

Expresión de las catecolaminas en la médula adrenal del ratón hipertenso (BPH/2).

Emilia M Carmona-Calero^{1,2}, Agustín Castañeyra-Ruiz¹, Ibrahim González-Marrero², Héctor De Paz Carmona¹, Leandro Castañeyra-Ruiz¹, Juan Manuel González-Toledo², María Lidia Ruiz-Mayor², Manuela Castañeyra-Martin¹.

1. Departamento de Biotecnología, Instituto de Investigación y Ciencias de Puerto del Rosario. Puerto del Rosario, Fuerteventura. Isla Canarias. España

2. Departamento de Anatomía, Facultad de Medicina, Universidad de La Laguna, La Laguna, Tenerife. Islas Canarias. España.

Correspondencia: ecarmona@ull.es

Resumen

Expresión de las catecolaminas en la médula adrenal del ratón hipertenso (BPH/2).

El ratón endogámico hipertenso (BPH/2) tiene la presión arterial alta durante la vida temprana al compararlos con el ratón hipotenso (BPL/1) y al ratón normotenso control (BPN/3). El presente estudio se investiga la expresión de catecolaminas en la medula adrenal, mediante inmunohistoquímica, del ratón hipertenso BPH/2. Hemos encontrado material inmunoreactivo (MIR) para TH, DBH, PNMT y ChA en la medula adrenal del ratón hipertenso a todas las edades estudiadas. A los 30 días de edad el MIR para DBH y PNMT estaba igual o ligeramente disminuido a 30 días en el hipertenso con respecto al control. Pero al comparar el BPH con el control (BPN/3) a los 200 días de edad, la TH inmunoreactiva (ir) estaba ligeramente disminuidos en la medula adrenal del hipertenso pero estaban incrementadas la DBH-ir y la PNMT-ir. La ChA estaba similar en ambos grupos. Nuestros resultados son similares a los descritos por otros autores que han establecido que la ChA y la noradrenalina estaban disminuidos en los BPH con respecto a los controles, pero diferentes a los descritos para las ratas SHR. Concluimos que las diferentes expresiones de la ChA y las alteraciones encontradas en las catecolaminas, es una característica variable de la hipertensión de los mamíferos.

Palabras clave: Catecolaminas, medula adrenal, ratón hipertenso

Summary

Catecholamine manifestation in the adrenal medulla of hypertensive mice (BPH/2). The hypertensive inbred mouse strain, BPH/2, has high blood pressure early in life, compared with its hypotensive BPL/1 and normotensive BPN/3 controls. The present study analyses, by immunohistochemistry in the adrenal medulla, the expression of catecholamine biosynthesis enzymes and chromogranin A in hypertensive mice (BPH/2). We have found immunoreactive material for TH, DBH, PNMT and (ChA) at all studied ages in the adrenal medulla of hypertensive mice. To compare

the hypertensive with normotensive mice at 200 postnatal day of age, the TH immunoreactive material was lightly decreased in the BPH/2 adrenal medulla, but DBH and PNMT immunoreactive material were increased. The ChA was similar in the both groups. Our results are similar to the described by the others authors that stated chromogranin A and noradrenalin that were diminished in BPH mice with respect to de control but different than the results described in the hypertensive rats (SHR). We conclude that different expression of chromogranin A and the alteration of the catecholamine is a variable feature of mammalian hypertension.

Key words: Catecholamine, adrenal medulla, hypertensive mice

Introduction

La relación entre la hipertensión arterial las catecolaminas y la medula de la glándula suprarrenal ha sido estudiada ampliamente por diferentes autores y en diferentes modelos experimentales, así se en trabajos previos hemos descrito las variaciones de las catecolaminas en la medula adrenal de la rata en la hipertensión y su tratamiento con captopril, y en ratones mutantes de la proteína p73 [1,2,3,4].

La hipertensión arterial es de carácter multifuncional pero muestra una influencia genética significativa, con un componente hereditario muy importante, sin embargo, es muy difícil elucidar los componentes genéticos subyacentes. Pero con las nuevas tecnología, de "microarrays" de expresión génica, se ha hecho posible el estudio de un gran número de genes en paralelo, lo que es ideal para el estudio de las enfermedades poligénicas como la hipertensión. Así en dicho sentido de han empleado modelos genéticos de la hipertensión O'Connor Schlager Schlager Sharma [6,9,10]. Como es la del ratón con hipertensión genética y /o hereditaria (HBP/2) [3,8,9,10], desarrollado en un programa para obtener una cepa de ratones hipertensos innatos homocigóticos; la cepa HBP/2 paralela a la hipertensión humana [3,7]. Estos ratones cursan, además de con la presión arterial con mayor frecuencia cardiaca. Varios autores han descrito que

el ratón endogámico hipertenso (BPH/2) tiene la presión arterial alta durante la vida temprana al compararlos con el ratón hipotenso (BPL/1) y con ratón normotenso control (BPN/3) [3]. A las 21 semanas de edad el ratón hipertenso tiene una presión sistólica 60mm Hg mayor que la del ratón hipotenso. La diferencia en la presión sanguínea entre los ratones hipertensos e hipotensos está asociada a las diferencias de la frecuencia cardiaca, peso cardiaco relativo, masa ventricular izquierda, peso renal, hematocrito y alteraciones de las catecolaminas. Los productos de secreción de la glándula suprarrenal, tanto medular como cortical, son candidatos lógicos para el estudio de la hipertensión ya que influyen directamente en la función endocrina, cardiovascular y simpática [6,7]. La adrenalina y la noradrenalina actúan a través del G-receptores acoplados a proteínas adrenérgicos afectar a funciones simpáticas, como la fuerza de contracción del corazón y la constricción de los vasos sanguíneos [5,6,7,10]. A la vista de lo descrito anteriormente, el propósito del presente estudio es analizar las catecolaminas en la medula adrenal de ratón hipertenso

Material y métodos

Hemos usado un total de 30 ratones macho de divididos en dos grupos: 15 ratones espontáneamente hipertensos (BPH/2) y 15 ratones normotensos (BPN/3) sacrificados a 30 y 200 días de edad. Los ratones se fijaron mediante la perfusión intracardiaca con bouin, luego se les extrajeron las suprarrenales que se postfijaron en bouin durante 24 horas. Por último se deshidrataron y se incluyeron en parafina. Las suprarrenales se cortaron en cuatro series coronales (A.B.C.D) paralelas de 10µm de espesor. La serie A se coloreó con la tinción de hematoxilina-eosina. Las series restantes se procesaron inmunohistoquímicamente usando anticuerpos primarios contra tirosina-hidroxilasa (TH), dopamina-beta-hidroxilasa (DBH), feniletanolamina-N-metiltransferasa (PNMT) y cromogranina A (ChA). Las secciones se incubaron con los anticuerpos primarios (anti-TH a 1:8000, anti-DBH a 1:1000 anti-PNMT a 1:1000 y anti-ChA a 1:2000) toda la noche, a temperatura ambiente en una cámara húmeda. Posteriormente se hicieron lavados en TBS y se incubaron con el anticuerpo secundario biotinilado (Goat anti-rabbit/mouse, DAKO) a una dilución de 1:100 durante 30 min., se lavaron con TBS y se incubaron en una solución a 1:100 de Streptavidina/Peroxidasa biotinilada (Kit ABC DAKO) 30 min. Tras varios lavado se procedió al revelado con una solución de TBS con 0,05 % de 3-3' diaminobenzidina (DAB, Sigma) a pH= 7.5. Por último, para medir la expresión de ambos anticuerpos se realizó la densitometría (programa IM 1000 de LEICA).

Resultados

Hemos encontrado material inmunoreactivo (MIR) para TH, DBH, PNMT y ChA a los 30 y 200 días de edad en la medula adrenal del ratón hipertenso y normotenso. A los 30 días de edad el MIR para TH, DBH y ChA estaba claramente disminuido en los hipertensos con respecto al control (Fig.1, Fig. 3), pero la TH y PNMT no presentaba diferencias significativas, aunque la intensidad de la reacción inmunoreactiva fue ligeramente inferior en los hipertensos con respecto a los controles (Fig.3). A los 200 días de edad (Fig.2) la TH, PNMT y ChA estaban disminuidas significativamente en la medula adrenal del hipertenso con respecto al control (Fig.2 , Fig.3) pero la DBH-ir no presentaba cambios significativos estando ligeramente incrementada en el grupo hipertenso. Al comparar los grupos controles de 30 con los 200 días de edad, hemos observado que la DBH y la ChA disminuyen en cambio la TH aumenta espectacularmente (Fig.3). Por otro lado hemos observado que la PNMT y ChA presenta sus valores más bajos, con respecto a rectos de grupos y edades, a los 200 días de edad en el grupo de ratones hipertensos (Fig.3)

Discusión

Las catecolaminas endógenas noradrenalina y adrenalina median en la regulación simpática de la presión arterial [1]. Estos efectores del sistema nervioso ortosimpático se sintetizan en las neuronas simpáticas y en las células cromafines de la médula adrenal mediante una serie de reacciones que comienzan con la conversión de la tirosina en la 3,4-dihidroxifenilalanina mediante la participación de la tirosina-hidroxilasa [1,2,3,4]. La noradrenalina es el principal neurotransmisor de las neuronas simpáticas, mientras que la adrenalina es segregada por las células cromafines de la médula suprarrenal a la circulación [1,3]. Considerando que las acciones de la noradrenalina están restringidos a los sitios de liberación de los nervios simpáticos y que la actuación de adrenalina es crucial como neurohormona para activar las respuestas cardiovasculares y metabólicas a través del torrente sanguíneo [3]. Son muy importantes los resultados que hemos entrado en el presente trabajo donde hemos observado que la enzima que cataliza el paso de de noradrenalina a adrenalina (PNMT) estaba claramente disminuida en los ratones hipertensos.

Por otro lado, se ha descrito [3] que los genes que codifican síntesis de las enzimas de biosíntesis de catecolaminas se sobreexpresa en HBP / 2, mientras que los genes que codifican para las enzimas de degradación de catecolaminas se sub expresan. Concretamente podemos destacar la tirosina hidroxilasa y feniletanolamina N-metiltransferasa se sobreexpresa 1,95 veces y 1,78 veces, respectivamente, en en el BPH. En el presente trabajo, nuestros resultados son distintos a

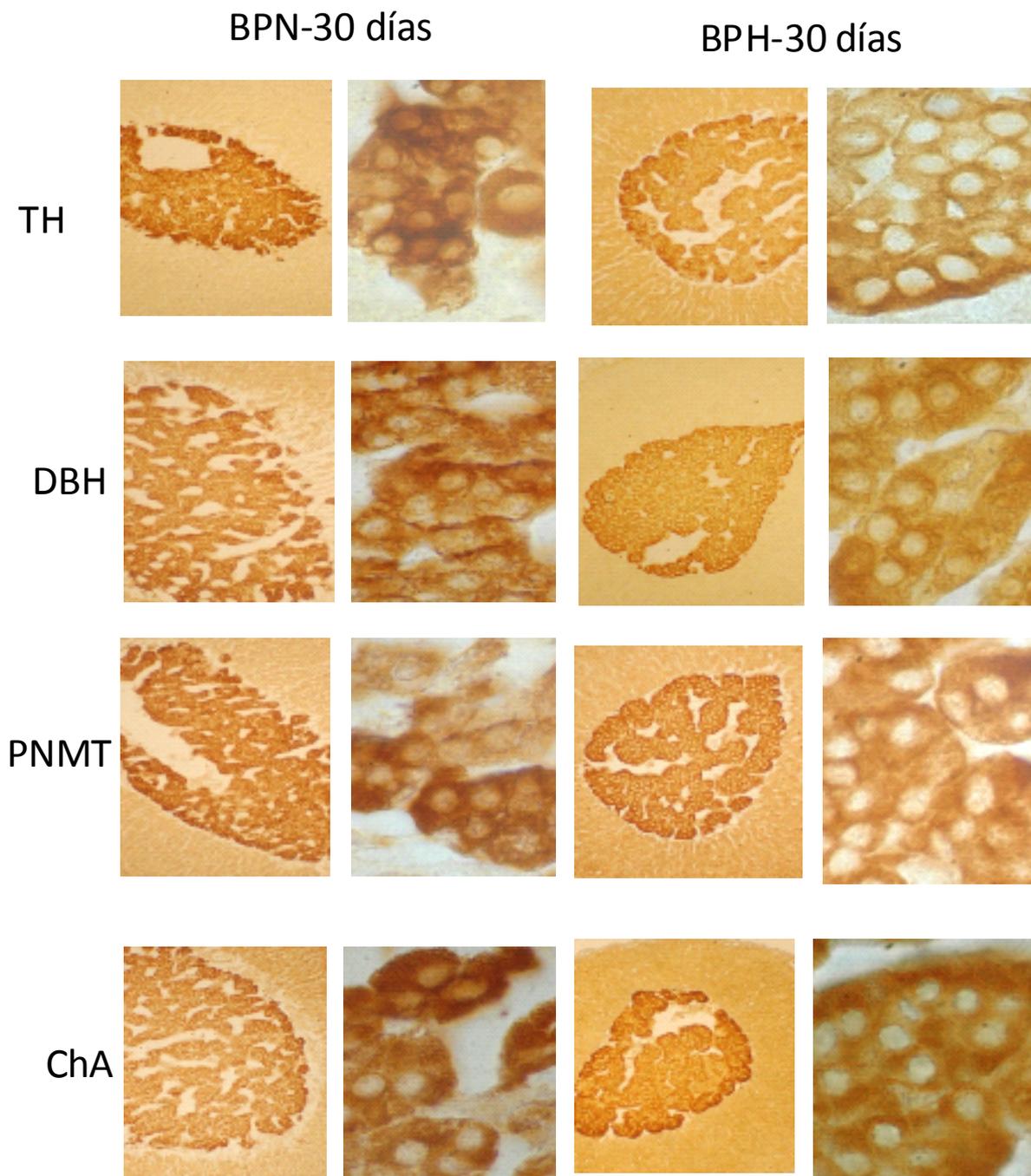


Figura 1.

lo descrito por dichos autores pero están en concordancia con los descritos por otros autores, que han establecido que la ChA y la noradrenalina estaban disminuidos en los BPH a las 5 semanas de edad (40 días). Por otro lado, en la glándula adrenal de ratas espontáneamente hipertensas adultas, (SHR) la cromogranina A y la TH estaban incrementadas, mientras que la actividad DBH y la PNMT estaba disminuida [2]. Estos resultados están parcialmente de acuerdo con otros trabajos sobre la expresión del ARNm de la ChA donde estaba elevado en la medula adrenal de la SHR.

Contrariamente, en el modelo de roedor hipertenso del presente trabajo BPH/2, las catecolaminas adrenales estaban igual o disminuidas a los 30 días y a los 200 días de edad comparadas con los controles BPN/3 de las mismas edades. Concluimos que las diferentes expresiones de la ChA y las alteraciones encontradas en las enzimas que catalizan la formación de las catecolaminas a las diferentes edades y en los diferentes modelos, es una característica variable de la hipertensión genética de los mamíferos.

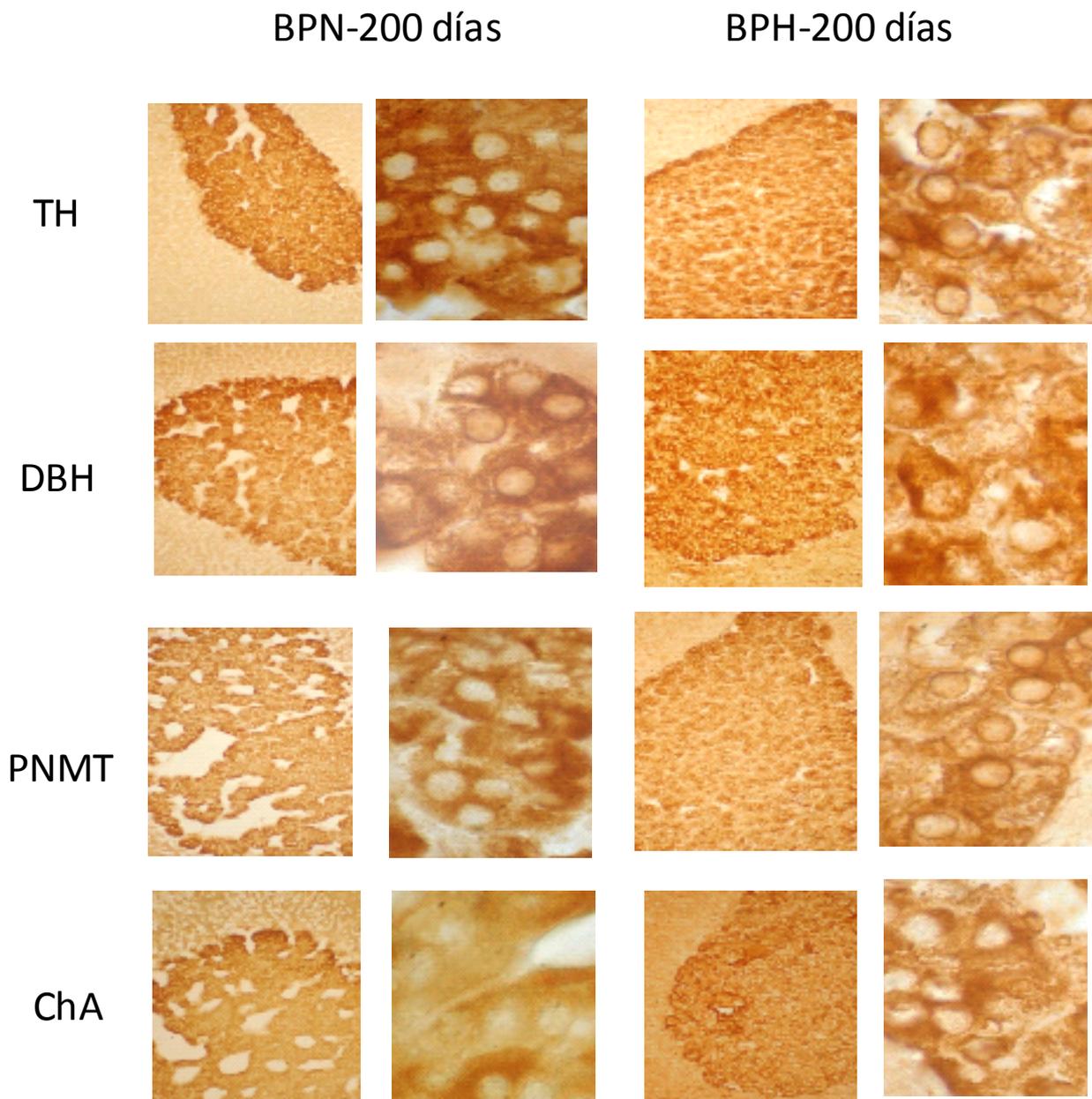


Figura 2.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido subvencionado por la Fundación Canaria Instituto de Investigación y Ciencias. Proyecto, referencia: INIPRO. N° 01/09

Bibliografía

1. Caramona MM, Soares-da-Silva P. The effects of chemical sympathectomy on dopamine, noradrenaline and adrenaline content in some peripheral tissues. *Br J Pharmacol*.1985; 86:351-356
2. Carmona-Calero E M , González-Toledo J M, González-Marrero I. Disfunción de las catecolaminas en la medula adrenal de la rata durante la hipertensión y su tratamiento con captopril. *Majorensis* 2007; 3: 13-17.
3. Fries RS, Mahboubi P, Mahapatra NR, Mahata SK, Schork NJ, Schmid-Schoenbein GW, O'Connor DT Neuroendocrine transcriptome in genetic hypertension: multiple changes in diverse adrenal physiological systems. *Hypertension*. 2004; 43:1301-1
4. González-Marrero I, Castañeyra-Ruiz A, Fernández-Rodríguez P, de Paz-Carmona H, Castañeyra-Ruiz L, González-Toledo JM, Castañeyra-Martín M, Carmona-Calero E. Catecholamine containing alterations in the adrenal medulla of the p73 mutant mice. *Majorensis* 2008; 4: 1-4.
5. McGuire JJ, Van Vliet BN, Giménez J, King JC, Halfyard SJ. Persistence of PAR-2

- vasodilation despite endothelial dysfunction in BPH/2 hypertensive mice. *Pflugers Arch.* 2007; 454:535-543.
6. O'Connor DT, Insel PA, Ziegler MG, Hook VY, Smith DW, Hamilton BA, et al. Heredity and the autonomic nervous system in human hypertension. *Curr Hypertens Rep.* 2000; 2: 16-22.
 7. O'Connor DT, Takiyyuddin MA, Printz MP, Dinh TQ, Barbosa JA, Rozansky DJ, Mahata SK, Wu H, Kennedy BP, Ziegler MG, Wright FA, Schlager G, Parmer RJ. Catecholamine storage vesicle protein expression in genetic hypertension. *Blood Press.* 1999; 8: 285-295.
 8. Schlager G, Sides J. Characterization of hypertensive and hypotensive inbred strains of mice. *Lab Anim Sci.* 1997; 47: 288-292.
 9. Schlager G. Selection for blood pressure levels in mice. *Genetics.* 1974; 76: 537-549.
 10. Sharma P, Fatibene J, Ferraro F, Jia H, Monteith S, Brown C, et al. A genome-wide search for susceptibility loci to human essential hypertension. *Hypertension.* 2000

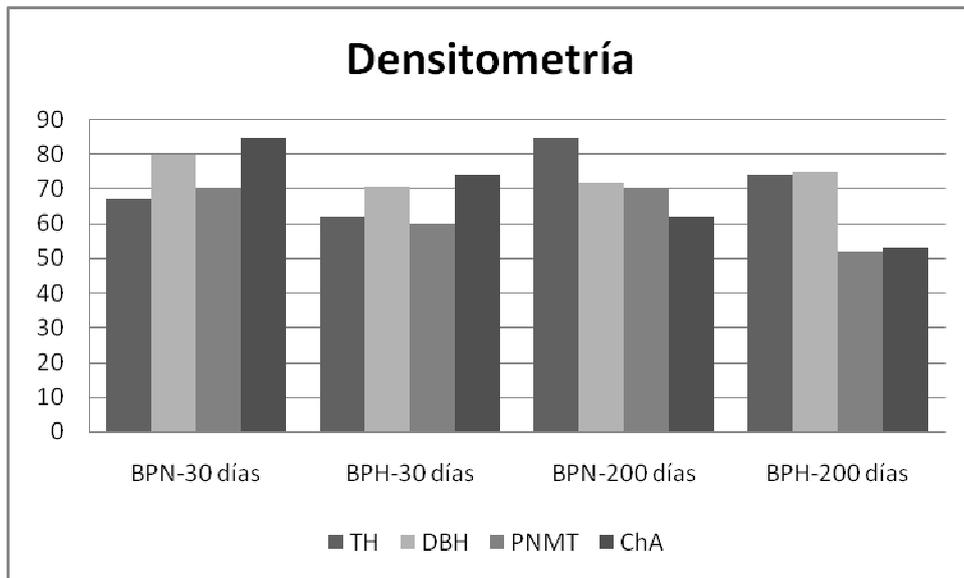


Figura 3