

Influencia de la hipertensión sobre el contenido de catecolaminas del complejo vagal dorsal de la rata

Emilia M Carmona-Calero 1,2, Leandro Castañeyra-Ruiz 2, Héctor de Paz-Carmona 2, Agustín Castañeyra-Ruiz 2, Juan M González-Toledo, Ibrahim González-Marrero 1,2.

1 Departamento de Anatomía, Facultad de Medicina, Universidad de La Laguna, La Laguna, Tenerife, Islas Canarias 2 Departamento de Biotecnología, Instituto de Investigación y Ciencias de Puerto del Rosario, Fuerteventura, Islas Canarias

Correspondence: ecarmona@ull.es

Resumen

Influencia de la hipertensión sobre el contenido de catecolaminas del complejo vagal dorsal de la rata

El complejo vagal dorsal (CVD) está formado por el núcleo del tracto solitario (NTS), el núcleo motor dorsal del vago (NMDV) y el área postrema (AP). Las funciones del DVC se han relacionado con la regulación cardiovascular y se ha considerado un centro de relevo para integrar las señales centrales y periféricas relacionadas con la regulación cardiovascular. El NTS es el lugar primario de las terminales de las fibras aferentes cardiovasculares y que están inervadas por neuronas catecolaminérgicas. El presente trabajo busca mas evidencias de la implicación de las neuronas catecolaminérgicas del CVD en el desarrollo de la hipertensión arterial. Se han usado ratas control WKY e hipertensas SHR. Para el análisis inmunohistoquímico y de western blot y se emplearon anticuerpos contra las enzimas de las biosíntesis de catecolamina; tirosina-hidroxilasa (TH) y dopamina- β -hidroxilasa (DBH). El material inmunoreactivo TH y DBH fue localizado en toda la extensión rostrocaudal y dorsoventral del área postrema, así como in neuronas del NTS. La distribución y el numero de neuronas TH fueron similar a las DBH, excepto en el NMDV. En le AP el numero de neuronas inmunohistoquímicamente marcadas para la TH fue superior que las marcadas con DBH. La hipertensión produjo un incremento del material inmunoreactivo para los dos anticuerpos TH y DBH en los tres núcleos que forman de CVD. Por lo tanto, podemos concluir que en la rata SHR se produce una activación del sistema catecolaminérgico central expresado por un aumento de las catecolaminas en el complejo vagal dorsal.

Palabras Clave. Complejo vagal dorsal, ratas hipertensas, catecolaminas.

Abstract

Influence of the hypertension on the catecholamines contain of the rat dorsal vagal complex

The dorsal vagal complex (CVD) is formed by the nucleus tractus solitarii, (NTS), the dorsal motor nucleus of the vagus nerve (NMDV) and the area

postrema (AP).The CVD functions has been connected with the cardiovascular regulations and is considered a relay centre for integrating central and peripheral signals related to cardiovascular regulation. The NTS is the primary site for cardiovascular afferent fibres termination and which are innervated by catecholaminergic neurons. The present work quest more evidences on the implication of the CVD catecholaminergic neurons in the development of and arterial hypertension. Control WKY and hypertensive SHR rats were used. Antibodies to the catecholamine synthetic enzymes tyrosine-hydroxylase (TH) and dopamine-beta-hydroxylase (DBH) were used in the immunohistochemical and western blot analysis. The TH and DBH material immunoreactive were located throughout the rostrocaudal and dorsoventral extent of the area postrema, as well as in neurons within the NTS. The distribution and the number of TH neurons were the similar as those DBH, except in the dorsal motor nucleus of the vagus. In the area postrema the number of neurons immunocytochemical labelled for TH was higher than those labelled for DBH. The hypertension produced an increase of the IRM for both of two antibodies TH and DBH in the three nuclei that form the CVD. Thereafter, we could conclude that in the SHR rat is produced an activation of the catecholaminergic central system expressed by an increase of the catecholamines in the dorsal vagal complex.

Key words. Dorsal vagal complex, Hypertensive rats, catecholamine

Introduction

El complejo vagal dorsal (CVD) engloba, el núcleo del tracto solitario (NTS), el núcleo motor dorsal del vago (NMDV) y el área postrema (AP). El CVD es el mayor centro víscero-sensorial del tronco de encéfalo y el principal centro integrador del sistema nervioso autónomo de los mamíferos. Sus componentes difieren sustancialmente tanto en la morfología como en su función [7,10].

Área Postrema

El AP se localiza en la parte caudal del 4º ventrículo, al carecer de barrera hematoencefálica da lugar a que

sus elementos neurales tengan acceso a factores circulantes y además a que el LCR pueda alcanzar fácilmente su interior [9]. El AP posee conexiones con los componentes del CVD, el núcleo parabraquial, los núcleos catecolaminérgicos del sistema tegmental lateral y dorsal y con el hipotálamo, lo que coloca al AP dentro de una red de estructuras cerebrales que intervienen en funciones viscerales (regulación cardiovascular, la homeostasis de fluidos, la ingesta de alimentos y el peso corporal). Además el AP contiene altas densidades de diferentes grupos de receptores peptidérgicos [17].

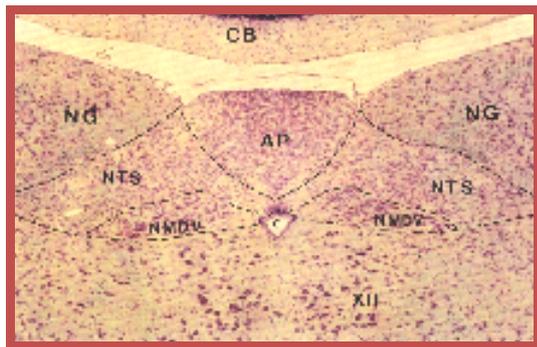


Fig. 1 Corte transversal del Complejo vagal dorsal coloreado con Klüver-Barrera.

NG= núcleo gracilis XII= n. hipogloso
 AP= área postrema CB= cerebelo
 NTS= núcleo del tracto solitario
 NMDV= núcleo motor dorsal del vago

Núcleo del tracto solitario (NTS)

Es un núcleo localizado en la parte dorsomedial del tronco de encéfalo, puede ser dividido en tres niveles rostrocaudales: rostral, intermedio y caudal, y en el se distinguen 4 subdivisiones (medial, rostral-central, rostral-lateral y ventral) [16]. Tiene un papel crucial en el control cardiovascular central, por la integración de la información cardiovascular de los receptores periféricos y de otros centros cardiovasculares particularmente su porción medial, es esencial para la integridad de los reflejos baroreceptores [5].

Núcleo motor dorsal del vago (NMDV)

Este núcleo se encuentra localizado en la parte dorsomedial del romboencéfalo caudal. Se considera la mayor fuente de neuronas preganglionares parasimpáticas. En este núcleo de naturaleza colinérgica, han sido encontrados numerosos neurotransmisores y neuronas que contienen dopamina en la parte caudal del núcleo y neuronas adrenérgicas en su parte rostral. El NMDV recibe proyecciones de varias regiones del diencefalo y del tronco de encéfalo (NTS y área postrema, núcleo parabraquial) [18].

La hiperactividad del sistema renina-angiotensina (RAS) juega un papel crítico en mediatizar la el aumento de la presión sanguínea en los modelos de hipertensión animal y humana, incluyendo la rata

espontáneamente hipertensa (SHR). Los mecanismos específicos por los cuales esta incrementa la actividad del RAS en la hipertensión no se entienden muy bien pero incluyen un incremento del tono vasomotor simpático y un deterioro de la función arterial baroreflexa [19]. En presente trabajo se pretende aportar nuevas evidencias del papel que juega el DVC analizando la variaciones de su contenido en catecolaminas ante la hipertensión arterial.

TH

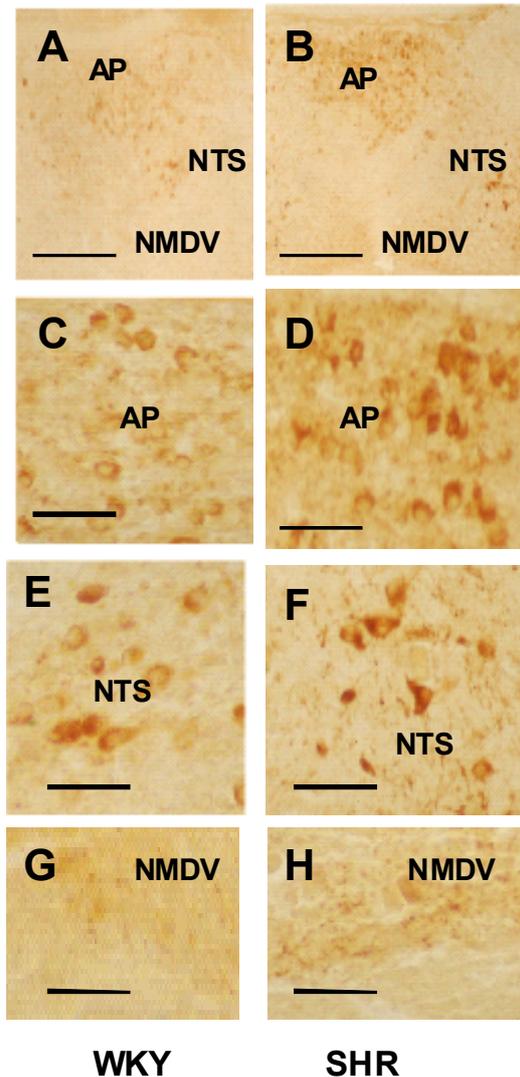


Fig. 2. Corte transversal del CVD marcado con tirosina-hidroxilasa (TH).

Barra: A,B 250µm; C,D,E,F 80µm; G,H 60µm

Material y métodos

Para este estudio se utilizaron, 20 ratas desarrollados en condiciones habituales de laboratorio. Los animales fueron divididos en dos grupos de 10 ratas cada uno: ratas control Wistar-Kyoto (WKY) y ratas espontáneamente hipertensas (SHR). Los animales fueron sacrificados a las 20 semanas mediante hidrato de cloral, cuatro animales de cada grupo se perfundieron por vía intracardiaca

con solución salina y se fijaron con Bouin. Posteriormente, los cerebros se sumergieron en el mismo líquido fijador durante 24 horas, se deshidrataron y se incluyeron en parafina, y por último se realizaron secciones coronales seriadas de 10 µm que se recogieron en cuatro series paralelas alternas A, B, C y D. La serie A se coloreó con el método de Klüver-Barrera y las B, C y D se procesaron a inmunohistoquímica.

Inmunohistoquímica

DBH

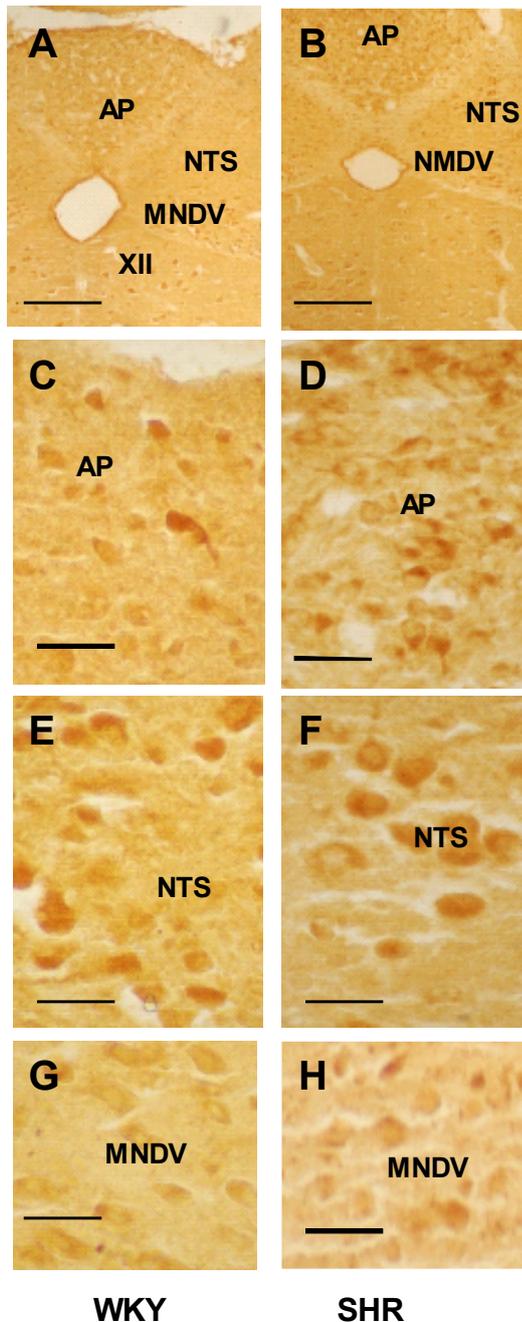


Fig. 3 Corte transversal del CVD marcado con dopamina-β-hidroxilasa (DBH). Barra: A,B 250µm; C,D,E,F 80µm; G,H 50µm

Los cortes fueron incubados con los anticuerpos primarios (anti-TH a 1:8000 y anti-DBH a 1:1000) 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 den 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 Fig.5.

Western blot

Extractos del CVD de seis cerebros de cada grupo se procesaron utilizando el método electroforético de SDS-PAGE 10% (Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) Laemmli [10]. Las bandas proteicas fueron transferidas a membranas de PVDF, bloqueamos la membrana para eliminar inespecificidades, se incubamos con el anticuerpo primario, anti-TH (1:25000) y anti-DBH (1:1000) toda la noche en agitación. Después de hacer lavados en TBST, se incuba con el anticuerpo secundario anti-mouse/anti-rabbit en solución de bloqueo durante 30 min., se hacen lavados y se revela por quimioluminiscencia (ECL plus AMERSHAM).

Resultados

Tirosina-hidroxilasa.

Área Postrema.- Se observan neuronas TH-inmunoreactiva (ir) en las partes dorsal, medial y ventral del AP. En los animales hipertensos TH-ir fue similar pero la reacción fue más intensa que los controles (Fig. 2 A,B,C,D; Fig.5).

Núcleo del Tracto Solitario (NTS).- En le NTS se detectaron células y fibras TH-ir en los subnúcleos medial, ventral, intermedio y comisural en las ratas controles En los animales hipertensos las células y fibras TH-ir estaban intensamente marcadas (Fig.2 A,B, E,F; Fig.5)

Núcleo Motor Dorsal del Vago (DMNV).- Se observan fibras TH-ir y neuronas ligeramente marcadas. En los animales SHR la reacción fue más intensa que en el control (Fig. 2 A,B, G,H; Fig.5).

Dopamina β-hidroxilaza (DBH)

Área postrema.- En ambos grupos se observan grupos de neuronas y fibras DBH-ir en las tres zonas del AP. Los animales SHR mostraron un cualitativo incremento del material inmunoreactivo (Fig 3, A,B,C,D; Fig.5).

Núcleo del tracto solitario.- Las ratas controles presentan una distribución de células y fibras DBH-ir, esparcidas en todo el núcleo, con una mayor intensidad de reacción a nivel de los subúcleos medial y lateral. En los animales SHR se observa

que el número de neuronas y fibras DBH-ir es mayor que en los controles (Fig. 3 A,B, E,F; Fig. 5).

Núcleo motor dorsal del vago.- En el grupo control se observan células DBH-ir bastante abundantes. En los animales espontáneamente hipertensos fue más intensa la expresión de la DBH-ir que en los controles (Fig 3 A,B,G,H; Fig.5). Western blot

En extractos del CVD completo se observa incremento de en la intensidad de las bandas tanto para la TH como para la DBH en los ratas SHR (Fig. 4).

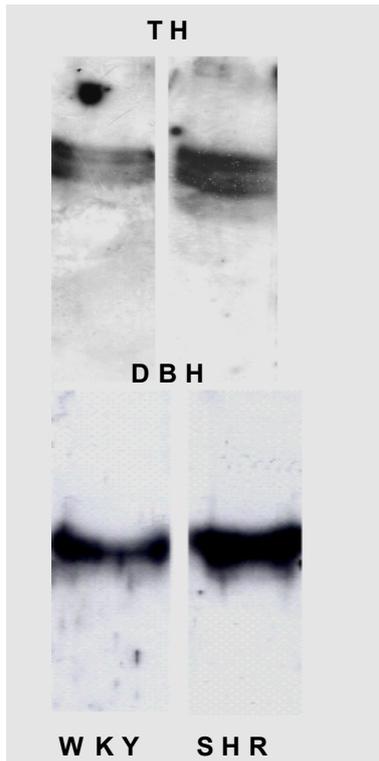


Fig.4

Discusión

El papel que juega en complejo vagal dorsal en la regulación cardiovascular y la presión arterial ha sido descrito por diferentes autores, así tenemos, que el control parasimpático del corazón esta llevado a cabo por el nervio vago. Las neuronas preganglionares parasimpaticas, cuyas fibras forman parte del nervio vago, se encuentran en el nucleo motor dorsal del vago, mientras que los impulsos baroreceptores aferentes terminan en NTS [1,8,13]. El núcleo motor dorsal del vago, el núcleo del tracto solitario y el área postrema son el blanco de las eferencias hipotalámicas y del órgano subfornical que contienen neurotransmisores y neuropeptidos, el CVD es también el lugar acción para las sustancias disueltas en sangre. Esto es debido a que el AP y el NTS tienen capilares fenestrados y un alargamientos espacios perivasculares que permiten la entrada de grandes proteínas sericas [2,6]. Además hay conexiones neuronales entre los diferentes componentes de DVC [17].

Nosotros hemos encontrado TH inmunoreactiva (ir) en neuronas localizadas principalmente en las zonas dorsales del AP y en algunas neuronas que rodean al tracto solitario (TS) (neuronas noradrenérgicas A2). La TH-ir incrementa y cambia su distribución con la hipertensión tanto en el AP como en el NTS. La TH-ir se expresa menos intensamente en el DMNV, pero incrementa su expresión con la hipertensión. En este sentido se ha descrito que existe una relación significativa entre la presión sistólica y la expresión génica TH en el tallo cerebral en ratas WKY y SHR. La elevada expresión génica de TH, está asociada con el fenotipo característico de SHR [14,15]. Por otro lado, la liberación aumentada de catecolaminas en SHR comparadas con las WKY está implicada en la patogénesis de la hipertensión esencial [12].

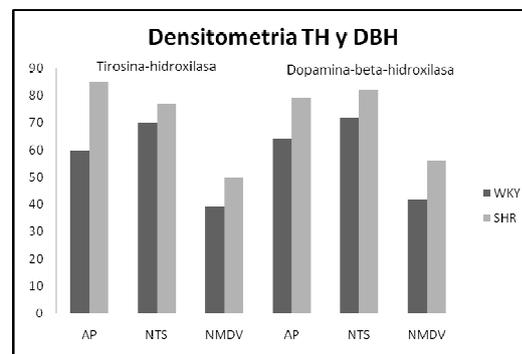


Fig. 5

En cuanto a la DBH, hemos observado que se encuentra claramente distribuida por toda el AP ciertas partes del NTS y en NMDV, aunque se expresa con menos intensidad en este último. En todo el CVD se produce un incremento de la DBH-ir en las ratas hipertensas con respecto al control, incremento que es más significativo en el AP y el NMDV. Estos resultados descritos anteriormente sobre las respuesta del contenido de catecolaminas ante la hipertensión podría o debería explicar la participación central en control cardiovascular mediante la influencia tónica de las neuronas barosensitivas en el núcleo de tracto solitario (A2 región NA). Por otro lado, en otros tejidos periféricos, como el adiposo o el muscular (esquelético), los niveles de la noradrenalina intersticial era mayor en los animales hipertensos con respecto al control [3]. Además, se describe que las neuronas noradrenérgicas del NTS caudal inervan el SFO, estas neuronas pueden estar implicadas en el transmisión de la información cardiovascular aferente directamente a este órgano circunventricular implicado en la presión arterial y el homeostasis [4].

Podemos concluir que este tipo de hipertensión produce una activación del sistema catecolaminérgico central expresado en un aumento de la expresión de las enzimas que catalizan la

biosíntesis de las catecalaminas en todos los centros que forman complejo vagal dorsal.

Agradecimientos

Este trabajo esta subvencionado por la Fundación Canaria Instituto de Investigación y Ciencias de Puerto del Rosario (INIPRO) proyecto nº 01/08

Bibliografía

1. Agarwal SK, Calaresu FR. Electrical stimulation of nucleus tractus solitarius excites vagal preganglionic cardiomotor neurons of the nucleus ambiguus in rats. *Brain Res.* 1992; 574(1-2):320-4.
2. Broadwell RD, Sofroniew MV. Serum proteins bypass the blood-brain fluid barriers for extracellular entry to the central nervous system. *Exp Neurol.* 1993;120(2):245-63.
3. Cabassi A, Vinci S, Cantoni AM, Quartieri F, Moschini L, Cavazzini S, Cavatorta A, Borghetti A. Sympathetic activation in adipose tissue and skeletal muscle of hypertensive rats. *Hypertension.* 2002; 39:656-61
4. Ciriello J, Rosas-Arellano MP, Solano-Flores LP. Direct projections to subfornical organ from catecholaminergic neurons in the caudal nucleus of the solitary tract. *Brain Res.* 1996; 726(1-2):227-32.
5. Fior-Chadi DR, Fuxe K. Quantitative receptor radioautography in the study of receptor-receptor interactions in the nucleus tractus solitarius. *Braz J Med Biol Res.* 1998; 31(2):225-30.
6. Gross PM, Wall KM, Pang JJ, Shaver SW, Wainman DS. Microvascular specializations promoting rapid interstitial solute dispersion in nucleus tractus solitarius. *Am J Physiol.* 1990 Dec;259(6 Pt 2):R1131-8.
7. Hayakawa T, Takanaga A, Tanaka K, Maeda S, Seki M. Distribution and ultrastructure of dopaminergic neurons in the dorsal motor nucleus of the vagus projecting to the stomach of the rat. *Brain Res.* 2004;1006(1):66-73.
8. Kalia M, Mesulam MM. Brain stem projections of sensory and motor components of the vagus complex in the cat: II. Laryngeal, tracheobronchial, pulmonary, cardiac, and gastrointestinal branches. *J Comp Neurol.* 1980; 193(2):467-508.
9. Krisch B, Leonhardt H, Buchheim W. The functional and structural border between the CSF- and blood-milieu in the circumventricular organs (organum vasculosum laminae terminalis, subfornical organ, area postrema) of the rat. *Cell Tissue Res.* 1978; 195(3):485-97.
10. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227(5259) : 680-685.
11. Leslie RA. Comparative aspects of the area postrema: fine-structural considerations help to determine its function. *Cell Mol Neurobiol.* 1986; 6(2):95-120.
12. Lim DY, Jang SJ, Park DG. Comparison of catecholamine release in the isolated adrenal glands of SHR and WKY rats. *Auton Autacoid Pharmacol.* 2002; 22(4):225-32.
13. Lynn RB, Kreider MS, Miselis RR. Thyrotropin-releasing hormone-immunoreactive projections to the dorsal motor nucleus and the nucleus of the solitary tract of the rat. *J Comp Neurol.* 1991; 311(2):271-88.
14. Reja V, Goodchild AK, Phillips JK, Pilowsky PM. Tyrosine hydroxylase gene expression in ventrolateral medulla oblongata of WKY and SHR: a quantitative real-time polymerase chain reaction study. *Auton Neurosci.* 2002 Jun 28;98(1-2):79-84.
15. Reja V, Goodchild AK, Pilowsky PM. Catecholamine-related gene expression correlates with blood pressures in SHR. *Hypertension.* 2002; 40(3):342-7.
16. Streefland C, Jansen K. Intramedullary projections of the rostral nucleus of the solitary tract in the rat: gustatory influences on autonomic output. *Chem Senses.* 1999 Dec;24(6):655-64.
17. Shapiro RE, Miselis RR. The central neural connections of the area postrema of the rat. *Comp Neurol.* 1985; 234(3):344-64.
18. Swanson LW, Kuypers HG. The paraventricular nucleus of the hypothalamus: cytoarchitectonic subdivisions and organization of projections to the pituitary, dorsal vagal complex, and spinal cord as demonstrated by retrograde fluorescence double-labeling methods. *J Comp Neurol.* 1980; 194(3):555-70
19. Veerasingham SJ, Raizada MK. Brain renin-angiotensin system dysfunction in hypertension: recent advances and perspectives. *Br J Pharmacol.* 2003; 139(2):191-202.