

## Efecto de la adrenomedulina cerebelosa frente al estrés agudo.

*Leticia Figueira y Anita Israel.*

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

**Palabras clave:** adrenomedulina; cerebelo; vermis; estímulo eléctrico plantar; estrés.

**Resumen.** La adrenomedulina (AM) es un péptido involucrado en la regulación cardiovascular. 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 (PA). El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto funcional *in vivo* de la AM durante el estrés agudo, mediante la administración *in situ* de AM en el vermis cerebelar de la rata. Se emplearon ratas adultas normotensas Wistar Kyoto (WKY) y Sprague Dawley (SD) y ratas espontáneamente hipertensas (SHR) las cuales fueron anestesiadas y posteriormente canuladas en el vermis cerebelar. El estrés se indujo mediante el uso del estímulo eléctrico plantar (EEP). Los animales fueron divididos en grupos que recibieron AM (0,2 o 200 pmol/5 $\mu$ L) o vehículo (solución fisiológica, 5 $\mu$ L). La PA se determinó antes del experimento y después de la administración del tratamiento respectivo, seguida de la aplicación del EEP (100 V, 5 Hz, 10 mseg, durante 4 minutos). La PA se determinó mediante pletismografía digital no invasiva. Los resultados demuestran que la microinyección de AM (0,2 y 200 pmol) *in situ* en el vermis cerebeloso en ratas SD, WKY y SHR disminuye significativamente la respuesta presora frente al estrés inducido por el EEP, lo que sugiere que la acción hipotensora está mediada a través de la regulación del eflujo simpático. Estos hallazgos demuestran la participación de la AM cerebelosa en la regulación de la respuesta cardiovascular frente al estrés.

## Effect of cerebellar adrenomedullin during acute stress.

*Invest Clin* 2016; 57(3): 280 - 292

**Key words:** adrenomedullin; cerebellum; vermis; footshock; stress.

**Abstract.** Adrenomedullin (AM) is a peptide involved in cardiovascular regulation. In the cerebellum, the density of AM receptors is altered during hypertension, suggesting a possible role of cerebellar adrenomedulinergic system in the regulation of blood pressure (BP). The aim of this study was to evaluate the functional role of AM during acute stress, by *in situ* administration of AM into the cerebellar vermis in rats. Adult normotensive Wistar Kyoto (WKY) and Sprague Dawley (SD) rats and spontaneously hypertensive rats (SHR), were anesthetized and their cerebellar vermis cannulated. Footshock was used as stressor. Animals were divided into groups that received either AM (0.2 and 200 pmol/5 $\mu$ L) or vehicle (physiological saline, 5 $\mu$ L). The BP was determined, using noninvasive digital plethysmography, before and after treatment, followed by footshock (100V, 5 Hz, 10 msec, for 4 minutes). The results show that microinjection of AM (0.2 and 200 pmol) *in situ* into the cerebellar vermis in SD, WKY and SHR rats, significantly decreased the pressor response induced by footshock stress, suggesting that the hypotensive action is mediated through regulation of sympathetic outflow. Taken together, our results demonstrate a role of cerebellar AM in the regulation of cardiovascular response to stress.

*Recibido: 21-10-2015. Aceptado: 10-03-2016*

### INTRODUCCIÓN

El estrés se define como la respuesta no específica del organismo ante cualquier demanda del exterior. En efecto, la vida existe en el organismo gracias a la presencia de un complejo equilibrio dinámico conocido como homeostasis, el cual se encuentra en constante cambio por fuerzas adversas intrínsecas o extrínsecas, los estresores (1). La respuesta a los estímulos estresantes del medio ambiente y las experiencias adversas, involucran la activación de vías complejas en el sistema nervioso central (SNC), que incluyen desde la percepción del estrés hasta respuestas conductuales, autonómicas y endocrinas, y el incremento de las actividades de diversos sistemas fisiológicos que induce la

interrupción de la homeostasis (2,3). Las estaciones del control central del sistema de estrés están localizadas en el hipotálamo y en el tallo cerebral e incluyen neuronas parvocelulares que sintetizan y secretan la hormona liberadora de corticotropina (CRH), las neuronas del núcleo paraventricular del hipotálamo que liberan la arginina-vasopresina y el locus coeruleus (LC) (sistema simpático central) (4,5). El eje hipotálamo-pituitario-adrenal (HPA), junto con el sistema eferente simpático adrenomedular, representan en conjunto el órgano efector, los cuales vía estimulación del cerebro influyen en todos los órganos del cuerpo ante la exposición a un estímulo estresor (6). En el cerebro también existe modulación de los eferentes vagales y de la porción eferente parasimpática sacra que

median las respuestas del intestino ante el estrés (7). Poco se conoce acerca del papel del cerebelo en la respuesta al estrés. Al respecto, la evidencia muestra que el estrés crónico por inmovilización produce alteraciones del comportamiento que podrían estar relacionados con cambios moleculares en las áreas del SNC que regulan las funciones motoras, tales como el cerebelo (8). Igualmente, se demostró que en ratas expuestas a estrés por nado forzado durante 7 días, se produce una elevación significativa en la peroxidación de lípidos en el cerebelo, lo que sugiere que el estrés activa los procesos de producción de radicales libres que conducen a un aumento en la peroxidación lipídica en el cerebelo (9).

Algunos factores neuroendocrinos como las catecolaminas, CRH, serotonina, endotelinas, vasopresina y la angiotensina II (ANG II) actúan en los circuitos centrales mediando las respuestas de estrés (6). La participación en la respuesta al estrés de los péptidos pertenecientes a la superfamilia de la calcitonina/péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP)/amilina, entre ellos la adrenomedulina (AM) (10,11), es poco conocida. La AM es un péptido de 52 aminoácidos (humano) o de 50 aminoácidos (rata) que muestra homología con el CGRP (12), con acción hipotensora y vasodilatadora potente. Los niveles de AM se encuentran significativamente elevados en pacientes con hipertensión (13). De igual manera, se ha descrito que el estrés por restricción de movimiento estimula la actividad simpática, así como del eje HPA, y produce un aumento significativo en los niveles de AM en el plasma, en la glándula pituitaria y glándulas suprarrenales, todos los cuales son componentes clave del eje HPA (14), lo cual sugiere que la AM ejerce funciones regulatorias y de protección para contrarrestar la activación del eje HPA inducida por una variedad de estresores fisiológicos y psicológicos (14). Efectivamente, los efectos endocrinos de la AM están mediados

a través de la inhibición de la liberación de la hormona adrenocorticotropa (ACTH), cortisol (15), corticosterona (16) y aldosterona estimulada ANG II (17).

Parte de las acciones protectoras de la AM ante el estrés podrían estar mediadas a través del SNC; la evidencia apoya esta posibilidad, ya que se ha demostrado la existencia de receptores de AM y de sus componentes en diferentes estructuras del SNC y específicamente en el cerebelo (18,19). Igualmente, nuestros hallazgos recientes demuestran la existencia de un sistema adrenomedulinérgico cerebeloso funcional, el cual se encuentra desregulado durante la hipertensión (19-21). Aún más, la administración de AM en el cerebelo en condiciones de hipertensión produce un profundo efecto hipotensor, dependiente de la dosis y sitio específico, mediado a través de la estimulación del receptor AM1 (21). Aún cuando estos hallazgos demuestran que la AM cerebelosa participa en la regulación de la presión arterial (PA), se desconoce si el sistema adrenomedulinérgico cerebeloso es capaz de regular la respuesta cardiovascular frente al estrés. Es por ello que en el presente estudio nos propusimos evaluar si la AM cerebelosa es capaz de modular la respuesta presora inducida por el estímulo eléctrico plantar (EEP), el cual constituye un modelo de estrés agudo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Animales de Experimentación

Se emplearon ratas macho, de 16 semanas de edad, de las cepas Sprague Dawley (SD), Wistar Kyoto (WKY) y espontáneamente hipertensas (SHR) provenientes del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC) (Caracas, Venezuela). Los animales fueron mantenidos en parejas en jaulas plásticas, a temperatura ambiente 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 (22) y la aprobación del Comité de Bioterio de la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela.

### **Administración *in situ* en el vermis cerebeloso de AM o ANG II en animales sometidos a EEP**

Los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico a la dosis de 40 mg/Kg. Posteriormente, mediante el uso de un aparato estereotáxico (David Kopf Instruments) se procedió a la canulación en el vermis del cerebelo de acuerdo a las coordenadas estereotáxicas antero-posterior (AP): -10,3, Lateral (L):0 y ventral (V): 2,4 de acuerdo a Pellegrino y col., y Sacchetti y col., (23,24). Se permitió la recuperación de los animales (3 días) y los mismos fueron divididos en dos grupos cada uno. El día del ensayo se determinó la PA basal de cada animal, y posteriormente se procedió a determinar el efecto de la administración *in situ* de AM en el vermis de cerebelo sobre la respuesta presora inducida por el EEP *in vivo* en ratas SD, WKY y SHR. Igualmente, se evaluó el efecto de la administración *in situ* de ANG II en el vermis de cerebelo sobre la respuesta presora inducida por el EEP en ratas SHR. Para ello, cada cepa de ratas previamente canulada en el vermis, fueron divididas en dos grupos experimentales a los cuales se les determinó la PA basal. Posteriormente, a un grupo se le administró AM (American Peptide, Company Inc.) (0,2 o 200 pmol/ 5 $\mu$ L) y al otro vehículo (solución fisiológica, 5  $\mu$ L). Inmediatamente después del tratamiento respectivo, cada animal fue transferido a una caja de plexiglas con una rejilla de cobre (dentro de la estufa), donde recibió una descarga eléctrica en las patas (100 V, 5 Hz, 10 mseg, durante 4 minutos) suministrada mediante un estimulador Grass (Modelo 48), después de lo cual se les determinó los parámetros cardiovasculares. Para evaluar si los

cambios en la PA media (PAM) inducido tras la administración de AM fueron específicos de la sustancia, se determinó el efecto de la administración *in situ* de ANG II (American Peptide, Company Inc) (200 pmol/ 5 $\mu$ L) en el vermis del cerebelo sobre la respuesta presora inducida por el EEP en ratas SHR. Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  error estándar de la media del PAM (mmHg) con respecto a sus valores basales (antes de la administración de AM o vehículo). Se tomaron los datos de aquellos animales en los que el colorante se localizó en el vermis cerebeloso. Para evaluar si los cambios en PAM inducidos tras la administración de AM fueron sitio específico, se determinó el efecto de la administración *in situ* de AM (200 pmol/ 5 $\mu$ L) fuera del vermis cerebeloso sobre la respuesta presora inducida por el EEP en ratas SD, WKY y SHR. En este caso se tomó en cuenta los datos de aquellos animales en los que el colorante se localizó fuera del vermis del cerebelo.

### **Determinación de la PA**

El registro de los parámetros cardiovasculares, presión sistólica (PS) y presión diastólica (PD) se realizó en las ratas conscientes por un método no invasivo mediante el uso de un pletoestesiógrafo digital de cola (Digital Pressure Meter LE 5002 LETICA®, Panlab, S.L. Barcelona - España). Dicho equipo emplea una aproximación de la medida de la PA que es básicamente esfigmomanométrica. La PAM fue calculada de la siguiente manera,  $PAM = PD + 1/3 (PS - PD)$ . La semana previa al experimento, se determinó diariamente la PA y frecuencia cardíaca, para minimizar el estrés asociado al manejo y al movimiento de la cola (período de adaptación).

### **Análisis Estadístico**

Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  error estándar de la media (E.E.M.). Se utilizó la prueba de Kruskal – Wallis para comparar los valores de tres grupos, con análisis post

hoc mediante la prueba de U- de Mann-Whitney sobre cada par de grupos. Un valor de  $p < 0,05$  fue considerado significativo. El análisis de los resultados y la elaboración de los gráficos se realizó empleando el programa Graph Pad Prism versión 5.1.

## RESULTADOS

### **Efecto de la administración *in situ* intracerebelar de AM sobre la PAM en ratas SD, WKY y SHR adultas sometidas a estrés por EEP**

Como se observa en la Fig. 1, el EEP produjo una respuesta presora significativa (+35 mmHg). La administración intracerebelar de AM (0,2 pmol/5 $\mu$ L) bloqueó completamente la respuesta presora frente al EEP. Aún más, la administración de AM a una dosis de 200 pmol/5 $\mu$ L no sólo bloqueó la respuesta presora frente al estrés sino que produjo una respuesta hipotensora profunda y significativa. Este efecto de la AM frente a la respuesta presora al EEP fue similar en las tres cepas evaluadas: ratas SD, WKY y SHR. La acción de la AM sobre la respuesta presora se indica en el gráfico del área bajo la curva (AUC) que demuestra claramente el efecto dependiente de la dosis (N=10,  $p < 0,05$ ).

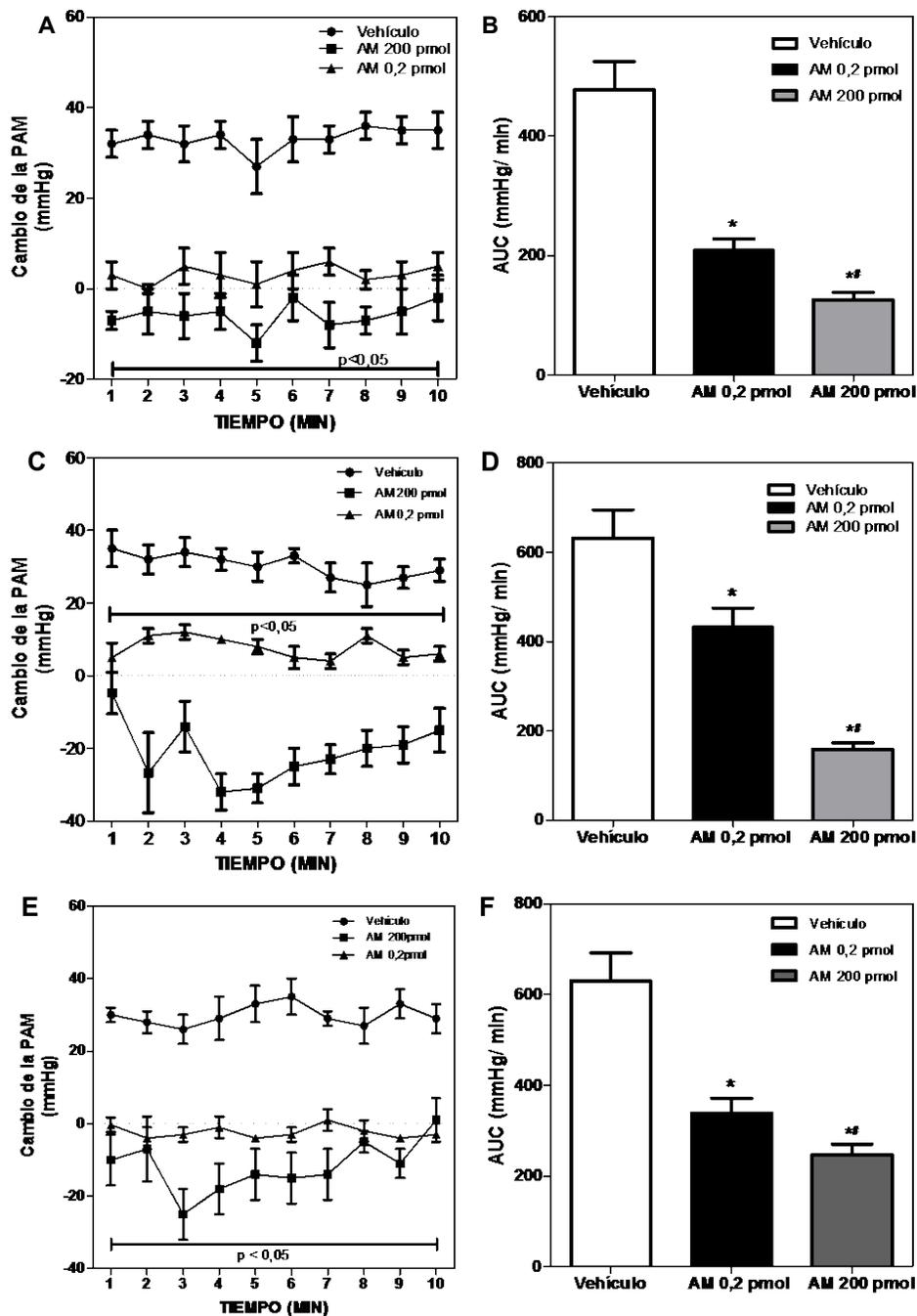
Para evaluar si los cambios en la PAM inducidos tras la administración de AM son sitio específicos, se evaluó el efecto de la administración *in situ* de AM fuera del vermis de cerebelo sobre la PAM en ratas SD, WKY y SHR *in vivo* sometidas a estrés por EEP. Como se observa en la Fig. 2, la administración de AM (200 pmol/5 $\mu$ L) fuera del vermis cerebelar de ratas SD, WKY y SHR, no fue capaz de alterar la respuesta presora inducida por el EEP (N=10).

### **Efecto de la administración intracerebelar de ANG II sobre la PAM en ratas SHR adultas sometidas a estrés por EEP**

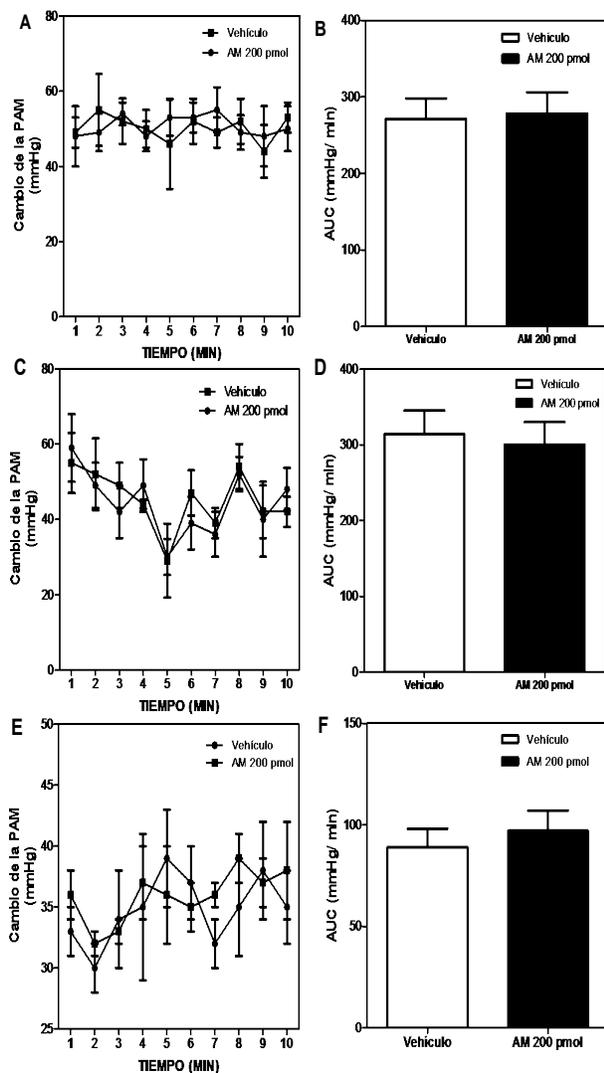
Se evaluó el efecto de la administración *in situ* de ANG II en el vermis del cerebelo sobre el cambio de PA en ratas SHR sometidas a estrés por EEP *in vivo*. Como se observa en la figura 3, la administración intracerebelar de vehículo o ANGII (200 pmol/5 $\mu$ L), en las ratas SHR sometidas a EEP, no provocó cambios en la magnitud de la respuesta presora al estrés cuando se compara con el vehículo (N=10).

## DISCUSIÓN

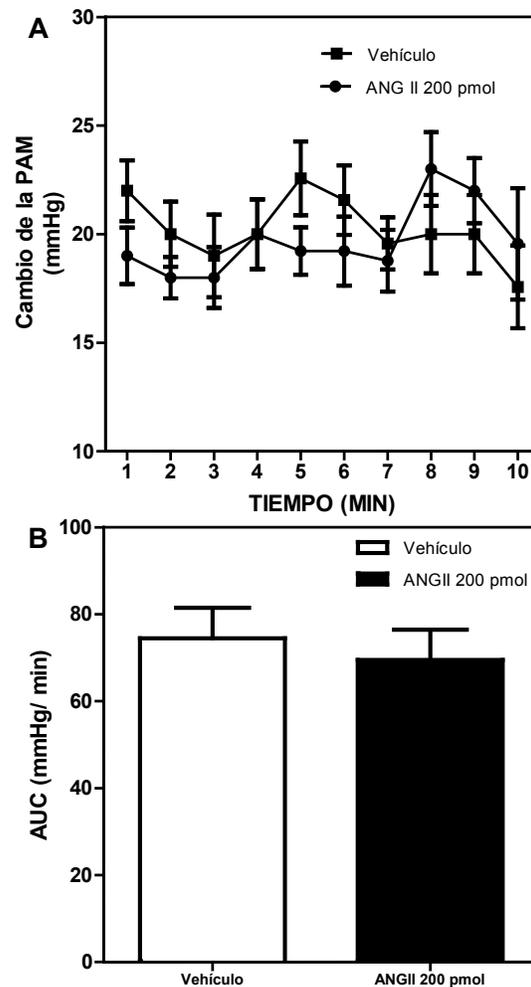
Se ha demostrado la presencia de un sistema adrenomedulinérgico en el SNC, el cual posee relevancia funcional. Efectivamente, se ha descrito la presencia de sitios de unión específicos para la AM en áreas del cerebro como la corteza cerebral, el bulbo olfatorio, núcleo accumbens, caudado-putamen, tálamo, hipotálamo, bulbo raquídeo, órganos circunventriculares y el cerebelo (18, 25,26). Igualmente, se ha demostrado la expresión de los componentes de los receptores de AM en diferentes áreas del SNC y entre ellas el cerebelo (27,28). Específicamente, resultados recientes mostraron la presencia de AM y los componentes de su receptor en el vermis cerebeloso de ratas WKY y SHR, indicando la presencia de receptores del péptido relacionado al gen de la calcitonina 1 (CGRP1), AM tipo 1 (AM1) y AM tipo 2 (AM2) en esta área (11,18-21, 29,30). Aún más, mediante estudios de microscopía de luz y electrónica se ha demostrado la presencia de AM inmunoreactiva en las células de Purkinje, en los terminales de las fibras musgosas y en las neuronas de los núcleos cerebelosos (18). Igualmente, se ha descrito en las células de Purkinje la presencia del ARNm de la proteína que modifica la actividad de receptor tipo 1 (RAMP1) y tipo 2 (RAMP2), y



**Fig. 1.** Efecto de la administración *in situ* de AM en el vermis de cerebelo de ratas SD, (A,B) WKY (C,D) y SHR (E,F) sometidas a estrés por EEP sobre la PAM. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  E.E.M. del cambio de PAM (Panel Izquierdo). Se determinó el área bajo la curva (AUC) del cambio de la PAM para cada tratamiento (Panel Derecho). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  E.E.M. de la AUC (N=10). \* $p < 0,05$  vs. vehículo. # $p < 0,05$  vs. AM 0,2 pmol.



**Fig. 2.** Efecto de la administración *in situ* de AM fuera del vermis de cerebelo de ratas SD (A,B), WKY (C,D) y SHR (E,F) sometidas a estrés por EEP sobre la PAM. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  E.E.M. del cambio de PAM (Panel Izquierdo). Se determinó el área bajo la curva (AUC) del cambio de la PAM para cada tratamiento (Panel Derecho). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  E.E.M. de la AUC (N=10).



**Fig. 3.** Efecto de la administración *in situ* de ANG II en el vermis de cerebelo de ratas SHR sometidas a estrés por EEP sobre la PA. Se determinó la PAM basal y se administró ANG II (200 pmol/5 $\mu$ L) o vehículo en ratas canuladas en el vermis del cerebelo, se sometió a las ratas a EEP durante 4 min y se determinó la PAM (durante 10min). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  E.E.M. del cambio de PAM (Panel A). Se determinó el área bajo la curva (AUC) del cambio de la PAM para cada tratamiento (Panel B). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  E.E.M. de la AUC (N=10).

del ARNm de la proteína que modifica la actividad de receptor tipo 3 (RAMP3) en las células granulosas (27). Esto indica un papel funcional de la AM cerebelosa y sugiere que este péptido podría participar en funciones cerebelosas como un factor autocrino/paracrino.

Desde que existe el sustrato anatómico y de receptores que responden a la AM en el cerebelo, es lógico pensar que la AM administrada directamente en el cerebelo debería ejercer alguna función en la regulación cardiovascular. Al respecto, previamente hemos demostrado que la microinyección de AM en el vermis del cerebelo de ratas hipertensas provoca una poderosa respuesta hipotensora, la cual fue específica y dependiente de la dosis (20,21). Por el contrario, la AM no fue capaz de reducir la PA en las ratas normotensas tras la microinyección en el vermis cerebeloso en ausencia de estímulos estresores. La especificidad de la acción hipotensora de la AM administrada en el vermis cerebeloso se apoya aún más por el hecho que la administración del péptido fuera del vermis no ocasionó el efecto hipotensor en las ratas SHR y la administración *in vivo* de un péptido presor como la ANG II en el vermis de cerebelo tampoco modificó la PA (20,21), aún cuando se sabe que existen receptores para la ANG II en el cerebelo (31,32). En este sentido, existe estudios que demuestran que la aplicación iontoforética de ANG II en el cerebelo causa depresión de la tasa de disparo de las células de Purkinje (33). Por lo tanto, los resultados del presente estudio constituyen la primera evidencia funcional *in vivo* del papel de la AM en el vermis cerebeloso en el control de la PA.

El mecanismo hipotensor preciso de la AM en el vermis cerebeloso en ratas hipertensas no se ha podido establecer hasta el presente, pero podría estar asociado a la regulación de la actividad o eflujo simpático y parece requerir de un sistema estimulado. Si ello es así, la administración de AM en el vermis cerebeloso debería

contrarrestar la respuesta presora producida por el estrés agudo inducido por el EEP en ratas, cuya respuesta efectora neuroendocrina es el sistema simpático – adrenal y que se manifiesta con un incremento en la frecuencia cardíaca, PA y respiración, alteraciones del flujo sanguíneo a los tejidos, aumento de la glicemia y disminución de la motilidad intestinal (34). Los resultados presentes apuntan a esa posibilidad; en efecto, el estrés agudo producido por el EEP incrementó la PA en las ratas SD, SHR y WKY (34-36), posiblemente debido a un incremento en la liberación de catecolaminas a la circulación (11,37,38). La microinyección de la AM en el vermis cerebeloso fue capaz de disminuir la respuesta presora frente al EEP, tanto en las ratas normotensas como hipertensas, lo cual sugiere que la AM intracerebelar puede actuar inhibiendo el eflujo simpático. Nuevamente, este efecto fue sitio dependiente y específico ya que la administración de AM fuera del vermis o de ANG II en el vermis cerebeloso no modificó la respuesta presora al estrés agudo inducido por EEP. En este sentido, existen estudios que demuestran que la aplicación microiontoforética de ANG II en el cerebelo causa depresión de la tasa de disparo de las células de Purkinje (33).

Contrario a los hallazgos de este estudio, la literatura indica que la AM en otras regiones del cerebro aumenta la actividad simpática y el eflujo simpático renal. Efectivamente, se ha demostrado que la administración de AM en la región ventrolateral rostral del bulbo raquídeo (RVLM) aumenta la PA, lo que sugiere que la AM estimula neuronas de RVLM las cuales controlan la actividad simpática cardíaca (39,40). Asimismo, la administración de AM intracerebroventricular (icv) provocó una elevación en la PA, lo cual parece ser mediado por el incremento de la actividad simpática (41-43) ya que fue bloqueado por la administración periférica de un bloqueante alfa adrenérgico como la fentolamina (44); esto sugiere que la AM está

involucrada como un neuropéptido en la regulación central de la función cardiovascular y simpática renal. De igual manera, Taylor y col., (45) encontraron que la administración icv de AM fue capaz de incrementar los niveles plasmáticos de corticosterona, sugiriendo que la AM actúa dentro del hipotálamo estimulando la liberación de la CRH, y por lo tanto incrementando la actividad del eje HPA. Aún más, la administración icv de AM estimula el flujo simpático y la descarga simpática renal y abdominal (46-49) e incrementa la sensibilidad del baroreflejo (46). Adicionalmente, la administración icv de AM activa neuronas en el núcleo paraventricular (NPV), el cual está asociado con regulación cardiovascular y simpática central (43,47). Asimismo, se ha demostrado que la microinyección de AM icv estimula la expresión del gen tirosina hidroxilasa, la enzima limitante de la síntesis de la noradrenalina, a nivel del LC (43); por lo tanto, como las neuronas noradrenérgicas del LC participan en importantes procesos regulando la función cardiovascular, es posible que la AM pueda mediar algunos de sus efectos a través de sus acciones en el sistema catecolaminérgico del LC (48,49).

El efecto hipotensor e inhibidor de la respuesta simpatoadrenal observado en el presente trabajo es difícil de explicar hasta los momentos, pero se podría especular que el cerebelo a través de sus conexiones neuroanatómicas desde el núcleo fastigio y mediado a través de la vía de señalización del óxido nítrico / guanosina monofostato cíclico (NO/GMPc) podría constituir un sistema contraregulador potente de los efectos excitatorios de los núcleos cerebrales que participan en la regulación de la PA. Se sabe que el núcleo fastigio cumple un importante papel en la regulación del sistema nervioso autónomo, pues este núcleo proyecta a estructuras del tallo cerebral como el RVLM, el cual a su vez recibe inervación del NPV y núcleo supraóptico (NSO) hipotalámico (50).

Aunado a ello, las neuronas que producen NO se encuentran en centros autonómicos que incluyen el NPV, NSO, núcleo del tracto solitario (NTS) y la columna ventrolateral (VLM) e intermediolateral de la médula espinal (51). En el NPV, el NO inhibe la actividad simpática a través de la estimulación de interneuronas GABAérgicas (52,53). Por su parte, en el NTS y VLM, el NO tiene efectos tanto simpato-excitatorios como simpato-inhbitorios, sugiriendo que en el tallo cerebral, el NO regula el flujo simpático, a través de un balance de las salidas de estos centros autonómicos (51). Aún más, la AM icv estimula la producción de NO en el hipotálamo y activa neuronas productoras de NO en el NPV (45). La estimulación del flujo simpático mediante la administración icv de AM junto con la inhibición del flujo simpático por el NO en el NPV, sugiere que la estimulación inducida por la AM del sistema nitrérgico en el hipotálamo, puede ser parte de un mecanismo de retroalimentación, que actúa para restablecer el equilibrio homeostático (49). En apoyo a ello, se ha reportado que la administración icv de AM a bajas dosis causa inhibición de la actividad simpática renal (54). Adicionalmente, Fujita y col., (55) encontraron que la AM endógena en el cerebro puede inhibir la activación simpática a través de su acción antioxidante. Por su parte, Xu y Krukoff (56) indicaron que la AM en el RVLM ejerce un efecto inhibitorio sobre la actividad del baroreflejo a través de un mecanismo mediado por los receptores específicos de AM, donde la activación de la proteína quinasa A (PKA) está involucrada.

En conclusión, la evidencia indica que la AM cerebelar constituye un poderoso péptido hipotensor y atenuador del flujo simpático, y refuerza el concepto novedoso de la existencia de un sistema adrenomedulinérgico cerebelar de importancia fisiológica, sugiriendo su papel protector ante el estrés agudo, con potencial aplicación farmacológica a futuro. Se abren así

nuevas rutas para el estudio de vías neuroanatómicas y neuropeptidérgicas involucradas en la regulación de la PA y la respuesta cardiovascular frente al estrés agudo, aún no descritas en profundidad.

### AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Sr. Banny Carballo por su ayuda técnica en los experimentos. Este trabajo fue subvencionado por el CDCH-UCV y por el Ministerio Popular de Ciencia Tecnología e Industrias, Proyecto Misión Ciencia, Sub-proyecto 7, ECCV No. 2007001585 y el Proyecto PEII No. 20122000760..

### REFERENCIAS

1. **Chrousos GP, Gold PW.** The concepts of stress system disorders: overview of behavioral and physical homeostasis. *JAMA* 1992; 267:1244 – 1252.
2. **McEwen BS, Magarinos AM, Reagan LP.** Studies of hormone action in the hippocampal formation: possible relevance to depression and diabetes. *J Psychosom Res* 2002; 53(4): 883-890.
3. **McEwen BS.** Stressed or stressed out: What is the difference? *J Psychiatry Neurosci* 2005; 30(5): 315-318.
4. **Chrousos GP.** Regulation and dysregulation of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis: the corticotropin releasing hormone perspective. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1992; 21:833– 858.
5. **Tsigos C, Chrousos GP.** Physiology of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis in health y dysregulation in psychiatric and autoimmune disorders. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1994; 23:451–466.
6. **Johnson EO, Kamilaris TC, Chrousos GP, Gold PW.** Mechanisms of stress: A dynamic overview of hormonal and behavioral homeostasis. *Neurosci Biobehav Rev* 1992; 16 (2): 115-130.
7. **Habib KE, Gold PW, Chrousos GP.** Neuroendocrinology of stress. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2001; 30:695–728.
8. **Babenko O, Golubov A, Ilnytskyy Y, Kovalchuk I, Metz GA.** Genomic and epigenomic responses to chronic stress involve miRNA-mediated programming. *PLoS One* 2012; 7(1):e29441.
9. **Nayanatara AK, Nagaraja HS, Anupama BK.** The effect of repeated swimming stress on organ weights and lipid peroxidation in rats. *Ai J Physiol Sci* 2005; 18: 3-9.
10. **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.
11. **Sakata J, Shimokubo T, Kitamura K, Nishizono M, Ichiki Y, Kangawa K, Matsuo H, Eto T.** Distribution and characterization of immunoreactive rat adrenomedullin in tissue and plasma. *FEBS Lett* 1994; 352: 105-108.
12. **Kitamura K, 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.
13. **Hu W, Zhou P, Zhang X, Xu C, Wang W.** Plasma concentrations of adrenomedullin and natriuretic peptides in patients with essential hypertension. *Exp Ther Med* 2015; 9(5): 1901-1908.
14. **Khan S, Michaud D, Moody TW, Anisman H, Merali Z.** Effects of acute restraint stress on endogenous adrenomedullin levels. *Neuroreport* 1999; 10: 2829-2833.
15. **Parkes DG, May CN.** ACTH-suppressive and vasodilator actions of adrenomedullin in conscious sheep. *J Neuroendocrinol*

- 1995; 7: 923-929.
16. **Ziolkowska A1, Budzynska K, Trejter M, Tortorella C, Belloni AS, Malendowicz LK.** Effects of adrenomedullin and its fragment 22-52 on basal and ACTH-stimulated secretion of cultured rat adrenocortical cells. *Int J Mol Med* 2003; 11:613-615.
  17. **Albertin G, Malendowicz LK, Tortorell C, Mazzocchi G, Nussdorfer GG.** Evidence for a paracrine role of adrenomedullin in the physiological resetting of aldosterone secretion by rat adrenal zona glomerulosa. *Peptides* 2000; 21: 413-417.
  18. **Serrano J, Uttenthal 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.
  19. **Figueira L, Israel A.** Desregulación del sistema adrenomedulinérgico cerebeloso en la hipertensión arterial. *Rev Lat Hipert* 2013; 8: 9-15.
  20. **Figueira L, Israel A.** Efecto hipotensor de la adrenomedulina cerebelosa. *Rev Latinoamer Hipert* 2013; 8: 62-67.
  21. **Figueira F, Israel A.** Role of cerebellar adrenomedullin in blood pressure regulation. *Neuropeptides* 2015; 54: 59-66.
  22. **NIH Guide for the care and use of animals.** Institute of Laboratory Animal Resources. National Research Council. Washington DC, USA. National Academy Press. 1996.
  23. **Pellegrino L, Pellegrino A, Cushman A.** A Stereotaxic Atlas of the rat brain. New York and London. Plenum Press. Springer. 1979.
  24. **Sacchetti B, Baldi E, Lorenzini C, Burcherelli C.** Cerebellar role in fear – conditioning consolidation. *PNAS* 2002; 12: 8406-8411.
  25. **Juaneda C, Dumont Y, Chabot JG, Fournier A, Quirion R.** Adrenomedullin receptor binding sites in rat brain and peripheral tissues. *Eur J Pharmacol* 2003; 474:165-174.
  26. **Macchi V, Porzionato A, Belloni AS, Stecco C, Parenti A, De Caro R.** Immunohistochemical mapping of adrenomedullin in the human medulla oblongata. *Peptides* 2006; 27: 1397-1404.
  27. **Ueda T, Ugawa S, Saishin Y, Shimada S.** Expression of receptor – activity modifying protein (RAMP) mRNAs in the mouse brain. *Brain Res Mol Brain Res* 2001; 93: 36-45.
  28. **Stachniak TJ, Krukoff TL.** Receptor activity modifying protein 2 distribution in the rat central nervous system and regulation by changes in blood pressure. *J Neuroendocrinol* 2003; 15: 840-850.
  29. **Edvinsson L, Eftekhari S, Salvatore CA, 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. *Mol Cell Neurosci* 2011; 46: 333-339.
  30. **Juaneda C, Dumont Y, Chabot JG, Quirion R.** Autoradiographic distribution of adrenomedullin receptors in the rat brain. *Eur J Pharmacol* 2001; 421: R1-R2.
  31. **Dinh D, Frauman A, Johnston C, Fabiani M.** Angiotensin receptors: distribution, signalling and function. *Clin Sci* 2001; 100: 481-492.
  32. **Arce M, Sanchez S, Seltzer A, Ciuffo G.** Autoradiographic localization of angiotensin II receptors in developing rat cerebellum and brainstem. *Regul Pept* 2001; 99: 53-60.
  33. **Ito M.** Functional roles of neuropeptides in cerebellar circuits. *Neuroscience* 2009;

- 162: 666-672.
34. **McCarty R, Gold PW.** Catecholamine, stress, and disease: A Psychobiological perspective. *Psychosom Med* 1996; 58: 590-597.
  35. **Verago J, Grassi D, Spadari R.** Metabolic markers following beta – adrenoceptor agonist infusion in footshock – stressed rat. *Braz J Med Biol Res* 2001; 34: 1197-1207.
  36. **Penna L, Bassani R.** Increased spontaneous activity and reduced inotropic response to catecholamines in ventricular myocytes from footshock – stressed rats. *Stress* 2010; 13 (1): 73-82.
  37. **Kvetnansky R, Sun C, Lake C, Thoa N, Torda T, Kopin I.** Effect of handling and forced immobilization on rat plasma levels of epinephrine, norepinephrine, and dopamine-beta-hydroxylase. *Endocrinology* 1978; 103: 1868-1874.
  38. **Sabban E.** Catecholamines in stress: molecular mechanisms of gene expression. *Endocrine Reg* 2007; 41: 61-73.
  39. **Xu Y, 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.
  40. **Ji SM, He RR.** Microinjection of adrenomedullin into rostral ventrolateral medulla increases blood pressure, heart rate and renal sympathetic nerve activity in rats. *Sheng Li Xue Bao* 2002; 54: 460-466.
  41. **Takahashi H, Watanabe T, Nishimura M, Nakanishi T, Sakamoto M, Yoshimura Y, Masuda M, Murakani T.** Centrally induced vasopressor and sympathetic responses to a novel endogenous peptide, adrenomedullin, in anesthetized rats. *Am J Hypertens* 1994; 7: 478- 482.
  42. **Saita M, Shimokawa A, Kunitake T, Kato K, Hanamori T, Kitamura K, Eto T, Kannan H.** Central actions of adrenomedullin on cardiovascular parameters and sympathetic outflow in conscious rats. *Am J Physiol* 1998; 274: R979-R984.
  43. **Shan J, Krukoff TL.** Distribution of preproadrenomedullin mRNA in the rat central nervous system and its modulation by physiological stressors. *J Comp Neurol* 2001; 432: 88-100.
  44. **Samson W, Murphy T, Resch Z.** Central mechanisms for the hypertensive effects of preproadrenomedullin – derived peptides in conscious rats. *Am J Physiol* 1998; 274: R1505-R1509.
  45. **Taylor M, Samson W.** A possible mechanism for the action of adrenomedullin in brain to stimulate stress hormone secretion. *Endocrinology* 2004; 145: 4890-4896.
  46. **Matsumura K, Abe I, Tsuchihashi T, Fujishima M.** Central adrenomedullin augments the baroreceptor reflex in conscious rabbits. *Hypertension* 1999; 33: 992-997.
  47. **Xu Y, Krukoff TL.** Decrease in arterial pressure induced by adrenomedullin in the hypothalamic paraventricular nucleus is mediated by nitric oxide and GABA. *Reg Pept* 2004; 119:21-30.
  48. **Aston G, Shipley M, Chauvet G, Ennis M, Van Bockstaele E, Pieribone V.** Afferent regulation of locus coeruleus neurons: anatomy, physiology and pharmacology. *Prog Brain Res* 1991; 88: 47-75.
  49. **Shan J, Stachniak T, Jhamandas J, Krukoff T.** Autonomic and neuroendocrine actions of adrenomedullin in the brain: mechanisms for homeostasis. *Reg Pept* 2003; 112: 33-40.
  50. **Nisimaru N.** Cardiovascular modules in the cerebellum. *Jpn J Physiol* 2004; 54: 431-448.
  51. **Krukoff TL.** Central actions of nitric oxide in regulation of autonomic functions.

- Brain Res Rev 1999; 30: 52-65.
- 52. Bains J, Ferguson A.** Nitric oxide regulates NMDA- driven GABAergic inputs to type I neurons of the rat paraventricular nucleus. *J Physiol* 1997; 499: 733-746.
- 53. Zhang J, Patel K.** Effect of nitric oxide within the paraventricular nucleus on renal sympathetic nerve discharge: role of GABA. *Am J Physiol* 1998; 275: R728-R734.
- 54. Mitsuhiro S, Shimokawa A, Kunitake T, Kato K, Hanamori T, Kitamura K, Eto T, Kannan H.** Central actions of adrenomedullin on cardiovascular parameters and sympathetic outflow in conscious rats. *Am J Physiol (Regulatory Integrative Comp Physiol)* 1998; 274: R979-R984.
- 55. Fujita M, Kuwaki T, Ando K, Fujita T.** Sympatho – inhibitory action of endogenous adrenomedullin through inhibition of oxidative stress in the brain. *Hypertension* 2005; 45: 1165-1172.
- 56. Xu Y, Krukoff TL.** Adrenomedullin in the rostral ventrolateral medulla inhibits baroreflex control of heart rate: a role for protein kinase A. *Br J Pharmacol* 2006; 148: 70-77.