

00591  
2

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Química  
División de Estudios de Posgrado

2.75165

**Estudios de la biosíntesis *in vivo*  
de neuropéptidos en el hipotálamo de la rata.**

T E S I S  
que para obtener el grado de  
DOCTORA EN CIENCIAS QUIMICAS (BIOQUIMICA)  
p r e s e n t a  
Q. REBECCA ELIZABETH FRANCO Y BOURLAND



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **DEDICATORIA**

A mis padres  
A mi hermano

**Tesis para recibir el Grado de Doctora en Ciencias Químicas (Bioquímica):  
Estudios de la biosíntesis *in vivo* de neuropéptidos en el hipotálamo de la rata.**

**Alumna: Q. Rebecca Elizabeth Franco y Bourland**

**Asesor: Dr. Alberto Huberman Wajsman**

**Resumen**

Este es el primer reporte de un procedimiento analítico riguroso por cromatografía líquida de alta presión (CLAP) en fase reversa y elución en gradiente para medir simultáneamente la biosíntesis *in vivo* de los neuropéptidos hipotalámicos vasopresina-L-[35S]Cys, oxitocina-L-[35S]Cys y somatostatina-14-L-[35S]Cys como un procedimiento para evaluar la actividad de las neuronas peptidérgicas correspondientes en ratas sometidas a diversas manipulaciones experimentales. Los neuropéptidos marcados fueron extraídos de hipotálamos y de neurohipófisis entre 2h y 6h después de la administración intracerebroventricular del precursor radioactivo, tiempo suficiente para permitir la conversión de sus precursores biosintéticos en una cantidad medible de los neuropéptidos-L-[35S]Cys tanto a nivel del hipotálamo, en los gránulos de secreción recién liberados del aparato de Golgi, como en los gránulos de secreción acumulados en la neurohipófisis. Partiendo de hipotálamos o neurohipófisis de ratas anestesiadas (Capítulo I) o despiertas (Capítulo II), se aplicó esta metodología al análisis de extractos de tejidos combinados (Capítulo I) o extractos individuales (Capítulo II). En ratas deshidratadas anestesiadas se detectó un aumento en la actividad de neuronas vasopresinérgicas y oxitocinérgicas. En ratas adrenalectomizadas despiertas aumentó selectivamente la actividad de las neuronas vasopresinérgicas; el estrés crónico por inmovilización en ratas despiertas resultó en la activación sólo de las neuronas oxitocinérgicas. En ningún caso cambió el estado de actividad de las neuronas somatostatinérgicas. En conclusión, la medición de la biosíntesis *in vivo* de neuropéptidos-L-[35S]Cys hipotalámicos y neurohipofisiarios por CLAP es un procedimiento sensible para conocer el estado de actividad de las neuronas peptidérgicas correspondientes bajo diversas condiciones fisiológicas.

**Tesis para recibir el Grado de Doctora en Ciencias Químicas (Bioquímica):**  
**Estudios de la biosíntesis *in vivo* de neuropéptidos en el hipotálamo de la rata.**  
[Studies of the biosynthesis *in vivo* of neuropeptides in the hypothalamus of the rat.]  
**Alumna: Q. Rebecca Elizabeth Franco y Bourland**  
**Asesor: Dr. Alberto Huberman Wajsman**

**SUMMARY**

This is the first report of a rigorous analytical procedure by reversed-phase high pressure liquid chromatography (HPLC) with gradient elution for the simultaneous measurement of the *in vivo* biosynthesis of the L-[<sup>35</sup>S]Cys-labeled hypothalamic neuropeptides vasopressin, oxytocin, and somatostatin-14 to estimate the activity of the corresponding peptidergic neurons in rats subjected to diverse experimental manipulations. The L-[<sup>35</sup>S]Cys-labeled neuropeptides were extracted from hypothalami and neurohypophyses between 2h to 6h after the intracerebroventricular administration of the radioactive precursor allowing sufficient time for the conversion of their biosynthetic precursors into measureable amounts of the labeled neuropeptides both in the hypothalami within the secretory granules just released from the Golgi apparatus as well as in the secretory granules accumulated in the neurohypophyses. Hypothalami and neurohypophyses were obtained from anesthetized (Chapter I) or awake rats (Chapter II), and this procedure was applied to the analysis of extracts from combined tissues (Chapter I) or individual tissues (Chapter II). Dehydrated anesthetized rats showed enhanced activity of the vasopressinergic and oxytocinergic neurons. Awake adrenalectomized rats showed enhanced activity of the vasopressinergic neurons. Chronic stress by intermittent immobilization in awake rats resulted only in the increased activity of the oxytocinergic neurons. In no case was the activity of the somatostatinergic neurons affected. In conclusion, the analytical procedure described here for the *in vivo* biosynthesis of hypothalamic and neurohypophyseal L-[<sup>35</sup>S]Cys-neuropeptides by HPLC is a sensitive method to estimate the neuronal activity of the corresponding peptidergic neurons under diverse physiological conditions.

**RECONOCIMIENTO A:**

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO  
Facultad de Química**

**INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MEDICAS Y NUTRICION  
"SALVADOR ZUBIRAN"**

**MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY**

## **JURADO**

<b>Dra. Estela Sánchez de Jiménez</b>	<b>Presidente</b>
<b>Dr. Antonio Peña Díaz</b>	<b>Vocal</b>
<b>Dr. Lourival Possani Postay</b>	<b>Vocal</b>
<b>Dr. Flavio Mena Jara</b>	<b>Vocal</b>
<b>Dr. Armando Gómez Puyou</b>	<b>Secretario</b>
<b>Dra. Patricia Joseph Bravo</b>	<b>Suplente</b>
<b>Dr. Carlos Arámburo de la Hoz</b>	<b>Suplente</b>

## PROLOGO

A fines de los años '70 se dieron 2 circunstancias que motivaron los estudios que se reportan aquí: por una parte había un interés renovado en el estudio de los mecanismos de biosíntesis de los neuropéptidos vasopresina (AVP) y oxitocina (OT) (1) y por otra, la cromatografía líquida de alta presión (CLAP) se estaba convirtiendo en una herramienta de purificación y análisis accesible para el estudio de múltiples sustancias químicas, incluidos los neuropéptidos (2). Dadas estas condiciones, nosotros nos planteamos la posibilidad de desarrollar una metodología que nos permitiera evaluar rápidamente y con alta precisión la biosíntesis *in vivo* de AVP, OT y también de somatostatina (SRIF-14), marcadas con L-[<sup>35</sup>S]Cys, en extractos de hipotálamo y neurohipófisis de rata, como un procedimiento para evaluar la actividad de las correspondientes neuronas peptidérgicas en animales sometidos a diversas manipulaciones experimentales.

Sin pretender más que medir, mediante un procedimiento analítico riguroso, los productos peptídicos finales del procesamiento postranscripcional de los precursores biosintéticos de AVP y OT (3) y de SRIF-14 (4), diseñamos el primer método reportado, basado en la CLAP, para medir simultáneamente los tres neuropéptidos marcados *in vivo*. Los neuropéptidos fueron extraídos no más de 6h después de la administración intracerebroventricular del precursor radioactivo, tiempo suficiente para asegurar la conversión de sus precursores biosintéticos a los neuropéptidos, tanto a nivel del hipotálamo, en los gránulos de secreción recién separados del aparato de Golgi, como en los gránulos de secreción acumulados en la neurohipófisis (5). Ya sea empleando animales anestesiados (Capítulo I) o animales despiertos (Capítulo II) y aplicando esta metodología al análisis de extractos de tejidos combinados (Capítulo I) o a partir de



extractos individuales (Capítulo II) de hipotálamos y neurohipófisis, hemos medido la respuesta de las correspondientes neuronas peptidérgicas en ratas sometidas a deshidratación, adrenalectomía y estrés crónico por inmovilización. Los resultados de estas investigaciones culminaron en esta tesis y dos publicaciones (6,7).

A pesar del tiempo transcurrido desde la primera de las dos publicaciones (6), la segunda publicación (7) y finalmente la presentación de esta tesis, este trabajo no ha perdido vigencia. En el *interim*, creció el interés por estudiar la expresión génica de las células neuroendócrinas, no a través de su producto peptídico, sino del ARN mensajero de los precursores neuropeptídicos. Pero ahora, en la era de la proteómica, hay renovado interés por medir la biosíntesis de neuropeptidos, entre otros métodos, por CLAP (8,9).

1. Gainer H, Sarne Y, Brownstein MJ Neurophysin bioynthesis: conversion of a putative precursor during axonal transport. *Science* 195 (1977) 1354-1356.
2. Meek JL, Bohan TP Use of high pressure liquid chromatography (HPLC) to study enkephalins. *Adv Biochem Psychopharmacol* 18 (1978) 141-147.
3. Gainer H, Sarne Y, Brownstein MJ Biosynthesis and axonal transport of rat neurohypophysial proteins and peptides. *J Cell Biol* 73 (1977) 366-381.
4. Zingg HH, Patel YC Somatostatin precursors: evidence for presence in and release from rat median eminence and neurohypophysis. *Biochem Biophys Res Commun* 90 (1979) 466-472.
5. Gainer H, Russell JT, Loh YP The enzymology and intracellular organization of peptide precursor processing: the secretory vesicle hypothesis. *Neuroendocrinology* 40 (1985) 171-184.
6. **Franco-Bourland RE**, Fernstrom JD *In vivo* biosynthesis of L-(35S)Cys-arginine vasopressin, -oxytocin, and -somatostatin: rapid estimation using reversed-phase high pressure liquid chromatography. *Endocrinology* 109 (1981) 1097-1106.
7. **Franco-Bourland RE** Vasopressinergic, oxytocinergic, and somatostatinergetic neuronal activity after adrenalectomy and immobilization stress. *Neurochemical Res* 23 (1998) 699-705.
8. Méndez M, Cisneros M, Baez A, Joseph-Bravo P, Charli JL Three TRH-like molecules are released from rat hypothalamus in vitro. *Neurochem Res* 24 (1999) 815-823.
9. Jankowski M, Wang D, Hajjar F, Mukaddam-Daher S, McCann SM, Gutkowska J Oxytocin and its receptors are synthesized in the rat vasculature. *Proc Natl Acad Sci USA* 97 (2000) 6207-6211.

## INDICE

RECONOCIMIENTOS	2
JURADO	3
PROLOGO	4
ABREVIATURAS Y FORMULAS QUIMICAS	12
RESUMEN GENERAL	14
CAPITULO I.	
<b>Medición simultánea de la biosíntesis <i>in vivo</i> de vasopresina-L-[<sup>35</sup>S]Cys, oxitocina-L-[<sup>35</sup>S]Cys y somatostatina-14-L-[<sup>35</sup>S]Cys en el hipotálamo y su acumulación en la neurohipófisis de ratas anestesiadas: Efecto de la deshidratación.</b>	<b>19</b>
Realizado en el MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY, Department of Nutrition and Food Science, Cambridge MA, USA Asesor: Dr. John D. Femstrom Beca CONACYT a REFB: # 17616	
<b>Introducción</b>	<b>19</b>
<b>Planteamiento del problema</b>	<b>21</b>
<b>Objetivos</b>	<b>22</b>
<b>Materiales y Métodos</b>	<b>23</b>
Animales	23
Reactivos	23
Equipo	24
• Equipo cromatográfico	24
• Equipo quirúrgico	24
• Espectrómetro de centelleo líquido	24
<b>Métodos</b>	<b>25</b>
• Sistemas cromatográficos en fase reversa CLAP-I-1, CLAP-I-2, CLAP-I-3	25
➤ CLAP-I-1	25
➤ CLAP-I-2	25
➤ CLAP-I-3	25
• Métodos de modificación química de AVP, OT y SRIF-14	26
➤ Oxidación de la AVP y la OT con ácido perbórico	26
➤ Carboximetilación de la SRIF-14	27
• Administración intracerebroventricular de L-[ <sup>35</sup> S]Cys a ratas anestesiadas	27

• Extracción ácida y caracterización por CLAP, con o sin modificación química, de los neuropéptidos-L-[ <sup>35</sup> S]Cys de los hipotálamos y las neurohipófisis de ratas hidratadas o deshidratadas	28
> Disección de los bloques hipotalámicos.	28
> Disección de las neurohipófisis.	29
> Extracción con ácido acético de los neuropéptidos-L-[ <sup>35</sup> S]Cys	29
> Prepurificación-I de los neuropéptidos-L-[ <sup>35</sup> S]Cys por filtración en gel.	30
> Prepurificación-II de los neuropéptidos-L-[ <sup>35</sup> S]Cys por quimioadsorción a octadecilsilano	31
> Purificación de los neuropéptidos-L-[ <sup>35</sup> S]Cys por CLAP-I-1	31
> Identidad y pureza radioquímica de la AVP-L-[ <sup>35</sup> S]Cys y la OT-L-[ <sup>35</sup> S]Cys purificadas por CLAP-I-1	32
> Identidad y pureza radioquímica de la SRIF-14-L-[ <sup>35</sup> S]Cys purificada por CLAP-I-1	32
• Mediciones de radioactividad por centelleo líquido	33
> Medición de los neuropéptidos-L-[ <sup>35</sup> S]Cys naturales o modificados químicamente	33
> Medición de la incorporación de [ <sup>35</sup> S]Cys a la proteína de los extractos de los hipotálamos y las neurohipófisis precipitada con ácido acético	34
• Análisis estadístico	35
<b>Resultados</b>	<b>36</b>
<b>Sistemas de CLAP para la purificación y caracterización de la AVP, la OT y la SRIF-14 y sus derivados</b>	<b>36</b>
• Separación simultánea de la AVP, la OT y la SRIF-14 por CLAP-I-1	36
• Análisis de la AVP y de la OT por CLAP-I-2	36
• Análisis de la SRIF-14 por CLAP-I-3	36
• Análisis de los derivados sulfónicos de la AVP y de la OT por CLAP-I-1	37
• Análisis de la SRIF-14 carboximetilada por CLAP-I-3	37
<b>Caracterización de las fracciones de AVP-L-[<sup>35</sup>S]Cys, OT-L-[<sup>35</sup>S]Cys y SRIF-14-L-[<sup>35</sup>S]Cys aisladas de los extractos ácidos de los hipotálamos y las neurohipófisis de las ratas hidratadas y deshidratadas, marcadas intracerebroventricularmente con L-[<sup>35</sup>S]Cys</b>	<b>38</b>
• Análisis por CLAP-I-1 de las fracciones marcadas con L-[ <sup>35</sup> S]Cys que coeluyeron con la AVP, la OT y la SRIF sintéticas	38
• Contenido endógeno neurohipofisiario de la AVP y la OT	40
<b>Caracterización y determinación del grado de pureza radioquímica de los neuropéptidos-L-[<sup>35</sup>S]Cys purificados por CLAP-I-1</b>	<b>40</b>
• Fracciones con la movilidad de AVP-L-[ <sup>35</sup> S]Cys y OT-L-[ <sup>35</sup> S]Cys obtenidas por CLAP-I-1	41
> Recromatografía en CLAP-I-2	41
> Oxidación con ácido per fórmico y recromatografía en CLAP-I-1	41
• Fracciones con la movilidad de SRIF-14-L-[ <sup>35</sup> S]Cys obtenidas por CLAP-I-1	42
> Recromatografía por CLAP-I-3	42
> Carboximetilación y recromatografía por CLAP-I-3	42
<b>Incorporación específica de la L-[<sup>35</sup>S]Cys a la proteína precipitada con ácido acético de los extractos de los hipotálamos y las neurohipófisis de las ratas hidratadas y las ratas deshidratadas</b>	<b>43</b>
<b>Figuras del Capítulo I</b>	<b>45</b>
• Figura I-1. Estructuras primarias de la OT, la AVP y la SRIF-14	46

Figura I-2.	47
Estructura química del octadecilsilano	
• Figura I-3.	48
Sitio de inyección de la L-[ <sup>35</sup> S]Cys	
• Figura I-4.	49
Disección de los bloques hipotalámicos	
• Figura I-5.	
Perfiles de radioactividad (L-[ <sup>35</sup> S]Cys) de los extractos de los hipotálamos y las neurohipófisis de las ratas hidratadas obtenidos por filtración en gel	50
• Figura I-6.	
Curva patrón de la albúmina para la determinación de proteínas por el método de Lowry	51
• Figura I-7.	
Perfiles de absorbencia a 210 nm de la AVP, la OT y la SRIF-14 obtenidos por CLAP-I-1 y CLAP-I-2	52
• Figura I-8.	
Perfil de absorbencia a 210 nm de la SRIF-14 obtenido por CLAP-I-3	53
• Figura I-9.	
Estructura química de los derivados sulfónicos de la AVP y la OT	54
• Figura I-10.	
Perfiles de absorbencia a 210 nm de los derivados sulfónicos de la AVP y la OT obtenidos por CLAP-I-1	55
• Figura I-11.	
Perfiles de absorbencia a 210 nm de la SRIF-14 y la SRIF-14-carboximetilada en CLAP-I-3	56
• Figura I-12.	
Estructura química de la SRIF-14-carboximetilada	57
• Figura I-13.	
Perfiles de absorbencia a 210 nm y de radioactividad obtenidos por CLAP-I-1 de los extractos prepurificados de los hipotálamos y las neurohipófisis de las ratas hidratadas, marcados con L-[ <sup>35</sup> S]Cys	58
• Figura I-14.	
Perfiles de absorbencia a 210 nm y de radioactividad obtenidos por CLAP-I-1 de los extractos prepurificados de los hipotálamos y las neurohipófisis de las ratas deshidratadas, marcados con L-[ <sup>35</sup> S]Cys	59
• Figura I-15.	
Criterios de identidad y de pureza radioquímica de la AVP-L-[ <sup>35</sup> S]Cys y la OT-L-[ <sup>35</sup> S]Cys obtenidas por CLAP-I-1: Caracterización por CLAP-I-2	60
• Figura I-16.	
Criterios de identidad y de pureza radioquímica de la AVP-L-[ <sup>35</sup> S]Cys y la OT-L-[ <sup>35</sup> S]Cys obtenidas por CLAP-I-1: Caracterización por modificación química y recromatografía en CLAP-I-1	61
• Figura I-17.	
Criterios de identidad y de pureza radioquímica de la SRIF-14-L-[ <sup>35</sup> S]Cys obtenida por CLAP-I-1: Caracterización sucesiva por cromatografía en CLAP-I-3 y por carboximetilación y recromatografía en CLAP-I-3	62
<b>Tabla del Capítulo I</b>	<b>63</b>
• Tabla I-1	64
<b>Discusión</b>	<b>65</b>
<b>Metodología</b>	<b>65</b>
<b>Biosíntesis <i>in vivo</i> de AVP-L-[<sup>35</sup>S]Cys, OT-L-[<sup>35</sup>S]Cys y de SRIF-14-L-[<sup>35</sup>S]Cys en el hipotálamo y su acumulación en la neurohipófisis de ratas hidratadas y deshidratadas.</b>	<b>69</b>

<b>Conclusiones</b>	<b>73</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>75</b>
<b>Publicaciones</b>	<b>82</b>
• Artículo	82
• Resúmenes en memorias de congresos internacionales	82

## CAPITULO II.

### **Medición simultánea de la biosíntesis *in vivo* de vasopresina-L-[<sup>35</sup>S]Cys, oxitocina-L-[<sup>35</sup>S]Cys y somatostatina-14-L-[<sup>35</sup>S]Cys en los hipotálamos y las neurohipófisis individuales de ratas despiertas: Efecto del estrés crónico por inmovilización intermitente y de la adrenalectomía.**

**83**

Realizado en el INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MEDICAS Y NUTRICION "SALVADOR ZUBIRAN", Departamento de Bioquímica, México, D.F., México.

Asesor: Dr. Alberto Huberman.

Financiamiento CONACYT a REFB: # PCCBBNA-001716

## **Introducción**

**83**

## **Metodología**

**83**

### **Estímulos del eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenales en la rata: su efecto sobre las neuronas vasopresinérgicas, oxitocinérgicas y somatostatinérgicas**

**84**

- Vasopresina **85**
- Oxitocina **87**
- Somatostatina **88**

## **Planteamiento del problema**

**90**

## **Objetivos**

**90**

## **Materiales y Métodos**

**92**

### **Animales**

**92**

### **Reactivos**

**92**

### **Equipo**

**93**

- Equipo quirúrgico **93**
- Equipo cromatográfico **93**
- Espectrómetro de centelleo líquido **94**

## **Métodos**

**94**

- Técnicas quirúrgicas **94**
  - > Implantación intracraneal de cánulas guía dirigidas al III ventrículo de ratas **94**
  - > Adrenalectomía **96**

• Otras manipulaciones experimentales	97
> Administración intracerebroventricular de L-[ <sup>35</sup> S]Cys	97
> Estrés crónico por inmovilización intermitente	97
> Anestesia profunda	98
• Sistemas cromatográficos en fase reversa CLAP-II-1 y CLAP-II-2	98
> CLAP-II-1	98
> CLAP-II-2	98
• Extracción ácida, purificación y cuantificación de AVP, OT y SRIF-14 marcadas con L-[ <sup>35</sup> S]Cys de los hipotálamos y las neurohipófisis individuales de ratas sometidas a estrés crónico por inmovilización o adrenalectomizadas	99
> Disección de los bloques hipotalámicos	99
> Disección de las neurohipófisis	100
> Extracción con ácido acético, prepurificación por quimioadsorción a octadecilsilano y purificación por CLAP-II-1 y CLAP-II-2 sucesivas	100
> Medición por centelleo líquido de L-[ <sup>35</sup> S]Cys en las fracciones obtenidas por CLAP-II-2	101
> Medición por centelleo líquido de AVP-L-[ <sup>35</sup> S]Cys, OT-L-[ <sup>35</sup> S]Cys y SRIF-14-L-[ <sup>35</sup> S]Cys	101
> Medición de la incorporación de L-[ <sup>35</sup> S]Cys a la proteína de los extractos de los hipotálamos y las neurohipófisis precipitada con ácido acético	102
• Análisis estadístico	103
<b>Resultados</b>	<b>105</b>
Medición simultánea de AVP-L-[ <sup>35</sup> S]Cys, T-L-[ <sup>35</sup> S]Cys y SRIF-14-L-[ <sup>35</sup> S]Cys en los hipotálamos y las neurohipófisis individuales de ratas: purificación por CLAP-II-1 y CLAP-II-2 sucesivas	105
Efecto del estrés crónico por inmovilización intermitente en la rata sobre la biosíntesis <i>in vivo</i> de AVP-L-[ <sup>35</sup> S]Cys, OT-L-[ <sup>35</sup> S]Cys y SRIF-14-L-[ <sup>35</sup> S]Cys en el hipotálamo y su acumulación en la neurohipófisis	107
Efecto de la adrenalectomía en la rata sobre la biosíntesis <i>in vivo</i> de AVP-L-[ <sup>35</sup> S]Cys y OT-L-[ <sup>35</sup> S]Cys en el hipotálamo y su acumulación en la neurohipófisis	109
<b>Figuras del Capítulo II</b>	<b>111</b>
• Figura II-1. Diagrama de la cánula guía de fabricación casera	112
• Figura II-2. Sitio de implantación intracraneal de cánulas guía	113
• Figura II-3. Administración intracerebroventricular de L-[ <sup>35</sup> S]Cys en la rata	114
• Figura II-4. Inducción de estrés crónico por inmovilización en ratas con cánulas guía implantadas	115
• Figura II-5. Cromatogramas/CLAP-II-1 de absorbencia UV representativos, de extractos ácidos completos de hipotálamo y de neurohipófisis individuales, prepurificados por quimioadsorción a octadecilsilano	116
• Figura II-6. Cromatogramas/CLAP-II-2 de absorbencia UV y de radioactividad representativos, de fracciones peptídicas marcadoras/acarreadoras de AVP, OT y SRIF-14 sintéticas	

o endógenas (*) y de las correspondientes dpm totales de AVP-L-[ <sup>35</sup> S]Cys, OT-L-[ <sup>35</sup> S]Cys y SRIF-14-L-[ <sup>35</sup> S]Cys de extractos de hipotálamo y neurohipófisis individuales, previamente purificados por CLAP-II-1	117
• Figura II-7. Biosíntesis <i>in vivo</i> de AVP-L-[ <sup>35</sup> S]Cys, OT-L-[ <sup>35</sup> S]Cys y SRIF-14-L-[ <sup>35</sup> S]Cys en hipotálamos y neurohipófisis individuales de ratas control y de ratas sometidas a estrés crónico por inmovilización intermitente	118
• Figura II-8. Perfiles/CLAP-II-2 de AVP-L-[ <sup>35</sup> S]Cys y de OT-L-[ <sup>35</sup> S]Cys representativos, asociados a las fracciones peptídicas marcadoras/acarreadoras de AVP y de OT de extractos de hipotálamos y de neurohipófisis individuales de ratas control (adrenalectomías simuladas) y de ratas adrenalectomizadas	119
• Figura II-9. Dpm totales de AVP-L-[ <sup>35</sup> S]Cys y de OT-L-[ <sup>35</sup> S]Cys en extractos de hipotálamos y de neurohipófisis individuales de ratas control (adrenalectomías simuladas) y de ratas adrenalectomizadas	120
• Figura II-10. Contenido endógeno total de AVP y de OT en neurohipófisis individuales de ratas control (adrenalectomías simuladas) y de ratas adrenalectomizadas	121
• Figura II-11. Incorporación de L-[ <sup>35</sup> S]Cys a proteína de hipotálamo y de neurohipófisis de ratas control (adrenalectomías simuladas) y de ratas adrenalectomizadas, precipitadas con ácido acético	122
<b>Discusión</b>	<b>123</b>
<b>Metodología</b>	<b>123</b>
Estímulos del eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenales en la rata: su efecto sobre la biosíntesis <i>in vivo</i> de la AVP-L-[ <sup>35</sup> S]Cys, la OT-L-[ <sup>35</sup> S]Cys y la SRIF-14-L-[ <sup>35</sup> S]Cys en el hipotálamo y su acumulación en la neurohipófisis	125
• Estrés crónico por inmovilización intermitente	125
• Adrenalectomía	127
<b>Conclusiones</b>	<b>131</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>133</b>
<b>Publicaciones</b>	<b>152</b>
• Artículo	152
• Resúmenes en memorias de congresos internacionales	152
• Resúmenes en memorias de congresos nacionales	152

## ABREVIATURAS Y FORMULAS QUIMICAS

A	absorbencia
ACTH	hormona adrenocorticotrópica
AMPc	adenosín monofosfato 3',5' cíclico
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
ATP	adenosín trifosfato
AVP	vasopresina
AVP-(SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ) <sub>2</sub>	derivado sulfónico de AVP
°C	grados centígrados
CH <sub>3</sub> CN	acetonitrilo
CLAP	cromatografía líquida de alta presión
cm	centímetros
CM-SRIF-I	derivado carboximetilado I de la SRIF-14
CM-SRIF-II	derivado carboximetilado II de la SRIF-14
cpm	cuentas por minuto
CRF-41	factor liberador de ACTH predominante
Cys	cisteína
DEAE	dietilaminoetil
dpm	desintegraciones por minuto
g	gramos
h	horas
H <sup>+</sup>	protón
<sup>3</sup> H	tritio
5-HT	serotonina
HOAc	ácido acético
<sup>125</sup> I	yodo 125
kg	kilogramo
L	litro
μ	micra
M	molar
μCi	micro Curie
μg	microgramo



mg	miligramo
min	minuto
$\mu\text{L}$	microlitro
mL	mililitro
mm	milímetro
mM	milimolar
NaCl	cloruro de sodio
NaOH	hidróxido de sodio
$\text{NH}_4^+$	ión amonio
nm	nanómetro
OT u OXT	oxitocina
$\text{OT}-(\text{SO}_3)_2$	derivado sulfónico de la OT
Phe	fenilalanina
$\text{PO}_4^{3-}$	fosfato
PVN	núcleo paraventricular
$R_{\text{AVP}}$	receptores de vasopresina
$R_{\text{G}}$	receptores de glucocorticoides
$^{35}\text{S}$	azufre 35
$\text{SO}_4^{2-}$	sulfato
SRIF o SRIF-14	somatostatina-14
TCA	ácido tricloroacético
U	unidad
UV	luz ultravioleta
$V_0$	volumen vacío
$V_s$	volumen salino
ZEEM	zona externa de la eminencia media
ZIEM	zona interna de la eminencia media

## RESUMEN GENERAL

En el presente trabajo se describen dos métodos para medir la biosíntesis *in vivo* de neuropéptidos en la rata como indicador del estado de actividad de ciertas neuronas hipotálamicas bajo diferentes condiciones experimentales. El trabajo se divide en dos capítulos. En el Capítulo I se describe el diseño de una metodología radiométrica, basada en el uso de la cromatografía líquida de alta presión (CLAP) en fase reversa, para la **medición simultánea** de la biosíntesis *in vivo* de vasopresina (AVP)-L-[<sup>35</sup>S]Cys, oxitocina (OT)-L-[<sup>35</sup>S]Cys y somatostatina-14 (SRIF-14)-L-[<sup>35</sup>S]Cys en los extractos de ácido acético de hipotálamos combinados y su acumulación en los correspondientes extractos ácidos de neurohipófisis combinadas de **5 ratas anestesiadas**, después de la administración intracerebroventricular de la marca radioactiva. Se muestra la aplicación de esta metodología a la comparación de la biosíntesis de estos neuropéptidos en ratas hidratadas y deshidratadas.

En el Capítulo II se describen algunas variantes a la metodología descrita en el Capítulo I. Para evitar la interferencia de una anestesia profunda y del trauma de una trepanación, aquí se implantaron cánulas guía a ratas para poder administrar intracerebroventricularmente la marca radioactiva a ratas que estuvieran **despiertas** durante el tiempo de marcaje de los neuropéptidos. En este capítulo se describen simplificaciones hechas al procedimiento de purificación simultánea de los neuropéptidos marcados. Con esta metodología se midió simultáneamente la biosíntesis *in vivo* de AVP-L-[<sup>35</sup>S]Cys, OT-L-[<sup>35</sup>S]Cys y SRIF-14-L-[<sup>35</sup>S]Cys extraídos con ácido acético de hipotálamos y neurohipófisis **individuales** de ratas despiertas sometidas a estrés crónico por inmovilización o a ratas adrenalectomizadas como respuesta de las

neuronas hipotalámicas vasopresinérgicas, oxitocinérgicas y somatostatinérgicas frente a estas manipulaciones del eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenales. El método de purificación de los neuropéptidos-L-[<sup>35</sup>S]Cys se basó en el uso de 2 pasos sucesivos de CLAP en fase reversa.

## CAPITULO I

AVP-L-[<sup>35</sup>S]Cys, OT-L-[<sup>35</sup>S]Cys, y SRIF-14-L-[<sup>35</sup>S]Cys se purificaron de extractos con ácido acético de 5 hipotálamos combinados y de 5 neurohipófisis combinadas, 4h después de la administración al III ventrículo de L-[<sup>35</sup>S]Cys a **ratas anestesiadas con pentobarbital y recién trepanadas**. Los neuropéptidos-L-[<sup>35</sup>S]Cys se prepurificaron sucesivamente por filtración en Sephadex G25 y quimioadsorción a octadecilsilano, usando cartuchos comerciales Sep-Pak-C<sub>18</sub> y separados por CLAP en fase reversa empleando columnas de  $\mu$ Bondapak C<sub>18</sub> y gradientes lineales de CH<sub>3</sub>CN. Su identidad y grado de pureza isotópica se determinaron por diferentes procedimientos de CLAP en columnas  $\mu$ Bondapak C<sub>18</sub> (con apareamiento iónico o por cromatografía isocrática), en su forma natural y después de su modificación química. Las fracciones peptídicas marcadas mostraron, por lo menos, una pureza radioquímica del 50%. De los 3 péptidos estudiados, sólo la AVP-L-[<sup>35</sup>S]Cys de los extractos ácidos de hipotálamo mostró una recuperación baja, aunque reproducible.

Empleando esta metodología, se comparó la incorporación de la marca a AVP, OT y SRIF-14 en ratas hidratadas y deshidratadas. La incorporación de la marca a la AVP y a la OT en el hipotálamo y en la neurohipófisis de las ratas deshidratadas fue 2 a 3 veces mayor que en las ratas hidratadas. La incorporación de la marca a la SRIF-14 en el

hipotálamo y en la neurohipófisis no se afectó por el estado de hidratación de los animales.

## CAPITULO II

Para eliminar la interferencia del trauma de la cirugía de trepanación y de la anestesia presentes en los estudios descritos en el Capítulo I y simplificar el procedimiento de purificación de los neuropéptidos-L-[<sup>35</sup>S]Cys de hipotálamos y de neurohipófisis, aquí se introdujeron varias modificaciones metodológicas, que incluyeron:

- El diseño y la implantación de cánulas guía dirigidas al III V como vía de administración al III ventrículo de la marca radioactiva en ratas bajo anestesia breve (no más de 5 min), para evitar la interferencia del trauma de una trepanación y de una anestesia profunda en el momento de la administración de la marca, buscando mediciones de biosíntesis de AVP-L-[<sup>35</sup>S]Cys, OT-L-[<sup>35</sup>S]Cys y SRIF-14-L-[<sup>35</sup>S]Cys que mejor reflejen el estado de actividad de las correspondientes neuronas hipotalámicas peptidérgicas en respuesta a manipulaciones experimentales.
- La simplificación del procedimiento de purificación de los neuropéptidos-L-[<sup>35</sup>S]Cys extraídos de hipotálamos y de neurohipófisis **individuales** (ya no de 5 tejidos combinados) eliminando el paso lento de filtración en gel por un paso rápido de CLAP en fase reversa y gradiente lineal de CH<sub>3</sub>CN.

Como demostración de la sensibilidad de este método para reflejar cambios en el estado de actividad de las neuronas vasopresinérgicas, oxitocinérgicas y somatostatinérgicas se evaluaron en ratas individuales los efectos del estrés crónico por inmovilización intermitente y de la adrenalectomía sobre la biosíntesis *in vivo* de AVP-L-

[<sup>35</sup>S]Cys, OT-L-[<sup>35</sup>S]Cys y SRIF-14-L-[<sup>35</sup>S]Cys en el hipotálamo y su acumulación en la neurohipófisis.

#### Estrés crónico por inmovilización

En ratas macho sujetas a estrés crónico por inmovilización intermitente durante 3 días (6h/día), se incrementaron los niveles de OT-L-[<sup>35</sup>S]Cys hipotalámico y neurohipofisiario, paralelamente con la reducción de la OT neurohipofisiaria endógena equivalente al 30% de su nivel en ratas control, lo que concuerda con el aumento en el nivel plasmático de OT reportado por otros autores en ratas inmovilizadas. Estos resultados sugieren la activación selectiva de neuronas oxitocinérgicas magnocelulares en ratas macho bajo estrés crónico por inmovilización, sin cambio apreciable en el estado de actividad de las neuronas vasopresinérgicas ni somatostatinérgicas.

#### Adrenalectomía

A los 20 días de una adrenalectomía bilateral y 4h después de la administración de la L-[<sup>35</sup>S]Cys, las ratas macho adrenalectomizadas mostraron un aumento selectivo en los niveles hipotalámicos de AVP-L-[<sup>35</sup>S]Cys, sin cambio apreciable en los niveles de OT-L-[<sup>35</sup>S]Cys, en comparación con las ratas macho sometidas a una adrenalectomía simulada. Además, comparativamente con las ratas control, las ratas adrenalectomizadas mostraron en la neurohipófisis un aumento en los niveles de AVP-L-[<sup>35</sup>S]Cys y de OT-L-[<sup>35</sup>S]Cys, sin cambio en el contenido endógeno de AVP y OT. Estas observaciones sugieren la desinhibición significativa de neuronas vasopresinérgicas parvocelulares del PVN en ratas macho adrenalectomizadas por deficiencia de glucocorticoides, en concordancia con los cambios en el nivel de inmunotinción de AVP y el aumento en los niveles de ARNm de AVP en las neuronas parvocelulares del PVN de ratas adrenalectomizadas, reportados por otros autores,

además de una respuesta, aunque de menor intensidad, de las neuronas vasopresinérgicas y oxitocinérgicas magnocelulares del PVN.

## CAPITULO I

Medición simultánea de la biosíntesis *in vivo* de vasopresina-L-[<sup>35</sup>S]Cys, oxitocina-L-[<sup>35</sup>S]Cys y somatostatina-14-L-[<sup>35</sup>S]Cys en el hipotálamo y su acumulación en la neurohipófisis de ratas anestesiadas: Efecto de la deshidratación.

### Introducción

La purificación de neuropéptidos marcados radioactivamente *in vivo* o *in vitro* es difícil, por ser éstos una pequeña fracción del total de la radioactividad de los extractos de tejido. Sachs fue el primero en estudiar la biosíntesis *in vivo* de vasopresina (AVP) marcada con L-[<sup>35</sup>S]Cys en el hipotálamo del perro (I-1, I-2, I-3) e *in vitro* en fragmentos de hipotálamo de rata (I-3, I-4) o en explantes de hipotálamo-hipófisis de cobayo (I-5). En estos estudios, la recuperación y cuantificación de las fracciones de AVP-L-[<sup>35</sup>S]Cys tomaba varias semanas. Los procedimientos empleados para purificar estas pequeñas fracciones de radioactividad del total de la radioactividad del tejido involucraban varios pasos de cromatografía, que además eran lentos.

Los procedimientos de purificación de neuropéptidos marcados radioactivamente variaron poco en el curso de 10 años. Involucraban varios pasos de cromatografía por intercambio iónico empleando resinas (XE-64, en su forma H<sup>+</sup> y NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) o celulosas modificadas (carboximetil-[CM]-celulosa y dietil-aminoetil-[DEAE]-celulosa), además de muchas horas de diálisis (I-6, I-7). Más adelante Sachs *et al.* (I-5) incluyeron en su esquema de purificación de AVP-L-[<sup>35</sup>S]Cys un paso de purificación por bioadsorción a agarosa modificada covalentemente con neurofisina (la proteína acarreadora de la AVP).

Los primeros estudios acerca de la biosíntesis de somatostatina-14 (SRIF-14) se realizaron *in vitro* en islotes de Langerhans del *Lophius piscatorius* (I-8) y de la rata (I-9), o empleando fragmentos de hipotálamo (I-10). La SRIF-14, marcada con L-[<sup>35</sup>S]Cys o con L-[<sup>3</sup>H]Phe, se purificó y caracterizó por inmunoadsorción (I-9, I-10) o por electroforesis en geles de poliacrilamida (I-8).

Con el advenimiento de la cromatografía líquida de alta presión (CLAP) (I-11) se facilitaron los estudios sobre la biosíntesis de péptidos dentro y fuera del sistema nervioso central. Por su rapidez, alto poder de resolución, gran versatilidad y compatibilidad con sistemas amortiguadores volátiles, así como por su acoplamiento fácil a diversos instrumentos de medición altamente sensibles, la CLAP ha demostrado ser un método invaluable para la purificación, caracterización y medición precisa de múltiples neuropéptidos extraídos de diversos tejidos (I-12, I-13, I-14, I-15, I-16, I-17).

Aquí se describe un método basado en la CLAP para la medición simultánea de la biosíntesis *in vivo* en el hipotálamo de AVP, OT y SRIF-14 marcadas con L-[<sup>36</sup>S]Cys y su acumulación en la neurohipófisis. Una vez establecidas la identidad y grado de pureza radioquímica de los neuropéptidos-L-[<sup>36</sup>S]Cys también por CLAP, con y sin modificación química, se probó la utilidad del método para medir comparativamente la actividad de neuronas vasopresinérgicas, oxitocinérgicas y somatostatinérgicas bajo diferentes condiciones osmóticas y natriuréticas en el hipotálamo de ratas hidratadas y deshidratadas, que se sabe regulan la actividad de las neuronas vasopresinérgicas y oxitocinérgicas (I-18).



## Planteamiento del problema

La purificación de neuropéptidos marcados radioactivamente *in vivo* es muy laboriosa. Involucra la obtención de tan solo una pequeñísima fracción del total de la radioactividad de los extractos de gramos de tejido nervioso marcado. El aislamiento de un péptido marcado mediante el uso de técnicas convencionales involucra varios pasos cromatográficos, habitualmente lentos, con muchas horas de diálisis intercaladas. En estas condiciones la purificación de un sólo neuropéptido marcado puede llevar varias semanas. Un procedimiento así es poco práctico si, a partir de la medición de la biosíntesis del péptido, se busca conocer el estado de actividad de la neurona peptidérgica correspondiente bajo diferentes condiciones fisiológicas.

Con el advenimiento de la CLAP, un procedimiento analítico rápido, de alto poder de resolución y compatible con sistemas de disoluciones amortiguadoras volátiles, surge la posibilidad de extraer, purificar y cuantificar de manera simultánea y en un tiempo relativamente corto, múltiples neuropéptidos marcados radiactivamente, partiendo sólo de miligramos de tejido marcado. Ello posibilita medir, de manera relativamente rápida, la capacidad de biosíntesis de ciertos neuropéptidos como un índice de actividad de diversas neuronas peptidérgicas en un mismo tejido de un modelo animal sometido a diferentes condiciones experimentales .

En este trabajo se planteó la posibilidad de estudiar simultáneamente la biosíntesis *in vivo* de AVP, OT y SRIF-14 en el hipotálamo y la neurohipófisis de ratas marcadas intracerebroventricularmente con L-[<sup>35</sup>S]Cys mediante un método radiométrico rápido basado en la CLAP en fase reversa, y posteriormente probar la sensibilidad del método para reflejar cambios en el estado de actividad de las correspondientes neuronas

peptidérgicas del sistema hipotálamo-neurohipofisiario bajo diferentes condiciones fisiológicas.

## Objetivos

- ◆ Diseñar una metodología radiométrica, basada en la CLAP en fase reversa, para la medición de la biosíntesis *in vivo* de AVP-L-[<sup>35</sup>S]Cys, OT-L-[<sup>35</sup>S]Cys y SRIF-14-L-[<sup>35</sup>S]Cys en los hipotálamos y su acumulación en las neurohipófisis de ratas anestesiadas.
- ◆ Determinar por CLAP en fase reversa la identidad y grado de pureza radioactiva de las fracciones peptídicas de AVP-L-[<sup>35</sup>S]Cys, OT-L-[<sup>35</sup>S]Cys y SRIF-14-L-[<sup>35</sup>S]Cys extraídas de los hipotálamos y las neurohipófisis de ratas.
- ◆ Aplicar esta metodología a la medición comparativa de la biosíntesis *in vivo* de AVP-L-[<sup>35</sup>S]Cys, OT-L-[<sup>35</sup>S]Cys y SRIF-14-L-[<sup>35</sup>S]Cys en los hipotálamos y su acumulación en las neurohipófisis de ratas hidratadas y de ratas deshidratadas con NaCl al 2% durante 5 días, para probar la sensibilidad del método para detectar diferencias en la actividad de las neuronas vasopresinérgicas, oxitocinérgicas y somatostatinérgicas en el sistema hipotálamo-neurohipofisiario de la rata bajo estas condiciones osmóticas y natriuréticas diferentes.

## **Materiales y Métodos**

### **Animales**

Se usaron ratas Wistar macho (Charles River, Wilmington MA) de 200-250 g de peso corporal. Las ratas se mantuvieron bajo observación una semana antes de ser manipuladas experimentalmente en el bioterio aclimatado del Instituto, con un régimen de iluminación de 12h de luz y 12h de oscuridad. Las ratas tuvieron acceso libre a alimento para roedores Purina (Ralston-Purina, St. Louis MO) y a agua de la llave.

Un grupo de ratas se deshidrató sustituyendo su agua de beber por una disolución de NaCl al 2% preparada con agua de la llave, durante 5 días (1-18). En este período las ratas aumentaron progresivamente su consumo del fluido de beber y su flujo de orina. Al término de los 5 días, las ratas deshidratadas pesaron, en promedio, 40 g menos que los controles.

### **Reactivos**

Todos los reactivos fueron del grado de pureza más alto disponible en el mercado. A continuación se especifican algunos de ellos: AVP, Ferring AB, (Malmö, Suecia); OT, Bachem Fine Chemicals, Inc., (Torrance CA, USA); SRIF-14, Sigma Chem. Co., (St. Louis MO, USA); Boehringer Mannheim Biochemicals, (Indianapolis IN, USA); Bachem Fine Chemicals, Inc.; L-[<sup>35</sup>S]cistina, con una actividad específica de 500-600 Ci/mmol, New England Nuclear Corp. (Boston MA, USA); acetonitrilo (CH<sub>3</sub>CN), grado CLAP, Fisher Scientific Co. (Fair Lawn NJ, USA); ácido acético (HOAc), grado amortiguador, Pierce Chemical Co. (Rockford, IL, USA); sal sódica del ácido 1-hexanosulfónico, Eastman Kodak (Rochester NY, USA).

## Equipo

- Equipo cromatográfico

El cromatógrafo para gradientes fue de Micromeritics, modelo 7000 B (Norcross GA, USA) de temperatura regulable. La columna fue una  $\mu$ Bondapak C<sub>18</sub> de Waters de 3.9 mm x 30 cm (Milford MA, USA), protegida con una precolumna Whatman CSK I, empacada con Co Pell ODS (Clifton NJ, USA). El espectrofotómetro fue un Gilford, modelo 2400, con una celdilla del flujo, modelo 203 (Oberlin OH, USA), ajustado a 210 nm. El registrador fue de Linear Instruments Corp., modelo 285 (Irvine CA, USA), ajustado a 1 cm/min. El colector de fracciones fue un Redi-Rac de LKB, modelo 2112 (Bromma, Suecia). Las jeringas de 100  $\mu$ L para la inyección de las muestras fueron de Micromeritics.

- Equipo quirúrgico

Instrumento estereotáxico para animales pequeños de David Kopf Instruments, modelo 900 (Tujunga CA, USA); jeringas Hamilton 701-N de 10  $\mu$ L (Reno NE, USA) para la administración intracerebroventricular del precursor radioactivo.

- Espectrómetro de centelleo líquido.

El espectrómetro de centelleo líquido fue un Beckman, modelo LS 7000 (Berkeley CA, USA) empleado a temperatura ambiente (20°C) y ajustado a las condiciones de conteo óptimo de [<sup>35</sup>S].

## Métodos

- Sistemas cromatográficos en fase reversa CLAP-I-1, CLAP-I-2, CLAP-I-3

Los sistemas cromatográficos para la purificación y caracterización de AVP, OT y SRIF-14, marcados con L-[<sup>35</sup>S]Cys, fueron sistemas en fase reversa diseñados con base en las características iónicas e hidrofóbicas de los neuropéptidos (Fig. I-1), que determinan su comportamiento cromatográfico en columnas de octadecilsilano ( $\mu$ Bondpak C<sub>18</sub>) (Fig. I-2).

### ➤ CLAP-I-1

Gradiente lineal : CH<sub>3</sub>CN de 5-40% en acetato de amonio 0.01M, pH 4.0. (Disolución amortiguadora orgánica liofilizable). Duración: 40 min. Flujo: 2 mL/min. Temperatura: Ambiente (20°C).

### ➤ CLAP-I-2

Gradiente lineal : CH<sub>3</sub>CN de 5-60% en HOAc 0.02M, con 0.1% de la sal sódica del ácido 1-hexanosulfónico (apareamiento iónico). Duración: 40 min. Flujo: 2 mL/min. Temperatura: 60°C.

### ➤ CLAP-I-3

Condiciones isocráticas: CH<sub>3</sub>CN al 26% en acetato de trietilamonio 0.25M, pH 3. [Disolución amortiguadora orgánica liofilizable, (I-12)]. Flujo: 1.5 mL/min. Temperatura: Ambiente (20°C).

Las disoluciones amortiguadoras acuosas se prepararon con agua bidestilada, desionizada y ultrapurificada en Milli Q de Millipore Corp. (Bedford MA, USA). Antes de mezclarse con el CH<sub>3</sub>CN previamente filtrado, las disoluciones amortiguadoras acuosas

se filtraron a través de membranas Millipore, tipo HAWP, 0.45  $\mu$ . El  $\text{CH}_3\text{CN}$  se filtró a través de membranas Millipore, tipo FHLP, 0.5  $\mu$ . Justo antes de usarse, las disoluciones amortiguadoras orgánicas se desgasificaron al vacío, con ultrasonificación.

- Métodos de modificación química de AVP, OT y SRIF-14

- *Oxidación de la AVP y la OT con ácido per fórmico*

Se empleó el método de Hirs (I-19). Se incubaron 2-6  $\mu\text{g}$  de AVP u OT con 100  $\mu\text{l}$  de ácido per fórmico a  $-8^\circ\text{C}$ , en un baño de hielo con sal. (*El ácido per fórmico se obtuvo combinando ácido fórmico con peróxido de hidrógeno (9:1), a temperatura ambiente, durante 45 min (I-20)*). La reacción se detuvo con la adición de 1 mL de agua fría. Los productos de oxidación (los derivados sulfónicos de AVP y OT) se concentraron a sequedad y se caracterizaron por CLAP-I-1. La recuperación de los péptidos después de la oxidación fue del 65%.

En algunos casos, con el propósito de confirmar su identidad, los productos de oxidación de AVP y OT se purificaron por cromatografía de intercambio iónico empleando DEAE-celulosa (I-7) antes de su cromatografía en CLAP-I-1. En estos casos, la mezcla de la reacción de oxidación se concentró a sequedad y el residuo resuspendido en 100  $\mu\text{L}$  de acetato de amonio 0.01 M, pH 6.9 y mediante rotación suave, mezclado con 2 mL de una suspensión de 2 g/10 mL de DEAE-celulosa, previamente equilibrada en la misma disolución amortiguadora. Al cabo de una hora, se lavó la celulosa con 6 mL del acetato de amonio 0.01 M, pH 6.9 y después se eluyeron los péptidos en 2 etapas con un total de 4 mL de acetato de amonio 0.2 M, pH 6.0. El eluido se concentró a sequedad y caracterizado por CLAP-I-1.

➤ *Carboximetilación de la SRIF-14*

La SRIF-14 se carboximetiló empleando el procedimiento de Spiess (I-13). Las reacciones se llevaron al cabo a temperatura ambiente. De 2-8  $\mu\text{g}$  de SRIF-14 se redujeron durante 4h en 50  $\mu\text{L}$  de una disolución recién preparada de ditioneitol (DTT) 50 mM en acetato de trietilamonio 0.5 M, pH 8.7. Enseguida la SRIF-14 se carboximetiló en la obscuridad usando una disolución recién preparada de ácido yodoacético 50 mM en la disolución amortiguadora del DTT. *(Es preciso ajustar el pH de las disoluciones de DTT y del ácido yodoacético a 8.7 con trietilamina una vez disueltos los reactivos).* Después de 5 min la reacción se detuvo con 1 mL de HOAc al 10%. Los productos de carboximetilación se concentraron a sequedad y analizaron por CLAP-I-3.

- Administración intracerebroventricular de L-[ $^{35}\text{S}$ ]Cys a ratas anestesiadas.

Las ratas se anestesiaron con 50 mg/kg de peso corporal de pentobarbital sódico (Nembutal) de Abbott Laboratories (North Chicago IL, USA). Se fijó su cabeza en el instrumento estereotáxico para animales pequeños con la nariz dirigida 2.4 mm abajo de la línea interaural, conforme a las coordenadas de König y Klippel (I-21). Enseguida se hizo una incisión sagital-media en la piel que se retrajo suavemente con un aplicador y se removió el tejido conectivo del cráneo para visualizar las suturas. Manualmente se hizo una trepanación en la línea media, 2 mm atrás de bregma, empleando una aguja desechable, calibre #20, con un tope de polietileno ajustado a 3 mm de la punta. Una vez controlado el sangrado del seno sagital superior, se introdujo al cerebro de la rata la aguja de una jeringa Hamilton 701-N (fijado al soporte universal del estereotáxico) 8.5 mm hasta alcanzar el III ventrículo (Figs. I-3). *(La localización del sitio de inyección se verificó en otro grupo de ratas inyectando 1  $\mu\text{L}$  de azul de metileno disuelto en salina [0.9% de NaCl]).* Enseguida se inyectaron, durante 7 min, 50  $\mu\text{Ci}$  de L-[ $^{35}\text{S}$ ]Cys

contenidos en 1  $\mu$ L de una disolución de DTT 10 mM en salina. Finalmente, se cerró la herida de la piel con grapas quirúrgicas. Las ratas permanecieron bajo el efecto del anestésico durante aproximadamente 3h.

- Extracción ácida y caracterización por CLAP, con o sin modificación química, de los neuropéptidos-L-[<sup>36</sup>S]Cys de los hipotálamos y las neurohipófisis de ratas hidratadas o deshidratadas

➤ *Disección de los bloques hipotalámicos*

Se extirpó el cerebro del cráneo cortando ventralmente los nervios ópticos y luego el tallo hipofisiario, quedando éste unido al hipotálamo. Enseguida se colocó el cerebro sobre una placa de vidrio sobre hielo con la parte ventral viendo hacia arriba.

Empleando un bisturí #11 de Aesculap-Werke AB, (Tübingen, Alemania) se obtuvo una rebanada de cerebro haciendo 2 cortes coronales, uno anterior al quiasma óptico y otro anterior a los cuerpos mamilares (Fig. I-4). Luego, colocando la rebanada sobre su superficie caudal, se hicieron 2 cortes sagitales a 3 mm de cada lado de la línea media. El bloque hipotalámico se obtuvo finalmente haciendo el último corte a la altura de la comisura anterior (Fig. I-4).

Con el propósito de prevenir la degradación de los neuropéptidos marcados con L-[<sup>36</sup>S]Cys, una vez disecados los bloques hipotalámicos se procesaron inmediatamente sin pesarlos. Su tamaño se estimó por su contenido de proteína total precipitable con HOAc 2M (*obtenido en el primer paso de purificación de los neuropéptidos marcados y descrito más adelante*), que en promedio fue de 7.7 +/- 0.9 mg/bloque (n=24).



➤ *Disección de las neurohipófisis*

Las neurohipófisis se separaron de las adenohipófisis con pinzas finas. En ocasiones se separaron las neurohipófisis junto con el lóbulo intermedio.

➤ *Extracción con ácido acético de los neuropéptidos-L-[<sup>35</sup>S]Cys*

Los bloques hipotalámicos o las neurohipófisis de 5 ratas de un mismo grupo experimental, que recibieran intracerebroventricularmente L-[<sup>35</sup>S]Cys, se combinaron y procesaron a 4°C en tubos de polipropileno, inmediatamente después de su disección. Los neuropéptidos-L-[<sup>35</sup>S]Cys se extrajeron por homogeneización de los tejidos en 4 mL de HOAc 2 M, conteniendo 0.01% de albúmina sérica bovina (fracción V, ICN Pharmaceuticals, Inc., Cleveland OH, USA) y 0.01% de NaN<sub>3</sub>, en presencia de 10 µg de cada uno de los neuropéptidos sintéticos AVP, OT y SRIF-14. Los péptidos sintéticos sirvieron como acarreadores de los péptidos radioactivos, fueron marcadores cromatográficos en la CLAP y las mediciones de su recuperación se emplearon como un índice del rendimiento de los péptidos radioactivos al final del proceso de purificación.

Los homogeneizados se centrifugaron a 10 000 xg durante 1h, en una centrifuga Sorvall refrigerada RC-5 de Dupont Instruments (Newton CT, USA). Se separaron los extractos solubles en ácido y se lavaron las pastillas de la proteína precipitada en el HOAc con 4 mL de la disolución ácida extractante. Se combinaron los extractos y los lavados correspondientes, que se mantuvieron a 0°C en hielo para continuar su procesamiento al día siguiente. Las pastillas de proteína se almacenaron a -70°C, hasta que se les midió su nivel de incorporación de L-[<sup>35</sup>S]Cys.

➤ *Prepurificación-I de los neuropéptidos-L-[<sup>35</sup>S]Cys por filtración en gel*

Los extractos solubles en ácido se sometieron a cromatografía por filtración en gel. Se empleó una columna de Sephadex G25 fino (Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway NJ, USA) de 2.5 cm x 18 cm, montada a 4°C en un tubo de plexiglass. El Sephadex se equilibró en una disolución de HOAc 2 M con 0.01% de albúmina sérica bovina y 0.01% de NaN<sub>3</sub>, misma en la que se montó la columna y se usó como eluyente. El flujo de 40 mL/min se mantuvo con una bomba peristáltica de Buchler Instruments (Fort Lee NJ, USA). La columna se calibró con prolactina-I<sup>125</sup> y I<sup>126</sup>.

Antes de cromatografiar la prolactina-I<sup>125</sup>, el I<sup>126</sup> o los extractos solubles en ácido de los tejidos, se recubrió el Sephadex en la columna con 2 mL de una disolución de albúmina sérica bovina al 2% en la misma disolución ácida del sistema, para evitar la adsorción inespecífica de los neuropéptidos al dextrán. Se colectaron fracciones de 2 mL en tubos (10 x 75 mm) de polietileno Falcon (Oxnard CA, USA). La radioactividad asociada a cada fracción se midió por centelleo líquido empleando alícuotas de 50 µL.

En la Fig. I-5 se ilustran los perfiles de elución radioactivos representativos de los extractos solubles en ácido de los hipotálamos y de las neurohipófisis de las ratas hidratadas. En ambos casos los extractos se desdoblaron en 2 picos: se descartó el primero, que eluyó en el volumen vacío (V<sub>0</sub>); el segundo, conteniendo los neuropéptidos marcados con L-[<sup>35</sup>S]Cys, que eluyó entre el V<sub>0</sub> y el volumen salino (V<sub>s</sub>), se continuó procesando.

➤ *Prepurificación-II de los neuropéptidos-L-[<sup>35</sup>S]Cys por quimioadsorción a octadecilsilano*

El segundo de los dos picos obtenidos por filtración en gel de los extractos solubles en ácido de los hipotálamos o de las neurohipófisis (Fig. I-5), conteniendo los neuropéptidos marcados con L-[<sup>35</sup>S]Cys y con un volumen aproximado de 40 mL, se filtró a través de un cartucho Sep Pak C<sub>18</sub> (Waters Associates), prehumedecido con 10 mL de isopropanol y lavado exhaustivamente con agua desionizada y ultrapurificada. Los neuropéptidos adsorbidos al soporte cromatográfico se lavaron con 3 mL de la disolución de HOAc extractante y posteriormente eluidos con 6 mL de CH<sub>3</sub>CN al 75% en la misma disolución ácida. Este extracto peptídico se concentró a sequedad en presencia de 1 mg de albúmina sérica bovina previo a su purificación por CLAP-I-1.

➤ *Purificación de los neuropéptidos-L-[<sup>35</sup>S]Cys por CLAP-I-1*

Los extractos peptídicos de los hipotálamos o de las neurohipófisis prepurificados sucesivamente por filtración en gel y quimioadsorción a octadecilsilano se purificaron finalmente por CLAP-I-1. Se colectaron fracciones de 600 µL (20 seg) en tubos de polipropileno Eppendorf (Brinkman Instruments, Westbury NY, USA)

La radioactividad asociada a cada fracción recolectada se midió por centelleo líquido en alícuotas de 100 ó 200 µL.

A las fracciones radioactivas obtenidas por CLAP-I-1, que coeluyeron con AVP, OT y SRIF-14 sintéticas (supuestamente AVP-L-[<sup>35</sup>S]Cys, OT- L-[<sup>35</sup>S]Cys y SRIF-14- L-[<sup>35</sup>S]Cys) se les confirmó su identidad y determinó su grado de pureza radioquímica. Las fracciones se concentraron a sequedad individualmente en un concentrador Speed Vac (Savant, Hicksville NY, USA) y recromatografiadas o modificadas químicamente

(derivados sulfónicos de AVP y de OT; derivado carboximetilado de SRIF-14) y recromatografiadas en alguno de los 3 sistemas de CLAP descritos.

➤ *Identidad y pureza radioquímica de la AVP-L-[<sup>35</sup>S]Cys y la OT-L-[<sup>35</sup>S]Cys purificadas por CLAP-I-1*

Parte del material radioactivo identificado como AVP-L-[<sup>35</sup>S]Cys y OT-L-[<sup>35</sup>S]Cys se recromatografió por CLAP-I-2. Se colectaron fracciones de 600 µL que se usaron íntegramente para hacer mediciones de radioactividad por centelleo líquido.

La parte restante del material radioactivo identificado como AVP-L-[<sup>35</sup>S]Cys y OT-L-[<sup>35</sup>S]Cys se oxidó con ácido perfórmico y los productos de oxidación (o sea los derivados sulfónicos de estos péptidos) se caracterizaron por CLAP-I-1. Se colectaron fracciones de 600 µL que se usaron íntegramente para las mediciones de radioactividad por centelleo líquido.

➤ *Identidad y pureza radioquímica de la SRIF-14-L-[<sup>35</sup>S]Cys purificada por CLAP-I-1*

El total del material purificado por CLAP-I-1 e identificado como SRIF-14-L-[<sup>35</sup>S]Cys se recromatografió por CLAP-I-3. Se colectaron fracciones de 600 µL. Una parte de este material se empleó para mediciones de radioactividad por centelleo líquido y la otra parte se carboximetiló. Los productos de la reacción de carboximetilación se caracterizaron por CLAP-I-3. Se colectaron fracciones de 600 µL que se usaron íntegramente para las mediciones de radioactividad por centelleo líquido.

- Mediciones de radioactividad por centelleo líquido
  - *Medición de los neuropéptidos-L-[<sup>35</sup>S]Cys naturales o modificados químicamente*

La determinación de la L-[<sup>35</sup>S]Cys incorporada a los neuropéptidos y asociada a las fracciones colectadas en los diferentes sistemas cromatográficos empleados en la purificación y caracterización de los neuropéptidos naturales o modificados químicamente (filtración en gel, CLAP-I-1, CLAP-I-2 y CLAP-I-3), se hizo por medición de la radioactividad en alícuotas de:

- ◆ 50 µL de las fracciones de 2 mL obtenidas por filtración en gel
- ◆ 100-600 µL de las fracciones de 600 µL obtenidas por CLAP-I-1, CLAP-I-2 y CLAP-I-3.

La radioactividad en las alícuotas se midió en frasquitos de polietileno, conteniendo 3 mL (para alícuotas de 50 µL) ó 5 mL (para alícuotas de 100-600 µL) del líquido de centelleo comercial Scinti-Verse (SV) (Fisher Scientific Co.) con Tritón X100 (T) (Amersham Corp., Arlington Heights IL, USA) mezclados en una proporción de 8:2 (SV/T). La eficiencia máxima de conteo del [<sup>35</sup>S] fue del 90%. Esta eficiencia decayó con el decaimiento del radioisótopo, pero fue independiente del volumen y de la composición química de las muestras estudiadas aquí.

Las cpm totales asociadas a cada fracción peptídica (natural o modificada químicamente) se obtuvieron corrigiendo las cpm parciales a 100% de recuperación. Los porcentajes de recuperación de los neuropéptidos-L-[<sup>35</sup>S]Cys fueron iguales a los de recuperación de sus análogos sintéticos añadidos a los extractos al inicio del proceso de purificación, con los que se modificaron químicamente en algunas instancias, y con los que coeluyeron en los diversos sistemas de CLAP. Los porcentajes

de recuperación de los péptidos sintéticos se determinaron por absorbencia UV a 210 nm, midiendo la altura de los picos comparativamente con la de los picos de patrones conocidos.

➤ *Medición de la incorporación de L-[<sup>35</sup>S]Cys a la proteína de los extractos de los hipotálamos y las neurohipófisis precipitada con ácido acético*

La incorporación de L-[<sup>35</sup>S]Cys a la proteína de los hipotálamos o de las neurohipófisis precipitada con HOAc 2M al inicio del proceso de purificación de los neuropéptidos-L-[<sup>35</sup>S]Cys se midió conforme al procedimiento de Hirs (I-24).

Los pasos a seguir fueron:

- ✎ Eliminar, por evaporación, el HOAc residual de fracciones pequeñas de las pastillas de la proteína precipitada con HOAc de 5 hipotálamos o de 5 neurohipófisis.
- ✎ Suspender los residuos proteínicos de los hipotálamo o de las neurohipófisis en 800  $\mu$ L ó 200  $\mu$ L de urea 10M y adicionar 10  $\mu$ L ó 1  $\mu$ L de  $\beta$ -mercaptoetanol a cada fracción proteínica, respectivamente, y calentar 2 min a 100°C.
- ✎ Añadir a los extractos proteínicos de los hipotálamos y de las neurohipófisis 200  $\mu$ L ó 20  $\mu$ L, respectivamente, de una disolución de ácido yodoacético 2.5M (Sigma Chemical Co.) recién preparada y calentar 30 min a 37°C. (*La carboximetilación de las fracciones proteínicas tiene por objeto eliminar la L-[<sup>35</sup>S]Cys de alta actividad específica asociada inespecíficamente a la proteína a través de puentes disulfuro.*)
- ✎ Adicionar 50  $\mu$ L y 5  $\mu$ L de  $\beta$ -mercaptoetanol a las fracciones hipotalámicas o neurohipofisiarias, respectivamente, y precipitar la proteína con el volumen de tricloroacético (TCA) al 100% necesario para obtener en las muestras una concentración final de TCA del 10%, y calentar 5 min a 100°C.
- ✎ Lavar los precipitados sucesivamente con TCA al 10%, etanol y éter. Evaporar el éter.

- ✖ Resuspender a 37°C durante 10 h las fracciones proteínicas precipitadas de los hipotálamo o de las neurohipófisis en 1 mL y 0.6 mL de NaOH 1N, respectivamente.
- ✖ Por duplicado, precipitar alícuotas de 100  $\mu$ L y 200  $\mu$ L de las disoluciones alcalinas de los hipotálamos y de las neurohipófisis, respectivamente, con 2 mL de TCA al 10%.
- ✖ Recoger los precipitados en discos de fibra de vidrio 934-AH (Whatman) de 2.4 cm de diámetro y lavarlos sucesivamente por filtración con vacío con TCA al 5%, etanol y éter.
- ✖ Secar los discos durante 45 min bajo una lámpara de luz infrarroja, colocada a una altura de 25 cm del nivel de los discos.
- ✖ Medir la radioactividad recogida en los discos, colocándolos en frasquitos de vidrio con niveles bajos de potasio, conteniendo 5 mL de líquido de centelleo SV-T. La eficiencia máxima de conteo fue del 100%.
- ✖ Por duplicado, medir la concentración de la proteína por el método de Lowry (1-25) en alícuotas de 5  $\mu$ L y 50  $\mu$ L de las disoluciones alcalinas de la proteína de los hipotálamos y de las neurohipófisis, empleando albúmina sérica bovina como patrón. En la Fig. 1-6 se muestra una curva patrón representativa.

- **Análisis estadístico**

Los datos en el texto y en las figuras están expresados como la media  $\pm$  desviación estándar para un número 'n' de determinaciones.

## Resultados

Sistemas de CLAP para la purificación y caracterización de la AVP, la OT y la SRIF-14 y sus derivados

- Separación simultánea de la AVP, la OT y la SRIF-14 por CLAP-I-1

En la Fig. I-7A se ilustra un cromatograma representativo de la separación simultánea de AVP, OT y SRIF-14 sintéticas por CLAP-I-1. Sus tiempos de retención promedio fueron:

- ◆ AVP, 16.3 +/- 0.1 min, n=24,
- ◆ OT, 20.8 +/- 0.1 min, n=23,
- ◆ SRIF-14, 32.8 +/- 0.1 min, n=17.

El pico pequeño que eluye justo antes de la SRIF-14, es un contaminante de las preparaciones comerciales de Bachem Fine Chemicals y de Boehringer Mannheim. Las preparaciones hechas para Sigma Chemical Co. no lo contienen.

- Análisis de la AVP y la OT por CLAP-I-2

En la Fig. I-7B se ilustra el comportamiento cromatográfico de AVP y de OT sintéticas en el sistema CLAP-I-2, en el que sus tiempos de retención promedio fueron:

- ◆ AVP, 29.5 +/- 0.3 min, n=13,
- ◆ OT, 30.8 +/- 0.3 min, n=13.

- Análisis de la SRIF-14 por CLAP-I-3

En la Fig. I-8 se ilustra la movilidad de la SRIF-14 sintética en el sistema isocrático CLAP-I-3, en el que su tiempo de retención promedio fue de 11.5 +/- 0.2 min, n=14. El pico pequeño que antecede al de la SRIF-14 corresponde a una impureza de la preparación comercial.



- Análisis de los derivados sulfónicos de la AVP y la OT por CLAP-I-1

Muestras de AVP y de OT sintéticas se oxidaron con ácido perbórmico y analizadas por CLAP-I-1. El incremento en las propiedades iónicas de los derivados sulfónicos (Fig. I-9), en relación a los péptidos naturales (Fig. I-1), dio por resultado una disminución de sus tiempos de retención en CLAP-I-1 (Fig. I-10), especialmente en el caso de la OT, que de una molécula neutra se convirtió en un anión. Los tiempos de retención promedio de los derivados sulfónicos fueron:

◆  $(\text{SO}_3^-)_2\text{-AVP}$ , 14.9 +/- 0.1 min, n=13,

◆  $(\text{SO}_3^-)_2\text{-OT}$ , 17.2 +/- 0.1 min, n=11.

En la Fig. I-10 también se aprecia que el comportamiento cromatográfico en CLAP-I-1 de los productos oxidados de AVP y de OT obtenidos directamente del residuo concentrado de la mezcla de reacción de oxidación (Figs. I-10B y I-10D) es idéntico al de aquellos obtenidos posterior a su purificación por intercambio aniónico en DEAE-celulosa (Figs. I-10A y I-10C). Esto constituye una demostración de la identidad de los derivados sulfónicos de los nonapéptidos. Medidas por absorbencia UV, la recuperación de la AVP y de la OT oxidadas fue del 65-70%.

- Análisis de la SRIF-14 carboximetilada por CLAP-I-3

En la Fig. I-11 se ilustran los perfiles cromatográficos en CLAP-I-3 del residuo concentrado de la mezcla de reacción de carboximetilación de SRIF-14 sintética (Fig. I-11B) comparativamente con el de la SRIF-14 sin derivatizar (Fig. I-11A) y el residuo concentrado de la mezcla de reacción de carboximetilación sin SRIF-14 (Fig. I-11C). En el cromatograma de la Fig. I-11B, el primer pico que eluye con un tiempo de retención de 7.3 min corresponde a un producto de la reacción de carboximetilación ajeno a la SRIF-14, dado que aparece en el cromatograma del residuo concentrado de la reacción de carboximetilación sin SRIF-14 (Fig. I-11C). El pico pequeño que le sigue no aparece

en ausencia de SRIF-14, y probablemente corresponde a la impureza de la preparación de SRIF-14 comercial ya señalada. Los otros 2 picos del cromatograma ilustrado en la Fig. I-11B, corresponden a los productos de carboximetilación de la SRIF-14:

- ◆ CM-SRIF-14-I, producto con sus 2 grupos -SH carboximetilados y con un tiempo de retención de 10.3 min (ver Ref. I-13, Fig. I-12)
- ◆ CM-SRIF-14-II, producto parcialmente carboximetilado y con un tiempo de retención de 15.4 min (ver Ref. I-13, Fig. I-12)

La recuperación de los productos carboximetilados (CM-SRIF-14-I más CM-SRIF-14-II), medida por absorbencia a 210 nm, fue del 94.4 +/- 1.5%, n=9.

Caracterización de las fracciones de AVP-L-[<sup>35</sup>S]Cys, OT-L-[<sup>35</sup>S]Cys y SRIF-14-L-[<sup>35</sup>S]Cys aisladas de los extractos ácidos de los hipotálamos y las neurohipófisis de las ratas hidratadas y deshidratadas, marcadas intracerebroventricularmente con L-[<sup>35</sup>S]Cys.

- Análisis por CLAP-I-1 de las fracciones marcadas con L-[<sup>35</sup>S]Cys que coeluyeron con la AVP, la OT y la SRIF-14 sintéticas.

Las Figs. I-13 y I-14 muestran, sobrepuestos, los perfiles de absorbencia UV a 210 nm y de radioactividad, en cpm, obtenidos por CLAP-I-1 de los extractos-L-[<sup>35</sup>S]Cys parcialmente purificados (por filtración en gel y quimioadsorción a octadecilsilano) de hipotálamos y de neurohipófisis, de 5 ratas hidratadas (Fig. I-13) y de 5 ratas deshidratadas (Fig. I-14). Los perfiles de absorbencia UV corresponden a la mitad de los extractos prepurificados de los hipotálamos y al total de los extractos prepurificados de las neurohipófisis. Los perfiles de radioactividad corresponden a mediciones hechas empleando alícuotas de 1/12 y de 1/3 del total de los extractos hipotalámicos-L-[<sup>35</sup>S]Cys y de los extractos neurohipofisarios-L-[<sup>35</sup>S]Cys, respectivamente.

En los perfiles de radioactividad se distinguen 3 fracciones que coeluyen con los péptidos acarreadores sintéticos, añadidos al inicio del proceso de extracción (que

también son marcadores cromatográficos, identificados por absorbencia UV). Cada una de estas fracciones contiene uno de los neuropéptidos recién biosintetizados y son, en orden de elución: AVP-L-[<sup>35</sup>S]Cys, OT-L-[<sup>35</sup>S]Cys y SRIF-14-L-[<sup>35</sup>S]Cys (notar que la incorporación de la marca a las fracciones de AVP de los extractos de hipotálamo apenas son detectables por arriba del nivel de fondo).

Las recuperaciones de los péptidos acarreadores sintéticos en CLAP-I-1, medidas por absorbencia UV, fueron: AVP, 34.9 +/- 2.3% (n=6); OT, 90.6 +/- 4.0% (n=6) y SRIF-14 87.6 +/- 6.0 % (n=8). Las cpm totales (corregidas a 100% de recuperación.) asociadas a cada una de las fracciones peptídicas ilustradas en las Figs. I-13 y I-14 están resumidas en la Tabla I-1.

El análisis de los perfiles cromatográficos obtenidos por CLAP-I-1, e ilustrados en las Figs. I-13 y I-14 reveló que:

- ◆ Las cpm totales asociadas a las fracciones de AVP en las neurohipófisis fueron un orden de magnitud mayor que los valores correspondientes en las fracciones de los hipotálamos.
- ◆ Las cpm totales asociadas a las fracciones de OT en las neurohipófisis fueron de 3-5 veces mayores que en las fracciones correspondientes de los hipotálamos.
- ◆ Las cpm totales asociadas a las fracciones de SRIF-14 en los hipotálamos fueron aproximadamente 10 veces mayores que en las neurohipófisis (nótese que las escalas de L-[<sup>35</sup>S]Cys en las Figs. I-13B y I-14B están amplificadas).
- ◆ Las cpm totales asociadas a las fracciones de AVP y de OT en los extractos hipotalámicos y neurohipofisarios de las ratas deshidratadas fueron aproximadamente 3 y 2 veces mayores, respectivamente, que los valores correspondientes obtenidos en las ratas hidratadas.

◆ Los niveles de SRIF-14-L-[<sup>35</sup>S]Cys en el hipotálamo y la neurohipófisis no se afectaron por el estado de hidratación de las ratas.

• Contenido endógeno neurohipofisiario de AVP y OT

Los valores de absorbencia UV a 210 nm de AVP y de OT medidos en los cromatogramas de los extractos neurohipofisarios (Figs. I-13B y I-14B), representan la suma de las absorbencias de los péptidos endógenos y de los péptidos acarreadores sintéticos añadidos al inicio del proceso de purificación. Después de restar los valores de las absorbencias debidas a los péptidos acarreadores y corrigiendo a 100% de recuperación, los niveles neurohipofisarios endógenos de AVP y de OT en las ratas hidratadas fueron 21.4 y 6.1 µg, respectivamente. Con la deshidratación, estos valores se redujeron a 3.0 y 1.3 µg, respectivamente, paralelamente con un incremento en los niveles de incorporación de L-[<sup>35</sup>S]Cys a estas fracciones peptídicas.

Caracterización y determinación del grado de pureza radioquímica de los neuropéptidos-L-[<sup>35</sup>S]Cys purificados por CLAP-I-1

Todas las fracciones peptídicas marcadas *in vivo* con L-[<sup>35</sup>S]Cys y obtenidas por CLAP-I-1 de los extractos de hipotálamos y de neurohipófisis de ratas hidratadas (Fig. I-13) y de ratas deshidratadas (Fig. I-14) se recromatografiaron por algún procedimiento de CLAP o se modificaron químicamente y luego se recromatografiaron, con el propósito de confirmar su identidad y de conocer su grado de pureza radioquímica. Los resultados de los análisis de las fracciones obtenidas de ratas deshidratadas están ilustrados en las Figs. I-15, I-16 y I-17 y aparecen resumidos en la Tabla I-1, junto con los valores correspondientes para las mismas fracciones peptídicas de las ratas hidratadas. La proporción entre la radioactividad de cada fracción peptídica-L-[<sup>35</sup>S]Cys obtenida por

recromatografía o por modificación química seguida de recromatografía y el total de la radioactividad de esa fracción peptídica-L-[<sup>35</sup>S]Cys obtenida en CLAP-I-1, constituye su índice de pureza radioquímica en CLAP-I-1.

- Fracciones con la movilidad de AVP-L-[<sup>35</sup>S]Cys y OT-L-[<sup>35</sup>S]Cys obtenidas por CLAP-I-1

➤ *Recromatografía en CLAP-I-2*

En la Fig. I-15 se ilustran sobrepuestos los perfiles cromatográficos de absorbencia UV a 210 nm y de radioactividad, en cpm, obtenidos por CLAP-I-2, de alícuotas de las fracciones radioactivas de hipotálamo (Figs. 15A y 15C) y de las fracciones radioactivas de las neurohipofisis correspondientes (Figs. 15B y 15D), que coeluyeron con AVP y con OT sintéticas en CLAP-I-1 (ver Figs. I-14A y I-14B, respectivamente). En la Tabla I-1 se resumen los índices de pureza radioquímica de cada fracción peptídica analizada. (Debido a su baja recuperación, no fue posible caracterizar la fracción de AVP-L-[<sup>35</sup>S]Cys ilustrada en la Fig. I-14A).

➤ *Oxidación con ácido perfórmico y recromatografía en CLAP-I-1*

Dado que los contaminantes radioactivos pueden comigrar con las fracciones peptídicas de interés en más de un sistema cromatográfico, se examinó también por modificación química y recromatografía en CLAP-I-1 la identidad y el grado de pureza radioquímica de las fracciones de AVP-L-[<sup>35</sup>S]Cys y de OT-L-[<sup>35</sup>S]Cys obtenidas en CLAP-I-1. Alícuotas de las fracciones peptídicas de hipotálamo y neurohipófisis se oxidaron con ácido perfórmico y recromatografiadas por CLAP-I-1. En la Fig. I-16 se muestran sobrepuestos los perfiles de absorbencia UV a 210 nm y de radioactividad de los derivados sulfónicos correspondientes: en las Figs. I-16A y I-16C se ilustran los cromatogramas obtenidos para las fracciones peptídicas de hipotálamo y en las Figs. I-

16B y I-16D los de las fracciones peptídicas de neurohipófisis. Una fracción importante del total de la radioactividad de cada fracción peptídica obtenida por CLAP-I-1 comigró con el acarreador sintético oxidado. Los índices de pureza radioquímica de las fracciones peptídicas modificadas químicamente y recromatografiadas aparecen en la Tabla I-1.

El grado de pureza radioquímica de las fracciones de AVP-L-[<sup>35</sup>S]Cys y OT-L-[<sup>35</sup>S]Cys medido por CLAP-I-2 o por modificación química y recromatografía en CLAP-I-1 fueron similares en todos los casos, exceptuando el caso de la OT-L-[<sup>35</sup>S]Cys neurohipofisiaria, que por modificación química resultó 20% menos pura que por recromatografía en CLAP-I-2 (con apareamiento iónico).

- Fracciones con la movilidad de SRIF-14-L-[<sup>35</sup>S]Cys obtenidas por CLAP-I-1

➤ *Recromatografía por CLAP-I-3*

Todas las fracciones con movilidad de SRIF-14-L-[<sup>35</sup>S]Cys de extractos de hipotálamos y de neurohipófisis obtenidas por CLAP-I-1 (Fig. I-14) se recromatografiaron por CLAP-I-3. Los perfiles sobrepuestos de absorbencia UV a 210 nm y de radioactividad ilustrados en las Figs. I-17A y I-17B muestran que una proporción alta del total de la radioactividad asociada a las fracciones de SRIF-14-L-[<sup>35</sup>S]Cys obtenidas por CLAP-I-1 volvió a coeluir con la SRIF-14 sintética en CLAP-I-3, una demostración de su identidad y de su alto grado de pureza radioquímica en CLAP-I-1 (ver Tabla I-1).

➤ *Carboximetilación y recromatografía por CLAP-I-3*

Las fracciones de SRIF-14-L-[<sup>35</sup>S]Cys de hipotálamo obtenidas por CLAP-I-3 (Fig. I-17A) y las fracciones de SRIF-14-L-[<sup>35</sup>S]Cys de neurohipófisis de 10 ratas hidratadas,

purificadas sucesivamente por CLAP-I-1 y CLAP-I-3, se carboximetilaron y recromatografiaron por CLAP-I-3. Como se aprecia en los perfiles sobrepuestos de absorbencia UV a 210 nm y de radioactividad en la Figs. I-17C y I-17D, tanto el material radioactivo como la SRIF-14 sintética, se desdoblaron en 2 productos de carboximetilación identificados como CM-SRIF-14-I y CM-SRIF-14-II. La relación de CM-SRIF-14-I/CM-SRIF-14-II varió de una preparación a la otra, pero fue la misma para el péptido acarreador y el péptido radioactivo de una preparación dada. En los ejemplos ilustrados, la relación fue de 2 para la preparación de hipotálamo y de 4 para la preparación de neurohipófisis. El grado de pureza radioquímica de cada una de las fracciones de SRIF-14-L-[<sup>35</sup>S]Cys está indicado en la Tabla I-1. Con CLAP-I-3 no fue posible mejorar el grado de pureza radioquímica de las fracciones hipotalámicas de SRIF-14-L-[<sup>35</sup>S]Cys obtenidas en CLAP-I-1. En cambio, la pureza radioquímica de las fracciones de SRIF-14-L-[<sup>35</sup>S]Cys de las 10 neurohipófisis de las ratas hidratadas ascendió de 68% en CLAP-I-1 a 100% en CLAP-I-3.

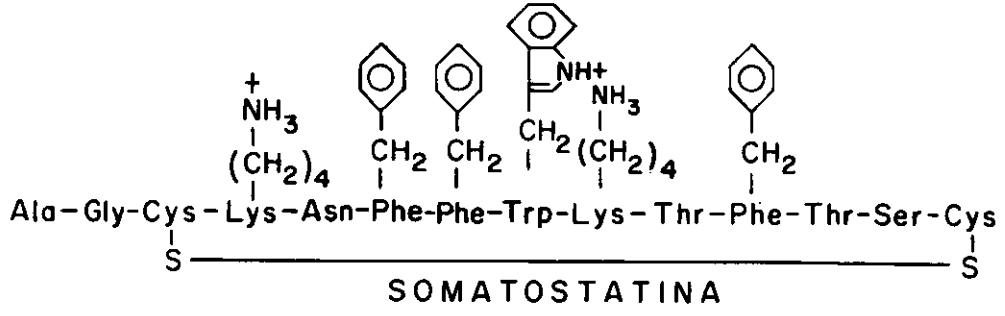
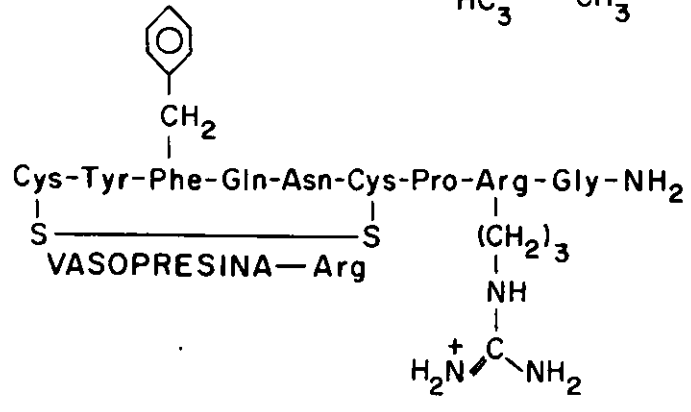
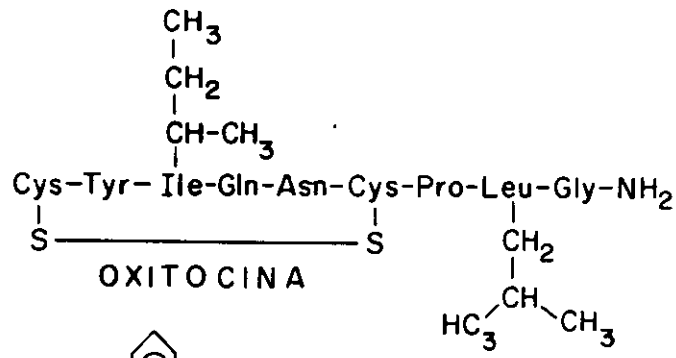
Incorporación específica de la L-[<sup>35</sup>S]Cys a la proteína precipitada con ácido acético de los extractos de los hipotálamos y las neurohipófisis de las ratas hidratadas y las ratas deshidratadas.

La incorporación específica de L-[<sup>35</sup>S]Cys a la proteína precipitada con HOAc 2M en el primer paso de extracción de los neuropéptidos-L-[<sup>35</sup>S]Cys de hipotálamos y de neurohipófisis de ratas hidratadas fue de 306 cpm/ $\mu$ g y de 80 cpm/ $\mu$ g, respectivamente, y de 331 cpm/ $\mu$ g y de 277 cpm/ $\mu$ g, respectivamente, para el caso de las ratas deshidratadas.

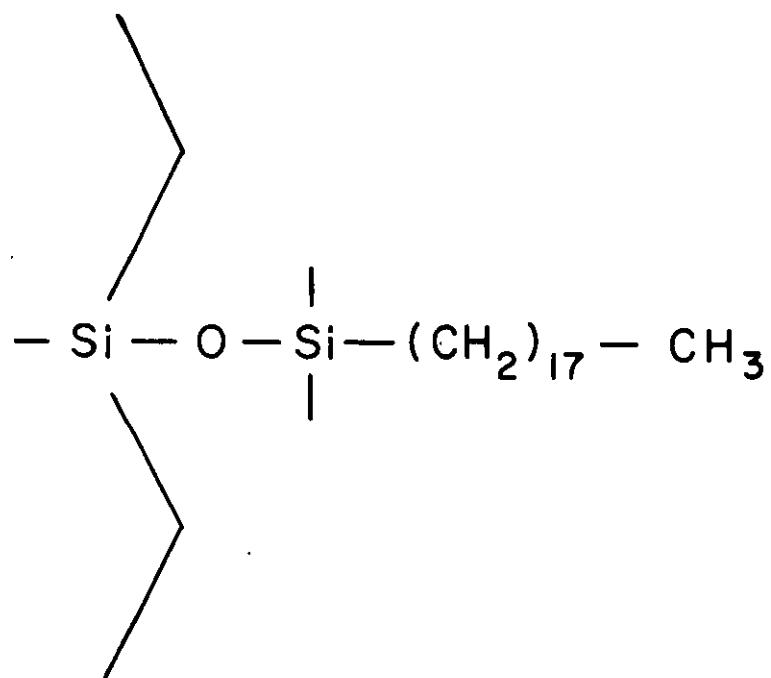
## **Figuras del Capítulo I**



**FIGURA I-1. ESTRUCTURA PRIMARIA DE LA OT, LA AVP Y LA SRIF-14. Están representadas las cadenas laterales (ionizadas, alifáticas y aromáticas) de la OT, la AVP y la SRIF-14 que determinan las diferencias en su comportamiento cromatográfico en los sistemas de CLAP-I-1, CLAP-I-2 y CLAP-I-3.**

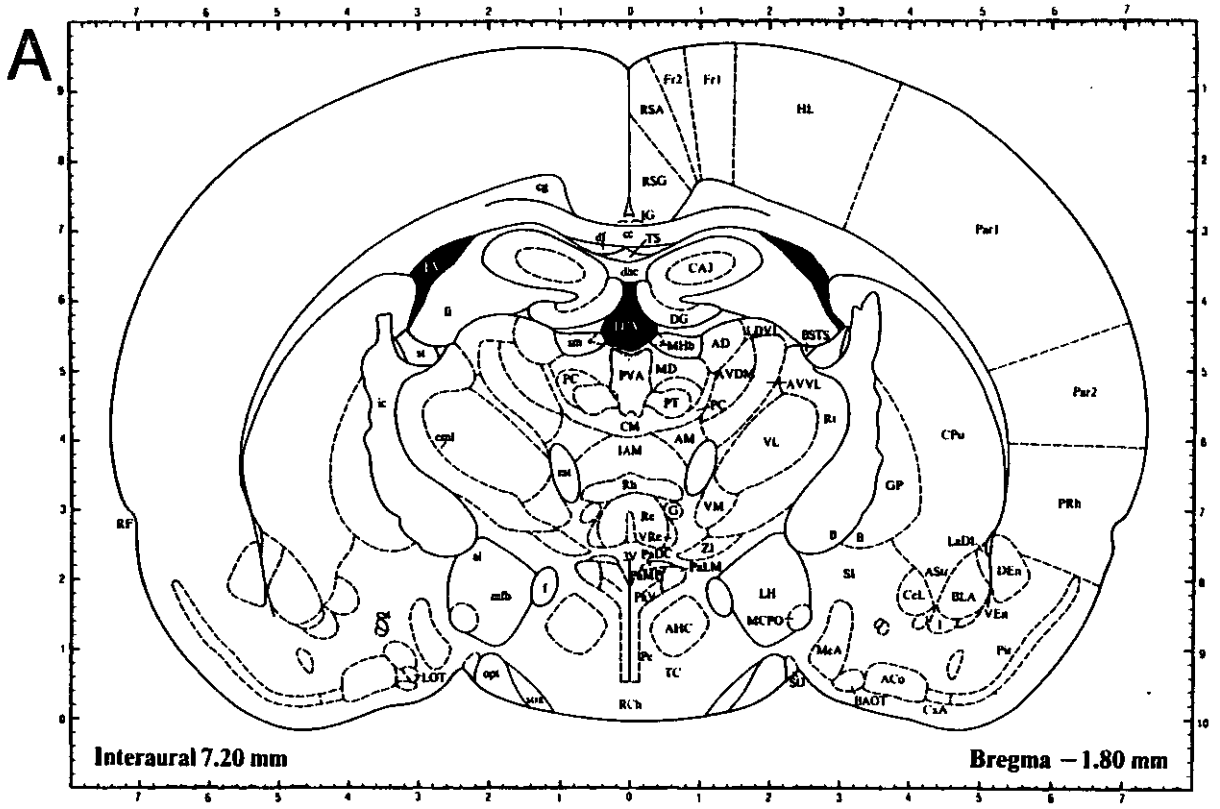


**FIGURA 1-2. ESTRUCTURA QUIMICA DEL OCTADECILSILANO.** Está representada la extensión alifática del soporte cromatográfico de la columna  $\mu$  Bondapak  $C_{18}$  empleada en los sistemas de CLAP-I-1, CLAP-I-2 y CLAP-I-3.

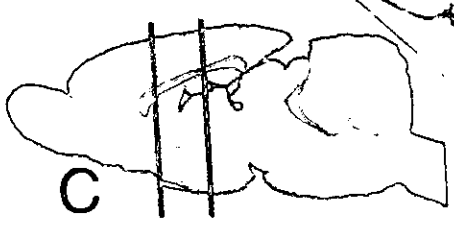
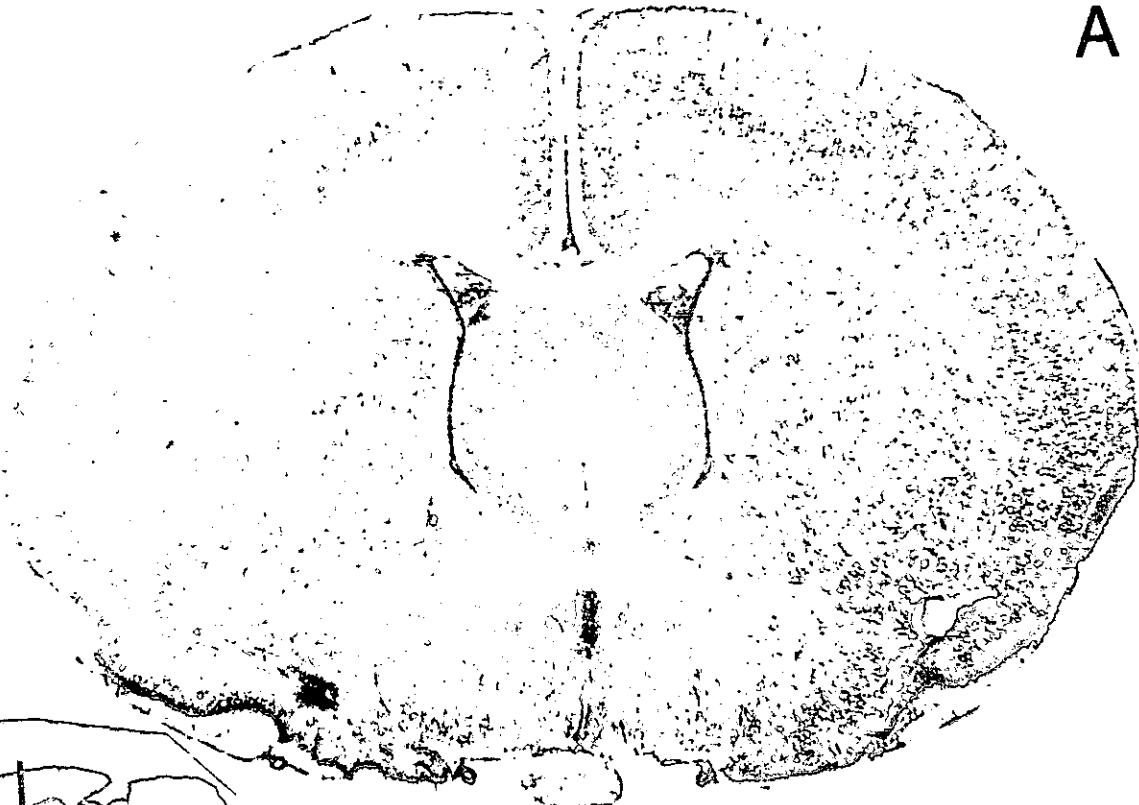


OCTADECILSILANO

**FIGURA I-3. SITIO DE INYECCION DE LA L-[<sup>35</sup>S]Cys.** El precursor radioactivo se inyectó en el III V a -2 mm de bregma. Se ilustra un corte coronal del cerebro de la rata a -1.8 mm de bregma (corte más cercano al sitio de inyección). A. Esquema del corte de tejido en B. B. Imagen del corte de tejido. Figuras tomadas de Paxinos y Watson (I-22). PaDC, núcleo paraventricular, cápsula dorsomedial; PaLM, núcleo paraventricular, magnocelular lateral; PaMP, núcleo paraventricular, parvocelular medial; PaV, núcleo paraventricular, ventral; Pe, núcleo periventricular.

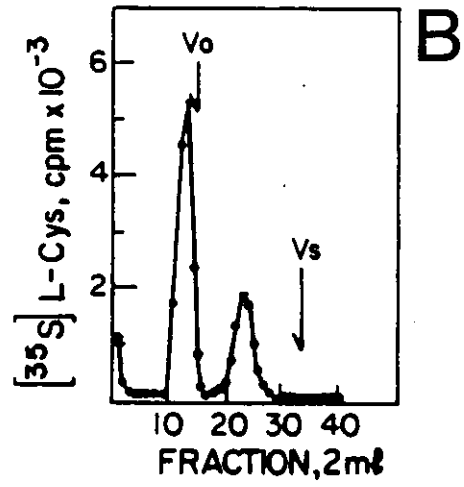
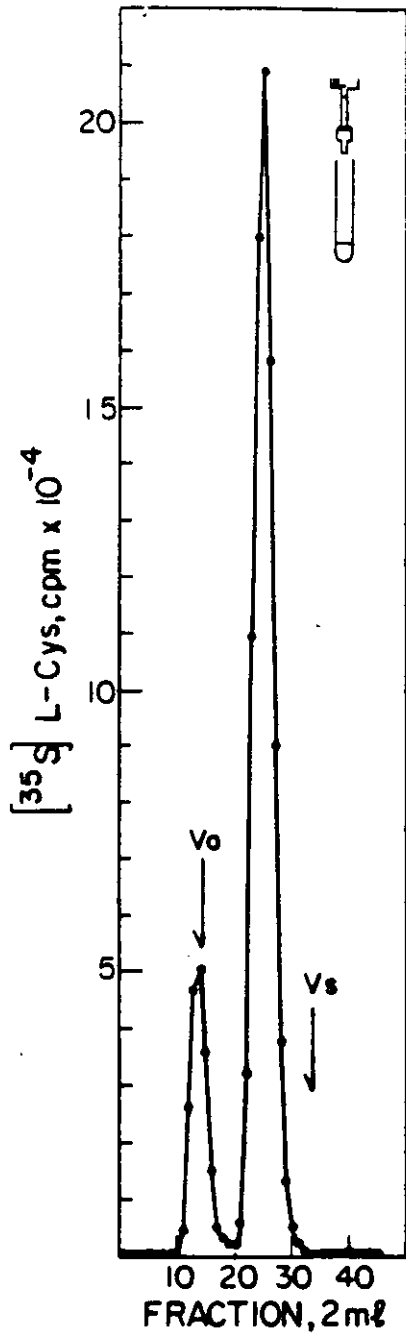


**FIGURA I-4. DISECCION DE LOS BLOQUES HIPOTALAMICOS.**  
Haciendo 2 cortes coronales (A), se obtuvo una rebanada de cerebro de rata entre - 0.30 mm (B) (en el quiasma óptico, ox) y - 4.80 mm (C) (anterior a los cuerpos mamilares, M) de bregma. Luego, colocando la rebanada sobre su superficie caudal, se hicieron 2 cortes sagitales a 3 mm de cada lado de la línea media. El bloque hipotalámico se obtuvo finalmente haciendo el último corte a la altura de la comisura anterior (ac). Las ilustraciones son de (I-23, A) y de Paxinos y Watson (I-22, B,C).

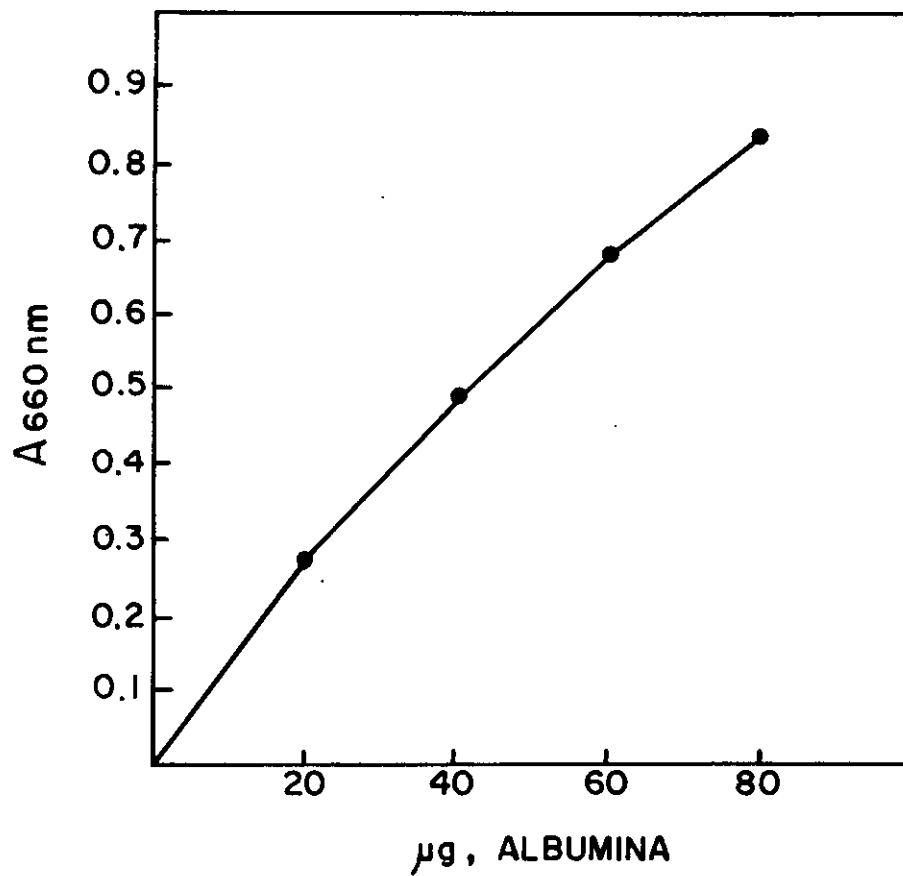




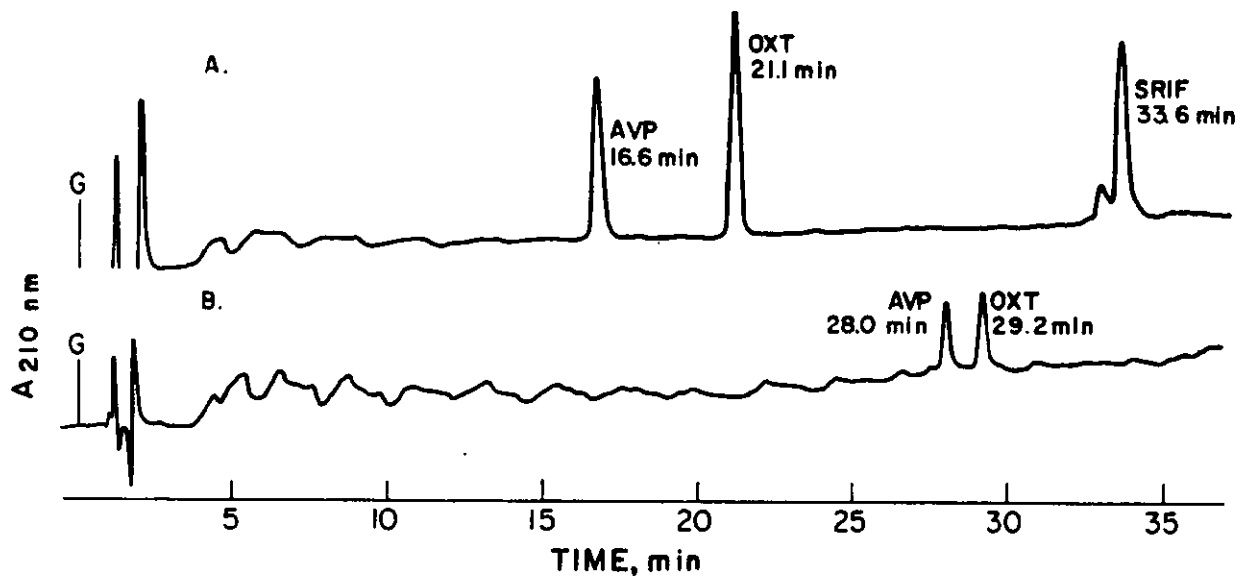
**FIGURA 1-5. PERFILES DE RADIOACTIVIDAD (L-[<sup>35</sup>S]Cys) DE LOS EXTRACTOS DE HIPOTALAMO Y NEUROHIPOFISIS DE LAS RATAS HIDRATADAS OBTENIDOS POR FILTRACION EN GEL.** Se purificaron por filtración en gel la mitad del extracto soluble en ácido de hipotálamos (A) y el total del extracto de neurohipófisis (B) de 5 ratas hidratadas, que recibieron intraventricularmente c/u 50  $\mu$ Ci de L-[<sup>35</sup>S]Cys. AVP, OT y SRIF-14, marcados con L-[<sup>35</sup>S]Cys, se obtuvieron en la fracción peptídica, el pico de radioactividad que eluye después del volumen vacío (Vo) . Vs es el volumen de sal. Los perfiles de radioactividad correspondientes de 5 ratas deshidratadas fueron similares a los de las ratas hidratadas, sólo que en el extracto de neurohipófisis el tamaño de los picos se duplicó (pico en Vo) o triplicó (fracción peptídica).



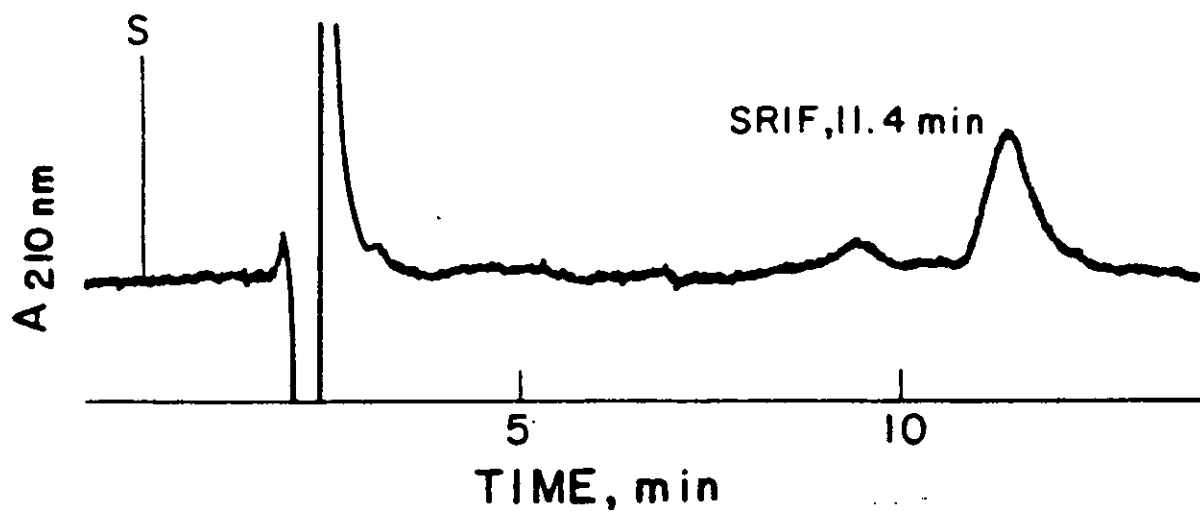
**FIGURA I-6. CURVA PATRON DE ALBUMINA PARA LA DETERMINACION DE PROTEINAS POR EL METODO DE LOWRY. La proteína patrón es albúmina sérica bovina, fracción V (Sigma Chemical Co). (I-25).**



**FIGURA I-7. PERFILES DE ABSORBENCIA UV A 210 nm de LA AVP, LA OT y LA SRIF-14 OBTENIDOS POR CLAP-I-1 y POR CLAP-I-2. A. Separación simultánea de 3 µg c/u de AVP, OT y SRIF-14 sintéticos en CLAP-I-1: Gradiente lineal : CH<sub>3</sub>CN de 5-40% en acetato de amonio 0.01M, pH 4.0. Duración: 40 min. Flujo: 2 mL/min. Temperatura: Ambiente (20°C). B. Cromatografía de 1 µg c/u de AVP y de OT sintéticas en CLAP-I-2: Gradiente lineal : CH<sub>3</sub>CN de 5-60% en HOAc 0.02M, con 0.1% de la sal sódica del ácido 1-hexanosulfónico (apareamiento iónico). Duración: 40 min. Flujo: 2 mL/min. Temperatura: 60°C. Se indican los tiempos de retención de cada péptido en minutos. G marca el inicio de los gradientes.**

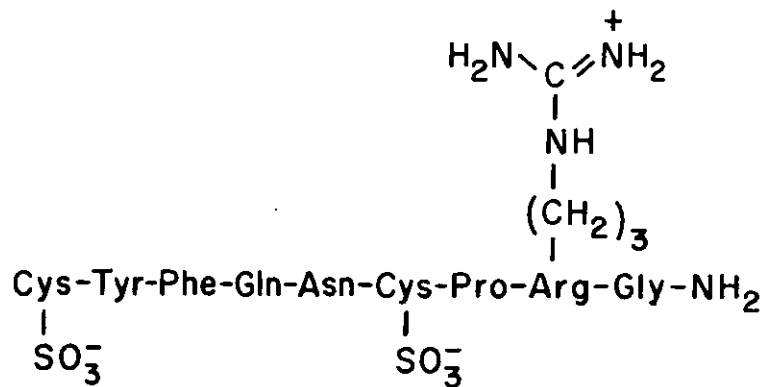


**FIGURA I-8. PERFIL DE ABSORBENCIA UV A 210 nm DE LA SRIF-14 OBTENIDO POR CLAP-I-3. Se cromatografiaron 3  $\mu$ g de SRIF-14 sintética en CLAP-I-3: Condiciones isocráticas: CH<sub>3</sub>CN al 26% en acetato de trietilamonio 0.25M, pH 3. Flujo: 1.5 mL/min. Temperatura: Ambiente. Su tiempo de retención está indicado en minutos. S marca el inicio de la cromatografía.**

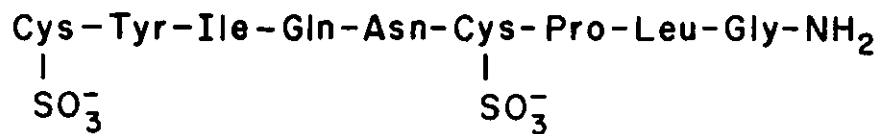




**FIGURA 1-9. ESTRUCTURA QUIMICA DE LOS DERIVADOS SULFONICOS DE LA AVP Y DE LA OT. Están representados los grupos funcionales ionizados de los derivados sulfónicos de la AVP y de la OT sintéticos obtenidos por oxidación con ácido perbórico, que determinan su comportamiento cromatográfico en CLAP-I-1.**

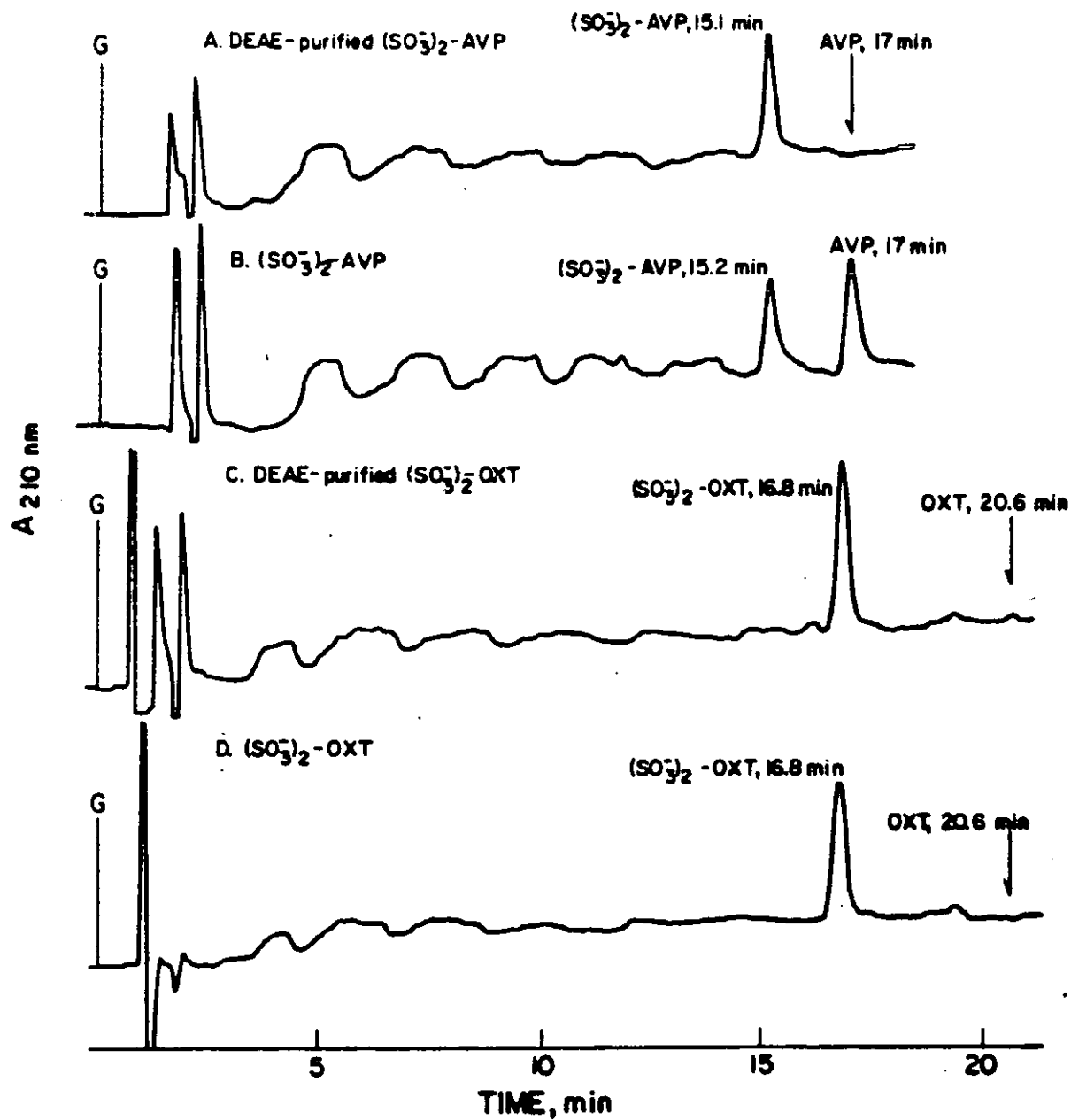


DERIVADO SULFONICO DE VASOPRESINA - Arg

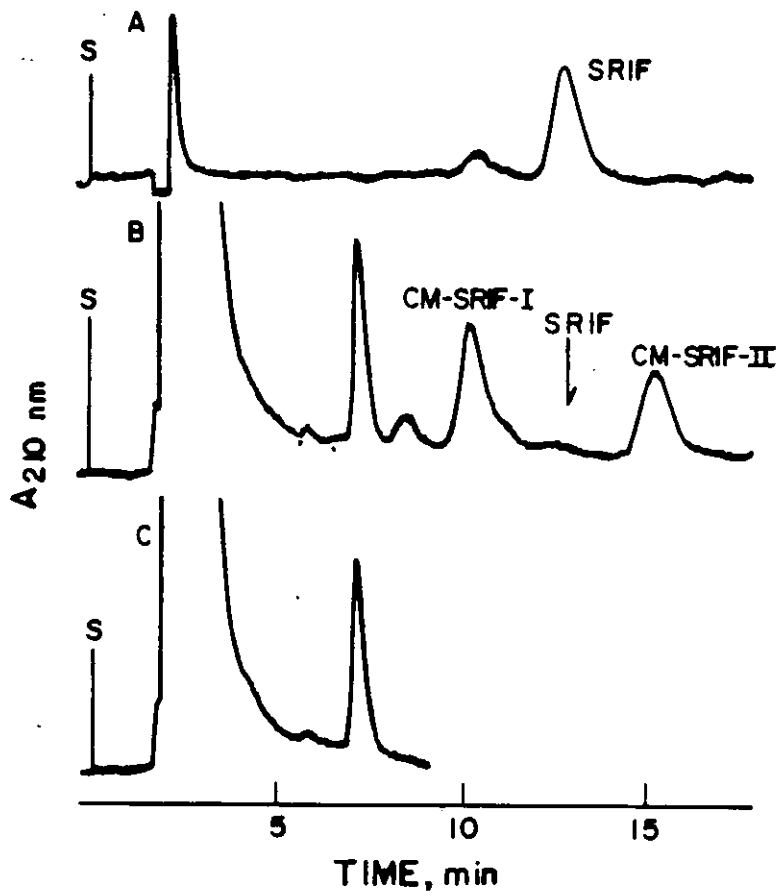


DERIVADO SULFONICO DE OXITOCINA

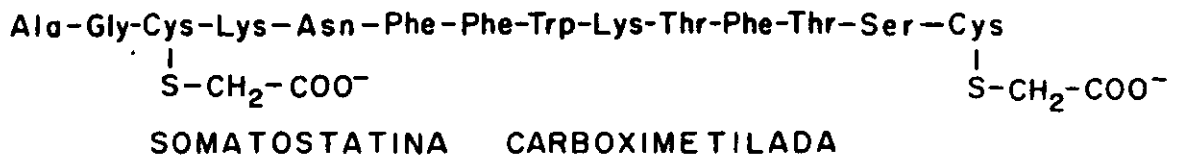
**FIGURA I-10. PERFILES DE ABSORBENCIA A 210 nm DE LOS DERIVADOS SULFONICOS DE LA AVP Y LA OT OBTENIDOS POR CLAP-I-1. Los derivados sulfónicos de la AVP y la OT se obtuvieron por oxidación con ácido perbromico. A. 2 µg de (SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-AVP después de purificar la mezcla de reacción en DEAE-celulosa. Se indica el tiempo de retención de la AVP. B. 2 µg de (SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-AVP obtenidos en la mezcla de reacción y sin purificación corridos junto con 2 µg de AVP. C. 3 µg de (SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-OT después de purificar la mezcla de reacción en DEAE-celulosa. Se indica la posición de elución de la OT. D. 3 µg de (SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-OT obtenidos en la mezcla de reacción y sin purificación. Se indica la posición de elución de la OT. Los tiempos de retención de los péptidos están indicados en minutos (min). A: Absorbencia. G:Inicio del gradiente.**



**FIGURA I-11. PERFILES DE ABSORBENCIA A 210 nm DE LA SRIF-14 y DE LA SRIF-14-CARBOXIMETILADA OBTENIDOS POR CLAP-I-3. A: 3 µg de SRIF-14. B: CM-SRIF-14-I y CM-SRIF-14-II son productos de la reacción de carboximetilación de 6 µg de SRIF-14. Se indica la posición de elución de la SRIF-14. C: Productos obtenidos en la mezcla de reacción de carboximetilación sin SRIF-14. A: Absorbencia. S: Inicio de la cromatografía.**

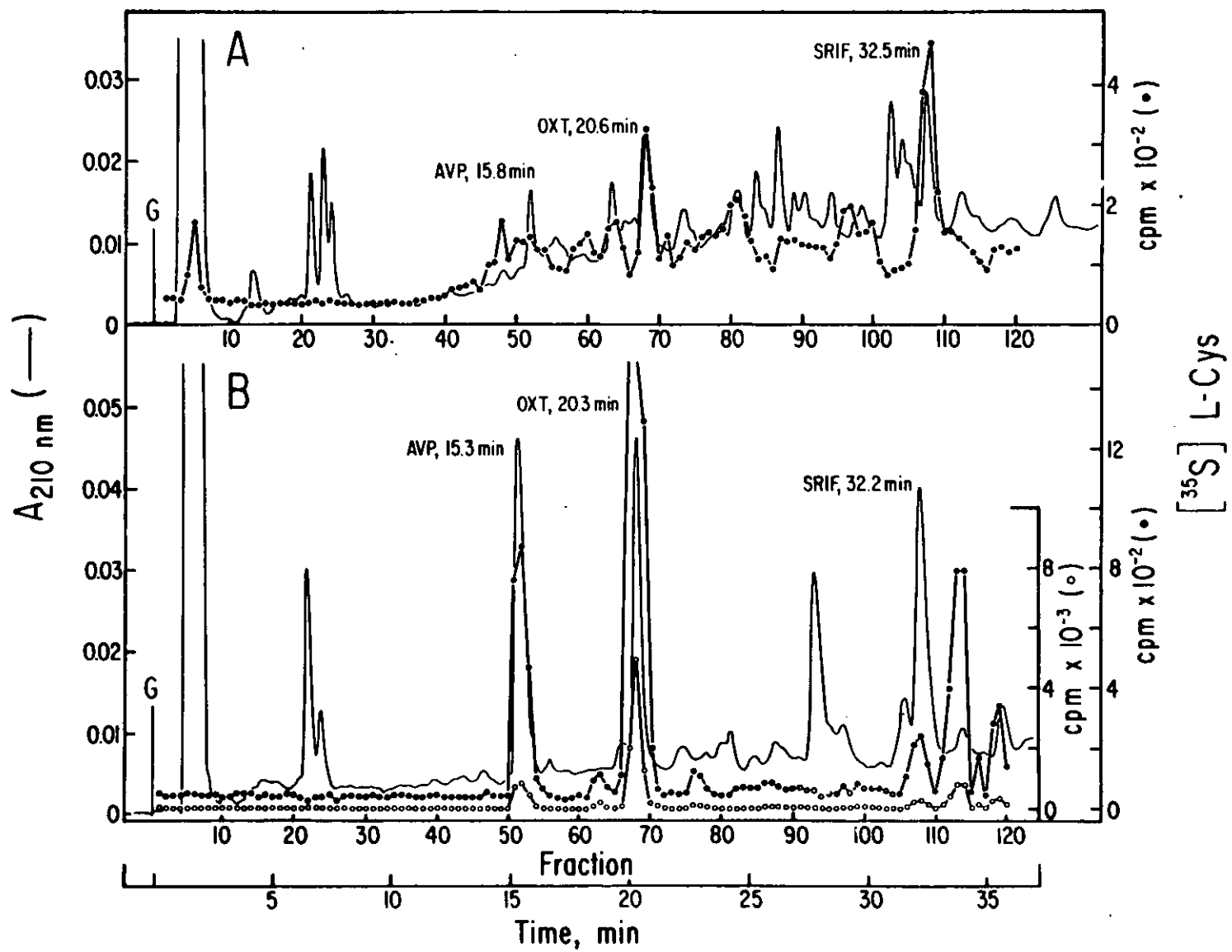


**FIGURA 1-12. ESTRUCTURA QUIMICA DE LA SRIF-14 CARBOXIMETILADA.** Se ilustra la estructura primaria de la SRIF-14 con grupos carboximetilo (-CH<sub>2</sub>-COO) unidos covalentemente a los azufres de los 2 residuos de cisteína.

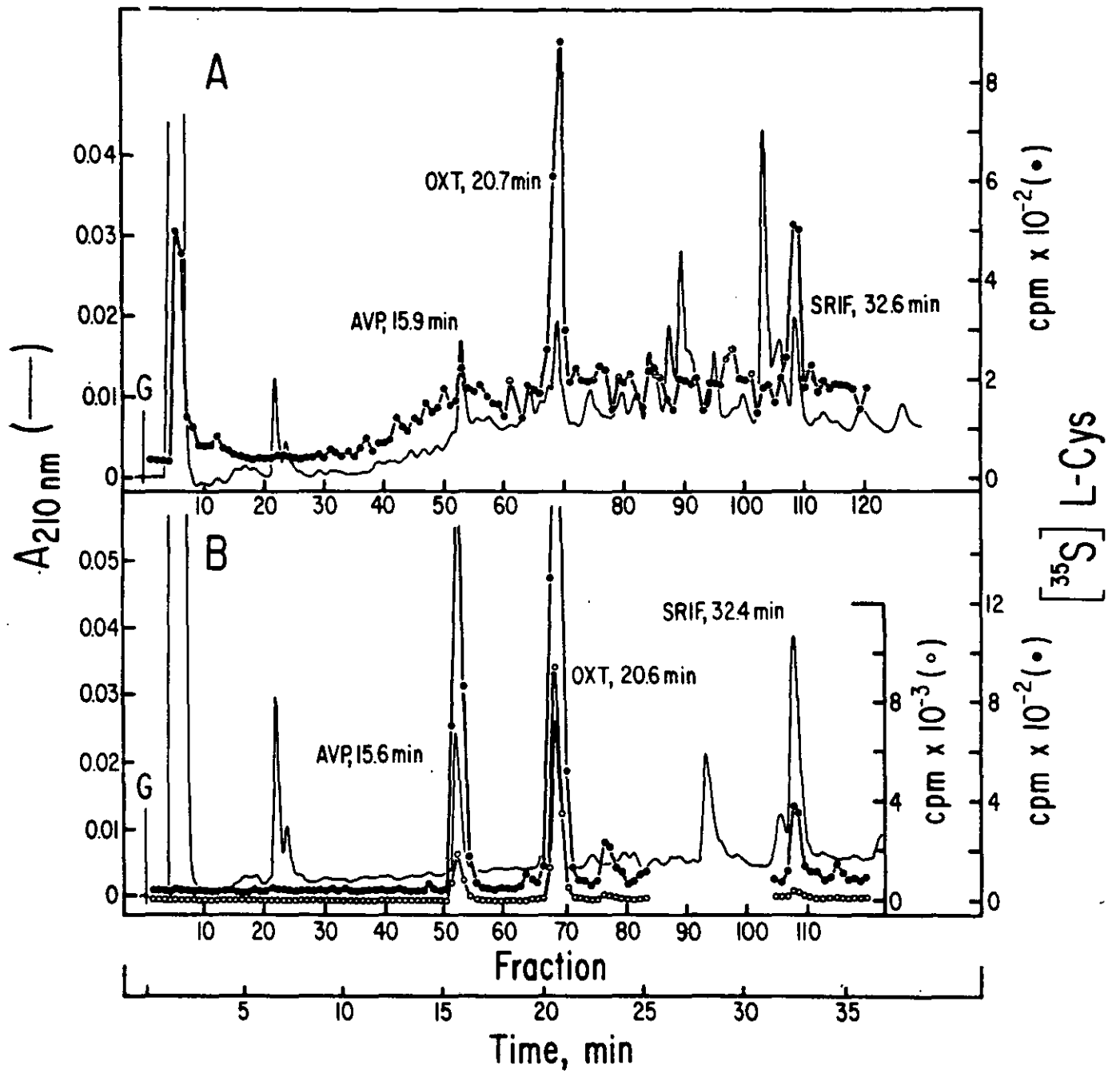




**FIGURA I-13. PERFILES DE ABSORBENCIA A 210 nm Y DE RADIOACTIVIDAD EN CLAP-I-1 DE LOS EXTRACTOS PREPURIFICADOS DE HIPOTALAMOS Y NEUROHIPOFISIS DE LAS RATAS HIDRATADAS, MARCADAS CON L-[<sup>35</sup>S]Cys. Cinco ratas hidratadas recibieron 50  $\mu$ Ci de L-[<sup>35</sup>S]Cys c/u en el III ventrículo. Al cabo de 4h, las ratas se decapitaron y sus hipotálamos y sus neurohipófisis se disecaron, combinaron y homogeneizaron con HOAc 2M, en presencia de 20 y 10  $\mu$ g de AVP, de 6 y 3  $\mu$ g de OT y de 8 y 8  $\mu$ g de SRIF-14 sintéticas, respectivamente. Los extractos de tejido se prepurificaron por filtración en gel y quimioadsorción a octadecilsilano y luego se analizaron por CLAP-I-1. Se colectaron fracciones de 600  $\mu$ l y se midió la radioactividad en 100  $\mu$ L (A) y 200  $\mu$ L (B) de cada fracción. A: Cromatografía de la mitad del extracto de los 5 hipotálamos de ratas hidratadas. B: Cromatografía del extracto completo de las 5 neurohipófisis de ratas hidratadas. En (B) se emplearon 2 escalas para graficar las cuentas por minuto (cpm). A: Absorbencia. G: Inicio del gradiente.**



**FIGURA I-14. PERFILES DE ABSORBENCIA A 210 nm Y DE RADIOACTIVIDAD OBTENIDOS POR CLAP-I-1 DE LOS EXTRACTOS PREPURIFICADOS DE HIPOTALAMOS Y NEUROHIPOFISIS DE LAS RATAS DESHIDRATADAS, MARCADAS CON L-[<sup>35</sup>S]Cys. Cinco ratas deshidratadas recibieron 50  $\mu$ Ci de L-[<sup>35</sup>S]Cys c/u en el III ventrículo. Al cabo de 4h, las ratas se decapitaron y sus hipotálamos y sus neurohipófisis se disecaron, combinaron y procesaron tal y como se indica en la leyenda de la Fig. I-13. A: Cromatografía de la mitad del extracto de los 5 hipotálamos de las ratas deshidratadas. B: Cromatografía del extracto completo de las 5 neurohipófisis de las ratas deshidratadas. En (B) se emplearon 2 escalas para graficar las cuentas por minuto (cpm). A: Absorbencia. G: Inicio del gradiente.**



**FIGURA I-15. CRITERIOS DE IDENTIDAD Y DE PUREZA RADIOQUÍMICA DE LA AVP-L-[<sup>35</sup>S]Cys Y LA OT-L-[<sup>35</sup>S]Cys OBTENIDAS POR CLAP-I-1: CARACTERIZACIÓN POR CLAP-I-2.** Se ilustran sobrepuestos los perfiles de absorbencia a 210 nm y de radioactividad obtenidos CLAP-I-2 de las fracciones de AVP-L-[<sup>35</sup>S]Cys y OT-L-[<sup>35</sup>S]Cys purificadas por CLAP-I-1 de los extractos de los hipotálamos y de las neurohipófisis de las ratas deshidratadas. A: AVP-L-[<sup>35</sup>S]Cys de hipotálamo (46% del material obtenido por CLAP-I-1, Fig. 1-14); OT, 1.2 µg, marcador interno. B: AVP-L-[<sup>35</sup>S]Cys de neurohipófisis (33% del material obtenido por CLAP-I-1, Fig. 1-14); OT, 2.4 µg, marcador interno. C: OT-L-[<sup>35</sup>S]Cys de hipotálamo (31% del material obtenido por CLAP-I-1, Fig. 1-14); AVP, 1.2 µg, marcador interno. D: OT-L-[<sup>35</sup>S]Cys de neurohipófisis (13% de material obtenido por CLAP-I-1, Fig. 1-14); AVP, 2.4 µg, marcador interno. En todos los casos se colectaron y contaron (centelleo líquido) fracciones de 600 µL. A: Absorbencia. G: Inicio del gradiente. Los tiempos de elución se expresan en minutos (min). Las escalas de radioactividad en cuentas por minuto (cpm) son diferentes para cada caso. Los resultados de este análisis están resumidos en la Tabla I-1.

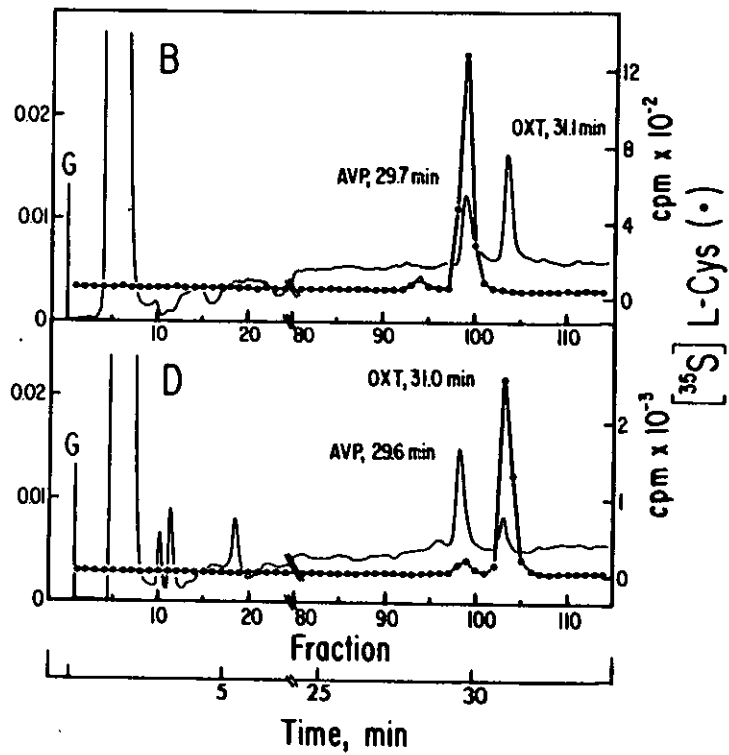
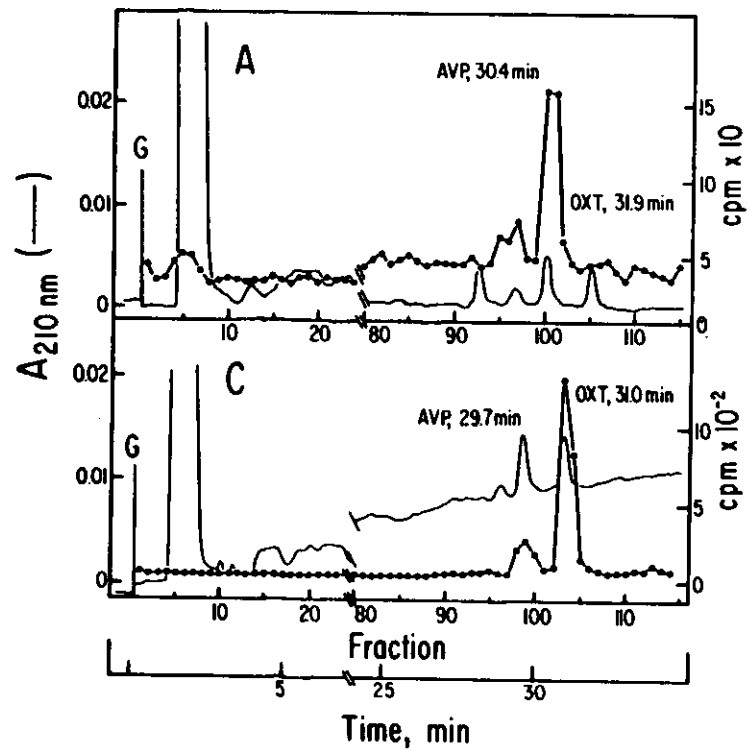
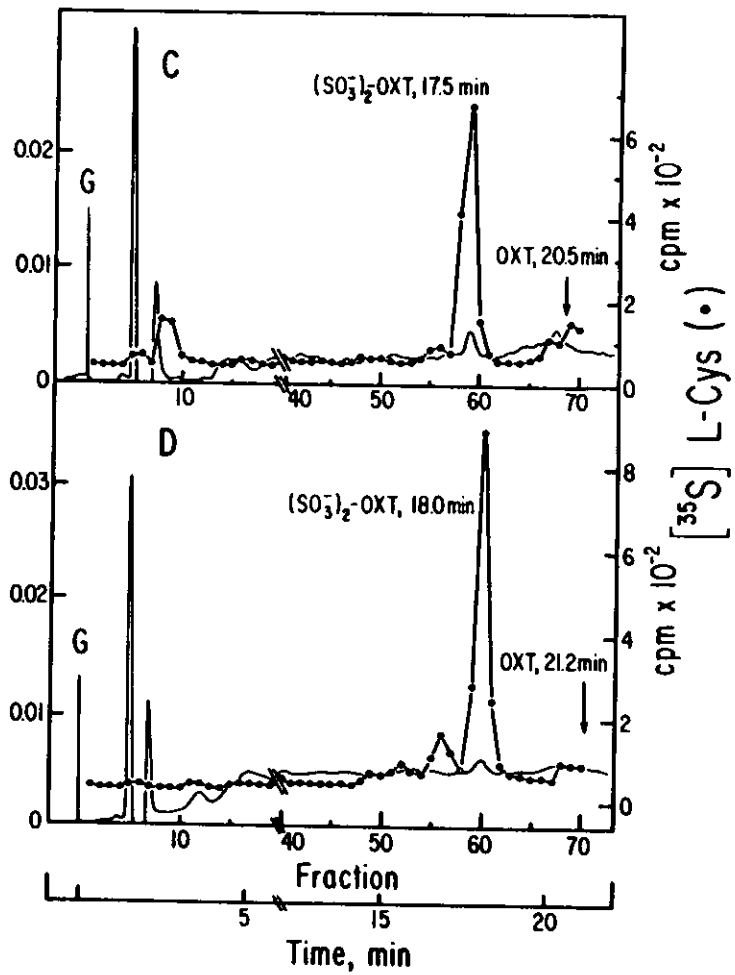
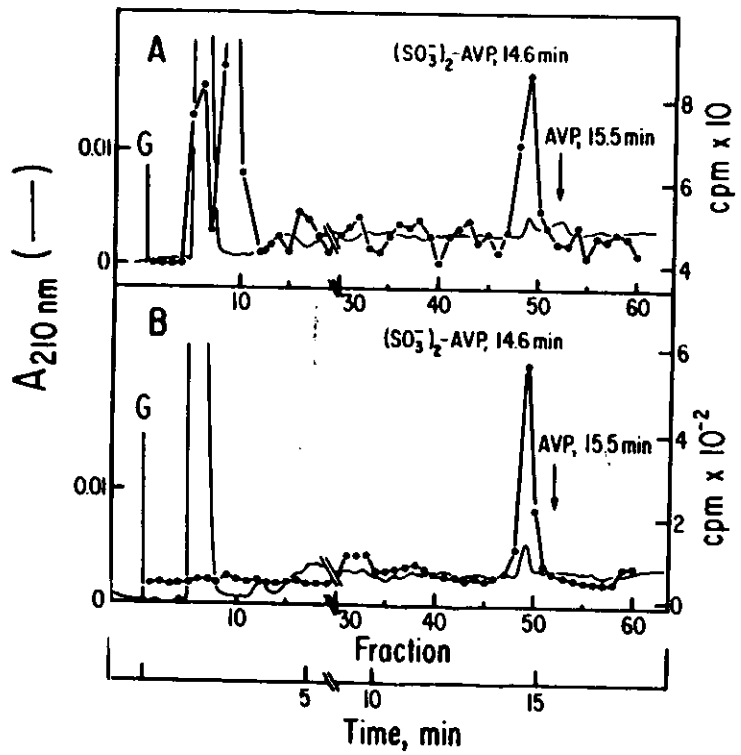
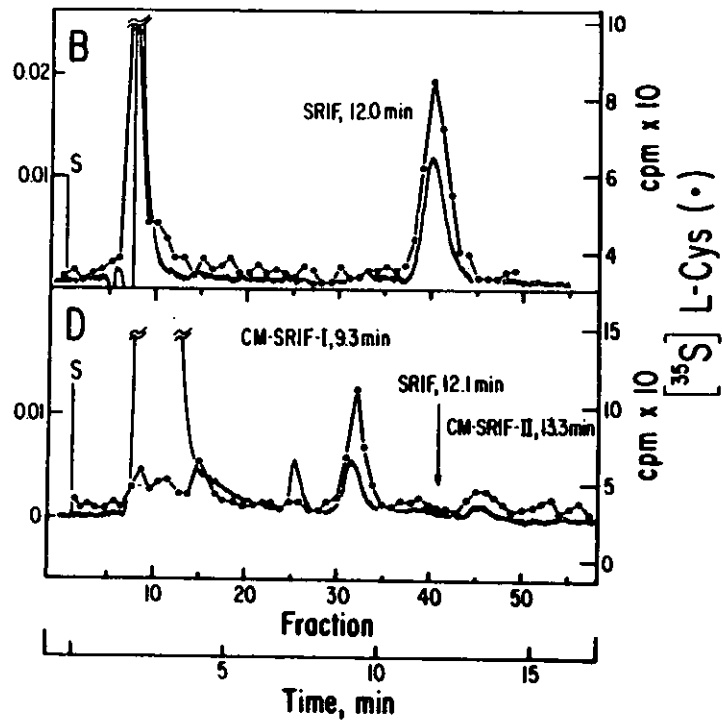
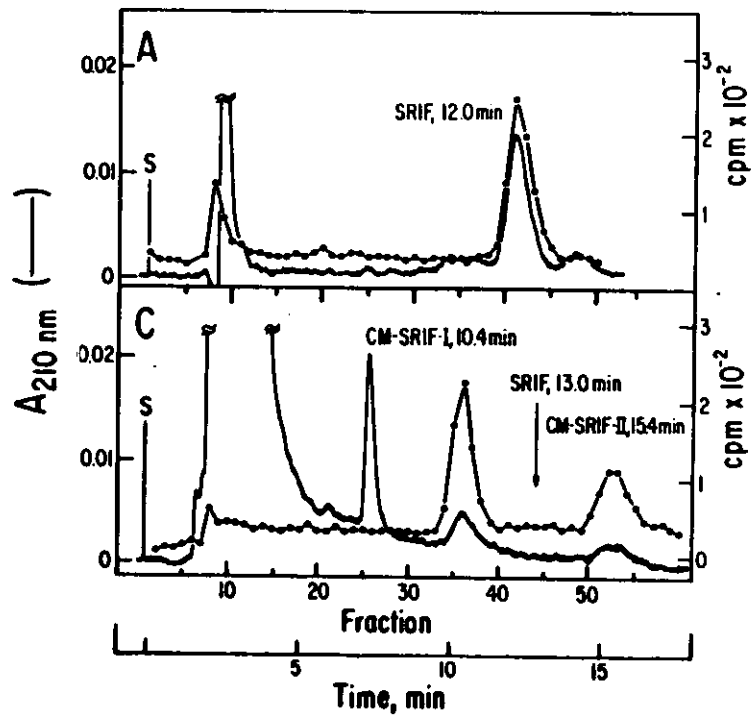


FIGURA I-16. CRITERIOS DE IDENTIDAD Y DE PUREZA RADIOQUÍMICA DE AVP-L-[<sup>35</sup>S]Cys Y OT-L-[<sup>35</sup>S]Cys OBTENIDAS POR CLAP-I-1: CARACTERIZACIÓN POR DERIVATIZACIÓN Y RECROMATOGRÁFIA EN CLAP-I-1. Se ilustran sobrepuestos los perfiles de absorbencia a 210 nm y de radioactividad obtenidos por CLAP-I-1 de los derivados sulfónicos de las fracciones de AVP-L-[<sup>35</sup>S]Cys y OT-L-[<sup>35</sup>S]Cys obtenidas por CLAP-I-1 de extractos de hipotálamos y de neurohipófisis de ratas *deshidratadas*. A: (SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-AVP-L-[<sup>35</sup>S]Cys de hipotálamo (46% del material obtenido en CLAP-I-1, Fig. I-14, oxidado). B: (SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-AVP-L-[<sup>35</sup>S]Cys(SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-AVP-L-[<sup>35</sup>S]Cys de neurohipófisis (33% del material obtenido en CLAP-I-1, Fig. I-14, oxidado). C: (SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-OT-L-[<sup>35</sup>S]Cys de hipotálamo (31% del material obtenido en CLAP-I-1, Fig. I-14, oxidado). D: (SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-OT-L-[<sup>35</sup>S]Cys de neurohipófisis (13% del material obtenido en CLAP-I-1, Fig. I-14, oxidado). Previo a su recromatografía, los neuropéptidos se oxidaron con ácido perbórmico. En todos los casos se indica el tiempo de elución del péptido original. En todos los casos se colectaron y contaron (por centelleo líquido) 600 µL. A: Absorbencia. G: Inicio del gradiente. Los tiempos de elución se expresan en minutos (min). Las escalas de radioactividad en cuentas por minuto (cpm) son diferentes para cada caso. La recuperación de los péptidos oxidados fue de 65-70%. Los resultados de este análisis están resumidos en la Tabla I-1.





**FIGURA I-17. CRITERIOS DE IDENTIDAD Y DE PUREZA RADIOQUÍMICA DE SRIF-14-L-[<sup>35</sup>S]Cys OBTENIDA POR CLAP-I-1: CARACTERIZACION SUCESIVA POR CROMATOGRAFIA EN CLAP-I-3 Y POR CARBOXIMETILACION Y RECROMATOGRAFIA EN CLAP-I-3.** Se ilustran sobrepuestos los perfiles de absorbencia a 210 nm y de radioactividad obtenidos por CLAP-I-3 de las fracciones de SRIF-14-L-[<sup>35</sup>S]Cys obtenidas por CLAP-I-1 de los extractos de los hipotálamos y de las neurohipófisis de las ratas hidratadas o deshidratadas, antes y después de carboximetilar. A: Total de la SRIF-14-L-[<sup>35</sup>S]Cys de los hipotálamos de las ratas deshidratadas obtenida por CLAP-I-1 (Fig. I-14). B: Total de la SRIF-14-L-[<sup>35</sup>S]Cys de las neurohipófisis de las ratas deshidratadas obtenida por CLAP-I-1 (Fig. I-14). C: SRIF-14-L-[<sup>35</sup>S]Cys obtenida en (A), carboximetilada. D: SRIF-14-L-[<sup>35</sup>S]Cys de 10 neurohipófisis de ratas hidratadas, obtenida sucesivamente por CLAP-I-1 y CLAP-I-3, carboximetilada y recromatografiada en CLAP-I-3. En (A) y (B) se colectaron fracciones de 500 µL y se contaron (por centelleo líquido) alícuotas de 100 µL (A) y 200 µL (B). El material restante en (A) se carboximetiló y recromatografió en CLAP-I-3 (C). En (C) y (D), se colectaron y contaron (por centelleo líquido) fracciones de 500 µL. CM-SRIF-14-I y CM-SRIF-14-II denotan los productos de carboximetilación de la SRIF-14. S: Inicio de la corrida.



## **Tabla del Capítulo I**

TABLA 1. CARACTERIZACION DE AVP, OT Y SRIF, MARCADAS CON L-(<sup>35</sup>S)CYS, DE HIPOTALAMOS Y NEUROHIPOFISIS DE RATAS HIDRATADAS (H) Y DE RATAS DESHIDRATADAS (D)

FRACCIONES PEPTIDICAS- L-( <sup>35</sup> S)CYS	TEJIDO <sup>a</sup>	AISLAMIENTO POR CLAP 1			% DE PUREZA RADIOQUIMICA			
		H	D	D/H	RECROMATOGRAFIA <sup>f</sup>		DERIVATIZACION <sup>g</sup>	
					H	D	H	D
AVP	HIPOTALAMO							
	cpm totales <sup>b</sup>	722	2,613	3.6	-	-	-	-
	NEUROHIPOFISIS							
	cpm totales	17,562	30,103	1.7	56	60	65	62
	cpm específicas <sup>c</sup>	11,415	18,664	1.6				
	µg <sup>d</sup>	21.4	3.0	0.14				
	cpm/µg específicas	533	6,221	11.7				
OT	HIPOTALAMO							
	cpm totales	5,258	17,391	3.3	49	90	70	100
	cpm específicas	3,681	17,391	4.7				
	NEUROHIPOFISIS							
	cpm totales	27,328	48,123	1.8	73	73	50	56
	cpm específicas	13,664	26,949	2.0				
	µg	6.1	1.3	0.21				
	cpm/µg específicas	2,240	20,730	9.3				
SRIF	HIPOTALAMO							
	cpm totales	10,370	9,356	0.9	71	81	86	72
	cpm específicas	7,363	7,578	1.0				
	NEUROHIPOFISIS							
	cpm totales	1,709	2,205	1.3	50	45	-	-
	cpm específicas	854	992	1.2				
	cpm totales	2,103 <sup>e</sup>	-	-	68	-	100	-
	cpm específicas	1,430	-	-				

24

- Extractos combinados de 5 ratas.
- Cpm corregidas con base en su recuperación y vida media de la L-[<sup>35</sup>S]Cys.
- Radioactividad incorporada específicamente a los péptidos-L-[<sup>35</sup>S]Cys, determinada según su grado de pureza radioquímica.
- Contenido endógeno neurohipofisario, corregido con base en su recuperación.
- Material combinado de 10 ratas.
- Recromatografía por CLAP-I-2 (AVP y OT) y CLAP-I-3 (SRIF-14).
- Derivatización de AVP y OT por oxidación con ácido perbórmico y de SRIF-14 por carboximetilación, seguida de su recromatografía en CLAP-I-1 y CLAP-I-3, respectivamente.

## Discusión

Partiendo de la premisa de que los niveles de biosíntesis *in vivo* de neuropéptidos reflejan el estado de actividad de las neuronas peptidérgicas correspondientes, se desarrolló un procedimiento, basado en la CLAP, para estimar la actividad de ciertas poblaciones de neuronas vasopresinérgicas, oxitocinérgicas y somatostatinérgicas hipotalámicas a través de la medición simultánea de AVP-L-[<sup>35</sup>S]Cys, OT-L-[<sup>35</sup>S]Cys y SRIF-14-L-[<sup>35</sup>S]Cys en extractos ácidos de hipotálamos y de neurohipófisis de ratas posterior a la administración *in vivo* de L-[<sup>35</sup>S]Cys en el III ventrículo. El procedimiento se valoró comparando los niveles de biosíntesis *in vivo* de AVP-L-[<sup>35</sup>S]Cys, OT-L-[<sup>35</sup>S]Cys y SRIF-14-L-[<sup>35</sup>S]Cys entre ratas hidratadas y deshidratadas como índice de actividad de las neuronas peptidérgicas correspondientes frente a la deshidratación.

## Metodología

Se diseñaron 3 sistemas de CLAP para la medición de AVP-L-[<sup>35</sup>S]Cys, OT-L-[<sup>35</sup>S]Cys y SRIF-14-L-[<sup>35</sup>S]Cys biosintetizadas en hipotálamos y acumuladas en neurohipófisis de ratas después de la administración intracerebroventricular de L-[<sup>35</sup>S]Cys. Los péptidos marcados se obtuvieron simultáneamente por CLAP-I-1 y su identidad y grado de pureza radioquímica se determinaron individualmente por recromatografía en CLAP del péptido en su forma natural o después de ser derivatizado.

Los extractos radioactivos ácidos crudos de hipotálamo o de neurohipófisis se filtraron por columnas de Sephadex G25 para separar las fracciones peptídicas de la proteína de alto peso molecular. Las fracciones conteniendo los neuropéptidos-L-[<sup>35</sup>S]Cys se concentraron y purificaron por quimioadsorción a octadecilsilano, empleando cartuchos comerciales Sep Pak. Dada la inespecificidad relativa del método de purificación por

quimioadsorción, basado en las propiedades químicas (no biológicas) comunes de los péptidos, la AVP-L-[<sup>35</sup>S]Cys, la OT-L-[<sup>35</sup>S]Cys y la SRIF-14-L-[<sup>35</sup>S]Cys se recuperaron simultáneamente en la misma fracción. En este paso se logró la eliminación de la mayor cantidad de radioactividad contaminante.

Los neuropéptidos-L-[<sup>35</sup>S]Cys prepurificados por Sephadex G25 y quimioadsorción a octadecilsilano luego se separaron por CLAP-I-1, un sistema de CLAP en fase reversa con gradiente lineal de CH<sub>3</sub>CN, en el cual los péptidos eluyeron en orden ascendente de hidrofobicidad. De los 3 péptidos analizados, la AVP es la menos hidrofóbica, por lo cual eluyó al inicio de la corrida; la SRIF-14 es la más hidrofóbica y por ello eluyó al final.

Los cromatogramas radioactivos obtenidos por CLAP-I-1, muestran los niveles de radioactividad asociados a las fracciones de AVP, OT y SRIF-14 de hipotálamo y de neurohipófisis, obtenidas 4h después de la administración intracerebroventricular de la L-[<sup>35</sup>S]Cys. La radioactividad asociada a estas fracciones se midió fácilmente en todos los casos, con excepción de la AVP-L-[<sup>35</sup>S]Cys en los extractos de hipotálamo, que apenas pudo distinguirse por arriba del nivel de fondo radioactivo. Es posible que los bajos niveles de AVP-L-[<sup>35</sup>S]Cys en el extracto de hipotálamo sean atribuibles a pérdidas en el curso de su purificación. Dada su naturaleza iónica, es probable que la mayor pérdida de AVP haya ocurrido por partición en el HOAc durante la filtración de la fracción peptídica obtenida por Sephadex G25 (20mL) a través de los cartuchos Sep-Pak. *(Esta deficiencia metodológica aparece corregida en el Capítulo II. El manejo de hipotálamos y de neurohipófisis individuales permitió eliminar el paso de purificación por filtración en Sephadex G25 y con ello mejorar el rendimiento de la AVP)*. No obstante, sí pudo establecerse aquí la identidad de la AVP-L-[<sup>35</sup>S]Cys en los extractos de hipotálamo en análisis subsecuentes por CLAP-I-2 y su recromatografía por CLAP-I-1, posterior a

su oxidación con ácido perbromico. A pesar de ello, no fue posible determinar con confianza su grado de pureza isotópica.

La confirmación de identidad y la medición del grado de pureza isotópica de las demás fracciones peptídicas marcadas se obtuvieron directamente por su recromatografía en CLAP-I-2 (AVP, OT) o en CLAP-I-3 (SRIF-14), o bien por CLAP después de su modificación química: los derivados sulfónicos de la AVP-L-[<sup>35</sup>S]Cys y de la OT-L-[<sup>35</sup>S]Cys se analizaron por CLAP-I-1 y la SRIF-14-L-[<sup>35</sup>S]Cys carboximetilada se recromatografió en CLAP-I-3. CLAP-I-2 es un sistema de cromatografía en fase reversa y gradiente lineal de CH<sub>3</sub>CN en el cual la movilidad de los péptidos depende de sus propiedades hidrofóbicas adquiridas por interacción con el ácido hexanosulfónico, un agente apareador iónico añadido a la disolución amortiguadora del sistema. CLAP-I-3 es un sistema isocrático en fase reversa descrito por Rivier (I-12).

El análisis de la OT-L-[<sup>35</sup>S]Cys de hipotálamo y de la AVP-L-[<sup>35</sup>S]Cys de neurohipófisis, obtenidas por CLAP-I-1, mostraron niveles de pureza isotópica equivalentes en su forma natural y después de ser oxidadas. Esto no fue el caso para la OT-L-[<sup>35</sup>S]Cys neurohipofisiaria. La radioactividad asociada a esta fracción recromatografiada en CLAP-I-2 fue 20% mayor que aquella asociada a la fracción del derivado sulfónico de OT-L-[<sup>35</sup>S]Cys neurohipofisiaria obtenida en CLAP-I-1, sugiriendo la coelución de contaminantes radioactivos en la fracción de la OT-L-[<sup>35</sup>S]Cys en CLAP-I-2. Es por ello que la actividad específica de incorporación de L-[<sup>35</sup>S]Cys a esta fracción en la Tabla I-1 está dada en función de su grado de pureza radioquímica medida después de su modificación química y recromatografía en CLAP-I-1.

La medición por CLAP de la SRIF-14-L-[<sup>35</sup>S]Cys en los extractos de hipotálamo y de neurohipófisis, constituye la primera demostración bioquímica rigurosa de la biosíntesis *in vivo* de SRIF-14 en la rata. Con anterioridad, solamente había sido reportada la biosíntesis *in vitro* de SRIF-14 inmunorreactiva (SRIF-14-I) en fragmentos de hipotálamo en cultivo (I-10). El 70 a 80% de la radioactividad asociada a la fracción hipotalámica de SRIF-14 en CLAP-I-1, se comportó como SRIF-14-L-[<sup>35</sup>S]Cys en CLAP-I-3 tanto en su forma natural como después de ser carboximetilada, lo que constituye una demostración satisfactoria de su identidad y grado de pureza radioquímica. La fracción neurohipofisiaria de SRIF-14-L-[<sup>35</sup>S]Cys obtenida por CLAP-I-1 y recromatografiada por CLAP-I-3 inclusive alcanzó el 100% de pureza isotópica después de ser carboximetilada y recromatografiada por CLAP-I-3. Esta SRIF-14-L-[<sup>35</sup>S]Cys neurohipofisiaria seguramente es de origen hipotalámico y viaja al lóbulo neural en la vía discreta identificada por Hökfelt *et al.* (I-26), que contrasta con la vía muy desarrollada de los péptidos neurohipofisarios clásicos de AVP y OT (I-27). De hecho, los niveles neurohipofisarios de SRIF-14-L-[<sup>35</sup>S]Cys son 10 veces menores que sus niveles en el hipotálamo, mientras que los niveles neurohipofisarios de AVP-14-L-[<sup>35</sup>S]Cys y OT-L-[<sup>35</sup>S]Cys siempre son mayores que sus niveles en hipotálamo. Por otra parte, los niveles endógenos de la SRIF-14 inmunodetectable en la neurohipófisis (I-28) son 1000 veces menores a los niveles inmunodetectables de AVP (I-29) y de OT (I-30). Por ahora se desconoce el significado fisiológico de la SRIF-14 neurohipofisiaria (I-28).

La carboximetilación de la SRIF-14 de hipotálamo o de neurohipófisis siempre resultó en el desdoblamiento del material en 2 fracciones, la CM-SRIF-14-I y la CM-SRIF-14-II, con movilidades en CLAP-I-3 menor y mayor a la SRIF-14 original, respectivamente. En sus estudios para caracterizar la SRIF-14 de páncreas de paloma, Spiess *et al.* (I-13) observaron que controlando el pH de la reacción podían carboximetilar uno o los dos



residuos de Cys de la SRIF-14. Trabajando a pH 6.0, obtenían un producto carboximetilado en una sola posición (no identificaron la posición), con un tiempo de retención en CLAP-I-3 mayor que la SRIF-14. En cambio, carboximetilando el material a pH 8.7, obtenían un producto carboximetilado en los 2 residuos de Cys, con un tiempo de retención en CLAP-I-3 menor que la SRIF-14. Independientemente del tiempo de reacción y a pesar de llevar a cabo la reacción en condiciones cuidadosamente controladas a pH 8.7; inexplicablemente aquí la carboximetilación de la SRIF-14 sintética o de la SRIF-14-L-[<sup>35</sup>S]Cys, siempre resultó en la formación de 2 productos de reacción. De hecho, la demostración de que después de la carboximetilación conjunta de SRIF-14 sintética y SRIF-14-L-[<sup>35</sup>S]Cys la relación entre el par de productos marcados fuera igual a la relación entre el par de productos no radioactivos, fue prueba de identidad de la SRIF-14-L-[<sup>35</sup>S]Cys.

**Biosíntesis *in vivo* de AVP-L-[<sup>35</sup>S]Cys, OT-L-[<sup>35</sup>S]Cys y SRIF-14-L-[<sup>35</sup>S]Cys en el hipotálamo y su acumulación en la neurohipófisis de ratas hidratadas y deshidratadas.**

Una vez establecida la metodología, se aplicó ésta a la comparación de los niveles de biosíntesis *in vivo* de AVP-L-[<sup>35</sup>S]Cys, OT-L-[<sup>35</sup>S]Cys y SRIF-14-L-[<sup>35</sup>S]Cys entre ratas hidratadas y deshidratadas. En respuesta a los estímulos osmótico (I-18) y natriurético (I-18), posterior a la administración de NaCl al 2% durante 5 días, la incorporación de la marca a AVP y a OT en los extractos de hipotálamos de ratas deshidratadas fue 3 a 4 veces mayor que los valores correspondientes obtenidos en los extractos de hipotálamos de ratas hidratadas, que sólo recibieron agua. La incorporación de la marca a AVP y a OT en los extractos neurohipofisarios de las ratas deshidratadas fue 2 veces mayor que en las ratas hidratadas. Estos cambios ocurrieron paralelamente con una caída pronunciada en los niveles endógenos neurohipofisarios de AVP y de OT en las ratas deshidratadas al 20% de sus niveles en las ratas hidratadas.

No hubo ningún cambio apreciable en el grado de pureza isotópica de los péptidos marcados en los extractos de las ratas deshidratadas en comparación con las ratas hidratadas, con excepción de la fracción hipotalámica de OT-L-[<sup>35</sup>S]Cys cuya pureza radioquímica fue mayor debido probablemente a que la inducción de su biosíntesis en respuesta a los estímulos osmótico y natriurético ocurrió sin cambio en el nivel de los contaminantes radioactivos que coeluyeron con el neuropéptido.

Independientemente del estado de hidratación de las ratas, tanto en los extractos de hipotálamo como de neurohipófisis, la radioactividad asociada a las fracciones de OT siempre fue mayor que aquella asociada a las fracciones de AVP (una observación que no cambió en los estudios descritos en el Capítulo II, aún después de simplificar el procedimiento de purificación de la AVP-L-[<sup>35</sup>S]Cys y lograr un rendimiento de AVP-L-[<sup>35</sup>S]Cys similar al de la OT-L-[<sup>35</sup>S]Cys). Estos resultados contrastan con las observaciones de Gainer et al. (I-31), quienes encontraron que después de inyectar L-[<sup>35</sup>S]Cys en el núcleo supraóptico (SON), la relación de AVP-L-[<sup>35</sup>S]Cys a OT-L-[<sup>35</sup>S]Cys en la neurohipófisis era de 1.8. Es factible que esta discrepancia sea atribuible a la diferencia en el sitio de inyección del precursor radioactivo.

La deshidratación de las ratas no alteró el nivel de incorporación de la marca a la proteína de hipotálamo precipitable con HOAc (una medida de la síntesis de proteínas total en hipotálamo), aunque sí resultó en un aumento notable en el nivel de la proteína-L-[<sup>35</sup>S]Cys neurohipofisaria precipitable con HOAc. Este aumento paralelo al incremento en los niveles de AVP-L-[<sup>35</sup>S]Cys y de OT-L-[<sup>35</sup>S]Cys en las ratas deshidratadas sugiere que se trata de una fracción proteínica ligada a los neuropéptidos, probablemente rica en precursores biosintéticos residuales (I-31, I-32, I-33, I-34,) con alto contenido de

cisteína (I-35), y formando agregados de alto peso molecular (I-36). No se conoce el porcentaje de precursores residuales de AVP y de OT en la neurohipófisis de la rata, pero en el humano constituye de un 10-16% del material precursor total.

A diferencia de su efecto sobre las neuronas vasopresinérgicas y oxitocinérgicas, los estímulos osmótico y natriurético en las ratas tratadas con NaCl al 2% durante 5 días no afectaron sensiblemente la actividad de las neuronas somatostatinérgicas. Los niveles de SRIF-14-L-[<sup>35</sup>S]Cys en el hipotálamo y en la neurohipófisis no variaron significativamente entre las ratas deshidratadas y las ratas hidratadas. Este resultado es congruente con las observaciones de Rossier et al. (I-37), quienes encontraron inalterados los niveles neurohipofisarios de la SRIF-14 inmunorreactiva en ratas que habían recibido NaCl al 2% durante 5 días. Al parecer las neuronas somatostatinérgicas que se están marcando radioactivamente, en su mayoría neuronas periventriculares (I-26, I-38), no son osmosensibles. Hay duda respecto a la existencia de neuronas somatostatinérgicas que se han identificadas inmunohistoquímicamente en los núcleos magnocelulares (I-39), que de existir tampoco parecen ser osmosensibles.

Además de los estímulos osmótico y natriurético a los que se sometieron a las ratas deshidratadas, tanto éstas como las ratas hidratadas estuvieron expuestas a la anestesia con pentobarbital y al trauma post-operatorio de la trepanación y del sangrado del seno sagital superior que pudiera haber afectado la biosíntesis *in vivo* de AVP-L-[<sup>35</sup>S]Cys, OT-L-[<sup>35</sup>S]Cys y SRIF-14-L-[<sup>35</sup>S]Cys. Existe evidencia experimental que demuestra que el pentobarbital y el estrés quirúrgico pueden estimular la secreción de AVP (I-40) y de OT (I-41), por lo cual es probable que estos factores hayan alterado la biosíntesis de AVP-L-[<sup>35</sup>S]Cys y de OT-L-[<sup>35</sup>S]Cys en los dos grupos experimentales. En consecuencia, los niveles de incorporación de L-[<sup>35</sup>S]Cys a estos péptidos en las ratas

hidratadas no corresponden a niveles de incorporación de la marca basal y en las ratas deshidratadas no son atribuibles enteramente a la estimulación por la deshidratación. Por lo que toca a la biosíntesis de SRIF-14-L-[<sup>35</sup>S]Cys, se sabe que la anestesia con pentobarbital inhibe la secreción de SRIF-14, observándose paralelamente un aumento en su contenido en el hipotálamo (I-42), por lo que es posible especular que los niveles de biosíntesis de SRIF-14-L-[<sup>35</sup>S]Cys que se reportan aquí, tanto para las ratas hidratadas como para las ratas deshidratadas, son menores a sus niveles de biosíntesis basal. De hecho, posterior a la publicación de este trabajo (I-43), Van Itallie y Fernstrom (I-44) demostraron que en ratas anestesiadas con uretano, un anestésico que induce la secreción de SRIF-14 (I-42), la incorporación de la marca a la SRIF-14 es el doble del valor obtenido en ratas anestesiadas con pentobarbital.

Las interferencias en la medición de la biosíntesis *in vivo* de AVP-L-[<sup>35</sup>S]Cys, OT-L-[<sup>35</sup>S]Cys y SRIF-14-L-[<sup>35</sup>S]Cys en el hipotálamo y la neurohipófisis de ratas hidratadas y deshidratadas descritas en este Capítulo, debidas a la anestesia y al trauma quirúrgico, se han superado en los estudios descritos en el Capítulo II. Mediante la implantación intracraneal de cánulas guía dirigidas al III V para la administración de la marca radioactiva a ratas despiertas y recuperadas del trauma quirúrgico, se aseguran mediciones más precisas de biosíntesis *in vivo* de los neuropéptidos, tanto del nivel de incorporación de la marca basal como de niveles de incorporación de la marca en respuesta a manipulaciones experimentales hechas a las ratas.

## Conclusiones

1. Se demostró que en la rata es posible medir simultáneamente la biosíntesis *in vivo* de AVP-L-[<sup>35</sup>S]Cys, OT-L-[<sup>35</sup>S]Cys y SRIF-14-L-[<sup>35</sup>S]Cys en extractos combinados de 5 hipotálamos así como medir su acumulación en los extractos combinados de las 5 neurohipófisis correspondientes (junto con AVP y OT neurohipofisiarias endógenas) posterior a la administración al III ventrículo de 50  $\mu$ Ci/rata del precursor radioactivo. [En este modelo, se marcan principalmente las neuronas vasopresinérgicas y oxitocinérgicas del núcleo paraventricular y las neuronas somatostatinérgicas periventriculares].
2. La medición de los neuropéptidos-L-[<sup>35</sup>S]Cys en los extractos de hipotálamos y neurohipófisis fue posible gracias al alto poder de resolución de la CLAP. Extraídos con HOAc, prepurificados en bloque por filtración en gel y quimioadsorción a octadecilsilano AVP-L-[<sup>35</sup>S]Cys, OT-L-[<sup>35</sup>S]Cys y SRIF-14-L-[<sup>35</sup>S]Cys fueron separados mediante la CLAP en fase reversa [octadecilsilano (fase sólida)/gradiente de CH<sub>3</sub>CN (fase móvil)] y cuantificados por centelleo líquido.
3. A pesar de que cada una de las fracciones peptídicas marcadas obtenidas así fue solamente una pequeñísima fracción del material radioactivo administrado para marcarlas, fue posible aislarlas simultáneamente en un sólo paso por CLAP (previa prepurificación en bloque) con un grado de pureza radioquímica mayor al 50%, tal y como se demostró por CLAP ya fuera de los neuropéptidos-L-[<sup>35</sup>S]Cys naturales o después de ser éstos modificados químicamente y recromatografiados.
4. Debido al grado de pureza radioquímica de las fracciones peptídicas las mediciones de biosíntesis de AVP-L-[<sup>35</sup>S]Cys, OT-L-[<sup>35</sup>S]Cys y SRIF-14-L-[<sup>35</sup>S]Cys constituyen un buen índice de actividad neuronal. De esta manera fue posible medir la respuesta de las neuronas peptidérgicas correspondientes a los estímulos osmótico y natriurético que

ocurren en ratas deshidratadas comparativamente con su actividad en las ratas hidratadas. El aumento en los niveles de incorporación de la marca a AVP-L-[<sup>35</sup>S]Cys y a OT-L-[<sup>35</sup>S]Cys hipotalámicas y neurohipofisiarias en las ratas deshidratadas en relación a las ratas hidratadas es un reflejo del aumento en la actividad de las neuronas vasopresinérgicas y oxitocinérgicas (principalmente paraventriculares) bajo estas condiciones experimentales, mientras que la similitud de la incorporación de la marca a la SRIF-14-L-[<sup>35</sup>S]Cys en ratas hidratadas y deshidratadas es una demostración de que las neuronas somatostatinérgicas periventriculares no son osmosensibles.

5. Este trabajo fue publicado en:

**Franco-Bourland RE, Fernstrom JD** *In vivo* biosynthesis of L-[<sup>35</sup>S]-arginine vasopressin, -oxytocin, and somatostatin: rapid estimation using reversed phase high pressure liquid chromatography. *Endocrinology* 109 (1981) 1097-1106.

Ha sido citado 16 veces.

1. Swann RW, Birkett SD, González CB, Pickering BT Precursors in the biosynthesis of vasopressin and oxytocin in the rat - characteristics of all the components in high-performance liquid-chromatography. *Biochemical J* 208 (1982) 339-349.
2. Van Itallie CM, Fernstrom JD Hypothalamic somatostatin-14 and -28 biosynthesis: effect of anesthetics and hypophysectomy. *Brain Res* 249 (1982) 177-183.
3. Van Itallie CM, Fernstrom JD *In vivo* studies of somatostatin-14 and somatostatin-28 biosynthesis in rat hypothalamus. *Endocrinology* 113 (1983) 1210-1217.
4. Robinson ICAF, Jones PM An intermediate in the biosynthesis of vasopressin and neurophysin in the guinea-pig posterior pituitary. *Neurosci Letts* 39 (1983) 273-278.
5. White JD, Krause JE, McKelvy JF *In vivo* biosynthesis and transport of oxytocin, vasopressin and neurophysins to posterior pituitary and nucleus of the solitary tract. *J Neurosci* 4 (1984) 1262-1270.
6. Zingg HH, Patel YC, Habener JF Approaches to the study of somatostatin biosynthesis. *Adv Exp Med Biol* 188 (1985) 49-58.
7. White JD, Stewart KD, McKelvy JF, Krause JE Biochemistry of peptide-secreting neurons. *Physiol Rev* 65 (1985) 553-606.
8. Camier M, Barre N, Cohen P, Morel A *In vivo* synthesis and processing of rat hypothalamic prosomatostatin. *FEBS Letts* 196 (1986) 14-18.
9. Clements JA, Funder JW Arginine vasopressin and oxytocin in organs outside the nervous system. *Front Neuroendocrinol* 10 (1988) 117-152.
10. Vantol HHM, Kiss JZ, Burbach JPH Differential responses in vasopressin and oxytocin gene-expression in distinct hypothalamic nuclei after hypothalamoneurohypophyseal disconnection and vasopressin substitution. *Neuroendocrinology* 49 (1989) 337-343.
11. Fernstrom JD, Fernstrom MH, Kwok RPS *In vivo* somatostatin, vasopressin, and oxytocin synthesis in diabetic rat hypothalamus. *Am J Physiol* 258 (1990) E661-E666.
12. Meister B, Cortes R, Villar MJ, Schalling M, Hökfelt T Peptides and transmitter enzymes in hypothalamic magnocellular neurons after administration of hyperosmotic stimuli - comparison between messenger RNA and peptide protein-levels. *Cell Tiss Res* 280 (1990) 279-297.
13. Vantol HHM, Snijdwint FGM, Boer GJ, Burbach JPH Hypothalamic oxytocin messenger-RNA during development of the Brattleboro rat - comparison to vasopressin messenger-RNA. *Neurosci Res Commun* 7 (1990) 25-33.
14. Vanvliet RAC, Walton JS, Wildeman AG, Betteridge KJ, Gibbins AMV Absence of oxytocin-neurophysin messenger-RNA in the day-18 bovine conceptus. *J Reprod Fert* 91 (1991) 73-79.
15. Burbach JPH, Adan RAH, Debree FM Regulation of oxytocin gene-expression and forms of oxytocin in the brain. *Ann NY Acad Sci* 652 (1992) 1-13.
16. Dheen ST, Tay SSW, Wong WC Arginine vasopressin-like and oxytocin-like immunoreactive neurons in the hypothalamic paraventricular and supraoptic nuclei of streptozotocin-induced diabetic rats. *Arch Histol Cytol* 57 (1994) 461-472.

## **Bibliografia**

- I-1. Sachs H *Vasopressin biosynthesis. I. In vivo studies.* J Neurochem 5 (1960) 297-303.
- I-2. Sachs H *Vasopressin biosynthesis. II. Incorporation of [<sup>35</sup>S] cysteine into vasopressin and protein associated with cell fraction.* J Neurochem 10 (1963) 299-311.
- I-3. Sachs H, Fawcett P, Takabatake Y, Portanova R *Biosynthesis and release of vasopressin and neurophysin.* Rec Prog Horm Res 25 (1969) 447-491.
- I-4. Sachs H, Takabatake Y *Evidence for a precursor in vasopressin biosynthesis.* Endocrinology 75 (1964) 943-948.
- I-5. Sachs H, Goodman R, Osinchak J, McKelvy J *Supraoptic neurosecretory neurons of the guinea pig in organ culture. Biosynthesis of vasopressin and neurophysin.* Proc Natl Acad Sci USA 68 (1971) 2782-2786.
- I-6. Takabatake Y, Sachs H *Vasopressin biosynthesis. III. In vitro studies.* Endocrinology 75 (1964) 934-942.
- I-7. Pickering BT, Jones CW *Isolation of radioactive oxytocin and vasopressin from the posterior pituitary gland of the rat after the injection of labelled tyrosine into the cerebrospinal fluid.* J Endocrinol 49 (1971) 93-103.

- I-8. Noe BD, Fletcher DJ, Bauer GE, Weir GC, Patel Y *Somatostatin biosynthesis occurs in pancreatic islets*. *Endocrinology* 102 (1978) 1675-1685.
- I-9. Zühlke H, Ziegler M, Jahr H, Titze R, Schmidt S *Biosynthesis of somatostatin in pancreas islets of Wistar rats*. *Acta Bio Med Ger* 37 (1978) K15-K18.
- I-10. Ensinnck JW, Laschansky EC, Kanter RA, Fijimoto WJ, Koerker DJ, Goodner CJ *Somatostatin biosynthesis and release in the hypothalamus and pancreas of the rat*. *Metabolism* 27 Suppl 1 (1978) 1207-1210.
- I-11. Snyder LR, Kirkland JJ **Introduction to Modern Liquid Chromatography**. Second Edition. John Wiley & Sons, Inc, New York, 1979.
- I-12. Rivier JE *Use of trialkylammonium phosphate (TAAP) buffers in reverse phase HPLC for high resolution and high recovery of peptides and proteins*. *J Liq Chromatography* 1 (1978) 343-366.
- I-13. Spiess J, Rivier JE, Rodkey JA, Bennet CD, Vale W *Isolation and characterization of somatostatin from pigeon pancreas*. *Proc Natl Acad Sci USA* 76 (1979) 2974-2978.
- I-14. White JD, Krause JE, McKelvy JF *In vivo biosynthesis and transport of oxytocin, vasopressin and neurophysins to posterior pituitary and nucleus of the solitary tract*. *J Neurosci* 4 (1984) 1262-1270.



- I-15. Burgus R, Rivier J *Use of high pressure liquid chromatography in the purification of peptides*. In: Loffet A (Ed) **Peptides, 1976**. Editions de l'Universite de Bruxelles, Belgium, 1976; pp. 85-94.
- I-16. Biemond MEF, Sipman WA, Olivie J *Quantitative determination of polypeptides by gradient elution high pressure liquid chromatography*. *J Liq Chromatogr* 2 (1979) 1407-1435.
- I-17. Morris HR, Etienne AT, Dell A, Albuquerque R *A rapid and specific method for the high resolution, purification, and characterization of neuropeptides*. *J Neurochem* 34 (1980) 574-582.
- I-18. Jones CW, Pickering BT *Comparison of the effects of water deprivation and sodium chloride imbibition on the hormone content of the neurohypophysis of the rat*. *J Physiol* 203 (1969) 449-458.
- I-19. Hirs CHW *Formic acid oxidation*. In: Hirs CHW (Ed) **Methods in Enzymology. XI. Enzyme Structure**. Academic Press, New York, 1967; pp. 197-199.
- I-20. Toennies G, Homiller RP *The oxidation of amino acids by hydrogen peroxide in formic acid*. *J Amer Chem Soc* 64 (1942) 3054-3056.
- I-21. König JFR, Knippel RA **The Rat Brain. A Stereotaxic Atlas of the Forebrain and Lower Parts of the Brain Stem**. Robert E Krieger Publ Co, Inc, New York, 1967.

- I-22. Paxinos G, Watson C *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, Sidney, 1986.
- I-23 Schwartz MW, Woods SC, Porte Jr D, Seeley RJ, Baskin DG *Central nervous system control of food intake*. *Nature* 404 (2000) 661-671.
- I-24. Hirs CHW *Reduction and S-carboxymethylation of proteins*. In: Hirs CHW (Ed) **Methods in Enzymology. XI. Enzyme Structure**. Academic Press, New York, 1967; pp. 199-203.
- I-25. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ *Protein measurement with Folin phenol reagent*. *J Biol Chem* 193 (1951) 265-275.
- I-26. Hökfelt T, Efendic S, Hellerström C, Johansson O, Luft R, Arimura A *Cellular localization of somatostatin in endocrine-like cells and neurons of the rat with special reference to the A1 cells of the pancreatic islets and to the hypothalamus*. *Acta Endocrinol* 80 Suppl 200 (1975) 5-41.
- I-27. Defendini R, Zimmerman EA *The magnocellular neurosecretory system of the mammalian hypothalamus*. In: Reichlin S, Baldessarini RJ, Martin JB (Eds) **The Hypothalamus**. Raven Press, New York, 1978; pp. 137-152.
- I-28. Patel YC, Reichlin S *Somatostatin in hypothalamus, extrahypothalamic brain, and peripheral tissues of the rat*. *Endocrinology* 102 (1978) 523-530.

- I-29. George JM *Vasopressin and oxytocin are depleted from rat hypothalamic nuclei after oral hypertonic saline.* Science 193 (1976) 146-148.
- I-30. George JM, Staples S, Marks BM *Oxytocin content of microdissected areas of rat hypothalamus.* Endocrinology 98 (1976) 1430-1433.
- I-31. Gainer H, Sarne Y, Brownstein MJ *Biosynthesis and axonal transport of rat neurohypophysial proteins and peptides.* J Cell Biol 73 (1977) 366-381.
- I-32. Rosenoir JC, North WG, Moore GJ *Putative precursors of vasopressin, oxytocin, and neurophysins in the rat hypothalamus.* Endocrinology 109 (1981) 1067-1072.
- I-33. Russell JT, Brownstein MJ, Gainer H *Time course of appearance and release of [<sup>35</sup>S]cysteine labelled neurophysins and peptides in the neurohypophysis.* Brain Res 205 (1981) 299-311.
- I-34. Gainer H, Loh YP, Neale EA *The organization of post-translational precursor processing in peptidergic neurosecretory cells.* In: **Proteins in the Nervous System: Structure and Function.** Alan R Liss, Inc, New York, 1982; pp. 131-145.
- I-35. Verbalis JG, Robinson AG *Characterization of neurophysin-vasopressin prohormones in human posterior pituitary tissue.* J Clin Endocrinol Metab 57 (1983) 115-123.

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

- I-36. Cupo A, Rougon-Rapuzzi G, Delaage MA *Immunochemical detection of vasopressin precursors: artificial processing and quantification along the hypothalamo-hypophysial axis.* Eur J Biochem 115 (1981) 169-174.
- I-37. Rossier J, Battenberg E, Pittman Q, Bayón A, Koda L, Millar R, Guillemin R, Bloom F *Hypothalamic enkephalin neurones may regulate the neurohypophysis.* Nature 177 (1977) 653-655.
- I-38. Parsons JA, Erlandsen SL, Hegre OD, McEvoy RC, Elde RP *Central and peripheral localization of somatostatin immunoenzyme immunocytochemical studies.* J Histochem Cytochem 24 (1976) 872-882.
- I-39. Dierickz K, Vandesande F *Immunocytochemical localization of somatostatin-containing neurons in the rat hypothalamus.* Cell Tissue Res 201 (1979) 349-359.
- I-40. Bonjour JP, Malvin RL *Plasma concentrations of ADH in conscious and anesthetized dogs.* Am J Physiol 218 (1970) 1128-1132.
- I-41. Dogterom J, Van Wimersma Greidanus TjB, Swaab DF *Evidence for the release of vasopressin and oxytocin into cerebral fluid: measurements in plasma and CSF of intact and hypophysectomized rats.* Neuroendocrinology 24 (1977) 108-118.
- I-42. Saito H, Ogawa T, Ishimaru K, Oshima I, Saito S *Effect of pentobarbital and urethane on the release of hypothalamic somatostatin and pituitary growth hormone.* Horm Metab Res 11 (1979) 550-554.

I-43. Franco-Bourland RE, Fernstrom J *In vivo biosynthesis of L-[<sup>35</sup>S]Cys-arginine vasopressin, -oxytocin, and -somatostatin: rapid estimation using reversed phase high pressure liquid chromatography.* Endocrinology 109 (1981) 1097-1106.

I-44. Van Itallie CM, Fernstrom JD *Hypothalamic somatostatin-14 and -28 biosynthesis: effect of anesthetics and hypophysectomy.* Brain Res 249 (1982) 177-183.

I-45. Van Itallie CM, Fernstrom JD *In vivo studies of somatostatin-14 and somatostatin-28 biosynthesis in rat hypothalamus.* Endocrinology 113 (1983) 1210-1217.

## Publicaciones

### Artículo

- **Franco-Bourland RE, Fernstrom JD**

*In vivo* biosynthesis of L-[<sup>35</sup>S]-arginine vasopressin, -oxytocin, and somatostatin: rapid estimation using reversed phase high pressure liquid chromatography. *Endocrinology* 109 (1981) 1097-1106.

- **Resúmenes en memorias de congresos internacionales**

- **1. Franco-Bourland RE, Fernstrom JD**

*In vivo* biosynthesis of L-[<sup>35</sup>S]Cys-arginine vasopressin, -oxytocin, and -somatostatin: rapid estimation using reversed-phase high pressure liquid chromatography, p.110, Abstr. 86. International Symposium on Pituitary Hormones and Related Peptides from Cell Biology to Clinical Applications. Republic of San Marino, May 25-27, 1981.

- **2. Franco-Bourland RE, Fernstrom JD**

*In vivo* biosynthesis of L-[<sup>35</sup>S]Cys-arginine-vasopressin, -oxytocin, and -somatostatin after osmotic stimulation, p. 51. 2<sup>nd</sup> International Symposium on Somatostatin. Athens, Greece, June 1-3, 1981.

- **3. Franco-Bourland RE, Fernstrom JD**

*In vivo* biosynthesis of brain peptides: rapid estimation using HPLC, p. 167.

VII International Biophysics Congress and III Pan-American Biochemistry Congress, Mexico City, México, August 23-28, 1981.

# *In Vivo* Biosynthesis of L-[<sup>35</sup>S]Cys-Arginine Vasopressin, -Oxytocin, and -Somatostatin: Rapid Estimation Using Reversed Phase High Pressure Liquid Chromatography\*

REBECCA E. FRANCO-BOURLAND† AND JOHN D. FERNSTROM‡

Laboratory of Brain and Metabolism, Department of Nutrition and Food Science, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, Massachusetts 02139

**ABSTRACT.** L-[<sup>35</sup>S]Cys-arginine vasopressin, -oxytocin, and -somatostatin were purified from hypothalami and neurohypophyses 4 h after rats received L-[<sup>35</sup>S]Cys via the third ventricle. After acetic acid extraction, Sephadex G-25 filtration, and chemoadsorption to C<sub>18</sub>-silica (Sep-Pak cartridges), the labeled peptides were rapidly separated by gradient elution, reversed phase, high pressure liquid chromatography (HPLC). The identity and isotopic purity of the labeled peptides were determined by several reversed phase HPLC procedures in conjunction with chemical modification. The labeled peptide fractions were at least 50% radiochemically pure. Using this HPLC isolation pro-

cedure, incorporation of L-[<sup>35</sup>S]Cys into each peptide was determined in hydrated and dehydrated rats. Label incorporation into arginine vasopressin and oxytocin in the hypothalamus and the neurohypophysis of dehydrated rats was 2-3 times greater than that in hydrated rats. Incorporation of label into hypothalamic and neurohypophyseal somatostatin was unaffected by the hydration state of the animal. This procedure thus provides a very rapid, but sensitive, set of techniques for studying the control of small peptide biosynthesis in the brain. (*Endocrinology* 109: 1097, 1981)

**T**HE STUDY of brain peptide biosynthesis has technically been a formidable area of investigation for many years. Significant *in vivo* incorporation of radiolabeled amino acids into peptides has not been a great problem. However, major difficulties have arisen in attempting to isolate, in pure form, specific labeled peptides from the morass of other compounds labeled after tracer injection. Sachs and associates (1) made fundamental contributions by succeeding in the isolation of labeled vasopressin after intraventricular administration of [<sup>35</sup>S]cysteine. However, the isolation-purification procedures took weeks, required several steps (e.g. ion exchange chromatography, isoelectric focusing, and affinity chromatography), and resulted in the processing of only a small number of samples at a time. Moreover, only modest amounts of radioactivity were usually recovered. Similar techniques have been applied more recently by others to the study of the synthesis of ACTH in pituitary

tumor cells (2) and somatostatin (SRIF) in pancreatic tissue (3, 4).

It seems likely that the complexity of these techniques and the ability to study only a single peptide at a time may have discouraged other investigators from pursuing studies of peptide biosynthesis. Certainly, active interest in this area might surface if more rapid, simple, and reliable methods become available for purifying labeled peptides.

We recently explored a potentially powerful method for studying peptide biosynthesis using isotope labeling and, in the process, developed a rapid peptide purification procedure. In this report, we describe the methodology, which involves a gradient elution, reversed phase, high pressure liquid chromatography (HPLC) technique for the simultaneous separation of three labeled neuropeptides, arginine vasopressin (AVP), oxytocin (OXT), and SRIF, from the hypothalami and neurohypophyses of rats after third ventricular administration of L-[<sup>35</sup>S]Cys. Using this methodology, we also demonstrate the *in vivo* biosynthesis of SRIF in the rat hypothalamus and the presence of labeled SRIF in the neurohypophysis, and provide data on the *in vivo* biosynthesis of OXT and AVP in the hypothalamus-neurohypophysis of the rat.

## Materials and Methods

Male Wistar rats (200-250 g; Charles River Breeding Laboratories, Wilmington, MA) were housed in our animal facilities

Received February 2, 1981.

Address requests for reprints to: J. D. Fernstrom, Laboratory of Brain and Metabolism 56-137, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, Massachusetts 02139.

\* This work was supported by NIH Grant HD-11722.

† Present address: Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de la Nutrición, Viaducto Tlalpan y Ave. San Fernando, México 22, D.F., México. Recipient of CONACYT-Mexico Postdoctoral Fellowship 17616.

‡ Recipient of NIMH Research Scientist Development Award MH-00254.

for 1 week. Food and water were provided *ad libitum*. For 5 days, some rats received tap water, while others received 2% NaCl. During this period, fluid intake and urine flow increased progressively in animals given NaCl; at the end of the experiment, they weighed an average of 40 g less than rats that consumed water.

Rats were anesthetized with sodium pentobarbital (Nembutal, Abbott Laboratories, North Chicago, IL). Their heads were fixed in a stereotaxic device (David Kopf Instruments, Tujunga, CA), and a scalp incision was made over the injection site [posterior, 2.00; lateral, 0.0; vertical, 8.5 (Bregmoidal reference)]. A 10- $\mu$ l Hamilton syringe was then lowered into the third ventricle, and 50  $\mu$ Ci L-[<sup>35</sup>S]Cys (543.02 Ci/mmol; New England Nuclear Corp., Boston, MA) in 1  $\mu$ l 0.9% NaCl containing 10 mM dithiothreitol (DTT) were injected over a period of 7 min (the accuracy of injection was determined anatomically by injecting 1  $\mu$ l methylene blue into other rats). The scalp wound was then closed, and the rats were decapitated 4 h later.

The brain was removed and placed on a chilled glass plate, ventral side up. A brain slice was obtained by making coronal sections rostral to the optic chiasm and then rostral to the mammillary bodies. This slice was placed flat on the cutting glass, and two more (sagittal) incisions were made, 3 mm to either side of the midline. A final (horizontal) cut was made at the anterior commissure, allowing removal of the hypothalamus. The neurohypophysis was separated from the adenohypophysis with a pair of fine forceps.

All solutions were prepared with deionized water prefiltered through a Milli Q water purification system (Millipore Corp., Bedford, MA). Tissues were extracted in 2 M HOAc containing 0.01% bovine serum albumin (BSA; fraction V, ICN Pharmaceuticals Inc., Cleveland, OH) and 0.01% NaN<sub>3</sub>.

Solvent mixtures for HPLC were made up with Millipore-filtered (0.5  $\mu$ m; FH filter) HPLC grade CH<sub>3</sub>CN (Fisher Scientific Co., Fair Lawn, NJ) in the following Millipore-filtered (0.45  $\mu$ m; HA filter) solutions: 1) 0.01 M ammonium acetate (NH<sub>4</sub>OAc), pH 4.0; 2) 0.02 M HOAc (pHix buffer grade, Pierce Chemical Co., Rockford, IL) containing 0.1% 1-hexane sulfonic acid, sodium salt (Eastman Kodak Co., Rochester, NY) recrystallized from ethanol; and 3) 0.25 N triethylammonium formate (pH 3.0). Just before chromatography, solvent mixtures were degassed for 3 min by ultrasonication *in vacuo*.

The hypothalami and neurohypophyses from hydrated and dehydrated rats were removed within 2 min of decapitation. They were immediately homogenized in 4 or 2 ml ice-cold 0.01 M NH<sub>4</sub>OAc, pH 4, respectively, in a polypropylene tube with a tight fitting pestle. The following carrier peptides were added just before homogenization of the hypothalami or neurohypophyses: 20 or 10  $\mu$ g AVP (Ferring AB, Malmo, Sweden); 6 or 3  $\mu$ g OXT (Bachem Fine Chemicals, Inc., Torrance, CA); and 8 and 8  $\mu$ g SRIF (Bachem Fine Chemicals, Inc.), respectively.

The following steps were then performed at 4 C. Homogenates were centrifuged at 10,000  $\times$  g for 1 h. The pellets were reextracted once with 4 ml (hypothalamic preparation) or 2 ml (pituitary preparation) 0.01 M NH<sub>4</sub>OAc, pH 4, and stored at -70 C for later estimation of L-[<sup>35</sup>S]Cys incorporation into 2 M HOAc-precipitable protein. Supernatants were pooled and stored at 0 C overnight.

Clear tissue extracts were subsequently run on 2.5  $\times$  18-cm columns (in Plexiglass tubing) of Sephadex G-25 (previously coated with 2 ml 2% BSA in 0.01 M NH<sub>4</sub>OAc, pH 4; Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, NJ) in 0.01 M NH<sub>4</sub>OAc (pH 4) at a flow rate of 40 ml/h. Two-milliliter fractions were collected in Falcon tubes (Oxnard, CA). Radioactivity was measured in 50- $\mu$ l aliquots counted in 3 ml liquid scintillation fluid using a Beckman liquid scintillation spectrophotometer (model LS 7000, Beckman Instruments, Irvine, CA) with an efficiency for <sup>35</sup>S of 90-95%. The liquid scintillation fluid (SV-T) was made by combining Scinti Verse (Fisher Scientific Co.) and Triton X-100 (Amersham Corp., Arlington Heights, IL) in an 8:1 ratio. The fractions eluting between the void volume and the salt volume contained AVP, OXT, and SRIF (columns were calibrated with [<sup>125</sup>I]iodo-PRL and <sup>125</sup>I; New England Nuclear Corp.). These fractions were combined and applied onto Sep-Pak C<sub>18</sub> reversed phase cartridges (Waters Associates, Milford, MA) previously washed with 5 ml isopropanol and then 10 ml deionized water. After washing the C<sub>18</sub> support with 5 ml clean 0.01 M NH<sub>4</sub>OAc (pH 4), the peptides were eluted in 6 ml 75% CH<sub>3</sub>CN in this same buffer. The eluates were lyophilized in polypropylene tubes in a Savant Speed Vac concentrator (Hicksville, NY).

The lyophilized samples were subsequently analyzed by one of more HPLC steps. Before chromatography, they were resuspended in 100 or 200  $\mu$ l of the starting solvent mixture. Any insoluble material was removed by centrifugation in an Eppendorf centrifuge (Brinkmann Instruments, Westbury, NY).

The HPLC apparatus consisted of a Micromeritics liquid chromatograph (model 7000 B, Norcross, GA) and employed a 4-mm  $\times$  30-cm C<sub>18</sub>  $\mu$ -Bondapak column (Waters Associates). Eluate absorbance at 210 nm was monitored in a Gilford model 203 flow cell, with a Gilford spectrophotometer (model 2400, Oberlin, OH). Absorbance was recorded on a Linear Instruments chart recorder (model 285, Irvine, CA).

The partially purified material obtained from Sep-Pak cartridges was run on the HPLC using conditions specified in Fig. 1. Further chromatographic steps were then performed on the fractions from the initial run, thought to contain AVP, OXT, or SRIF, using the conditions specified in Figs. 2-4.

L-[<sup>35</sup>S]Cys-AVP and L-[<sup>35</sup>S]Cys-OXT fractions were also subjected to performic acid oxidation, as described by Hirs (5). The samples were lyophilized, and oxidation products were analyzed by HPLC (Fig. 3). L-[<sup>35</sup>S]Cys-SRIF fractions were also S-carboxymethylated by a method similar to that of Spiess *et al.* (6). Reactions were carried out at ambient temperature. L-[<sup>35</sup>S]Cys-SRIF was reduced in 50  $\mu$ l fresh 50 mM DTT in 0.5 M triethylammonium acetate (pH 8.7) for 4 h and then carboxymethylated in the dark with 50  $\mu$ l fresh 50 mM iodoacetic acid in 0.5 M triethylammonium acetate (pH 8.7). The pH of the DTT and iodoacetic acid solutions had to be readjusted to pH 8.7 with triethylamine. After 5 min, the reaction was terminated by adding 1 ml 10% HOAc. The samples were lyophilized and later analyzed using the isocratic system of Rivier (7).

L-[<sup>35</sup>S]Cys incorporation into 2 M HOAc-precipitable protein was measured as described by Sachs (8). After incubation at 100 C, the trichloroacetic acid protein precipitate was washed with ethanol and ether and finally taken up in 1 ml (hypothala-



lamic preparation) or 0.5 ml (neurohypophyseal preparation) 1 M NaOH. Aliquots were removed for radioactivity and protein determinations. Protein determinations were made by the method of Lowry *et al.* (9).

### Results

Figure 1 shows the UV absorbance and radioactivity elution patterns of partially purified hypothalamic and neurohypophyseal extracts pooled from five dehydrated rats. The corresponding radioactivity patterns represent  $\frac{1}{2}$  of the total hypothalamic extracts and  $\frac{1}{3}$  of the total neurohypophyseal extracts, respectively. The retention times of each carrier peptide, determined from the UV absorbance profiles, were found to be the same in both preparations and also the same as those obtained using pure solutions of standards (see Fig. 1). The radioactivity patterns showed peaks in the three fractions coeluting with the carrier peptides, although AVP labeling in the hypothalamic extract was barely detectable above back-

ground. No other significant peaks were observed in the radioactivity pattern of the hypothalamic extract. However, the neurohypophyseal preparation contained additional, although minor, radioactive components. These patterns were specific for the hypothalamus and the neurohypophysis; cerebral cortical and adenohypophyseal extracts showed no incorporation into these fractions.

Overall recoveries of the synthetic peptides from standard solutions and tissue extracts carried from homogenization through the above HPLC procedure were: AVP,  $34.9 \pm 2.3\%$  ( $n = 6$ ); OXT,  $90.6 \pm 4.0\%$  ( $n = 6$ ); and SRIF,  $87.6 \pm 6.0\%$  ( $n = 8$ ). The absolute counts per min associated with the peptide fractions, corrected for recovery, are given in Table 1 [see GE(D) column]. Levels of incorporation into AVP in the neurohypophysis are an order of magnitude greater than those in the hypothalamus; those for OXT are only 3–4 times as high. In general, label incorporation into OXT was higher than that into AVP for both hypothalamic and pituitary extracts (Table 1). In contrast, L-[ $^{35}$ S]Cys counts in SRIF were much higher in hypothalamic chromatograms than in those of the posterior pituitary (Table 1; the L-[ $^{35}$ S]Cys counts per min scale is expanded in Fig. 1B).

The UV absorbance of AVP and OXT in the extract from the neural lobe was the sum of the absorbances of the endogenous and synthetic carrier peptides. After subtracting the UV absorbance corresponding to the carrier peptide and correcting for recovery, the endogenous levels of AVP and OXT for the pooled glands ( $n = 5$ ) after 5-day oral hypertonic saline treatment were roughly 3.0 and 1.3  $\mu$ g, respectively.

The incorporation of L-[ $^{35}$ S]Cys into 2 M HOAc-precipitable protein from the hypothalami and neurohypophyses of dehydrated rats in the experiment described in Fig. 1 was determined; the values were 331 and 277 cpm/ $\mu$ g, respectively.

Aliquots from the labeled AVP and OXT fractions obtained from the chromatographic separation described in Fig. 1 were further characterized and their radiochemical purities were determined using a second HPLC separation. Representative UV absorbance and radioactivity patterns from these analyses are illustrated in Fig. 2. Comigrating with carrier AVP and OXT, labeled material from both extracts was readily seen as peaks above insignificant background levels. Most notable was the appearance of a clear radioactive peak associated with AVP from the hypothalamic fractions where no such peak had been seen in the earlier HPLC step (Fig. 1).

The radiochemical purity of the labeled material in the fractions obtained from the first HPLC step (Fig. 1) was determined using the data from the second HPLC run after correcting for recovery of carrier peptide in the second run (Fig. 2). The resulting values for each peptide

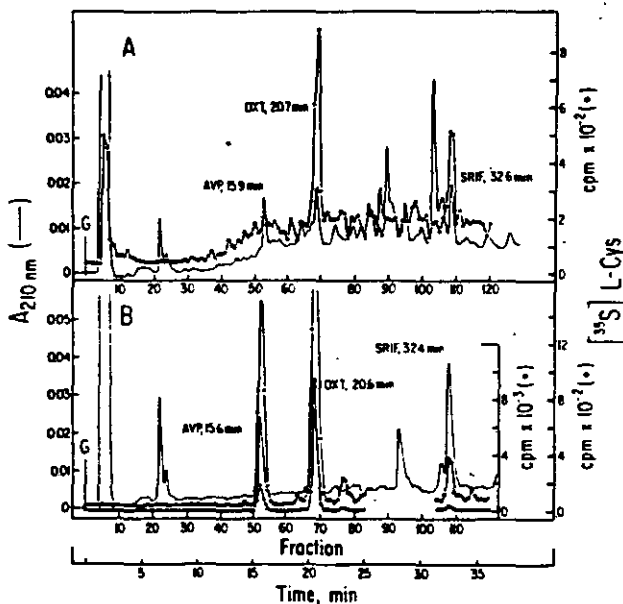


FIG. 1. Initial HPLC separation of AVP, OXT, and SRIF in extracts of partially purified hypothalami and neurohypophyses from dehydrated rats. Five dehydrated rats received 50  $\mu$ Ci L-[ $^{35}$ S]Cys via the third ventricle. After 4 h, they were decapitated, and their hypothalami and neurohypophyses were excised and pooled. Tissue extracts were partially purified (see text), and then half of the hypothalamic (A) and the total neurohypophyseal (B) extracts were analyzed by HPLC using a 40-min linear gradient of 5–40%  $\text{CH}_3\text{CN}$  in 0.01 M  $\text{NH}_4\text{OAc}$  (pH 4). Fractions (0.6 ml) were collected, and radioactivity was measured in 100- $\mu$ l (A) or 200- $\mu$ l (B) aliquots from each fraction. Carrier peptides (20 and 10  $\mu$ g AVP, 6 and 3  $\mu$ g OXT, and 8 and 8  $\mu$ g SRIF, respectively) were added to the hypothalamic and neurohypophyseal preparations. The retention times of the standards were: AVP,  $16.3 \pm 0.1$  min ( $n = 24$ ); OXT,  $20.8 \pm 0.1$  min ( $n = 23$ ); and SRIF,  $32.8 \pm 0.1$  min ( $n = 17$ ). G signifies the start of the gradient. Note in B that the counts per min data are presented twice, using two different scales.

TABLE 1. Characterization of L-[<sup>35</sup>S]Cys-AVP, -OXT, and -SRIF obtained after HPLC

L-[ <sup>35</sup> S]Cys-labeled	Tissue <sup>a</sup>	Isolation			% Radiochemical purity			
		GE(D)	GE(H)	GE(D)	IP or I		PA or CM	
				GE(H)	D	H	D	H
AVP	Hypothalamus (total cpm) <sup>b</sup>	2,613	722	3.6				
	Neurohypophysis							
	Total cpm	30,103	17,562	1.7	60	56	62	65
	Specific cpm <sup>c</sup>	18,664	11,415	1.6				
	μg <sup>d</sup>	3.0	21.4	0.14				
	Total cpm/μg	10,034	821	12.2				
	Specific cpm/μg	6,221	533	11.7				
OXT	Hypothalamus							
	Total cpm	17,391	5,258	3.3	90	49	100	70
	Specific cpm	17,391	3,681	4.7				
	Neurohypophysis							
	Total cpm	48,123	27,328	1.8	73	73	56	50
	Specific cpm	26,949	13,664	2.0				
	μg	1.3	6.1	0.21				
	Total cpm/μg	37,018	4,480	8.3				
	Specific cpm/μg	20,730	2,240	9.3				
SRIF	Hypothalamus							
	Total cpm	9,356	10,370	0.9	81	71	72	86
	Specific cpm	7,578	7,363	1.0				
	Neurohypophysis							
	Total cpm	2,206	1,709	1.3	45	50		
	Specific cpm	992	854	1.2				
	Total cpm <sup>e</sup>		2,103			68		100
	Specific cpm <sup>f</sup>		1,430					

GE, Gradient elution HPLC using 0.01 M NH<sub>4</sub>OAc; IP, ion-pairing gradient elution HPLC using 0.02 M AcOH containing 0.1% hexane sulfonic acid; I, isocratic HPLC; PA, performic acid oxidation; CM, S-carboxymethylation; H, hydrated; D, dehydrated.

<sup>a</sup> Extracts from five rats.

<sup>b</sup> Corrected for recovery and L-[<sup>35</sup>S]Cys half-life.

<sup>c</sup> Radioactivity in HPLC fractions specifically incorporated into the peptides determined by PA (AVP and OXT) or I (SRIF).

<sup>d</sup> Endogenous tissue content corrected for recovery.

<sup>e</sup> Pooled from 10 rats.

were compared to the amount of label originally present in the fractions from the first HPLC separations. The recoveries each peptide were  $36.0 \pm 6.7\%$  ( $n = 5$ ) from hypothalamic extracts and  $89.0 \pm 34\%$  ( $n = 6$ ) from neurohypophyseal extracts. The radiochemical purity of the peak fractions obtained in the second HPLC run were: hypothalamic L-[<sup>35</sup>S]Cys-OXT, 90%; neurohypophyseal L-[<sup>35</sup>S]Cys-OXT, 73%; and neurohypophyseal L-[<sup>35</sup>S]Cys-AVP, 60%. The low levels of L-[<sup>35</sup>S]Cys-AVP in the fractions from the initial HPLC run of hypothalamic extract allowed us to identify the species in the second HPLC step, but not to measure its isotopic purity.

Because radioactive contaminants may migrate with the peptide of interest, even with multiple chromatographic steps, we examined isotopic purity and identity further after derivatization. Aliquots of the presumed L-[<sup>35</sup>S]Cys-AVP and L-[<sup>35</sup>S]Cys-OXT fractions obtained after the first HPLC step (Fig. 1) were oxidized with performic acid (thereby excluding the possibility of non-

specific S-S bond formation) and rechromatographed using the same HPLC conditions. [Beforehand, we characterized the chromatographic behavior of (SO<sub>3</sub><sup>-</sup>)<sub>2</sub>-AVP and (SO<sub>3</sub><sup>-</sup>)<sub>2</sub>-OXT in this HPLC system, after ion exchange chromatography on diaminoethyl aminoethyl-cellulose, a standard technique used for their purifications (10).] Figure 3 shows the chromatographic properties of both carrier and labeled (SO<sub>3</sub><sup>-</sup>)<sub>2</sub>-AVP (Fig. 3; A and B) and (SO<sub>3</sub><sup>-</sup>)<sub>2</sub>-OXT (Fig. 3, C and D) from hypothalamic and neurohypophyseal extracts. After oxidation, the label was observed to chromatograph with oxidized standard for both OXT and AVP. The recoveries of oxidized products of both OXT and AVP were the same: from standard solutions,  $76.7 \pm 5.2\%$  ( $n = 3$ ); hypothalamic extracts,  $16.5 \pm 3.8\%$  ( $n = 4$ ); and neurohypophyseal extracts,  $34.8 \pm 2.5\%$  ( $n = 6$ ). The radiochemical purity determined after performic acid oxidation of the putative labeled AVP and OXT was found to parallel the values obtained using the HPLC conditions

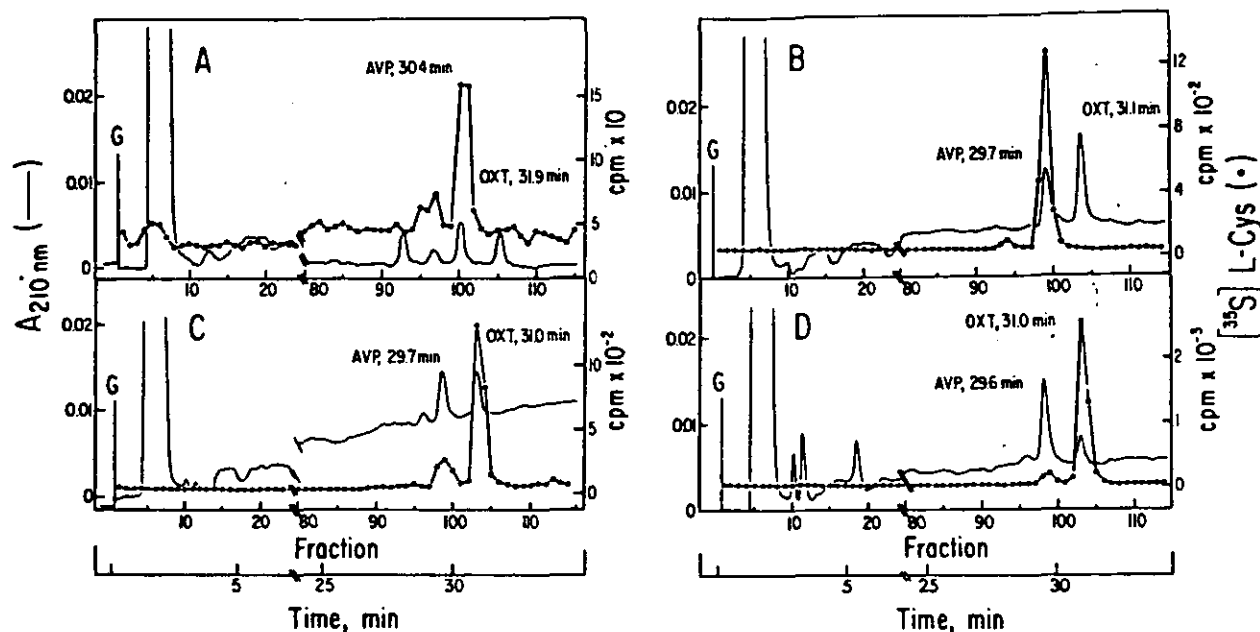


FIG. 2. Subsequent separation of HPLC fractions containing AVP or OXT by HPLC using an ion-pairing agent. Pooled HPLC fractions containing AVP or OXT from the chromatography procedure described in Fig. 1 were analyzed further by HPLC using a 40-min linear CH<sub>3</sub>CN gradient of 5–30% in 0.02 M AcOH containing 0.1% hexane sulfonic acid. A, The chromatogram for L-[<sup>35</sup>S]Cys-AVP from the hypothalamus, representing 46% of the material in the pooled fractions obtained from the first chromatographic step (Fig. 1). B, L-[<sup>35</sup>S]Cys-AVP from the neurohypophysis, representing 33% of the combined fractions from the first chromatographic step. C, L-[<sup>35</sup>S]Cys-OXT from the hypothalamus, representing 31% of the combined fractions. D, L-[<sup>35</sup>S]Cys-OXT from the neurohypophysis, representing 13% of the combined fractions. For A and C, 1.2 and 2.4  $\mu$ g OXT were added as internal markers, respectively; for B and D, 1.2 and 2.4  $\mu$ g AVP were added as internal markers, respectively. Fractions (600  $\mu$ l) were collected and counted. The retention times of the standard peptides were: AVP, 29.5  $\pm$  0.3 min (n = 13), and OXT, 30.8  $\pm$  0.3 min (n = 13).

described in Fig. 2: hypothalamic L-[<sup>35</sup>S]Cys-OXT, 100%, neurohypophyseal L-[<sup>35</sup>S]Cys-OXT, 56%; and neurohypophyseal L-[<sup>35</sup>S]Cys-AVP, 62%. However, neurohypophyseal L-[<sup>35</sup>S]Cys-OXT purity, as assessed by performic acid oxidation, was 20% lower than that obtained after HPLC analysis using the ion-pairing solvent (Fig. 2).

The radiochemical purities of the hypothalamic and neurohypophyseal L-[<sup>35</sup>S]Cys-SRIF fractions obtained after the first chromatographic step (Fig. 1) were also estimated after rechromatography (Fig. 4). The major radioactive peak detected in both instances matched the mobility of the synthetic carrier SRIF. The recovery of the carrier from either preparation was 63.7  $\pm$  6.3% (n = 6). From these runs, the percentages of label in the hypothalamic and neurohypophyseal SRIF fractions of the first chromatographic step that actually represented L-[<sup>35</sup>S]Cys-SRIF could be estimated and were found to be 81% (A) and 45% (B), respectively.

L-[<sup>35</sup>S]Cys-SRIF fractions obtained from the isocratic HPLC runs were also derivatized, by S-carboxymethylation, and the reaction products were rechromatographed using the same isocratic conditions. As seen in Fig. 4 (C and D), S-carboxymethylation of the synthetic carrier peptides and the labeled material resulted in two

carboxymethylated (CM-SRIF) products (denoted CM-SRIF-I and CM-SRIF-II in Fig. 4). The radioactive and synthetic derivatives showed identical chromatographic properties. CM-SRIF-I eluted at 10.4 and 9.3 min, and CM-SRIF-II eluted at 15.4 and 13.3 min, respectively, in runs of hypothalamic and neurohypophyseal SRIF-derivatized fractions. These retention times matched those of standard CM-SRIF-I and -II for each particular chromatographic run. The CM-SRIF products occurred in relatively fixed proportions of about 2:1 (CM-SRIF-I:CM-SRIF-II) in hypothalamic runs and 4:1 in neurohypophyseal runs. The mobilities of SRIF and its carboxymethylated products in this chromatographic system showed small day to day variations, but were constant under a given set of experimental conditions.

The yields of CM-SRIF-I and -II from standard solutions of SRIF were 94.4  $\pm$  1.5% (n = 9), but were somewhat less (48.8  $\pm$  2.6%; n = 4) from SRIF in tissue extracts. The isotopic purity of the labeled hypothalamic SRIF preparation (72%; Table 1) was slightly affected by carboxymethylation. The neurohypophyseal SRIF preparation from 10 (hydrated) rats, which had been estimated to be 68% radiochemically pure after the first chromatographic step (Table 1), was found to be 100%

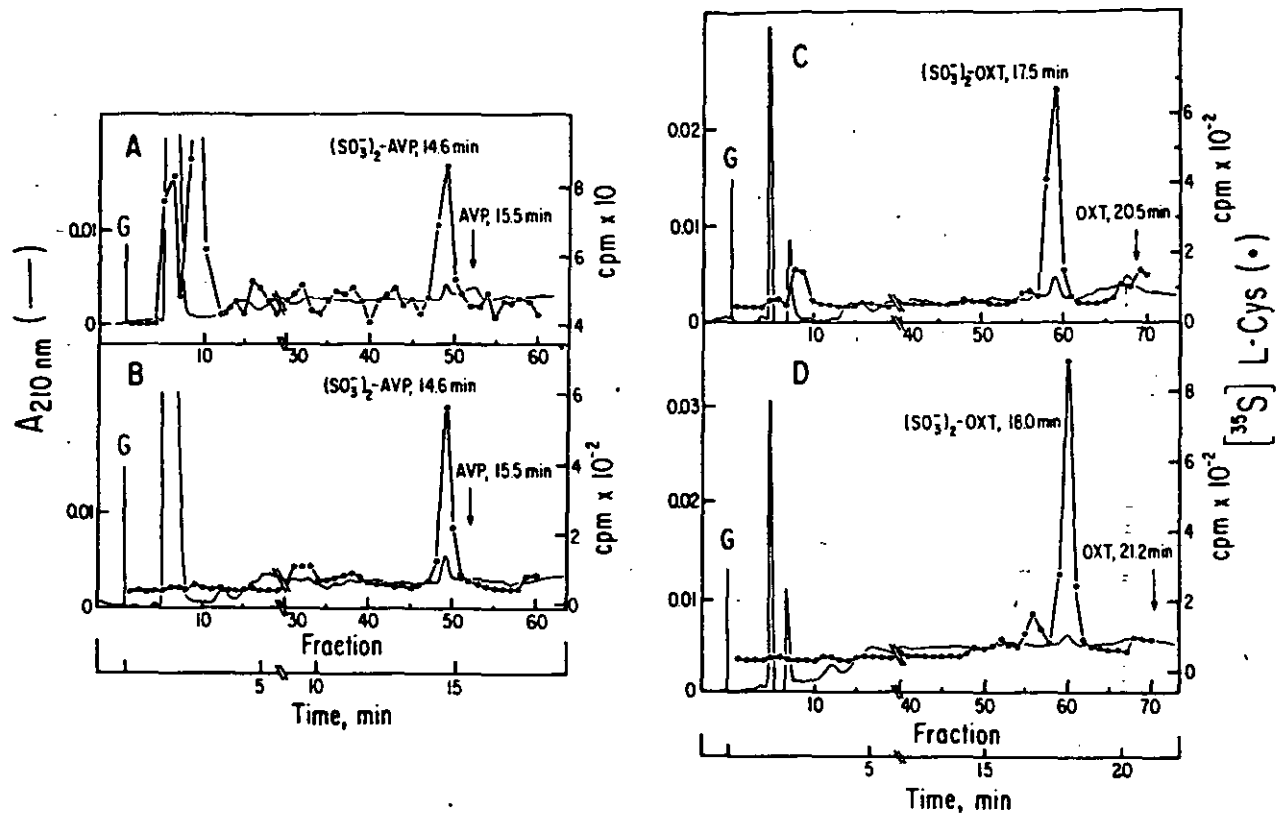


FIG. 3. HPLC chromatogram of performic acid oxidation products of L-[<sup>35</sup>S]Cys-AVP and -OXT. Aliquots of pooled HPLC fractions from a chromatograph similar to that in Fig. 1 that contained each of the labeled peptides (AVP or OXT) were oxidized with performic acid and rechromatographed using the same HPLC conditions. A, The chromatogram for L-[<sup>35</sup>S]Cys-(SO<sub>3</sub><sup>-</sup>)<sub>2</sub>-AVP from hypothalamus, representing 46% of the material from the pooled fractions. B, L-[<sup>35</sup>S]Cys-(SO<sub>3</sub><sup>-</sup>)<sub>2</sub>-AVP from the neurohypophysis, representing 33% of the combined fractions. C, L-[<sup>35</sup>S]Cys-(SO<sub>3</sub><sup>-</sup>)<sub>2</sub>-OXT, representing 31% of the pooled fractions. D, L-[<sup>35</sup>S]Cys-(SO<sub>3</sub><sup>-</sup>)<sub>2</sub>-OXT from the neurohypophysis, representing 13% of the combined fractions. Fractions (600 μl) were collected and counted. The retention times of the oxidized standards were: (SO<sub>3</sub><sup>-</sup>)<sub>2</sub>-AVP, 14.9 ± 0.1 min (n = 13); and (SO<sub>3</sub><sup>-</sup>)<sub>2</sub>-OXT, 17.2 ± 0.1 min (n = 11).

pure after the isocratic HPLC step, as assessed after S-carboxymethylation and rechromatography.

To test the utility of this chromatographic system for studying peptide synthesis changes after physiological manipulations, we compared the incorporation of L-[<sup>35</sup>S]Cys into AVP, OXT, and SRIF in the hypothalami and neurohypophyses of normal and dehydrated rats.

Figure 5 depicts the UV absorbance and radioactivity profiles of hypothalamic (Fig. 5A) and neurohypophyseal (Fig. 5B) extracts from five normal hydrated rats. Both the labeling and UV absorbance patterns are essentially the same as those in Fig. 1 for dehydrated animals. However, the amounts of some compounds detected by radioactivity and/or UV absorbance are different. In hydrated rats, the absolute counts per min of L-[<sup>35</sup>S]Cys (corrected for recovery) incorporated into AVP and OXT in the hypothalamic and neurohypophyseal extracts were 50% and 67% lower, respectively, than those in the preparations from dehydrated rats (see Table 1). In contrast,

the levels of L-[<sup>35</sup>S]Cys-SRIF in the hypothalamus and neurohypophysis were not affected by the state of hydration (note expanded L-[<sup>35</sup>S]Cys counts per min scale in Fig. 5B). The endogenous levels of AVP and OXT in the neurohypophyses of hydrated rats (n = 5) assessed by UV absorbance were 21.4 μg for AVP and 6.1 μg for OXT, values 5- to 6-fold higher than those of glands from dehydrated rats (compare Figs. 1B and 5B).

The incorporation of L-[<sup>35</sup>S]Cys into 2 M HOAc-precipitable protein in the hypothalami and neurohypophyses of hydrated animals was 306 and 80 cpm/μg, respectively. Compared to the corresponding values obtained in dehydrated rats, the level of incorporation into hypothalamic protein remained unchanged, while that into neurohypophyseal protein showed a 70% decrease.

#### Discussion

The results presented here describe a series of HPLC conditions that allow rapid reliable estimation of L-

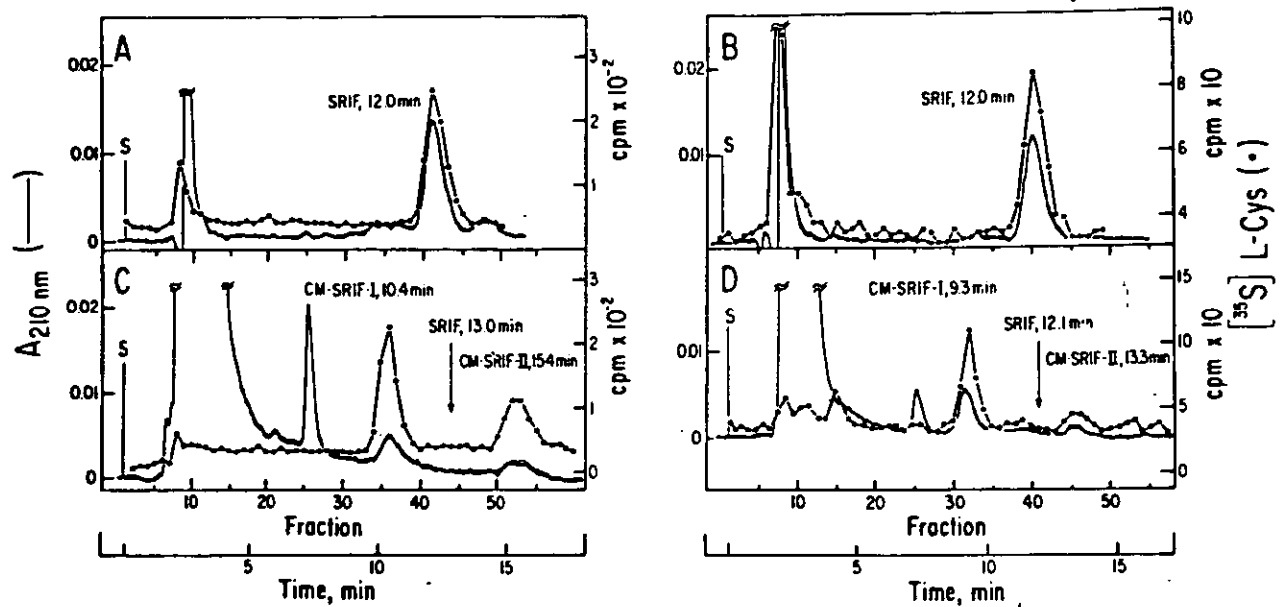


FIG. 4. Isocratic HPLC runs of SRIF fractions from a prior chromatographic step: effect of *S*-carboxymethylation. Sep-Pak supernatants of hypothalami and neurohypophyses from 5 dehydrated rats were chromatographed using the conditions described in Fig. 1. The total resulting hypothalamic and neurohypophyseal SRIF fractions were then subjected to a second HPLC chromatographic step (7) (isocratic; 1.5 ml/min; using 26%  $\text{CH}_3\text{CN}$  in 0.25 *N* triethylammonium formate, pH 3). Fractions (500  $\mu\text{l}$ ) were collected, and radioactivity was measured in 100- $\mu\text{l}$  (hypothalami; A) or 200- $\mu\text{l}$  (neurohypophyses; B) aliquots. In a separate experiment, Sep-Pak supernatants of hypothalami from 5 dehydrated rats and neurohypophyses from 10 hydrated rats were subjected to the same sequence of chromatograph steps. The SRIF fractions obtained from the second HPLC runs were *S*-carboxymethylated at pH 8.7 and then rechromatographed using the same isocratic parameters. Fractions (500  $\mu\text{l}$ ) were collected and counted (C, hypothalami; D, neurohypophyses). The retention times of standard SRIF and its derivatives were: SRIF, 11.9 min in A and B, and 13.0 and 12.1 min in C and D, respectively; CM-SRIF-I, 10.3 and 9.3 min in C and D, respectively; and CM-SRIF-II, 15.4 and 13.5 min in C and D, respectively. S signifies the start of the run.

$^{35}\text{S}$ Cys incorporation into AVP, OXT, and SRIF in the hypothalamus and neurohypophysis of the rat. The identity and radiochemical purity of the labeled peptides were established by further HPLC steps and derivatization.

Instead of using immuno- or bioadsorption techniques (1, 3),  $\text{L-}^{35}\text{S}$ Cys-AVP, -OXT, and -SRIF were initially isolated from radioactive contaminants by adsorption to Sep-Pak cartridges. Peptide separation was then achieved by HPLC.

In the radioactive chromatograms obtained from this first HPLC step, the levels of incorporation of  $\text{L-}^{35}\text{S}$ Cys into hypothalamic and neurohypophyseal neuropeptides were above background in all but one case. In aliquots of hypothalamic extracts (with readily measurable amounts of  $\text{L-}^{35}\text{S}$ Cys-OXT and  $\text{L-}^{35}\text{S}$ Cys-SRIF), labeled AVP peaks were barely, if at all, distinguishable from background. The presence of this species only became apparent after additional chromatography using an ion-pairing agent with or without performic acid oxidation. All other labeled peptide fractions were easily characterized for identity and isotopic purity. Analysis of hypothalamic  $\text{L-}^{35}\text{S}$ Cys-OXT and neurohypophyseal  $\text{L-}^{35}\text{S}$ Cys-AVP fractions from the first HPLC run using a second chro-

matographic step yielded equivalent levels of purity alone or after performic acid oxidation. The neurohypophyseal  $\text{L-}^{35}\text{S}$ Cys-OXT preparations, however, were 20% more pure when run in this HPLC system without prior oxidation, perhaps suggesting comigration of radiochemical impurities with the unmodified  $\text{L-}^{35}\text{S}$ Cys-OXT in this system. Hence, specific incorporation of  $\text{L-}^{35}\text{S}$ Cys into the OXT in these fractions was estimated after derivatization. After dehydration, incorporation of label into hypothalamic AVP and OXT was 3- to 4-fold greater than that in the normal hydration state. Label incorporation into neurohypophyseal AVP and OXT from dehydrated rats was increased 2-fold over hydrated values. There was no appreciable change in the isotopic purity of these labeled peptides after osmotic stimulation, with the exception of hypothalamic  $\text{L-}^{35}\text{S}$ Cys-OXT. The radiochemical purity of this species was greater in the dehydrated than in the hydrated state, whether analyzed intact or after performic acid oxidation. Perhaps this greater purity in dehydrated preparations reflects a marked induction of OXT biosynthesis (and secretion) and an increase in labeled OXT over background radioactivity levels.

Regardless of the state of hydration, we observed that

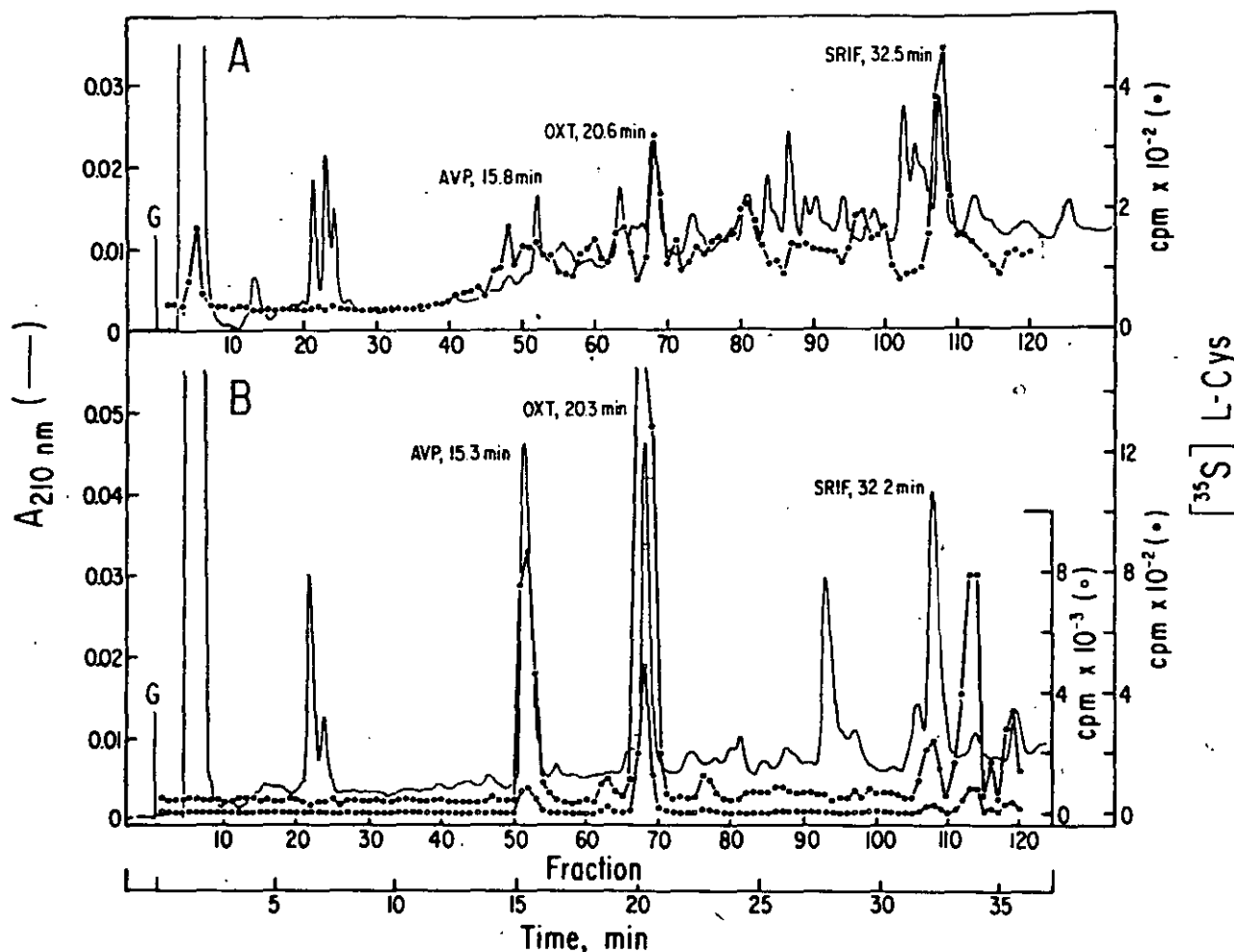


FIG. 5. Assessment of L-[<sup>35</sup>S]Cys present as AVP, OXT, and SRIF in fractions of partially purified hypothalamic (A) and neurohypophyseal (B) extracts from five hydrated rats. The conditions are identical to those described in Fig. 1 for amounts of tissue extracts analyzed and counted and for the conditions of the chromatography.

absolute labeling of OXT exceeded that of AVP, and the specific activity of labeled OXT was greater than that for AVP. These results stand in contrast to the findings of Gainer *et al.* (11), who observed, after *in vivo* labeling of the supraoptic nucleus, that the ratio of labeled AVP to OXT was 1.8. This difference may reflect differences in injection route and, thus, differences in the penetration of the labeled amino acid into the cells that synthesize each of these peptides (12).

Data on precursor (cysteine) specific activity would have been desirable to aid in the interpretation of results showing differences in label incorporation between treatment groups. However, we are not presently equipped to make such measurements. Nonetheless, since L-[<sup>35</sup>S]Cys incorporation into SRIF and hypothalamic 2 M HOAc-precipitable protein was roughly the same in all of our studies, precursor specific activities were probably simi-

lar. Hence, differences in labeled AVP and OXT in hydrated *vs.* dehydrated rats most likely represent changes in the rate of peptide synthesis (or turnover), rather than changes in precursor specific activity. In future studies, however, we hope to develop a liquid chromatographic method for isolating cysteine to allow such determinations.

The presence of L-[<sup>35</sup>S]Cys-SRIF in these hypothalamic preparations constitutes the first demonstration of *in vivo* SRIF biosynthesis in the rat hypothalamus. Previously, SRIF biosynthesis has been reported *in vitro* in rat hypothalamic fragments (13) and in dissociated cell cultures of rat cerebral neurons (14). The observation that approximately 100% label purity could be obtained after chemical modification provides strong evidence that the label under the SRIF peak actually was covalently bound to SRIF.

Spieß *et al.* (6) observed that SRIF could be carboxymethylated in one or both of its sulfhydryl (SH) groups, depending on the pH of the reaction. At pH 6.0, SRIF was carboxymethylated at one SH site, and the resulting product eluted after SRIF in the isocratic HPLC system. At pH 8.7, both SH groups were *S*-carboxymethylated, yielding a species that eluted ahead of SRIF (6). In our experiments, despite performing the reaction at pH 8.7, carboxymethylation of synthetic and labeled SRIF always resulted in the production of both CM-SRIF-I and -II. We presently lack an explanation for the differences obtained by us and by Spieß (6).

Though dehydration markedly stimulated the incorporation of label into AVP and OXT, it did not affect the incorporation of L-[<sup>35</sup>S]Cys into SRIF. This result is consistent with those of Rossier *et al.* (15), who found no changes in radioimmunoassayable SRIF in the neural lobes of rats given 2% NaCl for 5 days. These data suggest that SRIF is not synthesized by osmoreponsive magnocells of the supraoptic and paraventricular nuclei, as has been suggested previously (16).

The neurohypophyseal L-[<sup>35</sup>S]Cys-SRIF we observed in the rat may originate in the hypothalamus, perhaps reaching the neurohypophysis via the pathway identified by Hokfelt *et al.* (17). The finding that the amount of labeled SRIF in the hypothalamus exceeded by a factor of 10 that in the neurohypophysis would be consistent with this possibility. However, the SRIF system is reputed to be considerably less extensive than those of the two classical neurohypophyseal peptides, AVP and OXT (18). Our data would support this view and those of others that show endogenous levels of SRIF in the neurohypophysis (19) to be 1000 times lower than levels of AVP (20) and OXT (21). Certainly, if a hypothalamo-hypophyseal tract for SRIF exists, our data would suggest that the transfer rate of the peptide to the neural lobe is much slower than that of AVP or OXT. At present, the functional importance of neural lobe SRIF is unknown.

Apart from the long term osmotic and natriuretic stimuli for AVP and OXT release, the anesthetic and surgical stress during the third ventricular administration of the label probably influenced the intensity of AVP and OXT secretion during the 4-h period of label incorporation. Pentobarbital and surgical stress are both known to stimulate AVP (22) and OXT release (23). Pentobarbital anesthesia is also known to inhibit SRIF release and produce a concomitant rise in the hypothalamic levels of this hormone (24). Thus, the levels of L-[<sup>35</sup>S]Cys-SRIF we observed may correspond to low rates of this peptide's synthesis. For these reasons, we cannot report true resting rates of *in vivo* biosynthesis for AVP, OXT, or SRIF. Perhaps injection of label into conscious rats 1-2 days after implantation of a third ventricular cannula will allow more accurate estimations of *in vivo* synthesis

rates.

In summary, the present results suggest that *in vivo* synthesis of several cysteine-containing peptides can conveniently and easily be studied in the brain using a combination of HPLC separation techniques. While a single HPLC step appears to give reliable, though rough, indices of label incorporation in most cases, two liquid chromatographic steps, alone or combined with chemical modification, appear advisable for more accurate estimates. Even when performing all three steps, total sample processing to final chromatographs takes several days at most. Hopefully, development of these and similar techniques will encourage more active investigations of the regulation of synthesis and turnover of these peptides.

### Acknowledgment

The authors thank Dr. Lawrence Botticelli for the third ventricular injections.

### References

1. Sachs H, Fawcett P, Takabatake Y, Portanova R 1969 Biosynthesis and release of vasopressin and neurophysin. *Recent Prog Horm Res* 25:447
2. Mains RE, Eipper BA 1976 Biosynthesis of adrenocorticotrophic hormone in mouse pituitary tumor cells. *J Biol Chem* 251:4115
3. Noe BD, Fletcher DJ, Bauer GE, Weir GC, Patel Y 1978 Somatostatin biosynthesis occurs in pancreatic islets. *Endocrinology* 102:1675
4. Zuhlke H, Ziegler M, Jahr H, Titze R, Schmidt S 1978 Biosynthesis of somatostatin in pancreatic islets of Wistar rats. *Acta Biol Med Ger* 37:K15
5. Hirs CHW 1956 The oxidation of ribonuclease with performic acid. *J Biol Chem* 219:611
6. Spieß J, Rivier JE, Rodkey JA, Bennett CD, Vale W 1979 Isolation and characterization of somatostatin from pigeon pancreas. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:2974
7. Rivier JE 1978 Use of trialkyl ammonium phosphate (TAAP) buffers in reverse phase HPLC for high resolution and high recovery of peptides and proteins. *J Liquid Chromatogr* 1:343
8. Sachs H 1963 Vasopressin biosynthesis II. *J Neurochem* 10:299
9. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ 1951 Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265
10. Pickering BT, Jones CW 1971 Isolation of radioactive oxytocin and vasopressin from the posterior pituitary gland of the rat after the injection of labelled tyrosine into the cerebrospinal fluid. *J Endocrinol* 49:93
11. Gainer H, Sarne Y, Brownstein MJ 1977 Biosynthesis and axonal transport of rat neurohypophyseal proteins and peptides. *J Cell Biol* 73:366
12. Russell JT, Brownstein MJ, Gainer H 1980 [<sup>35</sup>S]Cysteine labeled peptides transported to the neurohypophyses of adrenalectomized, lactating, and Brattleboro rats. *Brain Res* 201:227
13. Ensink JW, Laschansky EC, Kanter RE, Fujimoto WY, Koerker DJ, Goodner CJ 1978 Somatostatin biosynthesis and release in the hypothalamus and pancreas of the rat. *Metabolism* [Suppl 1] 27:1207
14. Delfs J, Robbins R, Connolly JL, Dichter M, Reichlin S 1980 Somatostatin production by rat cerebral neurones in dissociated cell culture. *Nature* 283:676
15. Rossier J, Battenberg E, Pittman Q, Bayon A, Koda L, Miller R, Guillemin R, Bloom F 1977 Hypothalamic enkephalin neurones may regulate the neurohypophysis. *Nature* 277:653
16. Dierick K, Vandesande F 1979 Immunocytochemical localization of

- somatostatin-containing neurons in the rat hypothalamus. *Cell Tissue Res* 201:349
17. Hokfelt T, Efendic S, Hellerstrom C, Johansson O, Luft R, Arimura A 1975 Cellular localization of somatostatin in endocrine-like cells and neurons of the rat with special reference to the A<sub>1</sub>-cells of the pancreatic islets and to the hypothalamus. *Acta Endocrinol [Suppl 200]* (Copenh) 80:5
  18. Defendini R, Zimmerman EA 1978 The magnocellular neurosecretory system of the mammalian hypothalamus. In: Reichlin S, Baldessareini RJ, Martin JB (eds) *The Hypothalamus*. Raven Press, New York, p 137
  19. Patel YC, Reichlin S 1978 Somatostatin in hypothalamus extra-hypothalamic brain, and peripheral tissues of the rat. *Endocrinology* 102:523
  20. George JM 1976 Vasopressin and oxytocin are depleted from rat hypothalamic nuclei after oral hypertonic saline. *Science* 193:146
  21. George JM, Staples S, Marks BM 1976 Oxytocin content of microdissected areas of rat hypothalamus. *Endocrinology* 98:1430
  22. Bonjour JP, Malvin R 1970 Plasma concentrations of ADH in conscious and anesthetized dogs. *Am J Physiol* 218:1128
  23. Dogterom J, VanWimersma Greidanus TJB, Swaab DF 1977 Evidence for the release of vasopressin and oxytocin into cerebrospinal fluid: measurements in plasma and CSF of intact and hypophysectomized rats. *Neuroendocrinology* 24:108
  24. Saito H, Ogawa T, Ishimaru K, Oshima I, Saito S 1979 Effect of pentobarbital and urethane on the release of hypothalamic somatostatin and pituitary growth hormone. *Horm Metab Res* 11:550



## CAPITULO II

Medición simultánea de la biosíntesis *in vivo* de vasopresina-L-[<sup>35</sup>S]Cys, oxitocina-L-[<sup>35</sup>S]Cys y somatostatina-14-L-[<sup>35</sup>S]Cys en los hipotálamos y las neurohipófisis individuales de ratas despiertas: Efecto del estrés crónico por inmovilización intermitente y de la adrenalectomía.

### Introducción

#### Metodología

Las mediciones de la biosíntesis *in vivo* de vasopresina (AVP)-L-[<sup>35</sup>S]Cys, oxitocina (OT)-L-[<sup>35</sup>S]Cys y somatostatina-14 (SRIF-14)-L-[<sup>35</sup>S]Cys en los hipotálamos y de su acumulación en las neurohipófisis de ratas hidratadas y deshidratadas, descritas en el Capítulo I, reflejan adecuadamente las diferencias en la actividad de las neuronas peptidérgicas correspondientes entre los dos grupos de animales, aunque fueron hechas en ratas anestesiadas y recién trepanadas. A pesar de representar un avance importante en cuanto a la metodología para medir simultáneamente la biosíntesis *in vivo* de tres neuropéptidos hipotalámicos marcados con L-[<sup>35</sup>S]Cys, el procedimiento debe simplificarse con el propósito de tener un modelo de trabajo más versátil para la determinación del estado de actividad de las neuronas vasopresinérgicas, oxitocinérgicas y somatostatinérgicas bajo diferentes condiciones experimentales, ya no en extractos combinados de varias ratas, sino en extractos de tejido individuales, y sin las interferencias de la anestesia ni del trauma de una cirugía intracraneal.

Aquí se describen los resultados de una nueva metodología para la medición en ratas despiertas de la biosíntesis *in vivo* de AVP-L-[<sup>35</sup>S]Cys, OT-L-[<sup>35</sup>S]Cys y SRIF-L-[<sup>35</sup>S]Cys en hipotálamos y neurohipófisis individuales, junto con la medición del contenido endógeno neurohipofisiario de AVP y OT, aplicada a la evaluación del estado de actividad de las neuronas vasopresinérgicas, oxitocinérgicas y somatostatinérgicas en

ratas sometidas a estímulos del eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenales por estrés por inmovilización crónica intermitente y por adrenalectomía. Para eliminar las interferencias debidas a la anestesia y al trauma de la cirugía en las mediciones de biosíntesis *in vivo*, a las ratas se les implantaron cánulas guía dirigidas al III ventrículo para la administración del precursor radioactivo [un mínimo de 10 días después de la cirugía]. Los niveles de los neuropéptidos-L-[<sup>36</sup>S]Cys en los extractos individuales de hipotálamo y de neurohipófisis, obtenidos sucesivamente por 2 pasos de CLAP en fase reversa y el contenido endógeno neurohipofisarios de AVP y OT fueron de una magnitud adecuada para permitir la obtención de valores independientes y confiables para cada una de las ratas estudiadas.

**Estímulos del eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenales en la rata:  
su efecto sobre las neuronas vasopresinérgicas, oxitocinérgicas y somatostatinérgicas.**

Existe evidencia experimental que sugiere que en la rata la AVP, la OT y la SRIF-14 sean hormonas de estrés multifuncionales. Dependiendo de las condiciones de estrés de la rata se ha visto que estos neuropéptidos hipotalámicos pueden ser liberados:

- ◆ al torrente sanguíneo vía la neurohipófisis, para modular el metabolismo alterado de diversos órganos en respuesta a los estímulos estresantes;
- ◆ al sistema porta-hipofisario, para regular las secreciones de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH) y de la hormona de crecimiento.
- ◆ directamente al sistema nervioso central, para mediar funciones de regulación central

- Vasopresina

Los niveles plasmáticos de la AVP aumentan poco, pero significativamente en respuesta a diferentes tipos de estrés, tales como, la adrenalectomía (II-1), la inmovilización (II-2, II-3), el choque eléctrico (II-2), y la inhalación de éter (II-4). Ello ha llevado a proponer que la AVP pudiera ser un modulador de las respuestas homeostáticas periféricas del organismo (II-5, II-6) frente a ciertos estímulos estresantes. Varios tejidos poseen receptores específicos a AVP (II-7) que pudieran mediar estos efectos periféricos. El sistema vasopresinérgico que ha sido implicado en estos casos es el sistema neurosecretor clásico de las neuronas magnocelulares del núcleo supraóptico (SON) y del núcleo paraventricular (PVN) con sus terminales nerviosas en la neurohipófisis. Al parecer, estas neuronas se encuentran bajo el control negativo de los glucocorticoides (II-1, II-8) y de la beta-endorfina (II-9).

Por otra parte, existe evidencia que sugiere que la AVP pudiera formar parte de un complejo multifactorial de secreción de ACTH. Diversos estudios han revelado la capacidad de la AVP para potenciar la acción del factor liberador de ACTH predominante, el CRF-41 (II-10), para estimular la secreción de ACTH, tanto *in vitro* (II-11, II-12, II-13, II-14, II-15, II-16) como *in vivo* en ratas (II-17, II-18, II-19), en humanos (II-20) y en monos (II-21), una acción de la vasopresina que además pudiera ser potenciada por serotonina (5HT) (II-22). Las neuronas vasopresinérgicas que se han implicado en la regulación de la secreción del ACTH pertenecen a un grupo de neuronas del PVN denominadas parvocelulares, que tienen sus terminales nerviosas en la zona externa de la eminencia media (ZEEM) (II-23) y constituyen el sistema vasopresinérgico tuberoinfundibular. Estas neuronas vasopresinérgicas están bajo la regulación de neuronas productoras de CRF-41 (II-24) [que a su vez están bajo regulación de neuronas vasopresinérgicas y oxitocinérgicas (II-25)]. Las neuronas

vasopresinérgicas parvocelulares del PVN también están bajo la regulación de neuronas catecolaminérgicas (II-26, II-27, II-28, II-29, II-30, II-31, II-32) del sistema límbico (II-33, II-34). El sistema límbico es rico en receptores de glucocorticoides (II-35, II-36, II-37) cuyos niveles de expresión son sensibles tanto a glucocorticoides (II-38) como a AVP (II-39). Estudios inmunocitoquímicos en ratas adrenalectomizadas han revelado la presencia de AVP (normalmente no detectable) en las neuronas parvocelulares del PVN (II-40, II-41, II-42, II-43), colocalizada con CRF-41 (II-44, II-45, II-46, II-47, II-48), que desaparece con un tratamiento sustitutivo con glucocorticoides (II-40, II-41).

La presencia de AVP inmunodetectable en estas neuronas parvocelulares del PVN después de la adrenalectomía concuerda con el aumento en estas células en ratas adrenalectomizadas del nivel de incorporación de [<sup>3</sup>H]-citidina a ARN (II-49) y el aumento en la síntesis de ARNm de AVP (II-50). La destrucción electrolítica de las neuronas parvocelulares vasopresinérgicas del PVN (II-42) anula el aumento de AVP inmunodetectable en la ZEEM posterior a una adrenalectomía (II-40, II-41, II-42, II-43, II-44, II-45, II-46, II-47, II-48).

Es razonable pensar que el aumento de AVP en la ZEEM de ratas adrenalectomizadas resulta en un aumento en la concentración de AVP en el sistema porta hipofisario (su vía de acceso al corticotropo) que pudiera correlacionarse con el aumento en la secreción de ACTH que ocurre en la insuficiencia suprarrenal. Se ha demostrado que la estimulación eléctrica del PVN resulta en un aumento en el nivel de secreción de ACTH, que se puede inhibir con la administración simultánea de un antisuero anti-AVP (II-51). Por otra parte, dado que los "niveles basales" de AVP en el sistema porta hipofisario de ratas (II-52) y de monos (II-53) normales son lo suficientemente elevados como para

inducir la secreción de ACTH (II-54), se piensa que estos valores no son "niveles basales reales" de la AVP en el sistema porta hipofisiario, sino que son niveles del neuropéptido que ocurren en respuesta al estado de estrés de los animales durante la toma de muestra. Es posible también que parte de la AVP en el sistema porta hipofisiario provenga de la neurohipófisis por flujo retrógrado (II-55, II-56). Se ha demostrado que la estimulación de la neurohipófisis puede resultar en un aumento en la secreción de ACTH (II-57, II-58).

Los niveles adenohipofisarios de la vasopresina aumentan después de la adrenalectomía (II-59) y desaparecen con una terapia sustitutiva con glucocorticoides (II-59). El aumento de AVP adenohipofisaria no ocurre en animales severamente deshidratados (II-60), lo que sugiere independencia entre la vía vasopresinérgica tuberoinfundibular y la vía neurosecretora clásica (II-43, II-61, II-62). En la adenohipófisis se han identificado receptores específicos de AVP (II-63, II-64), algunos de los cuales pudieran mediar la estimulación de la secreción de ACTH (II-15, II-65, II-66, II-67, II-68, II-69, II-70, II-71, II-72, II-73).

- Oxitocina

La OT ha sido propuesta recientemente como una hormona de estrés. Se ha observado que los niveles plasmáticos de OT aumentan selectivamente en respuesta a ciertos tipos de estrés tales como la inmovilización (II-4, II-74), nado forzado (II-74) sin cambio paralelo en los niveles plasmáticos de AVP. Los tejidos blanco de la OT bajo estas circunstancias podrían ser el sistema vascular (II-75, II-76), el tejido adiposo (II-77), el páncreas (II-78) y el timo (II-6), todos ellos tejidos en los que se han identificado receptores específicos de alta afinidad para la OT.

La OT, como la AVP, parece ser un componente del complejo multifactorial de regulación de la secreción de ACTH. Unos han demostrado que la OT posee cierta capacidad intrínseca para inducir la secreción de ACTH *in vitro* (II-14, II-79), aunque otros no han logrado detectar ningún efecto de la OT sobre la secreción basal de ACTH *in vivo* (II-17) ni *in vitro* (II-80). También existe controversia respecto a su capacidad para potenciar o inhibir la secreción inducida de ACTH. Unos han demostrado que la OT puede potenciar la secreción de ACTH inducida por el CRF-41 (II-14, II-15, II-81), o modular la secreción de ACTH inducida por estrés (II-82, II-83). Otros han reportado que *in vitro* la OT inhibe la secreción de ACTH inducida por AVP (II-80), y que *in vivo* inhibe la secreción de ACTH inducida por un estado de hipoglucemia (II-84). Por su parte Yates et al. (II-17) no observaron ningún efecto *in vivo* de la OT sobre la secreción inducida de ACTH. No obstante, la demostración de la presencia de OT en el sistema porta hipofisario en concentraciones biológicamente relevantes (II-85, II-86), que inclusive varían cíclicamente en la rata hembra (II-87) sugiere un papel fisiológico de la OT en la regulación de las secreciones adenohipofisarias, aunque no estén implicados necesariamente los corticotropos. Al parecer, la OT en el sistema porta hipofisario proviene de un grupo de neuronas oxitocinérgicas parvocelulares del PVN (II-88, II-89) que terminan en la ZEEM, donde los niveles de OT inmunodetectable son bajos (II-88, II-90) y no se alteran en respuesta a la adrenalectomía (II-40, II-43, II-91).

- Somatostatina-14

La evidencia experimental sugiere que la SRIF-14 sea un componente más del complejo multifactorial que regula la secreción de ACTH. *In vitro* (II-92, II-93), empleando células adenohipofisarias tumorales, e *in vivo* en humanos (II-94, II-95), se ha demostrado que la SRIF-14 puede inhibir la secreción inducida de ACTH.

En la rata se ha observado también que los niveles circulantes de la hormona de crecimiento caen bruscamente en respuesta al estrés (II-96, II-97). Dado que la administración de un antisuero anti-SRIF-14 a ratas estresadas inhibe esta respuesta (II-98, II-99), se ha propuesto que la caída en los niveles plasmáticos de la hormona de crecimiento pudieran atribuirse a un aumento en la concentración de SRIF-14 en el sistema porta hipofisiario, debido probablemente a la activación por estrés de neuronas somatostatinérgicas periventriculares (II-100), en un fenómeno en el que también está involucrado el CRF-41 (II-101). Además se ha visto que las neuronas somatostatinérgicas en cultivo, obtenidas de hipotálamos de animales estresados, son particularmente sensibles a la acción moduladora de péptidos opiáceos (II-102).

De lo expuesto hasta aquí resulta notable que no se hayan realizado estudios para medir en ratas despiertas los niveles de biosíntesis de AVP, OT y SRIF-14 en el hipotálamo de ratas sometidas a alguno de los estímulos estresantes mencionados, como una medida del estado de activación de las neuronas peptidérgicas correspondientes, a reserva del trabajo de Russell et al. (II-8), quienes midieron en las neurohipófisis de ratas adrenalectomizadas y bajo anestesia, los niveles de acumulación de AVP y OT, marcadas radioactivamente *in vivo*.

## **Planteamiento del problema**

Las mediciones de la biosíntesis *in vivo* de vasopresina (AVP)-L-[<sup>35</sup>S]Cys, oxitocina (OT)-L-[<sup>35</sup>S]Cys y somatostatina-14 (SRIF-14)-L-[<sup>35</sup>S]Cys en los hipotálamos y de su acumulación en las neurohipófisis de ratas hidratadas y deshidratadas, descritas en el Capítulo I, reflejan adecuadamente las diferencias en la actividad de las neuronas peptidérgicas correspondientes entre los dos grupos de animales, aunque fueron hechas en extractos de tejido combinadas de varias ratas anestesiadas y recién trepanadas.

Aquí se planteó la posibilidad de simplificar el procedimiento descrito en el Capítulo I con el propósito de tener una forma más versátil de medición de la biosíntesis *in vivo* de AVP-L-[<sup>35</sup>S]Cys, OT-L-[<sup>35</sup>S]Cys y SRIF-L-[<sup>35</sup>S]Cys para la determinación del estado de actividad de las neuronas vasopresinérgicas, oxitocinérgicas y somatostatinérgicas bajo diferentes condiciones experimentales, ya no en extractos de hipotálamos o neurohipófisis combinados de varias ratas, sino en extractos de tejido individuales, y sin las interferencias de la anestesia ni del trauma de una cirugía intracraneal.

## **Objetivos**

- ◆ Diseñar un procedimiento para la administración intracerebroventricular de L-[<sup>35</sup>S]Cys a ratas despiertas para medir la biosíntesis *in vivo* de vasopresina-L-[<sup>35</sup>S]Cys, oxitocina-L-[<sup>35</sup>S]Cys y somatostatina-14-L-[<sup>35</sup>S]Cys en los hipotálamos y su acumulación en las neurohipófisis, sin la interferencia de una anestesia profunda ni del trauma postquirúrgico de una trepanación y sangrado del seno sagital superior.



- ◆ Diseñar un método de separación simultánea por cromatografía líquida de alta presión en fase reversa de los neuropéptidos-L-[<sup>35</sup>S]Cys y del contenido endógeno neurohipofisario de AVP y de OT a partir de extractos ácidos prepurificados de hipotálamo y de neurohipófisis individuales.
  
- ◆ Determinar el grado de activación de las neuronas vasopresinérgicas, oxitocinérgicas y somatostatinérgicas en respuesta a manipulaciones del eje hipotálamo-neurohipófisis-suprarrenal (estrés crónico por inmovilización intermitente o adrenalectomía) por medición simultánea de la biosíntesis *in vivo* de AVP-L-[<sup>35</sup>S]Cys, OT-L-[<sup>35</sup>S]Cys y SRIF-14-L-[<sup>35</sup>S]Cys en los hipotálamos y su acumulación en las neurohipófisis, junto con la medición del contenido endógeno neurohipofisario de AVP y de OT, en ratas individuales y despiertas.

## **Materiales y Métodos**

### **Animales**

Se usaron ratas Wistar macho, criadas en los Laboratorios Miles (Instituto Politécnico Nacional, México, D.F., México) o en el bioterio del Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán. Las ratas se recibieron en el laboratorio pesando 150-180 g. Se distribuyeron en pares y se mantuvieron bajo observación en jaulas colgantes a 22°C y bajo iluminación natural durante 2-3 semanas. (Las ratas con cánulas guía intracraneales se mantuvieron en jaulas colgantes individuales). Solamente se emplearon en los experimentos aquellas ratas que mostraron un incremento de peso corporal de 3-5 g/día durante este período de aclimatación y que alcanzaron un peso de 240-260 g.

Las ratas tuvieron acceso libre a alimento para roedores Purina o Distribuidora Roma (México, D.F., México) y a agua de la llave con 1 g/l de Vitafort A (Parfarm, SA, México, D.F.) como suplemento vitamínico. Las ratas adrenalectomizadas y las de control correspondientes, recibieron además 0.9% de NaCl en el agua de beber.

### **Reactivos**

Todos los reactivos empleados fueron del grado de pureza más alto disponible en el mercado. A continuación se especifican algunos de los reactivos especiales. Péptidos sintéticos: AVP, Vega Biochemicals (Tucson AZ, USA); OT, Vega Biochemicals; SRIF-14, Sigma Chemical Co.(St. Louis MO, USA); precursores radioactivos: L-[<sup>35</sup>S]cistina (L-[<sup>35</sup>S]Cys) con actividades específicas entre 350-500 Ci/mmol, New England Nuclear Corp. (Boston MA, USA) y la L-[<sup>35</sup>S]cisteína (L-[<sup>35</sup>S]Cys) con actividad específica de 988 Ci/mmol, New England Nuclear Corp.; reactivos empleados en la preparación de

líquidos de centelleo: 2,5 difeniloxazol (PPO), Sigma Chemical Co., (bis-(O-metil-estiril)-benceno (bis MSB), New England Nuclear Corp., (1,4 bis(2-(4-metil-5-fenil oxazolil) benceno (dimetilPOPOP), Packard Instruments Co., Inc., Downers Grove, IL, USA; reactivos para CLAP: CH<sub>3</sub>CN, grado HPLC, Fisher Scientific Co.; trietilamina, Eastman Kodak (Rochester, NY, USA); sal sódica del ácido 1-hexanosulfónico, Eastman Kodak.

## Equipo

- Equipo quirúrgico

Instrumento estereotáxico para animales pequeños de David Kopf Instruments, (Tujunga CA, USA), modelo 900; jeringas Hamilton 701-N de 10 µL (Reno NE, USA) para la administración intracerebroventricular del precursor radioactivo.

- Equipo cromatográfico

El cromatógrafo para gradientes fue de Altex/Beckman Instruments (Berkeley CA, USA), modelo 332, con un microprocesador, modelo 420. La columna fue una µBondapak C<sub>18</sub> de Waters de 3.9 mm x 30 cm (Milford MA, USA), protegida con una precolumna Whatman CSK I, empacada con Co:Pell ODS de Whatman Inc. (Clifton NJ, USA). El calentador para columnas fue de Bioanalytical Systems, Inc. (West Lafayette, IN, USA), modelo LC-23A. El detector UV fue un Uvicord-S de LKB (Bromma, Suecia), modelo 2138, ajustado a 206 nm, al que se adaptó una celdilla para CLAP de 8 µL. El integrador fue un Chromatopac Shimadzu, modelo C-R1A (Beckman Instruments), ajustado a una atenuación de 7 ó de 5 para el análisis de los extractos de los hipotálamos o de las neurohipófisis, respectivamente. La velocidad del papel se ajustó a 1 cm/min durante la elución de las fracciones peptídicas y de las fracciones cercanas a ellas; de lo contrario el papel corrió a 0.1 cm/min. El colector de fracciones fue un Ultrorac de LKB, modelo

7000. La inyección de muestras se hizo usando jeringas herméticas Hamilton (Hamilton Co., Reno NE, USA), modelo 1725 TEFLL de 250  $\mu$ L.

- Espectrómetro de centelleo líquido

El espectrómetro de centelleo líquido fue un Tri Carb, Packard, modelo 3330, ajustado a 14°C, con una ganancia de 7% y una ventana de 50-1000. La eficiencia máxima de conteo del [<sup>35</sup>S] fue del 75%. Esta eficiencia-decayó con el decaimiento del radioisótopo, pero fue independiente del volumen y de la composición química de las muestras.

## Métodos

- Técnicas quirúrgicas

- *Implantación intracraneal de cánulas guía dirigidas al III ventrículo de ratas*

Bajo control estereotáxico, se implantaron intracranealmente cánulas guía a ratas como vía de administración del precursor radioactivo al III ventrículo para el marcaje simultáneo de neuronas hipotalámicas vasopresinérgicas y oxitocinérgicas magnocelulares y parvocelulares del PVN y de neuronas somatostatinérgicas del núcleo periventricular [ver corte a -1.8 mm de bregma (Fig. I-3, Capítulo I), tomado de Paxinos y Watson (II-104)].

Las cánulas guía fueron de fabricación casera, hechas con cánulas de acero inoxidable calibre # 21 de 1.60 - 1.65 cm de longitud y con un tope de teflón de aproximadamente 1 cm de longitud, que se ajustó a presión y se fijó a la cánula con pegamento instantáneo Kola Loka (Fig. II-1).

Bajo anestesia profunda, se centró y se fijó la cabeza de la rata (previamente rasurada) en el instrumento estereotáxico, con la nariz dirigida 3.4 mm por debajo de la línea interaural, según las coordenadas de Paxinos y Watson (II-104). Se lavó la cabeza con agua y jabón. Enseguida se hizo una incisión sagital-media en la piel de aproximadamente 2 cm de longitud. Se expuso el cráneo retrayendo la piel con un blefarostato. Se removió el tejido conectivo del cráneo presionando con un aplicador estéril y raspando suavemente con una legra, para visualizar las suturas y dejar la superficie limpia de tejido para facilitar la fijación del acrílico, como se describe más adelante.

La cánula guía, atornillada a un soporte del instrumento estereotáxico, se posicionó en la línea media, a -1.9 mm de bregma, según Paxinos y Watson (II-104) (Figs. II-2A y II-2B). Se marcó esta posición en el cráneo, y manualmente se hizo una trepanación con una broca fina de 1.2 mm de sección, a la que se le adaptó un tope de polietileno ajustado, a 3 mm de la punta. Se aspiró la sangre al vacío que brotó del seno sagital superior, y una vez controlado el sangrado, se bajó la cánula hasta quedar asentado el tope de teflón sobre la superficie del cráneo (Fig. II-2A). Antes de aplicar el acrílico para fijar la cánula guía, al cráneo expuesto se aplicó cera para hueso en aquellos puntos del cráneo que estuvieran sangrando (Bonewax, Ethicon W31), y esponja gelatinosa estéril (Gelfoam, The Upjohn Co., Kalamazoo MI, USA) al músculo circundante sangrante.

La cánula se fijó con acrílico dental autopolimerizable transparente (Orthodont, Dientes Acrílicos Mexicanos, México), que se fijó con 2 tornillos de acero inoxidable (Small Parts, Inc., # MX-080-2F, Miami FI, USA), colocados diagonalmente a 5 mm de la cánula (Figs. II-2A y II-2B). Una vez endurecido el acrílico, se desatornilló el soporte de

la cánula y a ésta se le colocó un mandril de acero inoxidable de 1.60-1.65 cm de longitud para mantenerla permeable.

Para prevenir cualquier infección (de la herida, de los oídos o algún trastorno de las vías respiratorias) se les inyectó intramuscularmente 150 000 U de penicilina de acción prolongada (Benzetacil, Wyeth-Vales, México, D.F., México)

Mantenidas en jaulas individuales, las ratas canuladas recuperaron su peso corporal original 8-10 días después de la cirugía, siendo entonces posible someterlas a otras manipulaciones experimentales (adrenalectomía y estrés crónico por inmovilización).

#### ➤ *Adrenalectomía*

Las ratas con cánulas guía implantadas se adrenalectomizaron. Bajo anestesia profunda, se rasuró el sitio de incisión y se lavó con agua y jabón. Enseguida se hizo una incisión en la piel en la línea media dorsal, de aproximadamente 3 cm de longitud (de la 13ª vértebra torácica hasta la 4ª vértebra lumbar). Luego se hicieron 2 incisiones en el músculo delgado, una de cada lado del animal, justo por abajo de la tercera costilla flotante, empleando una pinza punzante, a través de las cuales se extirparon las glándulas suprarrenales encapsuladas, contenidas generalmente dentro de una masa de tejido adiposo. El músculo y la piel se suturaron con seda quirúrgica, calibre 3/0. Al término de la cirugía las ratas recibieron 150 000 u de penicilina de acción prolongada. Las ratas control correspondientes se sometieron a una adrenalectomía simulada, es decir, se manipularon quirúrgicamente en la misma forma que las adrenalectomizadas, sólo que sin extirpárseles las suprarrenales.

El suplemento vitamínico añadido al agua de beber de todas las ratas experimentales previno en las ratas adrenalectomizadas la deficiencia de vitamina B<sub>6</sub>, que ocurre al extirpárseles las suprarrenales (II-105), y minimizó las alteraciones metabólicas que se pudieran haber producido por esta deficiencia, tales como la diuresis, el balance nitrogenado negativo, el incremento en la excreción de amoníaco y urea, el desequilibrio de electrolitos y una disminución en la actividad de aminotransferasas (II-105). En esta forma fue posible mantener sanas a las ratas adrenalectomizadas por 20 días antes del día del experimento.

- Otras manipulaciones experimentales

- *Administración intracerebroventricular de L-[<sup>35</sup>S]Cys*

Bajo control estereotáxico y anestesia ligera inducida con éter, se administraron en el III ventrículo, vía una cánula guía (Fig. II-3A), 40  $\mu$ Ci de L-[<sup>35</sup>S]Cys (L-[<sup>35</sup>S]cistina o L-[<sup>35</sup>S]cisteína) en 1  $\mu$ L de una disolución de ditioneitol (DTT) 10 mM en salina. Se empleó una jeringa Hamilton, modelo 75-N de 5  $\mu$ L, fija al soporte universal del estereotáxico. Se hizo descender la aguja 9 mm al interior del cerebro de la rata hasta alcanzar el III ventrículo, quedando la punta entre 1.0 - 1.2 mm de la base del cráneo. La administración del radioisótopo tuvo una duración de 3 min (Fig. II-3B). (La precisión en la administración de la marca en el III ventrículo se verificó en otro grupo de ratas, inyectando 1  $\mu$ L de azul de metileno disuelto en salina).

- *Estrés crónico por inmovilización intermitente*

Las ratas con cánulas guía implantadas, se sometieron a un tratamiento de estrés crónico de 3 períodos de inmovilización intermitente (II-96) de 6h/día, durante 3 días consecutivos. Bajo anestesia ligera con éter, se inmovilizó a las ratas postradas sobre

un alambrado, amarrándoles las patas al mismo y sosteniéndoles la cabeza con un collar metálico también atado al alambrado (Fig. II-4). Al cabo de los 3 días, las ratas se encontraron en un estado de estrés crónico severo. Las ratas control correspondientes se mantuvieron en las mismas condiciones ambientales que las estresadas, pero sin manipulación alguna.

➤ *Anestesia profunda*

La anestesia profunda se indujo administrándoles a las ratas, por vía intramuscular, 10 mg/kg de peso corporal de clorhidrato de xilacina (Rompún, Bayer, México, D.F., México) seguido, 10 min después, de 80 mg/kg de peso corporal de quetamina (Ketalar, Parke-Davis, Compañía Medicinal "La Campana" SA de CV, México, D.F., México).

• Sistemas cromatográficos en fase reversa CLAP-II-1 y CLAP-II-2

➤ *CLAP-II-1*

Gradiente lineal: CH<sub>3</sub>CN de 5-49% en formiato de trietilamonio 0.005 M, pH 4.5. (Disolución amortiguadora orgánica liofilizable). Duración: 40 min. Flujo: 2 mL/min. Temperatura: Ambiente (puede fluctuar entre 20 y 23°C de un día para otro). Fracciones colectadas: 600 µL (20 seg) en tubos de polipropileno Eppendorf (Brinkmann Instruments, Westbury NY, USA) de 1.5 mL.

➤ *CLAP-II-2*

Gradiente lineal: CH<sub>3</sub>CN de 10-60% en HOAc 0.02 M, con 0.1% de la sal sódica del ácido 1-hexanosulfónico. Duración: 60 min. Flujo: 2 mL/min. Temperatura: 60 °C. Fracciones colectadas: 300 µL (10 seg) en tubos de polipropileno Eppendorf de 1.5 mL.



Las disoluciones amortiguadoras acuosas se prepararon con agua bidestilada, desionizada y ultrapurificada en un sistema de filtración Nanopure (Sybron/Barnstead, Boston, MA USA). Antes de mezclarse con el disolvente orgánico, las disoluciones amortiguadoras acuosas se filtraron a través de membranas Millipore (Bedford MA, USA), tipo GSWP de 0.22  $\mu\text{m}$ . Antes de usarse las disoluciones amortiguadoras orgánicas se desgasificaron al vacío, con ultrasonificación.

- Extracción ácida, purificación y cuantificación de AVP, OT y SRIF-14 marcadas con L-[ $^{35}\text{S}$ ]Cys de los hipotálamos y las neurohipófisis individuales de ratas adrenalectomizadas o sometidas a estrés crónico por inmovilización

➤ *Disección de los bloques hipotalámicos*

Se extirpó el cerebro del cráneo cortando ventralmente los nervios ópticos y luego el tallo hipofisiario, quedando éste unido al hipotálamo. Enseguida se colocó el cerebro sobre una placa de vidrio sobre hielo con la parte ventral viendo hacia arriba.

Empleando un bisturí #11 de Aesculap-Werke AB, (Tübingen, Alemania) se obtuvo una rebanada de cerebro haciendo 2 cortes coronales, uno anterior al quiasma óptico y otro anterior a los cuerpos mamilares (ver Fig. I-4). Luego, colocando la rebanada sobre su superficie caudal, se hicieron 2 cortes sagitales a 3 mm de cada lado de la línea media. El bloque hipotalámico se obtuvo finalmente haciendo el último corte a la altura de la comisura anterior.

Con el propósito de prevenir la degradación de los neuropéptidos marcados con L-[ $^{35}\text{S}$ ]Cys, una vez disecados los bloques hipotalámicos se procesaron inmediatamente sin pesarlos. Su tamaño se estimó por su contenido de proteína total precipitable con HOAc 2M (obtenido en el primer paso de purificación de los neuropéptidos marcados), que en promedio fue de 7.7 +/- 0.9 mg/bloque (n=24).

➤ *Disección de las neurohipófisis*

Las neurohipófisis se separaron de las adenohipófisis con pinzas finas. En ocasiones se separaron las neurohipófisis junto con el lóbulo intermedio.

➤ *Extracción con ácido acético, prepurificación por quimioadsorción a octadecilsilano y purificación por CLAP-II-1 y CLAP-II-2 sucesivas.*

Los bloques hipotalámicos y las neurohipófisis de ratas canuladas y marcadas con L-[<sup>35</sup>S]Cys (adrenalectomizadas o sometidas a estrés crónico por inmovilización) se procesaron individualmente a 4°C en tubos de polipropileno inmediatamente después de su disección. Los neuropéptidos-L-[<sup>35</sup>S]Cys se extrajeron por homogeneización de los tejidos en 4 mL de HOAc 2M, conteniendo 0.01% de albúmina sérica bovina (fracción V, Sigma Chemical Co.) y 0.01% de NaN<sub>3</sub>, en presencia de 2 µg c/u de AVP, OT y SRIF-14 sintéticas (extracto de hipotálamo) o de 1 µg de SRIF-14 sintética (extracto de neurohipófisis) como acarreadores de los neuropéptidos marcados y marcadores cromatográficos. En las neurohipófisis la AVP y la OT endógenas (aproximadamente 1 µg/glándula de cada una) fueron acarreadores de los neuropéptidos marcados correspondientes y marcadores cromatográficos.

Los extractos solubles en ácido se obtuvieron por centrifugación a 10 000 xg durante 1h en una centrífuga Sorvall refrigerada RC-5B. Las pastillas residuales de proteína precipitada en el HOAc se lavaron con 2 mL adicionales de la disolución ácida extractante. Los lavados se combinaron con los extractos solubles anteriores y se guardaron en hielo a 0°C hasta continuar su procesamiento al día siguiente. Las pastillas de proteína residuales se almacenaron a -70°C hasta que se les midió su nivel de incorporación de L-[<sup>35</sup>S]Cys.

Los extractos solubles en ácido (hipotálamo o neurohipófisis) en su totalidad se filtraron a través de cartuchos Sep Pak C<sub>18</sub> previamente humedecidos con isopropanol y lavados exhaustivamente con agua. Los neuropéptidos-L-[<sup>35</sup>S]Cys se adsorbieron al octadecilsilano y lavados con 3 mL de HOAc 2M. Enseguida se eluyeron eluidos con 9 mL de CH<sub>3</sub>CN al 40% en HOAc 2M. Posterior a este paso de prepurificación, los extractos peptídicos marcados se concentraron a un volumen de 200 µL en un concentrador Speed Vac previo a su purificación sucesiva por CLAP-II-1 y CLAP-II-2. Las fracciones peptídicas obtenidas por CLAP-II-1 se combinaron, concentraron a 200 µL y recromatografiaron en CLAP-II-2. La radioactividad asociada a las fracciones colectadas se midió por centelleo líquido.

➤ *Medición por centelleo líquido de la L-[<sup>35</sup>S]Cys en las fracciones obtenidas por CLAP-II-2*

La cantidad de radioactividad (L-[<sup>35</sup>S]Cys) asociada a las fracciones peptídicas (300 µL) obtenidas por CLAP-II-2 se obtuvo contando los 300 µL completos en frasquitos de polietileno con 5 mL de la disolución centellante de Bray para muestras acuosas (II-106): etilenglicol, 40 mL; metanol, 200 mL; naftaleno (recristalizado de metanol), 120 g; PPO, 8 g; dimetil-POPOP, 0.4 g; dioxano, aforo a 2 L.

➤ *Medición por centelleo líquido de AVP-L-[<sup>35</sup>S]Cys, OT-L-[<sup>35</sup>S]Cys y SRIF-14-L-[<sup>35</sup>S]Cys*

Los porcentajes de recuperación de los neuropéptidos-L-[<sup>35</sup>S]Cys de hipotálamo obtenidos por CLAP-II-2 son iguales a los porcentajes de recuperación de sus análogos sintéticos añadidos al inicio del proceso de extracción. Los porcentajes de recuperación de los péptidos neurohipofisarios endógenos AVP y OT, y de los péptidos-L-[<sup>35</sup>S]Cys correspondientes, se consideraron iguales a los porcentajes de recuperación de la

SRIF-14 sintética añadida a los extractos neurohipofisarios al inicio del proceso de purificación. Los porcentajes de recuperación de cada péptido sintético se determina por absorbencia UV a 206 nm, integrando el área bajo la curva y relacionándolo al área bajo la curva de un patrón conocido.

➤ *Medición de la incorporación de L-[<sup>35</sup>S]Cys a la proteína de los extractos de los hipotálamos y las neurohipófisis precipitada con ácido acético*

La incorporación de L-[<sup>35</sup>S]Cys a la proteína de hipotálamo o neurohipófisis precipitada con HOAc 2M al inicio del proceso de purificación de los neuropéptidos-L-[<sup>35</sup>S]Cys se midió conforme al procedimiento de Hirs (II-107).

Los pasos a seguir fueron:

- ✘ Eliminar, por evaporación, el HOAc residual de una fracción pequeña de las pastillas de proteína precipitada con HOAc de un hipotálamo o del residuo completo de una neurohipófisis.
- ✘ Suspender los residuos proteínicos de hipotálamos o de neurohipófisis en 800  $\mu$ L ó 200  $\mu$ L de urea 10M y adicionar 10  $\mu$ L ó 1  $\mu$ L de  $\beta$ -mercaptoetanol a cada fracción, respectivamente, y calentar 2 min a 100°C.
- ✘ Añadir a los extractos proteínicos de los hipotálamos o de las neurohipófisis 200  $\mu$ L ó 20  $\mu$ L, respectivamente, de una disolución de ácido yodoacético 2.5 M (Sigma Chemical Co.) recién preparada y calentar 30 min a 37°C. (*La carboximetilación de las fracciones proteínicas tiene por objeto eliminar la L-[<sup>35</sup>S]Cys de alta actividad específica asociada inespecíficamente a la proteína a través de puentes disulfuro.*)
- ✘ Adicionar 50  $\mu$ L y 5  $\mu$ L de  $\beta$ -mercaptoetanol a las fracciones hipotalámicas o neurohipofisarias, respectivamente, y precipitar la proteína con el volumen de tricloroacético (TCA) al 100% necesario para obtener en las muestras una concentración final de TCA del 10%, y calentar 5 min a 100°C.

- ✖ Lavar los precipitados sucesivamente con TCA al 10%, etanol y éter. Evaporar el éter.
- ✖ Resuspender a 37°C durante 10 h las fracciones proteínicas precipitadas de los hipotálamos o de las neurohipófisis en 1 mL y 0.6 mL de NaOH 1N, respectivamente.
- ✖ Por duplicado, precipitar alícuotas de 100  $\mu$ L y 200  $\mu$ L l de las disoluciones alcalinas de las fracciones proteínicas de los hipotálamos y de las neurohipófisis, respectivamente, con 2 mL de TCA al 10%.
- ✖ Recoger los precipitados en discos de fibra de vidrio 934-AH (Whatman) de 2.4cm de diámetro y lavarlos sucesivamente por filtración con vacío con TCA al 5%, etanol y éter.
- ✖ Secar los discos durante 45 min bajo una lámpara de luz infrarroja, colocada a una altura de 25 cm del nivel de los discos.
- ✖ Medir la radioactividad recogida en los discos, colocándolos en frasquitos de vidrio conteniendo 5 mL de un líquido de centelleo a base de tolueno: PPO, 4g; bis MSB, 81.63 mg, y aforo a 1 L con tolueno. La eficiencia máxima de conteo fue del 86%.
- ✖ En duplicado, medir la concentración de proteína por el método de Lowry (II-108) en alícuotas de 5  $\mu$ L y 50  $\mu$ L de las disoluciones alcalinas de proteína de hipotálamo y de neurohipófisis, empleando albúmina sérica bovina como patrón. En la Fig. I-6 (Capítulo I) se muestra una curva patrón representativa.

- **Análisis estadístico**

Los datos en el texto y en las leyendas de las figuras están expresados como la media +/- desviación estándar para un número "n" de determinaciones o de ratas estudiadas.

Se usó la prueba t de Student para evaluar la significancia de las diferencias entre los parámetros estudiados en los distintos grupos experimentales.

## Resultados

Medición simultánea de AVP-L-[<sup>35</sup>S]Cys, OT-L-[<sup>35</sup>S]Cys y SRIF-14-L-[<sup>35</sup>S]Cys en los hipotálamos y las neurohipófisis individuales de ratas: purificación por CLAP-II-1 y CLAP-II-2 sucesivas.

L-[<sup>35</sup>S]Cys se administró al III ventrículo de ratas a través de cánulas guía implantadas por lo menos 10 días antes del estudio. Los neuropéptidos se marcaron en las ratas despiertas, sin estar bajo la influencia de ningún anestésico ni del estrés de una cirugía intracraneal (como lo estuvieron en los estudios descritos en el Capítulo I). A tiempos definidos, los animales se sacrificaron y la AVP-L-[<sup>35</sup>S]Cys, la OT-L-[<sup>35</sup>S]Cys y la SRIF-14-L-[<sup>35</sup>S]Cys, se extrajeron con HOAc 2M de los hipotálamos y, junto con la AVP y la OT endógenas, de las neurohipófisis individuales. Los neuropéptidos-L-[<sup>35</sup>S]Cys y la AVP y la OT endógenas neurohipofisiarias se purificaron por quimioadsorción a octadecilsilano y se separaron sucesivamente por CLAP-II-1 y CLAP-II-2.

En la Fig. II-5 se ilustran perfiles de absorbencia UV a 206 nm representativos obtenidos por CLAP-II-1. Estos perfiles muestran el comportamiento cromatográfico de los extractos ácidos de hipotálamo (Fig. II-5A) y de neurohipófisis (Fig. II-5B) prepurificados por quimioadsorción a octadecilsilano. En el cromatograma del extracto de hipotálamo se distinguen los picos de absorbencia de los péptidos sintéticos (acarreadores y marcadores cromatográficos) AVP, OT y SRIF-14 añadidos al inicio del proceso de purificación. En el cromatograma del extracto de neurohipófisis se distinguen los picos que corresponden a la AVP y a la OT endógenas (\*), así como al pico de la SRIF-14 sintética, añadida al inicio del proceso de extracción. Las 3 fracciones peptídicas purificadas por CLAP-I-1 de hipotálamo y de neurohipófisis se combinaron, concentraron y recromatografiaron por CLAP-II-2, obteniéndose para cada tejido

(hipotálamo o neurohipófisis) perfiles de absorbencia UV a 206 nm y de radioactividad similares a los ilustrados en la Fig. II-6.

Las recuperaciones de AVP, OT y SRIF-14 (sintéticas) en CLAP-II-2 (Fig. II-6A) al término del proceso de purificación de los extractos peptídicos hipotalámicos individuales (también una medida de la recuperación de AVP-L-[<sup>35</sup>S]Cys, OT-L-[<sup>35</sup>S]Cys y SRIF-14-L-[<sup>35</sup>S]Cys biosintetizadas, Fig. II-6C) fueron (en %):

- ◆ AVP, 70.17 +/- 4.59, n=15,
- ◆ OT, 69.78 +/- 4.04, n=15,
- ◆ SRIF-14, 82.57 +/- 3.68, n=15.

La recuperación de la SRIF-14 sintética en CLAP-II-2 (Fig. II-6B) al término del procesamiento de las neurohipófisis individuales (una medida de la recuperación de AVP y OT endógenas así como de AVP-L-[<sup>35</sup>S]Cys, OT-L-[<sup>35</sup>S]Cys y SRIF-14-L-[<sup>35</sup>S]Cys acumuladas en la neurohipófisis, Fig. II-6D) fue (en %):

- ◆ SRIF-14, 73.44 +/- 4.47, n=15.

Los niveles de concentración normal de AVP y de OT neurohipofisarias endógenas, medidos a partir de perfiles de absorbencia UV a 206 nm obtenidos por CLAP-II-2, similares al de la Fig. II-6B, y corregidos a un 100 % de recuperación fueron:

- ◆ AVP, 1.17 - 1.62 µg/glándula (1.41 +/- 0.15, n=10),
- ◆ OT, 1.02 - 1.41 µg/glándula (1.29 +/- 0.11, n=9).



Efecto del estrés crónico por inmovilización intermitente en la rata sobre la biosíntesis *in vivo* de AVP-L-[<sup>35</sup>S]Cys, OT-L-[<sup>35</sup>S]Cys y SRIF-14-L-[<sup>35</sup>S]Cys en el hipotálamo y su acumulación en la neurohipófisis.

A 12 ratas se les implantaron cánulas guía dirigidas al III ventrículo. Después de un período de 10 días de recuperación, estas ratas se dividieron en 2 grupos de 6 ratas cada una. Se sometió un grupo de 6 ratas a estrés crónico por inmovilización intermitente durante 3 días (6h/día) (Fig. II-4). El otro grupo de 6 ratas, el grupo control, se mantuvo en las mismas condiciones ambientales que las estresadas, pero sin ser manipuladas. Al cabo del tratamiento estresante, las ratas mostraron una pérdida de peso corporal del 15.4%: su peso promedio antes de ser inmovilizadas fue de 279.8 +/- 8.5 g y después fue de 236.5 +/- 7.5 g. Además, en la autopsia se observó la hipertrofia de sus glándulas suprarrenales: el peso promedio de las suprarrenales de las ratas control fue de 21.7 mg/100 g de peso corporal, mientras que el peso promedio de las suprarrenales de las ratas estresadas aumentó en un 28.1% y fue de 27.8 mg/100 g de peso corporal.

Inmediatamente después del último período de inmovilización se midió el curso temporal de incorporación de la L-[<sup>35</sup>S]Cys a AVP, OT y SRIF en los hipotálamos y, junto con la AVP y la OT endógenas, el curso temporal de su acumulación en las neurohipófisis de las ratas control y de las ratas estresadas. Cada rata recibió intracerebroventricularmente 40 µCi de L-[<sup>35</sup>S]Cys. Tres ratas de cada grupo se decapitaron 2 y 4h después de la administración de la marca. Los péptidos marcados se extrajeron simultáneamente de los hipotálamos y de las neurohipófisis. Los cursos temporales de incorporación de la marca a AVP-L-[<sup>35</sup>S]Cys, OT-L-[<sup>35</sup>S]Cys y a SRIF-14-L-[<sup>35</sup>S]Cys hipotalámicas y neurohipofisarias se midieron a partir de perfiles de radioactividad obtenidos por CLAP-II-2, similares a los ilustrados en las Fig. II-6C y Fig.

II-6D y corregidos a 100% de recuperación. Los resultados aparecen graficados para hipotálamos y para neurohipófisis individuales en la Fig. II-7.

De los resultados ilustrados en la Fig. II-7 se desprende que de los 3 sistemas peptidérgicos estudiados, sólo el oxitocinérgico respondió al estrés crónico por inmovilización. Con curso temporal descendente, los niveles de incorporación de la marca a la OT en los hipotálamos de las ratas estresadas fueron más elevados que en los hipotálamos de las ratas control (Fig. II-7A). Igualmente, pero con curso temporal ascendente, los niveles de acumulación de OT-L-[<sup>36</sup>S]Cys en las neurohipófisis de las ratas estresadas fueron mayores que los niveles de acumulación de esta especie en las neurohipófisis de las ratas control ((Fig. II-7B). Paralelamente con estos resultados, se observó una disminución significativa ( $p < 0.05$ ) de un 28.2% en el contenido endógeno neurohipofisiario de OT de  $1.41 \pm 0.22 \mu\text{g}$  ( $n=6$ ) en las ratas control a  $1.02 \pm 0.18 \mu\text{g}$  ( $n=6$ ) en las ratas estresadas.

Los cursos temporales de incorporación de L-[<sup>36</sup>S]Cys a AVP y a SRIF-14 en los hipotálamos (Fig. II-7A) y de su acumulación en las neurohipófisis (Fig. II-7B) de las ratas control y de las ratas estresadas fueron similares entre sí. También el contenido endógeno neurohipofisiario de AVP no se alteró significativamente en respuesta al estrés crónico por inmovilización siendo de  $1.31 \pm 0.07 \mu\text{g}$  ( $n=6$ ) para las ratas control y de  $1.35 \pm 0.24 \mu\text{g}$  ( $n=6$ ) para las ratas estresadas.

Efecto de la adrenalectomía en la rata sobre la biosíntesis *in vivo* de AVP-L-[<sup>35</sup>S]Cys y OT-L-[<sup>35</sup>S]Cys en el hipotálamo y su acumulación en la neurohipófisis.

Diez días después de la implantación de cánulas guía dirigidas al III ventrículo a 6 ratas, 3 ratas se adrenalectomizaron y 3 se sometieron a una adrenalectomía bilateral simulada (ratas control). Veinte días después, las 6 ratas recibieron intracerebroventricularmente 40  $\mu$ Ci de L-[<sup>35</sup>S]Cys y se decapitaron 4h después. Sus hipotálamos y sus neurohipófisis se disecaron y procesaron individualmente.

En la Fig. II-8 se ilustran los perfiles de radioactividad representativos de extractos purificados de hipotálamo (Fig. II-8A) y de sus correspondientes neurohipófisis (Fig. II-8B) de una rata control y de una rata adrenalectomizada, asociados a las fracciones peptídicas acarreadoras (hipotálamo) o a las fracciones peptídicas endógenas (neurohipófisis) correspondientes, obtenidas por CLAP-II-2 (ver Fig. II-6).

Comparativamente con el caso control (adrenalectomía simulada), la rata adrenalectomizada mostró tanto en hipotálamo como en neurohipófisis un aumento significativo en AVP-L-[<sup>35</sup>S]Cys. Por lo que toca a los niveles de OT-L-[<sup>35</sup>S]Cys, éstos aumentaron significativamente en la neurohipófisis aunque sin cambio apreciable en el hipotálamo.

El histograma de la Fig. II-9 muestra los promedios de las dpm totales de AVP-L-[<sup>35</sup>S]Cys y de OT-L-[<sup>35</sup>S]Cys (corregidas a 100% de recuperación) obtenidas en los extractos de hipotálamo (Fig. II-9A) y de neurohipófisis (Fig. II-9B) individuales de 3 ratas control y de 3 ratas adrenalectomizadas, 4h después de la administración de la marca. Como se vio en los perfiles de radioactividad representativos de estas fracciones peptídicas de hipotálamo y de neurohipófisis de una rata control y de una rata adrenalectomizada (Fig. II-8), aquí se vuelve a apreciar que: para todas las ratas, los

niveles neurohipofisarios de AVP-L-[<sup>35</sup>S]Cys y de OT-L-[<sup>35</sup>S]Cys fueron mayores que sus niveles correspondientes en hipotálamo; los niveles de AVP-L-[<sup>35</sup>S]Cys en los hipotálamos y en las neurohipófisis de las ratas adrenalectomizadas fueron significativamente ( $p < 0.05$ ) más elevados que en las ratas control; los niveles neurohipofisarios de OT-L-[<sup>35</sup>S]Cys aumentaron significativamente ( $p < 0.01$ ) después de la adrenalectomía sin variación apreciable de sus niveles en el hipotálamo.

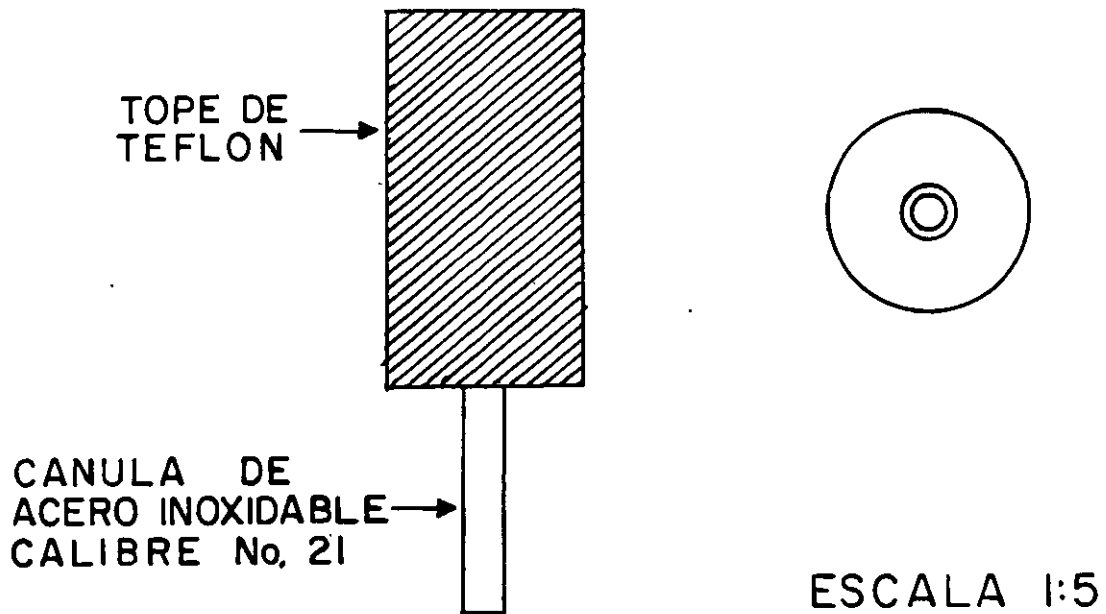
En la Fig. II-10 se muestra, que comparado con sus niveles en las neurohipófisis de las ratas control, el contenido endógeno neurohipofisario de AVP y OT no varió significativamente en las ratas con insuficiencia suprarrenal, a pesar del aumento significativo en sus niveles de AVP-L-[<sup>35</sup>S]Cys y de OT-L-[<sup>35</sup>S]Cys.

La Fig. II-11A muestra que la incorporación de L-[<sup>35</sup>S]Cys por mg de proteína de hipotálamo precipitable con HOAc (una medida de la síntesis de proteína total en este tejido) no se alteró significativamente, como consecuencia de la adrenalectomía, mientras que la incorporación de la marca a proteína precipitable con HOAc por glándula neurohipofisaria (Fig. II-11B) [una fracción proteínica rica en precursores biosintéticos de alto peso molecular de AVP y de OT (II-109, II-110)] aumentó significativamente ( $p < 0.01$ ), y paralelamente con el aumento en los niveles neurohipofisarios de AVP-L-[<sup>35</sup>S]Cys y de OT-L-[<sup>35</sup>S]Cys (Figs. II-8 y II-9).

## **Figuras del Capítulo II**

**Figura II-1. DIAGRAMA DE LA CANULA GUIA DE FABRICACION CASERA.** Las cánulas guía se fabricaron con una cánula de acero inoxidable calibre # 21 de 1.60 - 1.65 cm de longitud y un tope de teflón de 1.0 cm de longitud y 5 mm de diámetro, que se ajustó a presión y se fijó a la cánula con pegamento instantáneo Kola Loka. Escala 1:5.

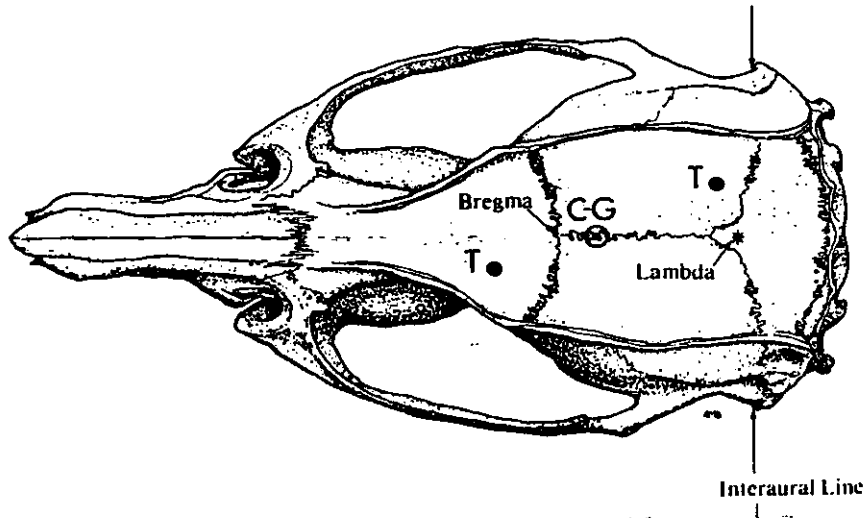
# CANULA - GUIA



**Figura II-2. SITIO DE IMPLANTACION INTRACRANEAL DE CANULAS GUIA.** Bajo control estereotáxico, se implantaron intracranealmente a ratas cánulas guía (C-G) dirigidas al III ventrículo. A. Vista dorsal del cráneo de la rata (modificada de Paxinos y Watson (II-104)). Se ilustran los sitios de colocación de la C-G en la línea media a -1.9 mm de bregma y de los tornillos (T). B. Se muestra el momento durante la cirugía de implantación de la C-G justo antes de ser fijada con acrílico autopolimerizable. La C-G aparece atomillada a un soporte del instrumento estereotáxico y asentada en la línea media, a -1.9 mm de bregma (Paxinos y Watson (II-104)) sobre el cráneo limpio y no sangrante, en medio de 2 tornillos colocados en diagonal que sirven para anclar el acrílico.



A

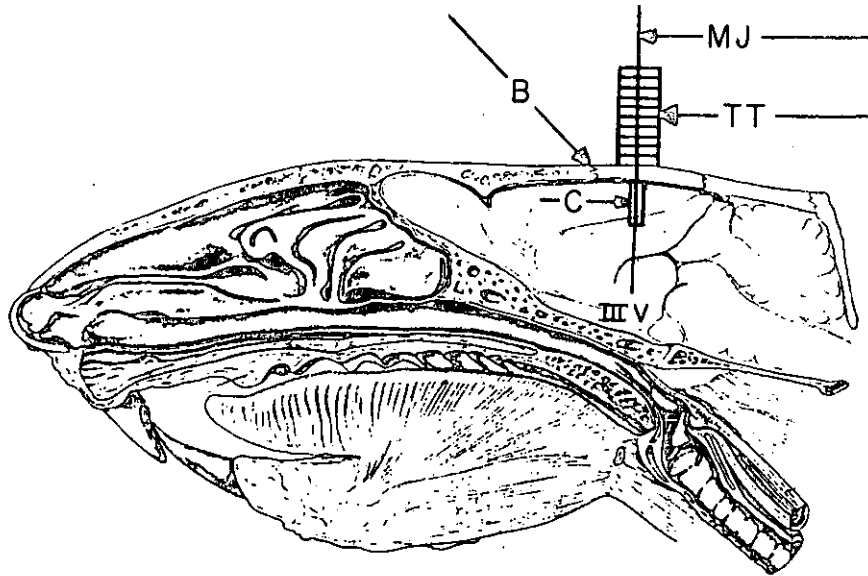


B

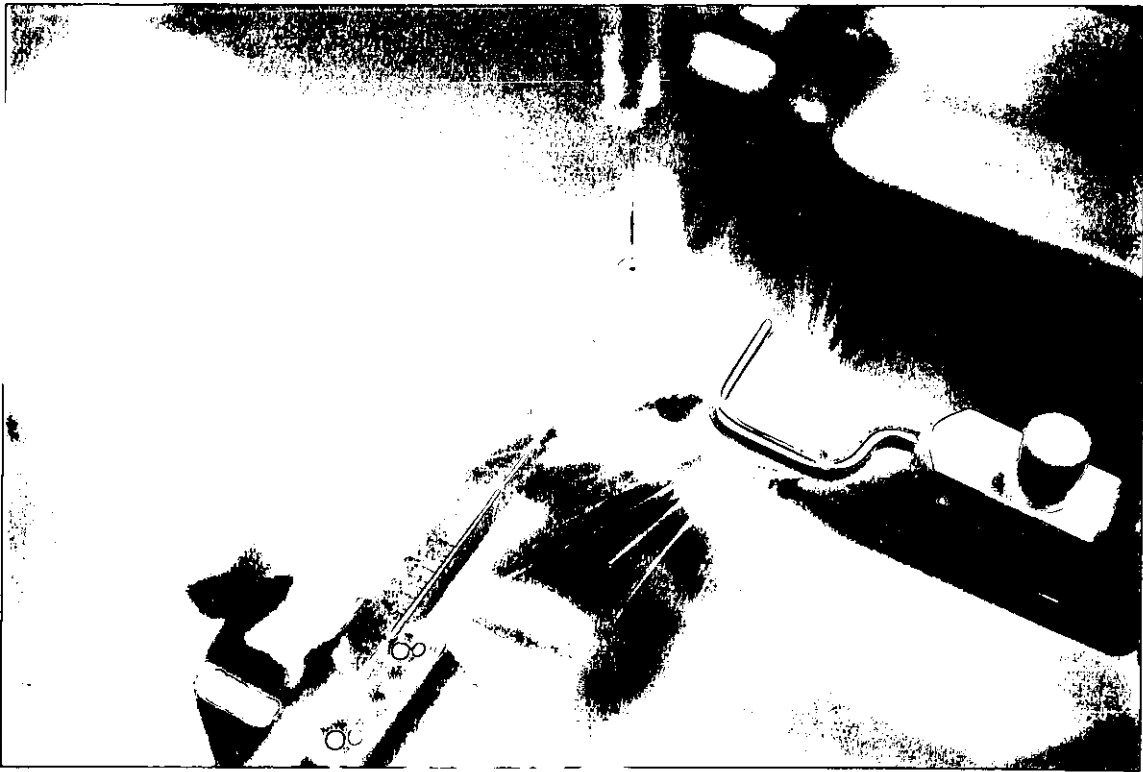


**Figura II-3. ADMINISTRACION INTRACEREBROVENTRICULAR DE L-[<sup>35</sup>S]Cys EN LA RATA.** A. Vía de administración intracerebroventricular de L-[<sup>35</sup>S]Cys. Vista lateral intracerebral de la cánula guía colocada en el cerebro de una rata y dirigida al III ventrículo. B. Se muestra un momento durante la administración intracerebroventricular de L-[<sup>35</sup>S]Cys. Bajo control estereotáxico y anestesia ligera inducida con éter, se administraron al III ventrículo, a través de una cánula guía, 40 µCi de L-[<sup>35</sup>S]Cys en 1 µL de una disolución de DTT 10 mM en salina empleando una jeringa Hamilton, modelo 75-N de 5 µL, fija al soporte universal del estereotáxico. Se hizo descender la aguja 9 mm al interior del cerebro hasta llegar al III ventrículo. La administración del radioisótopo tuvo una duración de 3 min. (La precisión en la administración de la marca al III ventrículo se verifica en otro grupo de ratas, inyectando 1 µL de azul de metileno disuelto en salina).

A

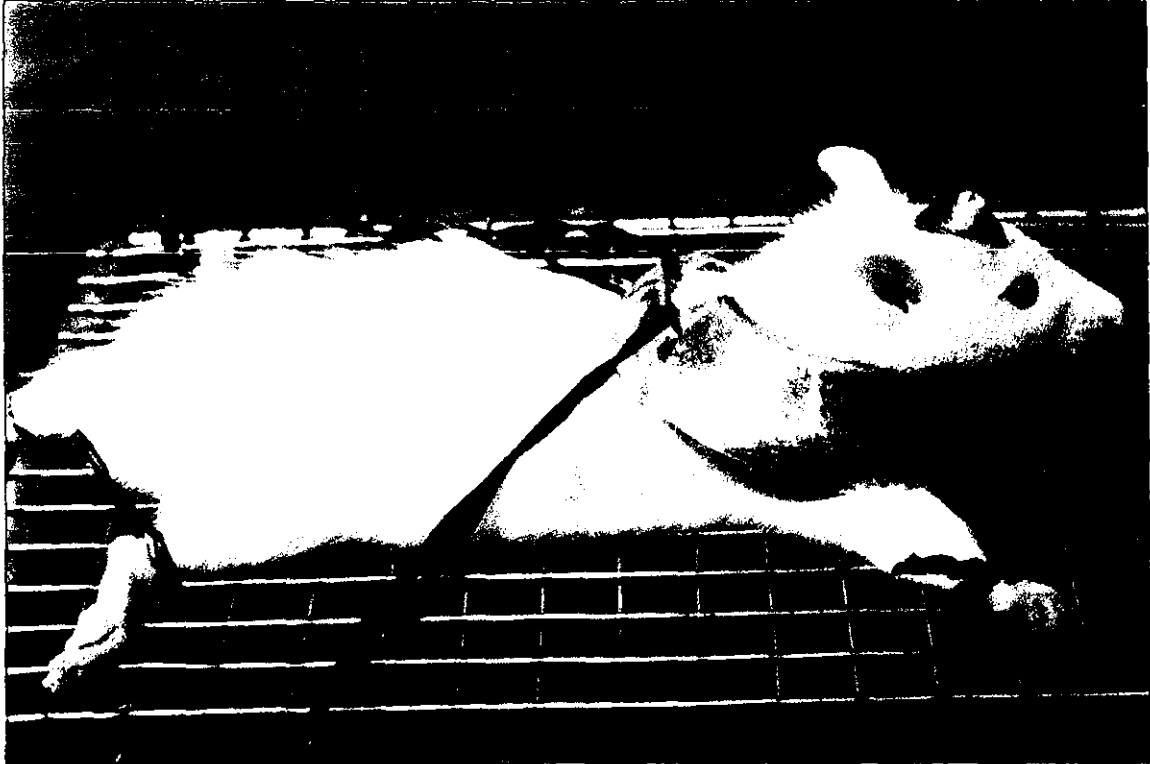


B



**Figura II-4. INDUCCION DE ESTRES CRONICO POR INMOVILIZACION EN RATAS CON CANULAS GUIA IMPLANTADAS.** Bajo anestesia ligera con éter, se inmovilizó a un grupo de ratas a las que previamente se les habían implantado cánulas guía. A. Postradas sobre un alambrado, se les amarraron las patas al mismo, sosteniéndoles la cabeza con un collar metálico también atado al alambrado. Al cabo de 3 periodos de inmovilización intermitente de 6h/día durante 3 días consecutivos (II-96), las ratas se encontraron en un estado de estrés crónico severo mostrando una expresión de dolor y agotamiento (B).

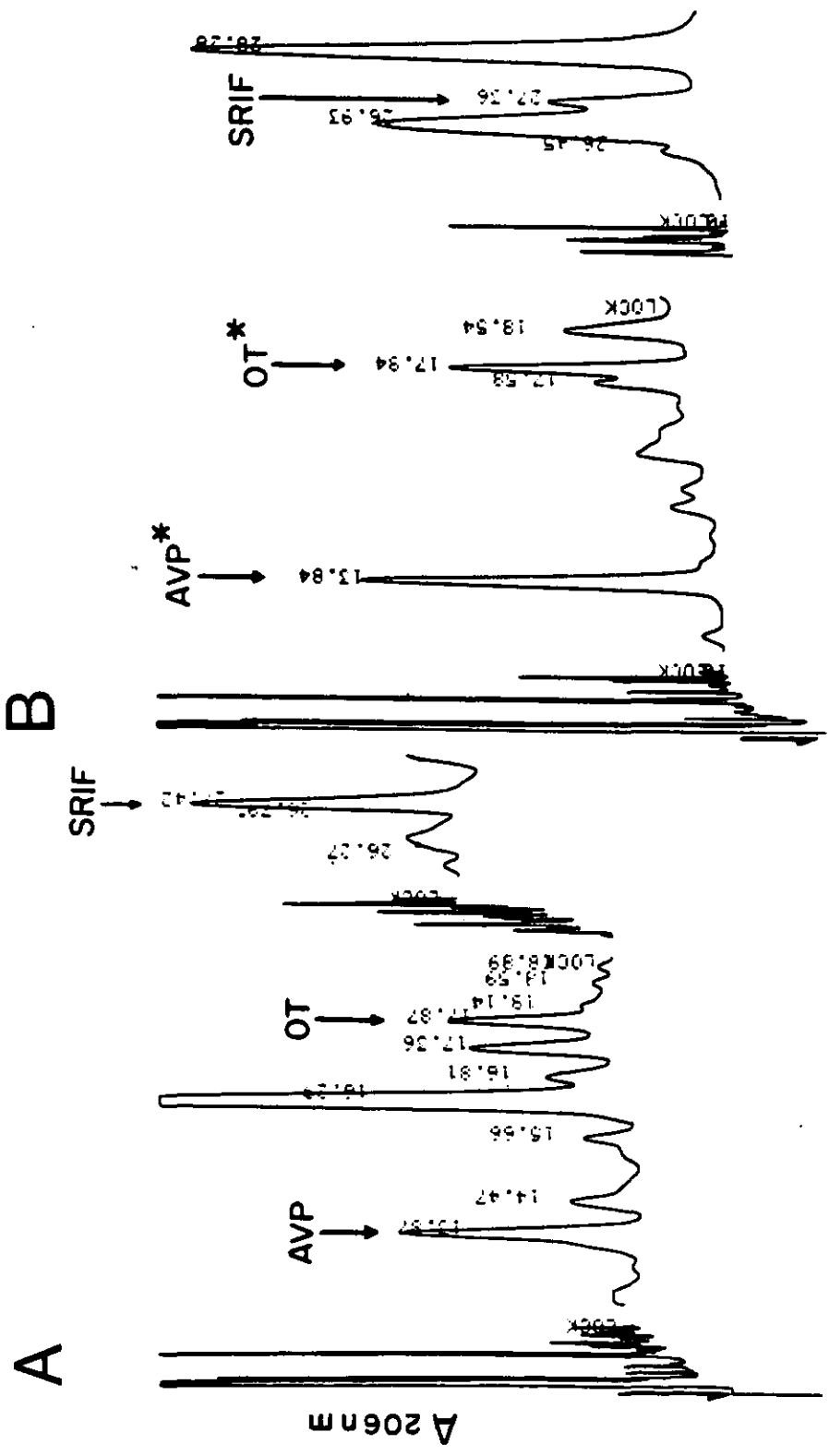
A



B

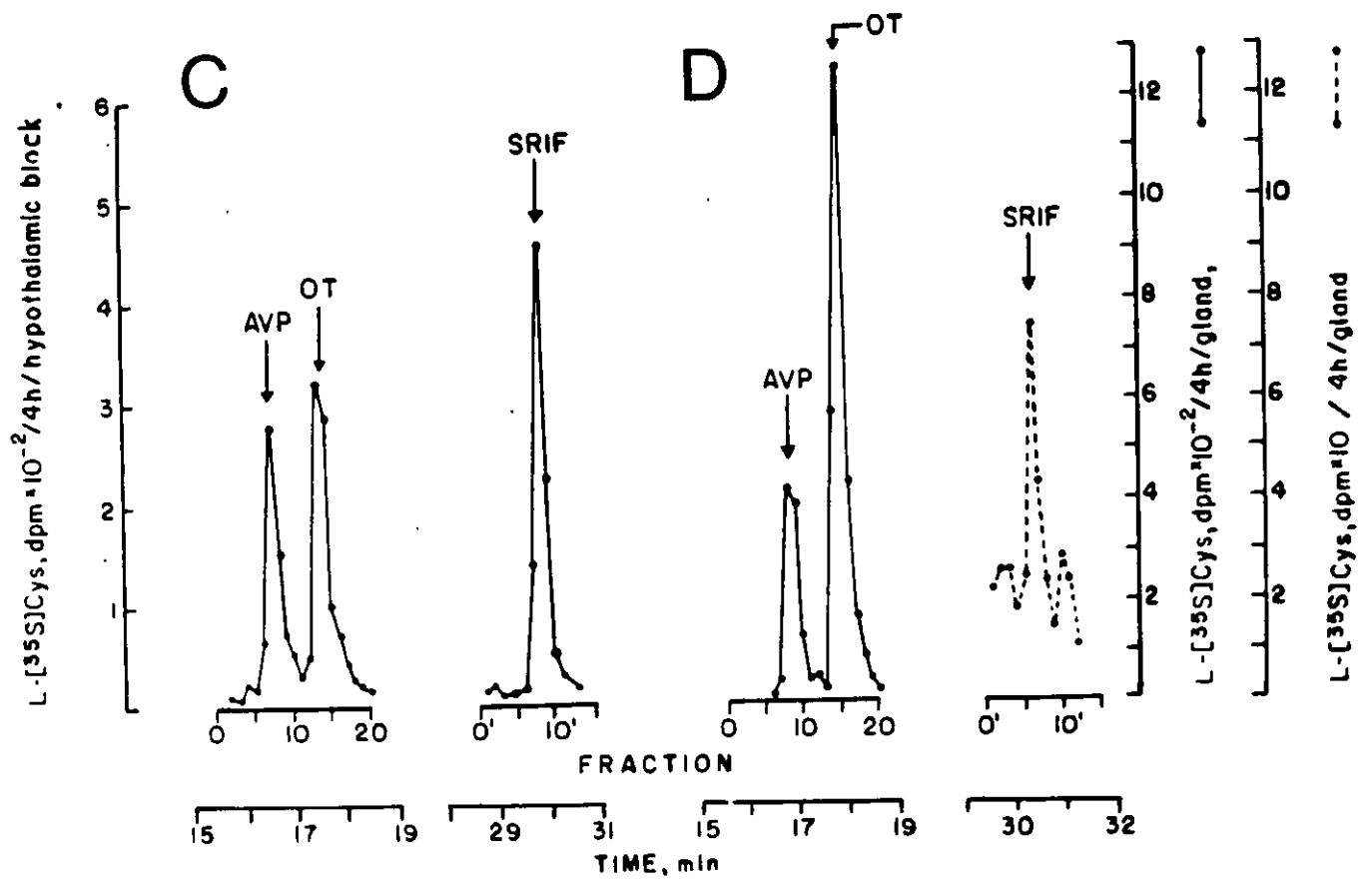
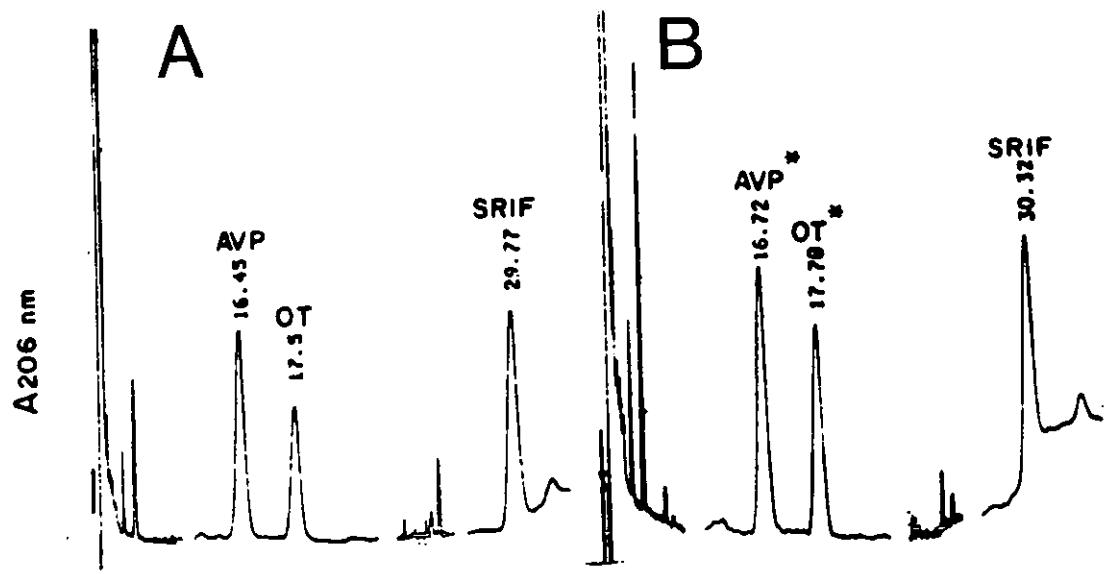


**Figura II-5. CROMATOGRAMAS/CLAP-II-1 DE ABSORBENCIA UV REPRESENTATIVOS DE EXTRACTOS ACIDOS COMPLETOS DE HIPOTALAMOS Y DE NEUROHIPOFISIS INDIVIDUALES, PREPURIFICADOS POR QUIMIOADSORCION A OCTADECILSILANO.** Se aprecian los picos de absorbencia de las fracciones peptídicas de AVP, OT y SRIF-14 sintéticas añadidas como marcadores cromatográficos y acameadores de los neuropéptidos-L-<sup>35</sup>S]Cys, al inicio del proceso de su extracción de hipotálamos (A) y de neurohipófisis (B) individuales recuperadas por quimioadsorción a octadecilsilano (empleando cartuchos Sep Pak C<sub>18</sub>): 2µg de cada neuropéptido se añadieron al extracto del hipotálamo y 1 µg de SRIF-14 se añadió al de la neurohipófisis. También se distinguen los picos de absorbencia de la AVP y la OT endógenas neurohipofisarias (\*). "A", absorbencia a 206 nm; los tiempos de retención de las fracciones peptídicas están indicados en minutos; las flechas en el extremo izquierdo de los cromatogramas marcan el inicio de los gradientes.

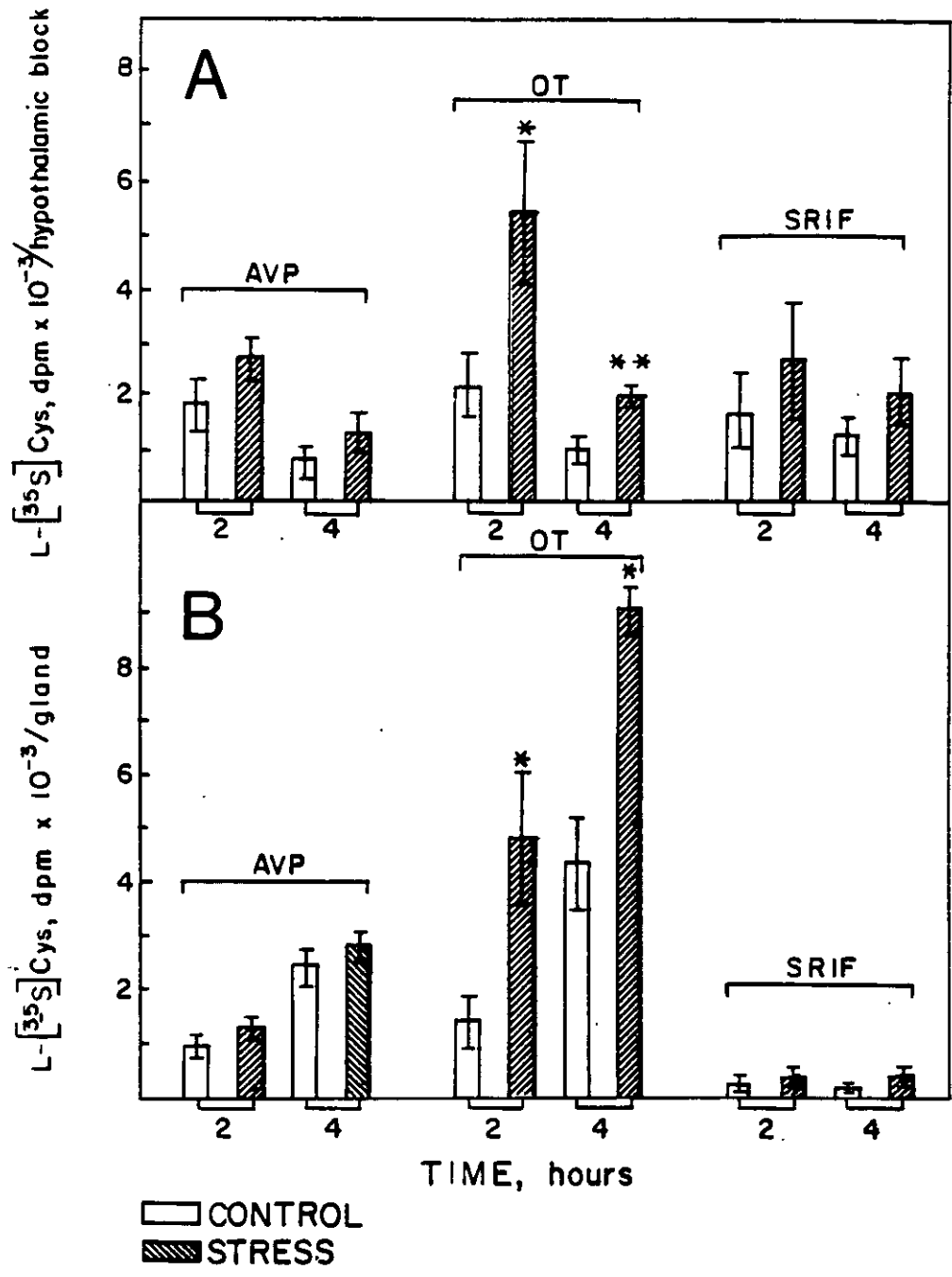


**Figura II-6. CROMATOGRAMAS/CLAP-II-2 DE ABSORBENCIA UV Y DE RADIOACTIVIDAD REPRESENTATIVOS, DE FRACCIONES PEPTIDICAS MARCADORAS/ACARREADORAS DE AVP, OT y SRIF-14 SINTETICAS O ENDOGENAS (\*) Y LAS CORRESPONDIENTES DPM TOTALES DE AVP-L-[<sup>35</sup>S]Cys, OT-L-[<sup>35</sup>S]Cys Y SRIF-14-L-[<sup>35</sup>S]Cys DE EXTRACTOS DE HIPOTALAMO Y NEUROHIPOFISIS INDIVIDUALES, PREVIAMENTE PURIFICADOS POR CLAP-II-1. Se aprecian los picos de absorbencia UV a 206 nm de las fracciones peptidicas de AVP, OT y SRIF-14 sintéticas: 2µg de cada una/extracto de hipotálamo individual (A) y 1µg de SRIF-14/extracto de neurohipófisis individual (B) y de AVP y OT neurohipofisarios endógenos (\*) (B). Estos neuropéptidos son marcadores cromatográficos y acarreadores de los neuropéptidos-L-[<sup>35</sup>S]Cys biosintetizados en hipotálamos (C) y acumulados en neurohipófisis (D) individuales. Los tiempos de retención de las fracciones peptidicas visualizadas por absorbencia UV están indicados en minutos (min). Los perfiles de radioactividad están representados en dpm/4h/bloque hipotalámico o dpm/4h/neurohipófisis individuales.**





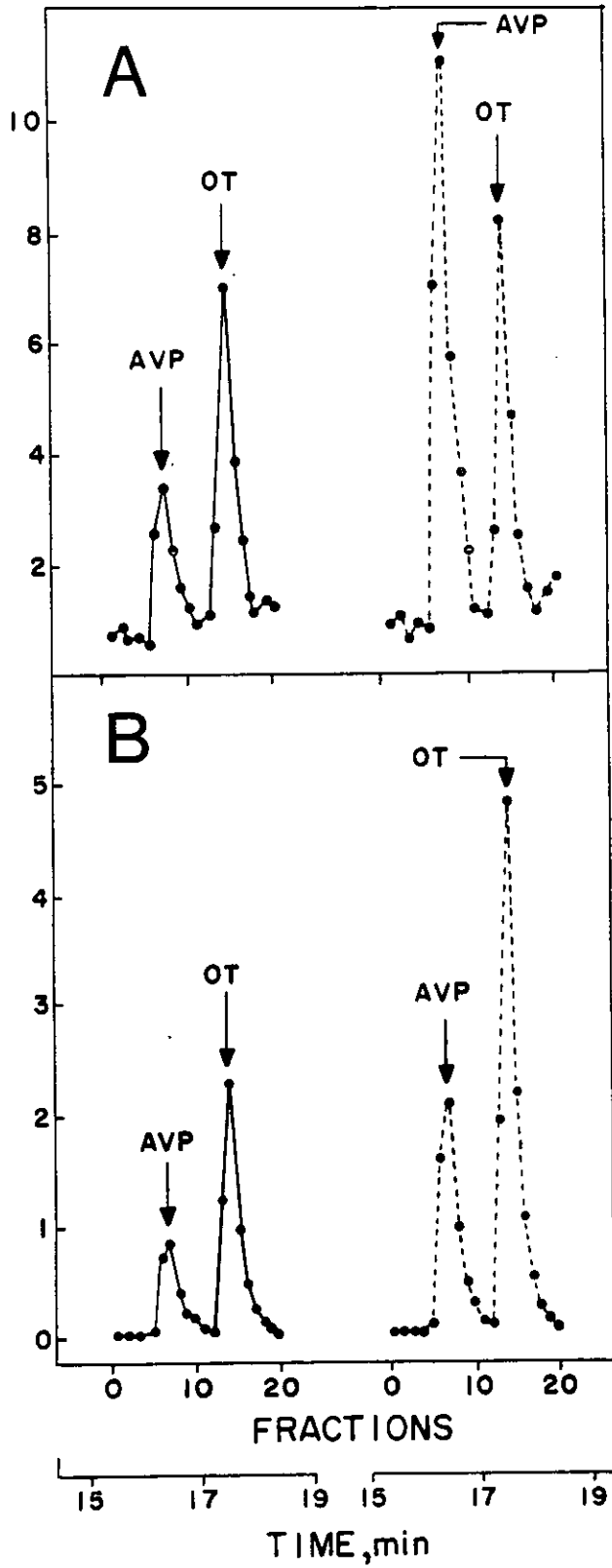
**Figura II-7. BIOSÍNTESIS *IN VIVO* DE AVP-L-[<sup>35</sup>S]Cys, OT-L-[<sup>35</sup>S]Cys Y SRIF-14-L-[<sup>35</sup>S]Cys EN HIPOTALAMOS Y NEUROHIPOFISIS INDIVIDUALES DE RATAS CONTROL Y DE RATAS SOMETIDAS A ESTRES CRONICO POR INMOVILIZACION INTERMITENTE.** Dos y 4 horas después de recibir intracerebroventricularmente 40  $\mu$ Ci de L-[<sup>35</sup>S]Cys hipotálamos y neurohipófisis de ratas control (no inmovilizadas) y de ratas sometidas a estrés crónico por inmovilización se extirparon y procesaron individualmente. Se ilustran las dpm de AVP-L-[<sup>35</sup>S]Cys, OT-L-[<sup>35</sup>S]Cys y SRIF-14-L-[<sup>35</sup>S]Cys en bloques hipotalámicos (A) y neurohipófisis (B) individuales de las ratas control [ ] y de las ratas estresadas por inmovilización intermitente [///] calculadas de perfiles de radioactividad obtenidos por CLAP-II-2 similares a los ilustrados en la Fig. II-6 (C y D). Estos valores se corrigieron a 100% de recuperación. Cada columna representa la media  $\pm$  desviación estándar de 3 mediciones. En la relación de las dpm de OT-L-[<sup>35</sup>S]Cys de las ratas estresadas vs. las ratas control: (\*)  $p < 0.05$ ; (\*\*)  $p < 0.01\%$ .



**Figura II-8. PERFILES/CLAP-II-2 DE AVP-L-[<sup>35</sup>S]Cys Y DE OT-L-[<sup>35</sup>S]Cys REPRESENTATIVOS DE EXTRACTOS DE HIPOTALAMOS Y DE NEUROHIPOFISIS INDIVIDUALES DE RATAS CONTROL (ADRENALECTOMÍAS SIMULADAS) Y DE RATAS ADRENALECTOMIZADAS. Se ilustran las dpm totales de AVP-L-[<sup>35</sup>S]Cys y de OT-L-[<sup>35</sup>S]Cys asociadas a las fracciones marcadoras/acarreadoras peptídicas AVP y OT, obtenidas por CLAP-II-2 de extractos de hipotálamos (A) y de neurohipófisis (B) individuales de una rata control, sometida a una adrenalectomía simulada (\_\_\_\_) y de una rata adrenalectomizada (-.-.-), 4h después de la administración intracerebroventricular del precursor radioactivo. Estas son muestras representativas de pares de tejidos similares de ratas control (n = 3) y de ratas adrenalectomizadas (n=3).**

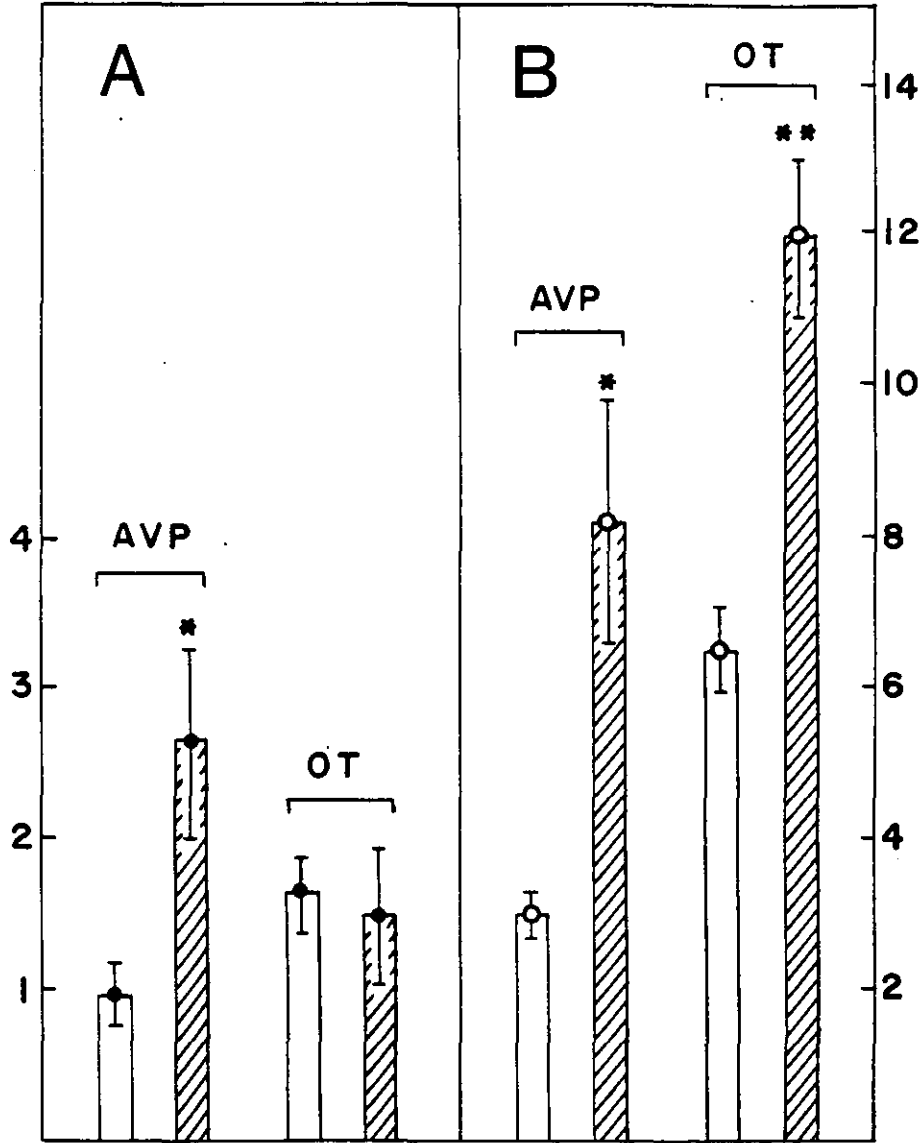
$[^{35}\text{S}]$  L-Cys INCORPORATION / 4h

dpm x 10<sup>-3</sup> / NEUROHYPOPHYSIS      dpm x 10<sup>-2</sup> / HYPOTHALAMIC BLOCK

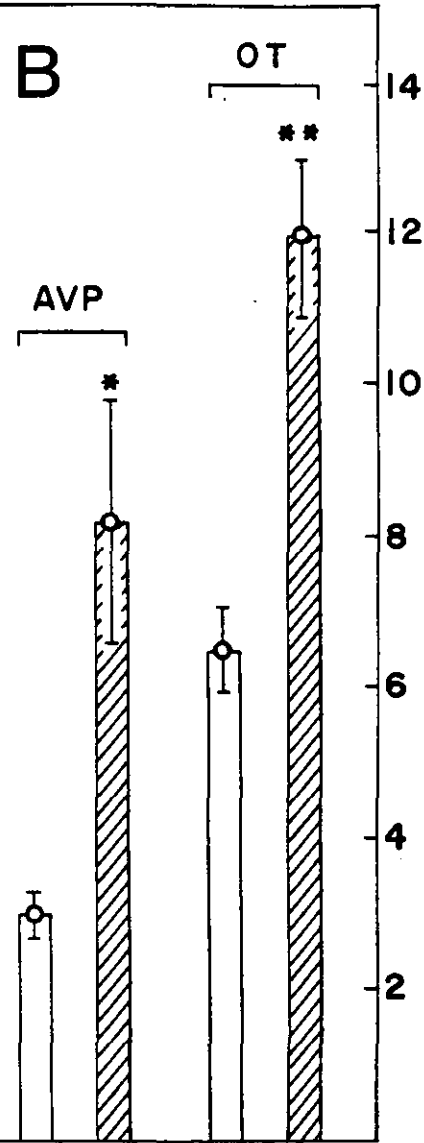


**Figura II-9. DPM TOTALES DE AVP-L-[<sup>35</sup>S]Cys Y DE OT-L-[<sup>35</sup>S]Cys EN EXTRACTOS DE HIPOTALAMOS Y DE NEUROHIPOFISIS INDIVIDUALES DE RATAS CONTROL (ADRENALECTOMÍAS SIMULADAS) Y DE RATAS ADRENALECTOMIZADAS. Se ilustran los promedios de las dpm totales +/- desviación estándar, corregidas al 100% de recuperación, de AVP-L-[<sup>35</sup>S]Cys y de OT-L-[<sup>35</sup>S]Cys, obtenidas por CLAP-II-2, asociadas a las fracciones peptídicas marcadoras/acarreadoras de AVP y de OT añadidas a extractos de hipotálamos (A) y endógenas en neurohipófisis (B) individuales de ratas control, sometidas a adrenalectomías simuladas, [ ], (n=3) y de ratas adrenalectomizadas, [////], (n=3).**

L-[<sup>35</sup>S] Cys, dpm x 10<sup>-3</sup> / 4h / hypothalamic block (●)

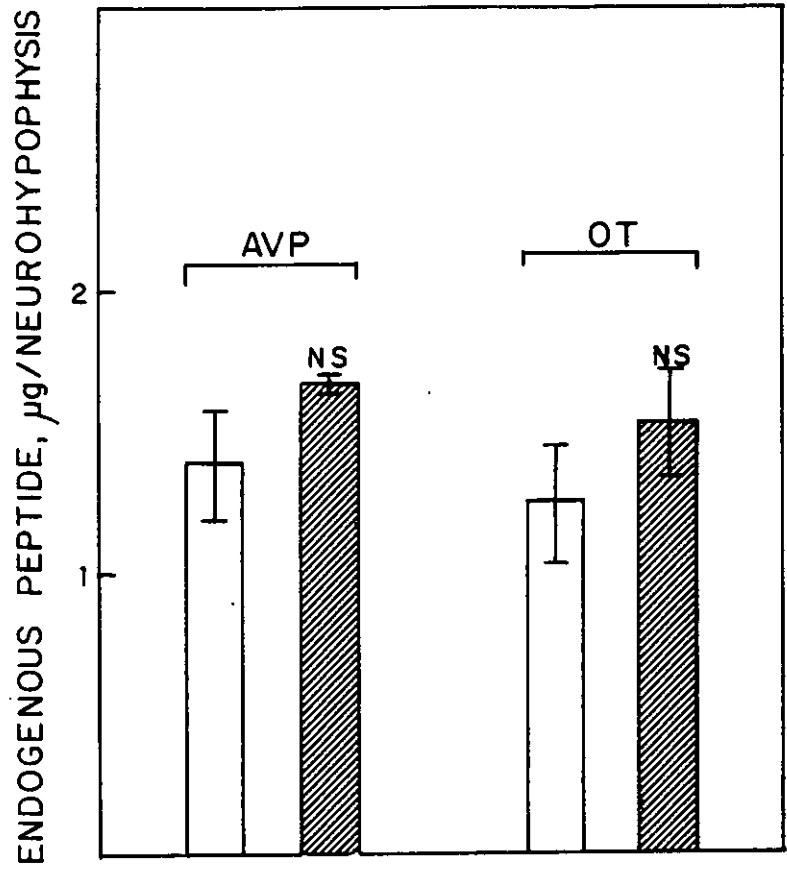


L-[<sup>35</sup>S] Cys, dpm x 10<sup>-3</sup> / 4h / gland (○)

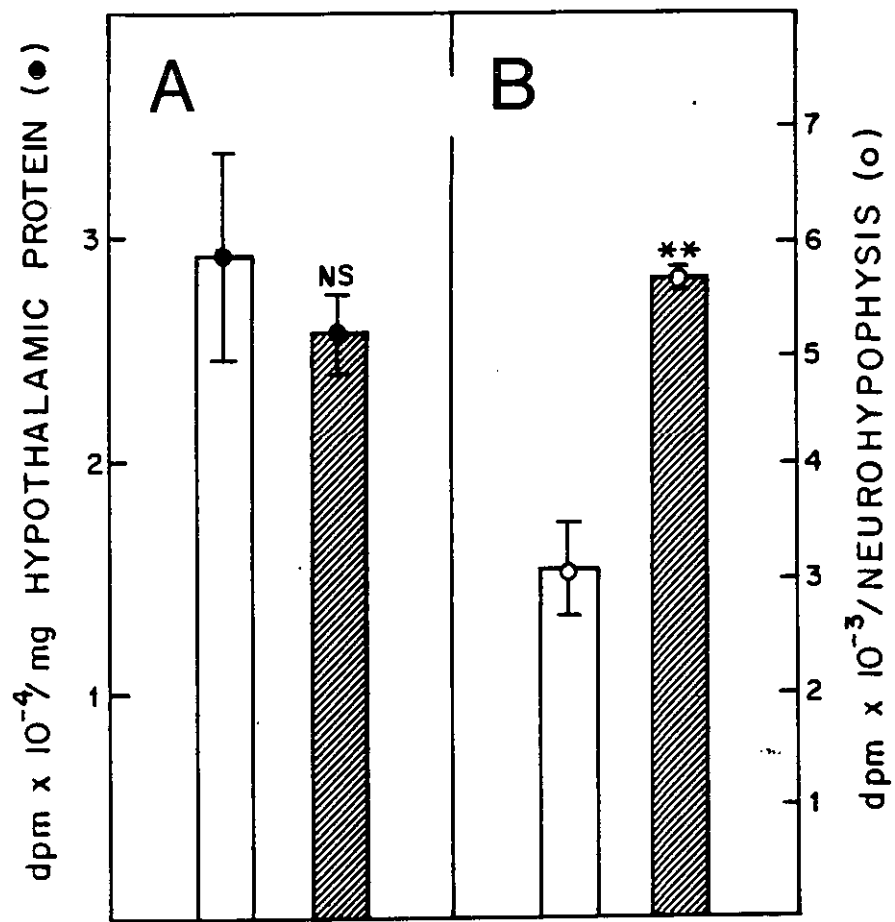


**Figura II-10. CONTENIDO ENDOGENO TOTAL DE AVP Y DE OT EN NEUROHIPOFISIS INDIVIDUALES DE RATAS CONTROL (ADRENALECTOMÍAS SIMULADAS) Y DE RATAS ADRENALECTOMIZADAS. Se muestran los promedios del contenido endógeno total (en  $\mu\text{g}$ ) de AVP y de OT en las neurohipófisis individuales de ratas control, sometidas a adrenalectomías simuladas, (n=3) [ ] y de ratas adrenalectomizadas (n=3) [////], calculados a partir de perfiles de absorbencia UV a 206 nm similares a los ilustrados en la Fig. II-6 y corregidos a 100% de recuperación.**





**Figura II-11. INCORPORACION DE L-[<sup>35</sup>S]Cys A PROTEINA DE HIPOTALAMO Y DE NEUROHIPOFISIS DE RATAS CONTROL (ADRENALECTOMIAS SIMULADAS) Y DE RATAS ADRENALECTOMIZADAS, PRECIPITADAS CON ACIDO ACETICO.** Se ilustran las dpm de incorporación promedio +/- desviación estándar de L-[<sup>35</sup>S]Cys a la proteína precipitada con HOAc 2M en el primer paso de purificación de los neuropéptidos-L-[<sup>35</sup>S]Cys de los hipotálamos (A) [dpm/mg], y de las neurohipófisis (B) [dpm/proteína precipitada total] individuales de ratas control, sometidas a adrenalectomía simulada, [ ] (n=3) y de ratas adrenalectomizadas [////] (n=3).



## Discusión

### Metodología

Se diseñó un procedimiento para el estudio simultáneo de la biosíntesis *in vivo* de AVP-L-[<sup>35</sup>S]Cys, OT-L-[<sup>35</sup>S]Cys y SRIF-14-L-[<sup>35</sup>S]Cys en hipotálamos y, junto con la AVP y la OT endógenas, su acumulación en neurohipófisis individuales de ratas **despiertas**, con el propósito de poder correlacionar con más precisión [sin la interferencia de una anestesia profunda ni del trauma de una cirugía intracraneal (Capítulo I)], los niveles de incorporación de la marca a estos 3 neuropéptidos y el contenido endógeno neurohipofisiario de AVP y OT, con la actividad de neuronas vasopresinérgicas y oxitocinérgicas magnocelulares y parvocelulares del núcleo paraventricular y de las neuronas somatostatinérgicas periventriculares [las neuronas peptidérgicas más cercanas al sitio de administración del precursor radioactivo] de ratas sometidas a alguna manipulación experimental.

En los estudios reportados aquí, el precursor radioactivo se administró intracerebroventricularmente a ratas despiertas a través de cánulas guía intracraneales dirigidas al III V un mínimo de 10 días después de su implantación. En el momento mismo de la inyección intracerebroventricular las ratas se anestesiaron con éter por no más de 5 min del total de las 2 ó 4h en que se marcaron los neuropéptidos. De esta manera, a diferencia del procedimiento descrito en el Capítulo I, las mediciones de biosíntesis en hipotálamo de AVP-L-[<sup>35</sup>S]Cys, OT-L-[<sup>35</sup>S]Cys y SRIF-14-L-[<sup>35</sup>S]Cys, su acumulación en neurohipófisis y las mediciones del contenido endógeno neurohipofisiario de AVP y OT, se hicieron sin la interferencia de una anestesia profunda, ni del trauma de una trepanación craneal y sangrado del seno sagital superior. En consecuencia, las mediciones reportadas aquí, reflejan mejor los cambios

en el estado de actividad de las neuronas peptidérgicas marcadas en respuesta a las manipulaciones experimentales realizadas.

Dada la eficiencia de incorporación de la marca *in vivo* y la alta capacidad de resolución de los sistemas de CLAP para la purificación de los neuropéptidos-L-[<sup>35</sup>S]Cys, fue posible obtener mediciones confiables y reproducibles de la incorporación de la marca a AVP-L-[<sup>35</sup>S]Cys, OT-L-[<sup>35</sup>S]Cys y SRIF-14-L-[<sup>35</sup>S]Cys en extractos de hipotálamo y de neurohipófisis **individuales**. Ello permitió simplificar el método de purificación de los neuropéptidos-L-[<sup>35</sup>S]Cys descrito en el Capítulo I (II-103), eliminando el paso de cromatografía por filtración en gel. Los extractos solubles en ácido obtenidos por centrifugación de los homogeneizados de los tejidos, se filtraron directamente a través de los cartuchos Sep-Pak C<sub>18</sub> y los neuropéptidos (marcados, sintéticos y endógenos) separados en 2 pasos sucesivos por CLAP, lográndose una recuperación del 70% o más para cada uno de los 3 neuropéptidos [lo que significó para el caso de la AVP de extractos de hipotálamo una recuperación 40% mayor que su recuperación al final del proceso de purificación descrito en el Capítulo I (II-103)].

Con el uso sucesivo de 2 sistemas de CLAP en fase reversa con gradientes lineales de CH<sub>3</sub>CN, se obtuvieron fracciones péptidicas altamente purificadas. De la pureza de los perfiles de absorbencia de las fracciones peptídicas obtenidas por CLAP-II-2 (Fig. II-6C y Fig. II-6D), se infiere (aunque no se midió) que la pureza radioquímica de las fracciones peptídicas fue mayor que la pureza de las fracciones obtenidas de los extractos combinados de múltiples hipotálamos o de múltiples neurohipófisis descrita en el Capítulo I (II-103), que como mínimo fue del 50%.

Estímulos del eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenales en la rata: su efecto sobre la biosíntesis *in vivo* de AVP-L-[<sup>35</sup>S]Cys, OT-L-[<sup>35</sup>S]Cys y SRIF-14-L-[<sup>35</sup>S]Cys en el hipotálamo y su acumulación en la neurohipófisis.

- Estrés crónico por inmovilización intermitente

Dos y cuatro horas después de la administración intracerebroventricular del precursor radioactivo los niveles de OT-L-[<sup>35</sup>S]Cys fueron significativamente más elevados en las ratas sometidas a estrés crónico por inmovilización intermitente durante 3 días (6h/día) que en las ratas control no estresadas, tanto en hipotálamos (con una tendencia descendente) como en neurohipófisis (con una tendencia ascendente), sin diferencias en los niveles de biosíntesis hipotalámica ni acumulación neurohipofisiaria de AVP-L-[<sup>35</sup>S]Cys o de SRIF-14-L-[<sup>35</sup>S]Cys. Además, las ratas estresadas mostraron una disminución del 30% en el contenido endógeno neurohipofisiario de OT comparado a su contenido en las ratas control, en acorde con las observaciones de Guzek *et al.* (II-111), y sin cambio en el contenido endógeno de AVP en las mismas neurohipófisis. Estos resultados sugieren que en respuesta al estrés crónico por inmovilización en la rata la OT y no la AVP, es una hormona de estrés (II-74).

No se conoce con certeza la función de la OT como una hormona de estrés.

Pudiera estar involucrada en la regulación de la presión arterial, reduciendo la resistencia vascular que aumenta con el estrés (II-75, II-76). Se ha propuesto que bajo ciertas circunstancias estresantes, como la inmovilización y el nado forzado (II-74), la OT apoya la acción lipolítica de la ACTH y de la epinefrina ejerciendo un efecto anti-insulínico sobre el tejido adiposo (II-112), que se sabe posee receptores de OT específicos y de alta afinidad (II-77). Sin embargo, otros han observado justo lo contrario, es decir, que la OT antagoniza la acción lipolítica de la ACTH y de la epinefrina ejerciendo un efecto insulínico (II-113).

Por otra parte, Gibbs (II-4, II-82, II-83) ha propuesto que la inhibición de la secreción de la hormona de crecimiento en ratas estresadas no sea atribuible a un aumento en la liberación de SRIF-14 [en efecto, los niveles de biosíntesis de SRIF-14-L-[<sup>35</sup>S]Cys de las neuronas periventriculares no se alteraron en respuesta al estrés crónico por inmovilización], sino que pudiera deberse a un aumento en la secreción de OT al sistema porta hipofisario proveniente de las secreciones de los cuerpos de Herring (II-114), [extensiones en la ZEEM de axones dirigidos a la neurohipósis] de las neuronas magnocelulares oxitocinérgicas activadas. El aumento en la biosíntesis de OT-L-[<sup>35</sup>S]Cys simultáneamente con el aumento en la secreción de OT endógena neurohipofisaria demostradas aquí, son evidencias del aumento en el estado de actividad de estas neuronas con el estrés. En este fenómeno, también pudieran estar implicadas neuronas oxitocinérgicas parvocelulares (II-88) con terminales en la ZEEM (II-115). De ser así, el incremento en los niveles hipotalámicos de OT-L-[<sup>35</sup>S]Cys en las ratas estresadas observado aquí, pudiera atribuirse también a la activación de esta población neuronal.

La ausencia de respuesta de las neuronas vasopresinérgicas magnocelulares al estrés por inmovilización crónica observada aquí concuerda con los reportes de Husain *et al.* (II-2), Gibbs *et al.* (II-4) y Lang *et al.* (II-74), quienes no observaron aumento significativo en los niveles plasmáticos de AVP inmunodetectable en sus ratas inmovilizadas, pero se opone a los estudios de Krisch (II-116), en los que se demuestra un aumento en la inmunotinción debida a AVP en neuronas magnocelulares del PVN y en la ZEEM, aunque sin cambios en el contenido endógeno neurohipofisario del nonapéptido (II-117) tal y como se reporta aquí. Además, a diferencia del efecto de la adrenalectomía (que se comenta a continuación), el estrés crónico por inmovilización tampoco parece haber activado al sistema tuberoinfundibular vasopresinérgico.

Existen varios motivos por los que se esperaba que las neuronas somatostatinérgicas se activaran con el estrés crónico por inmovilización. *In vivo* (II-94, II-95) e *in vitro* (II-92, II-93) la SRIF-14 administrada en forma exógena es capaz de inhibir la secreción ACTH. Existe evidencia de que las neuronas somatostatinérgicas son sensibles al estrés por frío (II-102) y se ha propuesto que la inhibición de la secreción de la hormona de crecimiento en ratas estresadas por inmovilización pudiera atribuirse a un aumento en la secreción de SRIF-14 (II-98, II-99). También, estudios del grupo de McCann (II-118) sugieren que la inhibición de la secreción de la hormona de crecimiento en respuesta al estrés por la inhalación de éter, pudiera atribuirse a un efecto de la SRIF-14 directo sobre la secreción de la hormona de crecimiento, además de bloquear la acción de la hormona liberadora de la hormona de crecimiento. Sin embargo, los resultados obtenidos aquí muestran la resistencia de las neuronas somatostatinérgicas periventriculares al estrés por inmovilización.

- Adrenalectomía

Veinte días después de una adrenalectomía bilateral y 4 horas después de la administración intracerebroventricular de L-[<sup>35</sup>S]Cys, ratas adrenalectomizadas mostraron niveles AVP-L-[<sup>35</sup>S]Cys en el hipotálamo 2.5 veces mayores que ratas sometidas a una adrenalectomía bilateral simulada (grupo control). No hubo cambios en los niveles hipotalámicos de OT-L-[<sup>35</sup>S]Cys ni en el nivel de incorporación de la L-[<sup>35</sup>S]Cys a la proteína de hipotálamo precipitable con HOAc, una medida de biosíntesis de proteína total.

En las neurohipófisis correspondientes, no hubo cambio en el contenido endógeno de AVP ni de OT, mientras que los niveles de acumulación de AVP-L-[<sup>35</sup>S]Cys y de OT-L-



[<sup>35</sup>S]Cys aumentaron significativamente en las ratas adrenalectomizadas, comparativamente con las ratas control. Lo mismo ocurrió con los niveles de incorporación de la marca a la fracción de proteína neurohipofisaria precipitable con HOAc [una fracción proteínica rica en precursores biosintéticos residuales de AVP y de OT (II-109, II-110)].

El aumento selectivo en los niveles de AVP-L-[<sup>35</sup>S]Cys en el hipotálamo de las ratas adrenalectomizadas, pudiera reflejar la desinhibición de neuronas vasopresinérgicas parvocelulares del PVN por deficiencia de glucocorticoides. Se sabe que estas neuronas son sensibles a glucocorticoides (II-119) y que en ratas adrenalectomizadas muestran alteraciones marcadas en la expresión génica de la AVP tales como, un incremento en AVP inmunodetectable, colocalizada con CRF-41 (II-45, II-46, II-47), así como un aumento selectivo en el nivel de transcripción del ARNm de AVP (II-50, II-120). Es importante señalar que los estudios reportados aquí se realizaron con ratas macho adrenalectomizadas, ya que recientemente se ha observado que la regulación de los niveles de ARNm de AVP por glucocorticoides en el PVN depende del género (II-121, II-122).

Las neuronas vasopresinérgicas parvocelulares del PVN terminan en la ZEEM (II-23, II-52, II-115) y es a ellas que se atribuye el aumento de AVP en la ZEEM de ratas adrenalectomizadas (II-40, II-41, II-42, II-43), así como al aumento gradual en los niveles de AVP inmunodetectable en la adenohipófisis de estas ratas (II-59). Dada la inestabilidad de la AVP agranular en la adenohipófisis por acción de peptidasas circulantes, aquí no se acumularon niveles medibles de AVP-L-[<sup>35</sup>S]Cys durante las 4 horas de incorporación de la marca en las adenohipófisis de las ratas adrenalectomizadas.

A pesar de que está demostrada su capacidad *in vitro* para potenciar la secreción de ACTH inducida por CRF-41 (II-14, II-15, II-81) y su capacidad *in vivo*, en humanos, para inhibir la secreción de ACTH inducida por AVP o por insulina (II-84), en ratas adrenalectomizadas la OT no parece tener un papel en la regulación de la secreción de ACTH. Las neuronas oxitocinérgicas que pudieran estar involucradas en esta función serían las neuronas oxitocinérgicas parvocelulares del PVN con terminales en la ZEEM (II-86, II-87). Sin embargo, estas neuronas no respondieron a la deficiencia de glucocorticoides. Los niveles de OT-L-[<sup>35</sup>S]Cys en hipotálamos de ratas adrenalectomizadas fueron iguales a las de las ratas control (adrenalectomía simulada). Además, otros han demostrado que el contenido endógeno de OT inmunodetectable en la ZEEM no cambia después de la adrenalectomía (II-40, II-43, II-91).

El aumento en los niveles de acumulación de AVP-L-[<sup>35</sup>S]Cys y de OT-L-[<sup>35</sup>S]Cys en las neurohipófisis de las ratas adrenalectomizadas, que concuerda con las observaciones de Russell (II-8), así como el aumento en el nivel de la proteína-L-[<sup>35</sup>S]Cys precipitable con HOAc [una fracción proteínica rica en precursores biosintéticos de AVP-L-[<sup>35</sup>S]Cys y de OT-L-[<sup>35</sup>S]Cys (II-109, II-110)], pudieran atribuirse a la desinhibición de las correspondientes neuronas magnocelulares del PVN (II-40). Al igual que otros investigadores que evaluaron la actividad de las neuronas magnocelulares vasopresinérgicas en ratas adrenalectomizadas (II-1), aquí se encontró que la respuesta a la adrenalectomía de las neuronas magnocelulares vasopresinérgicas y oxitocinérgicas fue débil. No resultó en un aumento en los niveles hipotalámicos de OT-L-[<sup>35</sup>S]Cys, como ocurre cuando estas neuronas están bajo la influencia de un estímulo potente, como es la deshidratación (II-103); no condujo a cambios en el contenido de AVP ni de OT inmunodetectables en las neuronas magnocelulares del PVN (II-47), ni a cambios en su contenido en la ZIEM (II-40, II-43), y en el presente trabajo, tampoco

resultó en una disminución de su contenido endógeno neurohipofisario. Para evitar que se produjera un estado de hipovolemia que pudiera interferir con la activación de los barorreceptores de las neuronas magnocelulares en las ratas adrenalectomizadas [por deficiencia de aldosterona (II-1)] se les dió como agua de beber una disolución salina isotónica (0.9% de NaCl) [que también recibieron las ratas control] (II-124, II-125, II-126, II-127). Con base en estos resultados, es posible concluir que el aumento, observado aquí, en los niveles hipotalámicos de AVP-L-[<sup>35</sup>S]Cys en las ratas adrenalectomizadas, es atribuible principalmente a la desinhibición de neuronas vasopresinérgicas parvocelulares del PVN (II-45, II-46, II-47, II-49, II-50, II-119, II-120) y que los incrementos en los niveles neurohipofisarios de AVP-L-[<sup>35</sup>S]Cys y de OT-L-[<sup>35</sup>S]Cys, sin cambio en su contenido endógeno, son el resultado de alteraciones menores en el estado de actividad de las correspondientes neuronas magnocelulares del PVN.

## Conclusiones

1. Se obtuvieron mediciones de la biosíntesis *in vivo* de AVP-L-[<sup>35</sup>S]Cys, OT-L-[<sup>35</sup>S]Cys y SRIF-14-L-[<sup>35</sup>S]Cys sin la interferencia de una anestesia profunda ni del trauma postquirúrgico de una cirugía intracraneal en ratas individuales, despiertas y recuperadas de la trepanación. Esto fue posible por dos razones fundamentales:
  - a. La administración intracerebroventricular del precursor radioactivo se hizo a través de cánulas guía intracraneales dirigidas al III ventrículo implantadas 10 días antes del estudio.
  - b. Administrando 50  $\mu$ Ci/rata y empleando técnicas de CLAP en fase reversa de alta resolución fue posible medir la biosíntesis *in vivo* de AVP-L-[<sup>35</sup>S]Cys, OT-L-[<sup>35</sup>S]Cys y SRIF-14-L-[<sup>35</sup>S]Cys, en extractos de hipotálamos individuales y medir su acumulación y los niveles de AVP y OT endógenas en los extractos de las neurohipófisis individuales correspondientes.
2. Con esta metodología es posible determinar la capacidad biosintética, bajo diversas condiciones fisiológicas, de las neuronas peptidérgicas vasopresinérgicas y oxitocinérgicas magnocelulares y parvocelulares del núcleo paraventricular así como la de las neuronas somatostatinérgicas periventriculares (todas ellas neuronas peptidérgicas cercanas al sitio de administración del precursor radioactivo) en ratas individuales, despiertas y recuperadas de la cirugía intracraneal. En estas condiciones metodológicas, la determinación de esta capacidad biosintética constituye un índice confiable de actividad neuronal de dichas poblaciones de neuronas peptidérgicas.
3. Empleando esta metodología se observó que ratas sometidas a estrés crónico por inmovilización intermitente durante 3 días (6h/día) muestran una activación selectiva de las neuronas magnocelulares oxitocinérgicas paraventriculares, sin cambio en el estado de actividad de las neuronas vasopresinérgicas paraventriculares ni somatostatinérgicas periventriculares. En comparación con las ratas control, las ratas estresadas mostraron

incrementos en los niveles hipotálamicos y neurohipofisarios de OT-L-[<sup>35</sup>S]Cys, paralelamente con una disminución en un 30% del contenido endógeno neurohipofisario de OT, sin cambio en los niveles de biosíntesis de AVP-L-[<sup>35</sup>S]Cys ni de SRIF-14-L-[<sup>35</sup>S]Cys, ni del contenido endógeno neurohipofisario de AVP.

4. En ratas macho adrenalectomizadas se observó un aumento selectivo en los niveles hipotalámicos de AVP-L-[<sup>35</sup>S]Cys e incrementos en las neurohipofisis de AVP-L-[<sup>35</sup>S]Cys y de OT-L-[<sup>35</sup>S]Cys, aunque sin cambio en el contenido endógeno neurohipofisario de AVP ni de OT. Con base en varios reportes en la literatura se sugiere que el aumento de AVP-L-[<sup>35</sup>S]Cys en los hipotálamos de las ratas adrenalectomizadas sea atribuible principalmente a la desinhibición de las neuronas vasopresinérgicas parvocelulares del PVN, mientras que los incrementos en la neurohipófisis de AVP-L-[<sup>35</sup>S]Cys y OT-L-[<sup>35</sup>S]Cys, sin cambio en el contenido endógeno de AVP ni de OT, son el resultado de alteraciones menores en el estado de actividad de las correspondientes neuronas magnocelulares del PVN.

5. Este trabajo fue publicado en:

**Franco-Bourland RE** Vasopressinergic, oxytocinergic, and somatostatinergic neuronal activity after adrenalectomy and immobilization stress. *Neurochemical Res* 23 (1998) 699-705.

Ha sido citado una vez.

1. Hirai K, Seki T Cerebrospinal fluid somatostatin levels in febrile seizures and epilepsy in children. *Neuropeptides* 34 (2000) 18-24.



## **Bibliografia**

- II-1. Seif SIM, Robinson AG, Zimmerman EA, Wilkins J *Plasma neurophysin and vasopressin in the rat. Response to adrenalectomy and steroid replacement.* Endocrinology 103 (1978) 1009-1015.
- II-2. Husain MK, Manger WM, Rock TW, Weiss RJ, Frantz AG *Vasopressin release due to manual restraint in the rat: role of body compression and comparison with other stressful stimuli.* Endocrinology 104 (1979) 641-644.
- II-3. Collu R, Gibb W, Bichet DG, Ducharme JR *Role of arginine-vasopressin (AVP) in stress-induced inhibition of testicular steroidogenesis in normal and AVP-deficient rats.* Endocrinology 115 (1984) 1609-1615.
- II-4. Gibbs DM *Dissociation of oxytocin, vasopressin, and corticotropin secretion during different types of stress.* Life Sci 35 (1984) 487-492.
- II-5. Dunning BE, Moltz JH, Fawcett CP *Actions of neurohypophysial peptides on pancreatic hormone release.* Am J Physiol 246 (1984) E108-E114.
- II-6. Goren HJ, Okabe T, Lederis K, Hollenberg MD *Oxytocin stimulates glucose oxidation in rat thymocytes.* Proc West Pharmacol Soc 27 (1984) 461-463.
- II-7. Jard S *Vasopressin: mechanisms of receptor activation.* Prog Brain Res 60 (1983) 383-394.

II-8. Russell JT, Brownstein MJ, Gainer H *[<sup>35</sup>S]cysteine labeled peptides transported to the neurohypophyses of adrenalectomized, lactating, and Brattleboro rats. Brain Res* 201 (1980) 227-234.

II-9. Knepel W, Nutto D, Anhut H *β-endorphin controls vasopressin release during foot-shock-induced stress in the rat. Regulat Peptides* 7 (1983) 9-19.

II-10. Vale W, Spiess J, Rivier C, Rivier J *Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin. Science* 213 (1981) 1394-1397.

II-11. Bény JL, Baertschi AJ *Synthetic corticoliberin needs arginine vasopressin for full corticotropin releasing activity. Experientia* 38 (1982) 1078-1079.

II-12. Gillies GE, Linton EA, Lowry PJ *Corticotropin releasing activity of the new CRF is potentiated several times by vasopressin. Nature* 299 (1982) 4355-4357.

II-13. Giguère V, Labrie F *Vasopressin potentiates cyclic AMP accumulation and ACTH release induced by corticotropin-releasing factor (CRF) in rat anterior pituitary cells in culture. Endocrinology* 111 (1982) 1752-1754.

II-14. Vale W, Vaughan J, Smith M, Yamamoto G, Rivier J, Rivier C *Effects of synthetic ovine corticotropin-releasing factor, glucocorticoids, catecholamines, neurohypophysial peptides, and other substances on cultured corticotropic cells. Endocrinology* 113 (1983) 1121-1131.



- II-15. Antoni FA, Holmes MC, Jones MT *Oxytocin as well as vasopressin potentiate ovine CRF in vitro*. *Peptides* 4 (1983) 411-415.
- II-16. Murakami K, Hashimoto K, Ota Z *Interaction of synthetic corticotropin releasing factor and arginine vasopressin on in vitro ACTH release by the anterior pituitary of rats*. *Neuroendocrinology* 39 (1984) 49-53.
- II-17. Yates FE, Russell SM, Dallman MF, Hedge GA, McCann SM, Dhariwal APS *Potentiation by vasopressin of corticotropin release induced by corticotropin-releasing factor*. *Endocrinology* 88 (1971) 3-15.
- II-18. Rivier C, Vale W *Interaction of corticotropin-releasing factor and arginine vasopressin on adrenocorticotropin secretion in vivo*. *Endocrinology* 113 (1983) 939-942.
- II-19. Fishman AJ, Moldow RL *In vivo potentiation of corticotropin-releasing factor activity by vasopressin analogues*. *Life Sci* 35 (1984) 1311-1319.
- II-20. Liu JH, Muse K, Contreras P, Gibbs D, Vale W, Rivier J, Yen SSC *Augmentation of ACTH-releasing activity of synthetic corticotropin releasing factor (CRF) by vasopressin in women*. *J Clin Endocrinol Metab* 57 (1983) 1087-1089.
- II-21. Hashimoto K, Murakami K, Hattori T, Ota Z *Synergistic interaction of corticotropin releasing factor and arginine vasopressin on adrenocorticotropin and cortisol secretion in Macaca Fuscata*. *Acta Med Okayama* 38 (1984) 261-268.

II-22. Spinedi E, Negro-Vilar A *Serotonin and adrenocorticotropin (ACTH) release: direct effects at the anterior pituitary level and potentiation of arginine-vasopressin-induced ACTH release.* Endocrinology 112 (1983) 1217-1223.

II-23. Swanson LW, Sawchenko PE, Wiegand SJ, Price JL *Separate neurons in the paraventricular nucleus project to the median eminence and to the medulla and spinal cord.* Brain Res 198 (1980) 190-195.

II-24. Plotsky PM, Bruhn TO, Otto S *Central modulation of immunoreactive arginine vasopressin and oxytocin secretion into the hypophysial-portal circulation by corticotropin-releasing factor.* Endocrinology 116 (1985) 1669-1671.-

II-25. Plotsky PM, Bruhn TO, Vale W *Central modulation of immunoreactive corticotropin-releasing factor secretion by arginine vasopressin.* Endocrinology 115 (1984) 1639-1641.

II-26. Vellucci SV *The effects of reserpine on hypothalamo-pituitary-adrenocortical function.* Gen Pharmacol 9 (1978) 275

II-27. Swanson LW, Sawchenko PE, Berod A, Hartman BK, Heile KB, Van Orde DE *An immunohistochemical study of the organization of catecholaminergic cells and terminal fields in the paraventricular and supraoptic nuclei of the hypothalamus.* J Comp Neurol 196 (1981) 271-285.

- II-28. Seybold V, Elde R, Hökfelt T *Terminals of reserpine-sensitive vasopressin-neurophysin neurons in the external layer of the rat median eminence.* Endocrinology 108 (1981) 1803-1809.
- II-29. Silverman AJ, Hou-Yu A, Oldfield BJ *Ultrastructural identification of noradrenergic nerve terminals and vasopressin containing neurons of the paraventricular nucleus in the same thin section.* J Histochem Cytochem 31 (1983) 1151-1156.
- II-30. Smythe GA, Bradshaw JE, Vining RF *Hypothalamic monoamine control of stress-induced adrenocorticotropin release in the rat.* Endocrinology 113 (1983) 1062-1071.
- II-31. Silverman AJ, Hou-Yu A, Zimmerman EA *Ultrastructural studies of vasopressin neurons of the paraventricular nucleus of the hypothalamus using a monoclonal antibody to vasopressin: analysis of synaptic input.* Neuroscience 9 (1983) 141-155.
- II-32. Day TA, Ferguson AV, Renaud LP *Facilitatory influence of noradrenergic afferents on the excitability of rat paraventricular nucleus neurosecretory cells.* J Physiol 355 (1984) 237-250.
- II-33. Silverman AJ, Hoffman DL, Zimmerman EA *The descending afferent connections of the paraventricular nucleus of the hypothalamus.* Brain Res Bull 6 (1981) 47-61.
- II-34. Tribollet E, Dreifuss JJ *Localization of neurones projecting to the hypothalamic paraventricular nucleus area of the rat: a horseradish peroxidase study.* Neuroscience 6 (1981) 1315-1328.

- II-35. McEwen BS, Gerlach JL, Micco DJ *Putative glucocorticoid receptors in hippocampus and other brain regions of the rat brain*. In: Isaacson S, Pribram J (Eds) **The Hippocampus I**, Plenum Press, New York, 1975; pp. 285-322.
- II-36. Warembourg M *Radioautographic study of the rat brain after injection of [1,2-<sup>3</sup>H]-corticosterone*. *Brain Res* 89 (1975) 61-70.
- II-37. Sapolsky RM, McEwen BS, Rainbow TC *Quantitative autoradiography of [<sup>3</sup>H]-corticosterone receptors in rat brain*. *Brain Res* 271 (1983) 331-334.
- II-38. Tornello S, Orti E, De Nicola AF, Rainbow TC, McEwen BS *Regulation of glucocorticoid receptors in brain by corticosterone treatment of adrenalectomized rats*. *Neuroendocrinology* 35 (1982) 411-417.
- II-39. Sapolsky RM, Krey LC, McEwen BS, Rainbow TC *Do vasopressin-related peptides induce hippocampal corticosterone receptors? Implications for aging*. *J Neurosci* 4 (1984) 1479-1485.
- II-40. Stillman MA, Recht LD, Rosario SL, Seif SM, Robinson AG, Zimmerman EA *The effects of adrenalectomy and glucocorticoid replacement on vasopressin and vasopressin-neurophysin in the zona externa of the median eminence of the rat*. *Endocrinology* 101 (1977) 42-49.
- II-41. Silverman AJ, Hoffman D, Gadde CA, Krey LC, Zimmerman EA *Adrenal steroid inhibition of the vasopressin-neurophysin neurosecretory system to the median eminence of the rat*. *Neuroendocrinology* 32 (1981) 129-133.

II-42. Silverman AJ, Zimmerman EA *Adrenalectomy increases sprouting in a peptidergic neurosecretory system.* Neuroscience 7 (1982) 2705-2714.

II-43. Bock R, Detzer K, Geiger A, Lang RE, Ostermann E, Sinner G *Effect of adrenalectomy and administration of hypertonic saline on the content of aldehyde fuchsin-positive neurosecretory material and posterior lobe hormones in the median eminence and the neural lobe of rats.* Cell Tissue Res 228 (1983) 127-138.

II-44. Roth KA, Weber E, Barchas JD *Immunoreactive CRF and vasopressin are colocalized in a subpopulation of immunoreactive vasopressin cells in the paraventricular nucleus of the hypothalamus.* Life Sci 31 (1983) 1857-1860.

II-45. Tramu G, Croix C, Pillez A *Ability of the CRF immunoreactive neurons of the paraventricular nucleus to produce vasopressin-like material. Immunohistochemical demonstration in adrenalectomized guinea pigs and rats.* Neuroendocrinology 37 (1983) 467-469.

II-46. Kiss J, Mezey E, Skirboll L *Corticotropin-releasing factor-immunoreactive neurons of the paraventricular nucleus become vasopressin positive after adrenalectomy.* Proc Natl Acad Sci USA 81 (1984) 1854-1858.

II-47. Sawchenko PE, Swanson LW, Vale W *Co-expression of corticotropin-releasing factor and vasopressin immunoreactivity in parvocellular neurosecretory neurons of the adrenalectomized rat.* Proc Natl Acad Sci USA 81 (1984) 1883-1887.

II-48. Sawchenko PE, Swanson LW, Vale WW *Corticotropin-releasing factor: co-expression within distinct subsets of oxytocin-, vasopressin-, and neurotensin-immunoreactive neurons in the hypothalamus of the male rat.* J Neurosci 4 (1984) 1118-1129

II-49. Silverman AJ, Gadde CA, Zimmerman EA *The effects of adrenalectomy on the incorporation of [<sup>3</sup>H]cytidine into RNA in neurophysin and vasopressin containing neurons of the rat hypothalamus.* Neuroendocrinology 30 (1980) 285-290.

II-50. Wolfson B, Manning RW, Davis LG, Arentzen R, Baldino Jr F *Co-localization of corticotropin releasing factor and vasopressin mRNA in neurons after adrenalectomy.* Nature 315 (1985) 59-61.

II-51. Carlson DE, Domhorst A, Seif SM, Robinson AG, Gann DS *Vasopressin-dependent and -independent control of the release of adrenocorticotropin.* Endocrinology 110 (1982) 680-682.

II-52. Recht LD, Hoffman DL, Haldar J, Silverman AJ, Zimmerman EA *Vasopressin concentrations in hypophysial portal plasma: insignificant reduction following removal of the posterior pituitary gland.* Neuroendocrinology 33 (1981) 88-90.

II-53. Zimmerman EA, Carmel PW, Husain MK, Ferin M, Tannenbaum M, Frantz AG, Robinson AG *Vasopressin and neurophysin: high concentrations in monkey hypophysial portal blood.* Science 182 (1973) 925-927.

II-54. Goldman H, Lindner L *Antidiuretic hormone concentration in blood perfusing the adenohipophysis*. *Experientia* 18 (1962) 289

II-55. Oliver C, Mical RS, Porter JC *Hypothalamic-pituitary vasculature: evidence for retrograde blood flow in the pituitary stalk*. *Endocrinology* 101 (1977) 598-604.

II-56. Baertschi AJ *Portal vascular route from hypophysial stalk/neural lobe to adenohipophysis*. *Amer J Physiol* 239 (1980) R463-R469.

II-57. Baertschi AJ, Vallet P, Baumann JB, Girard J *Neural lobe of pituitary modulates corticotropin release in the rat*. *Endocrinology* 106 (1980) 878-882. -

II-58. Makara JB, Stark E, Kárteszi M, Fellingner E, Rappay G, Szabó D *Effect of electrical stimulation of the neurohipophysis on ACTH release in rats with hypothalamic lesions*. *Neuroendocrinology* 31 (1980) 237-243.

I-59. Chateau M, Marchetti J, Burllet A, Boulange M *Evidence of vasopressin in adenohipophysis: research into its role in corticotrope activity*. *Neuroendocrinology* 28 (1979) 25-35.

II-60. Chateau M, Burllet A, Marchetti J *La "vasopressin-like" du lobe antérieur de l'hipophyse: isolement et identification par son activité biologique et immunologique*. *J Physiol Paris* 68 (1974) 10B-11B.

- II-61. Bock R, Detzer K, Leicht E, Röder R *Functional difference between "classical" neurosecretory material and vasopressin-like substances of the outer layer of the median eminence.* Cell Tissue Res 212 (1978) 257-277.
- II-62. Bulet A, Chateau-Chapleur M, Dreyfuss F *The vasopressinergic infundibular fibres: collaterals from the hypothalamo-neurohypophysial tract?* In: Baertschi AJ, Dreifuss JJ (Eds) **Neuroendocrinology of Vasopressin, Corticotiberin, and Opiomelanocortins.** Academic Press, London, 1982; pp. 95-105.
- II-63. Lutz-Bucher B, Koch B *Characterization of specific receptors for vasopressin in the pituitary gland.* Biochem Biophys Res Commun 115 (1983) 492-498.
- II-64. Antoni FA *Novel ligand specificity of pituitary vasopressin receptors in the rat.* Neuroendocrinology 39 (1984) 186-188.
- II-65. Prasad C, Edwards RM *Stimulation of rat pituitary phospholipid methyltransferase by vasopressin but not oxytocin.* Biochem Biophys Res Commun 103 (1981) 559-564.
- II-66. Aguilera G, Harwood JP, Wilson JX, Morell J, Brown JH, Catt KJ *Mechanisms of action of corticotropin-releasing factor and other regulators of corticotropin release in rat pituitary cells.* J Biol Chem 258 (1983) 8039-8045.
- II-67. Raymond V, Leung PCK, Giguère V *The phosphatidic acid-phosphatidylinositol cycle in the rat corticotroph: rapid stimulation by vasopressin but not by CRF.* Abstracts of the 65<sup>th</sup> Annual Meeting of the Endocrine Society Abstr 735, 1983; p. 264.



II-68. Spinedi E, Negro-Vilar A *Arginine vasopressin and adrenocorticotropin release: correlation between binding characteristics and biological activity in anterior pituitary dispersed cells.* Endocrinology 114 (1984) 2247-2251.

II-69. Gaillard RC, Schoenenberg P, Favrod-Coune CA, Muller AF, Marie J, Bockaert J, Jard S *Properties of rat anterior pituitary vasopressin receptors: relation to adenylate cyclase and the effect of corticotropin-releasing factor.* Proc Natl Acad Sci USA 81 (1984) 2907-2911.

II-70. Rivier C, Rivier J, Mormede P, Vale W *Studies of the nature of the interaction between vasopressin and corticotropin-releasing factor on adrenocorticotropin release in the rat.* Endocrinology 115 (1984) 882-886.

II-71. Knepel W, Homolka L, Vlaskovska M, Nutto D *In vitro adrenocorticotropin/ $\beta$ -endorphin releasing activity of vasopressin analogs is related neither to pressor nor to antidiuretic activity.* Endocrinology 114 (1984) 1797-1804.

II-72. Antoni FA, Holmes MC, Makara GB, Káteszi M, Laszló FA *Evidence that the effects of arginine-8-vasopressin (AVP) on pituitary corticotropin (ACTH) release are mediated by a novel type of receptor.* Peptides 5 (1984) 519-522.

II-73. Holmes MC, Antoni FA, Szentendrei T *Pituitary receptors for corticotropin-releasing factor: no effect of vasopressin on binding or activation of adenylate cyclase.* Neuroendocrinology 39 (1984) 162-169.

II-74. Lang RE, Heil JWE, Ganten D, Hermann K, Unger T, Rascher W *Oxytocin, unlike vasopressin, is a stress hormone in the rat.* Neuroendocrinology 37 (1983) 314-316.

II-75. Nakano J, Fisher RD *Studies on the cardiovascular effects of synthetic oxytocin.* J Pharm Exp Ther 142 (1963) 206-214.

II-76. Hendricks CH, Brenner WE *Cardiovascular effects of oxytocic drugs used postpartum.* Amer J Obstet Gynecol 108 (1970) 751-760.

II-77. Thompson EE, Freychet P, Roth J *Monoiodo-oxytocin: demonstration of its biological activity and specific binding to isolated fat cells.* Endocrinology 91 (1972) 1199-1205.

II-78. Altszuler N, Hampshire J *Oxytocin infusion increases plasma insulin and glucagon levels and glucose production and uptake in the normal dog.* Diabetes 30 (1981) 112-114.

II-79. Portanova R, Sayers G *Isolated pituitary cells: CRF-like activity of neurohypophyseal and related peptides.* Proc Soc Exp Biol Med 143 (1973) 661-666.

II-80. Lutz-Bucher B, Koch B, Briaud B, Mialhe C *Spécificité de l'action de la vasopressine au niveau de l'antéhypophyse du rat.* J Physiol, Paris 76 (1980) 243-247.

II-81. Gibbs DM, Vale W, Rivier J, Yen SSC *Oxytocin potentiates the ACTH-releasing activity of CRF-41 but not vasopressin.* Life Sci 34 (1984) 2245-2249.

- II-82. Gibbs DM *Immunoneutralization of oxytocin attenuates stress-induced corticotropin secretion in the rat.* Regulat Peptides 12 (1985) 273-277.
- II-83. Gibbs DM *Stress-specific modulation of ACTH secretion by oxytocin.* Neuroendocrinology 42 (1986) 456-458.
- II-84. Legros JJ, Chiodera P, Demey-Ponsart E *Inhibitory influence of exogenous oxytocin on adrenocorticotropin secretion in normal human subjects.* J Clin Endocrinol Metab 55 (1982) 1035-1039.
- II-85. Gibbs D *High concentrations of oxytocin in hypophysial portal plasma.* Endocrinology 114 (1984) 1216-1218.
- II-86. Horn AM, Robinson IC, Fink G *Oxytocin and vasopressin in rat hypophysial portal blood: experimental studies in normal and Brattleboro rats.* J Endocrinol 104 (1985) 211-224.
- II-87. Sarkar DK, Gibbs DM *Cyclic variation of oxytocin in the blood of pituitary portal vessels of rats.* Neuroendocrinology 39 (1984) 481-483.
- II-88. Vandesande F, Dierickx K, De Mey J *The origin of vasopressinergic and oxytocinergic fibers of the external region of the median eminence of the rat hypophysis.* Cell Tissue Res 180 (1977) 443-452.

- II-89. Bulet A, Chateau M, Czernichow P *Infundibular localization of vasopressin, oxytocin, and neurophysins in the rat: its relationship with corticotrope function.* Brain Res 168 (1979) 275-286.
- II-90. Sokol HW, Zimmerman EA, Sawyer WH, Robinson AG *The hypothalamo-neurohypophysial system of the rat: localization and quantification of neurophysin by light microscopic immunocytochemistry in normal rats and in Brattleboro rats deficient in vasopressin and a neurophysin.* Endocrinology 98 (1976) 1176-1188.
- II-91. Robinson AG, Seif SM, Verbalis JG, Brownstein MJ *Quantitation of changes in the content of neurohypophyseal peptides in hypothalamic nuclei after adrenalectomy.* Neuroendocrinology 36 (1983) 347-350.
- II-92. Richardson US, Schonbrunn A *Inhibition of adrenocorticotropin secretion by somatostatin in pituitary cells in culture.* Endocrinology 108 (1981) 281-289.
- II-93. Heisler S, Reisine TD, Hook VYH, Axelrod J *Somatostatin inhibits multireceptor stimulation of cyclic AMP formation and corticotropin secretion in mouse pituitary tumor cells.* Proc Natl Acad Sci USA 79 (1982) 6502-6506.
- II-94. Tyrell JB, Lorenzi M, Gehrich JE, Forsham PH *Inhibition by somatostatin of ACTH secretion in Nelson's syndrome.* J Clin Endocrinol Metab 40 (1975) 1125-1127.
- II-95. Fehm HL, Voigt KH, Beinert KE, Raptis S, Pfeiffer EF *Somatostatin: a potent inhibitor of ACTH hypersecretion in adrenal insufficiency.* Klin Wochensh 54 (1976) 173-175.

II-96. Taché Y, Du Ruisseau P, Ducharme JR, Collu R *Pattern of adenohipophyseal hormone changes in male rats following chronic stress*. *Neuroendocrinology* 26 (1978) 208-219.

II-97. Schalch DS, Reichlin S *Stress and growth hormone release*. In: Pecile A, Müller EE (Eds) **Growth Hormone**. Excerpta Medica, Amsterdam, 1968; p. 211.

II-98. Arimura A, Smith WD, Schally AV *Blockade of the stress-induced decrease in blood GH by anti-somatostatin serum in rats*. *Endocrinology* 98 (1976) 540-543.

II-99. Terry LC, Willoughby JO, Brazeau P, Martin JB, Patel Y *Antiserum to somatostatin prevents stress-induced inhibition of growth hormone secretion in the rat*. *Science* 192 (1976) 565-567.

II-100. Hökfelt T, Efendic S, Hellerström C, Johansson O, Luft R, Arimura A *Cellular localization of somatostatin in endocrine-like cells and neurons of the rat with special reference to the A1 cells of the pancreatic islets and to the hypothalamus*. *Acta Endocrinol* 80 Suppl 200 (1975) 5-41.

II-101. Rivier C, Vale W *Involvement of corticotropin-releasing factor and somatostatin in stress-induced inhibition of growth hormone secretion in the rat*. *Endocrinology* 117 (1985) 2478-2482.

II-102. Moldow RL, Hollander CS *Opiate peptide modulate somatostatin release from dispersed hypothalamic cells*. *Peptides* 2 (1981) 489-492.

II-103. Franco-Bourland RE, Fernström JD *In vivo biosynthesis of L-[35S]Cys-arginine vasopressin, -oxytocin, and -somatostatin: rapid estimation using reversed phase high pressure liquid chromatography.* Endocrinology 109 (1981) 1097-1106.

II-104. Paxinos G, Watson C **The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates.** Academic Press, Sidney, 1986.

II-105. David S, Kalyankar GD *Influence of adrenalectomy on vitamin B6 status.* Experientia 39 (1983) 329.

II-106. Bray GA *A simple efficient liquid scintillator for counting aqueous solutions in a liquid scintillation counter.* Anal Biochem 1 (1960) 279-285.

II-107. Hirs CHW *Reduction and S-carboxymethylation of proteins.* In: Hirs CHW (Ed) **Methods in Enzymology, XI, Enzyme Structure,** Academic Press, New York, 1967; pp. 199-203.

II-108. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ *Protein measurement with the Folin phenol reagent.* J Biol Chem 193 (1951) 265-275.

II-109. Verbalis JG, Robinson AG *Characterization of neurophysin-vasopressin prohormones in human posterior pituitary tissue.* J Clin Endocrinol Metab 57 (1983) 115-123.

- II-110. Cupo A, Rougon-Rapuzzi G, Delaage MA *Immunochemical detection of vasopressin precursors: artificial processing and quantification along the hypothalamo-hypophysial axis.* Eur J Biochem 115 (1981) 169-174.
- II-111. Guzek JW, Olczak S, Stempniak B *The hypothalamic and neurohypophysial oxytocic activities in stressed rats: independence from beta-adrenergic blockade.* Exp Clin Endocrinol 84 (1984) 331-337.
- II-112. Stephenson FA, Rogol AD *Oxytocin: anti-insulin-like effects in isolated fat cells.* Arch Biochem Biophys 234 (1984) 230-234
- II-113. Hanif K, Goren HJ, Hollenberg MD, Lederis K *Oxytocin action. Mechanisms for insulin-like activity in isolated rat adipocytes.* Molec Pharmacol 22 (1982) 381-388.
- II-114. Holmes MC, Antoni FA, Aguilera G, Catt KJ *Magnocellular axons in passage through the median eminence release vasopressin.* Nature 319 (1986) 326-329.
- II-115. Zimmerman EA, Robinson AG *Hypothalamic neurons secreting vasopressin and neurophysin.* Kidney Int 10 (1976) 12-24.
- II-116. Krisch B *Altered pattern of vasopressin distribution in the hypothalamus of rats subjected to immobilization stress. An immunohistochemical study.* Cell Tissue Res 189 (1978) 267-275.
- II-117. Krisch B *Indication for a granule-free form of vasopressin in immobilization-stressed rats.* Cell Tissue Res 197 (1979) 95-104.

II-118. Aguila MC, Pickle RL, Yu WH, McCann SM *Roles of somatostatin and growth hormone releasing factor in ether stress inhibition of growth hormone release.*

Neuroendocrinology 54 (1991) 515-520.

II-119. Kovács K, Kiss JZ, Makara GB *Glucocorticoid implants around the hypothalamic paraventricular nucleus prevent the increase of corticotropin-releasing factor and arginine vasopressin immunostaining induced by adrenalectomy.* Neuroendocrinology 44 (1986) 229-234.

II-120. Kovács KJ, Földes A, Sawchenko PE *Glucocorticoid negative feedback selectively targets vasopressin transcription in parvocellular neurosecretory neurons.* J Neurosci 20 (2000) 3843-3852.

II-121. Femini MG, Grillo CA, Piroli G, de Kloet ER, De Nicola AF *Sex difference in glucocorticoid regulation of vasopressin mRNA in the paraventricular hypothalamic nucleus.* Cell Mol Neurobio 17 (1997) 671-686.

II-122. Viau V, Chu A, Soriano L, Dallman MF *Independent and overlapping effects of corticosterone and testosterone on corticotropin-releasing hormone and arginine vasopressin mRNA expression in the paraventricular nucleus of the hypothalamus and stress-induced adrenocorticotrophic hormone release.* J Neurosci 19 (1999) 6684-6693.

II-123. Gainer H, Same Y, Brownstein MJ *Biosynthesis and axonal transport of rat neurohypophysial proteins and peptides.* J Cell Biol 73 (1977) 366-381.



II-124. Schwartz J, Keil LC, Maselli J, Reid IA *Role of vasopressin in blood pressure regulation during adrenal insufficiency.* Endocrinology 112 (1983) 234-238.

II-125. Linas SL, Berl T, Robertson GL, Aisenbrey GA, Schrier RW *Role of vasopressin in the impaired water excretion of glucocorticoid deficiency.* Kidney Int 18 (1980) 58-67.

II-126. Mandell IN, DeFronzo RA, Robertson GL, Forrest Jr JN *Role of plasma arginine vasopressin in the impaired water diuresis of isolated glucocorticoid deficiency in the rat.* Kidney Int 17 (1980) 186-195.

II-127. Boykin J, DeTorrente A, Erickson A, Robertson G Schrier RW *Role of plasma vasopressin in impaired water excretion of glucocorticoid deficiency.* J Clin Invest 62 (1978) 738-744.

## Publicaciones

### Artículo

- 1. **Franco-Bourland RE**

Vasopressinergic, oxytocinergic, and somatostatinergic neuronal activity after adrenalectomy and immobilization stress. *Neurochemical Res* 23 (1998) 699-705.

- Resúmenes en memorias de congresos internacionales

- 1. **Franco-Bourland RE**

Effect of adrenalectomy and immobilization stress on the biosynthesis *in vivo* of L-[<sup>35</sup>S]Cys-labeled vasopressin, oxytocin, and somatostatin in the hypothalamus, and their accumulation in the neurohypophysis of the rat. In: Moody TW (Ed.) *Neural and Endocrine Peptides and Receptors '85* Washington D.C., 1985; Abstr 150

- 2. **Franco-Bourland RE**

In vivo biosynthesis of hypothalamic L-[<sup>35</sup>S]Cys-vasopressin, -oxytocin, and -somatostatin in adrenalectomized and stressed rats. In: *Abstracts of the 13<sup>th</sup> International Congress of Biochemistry*. Elsevier, Utrecht, 1985; p. 73

- Resúmenes en memorias de congresos nacionales

- 1. **Franco-Bourland RE, Gitler-Goldwain M**

Efecto del estrés crónico sobre la biosíntesis *in vivo* de vasopresina, oxitocina y somatostatina (Addendum). XIV Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Bioquímica. Guadalajara, Jal., México; Noviembre 7-12, 1982.

➤ 2. **Franco-Bourland RE** (Patrocinador: A. Huberman)

Efecto del stress agudo sobre la biosíntesis de vasopresina, oxitocina y somatostatina,  
p. 132. XXVI Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas.

Colima, Col., México; Julio 17-21, 1983.

## Vasopressinergic, Oxytocinergic, and Somatostatinergic Neuronal Activity after Adrenalectomy and Immobilization Stress\*

Rebecca E. Franco-Bourland<sup>1</sup>

(Accepted August 19, 1997)

Twenty days after bilateral adrenalectomy (ADX) or immediately after the last of three 6-h long immobilization periods, the levels of hypothalamic and neurohypophyseal L-[<sup>35</sup>S]Cys-labeled arginine vasopressin (AVP), oxytocin (OT), and somatostatin-14 (SRIF) (only stressed animals) were measured simultaneously in male Wistar rats, after third ventricular administration of the labeled precursor, via guide-cannulae. The acetic acid-extracted labeled peptide fractions were purified by two sequential HPLC-steps. After a 4 h period of labeling, only L-[<sup>35</sup>S]Cys-AVP was selectively increased in the hypothalami of ADX-ized rats, compared to the sham-operated animals, possibly reflecting a significant activation of the paraventricular parvocellular (PVC) AVP/corticotropin-releasing factor (CRF) neurons. The increased accumulation of neurohypophyseal L-[<sup>35</sup>S]Cys-labeled AVP and OT in these animals, without changes in the endogenous levels of these peptides, as measured by UV absorbance, also suggests a moderate activation of the magnocellular (MGC) AVP and OT neurons, as a consequence of adrenal insufficiency. In response to immobilization stress, levels of L-[<sup>35</sup>S]Cys-OT were selectively increased in the hypothalami and corresponding neurohypophyses, 2 h and 4 h after receiving the label, concomitantly with a statistically significant reduction in the stores of OT in the neural lobes. AVP and SRIF biosynthesis remained unaffected by immobilization; the neurohypophyseal AVP stores likewise remained unchanged. These observations suggest the selective activation of MGC-OT neurons in response to chronic immobilization stress. Selective increases in hypothalamic L-[<sup>35</sup>S]Cys-AVP in ADX-ized rats, and in hypothalamic L-[<sup>35</sup>S]Cys-OT in chronically stress-immobilized rats, are presented as a measure of PVC-AVP/CRF and MGC-OT neuronal activation, respectively.

**KEY WORDS:** Adrenal insufficiency; chronic stress; vasopressin; oxytocin; somatostatin; neuropeptide biosynthesis; hypothalamus; neurohypophysis.

### INTRODUCTION

There is experimental evidence that suggests, that in the rat, hypothalamic arginine vasopressin (AVP) (1-3), oxytocin (OT) (1-4), and somatostatin-14 (SRIF) (5-

7) are multifunctional stress hormones, which are selectively released in response to specific stressful stimuli [ether inhalation (1,2), exposure to a novel environment (2), exposure to cold (1), immobilization stress (1,3), swimming stress (3), surgical stress (8), tail-hang (2,4)] or adrenalectomy (ADX) (9-11). These neuropeptides may be released into the bloodstream, possibly to control the altered metabolism of various organs during stress (12,13); they may be released into the hypophyseal portal system, to regulate the secretion of adnohypophyseal

<sup>1</sup> Department of Biochemistry, Instituto Nacional de la Nutrición, Salvador Zubirán, Vasco de Quiroga #15, 14000 México, D. F., México. Telephone: (525) 5731200, extension 2607; FAX: (525) 6550011

\* Special issue dedicated to Dr. Richard J. Wurtman.

hormones such as the adrenocorticotrophic hormone (ACTH) (5,14) or growth hormone (GH) (6,7); and they may be released in the brain, to modulate centrally mediated adaptive functions (15,16), including pain perception (17,18).

It is noteworthy, that no attempt has been made to quantify in fully awake, freely moving animals the levels of biosynthesis of AVP, OT, and SRIF in the hypothalami of ADX-ized or stress-immobilized rats, as a measure of the state of activation of the corresponding neurons, aside from the study of Russel et al. (19), who measured levels of accumulation of *in vivo* labeled AVP and OT in the neurohypophyses of anesthetized, ADX-ized rats. The purpose of the present work was to develop a method to assess the extent of stimulation of vasopressinergic, oxytocinergic, and somatostatinergic neurons in response to manipulations of the hypothalamo-neurohypophyseal-adrenal axis, by simultaneously measuring the *in vivo* biosynthesis of L-[<sup>35</sup>S]Cys-labeled AVP, OT, and SRIF in the hypothalami, and their accumulation in the neurohypophyses of non-anesthetized, freely moving ADX-ized and stress-immobilized rats.

The method involves the intracranial implantation of guide-cannulae for third ventricular administration of the radioactive precursor into the hypothalami of fully awake rats 20 days after bilateral ADX or immediately after the last of three 6h-long immobilization sessions, followed by the purification and quantitation of the labeled peptides by high pressure liquid chromatography (HPLC) and liquid scintillation, respectively. Endogenous neurohypophyseal AVP and OT are measured by UV absorbance.

## EXPERIMENTAL PROCEDURE

**Animals.** Male Wistar rats (180–200 g body weight (BW)) bred at the Institute, were caged in pairs and kept under controlled conditions in the laboratory (22°C, natural light), where they were observed for 2 weeks prior to any experimental manipulation. At the end of this period, those rats that weighed 240–260 g were selected for experimentation. From then on, rats were kept in individual cages. Food and water (supplemented with a standard vitamin preparation) were provided *ad libitum*.

**Intracranial Implantation of Guide-Cannulae.** The intracranial implantation of guide-cannulae directed to the III ventricle was performed using a Kopf stereotactic instrument (Tujunga, CA, USA). For this procedure, rats were anesthetized with 10 mg/kg BW xylazine-HCl (Bayer, México), followed by 80 mg/kg ketamine (Parke-Davis, México), both given *im*, with a 10 min interval. With the rat's nose placed 2.4 mm below the interaural line (20), a custom made 21-gauge stainless steel guide-cannula, 1.60–1.65 cm long, was implanted 0.60–0.65 cm into each rat using the following coordinates, Bregma reference: P-1.9, L-0.0, V-6.5 mm. The guide-cannulae had indwelling stainless steel stylettes, 1 mm longer than the cannulae, in order to

protect the patency of the tubes which in turn were held, centered in a teflon stop (1 cm long and 0.5 cm in diameter). Cannulae were fixed with autopolymerizable dental acrylic. At the end of the surgical procedure, rats received 150,000 U penicillin *im*. Rats were allowed to recover (regain their original weight) from surgery for at least 8 days before any further experimental manipulation.

**Adrenalectomy.** Under deep anesthesia (as described above), and a minimum of 8 days after guide-cannulae implantation, rats were either bilaterally ADX-ized or sham-ADX-ized (control). ADX was performed using a dorsal approach. Sham-ADX was performed using the same approach, only that after identification of the adrenals, the glands were left undisturbed and intact on each side. After ADX or sham-ADX, rats were given 150 000 U penicillin *im*. ADX-ized rats were maintained on 0.9% NaCl to correct for aldosterone insufficiency. The standard vitamin preparation added to the drinking water of all experimental animals corrected for the loss of vitamin B<sub>6</sub> of ADX-ized rats (21), which helped minimize abnormalities due to diuresis, negative nitrogen balance, increased excretion of ammonium and urea, electrolyte imbalance, and reduced aminotransferase activity.

In order to ensure more homogenous basal hormonal and metabolic conditions in the brains of the ADX-ized rats, experiments were performed on them 20 days after the bilateral removal of their adrenals, allowing for their recovery from surgery, as well as for the complete depletion of adrenal gland hormones from their brains (21).

**Immobilization Stress.** At least 8 days after the intracranial implantation of guide-cannulae, a group of rats was subjected to intermittent immobilization stress for 3 consecutive days, 6h/day, in order to produce a chronic stress model (22). For this procedure, rats were strapped to grids. With this strategy, by day 3, rats were in an obvious state of severe chronic stress. They had become aggressive and were difficult to handle. Control rats with implanted guide-cannulae, were kept undisturbed under the same environmental conditions.

**Administration of the Label.** Twenty days after ADX or immediately after the last immobilization period, and under light ether anesthesia and stereotactic control, rats received in the III ventricle, 40μCi L-[<sup>35</sup>S]Cys (480 Ci/mmol, New England Nuclear Corp., Boston, MA, USA) in 1μl 0.9% NaCl, containing 10 mM dithiothreitol. The label was administered over a period of 3 min, via the guide cannula, using a 5 μl Hamilton syringe fixed to the stereotactic apparatus. ADX-ized or sham-ADX-ized rats were sacrificed after 4h; stressed rats were sacrificed after 2 h or 4 h.

**Neuropeptide Extraction and Purification.** L-[<sup>35</sup>S]Cys-AVP, -OT and -SRIF were acid-extracted from individual hypothalamic blocks (bound laterally by the hypothalamic sulci, anteriorly by the optic chiasm and anterior commissure, and posteriorly by the mammillary nuclei), and from individual neurohypophyses. Labeled hypothalamic neuropeptides were purified with 1 μg of each AVP (Vega Biotechnologies, Inc., Tucson, AZ, USA), OT (Vega Biotechnologies, Inc.), and SRIF (Sigma Chem. Co., St. Louis, MO, USA), added as chromatographic markers and carriers, to avoid losses and allow for recovery measurements; labeled neurohypophyseal peptides were copurified with endogenous AVP and OT, and 1 μg added SRIF.

Tissues were dissected within 2 min of killing, and were immediately homogenized in 4 ml of ice-cold 2M acetic acid (HOAc) in polypropylene tubes. Homogenates were centrifuged at 10,000 g for 1 h at 4°C. Pellets were reextracted. Supernatants were kept at 0°C overnight.

Clear tissue extracts were then applied onto wet (treated with isopropanol and washed thoroughly with water) C<sub>18</sub>-Sep Pak cartridges (Waters Associates, Milford, MA, USA). After washing the C<sub>18</sub> support with 3 ml of 2M HOAc, peptides were eluted in 9 ml of 40%

CH<sub>3</sub>CN in 2M HOAc. Eluates were lyophilized in a centrifugal evaporator.

Prepurified tissue extracts were further purified by 2 sequential reversed-phase HPLC steps (HPLC-I and HPLC-II), using an Altex 332 gradient chromatograph with a 420 microprocessor (Berkeley, CA, USA), equipped with a Bioanalytical Systems LC-23A column heater (West Lafayette, IN, USA), and a C<sub>18</sub>  $\mu$ Bondapak column (300  $\times$  4 mm, 10  $\mu$ m particle size) (Waters Associates), fitted with a Whatman CSK I guard column packed with CO:PELL:ODS (Whatman Inc., Clifton, NJ, USA).

HPLC-I was run at room temperature, using a 40-min linear gradient of 5–49% CH<sub>3</sub>CN (HPLC grade, Fisher Scientific Co., Fair Lawn, NJ, USA) in 5 mM triethylammonium formate, pH 4.5, at a flow rate of 2 ml/min. HPLC-II was run at 60°C, using a 60-min linear gradient of 10–60% CH<sub>3</sub>CN in 0.02M HOAc and 0.1% 1-hexanesulfonic acid, sodium salt (Eastman Kodak Co., Rochester, NY, USA) at a flow rate of 2 ml/min. Before mixing, aqueous salt solutions were filtered using 0.45  $\mu$  HA Millipore filters. Just before chromatography, solvent mixtures were degassed for 3 min by ultrasonication in vacuo.

Eluate UV absorbance was monitored at 206 nm with a LKB 2138 Uvicord S detector (Bromma, Sweden) equipped with an 8  $\mu$ l HPLC flow cell, and was recorded, and peaks integrated, using a Chromatopac C-R1A data processor (Shimadzu, Corp., Kyoto, Japan). Using the LKB Ultrarac, model 7000, peptide fractions collected from HPLC-I were pooled, lyophilized, and rechromatographed in HPLC-II for the final quantitation of the highly purified L-[<sup>35</sup>S]Cys-labeled neuropeptides by liquid scintillation of the fractions collected every 10 sec (300  $\mu$ l). The endogenous levels of neurohypophyseal AVP and OT were obtained from the 206 nm UV absorbance chromatographic patterns of individual labeled or non-labeled neurohypophyseal extracts. Endogenous levels of neurohypophyseal AVP and OT reported here for undisturbed male Wistar rats bred at the INNSZ, were obtained in the course of this study from  $n = 9/10$  neurohypophyses (patterns not shown), respectively. The endogenous neurohypophyseal levels of AVP and OT reported here for the ADX-ized and immobilized rats (and their corresponding controls) were obtained from UV absorbance profiles of the neurohypophyseal extracts processed for their simultaneous recovery with L-[<sup>35</sup>S]Cys-AVP and L-[<sup>35</sup>S]Cys-OT. (For the sake of clarity, the UV absorbance profiles were not superimposed on the radioactive chromatographic patterns).

The retention times for chromatographic peptide markers added to hypothalamic acid extracts and for endogenous neurohypophyseal peptides on HPLC-I, were constant throughout the study (chromatographic profiles not shown) and were (in min,  $n = 10$ ): AVP, 10.89  $\pm$  0.06; OT, 15.97  $\pm$  0.06; and SRIF, 24.06  $\pm$  0.11. The retention times of the peptides on HPLC-II from either HPLC-I purified hypothalamic or neurohypophyseal extracts were also constant throughout the study, and were (in min,  $n = 15$ ): AVP, 16.42  $\pm$  0.09; OT, 17.63  $\pm$  0.06; and SRIF, 29.53  $\pm$  0.23. At the end of the purification procedure, the recoveries of the peptides from either hypothalamic or neurohypophyseal tissues were comparable, and were for both (in %,  $n = 15$ ): AVP, 70.17  $\pm$  4.59; OT, 69.78  $\pm$  4.04, and SRIF, 82.57  $\pm$  3.68.

**Radioactivity Measurements.** Radioactivity associated with the peptide fractions (10 sec/300  $\mu$ l) obtained after HPLC-II, was measured by liquid scintillation using 5 ml of a dioxane-based scintillating solution for aqueous samples (23). Radioactivity determinations were made using a Packard Instruments liquid scintillation spectrometer, model 3330 (Downer Grove, IL, USA) with a counting efficiency for L-[<sup>35</sup>S]Cys of 70%. The yield of the labeled peptides from the hypothalamic and neurohypophyseal extracts was determined from the recovery of the carrier peptides added to the extracts at the start of the

extraction procedure and determined from the corresponding UV absorbance chromatographic profiles, obtained at 206 nm. The content of endogenous neurohypophyseal AVP and OT were also determined from the UV absorbance chromatographic profiles obtained at 206 nm.

**Statistical Analyses.** Experimental results are expressed as the mean  $\pm$  standard deviation. Statistical analyses were performed using Student's *t* test.

## RESULTS

**Effect of Adrenalectomy.** Fig. 1 shows representative L-[<sup>35</sup>S]Cys chromatographic patterns (in dpm), obtained by HPLC-II, of purified L-[<sup>35</sup>S]Cys-AVP and L-[<sup>35</sup>S]Cys-OT from individual hypothalamic blocks and their corresponding individual neurohypophyses, from ADX-ized and control (sham-ADX-ized) rats, 4 h after the administration in the III ventricle of 40  $\mu$ Ci of the labeled precursor.

Fig. 2 shows the mean  $\pm$  standard deviation levels (in dpm) of L-[<sup>35</sup>S]Cys-AVP and L-[<sup>35</sup>S]Cys-OT in individual hypothalamic blocks and corresponding individual neurohypophyses of ADX-ized ( $n = 3$ ) and control (sham-ADX-ized) ( $n = 3$ ) rats, obtained from radioactive chromatographic patterns similar to those depicted in Fig. 1, and corrected for recovery. In the hypothalami from ADX-ized animals, the levels of labeled AVP were more than double those found in the sham-ADX-ized rats ( $p < 0.05$ ), while the levels of labeled OT remained unchanged. The levels of accumulation of both L-[<sup>35</sup>S]Cys-AVP and L-[<sup>35</sup>S]Cys-OT in the corresponding neurohypophyses from ADX-ized rats were significantly greater ( $p < 0.05$  and  $p < 0.01$ , respectively), than those found in the corresponding neurohypophyseal glands from the control group.

The content of endogenous neurohypophyseal AVP and OT, calculated from the UV absorbance chromatographic profiles associated to the radioactive chromatographic patterns, similar to those shown in Fig. 1 (for clarity, the corresponding UV absorbance profiles generated in the course of purification of the neurohypophyseal extracts were not superimposed on the radioactive patterns), were not affected by ADX. AVP content in the glands from controls (sham-ADX-ized) and from ADX-ized animals was 1.38  $\pm$  0.16  $\mu$ g/gland, and 1.67  $\pm$  0.02  $\mu$ g/gland, respectively; OT content in the control rats was 1.24  $\pm$  0.16  $\mu$ g/gland and 1.53  $\pm$  0.14  $\mu$ g/gland in the ADX-ized rats. All four values are within the concentration range of stored AVP and OT found in individual neurohypophyses of undisturbed male Wistar rats bred at the INNSZ, namely, 1.41  $\pm$  0.15,  $n = 10$  for AVP, and 1.29  $\pm$  0.11,  $n = 9$  for OT (UV chromatographic patterns from which

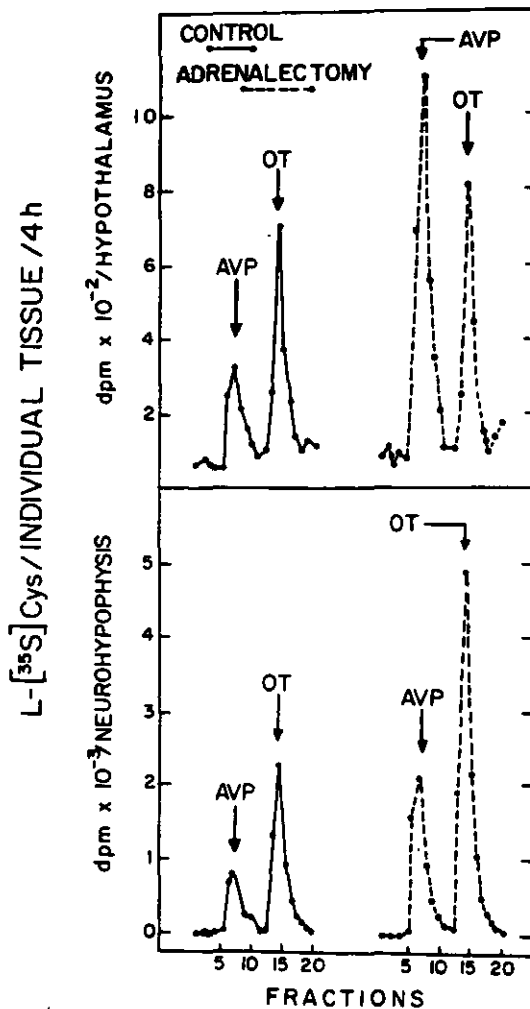


Fig. 1. HPLC-II L-[<sup>35</sup>S]Cys radioactive profiles of individual hypothalamic and neurohypophyseal extracts of control (sham-ADX-ized) and ADX-ized rats. Arrows point to the elution positions of the peptide chromatographic markers added to the hypothalamic extracts, or the endogenous peptides of the neurohypophyseal extracts monitored by UV absorbance (for the sake of simplicity absorbance chromatographic profiles were not superimposed).

these values were obtained, were generated in the course of this study, but are not shown).

**Effect of Immobilization Stress.** The 3-day regimen of intermittent stress by immobilization lowered the BW of stressed rats ( $n = 6$ ) by 15.5% ( $p < 0.05$ ) from 279.8  $\pm$  8.5 g to 234.5  $\pm$  7.5 g. During this time, the group of undisturbed control rats ( $n = 6$ ) gained 3.9% BW, from 250.7  $\pm$  13.1 g to 260.8  $\pm$  14.4 g, which was not significant. At autopsy, the adrenals from the stressed rats compared to controls were hypertro-

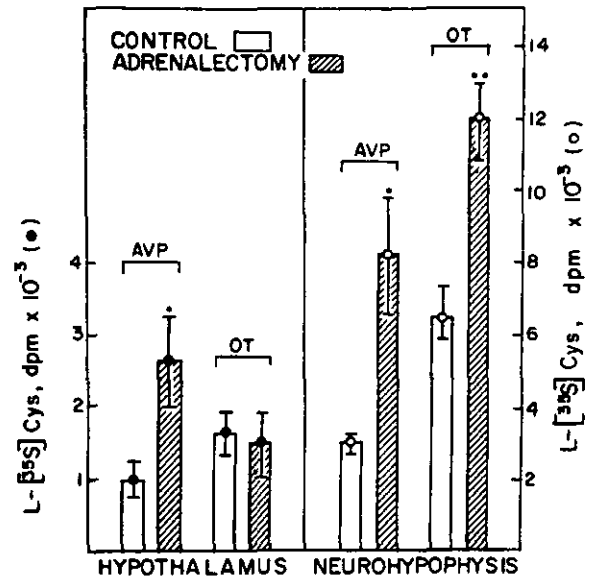


Fig. 2. Levels of L-[<sup>35</sup>S]Cys-AVP and L-[<sup>35</sup>S]Cys-OT in the individual hypothalami and corresponding neurohypophyses of control (sham-ADX-ized) ( $n = 3$ ) and ADX-ized ( $n = 3$ ) rats. Measurements were made after HPLC II, from radioactive profiles similar to those shown in Fig. 1, and were corrected for recovery. Columns represent mean  $\pm$  standard deviation. ADX-ized vs. sham-ADX-ized: \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ .

phied by 28.1% ( $p < 0.05$ ): adrenals from control rats weighed 21.7  $\pm$  1.4 mg/pair/100 g BW, while those of stressed rats weighed 27.8  $\pm$  0.8 mg/pair/100 g BW.

Fig. 3 shows the levels of L-[<sup>35</sup>S]Cys-labeled AVP, OT, and SRIF in the hypothalami and corresponding neurohypophyses of control ( $n = 3$ ) and stressed rats ( $n = 3$ ), 2 h and 4 h after the administration of the label. These values were obtained from radioactive chromatographic profiles similar to those depicted in Fig. 1, and were corrected for recovery. At both times tested, the levels of hypothalamic L-[<sup>35</sup>S]Cys-AVP and L-[<sup>35</sup>S]Cys-SRIF in the stressed rats were not significantly different from those seen in control animals. Due to rapid axonal transport (24) of hypothalamic L-[<sup>35</sup>S]Cys-AVP down to the neurohypophysis, by 4 h the levels of this material in the hypothalamic blocks from control and stressed rats were reduced by half, compared to the levels seen at 2 h ( $p < 0.05$ ). Accordingly, 4 h after the administration of the label, levels of accumulation of labeled AVP in the neurohypophyses, had doubled the level observed at 2 h ( $p < 0.01$ ), and were similar for both control and stressed rats.

Hypothalamic levels of L-[<sup>35</sup>S]Cys-SRIF obtained at 4h, for both control and stressed rats, were only

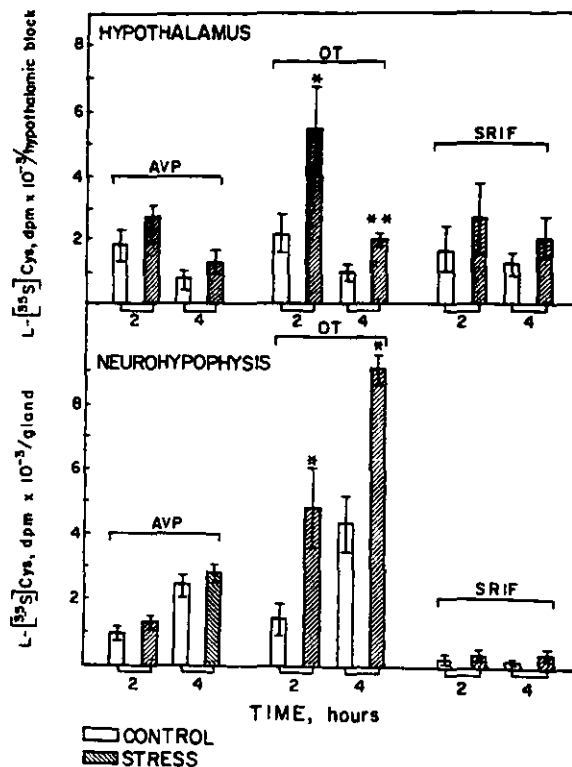


Fig. 3. Levels of L-[<sup>35</sup>S]Cys-labeled AVP, OT, and SRIF in the hypothalami and corresponding neurohypophyses of control (non-immobilized) and stress-immobilized rats. Measurements were made after HPLC II, from radioactive profiles similar to those shown in Fig. 1, and were corrected for recovery. Columns represent mean  $\pm$  standard deviation. Number of determinations for each time point and experimental group was  $n = 3$ . For OT, stress vs. control: \* $p < 0.05$ ; \*\* $p > 0.01$ .

slightly, but not significantly lower than those obtained 2 h after the administration of the label. The barely detectable levels of L-[<sup>35</sup>S]Cys-SRIF in the neurohypophyses, which have been proven not to be an artifact (25), were not significantly different between the stressed and the control rats 2 h or 4 h after the administration of the label.

Levels of L-[<sup>35</sup>S]Cys-OT in the hypothalami of the stressed rats were significantly higher at 2 h ( $p < 0.05$ ) and at 4 h ( $p < 0.01$ ), than those seen in the corresponding fractions from control rats. At 4 h, hypothalamic levels of L-[<sup>35</sup>S]Cys-OT were much lower than at 2 h ( $p < 0.01$ ), mainly because of the peptide's rapid transport (24) to the neural lobe. The levels of accumulation of the labeled OT in this gland in the stressed rats were double those found in control animals ( $p < 0.05$ ) at both time points studied; for both groups, levels obtained at 4 h roughly doubled those found at 2 h ( $p < 0.05$ ).

Measured in the same rats, from HPLC-II UV absorbance chromatographic profiles, and corrected for recovery, the levels of endogenous neurohypophyseal OT in the stressed rats were  $1.02 \pm 0.16 \mu\text{g/gland}$ , which were significantly lower than the control values of  $1.42 \pm 0.2 \mu\text{g/gland}$  ( $p < 0.05$ ). Endogenous AVP was not significantly different between the two groups, and was  $1.31 \pm 0.06 \mu\text{g/gland}$  for the control rats, and  $1.35 \pm 0.22 \mu\text{g/gland}$  for the stressed rats.

## DISCUSSION

*In Vivo Neuropeptide Labeling.* A method was developed for the simultaneous determination by HPLC of the *in vivo* biosynthesis of hypothalamic L-[<sup>35</sup>S]Cys-labeled AVP, OT, and SRIF in awake, freely moving rats. Guide-cannulae were implanted for the stereotactically controlled third ventricular administration of the label into lightly ether-anesthetized rats (who were unconscious for no longer than 5 min). Peptide labeling was measured 2 h or 4 h after receiving the labeled precursor. The third ventricular route of administration was chosen to simultaneously label MGC and parvocellular (PVC), AVP and OT neurons of the PVN (9), and the SRIF neurons in the periventricular nucleus (PEVN) (26).

The purification procedure of the L-[<sup>35</sup>S]Cys-labeled and endogenous neuropeptides included the pre-purification of individual hypothalamic and neurohypophyseal HOA<sub>2</sub>-tissue extracts tissue extracts on C<sub>18</sub>-Sep Pak cartridges, followed by two sequential HPLC steps, performed under very different chromatographic conditions, in order to achieve even greater levels of purity of the labeled and endogenous neuropeptides, than those reported previously for pooled tissue extracts, using gel filtration prior to one HPLC step (25). Recovery of the three labeled peptides from the hypothalamic and neurohypophyseal extracts was at least 70%.

*Effect of Adrenalectomy.* The radioactive chromatographic profiles of the hypothalamic extracts from the ADX-ized rats revealed enhanced levels of L-[<sup>35</sup>S]Cys-AVP, which were more than double those found in the control (sham-operated) group, but showed unchanged levels of L-[<sup>35</sup>S]Cys-OT. These enhanced levels of L-[<sup>35</sup>S]Cys-AVP in the hypothalamic extracts could reflect primarily the activation of PVC-AVP/corticotropin-releasing factor (CRF) neurons in the PVN. Enhanced levels of AVP-like immunoreactivity (9) and of AVP-mRNA (11) have been reported in the PVN of ADX-ized rats. Furthermore, Stillman et al. (10) have observed increased levels of immunoreactive AVP and



AVP-neurophysin, but not OT, in the external zone of the median eminence in ADX-ized rats (10), an area of the median eminence known to receive projections principally from the PVN (27). In fact, all these observations taken together are consistent with suggestions of a relationship between the regulation of corticotropic function and the activity of neurosecretory neurons in the PVN (27).

The increased levels of hypothalamic L-[<sup>35</sup>S]Cys-AVP may also be attributed, at least in part, to a response of the MGC-AVP neurons that show increased levels of accumulation of L-[<sup>35</sup>S]Cys-AVP in their corresponding nerve terminals in the neurohypophyses. Although unchanged in the hypothalami, the enhanced levels of accumulation of neurohypophyseal L-[<sup>35</sup>S]Cys-OT, also reported by Russell et al. (19), might also reflect the activation of MGC-OT neurons in response to adrenal insufficiency. The activation of the MGC-AVP and MGC-OT neurons, however, appears to be modest, insofar that it does not lead to any significant changes in the endogenous levels of these peptides in the posterior pituitary (measured from the UV absorbance chromatographic profiles [not shown], on which the radioactive chromatographic patterns shown in Fig. 1 are superimposed). These observations are in agreement with those of Stillman et al. (10), who saw no appreciable change in the immunostaining of AVP, OT, or neurophysin in the internal zone of the median eminence. Therefore, it is reasonable to assume that after ADX, AVP and OT are not released into the general circulation, so would not be expected to have a direct systemic effect, but instead act locally contributing to the alterations that occur in the brains of ADX-ized rats.

*Effects of Immobilization Stress.* Immobilization stress resulted in the activation of OT neurons, with no apparent change in the state of activity of either AVP or SRIF neurons. Two hours or 4 h after label administration, the levels of hypothalamic and neurohypophyseal L-[<sup>35</sup>S]Cys-OT were markedly elevated in the stressed rats compared to the undisturbed controls. Also, the content of endogenous OT in the neurohypophyses of the stressed animals was significantly diminished compared to that of controls, in agreement with Guzek et al. (28). Taken together, these observations suggest the selective activation of MGC-OT neurons in response to chronic immobilization stress, and support the role of OT as a stress hormone in the rat, unlike AVP, as proposed by Lang et al. (3). In fact, it has been shown here that rat hypothalamic AVP neurons remained unaffected by immobilization stress, as measured by their AVP biosynthetic capacity, neurohypophyseal accumulation of

L-[<sup>35</sup>S]Cys-AVP, and unchanged levels of endogenous AVP in the neurohypophysis. Moreover, Gibbs has shown the selective roles of OT and AVP in the modulation of CRF secretion (1) in response to different types of stress, including immobilization stress, as well as its role in the modulation of ACTH secretion in tail-hung rats (4). Gibbs has further proposed that the inhibition of GH secretion under stress, could be attributed to the enhanced release of OT in the hypophyseal portal system during acute immobilization stress (1,2,4), rather than an enhanced release of SRIF, which might in part explain the lack of response to stress of the somatostatinergic neurons observed here. This OT could originate in a population of PVC-OT neurons (29) with axons in the external zone of the median eminence (30), whose biosynthetic capacity in response to immobilization stress would thus be expected to be enhanced. If so, in the stress-immobilized rats described here, this population of cells would contribute to the enhanced levels of hypothalamic L-[<sup>35</sup>S]Cys-OT. However, it is also possible, that this OT is secreted in the median eminence from the Herring bodies (31) of the axons of the stress-activated MGC-OT neurons.

In conclusion, we have shown the possibility of determining the activity of AVP, OT, and SRIF neurons in the brains ADX-ized and stress-immobilized rats by measuring their levels of L-[<sup>35</sup>S]Cys-AVP, -OT, and -SRIF biosynthesis in individual hypothalamic blocks and their corresponding individual neurohypophyses, as well as by measuring the endogenous levels of neurohypophyseal AVP and OT. L-[<sup>35</sup>S]Cys-AVP was significantly increased in the hypothalami of ADX-ized rats, without significant changes in the endogenous neurohypophyseal levels of AVP. In conjunction with citations from the literature, it is proposed, that this increase reflects the activation of PVC AVP/CRF neurons in the PVN. In chronically stress-immobilized rats, L-[<sup>35</sup>S]Cys-OT biosynthesis was selectively enhanced, and the endogenous neurohypophyseal levels of OT significantly reduced, suggesting its release into the general circulation. These observations reveal the selective activation of MGC-OT neurons in response to chronic stress, and support its role as a stress hormone.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, grant PCCBBNA-001716. I am grateful to Miriam Gitler for her assistance in the stress experiment.

## REFERENCES

1. Gibbs, D. M. 1984. Dissociation of oxytocin, vasopressin, and corticotropin secretion during different types of stress. *Life Sci.* 35:487-492.
2. Gibbs, D. M. 1986. Stress-specific modulation of ACTH secretion by oxytocin. *Neuroendocrinology* 42:456-458.
3. Lang, R. E., Heil, J. W. E., Ganten, D., Hermann, K., Unger, T., and Rascher, W. 1983. Oxytocin, unlike vasopressin, is a stress hormone in the rat. *Neuroendocrinology* 37:314-316.
4. Gibbs, D. M. 1985. Immunoneutralization of oxytocin attenuates stress-induced corticotropin secretion in the rat. *Regulat. Peptides* 12:273-277.
5. Richardson, U. I., and Schonbrunn, A. 1981. Inhibition of adrenocorticotropin secretion by somatostatin in pituitary cells in culture. *Endocrinology* 108:281-289.
6. Rivier, C., and Vale, W. 1985. Involvement of corticotropin-releasing factor and somatostatin in stress-induced inhibition of growth hormone secretion in the rat. *Endocrinology* 117:2478-2482.
7. Terry, L. C., Willoughby, J. O., Brazeau, P., Martin, J. B., and Patel, Y. 1976. Antiserum to somatostatin prevents stress-induced inhibition of growth hormone secretion in the rat. *Science* 192:565-567.
8. Gibbs, D. M. 1984. High concentrations of oxytocin in hypophysial portal plasma. *Endocrinology* 114:1216-1218.
9. Sawchenko, P. E., Swanson, L. W., and Vale, W. W. 1984. Co-expression of corticotropin-releasing factor and vasopressin immunoreactivity in parvocellular neurosecretory neurons of the adrenalectomized rat. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 81:1883-1887.
10. Stillman, M. A., Recht, L. D., Rosario, S. L., Seif, S. M., Robinson, A. G., and Zimmerman, E. A. 1977. The effects of adrenalectomy and glucocorticoid replacement on vasopressin and vasopressin-neurophysin in the zona externa of the median eminence of the rat. *Endocrinology* 101:42-49.
11. Wolfson, B., Manning, R. W., Davis, L. G., Arentzen, R., and Baldino, Jr., F. 1985. Co-localization of corticotropin releasing factor and vasopressin mRNA in neurons after adrenalectomy. *Nature* 315:59-61.
12. Dunning, B. E., Moltz, J. H., and Fawcett, C. P. 1984. Actions of neurohypophysial peptides on pancreatic hormone release. *Amer. J. Physiol.* 246:E108-E114.
13. Goren, H. J., Okabe, T., Lederis, K., and Hollenberg, M. D. 1984. Oxytocin stimulates glucose oxidation in rat thymocytes. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* 27:461-463.
14. Vale, W., Vaughan, J., Smith, M., Yamamoto, G., Rivier, J., and Rivier, C. 1982. Effects of synthetic ovine CRF, glucocorticoids, catecholamines, neurohypophysial peptides and other substances on cultured corticotropin cells. *Endocrinology* 113:1121-1131.
15. Plotsky, P. M., Bruhn, T. O., and Vale, W. 1984. Central modulation of immunoreactive corticotropin-releasing factor secretion by arginine vasopressin. *Endocrinology* 115:1639-1641.
16. Plotsky, P. M., Bruhn, T. O., and Otto, S. 1985. Central modulation of immunoreactive arginine vasopressin and oxytocin secretion into the hypophysial-portal circulation by corticotropin-releasing factor. *Endocrinology* 116:1669-1671.
17. Morley, J. S. 1985. Peptides in nociceptive pathways. Pages 65-91, in Lipton, S., and Miles, J. (eds.), *Persistent pain*. Vol. 5, Chap. 3, Grune and Stratton, Ltd., London.
18. Madrazo, I., Franco-Bourland, R. E., León-Meza, V. M., Mena, I. 1987. Intraventricular somatostatin-14, arginine-vasopressin, and oxytocin: analgesic effect in a patient with intractable cancer pain. *Appl. Neurophysiol.* 50:427-431.
19. Russell, J. T., Brownstein, M. J., and Gainer, H. 1980. [<sup>35</sup>S]cysteine labeled peptides transported to the neurohypophyses of adrenalectomized, lactating, and Brattleboro rats. *Brain Res.* 201:227-234.
20. Paxinos, G., and Watson, C. 1982. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press, Sidney.
21. David, S., and Kalyankar, G. D. 1983. Influence of adrenalectomy on vitamin B<sub>6</sub> status. *Experientia* 39: 329.
22. Taché, Y., Du Ruisseau P., Ducharme, J. R., Collu, R. 1978. Pattern of adeno-hypophysial hormone changes in male rats following chronic stress. *Neuroendocrinology* 26:208-219.
23. Bray, G. A. 1960. A simple efficient liquid scintillator for counting aqueous solutions in a liquid scintillation counter. *Anal. Biochem.* 1:279-285.
24. Robinson, A. G. 1978. Neurophysins, an aid to understanding the structure and function of the neurohypophysis. *Front. Neuroendocrinol.* 5:35-59.
25. Franco-Bourland, R. E., and Fernstrom, J. D. 1981. In vivo biosynthesis of L-[<sup>35</sup>S]Cys-arginine vasopressin, -oxytocin, and -somatostatin: rapid estimation using reversed phase high pressure liquid chromatography. *Endocrinology* 109:1097-1106.
26. Hökfelt, T., Efendic, S., Hellerström, C., Johansson O., Luft, R., and Arimura, A. 1975. Cellular localization of somatostatin in endocrine-like cells and neurons of the rat with special reference to the A<sub>1</sub>-cells of the pancreatic islets and to the hypothalamus. *Acta Endocrinol.* 80: Suppl. 200:5-41.
27. Krieger, D. T. and Zimmerman E. A. 1977. The nature of CRF and its relationship to vasopressin. Pages 363-391, in Martini, L., and Besser, G. M. (eds.), *Clinical Neuroendocrinology*. Academic Press, New York.
28. Guzek, J. W., Olczak, S., and Stempniak, B. 1984. The hypothalamic and neurohypophysial oxytocic activities in stressed rats: independence from beta-adrenergic blockade. *Exp. Clin. Endocrinol.* 84:331-337.
29. Vandesande, F., Dierickx, K., and De Mey, J. 1977. The origin of vasopressinergic and oxytocinergic fibers of the external region of the median eminence of the hypophysis. *Cell Tissue Res.* 180: 443-452.
30. Zimmerman E. A. and Robinson, A. G. 1976. Hypothalamic neurons secreting vasopressin and neurophysin. *Kidney Int.* 10:12-24.
31. Holmes, M. C., Antoni, F. A., Aguilera, G., and Catt, K. J. 1986. Magnocellular axons in passage through the median eminence release vasopressin. *Nature* 319:326-329.