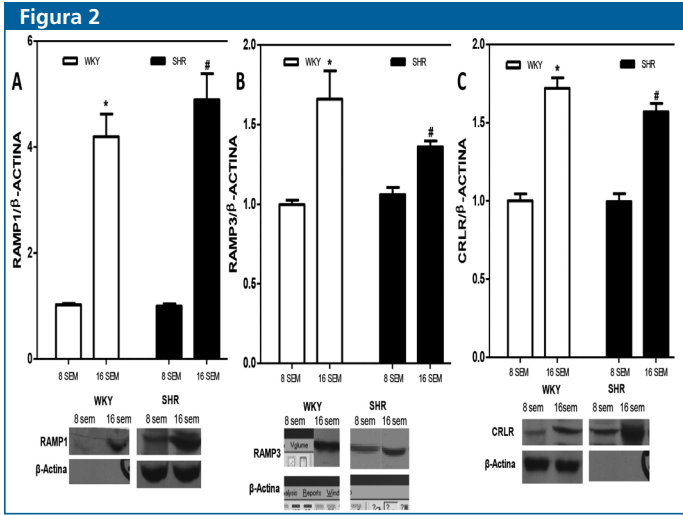
Efecto de la edad sobre la expresión de la AM (Panel A) y RAMP2 (Panel B) en el vermis de cerebelo de ratas WKY y SHR. 100  $\mu$ g de proteínas provenientes del vermis cerebelar de las ratas WKY y SHR de 8 y 16 semanas de edad fueron empleados para el western blotting. Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  EEM. La expresión de la AM y RAMP2 fue normalizada con la de la  $\beta$ -actina. ( $N=10$ ).

Discusión

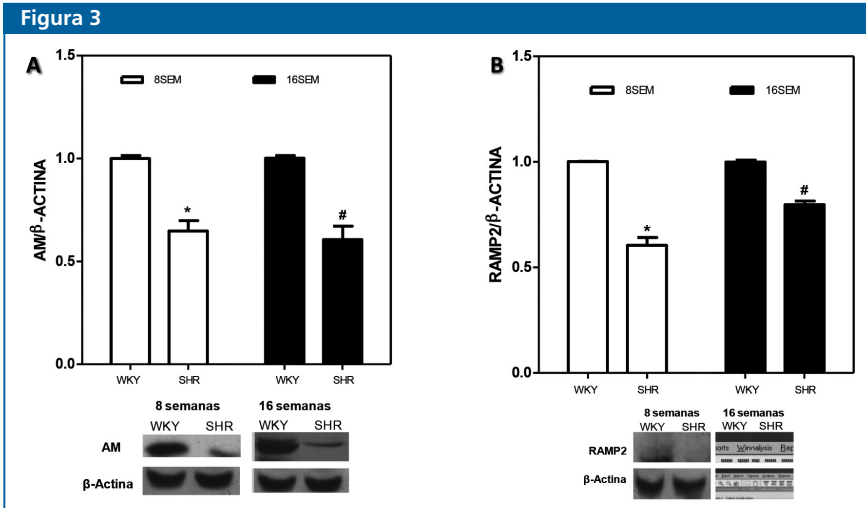
La AM es un péptido ubicuo, que se encuentra ampliamente distribuido en el organismo, tanto a nivel periférico como central. Diversos estudios han demostrado este péptido en el cerebro humano y de animales como ratas, ratones y sapo; en áreas como la corteza, el bulbo olfatorio, el núcleo accumbens, el caudado-putamen, el tálamo, el hipotálamo, el mesencéfalo, el bulbo raquídeo, los órganos circunventriculares y el cerebelo (Hinson y col., 2000; Serrano y col., 2000; Juaneda y col., 2003; Macchi y col., 2006).

A nivel del sistema nervioso central existe una amplia inmunoreactividad y expresión de los receptores de la AM (Oliver y col., 2002; Juaneda y col., 2003). En este sentido, Sone y col., (1997), demostraron sitios de unión específicos a la AM en varias regiones del cerebro humano como la corteza cerebral, el tálamo, el hipotálamo, el bulbo raquídeo y el cerebelo. En efecto, Ueda y col., (2001) encontraron que el ARNm de RAMP1 muestra una amplia distribución en el cerebro localizándose en el hipocampo, el núcleo accumbens, el núcleo caudado-putamen, la corteza cerebral y el cerebelo. Por su parte, el ARNm de RAMP2 se encuentra en regiones como el hipocampo, el bulbo olfatorio, los plexos coroides y el cerebelo. El ARNm del RAMP3 se demostró en la corteza cerebral, el tálamo y el cerebelo. Se ha evidenciado la colocalización del CRLR con RAMP1 en el caudado-putamen y el núcleo amigdalóide, y con el RAMP2 en los plexos coroides. En vista de la presencia de AM y de sus receptores en el cerebro, y del papel que juega en el procesamiento de información asociada a la regulación de los fluidos corporales y en la regulación de la presión arterial; se ha sugerido la existencia de un sistema adrenomedulinérgico a nivel central de importancia fisiológica.

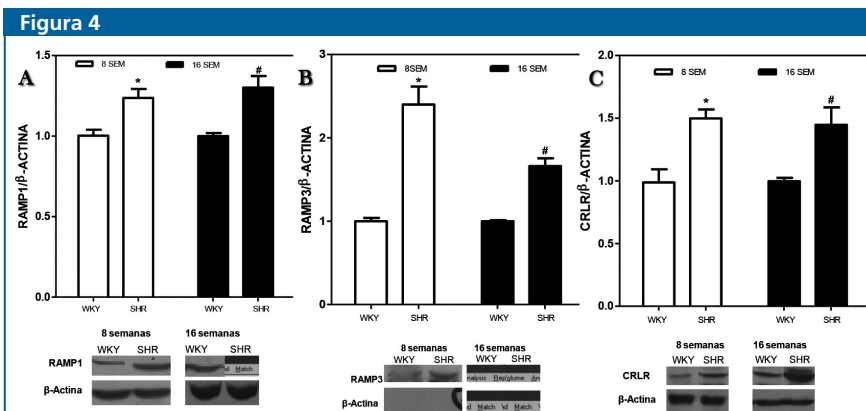
Nuestros resultados demuestran, por primera vez, la presencia de AM y los componentes de su receptor en áreas específicas del cerebelo como lo es el vermis cerebeloso de las ratas WKY y SHR, indicando la presencia de receptores de CGRP, AM1 y AM2 en dicha región (Sakata y col., 1994; Juaneda y col., 2001; Serrano y col., 2000; Edvinsson y col., 2010). En apoyo a nuestros hallazgos en el cerebelo de rata ha sido reportado previamente la presencia de inmunoreactividad a la AM en las células de Purkinje en el cerebelo de la rata,



Efecto de la edad sobre la expresión de RAMP1 (Panel A), RAMP3 (Panel B) y CRLR (Panel C) 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 8 y 16 semanas de edad fueron empleados para el western blotting. Los resultados fueron expresados como la media ± EEM. La expresión de RAMP1, RAMP3 y CRLR fue normalizada con la de la β-actina. (N=10). \*p<0,0001 vs. WKY 8 semanas. #p<0,0001 vs. SHR 8 semanas.



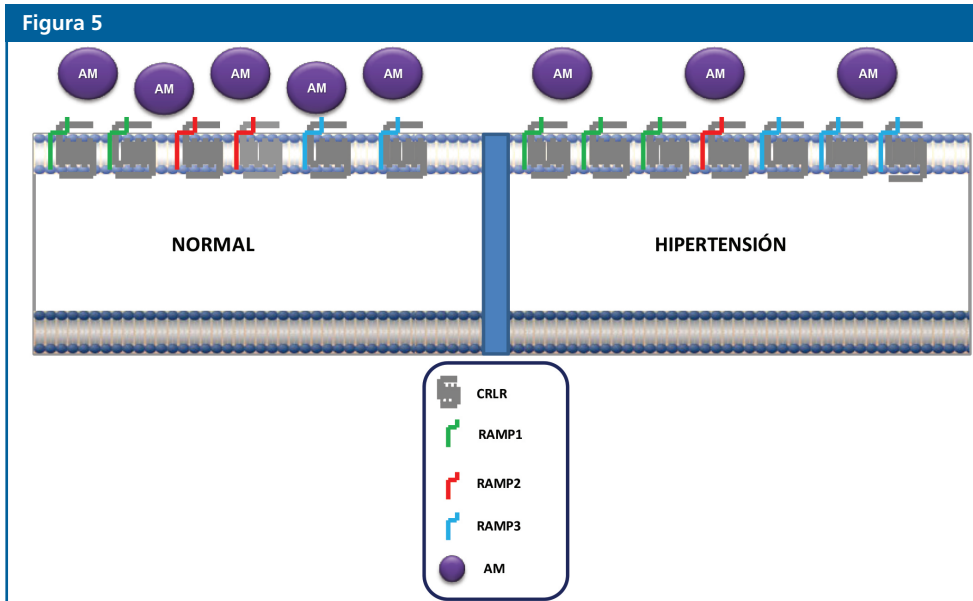
La expresión de la AM (Panel A) y RAMP2 (Panel B) en el vermis de cerebelo de ratas WKY y SHR de 8 y 16 semanas de edad. 100 µg de proteínas provenientes del vermis cerebelar de las ratas WKY y SHR de 8 y 16 semanas de edad fueron empleados para el western blotting. Los resultados fueron expresados como la media ± EEM, de N=10 por grupo experimental. La expresión de la AM y RAMP2 fue normalizada con la de la β-actina. (N=10), \*p<0,0001 vs. WKY 8 semanas. #p<0,0001 vs. WKY 16 semanas.



La expresión de las RAMP1 (Panel A), RAMP3 (Panel B) y CRLR (Panel C) en el vermis de cerebelo de ratas WKY y SHR de 8 y 16 semanas de edad. Proteínas (100 µg) provenientes del vermis cerebelar de las ratas WKY y SHR de 8 y 16 semanas de edad fueron empleados para el western blotting. Los resultados fueron expresados como la media ± EEM. La expresión de la RAMP1, RAMP3 y CRLR fue normalizada con la de la β-actina. (N=10). \*p<0,0001 vs. WKY 8 semanas. #p<0,0001 vs. WKY 16 semanas.



Figura 5



Propuesta del efecto de la hipertensión arterial sobre la expresión de la AM y los componentes de su receptor en el vermis de cerebelo de la rata. En condiciones basales (controles) se expresa AM, CRLR, RAMP1, RAMP2 y RAMP3; pero durante la hipertensión arterial se produce un aumento en la expresión de AM y RAMP2. Así durante la hipertensión arterial tanto la AM como el receptor AM1 se regulan "hacia abajo", mientras que los receptores de AM2 y de CGRP1 lo hacen "hacia arriba".

específicamente en la capa granular y en los núcleos cerebelares (Serrano y col., 2000). Aun más, la presencia de los componentes del receptor de CGRP, AM1 y AM2 en cerebelo, como lo son el ARNm para RAMP1 y RAMP2 en la capa de las células de Purkinje y del ARNm de RAMP3 en la capa granular del cerebelo ha sido reportado previamente (Ueda y col., 2001). Igualmente, se ha descrito la presencia de inmunoreactividad para el CRLR y RAMP1 en las células de Purkinje y la capa molecular del cerebelo de rata (Edvinsson y col., 2010; Morara y col., 1998). Por lo tanto, la presencia de AM así como los componentes de sus receptores en el cerebelo sugieren que la AM podría cumplir un papel funcional en esta estructura e indican que este péptido podría influir en las funciones cerebelares como un factor autocrino / paracrino.

De ser cierta la aseveración anterior, la expresión y la función de los componentes del sistema adrenomedulinérgico podría estar alterada en situaciones patológicas y durante el crecimiento. Nuestros resultados apuntan a esta posibilidad ya que demuestran que la expresión de RAMP1, RAMP3 y CRLR en el vermis de cerebelo de las ratas aumenta con la edad de las mismas, no observando el mismo comportamiento con la AM y la RAMP2. En este sentido, diversos estudios han demostrado cambios en el sistema adrenomedulinérgico local en las distintas edades de la rata, pues se ha demostrado que el receptor de CGRP (CRLR/RAMP1) expresado en las neuronas y glías de la capa cortical del cerebelo, sufre marcadas variaciones durante el desarrollo del cerebelo. De hecho, los estudios de inmunohistoquímica y autoradiografía demuestran que el número de receptores en la capa de células de Purkinje/capa molecular es bajo en las etapas iniciales del desarrollo e incrementa con la madurez, mientras que disminuye durante el mismo período en la sustancia blanca, lo que sugiere que el CGRP liberado desde las fibras trepadoras puede cumplir un papel en el desarrollo cerebelar, pues el

patrón de la conectividad adulta del cerebelo es alcanzado a través de una serie de procesos que tienen lugar en la última fase embrionaria y en el período postnatal (Morara y col., 2000). Por lo que la expresión del receptor CGRP en el cerebelo de ratas adultas puede estar regulado por la activación de las neuronas provenientes de la oliva inferior, cuyos axones constituyen las fibras trepadoras que hacen sinapsis sobre las dendritas de las células de Purkinje (Morara y col., 1998).

Resultados similares se han descrito en la periferia, así Hwang y col. (2007) encontraron que la expresión de AM en pulmón de ratas de 3, 12 y 20 meses aumenta con la edad, mientras que los componentes de su receptor disminuyeron con la edad de las mismas. De igual manera, Wong y col., (2012<sup>A</sup>) encontraron que la expresión de AM incrementó con la edad en los pulmones de ratas con 1, 7 y 21 días, pero disminuyó con la edad en los riñones, glándulas suprarrenales y en el corazón. La evidencia y nuestros hallazgos sugieren que el patrón de cambios en la expresión de la AM y los componentes de sus receptores se ve afectado por la edad de la rata y además son órgano-específico.

Es importante resaltar que la estimulación eléctrica de diversas zonas cerebelosas conlleva cambios en la presión arterial y la frecuencia cardíaca (Nisimaru, 2004; Rector y col., 2006; Tandon y col., 2006). Así, la estimulación eléctrica de la corteza cerebelar posterior a nivel del lóbulo IX del vermis cerebelar, en conejos anestesiados provoca bradicardia, caída de la presión arterial e inhibición transitoria de la actividad simpática renal (Bradley y col., 1987<sup>A</sup>; Rocha y col., 2008). Por su parte, la estimulación eléctrica de la porción rostral de núcleo fastigio en conejos anestesiados desencadena una respuesta presora (Bradley y col., 1987<sup>B</sup>). Estos hallazgos constituyen evidencia clara del papel del cerebelo, específicamente el vermis cerebelar en

la regulación de la presión arterial. Además, la presencia de AM y los componentes de sus receptores en el cerebelo de ratas WKY y SHR sugiere que este péptido puede cumplir un papel en la regulación de la función cardiovascular.

Algunos estudios han indicado que la hipertensión puede influir en la expresión de la AM y los componentes de su receptor en diferentes órganos y en la periferia; en este sentido se ha indicado que la elevación de la AM plasmática constituye un marcador predictivo de diversas enfermedades y sus niveles se correlacionan con la severidad de la enfermedad (Gibbons y col., 2007). De hecho, se ha postulado que el incremento plasmático de la AM puede ayudar a regular los cambios en la presión arterial que acompañan las enfermedades cardiovasculares (Caron y col., 2007).

Diversos estudios han indicado que la expresión de AM y sus receptores se encuentra alterada en el sistema cardiovascular y el SNC durante la hipertensión arterial. A nivel cardiovascular, se ha demostrado un incremento en la producción de AM y mayor expresión del péptido y los componentes de sus receptores (CRLR, RAMP2 y RAMP3) en tejido aórtico y ventrículo cardíaco durante la hipertensión inducida con L-NAME (Pan y col., 2005). Sin embargo, la expresión de RAMP1 se ha encontrado incrementada en la aorta y no se vio alterada en el ventrículo de ratas hipertensas. Por su parte, Bell y col. (2006) demostraron que la expresión de RAMP2 y RAMP3 aumentó en los cardiomiocitos de ratas hipertensas, mientras que la expresión de RAMP1 y CRLR no se modificaron.

Asimismo, a nivel del SNC, la evidencia muestra alteración en la expresión del sistema adrenomedulinérgico durante la hipertensión. De hecho, Shan y col. (2001) encontraron una menor expresión del ARNm que codifica a la AM en regiones como el NPV, el órgano subfornical (OSF), el área postrema (AP) y el núcleo del tracto solitario (NTS) en ratas sometidas a estresores fisiológicos. Por su parte, Stachniak y col. (2003) demostraron que el 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 RAMP2 puede afectar la capacidad de la AM central en regular la actividad simpática. Asimismo, se ha observado que la hipertensión inducida por estrés crónico provoca un incremento en la expresión del ARNm de la pre-pro-AM en el hipotálamo, la glándula pituitaria y la glándula suprarrenal; y una disminución en el bulbo raquídeo y el mesencéfalo (Li y col., 2004).

En el cerebelo, Pastorello y col., (2007) demostraron incrementos en los sitios de unión a la AM en ratas hipertensas 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 parece indicar que la AM podría estar participando en el mantenimiento de la hipertensión. 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 arterial 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.

En apoyo a los hallazgos anteriores nuestros resultados en los que se demuestra que la expresión de CRLR, RAMP1 y RAMP3 es mayor en las ratas SHR al compararlas con las WKY, indican que los receptores de CGRP (CRLR+RAMP1) y AM2 (CRLR+RAMP3) en el cerebelo se encuentran sobreexpresados en la hipertensión arterial. Por el contrario, la expresión de RAMP2 y AM resultó ser menor en las ratas SHR, sugiriendo que durante la hipertensión ocurre una regulación "hacia abajo" del receptor AM1 (CRLR+RAMP2) cerebeloso (Fig. 5). La reducción en la expresión de la AM en el cerebelo de las ratas hipertensas podría ser la responsable de la regulación "hacia arriba" de los receptores AM2 y de los sitios de unión observados por autoradiografía (Pastorello y col., 2007 y presente estudio). Estos hallazgos apoyan aun más el papel del sistema adrenomedulérgico cerebeloso en la regulación de la presión arterial, así como su posible disregulación en la hipertensión.

Al respecto, Li y col. (2004), sugirieron que el aumento de la pre-pro-AM, la RAMP2 y la RAMP3 en el hipotálamo podrían constituir un mecanismo de protección para reajustar el incremento en la presión arterial por el estrés crónico a través de un mecanismo de acción directo o indirecto sobre la función cardiovascular. Por su parte, la disminución en la expresión de la pre-proAM en el bulbo, donde la administración de AM provoca un incremento en la presión arterial por incremento del eflujo simpático, podría constituir un mecanismo protector de la AM en reajustar la presión arterial.

Se sabe que el complejo CRLR/RAMP2 constituye la vía de la traducción de la actividad biológica de la AM, y se ha postulado que alteraciones en la expresión de las RAMPs se asocian 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). Efectivamente, nuestros resultados de una menor expresión de AM y RAMP2 en la hipertensión sugieren que estos cambios pueden 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 (Figura 5).

### Agradecimientos

Los autores agradecen al Sr. Banny 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

- Allen M, Smith P, Ferguson A. Adrenomedullin microinjection into the area postrema increases blood pressure. *Am J Physiol* 1997; 272: R1698 – R1703.
- Bell D, Zhao Y, Kelso E, McHenry E, Rush L, Lamont V, Nicholls P, McDermott B. Upregulation of adrenomedullin and its receptor components during cardiomyocyte hypertrophy induced by chronic inhibition of nitric oxide synthesis in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 290: H904 – H914.
- Beltowski J, Jamroz A. Adrenomedullin – What do we know 10 years since its discovery? *Pol J Pharmacol* 2004; 56: 5 – 27.
- Bradley DA, Ghelarducci B, Paton J, Spyer K. The cardiovascular response elicited from the posterior cerebellar cortex in the anaesthetized and decerebrate rabbit. *J Physiol* 1987; 383: 537 – 550.
- Bradley D<sup>8</sup>, Paton J, Spyer K. Cardiovascular responses evoked from the fastigial region of the cerebellum in anaesthetized and decerebrated rabbits. *J Physiol* 1987; 392: 475 – 491.
- Caron K, Hagaman J, Nishikimi T, Kim H, Smithies O. Adrenomedullin gene expression differences in mice do not affect blood pressure but modulate hypertension – induced pathology in males. *PNAS* 2007; 104 (7): 3420 – 3425.
- Cases A, Mora-Macía J. Adrenomedulina: un Nuevo péptido vasoactivo. *Nefrología* 2001; XXI (1): 16 – 25.
- Chakravarty P, Suthar T, Coppock H, Nicholl C, Bloom S, Legon S, Smith D. CGRP and adrenomedullin binding correlates with transcript levels for calcitonin receptor – like receptor (CRLR) and receptor activity modifying proteins (RAMPs) in rat tissues. *Br J Pharmacol* 2000; 130: 189 – 195.
- Díaz E, Israel A. Effect of adrenomedullin receptor and calcitonin gene – related peptide receptor antagonists on centrally mediated adrenomedullin renal action. *Brain Res Bull* 2001; 55 (1): 29 – 35.
- Edvinsson L, Eftekhari S, Salvatore C, Warfvinge K. Cerebellar distribution of calcitonin gene – related peptide (CGRP) and its receptor components calcitonin receptor – like receptor (CLR) and receptor activity modifying protein 1 (RAMP1) in rat. *Molecular and Cellular Neuroscience* 2010; 5: 1–7.
- Gibbons C, Dackor R, Dunworth W, Fritz-Six K, Caron K. Receptor Activity – modifying proteins: RAMPing up Adrenomedullin signaling. *Mol Endocrinol* 2007; 21 (4): 783–796.
- Hinson J, Kapas S, Smith D. Adrenomedullin, a multifunctional regulatory peptide. *Endocr Rev* 2000; 21 (2): 138 – 167.
- Hwang IS, Fung ML, Liang EC, Tipoe GL, Tang F. Age-related changes in adrenomedullin expression and hypoxia-inducible factor-1 activity in the rat lung and their responses to hypoxia. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2007; 62 (1):41–49.
- Ichiki Y, Kitamura K, Kangawa K, Kawamoto M, Matsuo H, Eto T. Distribution and characterization of immunoreactive adrenomedullin in human tissue and plasma. *FEBS Lett* 1994; 338: 6 – 10.
- Israel A, Cierco M, Sosa B. Role of AT<sub>2</sub> receptors in the vasodepressor response to footshocks in losartan pretreated rats. Involvement of kinins, nitric oxide and prostaglandins. *Eur J Pharmacol* 2000; 394(1):103–108.
- Israel A, Díaz E. Diuretic and natriuretic action of adrenomedullin administered intracerebroventricularly in conscious rats. *Regul Pept* 2000; 89: 13–18.
- Ji S, He R. Microinjection of adrenomedullin in rostral ventrolateral medulla increases blood pressure, heart rate and renal sympathetic nerve activity in rats. *Acta Physiol Sin* 2002; 54 (6): 460 – 466.
- Juaneda C, Dumont Y, Chabot J, Fournier A, Quirion R. Adrenomedullin receptor binding sites in rat brain and peripheral tissues. *Eur J Pharmacol* 2003; 474: 165 – 174.
- Juaneda C, Dumont Y, Chabot J, Quirion R. Autoradiographic distribution of adrenomedullin receptors in the rat brain. *Eur J Pharmacol* 2001; 421: R1 – R2.
- Kitamura K<sup>a</sup>, Kangawa K, Kawamoto M, Ichiki Y, Nakamura S, Matsuo H, Eto T. Adrenomedullin: a novel hypotensive peptide isolated from human pheochromocytoma. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 192: 553 – 560.
- Li X, Li L, Shen L, Qian Y, Cao Y, Zhu D. Changes of adrenomedullin and its receptor components mRNAs expression in the brain stem and hypothalamus-pituitary – adrenal axis of stress – induced hypertensive rats. *Acta Physiol Sin* 2004; 56 (6): 723 – 729.
- Lowry O, Rosebrough N, Farr A, Randall R. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951; 193: 265–275
- Macchi V, Porzionato A, Belloni A, Stecco C, Parenti A, De Caro R. Immunohistochemical mapping of adrenomedullin in the human medulla oblongata. *Peptides* 2006; 27: 1397 – 1404.
- McLatchie L, Fraser N, Main M, Wise A, Brown J, Thompson N, Solari R, Lee M, Foord S. RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor. *Nature*. 1998; 393 (6683): 333–339.
- Morara S, Rosina A, Provini L, Forloni G, Caretti A, Wimalawansa S. Calcitonin gene – related peptide receptor expression in the neurons and glia of developing rat cerebellum: an autoradiographic and immunohistochemical analysis. *Neuroscience* 2000; 100 (2): 381 – 391.
- Morara S, Wimalawansa S, Rosina A. Monoclonal antibodies reveal expression of the CGRP receptor in Purkinje cells, interneurons and astrocytes of rat cerebellar cortex. *NeuroReport* 1998; 9: 3755 – 3759.
- NIH Guide for the care and use of animals. 1996. Institute of Laboratory Animal Resources. National Research Council. National Academy Press, Washington DC, USA.
- Nisamaru N. Cardiovascular modules in the cerebellum. *Jpn J Physiol* 2004; 54: 431 – 448.
- Oliver K, Wainwright A, Edvinsson L, Pickard J, Hill R. Immunohistochemical localization of calcitonin receptor like receptor and receptor activity – modifying proteins in the human cerebral vasculature. *J Cereb Blood Flow Metab* 2002; 22: 620 – 629.
- Owji A, Gardiner J, Upton P, Mahmoodi M, Ghatei M, Bloom S, Smith D. Characterization and molecular identification of adrenomedullin binding sites in the rat spinal cord: A comparison with calcitonin gene – related peptide receptors. *J Neurochem* 1996; 67: 2172 – 2179.
- Pan C, Jaing W, Zhong G, Zhao J, Pang Y, Tang C, Qi Y. Hypertension induced by nitric oxide synthase inhibitor increases responsiveness of ventricular myocardium and aorta of rat tissue to adrenomedullin stimulation in vitro. *Life Science* 2005; 78: 398 – 405.
- Pastorello M, Díaz E, Csibi A, Garrido M, Chabot J, Quirion R, Israel A. Papel de la adrenomedulina cerebelosa en la hipertensión arterial. *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica* 2007; 26 (2): 98 – 104.
- Rector D, Richard C, Harper R. Cerebellar fastigial nuclei activity during blood pressure challenges. *J Appl Physiol* 2006; 101: 549 – 555.
- Rocha I, Goncalves V, Bettencourt M, Silva L. Effect of stimulation of sublobule IX-b of the cerebellar vermis on cardiac function. *Physiol Res* 2008; 57: 701 – 707.
- Sakata J, Shimokubo T, Kitamura K, Nishizono M, Iehiki Y, Kangawa K, Matsuo H, Eto T. Distribution and characterization of immunoreactive rat adrenomedullin in tissue and plasma. *FEBS Letters* 1994; 352: 105 – 108.
- Serino R, Ueta Y, Hara Y, Nomura M, Yamamoto Y, Shibuya I, Hattori Y, Kitamura K, Kangawa K, Russell J, Yamashita H. Centrally administered adrenomedullin increases plasma oxytocin level with induction of c-fos messenger ribonucleic acid in the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat. *Endocrinology* 1999; 140: 2334 – 2342.
- Serrano J, Utenthal O, Martínez A, Fernández P, Martínez J, Alonso D, Bentura M, Santacana M, Gallardo J, Martínez R, Cutitta F, Rodrigo J. Distribution of adrenomedullin – like immunoreactivity in the rat central nervous system by light and electron microscopy. *Brain Res* 2000; 853: 245 – 268.
- Shan J, Krukoff T. Distribution of preadrenomedullin mRNA in the rat central nervous system and its modulation by physiological stressors. *J Comp Neurol* 2001; 432: 88 – 100.
- Sone M, Takahashi K, Satoh F, Murakami O, Totsume K, Ohneda M, Sasano H, Ito H, Mouri T. Specific adrenomedullin binding sites in the human brain. *Peptides* 1997; 18 (8): 1125 – 1129.
- Stachniak T, Krukoff T. receptor activity modifying protein 2 distribution in the rat central nervous system and regulation by changes in blood pressure. *J Neuroendocrinol* 2003; 15 (9): 840 – 850.
- Takei Y, Inoue K, Ogoshi M, Kawahara T, Bannai H, Miyano S. Identification of novel adrenomedullin in mammals: a potent cardiovascular and renal regulator. *FEBS Lett* 2004; 56: 53 – 58.
- Tandon O, Malhotra V, Bhaskar V, Shankar P. Cerebellar control of visceral response – possible mechanisms involved. *Indian J Exp Biol* 2006; 44: 429 – 435.
- Ueda T, Ugawa S, Saishin Y, Shimada S. Expression of receptor – activity modifying protein (RAMP) mRNAs in the mouse brain. *Mol Brain Res* 2001; 93: 36 – 45.
- Uezono Y, Nakamura E, Ueda Y, Shibuya I, Ueta Y, Yokoo H, Yanagita T, oyohira Y, Kobayashi H, Yanagihara N, Wada A. Production of cAMP by adrenomedullin in human oligodendroglial cell line KG1C: Comparison with calcitonin gene – related peptide and amylin. *Brain Res*. *Mol. Brain Res* 2001; 97: 59 – 69.
- Urrecheaga D, Csibi A, Levy P, Bottari S, Israel A. Efecto de la hipoxia intermitente crónica sobre la nitración y la fosforilación de las quinasas reguladas por señales extracelulares en la corteza del cerebro de la rata. *Rev Facultad de Farmacia* 2007; 70(2): 34–42.
- Wong P<sup>a</sup>, Tang F. An ontogenic study of adrenomedullin gene expression in the rat lung, adrenal, kidney, and heart. *Endocrine* 2012 ; 41 (2): 256–265.
- Xu Y<sup>a</sup>, Krukoff T. Adrenomedullin in the rostral ventrolateral medulla increases arterial pressure and heart rate: roles of glutamate and nitric oxide. *Am J Physiol* 2004; 287 R729 – R734.
- Xu Y<sup>b</sup>, Krukoff TL. Decrease in arterial pressure induced by adrenomedullin in the hypothalamic paraventricular nucleus is mediated by nitric oxide and GABA. *Regul Pept* 2004; 119 (1–2): 21–30.
- Yokoi H, Arima H, Murase T, Kondo K, Iwasaki Y, Oiso Y. Intracerebroventricular injection of adrenomedullin inhibits vasopressin release in conscious rats. *Neurosci Lett* 1996; 216: 65 – 67.