Majorensis 2007; **3**: 18-22. www.majorensis.es

Majorensis
ISSN 1697-5529

Efectos de la administración de nicotina sobre la eminencia media y el núcleo arcuato. Estudio con tirosina hidroxilasa y angiotensina II

Emilia M Carmona-Calero 1,2, Agustín Castañeyra-Ruiz 2, Ibrahim González-Marrero 1, Héctor de Paz-Carmona 2, Juan Manuel González -Toledo 1, Isabel Hernández-Garde 2, Agustín Castañeyra Perdomo 1,2.
1. Departamento de Anatomía, Fac. Medicina, Universidad de La Laguna, La Laguna, Tenerife, Canarias, España. 2. Departamento de Biotecnología, Instituto de Investigación y Ciencias de Puerto del Rosario. Fuerteventura, Canarias, España.
Correspondencia: ecarmona@ull.es

Resumen

Efectos de la nicotina sobre la eminencia media y el núcleo arcuato. Estudio con tirosina hidroxilasa y angiotensina II.

La nicotina es uno de los principales factores responsables de las afecciones agudas del sistema cardiovasculares. Por otro lado tanto la eminencia media (EM) como el núcleo arcuato (NA) pertenecen al sistema tuberoinfundibular donde se observan neuronas y fibras catecolaminérgicas y vasopresinergicas. El propósito del presente trabajo es analizar los efectos de la administración de nicotina en EM y el NA. Se han empleado ratones hembra divididos en cuatro grupos de animales; grupos controles de 50 y 85 días de edad y grupos experimentales que se trataron con nicotina durante 30 días y 60 días y se sacrificaron a las mismas edades que los controles. Para la inmunohistoquimia se usaron la anti-tirosina-hidroxilasa (TH) y anti-angiotensina II (AgII) como anticuerpos primarios. Los resultados mostraron que el tratamiento con nicotina produce una disminución de la TH-ir en la EM y en el NA. La AgII-ir al contrario se encuentra incrementada en los grupos tratados con nicotina en la EM y no presenta cambios en el NA. La nicotina produce disminución de la TH y un incremento de la AgII, de forma similar a lo descrito en ratas hipertensas, lo que podría estar relacionado con los efectos de la nicotina en la liberación de neurotransmisores.

Palabras clave

Nicotina, núcleo arcuato, eminencia media, angiotensina II, tirosina-hidroxilasa

Summary

Nicotine effects on the median eminence and the arcuate nucleus. Study with tyrosine-hydroxylase and angiotensin II.

The nicotine is one of the main factors responsible of the acute affections of cardiovascular system. For another hand, the median eminence and the arcuate nucleus belong to the tubeoinfudibular system where catecholaminergic and vasopressinergic neurones and fibres are observed. The aim of the present work is to analyze the effects of the nicotine administration on the ME and AN. Female mouse divided in four groups were used; control groups of 50 and 85 days of age and experimental groups that were treated with nicotine during 30 and 60 days and were sacrificed at the same age than control groups. For the immunohistochemistry anti-tyrosine-hydroxylase (TH) and anti-vasopressin II (AgII) were used as primary antibodies. The results showed that nicotine treatment produced a decrease of the TH-ir in the ME and AN. Contrarily the AgII-ir was increased in the ME and did not showed changes in the AN. The nicotine produces decrease of the TH and an increase of the AgII, in similar way that is described for the hypertensive rats, that could be related with the nicotine effects on the release of the neurotransmitter.

Key words

Nicotine, arcuate nucleus, median eminence, angiotensin II, tyrosine-hydroxylase

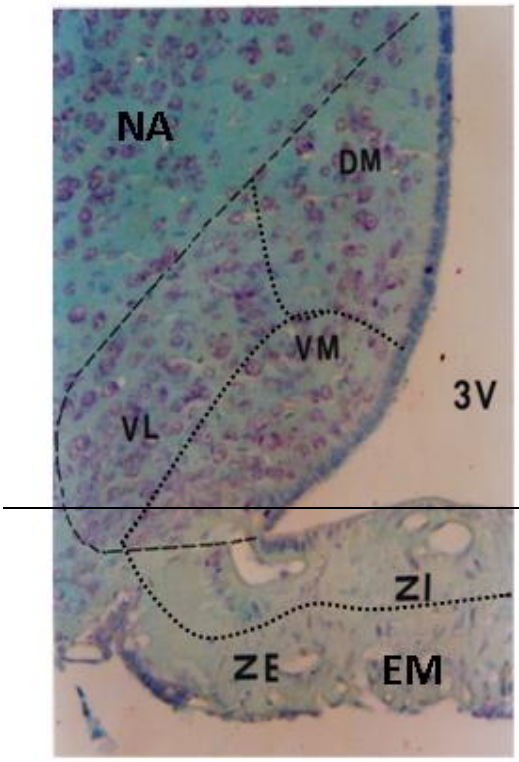
Introduccíon

La nicotina del tabaco es una de las drogas de abuso más ampliamente extendida y, además, la principal responsable de sus efectos agudos cardiovasculares. Sus efectos farmacológicos son el resultado de complejas interacciones tanto a nivel periférico como en el sistema nervioso central. Extraída de la hoja de Nicotiana tabaco la nicotina puede introducirse en el organismo no sólo fumando el típico cigarrillo, sino también por absorción a través de las mucosas de la boca y nariz cuando se mastica o se usa como rapé. En el organismo se metaboliza en parte dando lugar al ión amonio que es el verdaderamente tóxico pues al estar cargado positivamente "secuestra" moléculas cargadas negativamente tales como ADN, ARN, enzimas incorporándolas a su estructura y destruyéndolas de esta manera. En general se considera que fumar activa el sistema nervioso simpático, esto se consigue por distintos mecanismos incluyendo la inducción de potenciales de acción nerviosos y la liberación de catecolaminas en los terminales simpáticos [23].

Se ha visto además que produce un aumento de las concentraciones de noradrenalina y adrenalina circulantes, lo mismo que ocurre con la estimulación noradrenérgica y adrenérgica por otras causas [15,

Majorensis
ISSN 1697-5529

20] A nivel parasimpático, la nicotina actúa sobre los receptores colinérgicos nicotínicos postganglionares de los ganglios y del SNC. Su mecanismo de acción es bifásico: en primer lugar se comporta como estimulante y luego como bloqueante, sobre todo a dosis altas o en aplicaciones prolongadas. Estos efectos a nivel del sistema nervioso autónomo varían dependiendo de la dosis y la vía de administración.



Corte coronal del Núcleo Arcuato y La Eminencia Media
NA: Núcleo Arcuato
•DM: Región dorsomedial
•VL: Región ventrolateral
•V M: Región ventromedial
EM: La Eminencia Media
•ZE: Zona Externa
•ZI: Zona Interna

En el sistema vascular, pequeñas dosis de nicotina producen vasoconstricción de la circulación periférica [9] lo que explica en parte el aumento de presión arterial que se observa cuando se fuma [3]. A nivel del SNC, atraviesa la barrera hematoencefálica distribuyéndose por diferentes centros del mismo [17] donde ejerce múltiples efectos relacionados éstos con la dosis. Se han descrito lugares de unión a la nicotina en núcleos de regiones tales como el hipotálamo, hipocampo, tálamo, cerebro medio y troncoencéfalo [6].
Se sabe que la activación nicotínica de receptores colinérgicos en estos lugares produce estimulación central neurohumoral con liberación de neurotransmisores como la acetilcolina, noradrenalina, dopamina y vasopresina [7]. Tanto la noradrenalina como la dopamina, actúan como neurotransmisores y neuromoduladores en una gran cantidad de funciones fisiológicas. La enzima tirosina hidroxilasa se encuentra en todas las neuronas catecolaminérgicas y es la que cataliza el primer paso de la síntesis de catecolaminas. La actividad de esta enzima es limitante de la velocidad de la síntesis de catecolaminas.
Eminencia media (EM) y núcleo arcuato (NA)
La EM forma parte de un conjunto de órganos denominados circunventriculares los cuales se asemejan en su organización vascular, neural, glial y ependimaria [24]. Se localiza en la región rostral de la neurohipófisis y carece de barrera sanguínea cerebral. Los principales elementos que se encuentran en su tejido son células gliales y ependimárias, fibras nerviosas y vasos sanguíneos. Estos elementos se distribuyen en una región interna o neural y otra externa o neurohemática.
El Núcleo Arcuato (NA) se localiza en el hipotálamo, en la región del tuber. Se encuentra en la parte más ventral del III ventrículo, en relación con el receso infundibular y llega hasta la EM. Puede dividirse en tres zonas: ventromedial, ventrolateral y dorsomedial [18].
Tanto la EM como el NA pertenecen al sistema tuberoinfundibular donde se observan neuronas catecolaminérgicas principalmente en el NA y en el núcleo periventricular proyectando sus axones hacia la EM, representan el 28 % de la población de células TH inmunorreactivas. ─En cuanto a las células dopamina-inmunorreactivas se localizan en agregados principalmente en la parte dorsomedial del Núcleo arcuato, en la porción ventrolateral y en la región periarcuata. [16]. En la rata, las neuronas dopaminérgicas tuberoinfundibulares proyectan desde el Núcleo arcuato hacia la EM liberando dopamina en los vasos portales. La dopamina liberada es transportada al lóbulo anterior de la hipófisis donde actúa inhibiendo la liberación de prolactina. La nicotina estimula la actividad dopaminérgica tuberoinfundibular en la rata.
La Angiotensina II participa en el control de la función cardiovascular aunque su actividad solo se ha demostrado en áreas específicas relacionadas con el control de la presión arterial como son el órgano subfornical, la porción parvicelular del núcleo paraventricular hipotalámico y el núcleo péptico medial. Asimismo, se describe que lesiones cercanas al núcleo arcuato en ratas hipertensas producen polidipsia y disminución de los efectos presores causados por la angiotensina II y un retardo en el desarrollo de la hipertensión [18]. Se han detectado receptores AT1 para la angiotensina II en el núcleo arcuato [21]. Al parecer, la mayoría de los efectos farmacológicos de la angiotensina II están mediados por la activación de este tipo de receptores.
El propósito del presente trabajos es los efectos de la administración de nicotina sobre la EM y el NA

Majorensis
ISSN 1697-5529

y sur ver sus repercusiones sobre secreción de catecolaminas y vasopresina.

Material y métodos

En nuestro estudio experimental hemos empleado ratones hembra de la cepa Swiss con un total de 20 ratones. Para el estudio morfológico se analizaron 4 grupos de animales. Dos grupos controles de 50 (C50) y 85 días (C85) respectivamente y dos grupos experimentales que recibieron tratamiento con nicotina durante 30 días (N30) y 60 días (N60). Los grupos controles se desarrollaron bajo condiciones estándar de laboratorio y a los grupos experimentales se les administró nicotina por vía subcutánea desde los 20 días de edad. Los animales fueron anestesiados con hidrato de cloral, a continuación fueron perfundidos por vía cardiaca con solución salina y fijados con Bouin. Posteriormente se procedía a la extracción de los cerebros que permanecieron sumergidos en el mismo líquido fijador durante 24 horas, siendo después deshidratados e incluidos en parafina. Se realizaron cortes coronales seriados de 10 micras recogidos en tres series alternas. La serie A fue teñida con el método de Klüver-Barrera, mientras que las series B y C se sometieron a inmunohistoquimia siguiendo el método de la estreptoavidina-biotina. Para la serie B se usó como primer anticuerpo anti-tirosina hidroxilasa (1:8.000). Para la serie C se utilizó angiotensina II fracción 1-4 (1:200). Como anticuerpos secundarios se utilizaron suero normal de rabbit y anti-IgG de rata biotinilado ambos a concentración 1:200, y suero normal de horse y anti-IgG de ratón biotinilado ambos también a 1:200. El revelado de la reacción se realizó con diaminobencidina en buffer de cacodilato.

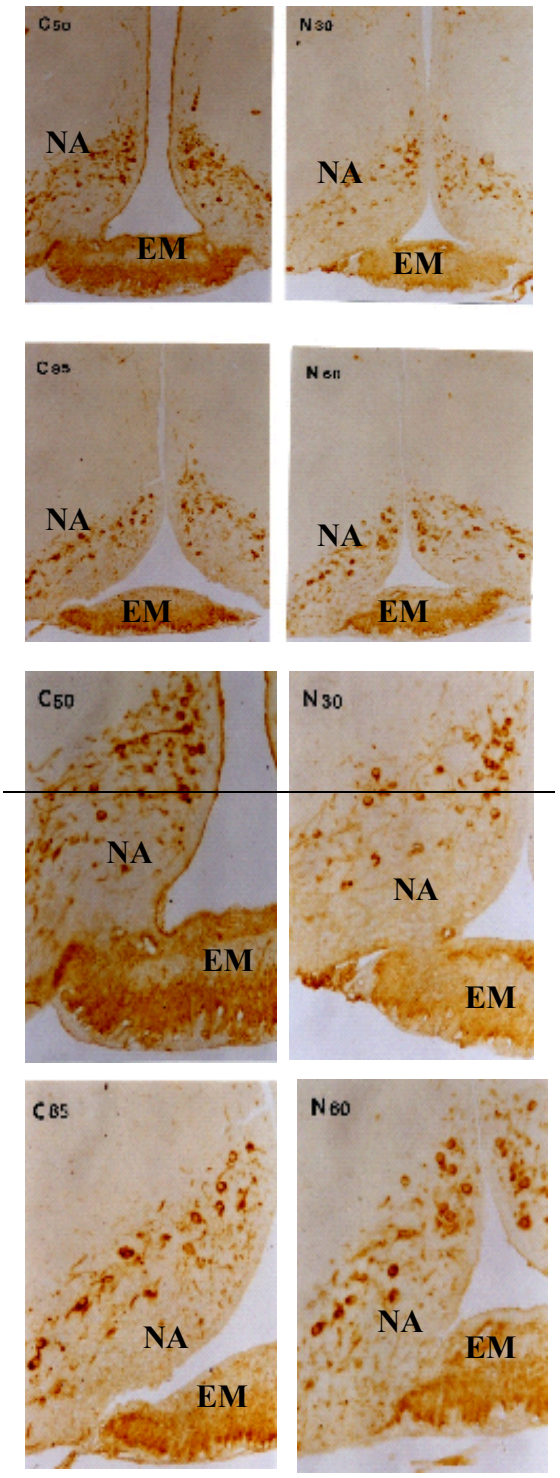
Resultados

Tirosina hidroxilasa

En la eminencia media (EM) la TH-ir se observa en fibras distribuidas por la zona interna y la zona externa, en los animales controles de 50 días y experimentales con tratamiento de 30 días (N30). La intensidad de la reacción es menor en el grupo N30, sobre todo a nivel de la zona externa. El grupo control de 85 días y el grupo experimental N60 presentan una distribución del TH-ir similar a los grupos anteriores. Aunque el grupo C85 se observa una mayor intensidad de reacción a nivel de la ZE de la EM mientras que al tratar con nicotina disminuye la intensidad del marcaje.

En el núcleo Arcuato (NA) del grupo control se observan neuronas y fibras TH, en las tres zonas del NA. A mayor aumento vemos que la intensidad de reacción y número de células marcadas es menor en el grupo que recibió nicotina, además se observa un menor número de neuronas marcadas en la zona ventromedial. En el NA del control de 85 días la distribución del TH-ir es similar al grupo control de 50 días. El tratamiento con nicotina disminuye el número de neuronas y fibras marcadas.

TIROSINA HIDROXILASA



NA : Núcleo Arcuato
EM: Eminencia Media

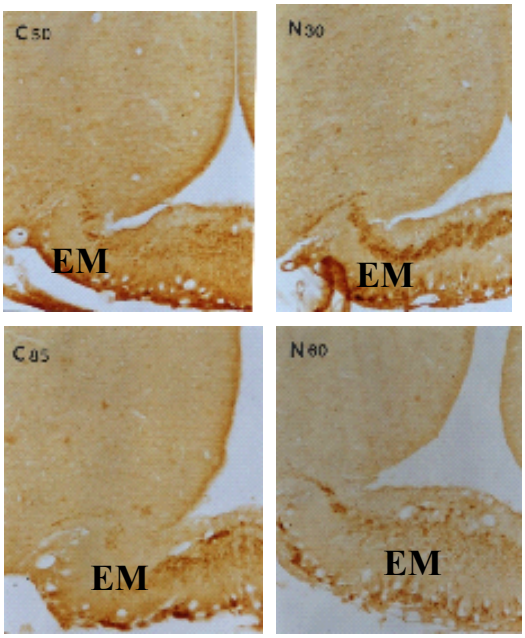
Grupos Control de 50 y 80 días (C-50 y C-
Experimentales 1 mes Tto(N-30) y 2 meses
(N-60)

Majorensis
ISSN 1697-5529

Angiotensina II

En la EM tanto de los controles de 50 días como en el grupo N30 se observan fibras angiotensina II positivas distribuidas principalmente en la zona interna y zona externa, aumentando significativamente la intensidad del marcaje al tratar con nicotina... En los grupos C85 y N60 la distribución de fibras IR es similar en los grupos, la intensidad del marcaje en el grupo experimental es similar a la del grupo control a los 85 días.

ANGIOTENSINA II



Grupos Control de 50 y 80 días (C-50 y C-85)
Experimentales 1 mes Tto(N-30) y 2 meses Tto (N-60)

Discusión

La relación entre dopamina/catecolaminas y el sistema simpático con el sistema renina-angiotensina ha sido estudiada por diferentes autores. Las neuronas dopaminérgicas tuberoinfundibulares están distribuidas en el Núcleo Arcuato (NA) y envían sus axones a la capa externa de la EM cerca de los plexos capilares [4]. La colocalización de receptores AT1 y TH en neuronas del NA indica que en esta área cerebral la AII actúa directamente en las neuronas [11]. En el presente trabajo hemos empleado anti-AII y anti-TH y hemos observado que la nicotina produce variaciones cualitativas en la AII-ir y TH-ir en las dos regiones estudiadas. Se detectó que, para la TH la intensidad de la reacción fue menor en jóvenes tratados con nicotina, en el grupo C85 se observa una mayor intensidad de reacción a nivel de la ZE de la EM mientras que al tratar con nicotina disminuye la intensidad del marcaje.

Por el contrario, el material inmunoreactivo para la AII fue mayor en los animales jóvenes tratados con nicotina que en los adultos tratados. Klein [12] apunta que la administración de nicotina por vía osmótica durante 19 días en ratas adolescentes aumentó los niveles de corticosterona y ACTH en la edad adulta, de manera dosis-dependiente. Esto sugiere un importante efecto de la exposición de la nicotina en la adolescencia, incluyendo alteraciones del status neuroendocrino. Nosotros hemos observado en el NA fibras y células TH positivas localizadas en las partes dorsomedial y ventrolateral, lo que coincide con estudios previos realizados por otros autores [12]. Además, pudimos constatar la existencia de terminales TH-ir en la EM, especialmente en la zona externa. También detectamos que la intensidad de la reacción en el NA y EM presentó variaciones con la edad en los grupos control, y se observan diferencias en los tratados con nicotina tanto en el número como en la intensidad del marcaje, siendo más intensa en los adultos. La exposición crónica al tabaco parece inducir tolerancia en relación a su efecto estimulatorio en el sistema noradrenérgico, subependimario y paraventricular hipotalámico [1]. Sin embargo, Fuxe et al. [8] indicaron que una dosis de 0,3 mg por Kg de peso por vía subcutánea no influye significativamente en el recambio de las catecolaminas en el hipotálamo, pero reduce los niveles de noradrenalina en la capa subependimária de la EM, y tiende a aumentar el recambio de dopamina en las zonas palizada, lateral y medial. Las variaciones en el contenido de TH-ir podrían estar relacionadas con la depresión de las reservas de catecolaminas en el hipotálamo y EM producida tras el tratamiento con nicotina y la exposición al tabaco.

Angiotensina II

El sistema angiotensinérgico paraventricular hipofisario presenta la mayoría de células marcadas AII-IR en su división magnocelular, y fibras con pequeñas varicosidades que se dirigen a la zona interna de la EM [19]. En el presente trabajo también observamos fibras y terminales AII con varicosidades en la zona interna de la EM. Lind et al. [14] encontraron células AII-IR en las divisiones magno y parvocelular del Núcleo Paraventricular, que proyectan a la zona externa de la EM y que no están relacionadas con la vasopresina. Nuestros resultados con relación a la EM, al utilizar un anticuerpo frente a la AII, nos permitieron detectar la presencia de fibras en la zona externa, en torno a los plexos capilares, en todos los grupos estudiados. Según Clara et al. [5], es razonable suponer que dentro de los efectos agudos del tabaco se encuentre la activación del SRA, aunque esto no ha sido suficientemente estudiado. La nicotina causa, por otra parte, una rápida elevación de los niveles séricos de ECA [22]. La edad y el tratamiento afectan de forma diferente a la presencia de AII en la EM, ya que el material inmunoreactivo fue mayor en los animales jóvenes tratados con nicotina. La nicotina produce un aumento de la AII en la EM de

Majorensis
ISSN 1697-5529

forma similar al descrito en ratas hipertensas en trabajos previos realizados en nuestro Departamento. Esto podría estar relacionado con los efectos de la nicotina en la liberación de neurotransmisores cerebrales y sobre la modificación de la presión arterial [2].

Agradecimientos
Este trabajo ha sido subvencionado por el proyecto INIPRO. Referencia: N 02/07

Bibliografía

1. Andersson K, Eneroth P, Fuxe K, Mascagni F, Agnati LF. Effects of chronic exposure to cigarette smoke on amine levels and turnover in various hypothalamic catecholamine nerve terminal systems and on the secretion of pituitary hormones in the male rat. Neuroendocrinology. 1985; 41(6):462-466.
2. Battistel M, Plebani M, Di Mario F, Jocic M, Lippe IT, Holzer P. Chronic nicotine intake causes vascular dysregulation in the rat gastric mucosa. Gut. 1993; 34(12):1688.
3. Benowitz NL. The biology of nicotine dependence: from the 1988 Surgeon General's Report to the present and into the future. Nicotine Tob. Res. 1999;1 Suppl 2:S159-163.
4. Björklund A, Lindvall O. Dopamine in dendrites of substantia nigra neurons: suggestions for a role in dendritic terminals. Brain Res. 1975; 83(3):531-537.
5. Clara JG, Coelho C, Breitenfeld L, Siqueira C, Bicho M, de Pádua F. [Acute effects of tobacco and vascular risk modulated by genetic factors]. Rev Port Cardiol. 2000; 19(12):1279-1283.
6. Clarke PB, Pert CB, Pert A. Autoradiographic distribution of nicotine receptors in rat brain. Brain Res. 1984; 323(2):390-395.
7. Chesselet MF. Presynaptic regulation of neurotransmitter release in the brain: facts and hypothesis. Neuroscience. 1984; 12(2):347-375.
8. Fuxe K, Agnati LF, Benfenati F, Andersson K, Camurri M, Zoli M. Evidence for the existence of a dopamine receptor of the D-1 type in the rat median eminence. Neurosci. Lett. 1983; 43(2-3):185-190.
9. Henningfield JE, Miyasato K, Jasinski DR. Abuse liability and pharmacodynamic characteristics of intravenous and inhaled nicotine. J. Pharmacol. Exp. Ther. 1985; 234(1):1-12.
10. Ichitani Y, Morimoto N, Okuyama I, Hasegawa M, Nagatsu I, Ibata Y. Fine structure of tyrosine hydroxylase-like immunoreactive neurons and terminals of the hypothalamic arcuate nucleus and median eminence in young and aged rats. J Electron Microsc (Tokyo). 1990; 39(5):396-403.
11. James MD, MacKenzie FJ, Tuohy-Jones PA, Wilson CA. Dopaminergic neurones in the zona incerta exert a stimulatory control on gonadotrophin release via D1 dopamine receptors. Neuroendocrinology. 1987 ; 45(5):348-355.
12. Klein LC. Effects of adolescent nicotine exposure on opioid consumption and neuroendocrine responses in adult male and female rats. Exp Clin Psychopharmacol. 2001; 9(3):251-261.
13. Lind RW, Swanson LW, Sawchenko PE. Anatomical evidence that neural circuits related to the subfornical organ contain angiotensin II. Brain Res. Bull. 1985; 15(1):79-82.
14. Lind RW, Swanson LW, Bruhn TO, Ganten D. The distribution of angiotensin II-immunoreactive cells and fibers in the paraventriculo-hypophysial system of the rat. Brain Res. 1985; 338(1):81-89.
15. Mancia G, Groppelli A, Casadei R, Omboni S, Mutti E, Parati G. Cardiovascular effects of smoking. Clin Exp Hypertens A. 1990; 12(5):917-929.
16. Okamura H, Kitahama K, Mons N, Ibata Y, Jouvet M, Geffard M. L-dopa-immunoreactive neurons in the rat hypothalamic tuberal region. Neurosci. Lett. 1988; 95(1-3):42-46.
17. Oldendorf WH. Lipid solubility and drug penetration of the blood brain barrier. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1974;147(3):813-815.
18. Rosas-Arellano MP, Solano-Flores LP, Ciriello J. Neurotensin projections to subfornical organ from arcuate nucleus. Brain Res. 1996; 706(2):323-327.
19. Sawchenko PE, Swanson LW. The organization and biochemical specificity of afferent projections to the paraventricular and supraoptic nuclei. Prog. Brain Res. 1983; 60:19-29.
20. Siess W, Lorenz R, Roth P, Weber PC. Plasma catecholamines, platelet aggregation and associated thromboxane formation after physical exercise, smoking or norepinephrine infusion. Circulation. 1982; 66(1):44-48.
21. Speth RC, Smith MS, Grove KL. Lactation decreases angiotensinogen mRNA expression in the midcaudal arcuate nucleus of the rat brain. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 2001; 280(4):R1169-1176.
22. Sugiyama H, Yamashita Y. Characterization of putative nicotinic acetylcholine receptors solubilized from rat brains. Brain Res. 1986; 373(1-2):22-26.
23. Watts DT. The effect of nicotine and smoking on the secretion of epinephrine. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1960; 90:74-80.
24. Weindl A, Joynt RJ. Ultrastructure of the ventricular walls. Three-dimensional study of regional specialization. Arch Neurol. 1972;26(5):420-427.