



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias

Profesor Patrocinante  
**Dr. Carlos González F.**  
Instituto de Fisiología  
Facultad de Medicina

**EXPRESIÓN DE ISOFORMAS DEL RECEPTOR V2 DE  
VASOPRESINA EN SISTEMA NERVIOSO CENTRAL**

Tesis de Grado presentada como parte  
de los requisitos para optar al grado de  
*Licenciado en Bioquímica* y Título  
Profesional de *Bioquímico*

**KARINA JAZMINA VARGAS BARRÍA**

**VALDIVIA – CHILE**

**2004**

## **AGRADECIMIENTOS**

Quisiera agradecer en primer lugar a mi profesor patrocinante Dr. Carlos González, por haber permitido la realización de mi tesis en su laboratorio y tener tanta paciencia a través de todo el tiempo que tomó su realización.

También, quisiera agradecer a Pepe, Carolina, Mauricio, Danae, Lida, Sra. Silvia, Charlie y Caro, todos compañeros del laboratorio de Fisiología, quienes me acompañaron a lo largo de este gran periodo de aprendizaje, ayudándome en todo lo que necesité. No puedo dejar de agradecer al Dr. Carlos Figueroa y a todo su laboratorio, en el cual encontré un gran apoyo.

Un agradecimiento especial es el que quiero dar a mi familia y a mis padres, Gloria y Héctor, quienes apoyaron todas mis decisiones, y permitieron que me alejara del hogar para realizar todos mis sueños.

Finalmente, quiero agradecer a mi amigo, mi compañero, mi pareja, el que camina conmigo y me da fuerzas a cada momento, cumple mis deseos, y calma mis penas, sin ti no lo hubiera hecho. A ti Guayec, gracias.

Este trabajo fue realizado en el Instituto de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile y financiado por el proyecto Fondecyt 1030261

## INDICE DE CONTENIDOS

		Página
	<b>INDICE</b>	i
	<b>INDICE DE FIGURAS</b>	iv
	<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	vi
<b>1.</b>	<b>RESUMEN</b>	<b>1</b>
	<b>SUMMARY</b>	<b>2</b>
<b>2.</b>	<b>INTRODUCCION</b>	<b>3</b>
<b>3.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>10</b>
<b>3.1.</b>	<b>MATERIALES</b>	<b>10</b>
3.1.1.	Reactivos	10
3.1.2.	Animales de experimentación	11
3.1.3.	Equipos	11
<b>3.2.</b>	<b>MÉTODOS</b>	<b>12</b>
3.2.1.	Amplificación mediante RT-PCR	12
3.2.1.1.	Diseño de partidores gen específicos	12
3.2.1.2.	Aislamiento de RNA total de riñón, cerebelo, tronco cerebral y corteza frontal cerebral	13
3.2.1.3	Electroforesis en geles de agarosa conteniendo formaldehído	14
3.2.1.4.	Tratamiento con DNAsa I	14
3.2.1.5.	Síntesis de cDNA a partir de mRNA total	15
3.2.1.6.	Amplificación del cDNA mediante PCR	15
3.2.2.	Clonamiento del cDNA del receptor V2 de vasopresina	16
3.2.2.1.	Purificación del fragmento amplificado	16
3.2.2.2.	Reacción de ligación en el vector pGEM-T	16
3.2.2.3.	Transformación y siembra de células competentes	17
3.2.2.4.	Preparación de DNA plasmidial en pequeña escala (minipreparaciones)	17

3.2.2.5.	Preparación de DNA plasmidial en mediana escala (midipreparaciones)	18
3.2.3.	Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS e inmunodetección	19
3.2.3.1.	Purificación de proteínas de membrana	19
3.2.3.2.	Electroforesis de proteínas de membrana y transferencia a membrana de nitrocelulosa	20
3.2.3.3.	Inmunodetección	20
3.2.4.	Inmunohistoquímica	21
3.2.4.1.	Anticuerpos usados para la técnica inmunohistoquímica	21
3.2.4.2.	Obtención de los cortes histológicos	21
3.2.4.3.	Desparafinación de los cortes histológicos	22
3.2.4.4.	Hidratación de los cortes histológicos	22
3.2.4.5.	Inmunodetección	23
3.2.4.6.	Deshidratación de los cortes	24
3.2.5.	Hibridación <i>in situ</i>	24
3.2.5.1.	Diseño de sonda V2	24
3.2.5.2.	Desparafinación de los cortes	25
3.2.5.3.	Hidratación de los cortes	25
3.2.5.4.	Pretratamiento de los cortes	26
3.2.5.5.	Hibridación de los cortes	27
3.2.5.6.	Lavado de los cortes	27
3.2.5.7.	Detección inmunológica	27
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>29</b>
4.1.	Amplificación mediante RT-PCR	29
4.1.1.	Diseño de partidores gen específicos	29
4.1.2.	Obtención de RNA total de distintos tejidos de rata	32
4.1.3.	Tratamiento con DNAsa I	32
4.1.4.	Amplificación mediante RT-PCR de receptores V2 de vasopresina	35
4.1.4.1.	Amplificación de receptores V2 desde riñón	35

4.1.4.2.	Amplificación de receptores V2 desde distintas zonas del sistema nervioso central	37
4.2.	Alineamiento de las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas deducidas	43
4.3.	Detección del mRNA del receptor V2 de vasopresina mediante hibridación <i>in situ</i>	43
4.4.	Inmunodetección de las isoformas del receptor V2 de vasopresina en cerebelo de rata en distintas etapas del desarrollo	48
4.4.1.	Caracterización del antisuero anti-receptor V2b	48
4.4.2.	Inmunodetección de la isoforma V2b del receptor de vasopresina	54
4.4.3.	Inmunodetección de la isoforma V2 del receptor de vasopresina	58
<b>5.</b>	<b>DISCUSION</b>	<b>63</b>
<b>6.</b>	<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>70</b>

## INDICE DE FIGURAS

		<b>Página</b>
Figura 1.	Esquema del gen del receptor V2 de vasopresina	30
Figura 2.	Posibles productos de amplificación por RT-PCR	31
Figura 3.	Electroforesis de RNA total de distintos tejidos de rata	33
Figura 4.	Control de la eficiencia del tratamiento con DNAsa I	34
Figura 5.	Reamplificación por RT-PCR de las isoformas de los receptores V2 de vasopresina desde riñón de rata	36
Figura 6.	Amplificación por RT-PCR de las isoformas de los receptores V2 de vasopresina desde riñón de rata	38
Figura 7.	Amplificación por RT-PCR de las isoformas del receptor V2 de vasopresina en cerebelo de rata	39
Figura 8.	Amplificación por RT-PCR de las isoformas del receptor V2 en tronco cerebral de rata	41
Figura 9.	Amplificación por RT-PCR de las isoformas del receptor V2 de vasopresina en corteza cerebral y riñón de rata	42
Figura 10.	Alineamiento de secuencia nucleotídica deducida para receptores V2 de vasopresina	45
Figura 11.	Alineamiento de secuencia aminoacídica deducida para receptores V2 de vasopresina	46
Figura 12.	Esquema de hibridación de sondas en el gen del receptor V2 de vasopresina	47
Figura 13.	Hibridación <i>in situ</i> del mRNA del receptor V2 de vasopresina en cerebelo de rata de 1 día	49
Figura 14.	Hibridación <i>in situ</i> del mRNA del receptor V2 de vasopresina en cerebelo de rata de 5 días.	50
Figura 15.	Hibridación <i>in situ</i> del mRNA del receptor V2 de vasopresina en cerebelo de rata de 15 días	51

Figura 16.	Hibridación <i>in situ</i> del mRNA del receptor V2 de vasopresina en cerebelo de rata de 30 días	52
Figura 17.	Hibridación <i>in situ</i> del mRNA del receptor V2 de vasopresina en cerebelo de rata de diferentes edades	53
Figura 18.	Identificación de la isoforma V <sub>2b</sub> del receptor V <sub>2</sub> de vasopresina mediante Western Blot en células MDCK	55
Figura 19.	Inmunolocalización de la isoforma V2b y del receptor V2 de vasopresina en secciones de cerebelo de rata de 1 día	56
Figura 20.	Inmunolocalización de la isoforma V2b y del receptor V2 de vasopresina en secciones de cerebelo de rata de 5 días	57
Figura 21.	Inmunolocalización de la isoforma V2b y del receptor V2 de vasopresina en secciones de cerebelo de rata de 15 días	59
Figura 22.	Inmunolocalización de la isoforma V2b y del receptor V2 de vasopresina en secciones de cerebelo de rata de 30 días	60
Figura 23.	Inmunolocalización de la isoforma V2b y del receptor V2 de vasopresina en secciones de cerebelo de rata de distintas edades	61

**LISTA DE ABREVIATURAS**

AB	Anticuerpo
AMPC	Adenosina monofosfato cíclico
Asn	Asparragina
AVP	Hormona Vasopresina
AVP (4-8)	Fragmento de Vasopresina 4-8
AVP (4-9)	Fragmento de Vasopresina 4-9
cDNA	DNA complementario
Cys	Cisteína
dATP	Desoxiadenosina trifosfato
dCTP	Desoxicitocina trifosfato
DDAVP	[ Diamino-Cys <sup>1</sup> , D-Arg <sup>8</sup> ] - Vasopresina
DEPC	Dietilpirocarbonato
dGTP	Desoxiguanosina trifosfato
DNAsa	Desoxirribonucleasa
DTT	Ditiotreitol
dTTP	Desoxitimidina trifosfato
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
GAPDH	Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa
GPCRs	Receptores acoplados a proteína G
G <sub>s</sub>	Proteína G estimulante
<sup>3</sup> H-AVP	Vasopresina marcada con tritio
IP <sub>3</sub>	Inositol trifosfato
MDCK	Línea celular derivada de epitelio renal de perro
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
NDI	Diabetes insípida nefrogénica
PKA	Proteína kinasa A
RNAsa	Ribonucleasa
RT-PCR	Transcripción reversa-Reacción en cadena de la polimerasa
V1a	Receptor V1a de Vasopresina

V1b	Receptor V1b de Vasopresina
V2a	Receptor V2a de Vasopresina
V2b	Receptor V2b de Vasopresina
V2b-GFP	Quimera receptor V2b-Proteína fluorescente verde

## 1. RESUMEN

La hormona vasopresina (AVP) es un nonapéptido que posee varias funciones biológicas como por ejemplo, inhibición de la diuresis, estimulación de la glicogenólisis y contracción de la musculatura lisa vascular. Estos efectos son ejercidos a través de la activación de receptores acoplados a proteína G. Tres subtipos de receptores de vasopresina han sido descritos según sus características funcionales y farmacológicas: V1a, V1b y V2. En riñón de rata se expresan dos productos alternativos del gen del receptor V2 de vasopresina. Una de estas variantes (V2b), posee una secuencia distinta a partir del dominio 7 de transmembrana respecto del receptor V2 canónico (V2a). Mediante RT-PCR se detectó el mRNA correspondiente a las isoformas V2a y V2b, y el transcrito primario del receptor V2 en corteza cerebral frontal, tronco cerebral y cerebelo de rata. La proporción aparente a través del tiempo de estas especies en los tejidos examinados difiere de la observada en forma cotidiana en tejido renal, en el cual es constante. A nivel cerebelar el mRNA del receptor V2 de vasopresina fue encontrado en células de Purkinje, y sufrió cambios dinámicos a través del tiempo. Un suero específico contra el extremo C-terminal del receptor V2b nos permitió detectar el receptor V2b en células de Purkinje de cerebelo. Mediante inmunotinción detectamos, en esta misma ubicación citológica, las dos isoformas del receptor V2 de vasopresina. Se observó un cambio dinámico a través del tiempo. Además al comparar los mismos estadios, la inmunodetección resultó más intensa para V2 (V2a+V2b) que para V2b, lo que concuerda con la expresión de las dos isoformas en las células de Purkinje.

## SUMMARY

Arginine-vasopressin (AVP) is a cyclic nonapeptide with different biological functions, namely, gluconeogenesis, vasoconstriction, and renal water reabsorption. AVP exerts its actions through binding to specific G protein-coupled receptors. Three distinct vasopressin receptor subtypes have been described on the basis of their functional and pharmacological properties: V1a, V1b and V2. Two alternative splicing products of the V2 vasopressin receptor gene are expressed in rat kidney. The shorter one (V2b) differs from the V2 vasopressin receptor canonical sequence (V2a) in the 7th transmembrane domain. Using RT-PCR, we detected V2a, V2b and V2-immature mRNA in rat brain frontal cortex, brain stem and cerebellum. The mRNAs transcription levels varied in an age-dependent manner in these tissues. These results differ from the obtained in rat kidney, where the studied mRNAs transcription levels remained constant. In rat cerebellum, V2 mRNA was found in Purkinje cells, and its expression changed dynamically through the developmental process. A specific serum against the C-tail of V2b receptor allowed detect this protein in cerebellum Purkinje cells. Also, the isoforms of vasopressin V2 receptor were detected in these cells using immunohistochemistry. The protein expression pattern resulted age-dependent. In addition, when compared the same stadiums, the immunodetection turned out to be more intense for V2 (V2a+V2b) than for V2b, which agrees with the expression of the two isoforms in Purkinje cells.

## 2. INTRODUCCIÓN

La hormona neurohipofiseal vasopresina es sintetizada principalmente por neuronas magnocelulares de los núcleos supraóptico y paraventricular del hipotálamo, donde se almacena en gránulos unida a polipéptidos de aproximadamente 95 aminoácidos, conocidos como neurofisinas. La liberación de vasopresina se produce por exocitosis calcio-dependiente, y es estimulada por un incremento en la presión osmótica efectiva del plasma (González y colaboradores, 1997).

Vasopresina es un péptido que consta de nueve aminoácidos. Un puente disulfuro entre los residuos de cisteína 1 y 6 da como resultado la formación de un péptido con una porción cíclica de seis aminoácidos y un extremo carboxilo terminal de tres aminoácidos. En el ser humano y la mayoría de los mamíferos placentarios, la hormona presenta arginina en la posición 8 de la cadena, [Arg<sup>8</sup>]-VP, por lo que se denomina arginina-vasopresina, AVP (Ferguson y Seller, 1965). Los receptores de vasopresina periféricos han sido clasificados sobre la base del sistema de segundos mensajeros que se acopla al receptor y a la afinidad por una serie de análogos cuya selectividad es mayor por un tipo de receptor que por otro (Jard y colaboradores, 1986).

Según este criterio, se han definido las siguientes isoformas del receptor de vasopresina: V1 o V1a, expresada en células de hígado, músculo liso vascular, plaquetas, cerebro y en casi todos los tejidos periféricos que expresan receptores de vasopresina; V3 o V1b, que se expresa en adenohipófisis; y V2, que lo hace en riñón y vesícula seminal (Jard y colaboradores, 1988).

La activación de las isoformas del receptor de vasopresina V1a y V1b resulta en la hidrólisis de fosfatidilinositol y la movilización de calcio intracelular. Vasopresina, por

acción mediada por el receptor V1a, produce la contracción de los vasos sanguíneos y estimula la glicógenolisis y regeneración hepática. La unión de la hormona a la isoforma V1b de su receptor, en cambio induce la secreción de la hormona adrenocorticotropina desde la pituitaria anterior (Antoni, 1984; Jard y colaboradores, 1986).

La activación de los receptores V2 de vasopresina es asociada con un incremento en la concentración intracelular de AMPc (Thibonnier, 1988). Esta isoforma del receptor se encuentra en células renales y media los efectos antidiuréticos de vasopresina (Klussmann, 2000).

La clonación molecular de las distintas isoformas del receptor de vasopresina ha confirmado que estos receptores pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteína G (GPCRs), consistente en proteínas de siete dominios alfa-helicoidales de transmembrana (TM) unidos por tres “loops” intracelulares y tres “loops” extracelulares, con un extremo amino-terminal extracelular y una cola carboxi-terminal citoplasmática (Barberis, 1998).

Los receptores de vasopresina presentan también las características estructurales de la mayoría de los GPCRs: glicosilación de los residuos Asn presentes en los dominios extracelulares, un puente disulfuro entre dos Cys altamente conservadas en los “loops” segundo y tercero extracelulares, y dos Cys relativamente conservadas y putativamente palmitoiladas en el extremo carboxi-terminal (Barberis, 1998).

La función endocrina más estudiada y relevante de AVP es el incremento de la concentración intracelular de AMPc en las células principales del nefrón distal por activación de la isoforma V2 del receptor. El aumento de la concentración de AMPc promueve la inserción de canales de agua aquaporina 2 en la superficie luminal de los

túbulos colectores y, como consecuencia, un incremento de la reabsorción de agua. AVP regula la homeostasis del agua vía un efecto dual: la regulación del transporte de aquaporina 2 hacia la superficie celular y la estimulación de la síntesis del mRNA codificante para la proteína aquaporina 2 (Birnbaumer, 2000).

En una primera instancia, la habilidad de vasopresina para reducir la respuesta de los receptores V1a y V2, proceso conocido como desensibilización, fue descrita en células de hígado y riñón, respectivamente. El receptor V1a fue propenso a desensibilización homóloga y heteróloga, a diferencia del receptor V2, que fue propenso a desensibilización homóloga solamente. La desensibilización homóloga de receptores V1a y V2 se produce debido a la internalización de los receptores desde la superficie celular, los cuales posteriormente son fosforilados por kinasas específicas de GPCRs. Los grupos fosfatos permanecen asociados por 3 horas después de la remoción de AVP de las inmediaciones de la célula (Birnbaumer, 2000).

Existen mutaciones que reducen la expresión o el acoplamiento del receptor V2, que son responsables del 95% de los casos de diabetes insípida nefrogénica (NDI), una enfermedad caracterizada por poliuria, que puede causar deshidratación severa y muerte; en ausencia de la vía de señalización de AVP el riñón no puede concentrar la orina y regular la homeostasis del agua. Aunque la NDI es una enfermedad rara, más de 130 mutaciones diferentes que causan la pérdida de función del receptor han sido identificadas después del clonamiento del gen del receptor. Una fracción de las mutaciones produce receptores truncados por un corrimiento en el marco de lectura que da como resultado la formación de un codón de detención. Sin embargo, la mayoría de las mutaciones son de tipo puntual, lo que provoca cambios en el plegamiento de la

proteína, causando la retención de ésta en el interior de la célula y reduciendo la abundancia del receptor en la superficie celular. Unas pocas mutaciones no cambian la abundancia del receptor en la superficie, pero reducen la afinidad de unión al ligando o la eficiencia de acoplamiento a la proteína  $G_s$ . Todas estas mutaciones sin sentido han sido descritas en individuos afectados con un fenotipo completo o parcial de NDI recesiva ligada al cromosoma X (Birnbaumer, 2000).

En riñón, dos variantes del mRNA de la isoforma V2 del receptor de vasopresina han sido identificadas y serían producto de un gen simple, por empalme alternativo usando un sitio donador y dos sitios aceptores. Una de estas variantes, denominada variante larga, codifica para el receptor funcional, el cual mediante acoplamiento a la proteína  $G_s$  produce la activación de la enzima adenilato ciclasa en la membrana plasmática. La variante corta carece de la secuencia nucleotídica que codifica para el séptimo dominio de transmembrana, producto de un corrimiento en el marco de lectura en su región 3' codificante. La proteína traducida es incapaz de activar la enzima adenilato ciclasa en células transfectadas. En todos los segmentos del nefrón, la cantidad de transcrito de la variante corta corresponde a un 15% de la cantidad de transcrito de la variante larga. Sólo se observa un alto nivel de transcripción del mRNA de la variante corta del receptor V2 en los túbulos colectores (Firsov y colaboradores, 1994). En nuestro laboratorio también se clonó y secuenció las isoformas larga y corta del receptor V2 de vasopresina desde riñón de rata, pero fueron llamadas V2a y V2b respectivamente, y además ambas isoformas de receptor V2 fueron localizadas en el mismo tipo celular, con una alta expresión en células principales del túbulo colector (Urra, 2003) .

Se ha demostrado que el mRNA del receptor V2b es traducido a proteína, pero ésta es retenida en el interior de la célula. Además, la proteína V2b forma heterodímeros con el receptor V2a (tipo salvaje), actuando como un dominante negativo por secuestro de la isoforma V2a en el interior de la célula (Sarmiento y colaboradores, 2004).

Además de los efectos de vasopresina a nivel renal, se ha documentado efectos centrales como el aumento de ciertas formas de aprendizaje y la consolidación de la memoria tras la administración sistémica e intracerebroventricular de la hormona (de Wied, 1965). Vasopresina facilita la memoria en numerosas tareas del apetito y de aversión y afecta la acción de varios agentes amnésicos revirtiendo o anulando sus efectos (van Wimersma Greidanus y colaboradores, 1981). Por otra parte, AVP administrada subcutáneamente potencia las crisis inducidas por la inyección intracerebroventricular del agonista colinérgico muscarínico pilocarpina (Croiset y colaboradores, 1997). Por último, se ha comprobado que vasopresina juega un rol dentro del comportamiento social en mamíferos monógamos, tales como los ratones campestres (*Microtus ochrogaster*). En estos animales, la administración de la hormona favorece la aparición de un comportamiento agresivo en machos sexualmente ingenuos (Stribley y colaboradores, 1999).

AVP también tiene efecto sobre la regulación del volumen celular en astrocitos en cultivo, los cuales son importantes reguladores del agua cerebral, y componen aproximadamente el 20% del espacio intracelular cerebral. Las células al ser expuestas a un medio hipotónico se hinchan, pero rápidamente retornan a su volumen normal por un proceso de decrecimiento regulado del volumen. El tratamiento con AVP de

astrocitos en cultivo incrementa el volumen celular durante este proceso (Sarfaz y colaboradores, 1999).

Se ha caracterizado los sitios de unión de  $^3\text{H}$ -AVP en preparaciones particuladas de cerebro de rata (Pearlmutter y colaboradores, 1983). La distribución de la inmunorreactividad de vasopresina en el cerebro de rata ha sido rastreada histoquímicamente desde los núcleos supraquiasmáticos, a través de proyecciones extensas hacia áreas centrales blanco en varios niveles del sistema nervioso central, distintas de las proyecciones usuales hacia la neurohipófisis (Sofroniew y colaboradores, 1981). Estas áreas incluyen proyecciones desde neuronas parvocelulares y magnocelulares. Las fibras y terminales vasopresinérgicas han sido localizadas en muchas áreas del cerebro involucradas en procesos de memoria tales como: hipocampo, septum, amígdala y tálamo (Thompson, 1978).

Existe evidencia de que los efectos sobre la memoria y el comportamiento producidos por vasopresina a nivel de varias estructuras centrales relacionadas con dichas funciones son mediados por el receptor V1, pero también por los receptores de oxitocina (de Wied y colaboradores, 1991; Paban y colaboradores, 1998). La participación central de los receptores V2 de vasopresina también ha sido sugerida (de Wied y colaboradores, 1991; Popik y colaboradores, 1992; Croiset y de Wied, 1997).

Hay evidencia previa de la existencia de receptores V2 de vasopresina en el sistema nervioso central (Hirasawa y colaboradores, 1994; Kato y colaboradores, 1995).

Además, se ha visto que la expresión del mRNA del receptor V2 de vasopresina en el hipocampo cambia dinámicamente durante los procesos de desarrollo (Kato, 1995).

La acción protectora de un antagonista del receptor V2 de vasopresina contra los ataques inducidos por pilocarpina, sugiere la existencia de este receptor en el cerebro. Sin embargo, ni la inyección subcutánea ni la intracerebroventricular del agonista selectivo del receptor de riñón V2, dDAVP, potenció las crisis inducidas por el agonista colinérgico muscarínico pilocarpina, por lo que podría tratarse de una nueva isoforma (Croiset y colaboradores, 1997). Estos antecedentes nos llevan a plantear como hipótesis que los receptores V2a y V2b se encuentran presentes en el sistema nervioso central. Por lo tanto el objetivo principal de la siguiente tesis fue estudiar la expresión de estas isoformas del receptor de vasopresina en el sistema nervioso central, para lo cual se cumplieron los siguientes objetivos específicos:

1. Amplificación mediante RT-PCR de la isoforma V2a y V2b del receptor de vasopresina, a partir de RNA total de Cerebelo, Tronco Cerebral y Corteza Cerebral de rata en distintos estados de desarrollo.
2. Detección con sondas biotiniladas del mensajero del receptor V2, mediante Hibridación *In situ* en cortes de cerebelo de rata en distintos estados de desarrollo.
3. Detección de las isoformas V2a y V2b del receptor de vasopresina mediante inmunohistoquímica, en cortes de cerebelo de rata en distintos estados de desarrollo.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 MATERIALES

##### 3.1.1 Reactivos

Los reactivos utilizados fueron comprados a los siguientes proveedores:

**Dako Cytomation:** Fragmento F<sub>c</sub> anti-biotina (M0743), Kit LSAB (K0690), sistema cromógeno DAB (K3968), sistema cromógeno NBT-BCIP (K0598)

**Sigma Chemicals Co. :** Agar, albúmina sérica bovina (BSA), azida de sodio, persulfato de amonio, bromuro de etidio, RNAsa A, tampones de calibración (pH 4,7 y 10).

**Bio-Rad:** Tween-20, N,N,N'-tetrametiletildiamina (TEMED), streptoavidina, biotina, membrana de nitrocelulosa.

**Merck, Darmstadt, Alemania:** Etanol absoluto, glicerol, peroxido de hidrógeno, SDS, Tris, ácido acético glacial.

**Invitrogen:** Acrilamida, agarosa ultrapura, agarosa de bajo punto de fusión (LMP), ampicilina, bisacrilamida, células DH5 $\alpha$ , cianol de xileno, desoxinucleótidos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), DNAsa I grado de amplificación (1 U/ $\mu$ l), ditioneitol (DTT), enzima Eco RI (10 U/ $\mu$ l), enzima Superscript II RT (200 U/ $\mu$ l), extracto de levadura, glicina,

marcador de tamaño molecular 1 kb, marcador de tamaño molecular 100 pb, oligo dT<sub>15</sub> (500 µg/µl), Taq DNA polimerasa (5 U/µl), triptona, trizol.

**Equilab:** Metanol, xilol.

**Promega:** Sistema de purificación de midipreparaciones “*Wizard plus*”.

### 3.1.2 Animales de experimentación

Los animales utilizados para los experimentos fueron *Ratus norvergicus* de distintas edades (1, 5, 15, 30, y 60 días). Las ratas recibieron líquido y alimentación *ad libitum*, y estuvieron sometidas a un ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad.

Las ratas fueron sacrificadas por decapitación.

### 3.1.3 Equipos

Agitador magnético Cole-Parmer (mod. 4658 Estiren/hot plate), agitador termorregulado Lab-Line (Environ Shaker), balanza electrónica Shimadzu (321-33557), balanza analítica Santorius (LA250S), centrífuga 5415D (Eppendorf), espectrofotómetro Shimadzu (UV-150-02), estufa de cultivo Memmert, fuente de poder Bio-Rad (power-PAC200), lámpara UV Camag (type TL900/U), microscopio óptico Zeiss (con cámara fotográfica MC80), medidor de pH WTW (pH 521), termociclador M.J. Reserch (MiniCycler™), transiluminador UV Viber-Lourmat, ultracentrífuga Beckman Optima LE-80K.

## 3.2 MÉTODOS

### 3.2.1 Amplificación mediante RT-PCR

#### 3.2.1.1 Diseño de partidores gen específicos

Los partidores gen específicos, para los ensayos de RT-PCR, fueron diseñados a partir de la secuencia del gen del receptor V2 de vasopresina de la especie *Ratus norvegicus*. Se sintetizaron dos pares de partidores. El primer par amplificó un fragmento de 1222 pb para la isoforma V2a y un fragmento de 1146 pb para la isoforma V2b del receptor V2 de vasopresina, y los partidores fueron:

Sentido (V2FN)            5' GGAATTCGGTGTGTTAGGTCATCATCAA 3'

Antisentido (V2RN<sub>2</sub>)    5' GCTCTAGACAGTTGAGCTACAGAGGGTTT 3'

El segundo par de partidores amplificó un fragmento de 292 pb para la isoforma V2a y un fragmento de 222 pb para la isoforma V2b del receptor V2 de vasopresina, y los partidores fueron:

Sentido (V2-919)            5'CGTGGGATCCGGAAGCTCCTCTGG3'

Antisentido (V2-1181)    5' TCAGGGCCAACCCTAGATAGTCAG 3'

Un tercer par de partidores, diseñado a partir de la secuencia del gen constitutivo GAPDH de la especie *Ratus norvegicus*, amplificó un fragmento de aproximadamente 300 pb y los partidores fueron:

Sentido                                   5'CGTGGGATCCGGAAGCTCCTCTGG3'

Antisentido                            5' TCAGGGCCAACCCTAGATAGTCAG 3'

### **3.2.1.2 Aislamiento de RNA total de riñón, cerebelo, tronco cerebral y corteza frontal cerebral**

Se homogenizó 100 mg o más de tejido en un homogenizador Ultraturax añadiendo 1 ml de reactivo trizol. Se incubó por 5 min a temperatura ambiente, y se agregó 0.2 ml de cloroformo. Esta mezcla se agitó vigorosamente por 15 seg, tras lo cual se mantuvo en reposo sobre el mesón por 2 á 3 min. A continuación se centrifugó por 15 min a no más de 12000 x g a una temperatura de 2 á 8 °C. Se observó la formación de tres fases. La fase superior acuosa fue traspasada a otro tubo y el RNA fue precipitado agregando 0,5 ml de isopropanol, incubando por 10 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a una velocidad de no más de 12000 x g a temperatura ambiente por 10 min. Se lavó dos veces el precipitado resuspendiendolo en 1 ml de etanol al 75% preparado con agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC), y entonces centrifugandolo a 7500 x g por 5 min a una temperatura de 2 á 8 °C cada vez. Luego el precipitado se secó 5 á 10 min al vacío, sin dejar que se seicara completamente. Posteriormente se resuspendió en 100 µl de agua tratada con DEPC, incubando 10 min

entre 55 y 60 °C. Para cuantificar el RNA purificado se midió la absorbancia de la muestra a una longitud de onda de 260 nm (1 unidad de absorbancia a 260 nm corresponde a 40 µg/ml de RNA). Este protocolo es recomendado por Invitrogen para aislamiento de RNA con el reactivo TRIzol.

### **3.2.1.3 Electorforesis en geles de agarosa conteniendo formaldehído**

Para la identificación y separación de fragmentos de RNA, se prepararon geles de agarosa al 0.8% en tampón MOPS 5X (MOPS 0.2 M pH 7.0, acetato de sodio 50 mM, EDTA 5 mM pH 8.0) conteniendo formaldehído 2.2 M. Se utilizaron 20 µg de RNA en tampón MOPS 5X conteniendo formaldehído y formamida con 0.5 µg/ml de bromuro de etidio. La muestra se incubó a 55°C por 15 min. Se utilizó tampón de carga (glicerol 50%, EDTA 1mM, azul de bromofenol 0.4% y cianol de xileno 0.4%) en relación 1:10 con respecto al volumen de la muestra. Posteriormente se identificó la integridad del RNA observando el gel por exposición a luz UV en un transiluminador (Sambrook, 1989).

### **3.2.1.4 Tratamiento con DNAsa I**

Se tomaron 25 µg de mRNA total y se incubaron con 2 U de DNAsa I grado de amplificación en un volumen final de 50 µl, con una concentración final 1x de tampón DNAsa I. El tiempo de incubación fue de 90 min a una temperatura de 25 °C, tras lo

cual se procedió a la inactivación de la enzima mediante la adición de 5 µl de EDTA 2,5 mM, incubando a 70 °C por 10 min.

#### **3.2.1.5 Síntesis de cDNA a partir de mRNA total**

Se tomaron 5 µg de RNA total tratado con DNAsa I y fueron incubados por 10 min a 70 °C con 500 ng de oligo dT en un volumen final de 12 µl. A continuación se completó un volumen de 20 µl añadiendo tampón de la primera hebra, DTT (concentración final 10 mM), dNTPs (concentración final 0,5 mM), y 200 U de Superscript II RNAsa H transcriptasa reversa. La reacción se incubó a 52 °C por 50 min. La enzima se inactivó a 70 °C por 10 min, y la solución fue enfriada en hielo.

#### **3.2.1.6 Amplificación del cDNA mediante PCR**

El cDNA se amplificó por PCR, utilizando 5 µl de producto de la reacción de transcripción reversa como templado, 1,5 U de taq DNA polimerasa, y los volúmenes adecuados de los siguientes reactivos para obtener una concentración final de 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,2 mM de dATP, dCTP, dGTP, y dTTP; 1x de tampón PCR; 0,1 µM de partidor sentido y 0,1 µM de partidor antisentido. Se completó hasta un volumen de 50 µl con agua desionizada. Se cubrió la mezcla con vaselina líquida estéril. Antes de agregar la enzima se calentó la mezcla a 96 °C por 1 min con el propósito de denaturar el cDNA. Para el programa utilizado en la reacción en cadena de la polimerasa se consideraron 30 ciclos, cada uno de ellos con una temperatura de denaturación de 96 °C por 1 min,

de apareamiento 62 °C por 2 min, y de extensión 72 °C por 2 min. Una vez completados los 30 ciclos, se procedió a una extensión final a una temperatura de 70 °C por 10 min.

El producto de amplificación fue separado electroforéticamente en un gel al 1 % o 1,5 % agarosa y 2,8 µg/ml bromuro de etidio en tampón TAE 1x, utilizando como tampón de muestra una solución 6x compuesta por cianol de xileno al 0,25 % y glicerol al 30 % en agua destilada. Se visualizaron los productos de amplificación mediante la exposición del gel en un transiluminador de luz ultravioleta y la imagen fue capturada con una cámara digital.

### **3.2.2 Clonamiento del cDNA del receptor V2 de vasopresina**

#### **3.2.2.1 Purificación del fragmento amplificado**

El volumen total de amplificación de cDNA se cargó en un gel 1,5% agarosa de bajo punto de fusión. Se cortó la porción del gel en la que se encontró el producto de amplificación esperado, y se purificó el fragmento de DNA a través del sistema QIAEX II.

#### **3.2.2.2 Reacción de ligación en el vector pGEM-T**

Se tomaron 3 µl de DNA purificado y fueron ligados a 50 ng del vector de clonamiento pGEM-T en un volumen final de 10 µl, conteniendo 1x de tampón T4 ligasa

y 3 U de T4 ligasa. La reacción fue incubada a 4 °C toda la noche. Protocolo recomendado por Promega para el sistema pGEM-T.

### **3.2.2.3 Transformación y siembra de células competentes**

Se tomaron 2 µl del producto de ligación y se incubaron con 25 µl de células competentes DH5α por 30 min en hielo. Un “shock” térmico de 37 °C por 20 seg fue proporcionado a la mezcla, que a continuación fue nuevamente sumergida en hielo por 2 min. Se agitó la mezcla a 225 x g por una hora a 37 °C. Posteriormente se sembró en placas de agar LB con 50 µg/ml de ampicilina, que fueron incubadas toda la noche a 37 °C. Protocolo recomendado por Lifetechnology para transformación y clonamiento en células E. Coli DH5α.

### **3.2.2.4 Preparación de DNA plasmidial en pequeña escala (minipreparaciones)**

A lo menos 10 colonias de una placa se subcultivaron en medio líquido estéril LB conteniendo 100 µg/ml de ampicilina. Una colonia aislada se depositó en el tubo con el medio adecuadamente preparado para ser agitado a 225 x g toda la noche a 37 °C.

Para extraer el DNA plasmidial, se tomó 1,5 ml del cultivo incubado toda la noche y se centrifugó a 13000 x g. El sedimento de células bacterianas se resuspendió en 300 µl de solución TENS (100 mM NaOH, 0,5% SDS, 1x TE pH 7,5). A esta mezcla se agregó 150 µl de ácido acético 3M, pH 5,2, y se procedió a vortexear y centrifugar a 13000 x g. El DNA plasmidial se precipitó desde el sobrenadante con 900 µl de etanol

100 % enfriado en hielo. Se lavó dos veces con etanol 70% y posteriormente se resuspendió en 50 µl de agua conteniendo RNAsa 20 µg/ml.

El producto de digestión con *EcoRI* del DNA plasmidial purificado, fue separado electroforéticamente en un gel al 1,5% agarosa y 2,8 µg/ml bromuro de etidio en tampón TAE 1x, utilizando como tampón de muestra una solución 6x compuesta por cianol de xileno al 0,25% y glicerol al 30% en agua destilada. Se visualizaron los productos mediante la exposición del gel en un transiluminador de luz ultravioleta y la imagen fue capturada con una cámara digital. Se seleccionó una de las preparaciones, conteniendo el producto de clonamiento esperado liberado del vector, para realizar una midipreparación.

### **3.2.2.5 Preparación de DNA plasmidial en mediana escala (midipreparaciones)**

Se tomó 1 ml del cultivo seleccionado y se subcultivó en 200 ml de medio líquido estéril LB conteniendo 100 µg/ml de ampicilina. Se incubó en agitación constante (225 x g) toda la noche a 37 °C. Para purificar el DNA plasmidial, 100 ml de cultivo se centrifugó a 10000 x g por 10 min a 4 °C. Se desechó el sobrenadante y se secó el sedimento por inversión sobre un papel absorbente. Se resuspendió el sedimento en 3 ml de solución de resuspensión (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNAsa A). Se agregó 3 ml de solución de lisis celular (0,2 mM NaOH, 1% SDS) y se mezcló invirtiendo el tubo cuatro veces. Se añadió 3 ml de solución de neutralización (1,32 M acetato de potasio, pH 4,8) y se mezcló invirtiendo el tubo cuatro veces. Esta mezcla se centrifugó a 14000 x g por 15 min a 4 °C. El sobrenadante se transfirió a un

tubo nuevo y se le agregó 10 ml de resina de purificación de DNA plasmidial *Wizard* previamente resuspendida. Se transfirió esta mezcla a una midicolumna. A continuación se aplicó vacío, y cuando la muestra hubo pasado a través de la columna se procedió a lavar con solución de lavado (80 mM acetato de potasio, 8,3 mM Tris-HCl, pH 7,5, 40  $\mu$ M EDTA). El DNA plasmidial unido a la resina se eluyó desde la columna después de haber sido incubado por 1 min con 300  $\mu$ l de agua libre de nucleasa precalentada (65-70 °C), para esto se centrifugó a 10000 x g por 20 seg. Este protocolo es recomendado por Promega para el kit de purificación de midipreparaciones de DNA "*Wizard Plus*".

### **3.2.3 Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS e inmunodetección.**

#### **3.2.3.1 Purificación de proteínas de membrana**

Para purificar las proteínas de membrana de riñón, cerebelo, tronco cerebral y cerebro, se diseccionaron los tejidos correspondientes, cada uno fue triturado en forma manual utilizando un bisturí estéril y se agregó en forma paulatina tampón enfriado en hielo conteniendo 300 mM Manita y 12 mM Hepes-Tris, pH 7,4. Luego se trituró brevemente en un ultraturrax y a continuación la mezcla se sometió a 10 movimientos de vástago en un homogeneizador Potter. Todos los pasos posteriores fueron realizados a 4 °C. La suspensión fue centrifugada a 2500 x g por 15 min. El sedimento resultante fue desechado y el sobrenadante se centrifugó a una velocidad de 46000 x g por 45 min. El sobrenadante fue desechado y el sedimento fue resuspendido en PBS/0.1 mM PMSF.

### **3.2.3.2 Electroforesis de proteínas de membrana y transferencia a membrana de nitrocelulosa.**

Para separar las proteínas a través electroforesis según el método de Laemmli (1970) de tampon discontinuo con algunas modificaciones. Las membranas fueron disueltas en tampón de carga SDS, calentadas a 100 °C por 5 min, y separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE), el cual estaba constituido por un gel apilador al 4% acrilamida y un gel separador 8% acrilamida. La separación se realizó a 150 V por 2,5 horas a 4 °C. Inmediatamente después las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa. La transferencia se realizó según el método de Towbin y colaboradores (1979) modificado con un amperaje de 250 mA por 1,5 horas a 4 °C.

### **3.2.3.3 Inmunodetección**

Las membranas de nitrocelulosa fueron bloqueadas con leche descremada al 5% en tampon TTBS pH 7,5 ( 10mM Tris, 150mM NaCl, 0.1% Tween 20), efectuando un cambio de medio de bloqueo cada media hora hasta completar tres cambios. Se incubó entonces con el primer anticuerpo toda la noche. Las membranas fueron lavadas varias veces con TTBS y posteriormente incubadas por una hora y media con el segundo anticuerpo. Finalmente fue lavada nuevamente con TTBS. Para visualizar los sitios de reacción antígeno anticuerpo, las membranas fueron incubadas con sustrato quimioluminiscente supersignal west pico, para luego ser expuesta a la película de

rayos X. Protocolo recomendado por Pierce para el Sistema Supersignal West Pico Chemiluminescent Substrate.

### **3.2.4 Inmunohistoquímica**

#### **3.2.4.1. Anticuerpos usados para la técnica inmunohistoquímica:**

Un antisuero fue preparado por inmunización de conejo con el péptido sintético V2b (HTAWVLKMNPVPQP), el cual corresponde a una parte del extremo carboxilo terminal intracelular de la isoforma V2b del receptor de vasopresina que presenta una secuencia aminoacídica distinta a las demás isoformas del receptor.

El otro antisuero usado fue preparado por inmunización de conejo con el péptido sintético V2 (QRHTTHSLGPQDESCATASSSLMKDTPS), el cual corresponde a una parte del cuarto “loop” intracelular del receptor V2 de vasopresina, el cual es igual en ambas isoformas de este receptor (Urrea, 2003).

#### **3.2.4.2 Obtención de los cortes histológicos**

Los animales utilizados para los experimentos fueron *Ratus norvegicus* de distintas edades (1, 5, 15, 30, y 60 días). Las ratas tuvieron libre acceso a comida y agua, y estuvieron sometidas a un ciclo 12 horas luz, 12 horas oscuridad. Las ratas fueron sacrificadas por decapitación. Los cerebros de los animales fueron extraídos y

sumergidos de inmediato en una de estas soluciones de fijación: bouin o peryodato-lisina-paraformaldehido (PLP).

Los cerebros fijados en bouin o en PLP fueron incluidos en paraplast. Se hicieron cortes de 4  $\mu\text{m}$  de espesor en un micrótomo rotatorio Jung y se montaron en portaobjetos cubierto con poli-L-lisina.

### **3.2.4.3 Desparafinación de los cortes histológicos**

Los cortes fueron desparafinados sumergiéndolos en las soluciones siguientes y en los tiempos que se indican:

Xilol I	15 min
Xilol II	10 min

### **3.2.4.4 Hidratación de los cortes histológicos**

Los cortes fueron hidratados sumergiéndolos en las soluciones siguientes y en los tiempos que se indican:

Alcohol absoluto	10 min
Metanol	10 min
Alcohol 96 %	5 min
Alcohol 70%	5 min

### 3.2.4.5 Inmunodetección.

Después de haber desparafinado las muestras, se procedió a bloquear la peroxidasa endógena incubando los cortes con 3% peróxido de hidrógeno.

Se incubó con el antisuero primario diluido en una solución al 1% de albúmina de suero bovino (BSA) en tampón Tris-HCl pH 7,8 (137mM NaCl, 10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), en cámara húmeda por aproximadamente 18 horas a 20-22 °C.

A continuación se lavaron los cortes histológicos con tampón Tris-HCl pH 7,8 (3 lavados por 5 min).

Posteriormente se incubó con algunas gotas del fragmento F<sub>c</sub> biotinilado por 30 min, tras lo cual se lavó los cortes histológicos con tampón Tris-HCl pH 7,8 (3 lavados por 5 min).

Tras los lavados, se incubó el corte con el conjugado streptoavidina-biotina-peroxidasa por 30 min. Una vez llevada a cabo esta incubación, se lavaron los cortes histológicos con tampón Tris-HCl pH 7,8 (3 lavados por 5 min).

Se incubó por 10-15 min a temperatura ambiente y en ausencia de luz con la solución sustrato-cromógeno donde el sustrato corresponde al peróxido de hidrógeno y el cromógeno dador de electrones es tetracloruro-3,3'-diaminobencidina que al oxidarse, forma un precipitado coloreado insoluble en el sitio de la reacción inmune (Leiva y ordenes, 1998; Catalogo DAKO).

Finalmente se lavó el corte con agua destilada.

### 3.2.4.6 Deshidratación de los cortes

Los cortes fueron deshidratados, sumergiéndolos secuencialmente en las siguientes soluciones y por los tiempos indicados:

Alcohol 70%	5 min
Alcohol 96%	5 min
Alcohol absoluto	5 min
Alcohol absoluto	5min
Xilol I	10 min

Se procedió al montaje de los cortes agregando una gota de Permount al cubreobjetos y depositando éste sobre el corte. Los cortes fueron observados con el microscopio óptico, y la imagen fue capturada a través de una cámara adaptada al microscopio.

### 3.2.5 Hibridación *in situ*

#### 3.2.5.1 Diseño de sonda V2

Los oligonucleótidos usados fueron diseñados a partir de la secuencia del mRNA del receptor V2 de vasopresina de la especie *Ratus norvegicus*. El oligonucleótido antisentido hibrida con la sección del mRNA del receptor V2 que se extiende desde la

base 1004 hasta la 1021, compartida por las dos isoformas de este receptor, por lo tanto no discrimina entre ellas.

Los oligonucleótidos antisentido y sentido fueron adquiridos biotinilados y fueron:

antisentido                      5' CAC AGC AAA GCA GGC TAC GCA ACT 3'

sentido                              5' AGT TGC GTA GCC TGC TTT GCT GTG 3'

### 3.2.5.2 Desparafinación de los cortes

Cerebelos de rata de distintas edades fueron fijados en bouin e incluidos en paraplast.

Los cortes fueron desparafinados sumergiéndolos en las soluciones siguientes y en los tiempos que se indican:

Xilol I	5 min
Xilol II	5 min
Xilol III	5 min

### 3.2.5.3 Hidratación de los cortes

Los cortes fueron hidratados sumergiéndolos en las soluciones siguientes y en los tiempos que se indican:

Alcohol absoluto	5 min
Alcohol 96 %	5 min

Alcohol 96 %	5 min
Alcohol 70%	5 min
Alcohol 50%	5 min

#### 3.2.5.4 Pretratamiento de los cortes

A continuación se lavaron los cortes histológicos con tampón con PBS 1x pH 7.4 (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), dos veces por 5 min a 37°C.

La permeabilización se llevo a cabo incubando los cortes por 20 min a 37 °C con 1 µg/µl de proteinasa K. Luego se lavó con PBS 1x pH 7,4 a temperatura ambiente (2 lavados por 5 min).

Para bloquear la digestión, se fijaron los cortes con 4% paraformaldehído en PBS 1x pH 7,4 por 5 min a 4 °C. Luego se lavaron con PBS 1x pH 7,4 (2 lavados por 3 min a 4 °C y 2 lavados de 3 min a temperatura ambiente).

Para disminuir la unión inespecífica de la sonda se procedió a la acetilación de los grupos amino, incubando con trietanolamina acética (0.25% anhídrido acético en 0.1M trietanolamina pH8.0) durante 10 min a temperatura ambiente. Luego se lavaron con PBS 1x pH 7.4 (3 lavados de 3 min a temperatura ambiente).

La preincubación se realizó incubando los cortes en cámara húmeda con solución de prehibridación por 30 min a 37°C, esta solución contenía 50% (v/v) formamida desionizada; 4x SSC; 0,5x denhardt's (1% ficoll, 1% PVP, 1% BSA en agua desionizada estéril); 250 µg/ml de espermio de salmón, 10% dextrano y 10 mM DDT.

### 3.2.5.5 Hibridación de los cortes

Posteriormente, se descartó la solución de prehibridación y se agregó 30 picomoles por corte de la sonda antisentido o sentido, diluida en solución de prehibridación fresca. Antes de agregar la sonda, esta se denaturó a 50 °C por 5 min y entonces se incubó toda la noche en cámara húmeda a 42 °C.

### 3.2.5.6 Lavado de los cortes

Al otro día se desechó la solución de hibridación y se lavaron los cortes, sumergiéndolos secuencialmente en las siguientes soluciones y por los tiempos indicados:

4x SSC a 42°C	15 min
2x SSC a 37°C	15 min
1x SSC a 37°C	15 min
0,3x SSC a 37°C	15 min

### 3.2.5.7 Detección inmunológica

Luego se procedió a la detección inmunológica para lo cual se lavaron los cortes con solución 1 (150 mM NaCl; 100 mM Tris/HCl pH 7,4) por 10 min a temperatura ambiente, para después proceder a la incubación con solución 2 (1% BSA, 0,3% Tritón X-100 en solución 1) por 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente se incubaron

los cortes en cámara húmeda por 3 horas a temperatura ambiente con una dilución 1/40 del fragmento Fab anti-biotina conjugado a fosfatasa alcalina en solución 2. Se lavó en solución 1 (2 lavados de 10 min) a temperatura ambiente. Luego 3 lavados de 10 min en solución 3 (100 mM Tris/HCl pH 9,5, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>) a temperatura ambiente. Entonces se reveló incubando aproximadamente 15 horas en cámara húmeda con solución de cromógeno (NBT-BCIP, 10 mM levamisol). Luego se detiene la reacción incubando 5 min con solución 4 (10 mM Tris/HCl pH 8,0, 1 mM EDTA). Luego se montaron en moviol y se secaron a 30°C, para finalmente observarlos al microscopio y capturar la imagen en una cámara digital.

## 4. RESULTADOS

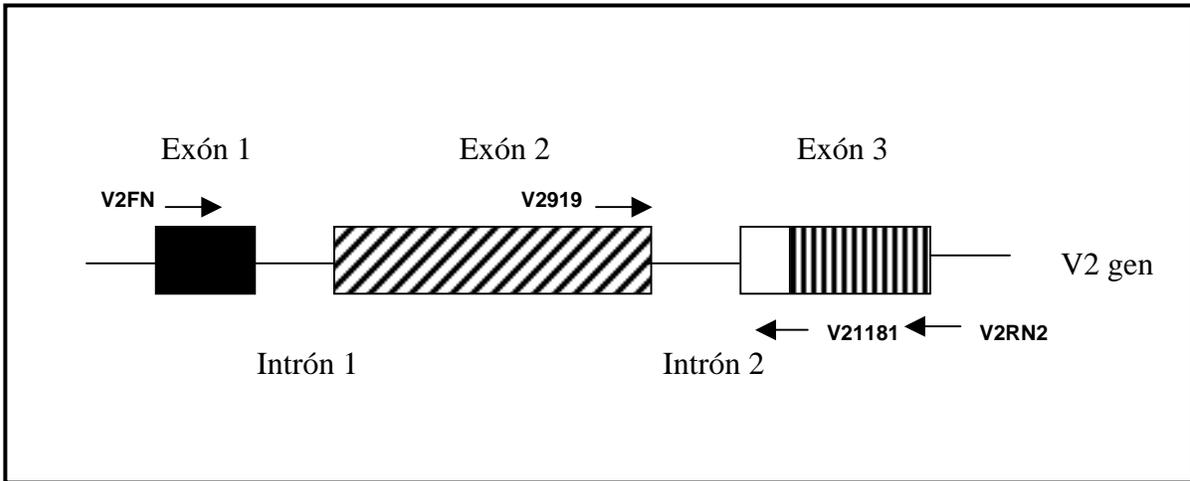
### 4.1 Amplificación mediante RT-PCR

#### 4.1.1 Diseño de partidores gen específicos

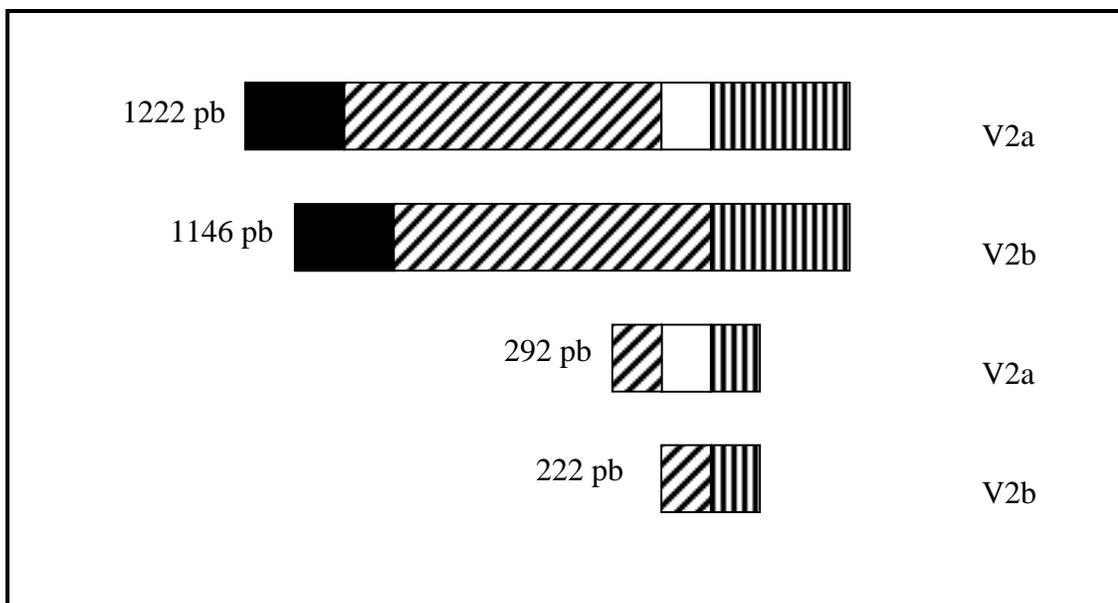
En la figura 1, podemos observar la estructura del gen del receptor de vasopresina V2, que es una proteína de siete dominios transmembrana. Este gen está compuesto por tres exones y dos intrones pequeños. El primer exón es muy corto, el segundo exón corresponde prácticamente al 80 % del receptor, y el tercer exón codifica para el séptimo dominio transmembrana del receptor V2 (Seibold y colaboradores, 1992).

Si analizamos la figura 1, observamos que se presentan dos sitios de empalme, los que posibilitan la obtención de dos variedades de mRNA maduro. Una en la que se produce el empalme en el primer sitio aceptor, comienzo de la caja blanca, que corresponde al mRNA ya descrito para la isoforma del receptor V2 renal, y que será llamado V2a (Fig.2). Otra variedad, en la que se produce el empalme en el segundo sitio aceptor, hacia el final de la caja blanca, produciría un mRNA más corto. Esta variedad será llamada V2b (Fig.2).

Al amplificar por RT-PCR a partir de mRNA total, utilizando los partidores V2FN (sentido) y V2RN<sub>2</sub> (antisentido), que amplifican el segmento comprendido entre el primer exón y el tercer exón, esperamos obtener dos productos de amplificación (Fig.2). El fragmento correspondiente a la isoforma V2a tendría un tamaño de 1222pb, mientras que el fragmento correspondiente a la isoforma V2b tendría un tamaño de 1146pb, acorde con los 76 nucleótidos menos en su mRNA tras el empalme alternativo.



**Figura 1: Esquema del gen del receptor V2 de vasopresina:** La caja llena corresponde al primer exón, la caja listada en forma oblicua corresponde al segundo exón. El tercer exón se presenta compuesto por dos cajas, una vacía y otra listada en forma vertical. El comienzo y el final de la caja blanca corresponden a sitios aceptores de empalme. Las flechas corresponden a la ubicación de los partidores gen específico



**Figura 2: Posibles productos de amplificación por RT-PCR:** Tamaño molecular esperado para los productos de amplificación por RT-PCR de acuerdo a la combinación de partidores gen específico, los primeros dos fragmentos con los partidores V2FN (sentido) y V2RN<sub>2</sub> (antisentido), los dos fragmentos que le siguen en el esquema corresponden a los partidores V2-919 (sentido) y V2-1181 (antisentido).

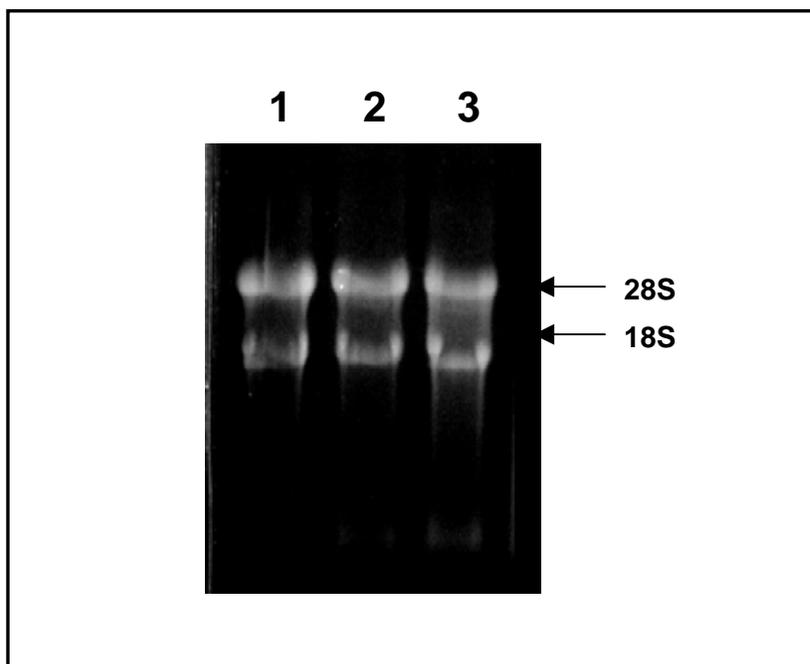
Con los partidores V2-919 (sentido) y V2-1181 (antisentido), diseñados para amplificar un fragmento más corto (desde el término del segundo exón hasta el final del tercer exón) también se obtendría una diferencia entre los productos de amplificación para las dos isoformas, V2a tendría un tamaño molecular de 292 pb y V2b uno de 222 pb, de la misma forma que sucede con los partidores anteriores, se debe al suceso de empalme alternativo (Fig.2).

#### **4.1.2 Obtención de RNA total de distintos tejidos de rata**

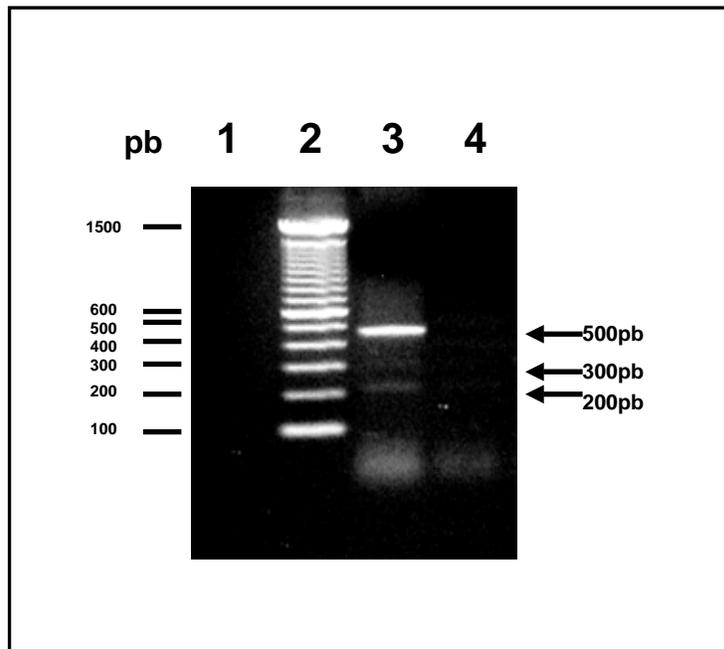
Se obtuvo RNA total de riñón, cerebelo, tronco cerebral y corteza frontal cerebral, después de esto se verificó la integridad de éste mediante una electroforesis en un gel 1.2% agarosa conteniendo formaldehído. Se obtuvieron dos bandas, una correspondiente al RNA ribosomal 28S y otra correspondiente al 18S, como se muestra en la figura 3, lo cual nos dice que el RNA ribosomal está íntegro.

#### **4.1.3 Tratamiento con DNAsa I**

Se eliminó la posibilidad de contaminación con DNA como se observa en la figura 4. Se verificó que no hubiera amplificación del producto de 474 pb, esperado en una muestra contaminada con DNA, al ser tratada previamente con DNAsa I y sin síntesis de cDNA, carril 4. En cambio si se realiza la síntesis de cDNA, podemos observar claramente un producto de amplificación del tamaño esperado sólo si el RNA está contaminado con DNA o si existe dentro de las variedades de RNA una forma inmadura del mensajero.



**Figura 3: Electroforesis de RNA total de distintos tejidos de rata:** Gel de agarosa 1.2% conteniendo formaldehído. Carril 1: Riñón, carril 2: Cerebelo, carril 3: Corteza frontal.



**Figura 4: Control de la eficiencia del tratamiento con DNAsa I.** Amplificación por RT-PCR de las isoformas de los receptores V2 de vasopresina desde corteza cerebral de rata de 1 día postnatal. Electroforesis en gel de agarosa 1% en TAE 1X, teñido con bromuro de etidio. Carril1: Amplificación sin templado, carril2: Marcador de tamaño molecular 100pb, carril3: Amplificación con síntesis de cDNA, carril 4: Amplificación sin síntesis de cDNA.

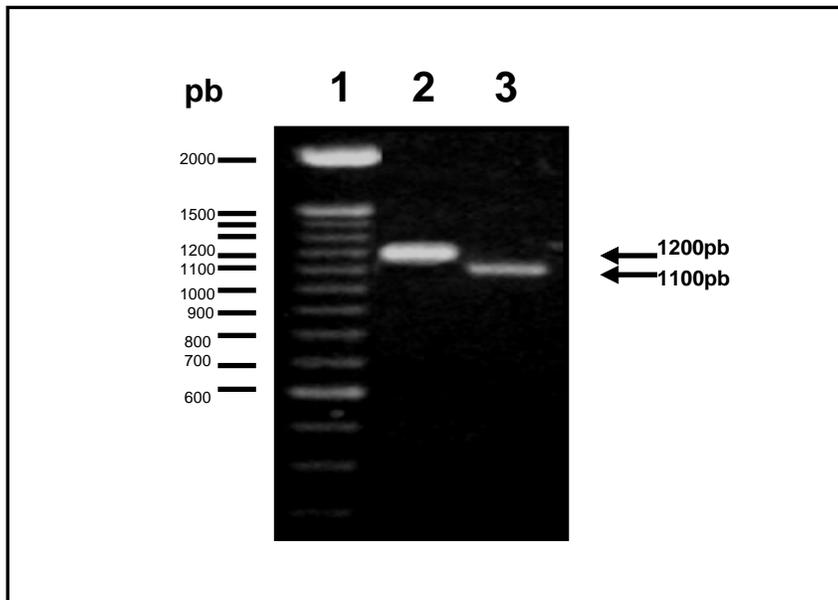
De esto se desprende que el tratamiento con DNAsa es eficiente en la eliminación total del DNA genómico contaminante que pudiera estar presente al extraer el RNA.

#### **4.1.4 Amplificación mediante RT-PCR de receptores V2 de vasopresina**

##### **4.1.4.1 Amplificación de receptores V2 desde riñón**

Se amplificó el receptor V2 de vasopresina a partir de RNA total de médula de riñón, ya que éste es el tejido que según estudios cinéticos y farmacológicos expresa mayoritariamente este tipo de receptor (Guillón y colaboradores, 1982).

Cuando se amplificó por RT-PCR con los partidores gen específicos V2FN y V2RN<sub>2</sub>, solamente se obtuvo el producto de amplificación esperado para la isoforma V2a del receptor V2 de vasopresina (dato no mostrado). Este fragmento fue purificado como se describe en metodos 3.2.2.1. Una baja expresión del mensajero fue descrita con anterioridad por Firsov y colaboradores. Por esta razón, se purificó el supuesto fragmento amplificado desde el sector del gel en el que debiera ubicarse el producto para el mensajero de la isoforma V2b. Entonces, ambas purificaciones fueron sometidas nuevamente a amplificación por RT-PCR con los partidores V2FN y V2RN<sub>2</sub>. Como resultado de esto podemos observar en la figura 5, en el carril 2, un producto de reamplificación de aproximadamente 1200 pb que corresponde al tamaño molecular esperado para la isoforma V2a del receptor de vasopresina, y en el carril 3 un producto de reamplificación de aproximadamente 1100 pb que es el tamaño molecular esperado para la isoforma V2b del receptor de vasopresina. Si se compara la intensidad de las



**Figura 5: Reamplificación por RT-PCR de las isoformas de los receptores V2 de vasopresina desde riñón de rata.** Electroforesis en gel de agarosa 1% en TAE 1X, teñido con bromuro de etidio. Carril1: marcador de tamaño molecular 100pb, carril2: Reamplificación de V2a de riñón de rata, carril 3: Reamplificación de V2b de riñón de rata.

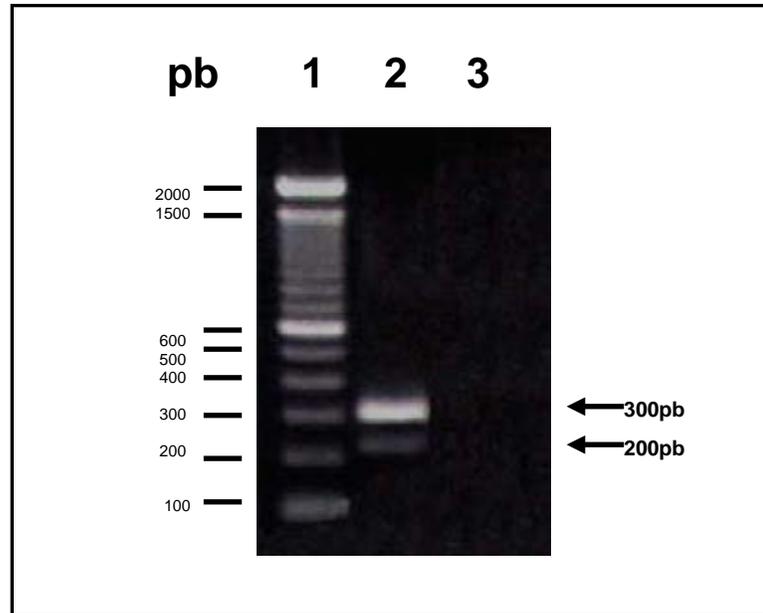
bandas de los productos de amplificación para ambos receptores, el producto de amplificación mayoritario corresponde a la isoforma V2a, ya que la intensidad de las bandas es directamente proporcional a la cantidad de RNA de cada una de las especies.

En los siguientes experimentos se emplearon los partidores gen específicos V2-919 y V2-1181. Esto debido a que al hacer una primera amplificación mediante RT-PCR se pueden visualizar los productos de amplificación para las dos isoformas del receptor V2 de vasopresina (fig 6). Se observa un producto de amplificación con tamaño molecular de 300 pb, que es lo esperado para la isoforma V2a del receptor, y otro de 200 pb aproximadamente que es lo esperado para la isoforma V2b del receptor (carril 2, fig 6). Si nos detenemos en la intensidad de los productos de amplificación, podremos notar que la intensidad y por tanto la abundancia relativa del mensajero correspondiente a la isoforma V2a es mucho mayor con respecto al otro producto de amplificación, correspondiente a la isoforma V2b.

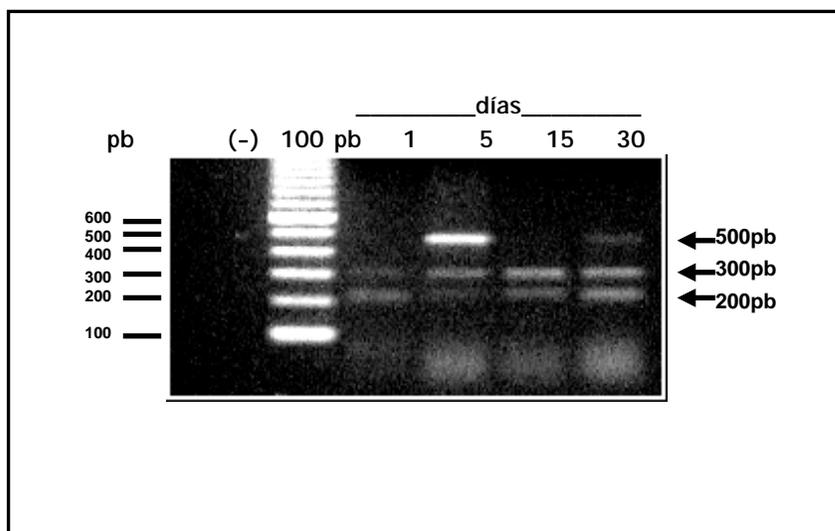
#### **4.1.4.2 Amplificación de receptores V2 desde distintas zonas del sistema nervioso central**

Se amplificó el receptor V2 de vasopresina desde distintos tejidos nerviosos, debido a la existencia de sitios de unión para vasopresina en varios sectores del sistema nervioso central (Pearlmutter y colaboradores, 1983).

Se utilizó el par de partidores gen específicos V2-919 (sentido) y V2-1181 (antisentido). El primer tejido examinado fue cerebelo. En la figura 7, en el día 1 se observan dos productos de amplificación de 200 y 300 pb que corresponden a las



**Figura 6: Amplificación por RT-PCR de las isoformas de los receptores V2 de vasopresina desde riñón de rata.** Electroforesis en gel de agarosa 1.5% en TAE 1X, teñido con bromuro de etidio. Carril 1: marcador de tamaño molecular 100 pb. Carril 2: Fragmento de 300 pb corresponde a la isoforma V2a del receptor de vasopresina, fragmento de 200 pb corresponde a la isoforma V2b del receptor de vasopresina. Carril 3: Amplificación sin templado.



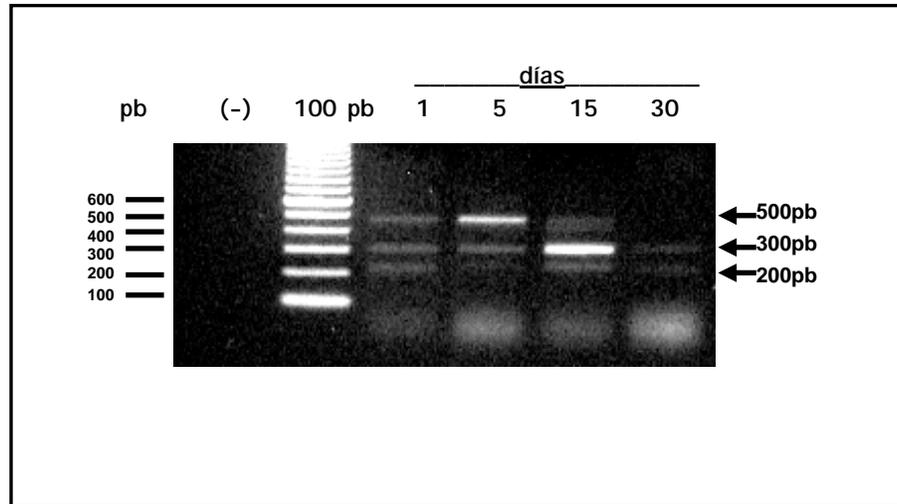
**Figura 7: Amplificación por RT-PCR de las isoformas del receptor V2 de vasopresina en cerebelo de rata.** Electroforesis en gel de agarosa 1.5% en TAE 1X, teñido con bromuro de etidio. Productos de amplificación con partidores V2-919 y V2-1181, desde día 1 postnatal hasta día 30 postnatal. Carril 1: Amplificación sin templado.

isoformas V2b y V2a respectivamente, que también son vistos en los días 5, 15 y 30 postnatal. En los días 5 y 30 postnatal se observa la aparición de un fragmento de amplificación de aproximadamente 500 pb, que corresponde al mRNA primario del receptor V2 de vasopresina. Se puede notar la diferencia en la intensidad de las bandas dependiendo del grado de desarrollo de las ratas.

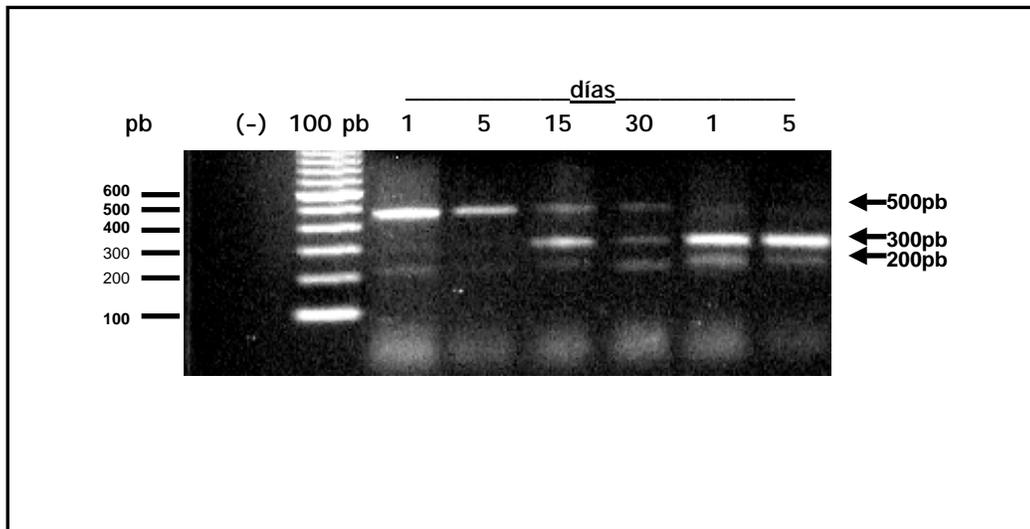
En tronco cerebral de rata, figura 8, se puede ver las tres variedades de productos de amplificación para el receptor V2 de vasopresina que se observan en cerebelo, las cuales cambian en su intensidad dependiendo del grado de desarrollo del espécimen.

En el día 1 postnatal podemos ver que las tres variedades se encuentran en una misma proporción. En el día 5 postnatal el producto de amplificación de aproximadamente 500 pb se encuentra en mayor proporción con respecto a los otros productos. Este corresponde al mRNA primario del receptor V2 de vasopresina. En el día 15 postnatal la proporción cambia bruscamente y prepondera el producto de amplificación de alrededor de 300 pb, tamaño esperado para el producto de amplificación del receptor V1a. Por último, en el día 30 postnatal desaparece el producto de amplificación de 500 pb, mientras las otras dos variedades se presentan en una misma proporción.

En la figura 9 podemos ver que el producto de amplificación predominante en el día 1 postnatal es de un tamaño aproximado a 500 pb. Este producto sigue siendo mayoritario en el día 5 postnatal. En el día 15 postnatal la forma predominante es el producto de amplificación de 300 pb, correspondiente al receptor V2a. La proporción llega a ser la misma entre las tres variedades en el día 30 postnatal.



**Figura 8: Amplificación por RT-PCR de las isoformas del receptor V2 en tronco cerebral de rata.** Electroforesis en gel de agarosa 1.5% en TAE 1X, teñido con bromuro de etidio. Productos de amplificación con partidores V2-919 y V2-1181, desde día 1 postnatal hasta día 30 postnatal. Carril 1: Amplificación sin templado.



**Figura 9: Amplificación por RT-PCR de las isoformas del receptor V2 de vasopresina en corteza cerebral y riñón de rata.** Electroforesis en gel de agarosa 1.5% en TAE 1X, teñido con bromuro de etidio. Productos de amplificación con partidores V2-919 y V2-1181, desde día 1 postnatal hasta día 30 postnatal. Carril 1: Amplificación sin templado.

## 4.2 Alineamiento de las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas deducidas

Los productos de amplificación fueron clonados en el vector pGEM-T de Promega según el protocolo descrito en métodos 3.2.2.2 y secuenciados en ambos sentidos por el método didesoxi, usando los partidores sp6 y T7.

Al comparar tanto la secuencia nucleotídica (Fig.10) como la aminoacídica (Fig.11) de los receptores V2 de vasopresina, V2a y V2b, ésta revela una alta homología en los primeros 303 aá, posterior a lo cual ocurre un cambio en el marco de lectura en el V2b, producto de la delección de 76 pb en la secuencia nucleotídica. Finalmente, producto del empalme alternativo en el mensajero de receptores V2 de vasopresina se origina una proteína más corta, de 339 aá, a diferencia del receptor V2 normal, el cual es un receptor que posee 371 aá.

## 4.3 Detección del mRNA del receptor V2 de vasopresina mediante hibridación *in situ*.

Se detectó el mRNA del receptor de vasopresina mediante hibridación *in situ*, para lo cual se diseñó una sonda antisentido que hibridizó con el mRNA en una zona correspondiente al tercer exón en el gen del receptor de vasopresina, compartida por ambas isoformas del receptor. La sonda se representó por una barra en el esquema de la figura 12.

En cerebelo de rata de 1 día, esta sonda hibridizó en forma específica en células con forma esférica, las cuales corresponden de acuerdo a su ubicación a precursoras

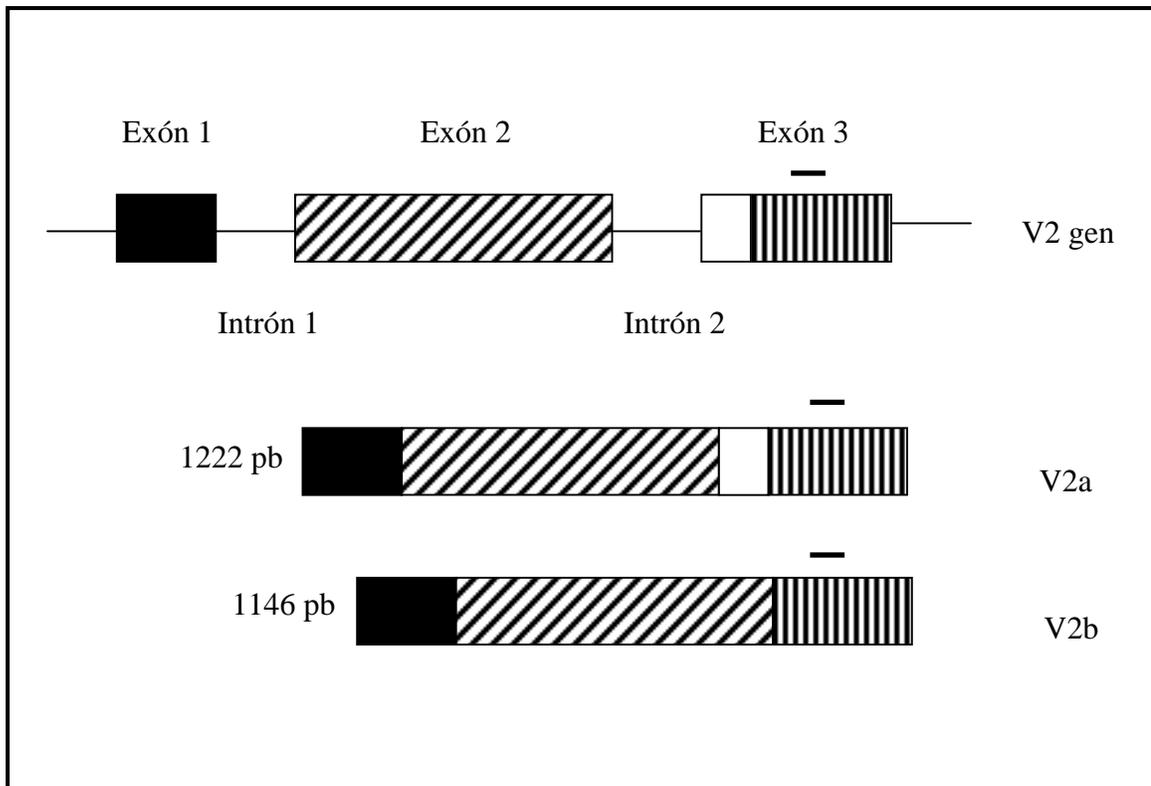
	1				50
CDS_V2A	ATGCTCCTGG	TGTCTACCGT	GTCCGCTGTG	CCTGGGCTCT	TTTCACCCCC
CDS_V2B	ATGCTCCTGG	TGTCTACCGT	GTCCGCTGTG	CCTGGGCTCT	TTTCACCCCC
	51				100
CDS_V2A	TAGCTCTCCC	AGCAACAGCA	GCCAGGAGGA	ACTACTGGAT	GACCGAGACC
CDS_V2B	TAGCTCTCCC	AGCAACAGCA	GCCAGGAGGA	ACTACTGGAT	GACCGAGACC
	101				150
CDS_V2A	CGCTGCTAGT	CCGGGCTGAA	CTGGCCCTGC	TATCTACAAT	TTTTGTGGCT
CDS_V2B	CGCTGCTAGT	CCGGGCTGAA	CTGGCCCTGC	TATCTACAAT	TTTTGTGGCT
	151				200
CDS_V2A	GTGGCCTTGA	GCAATGGCCT	AGTGCTGGGG	GCCCTAATAC	GGCGGGGCCG
CDS_V2B	GTGGCCTTGA	GCAATGGCCT	AGTGCTGGGG	GCCCTAATAC	GGCGGGGCCG
	201				250
CDS_V2A	GCGTGGACGC	TGGGCACCCA	TGCATGTCTT	CATCAGTCAT	TTGTGCCTGG
CDS_V2B	GCGTGGACGC	TGGGCACCCA	TGCATGTCTT	CATCAGTCAT	TTGTGCCTGG
	251				300
CDS_V2A	CTGACCTGGC	TGTGGCTCTG	TTTCAAGTGC	TACCCAGCT	GGCTTGGGAT
CDS_V2B	CTGACCTGGC	TGTGGCTCTG	TTTCAAGTGC	TACCCAGCT	GGCTTGGGAT
	301				350
CDS_V2A	GCCACTGACC	GCTTCCATGG	CCCTGATGCC	CTGTGTCGGG	CCGTCAAGTA
CDS_V2B	GCCACTGACC	GCTTCCATGG	CCCTGATGCC	CTGTGTCGGG	CCGTCAAGTA
	351				400
CDS_V2A	CCTGCAGATG	GTGGGCATGT	ATGCCTCCTC	CTACATGATC	CTGGCCATGA
CDS_V2B	CCTGCAGATG	GTGGGCATGT	ATGCCTCCTC	CTACATGATC	CTGGCCATGA
	401				450
CDS_V2A	CACTAGACCG	CCATCGTGCC	ATCTGCCGCC	CTATGCTAGC	ATACCGCCAT
CDS_V2B	CACTAGACCG	CCATCGTGCC	ATCTGCCGCC	CTATGCTAGC	ATACCGCCAT
	451				500
CDS_V2A	GGAGGTGGGG	CTCGCTGGAA	CAGGCCAGTG	CTGGTGGCCT	GGGCCTTCTC
CDS_V2B	GGAGGTGGGG	CTCGCTGGAA	CAGGCCAGTG	CTGGTGGCCT	GGGCCTTCTC
	501				550
CDS_V2A	ACTCCTTCTC	AGCCTGCCTC	AGCTCTTCAT	CTTTGCTCAG	CGTGATGTGG
CDS_V2B	ACTCCTTCTC	AGCCTGCCTC	AGCTCTTCAT	CTTTGCTCAG	CGTGATGTGG
	551				600
CDS_V2A	GAAATGGCAG	TGGGGTGTTT	GATTGCTGGG	CCCGATTTGC	AGAACCATGG
CDS_V2B	GAAATGGCAG	TGGGGTGTTT	GATTGCTGGG	CCCGATTTGC	AGAACCATGG
	601				650
CDS_V2A	GGCCTTCGTG	CCTATGTCAC	CTGGATTGCC	TTGATGGTGT	TTGTGGCACC
CDS_V2B	GGCCTTCGTG	CCTATGTCAC	CTGGATTGCC	TTGATGGTGT	TTGTGGCACC
	651				700
CDS_V2A	TGCCCTAGGC	ATTGCTGCCT	GTCAGGTTCT	TATCTTCCGG	GAGATACACG
CDS_V2B	TGCCCTAGGC	ATTGCTGCCT	GTCAGGTTCT	TATCTTCCGG	GAGATACACG
	701				750
CDS_V2A	CCAGTCTGGT	GCCAGGGCCA	TCCGAGAGGG	CAGGGAGGCG	CCGCAGAGGG
CDS_V2B	CCAGTCTGGT	GCCAGGGCCA	TCCGAGAGGG	CAGGGAGGCG	CCGCAGAGGG

	751				800
CDS_V2A	CGCCGGACAG	GAAGCCCCAG	CGAGGGAGCA	CATGTATCAG	CAGCCATGGC
CDS_V2B	CGCCGGACAG	GAAGCCCCAG	CGAGGGAGCA	CATGTATCAG	CAGCCATGGC
	801				850
CDS_V2A	CAAGACCGTG	AGGATGACAC	TGGTGATTGT	GATTGTCTAC	GTGCTATGCT
CDS_V2B	CAAGACCGTG	AGGATGACAC	TGGTGATTGT	GATTGTCTAC	GTGCTATGCT
	851				900
CDS_V2A	GGGCACCCTT	CTTCCTCGTG	CAGCTGTGGG	CAGCGTGGGA	TCCGGAAGCT
CDS_V2B	GGGCACCCTT	CTTCCTCGTG	CAGCTGTGGG	CAGCGTGGGA	TCCGGAAGCT
	901				950
CDS_V2A	CCTCTGGAAA	GACCCCCCTT	TGTGTTGCTC	ATGCTGCTGG	CTAGCCTTAA
CDS_V2B	CCTCTGGAAA	.....	.....	.....	.....
	951				1000
CDS_V2A	CAGCTGTACC	AACCCTTGGG	TCTATGCTTC	CTTCAGTAGC	AGTGTCTCCT
CDS_V2B	.....	.....	.....	.....TAGC	AGTGTCTCCT
	1001				1050
CDS_V2A	CGGAGTTGCG	TAGCCTGCTT	TGCTGTGCTC	AGAGGCACAC	CACACACAGC
CDS_V2B	CGGAGTTGCG	TAGCCTGCTT	TGCTGTGCTC	AGAGGCACAC	CACACACAGC
	1051				1100
CDS_V2A	CTGGGTCCCTC	AAGATGAATC	CTGTGCCACA	GCCAGCTCCT	CTTTGATGAA
CDS_V2B	CTGGGTCCCTC	AAGATGAATC	CTGTGCCACA	GCCAGCTCCT	CTTTGATGAA
	1101	1116			
CDS_V2A	GGATACACCC	TCCTGA			
CDS_V2B	GGATACACCC	TCCTGA			

**Fig 10: Alineamiento de secuencia nucleotídica deducida para receptores V2 de vasopresina:** Los nucleótidos marcados en color gris representan secuencias consensos para ambos receptores, mientras que la zona mostrada en amarillo corresponde a la delección de 76 nucleótidos que se produce en la nueva isoforma V2b producto del empalme alternativo al tercer exón.

	1				50
V2A	MLLVSTVSAV	PGLFSPPSSP	SNSSQEELLD	DRDPLLVRAE	LALLSTIFVA
V2B	MLLVSTVSAV	PGLFSPPSSP	SNSSQEELLD	DRDPLLVRAE	LALLSTIFVA
	51				100
V2A	VALSNGLVLG	ALIRRGRRGR	WAPMHVFISH	LCLADLAVAL	FQVLPQLAWD
V2B	VALSNGLVLG	ALIRRGRRGR	WAPMHVFISH	LCLADLAVAL	FQVLPQLAWD
	101				150
V2A	ATDRFHGPDA	LCRAVKYLQM	VGMYASSYMI	LAMTLDRHRA	ICRPMLAYRH
V2B	ATDRFHGPDA	LCRAVKYLQM	VGMYASSYMI	LAMTLDRHRA	ICRPMLAYRH
	151				200
V2A	GGGARWNRPV	LVAWAFSLLL	SLPQLFIFAQ	RDVGNGSGVF	DCWARFAEPW
V2B	GGGARWNRPV	LVAWAFSLLL	SLPQLFIFAQ	RDVGNGSGVF	DCWARFAEPW
	201				250
V2A	GLRAYVTWIA	LMV FVAPALG	IAACQVLIFR	EIHASLVPGP	SERAGR RRRG
V2B	GLRAYVTWIA	LMV FVAPALG	IAACQVLIFR	EIHASLVPGP	SERAGR RRRG
	251				300
V2A	RRTGSPSEGA	HVSAAMAKTV	RMTLVIVIVY	VLCWAPFFLV	QLWAAWDPEA
V2B	RRTGSPSEGA	HVSAAMAKTV	RMTLVIVIVY	VLCWAPFFLV	QLWAAWDPEA
	301				350
V2A	PLERPPFVLL	MLLASLNSCT	NPWIYASFSS	SVSSELRSLL	CCAQRHTTHS
V2B	PLEIAVSPRS	CVACFAVLRG	TPHTAWVLKM	NPVPQPAPL.	.....
	351		371		
V2A	LGPQDESCAT	ASSSLMKDTP	S		
V2B	.....	.....			

**Figura 11: Alineamiento de secuencia aminoacídica deducida para receptores V2 de vasopresina:** En gris se aprecia aquellos aminoácidos idénticos para las dos secuencias. El cambio en el marco de lectura para la isoforma V2b es marcado con amarillo.



**Figura 12: Esquema de hibridación de sondas en el gen del receptor V2 de vasopresina:** La caja llena corresponde al primer exón, la caja listada en forma oblicua corresponde al segundo exón. El tercer exón se presenta compuesto por dos cajas, una vacía y otra listada en forma vertical, el comienzo y el final de la caja blanca corresponde a sitios aceptores de empalme para formar el mRNA maduro. Las barras corresponden a la ubicación de los oligonucleótidos biotinilados sentido y antisentido utilizados para la hibridación *in situ*.

de las células de Purkinje, como se puede observar en la figura 13 B. No hay reactividad al hibridizar con la sonda sentido correspondiente, figura 13A.

En cerebelo de rata de 5 días se puede observar la reactividad de la sonda en las células de Purkinje, como se observa en la figura 14 B. Estas células ya tienen una morfología típica, lo cual es de esperar después del cuarto día de desarrollo postnatal. No hay reactividad al hibridizar con la sonda sentido correspondiente, figura 14 A.

En cerebelo de rata de 15 días se observa reactividad en las células de Purkinje y además, en procesos que nacen de estas células (figura 15 B). No hay reactividad al hibridizar con la sonda sentido correspondiente, figura 15 A.

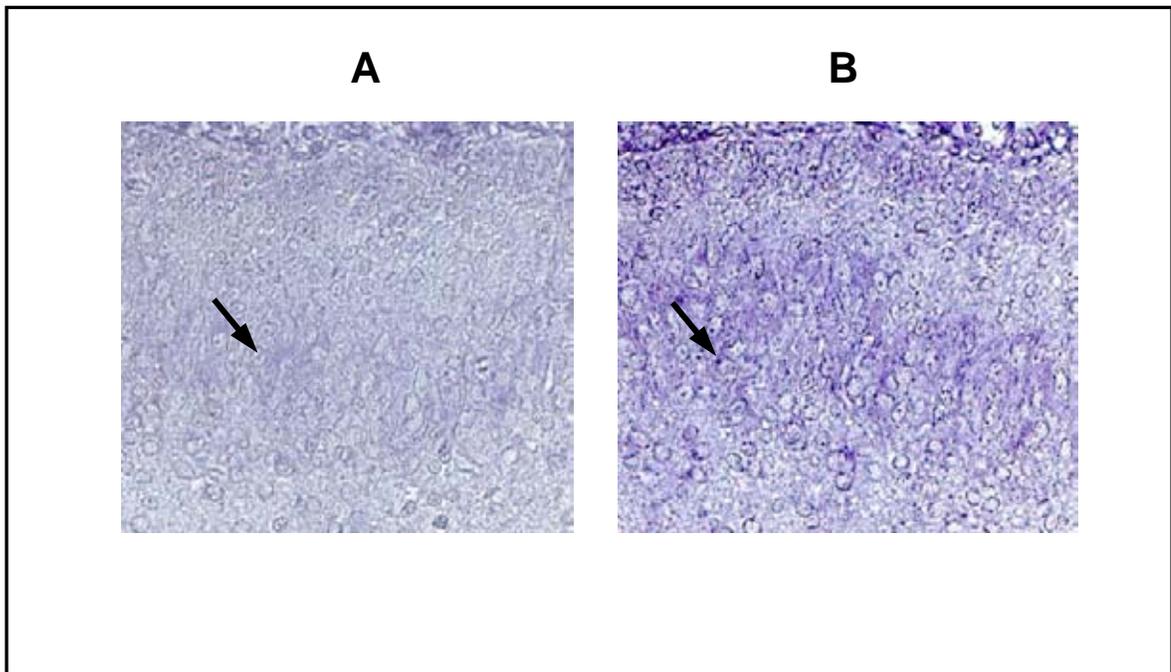
En cerebelo de 30 días se observa una reactividad marcada sólo en el cuerpo celular de las células de Purkinje (figura 16 B). No hay reactividad al hibridizar con la sonda sentido correspondiente, figura 16 A.

En la figura 17 se pueden observar todos los estadios de desarrollo simultáneamente. Se denota un dinamismo en la distribución del mensajero a través el tiempo.

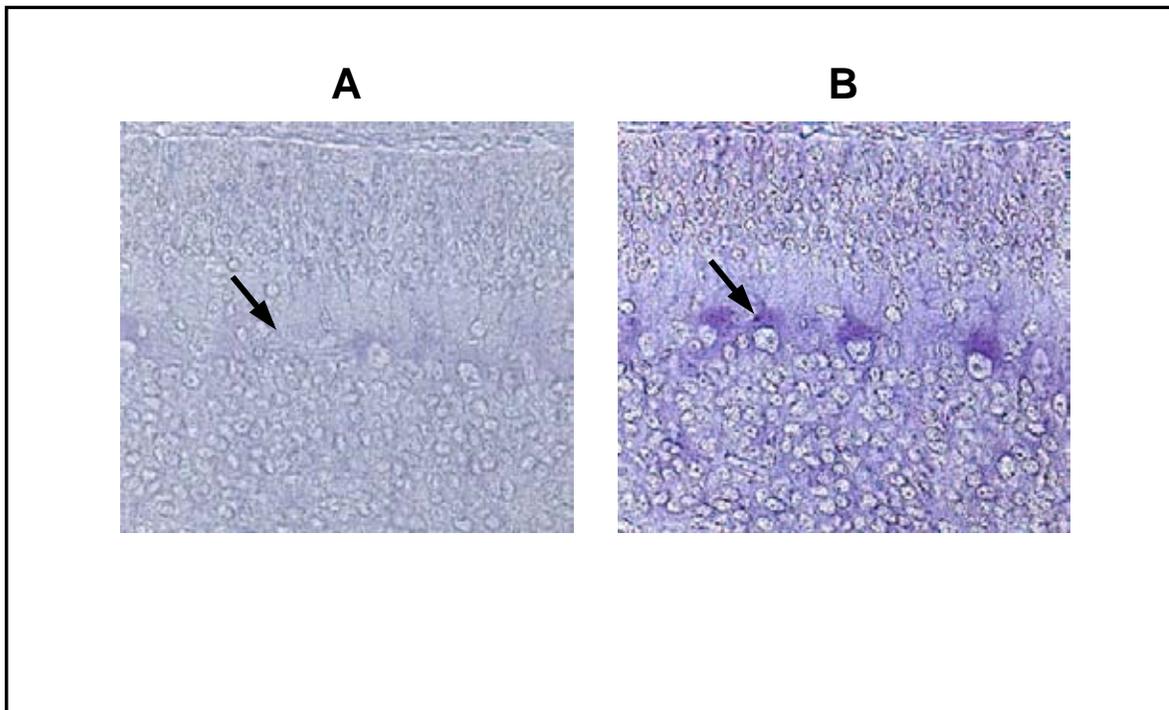
#### **4.4 Inmunodetección de las isoformas del receptor V2 de vasopresina en cerebelo de rata en distintas etapas del desarrollo.**

##### **4.1 Caracterización del antisuero anti-receptor V2b**

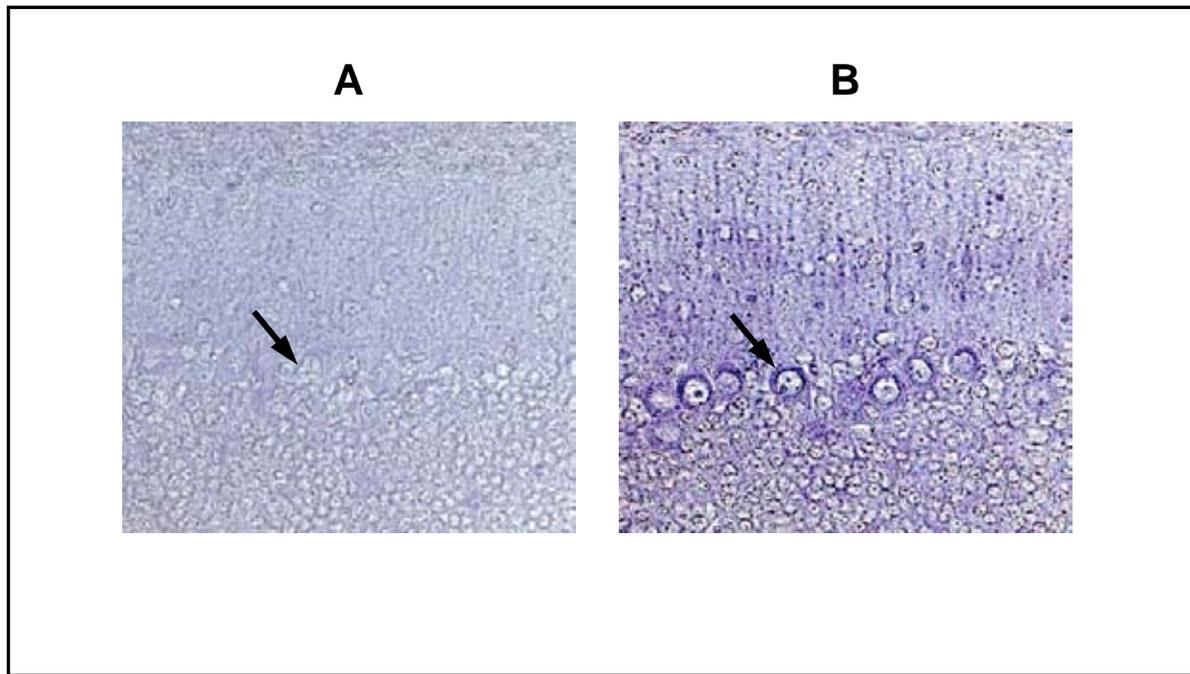
El antisuero anti-V2b fue fabricado contra un péptido que corresponde a la porción carboxilo terminal del receptor V2b de vasopresina (Urra, 2003). Células MDCK fueron



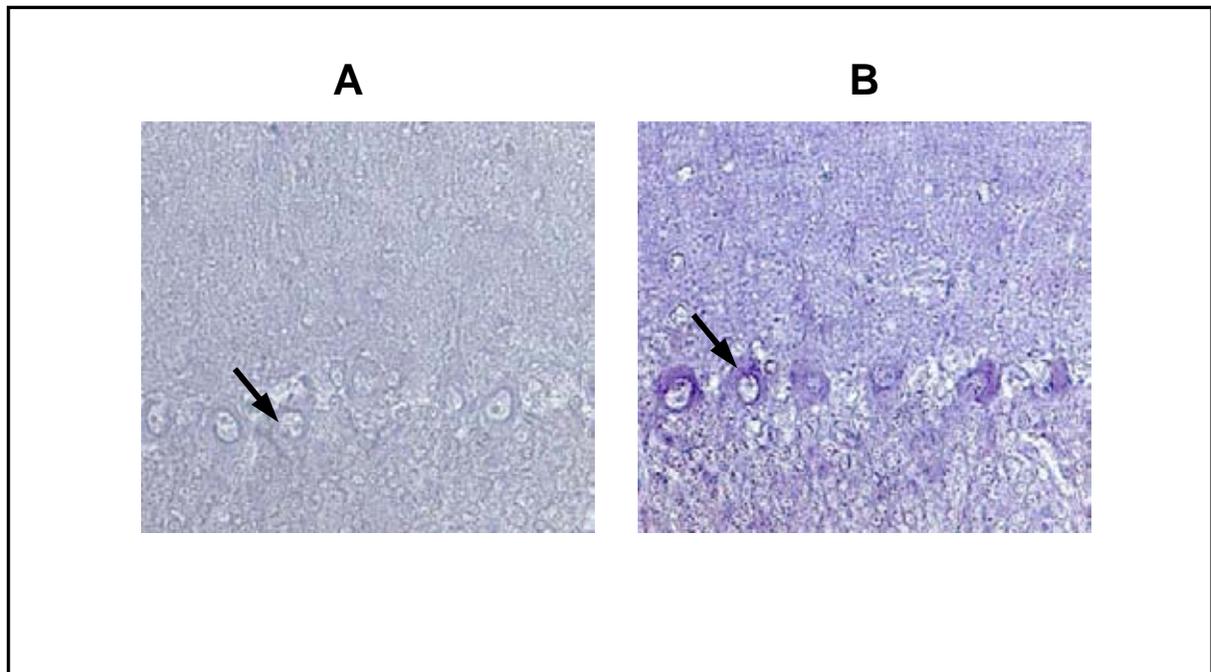
**Figura 13: Hibridación *in situ* del mRNA del receptor V2 de vasopresina en cerebelo de rata de 1 día. A-Control con la sonda sentido. B-Hibridación con sonda antisentido que detecta el receptor V2 de vasopresina en cerebelo de rata de 1 día. Aumento: 40X.**



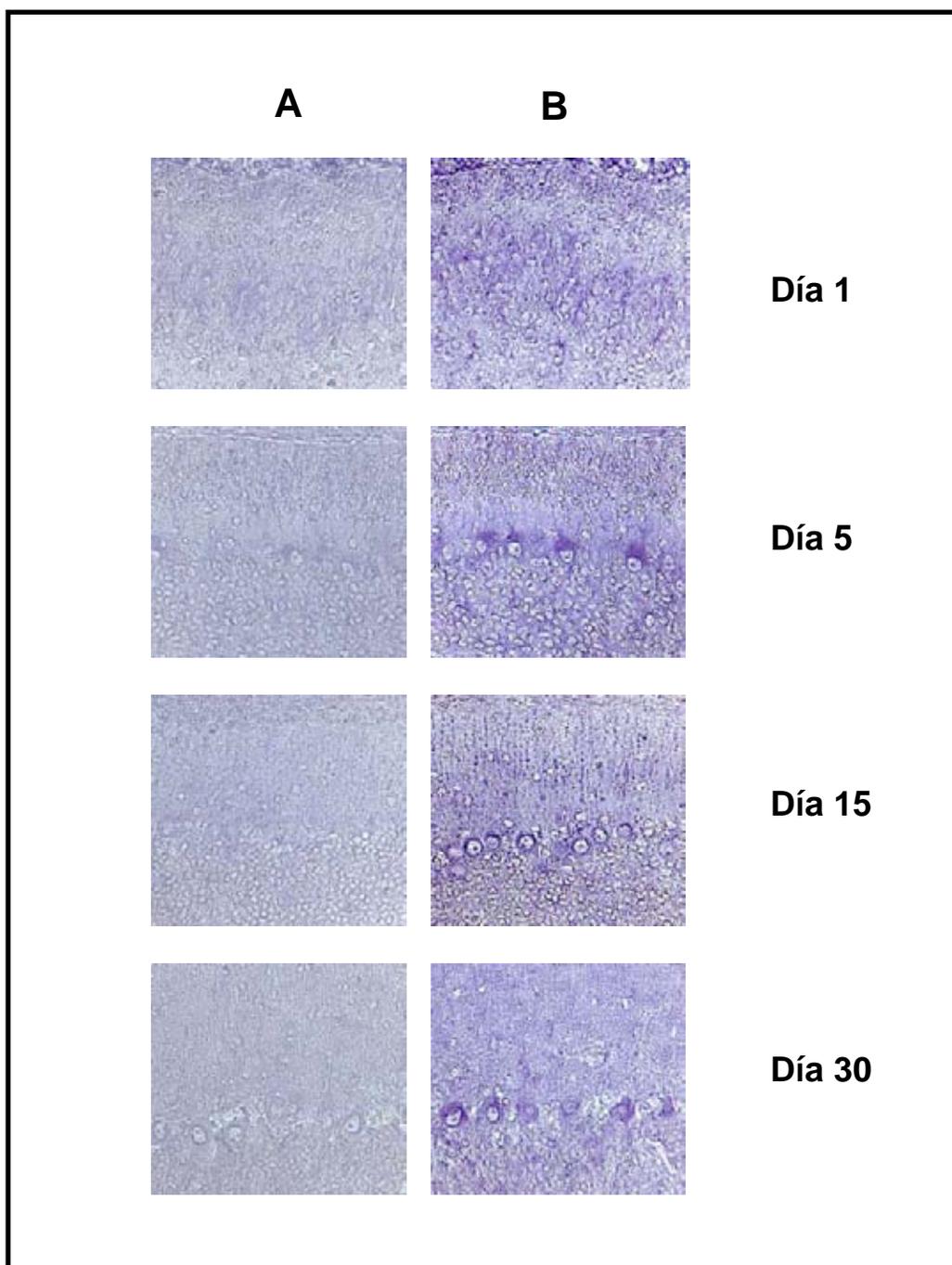
**Figura 14: Hibridación *in situ* del mRNA del receptor V2 de vasopresina en cerebelo de rata de 5 días. A-Control con la sonda sentido. B-Hibridación con sonda antisentido que detecta el receptor V2 de vasopresina en cerebelo de rata de 5 días. Aumento: 40X.**



**Figura 15: Hibridación *in situ* del mRNA del receptor V2 de vasopresina en cerebelo de rata de 15 días. A-Control con la sonda sentido. B-Hibridación con sonda antisentido que detecta el receptor V2 de vasopresina en cerebelo de rata de 15 días. Aumento: 40X.**



**Figura 16: Hibridación *in situ* del mRNA del receptor V2 de vasopresina en cerebelo de rata de 30 días. A-Control con la sonda sentido. B-Hibridación con sonda antisentido que detecta el receptor V2 de vasopresina en cerebelo de rata de 30 días. Aumento: 40X.**



**Figura 17: Hibridación *in situ* del mRNA del receptor V2 de vasopresina en cerebelo de rata de diferentes edades. A-Control negativo con la sonda sentido. B-Hibridación con sonda antisentido que detecta el receptor V2 de vasopresina. Aumento: 40X.**

transfectadas establemente con la quimera V2b-GFP. Para caracterizar el receptor V2b se usó Western blotting. Las membranas de células transfectadas y no transfectadas fueron inmunodetectadas con un anticuerpo anti-GFP (figura 18, Anti: GFP). Se detectó la banda esperada para la quimera. Al inmunodetectar con el antisuero anti-V2b (figura 18, Anti-V2b) se logró detectar la misma banda lo cual nos indica que el anticuerpo detecta el receptor V2b. Las células MDCK no expresan este receptor, ni tampoco la proteína GFP en forma endógena. Lo anterior se confirma porque ninguno de los dos anticuerpos detectó señal en los carriles donde se presentan las células no transfectadas.

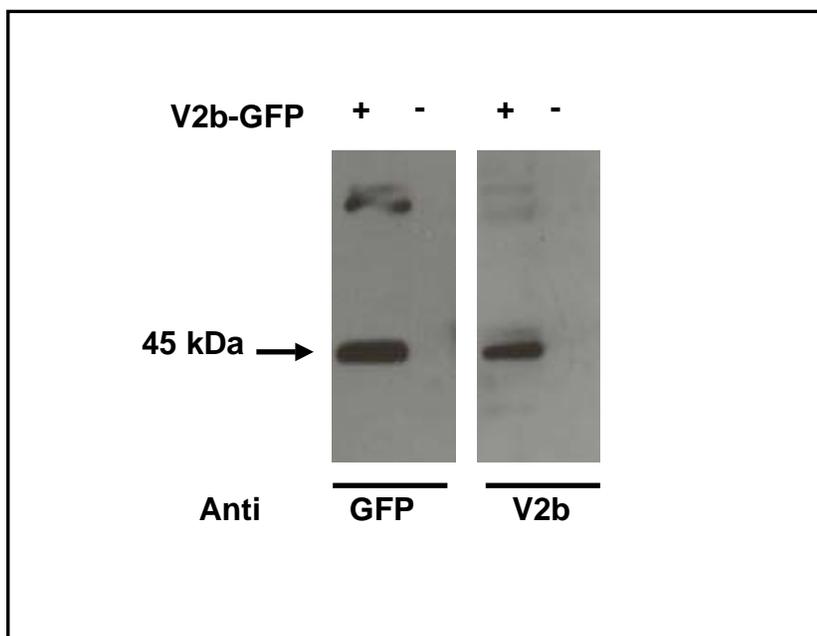
#### **4.4.2 Inmunodetección de la isoforma V2b del receptor de vasopresina**

Un anticuerpo anti-V2b fue generado contra un péptido de 14 aminoácidos correspondiente a la porción carboxilo terminal de esta proteína. La porción carboxilo terminal es distinta entre la isoforma V2a y V2b, y por lo tanto este anticuerpo es específico para la isoforma V2b (Urra, 2003).

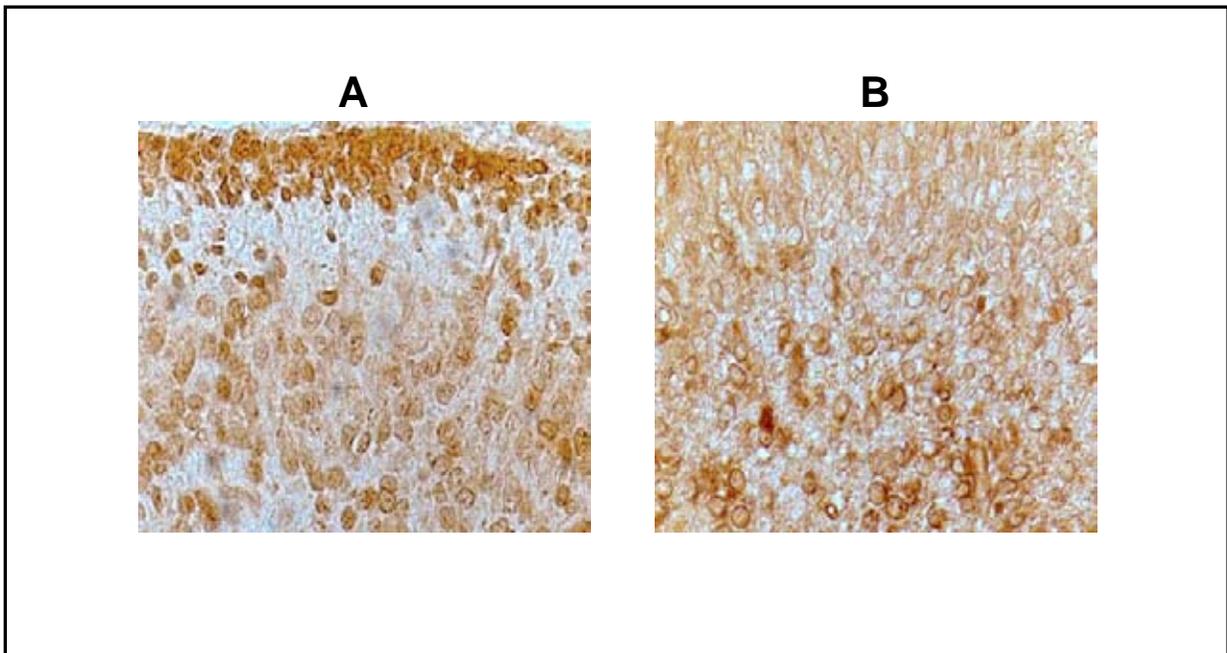
Se procedió a la inmunodetección en la forma que se detalla en métodos 3.2.4 en cortes de cerebelo de rata de 1, 5, 15 y 30 días. La inmunodetección se observó discretamente en el día 1 postnatal, figura 19 A.

En el día 5, figura 20 A, se puede observar que la inmunodetección del receptor V2b de vasopresina está localizada en el soma y dendritas de las células de Purkinje.

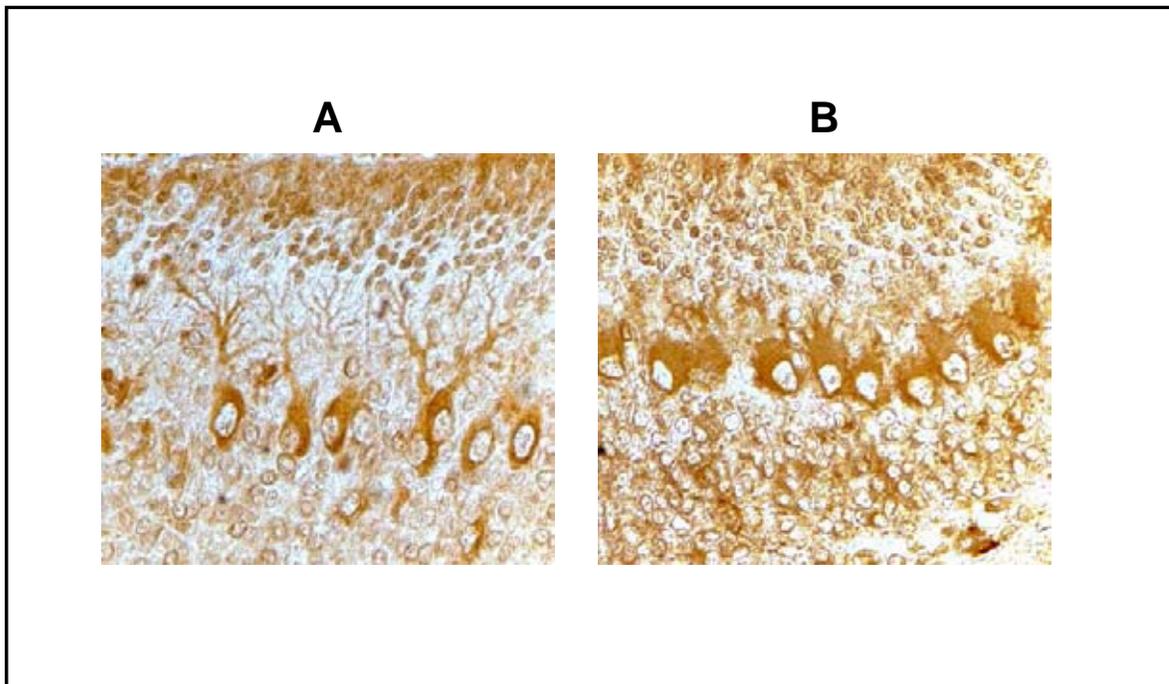
También se aprecia el cambio morfológico que se establece a partir del día 4 postnatal en las células de Purkinje. Avanzando en el desarrollo, se puede observar en



**Figura 18: Identificación de la isoforma V<sub>2b</sub> del receptor V<sub>2</sub> de vasopresina mediante Western Blotting en células MDCK.** El antisuero específico para la isoforma V2b fue generado a partir de un péptido de 14 residuos aminoacídicos de la región carboxiloterminial distinta entre ambas isoformas.



**Figura 19: Inmunolocalización de la isoforma V2b y del receptor V2 de vasopresina en secciones de cerebelo de rata de 1 día. A-** Inmunodetección con anticuerpo específico para la isoforma V2b. **B-** Inmunodetección con anticuerpo específico para el receptor V2 en las células de Purkinje de cerebelo de rata de 1 día. Aumento: 40X.



**Figura 20: Immunolocalización de la isoforma V2b y del receptor V2 de vasopresina en secciones de cerebelo de rata de 5 días. A:** Inmunodetección con anticuerpo específico para la isoforma V2b. **B:** Inmunodetección con anticuerpo específico para el receptor V2 en las células de Purkinje de cerebelo de rata de 5 días. Aumento: 40X.

la figura 21 A, que corresponde al día 15 postnatal, que la localización de la isoforma V2b persiste en las células de Purkinje. Estas células ya han cambiado su morfología destacando la formación de procesos radiales que se extienden a través de la capa molecular de la corteza cerebelosa. Los procesos radiales corresponden a los axones de las células de Purkinje.

En el día 30 se puede observar la inmunotinción reducida solamente a los somas de las células de Purkinje (figura 22 A).

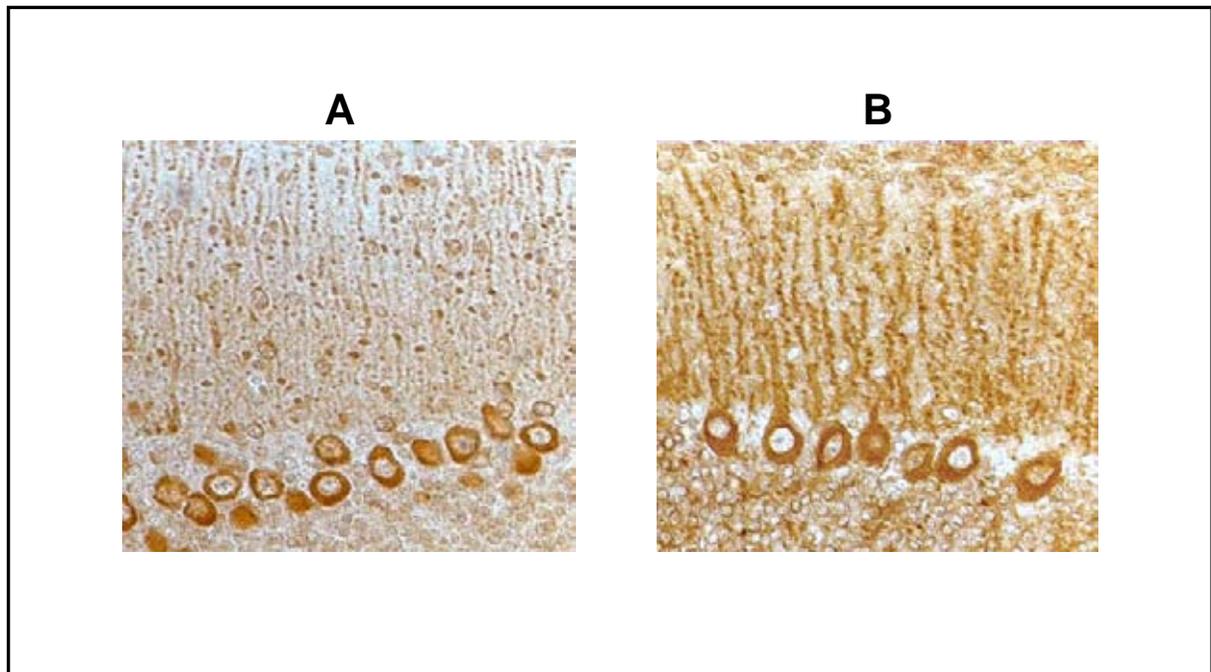
En la figura 23, columna A, podemos observar en forma simultánea la inmunodetección con el anticuerpo anti-V2b, la cual cambia dinámicamente a través el desarrollo.

#### **4.4.3 Inmunodetección de la isoforma V2 del receptor de vasopresina**

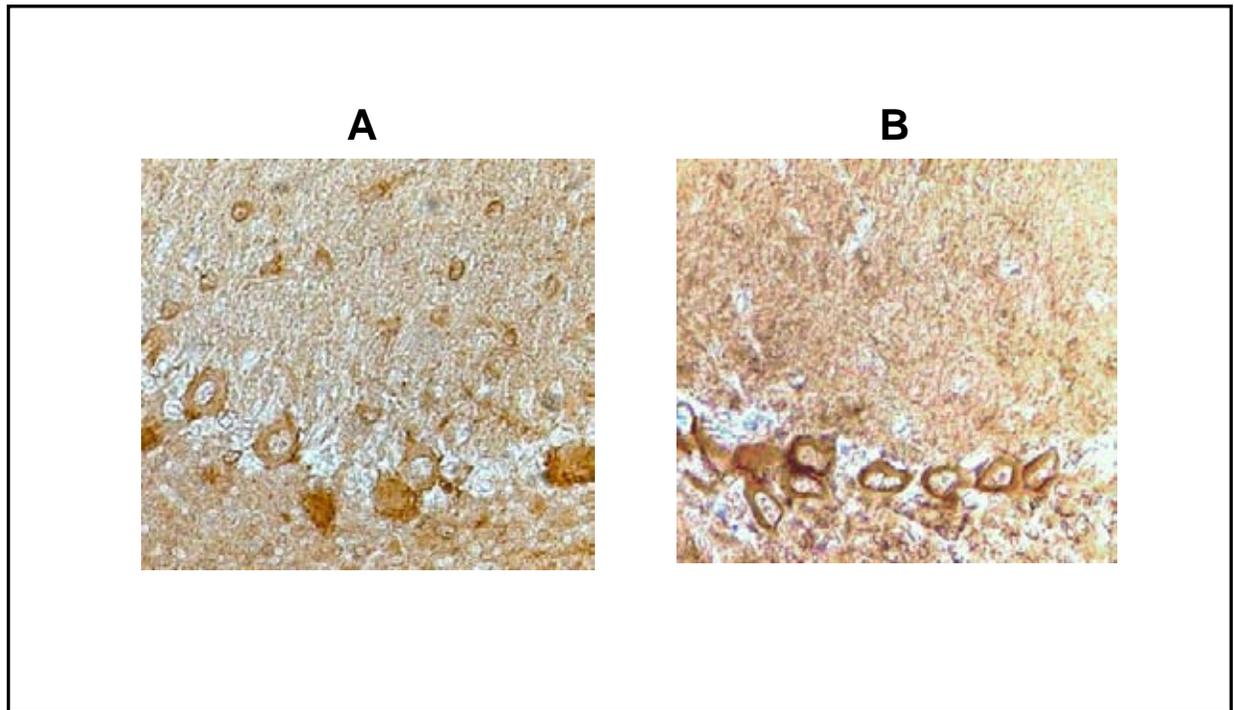
Se utilizó un suero específico contra el receptor V2. Fue generado contra una zona común para ambas isoformas del receptor, el cuarto “loop” intracelular. Por lo tanto, la detección observada corresponde a la sumatoria de la expresión de ambas isoformas (Urra, 2003). Se utilizó cerebelo de 1, 5, 15 y 30 días para proceder como se describe en el apartado Métodos 3.2.4.

La inmunorreacción para el receptor V2 de vasopresina se localizó en las células de Purkinje en todas las edades que fueron utilizadas.

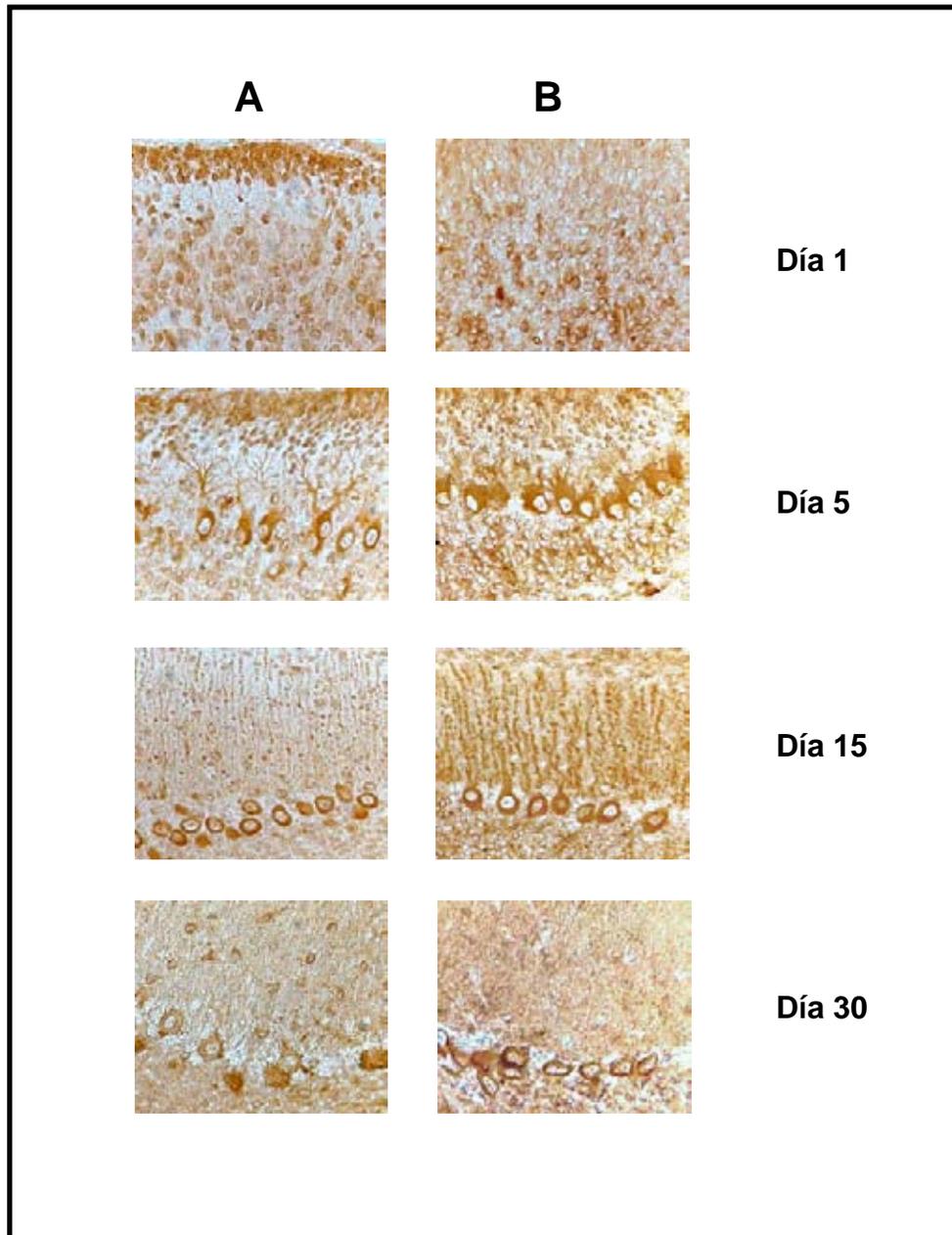
En el día 1 postnatal, se puede observar claramente la distribución de la marca en células de forma circular ubicadas en la posición en que deben encontrarse las células de Purkinje, figura 19 B.



**Figura 21: Inmunolocalización de la isoforma V2b y del receptor V2 de vasopresina en secciones de cerebelo de rata de 15 días. A:** Inmunodetección con anticuerpo específico para la isoforma V2b. **B:** Inmunodetección con anticuerpo específico para el receptor V2 en las células de Purkinje de cerebelo de rata de 15 días. Aumento: 40X.



**Figura 22: Inmunolocalización de la isoforma V2b y del receptor V2 de vasopresina en secciones de cerebelo de rata de 30 días. A:** Inmunodetección con anticuerpo específico para la isoforma V2b. **B:** Inmunodetección con anticuerpo específico para el receptor V2 en las células de Purkinje de cerebelo de rata de 30 días. Aumento: 40X.



**Figura 23: Inmunolocalización de la isoforma V2b y del receptor V2 de vasopresina en secciones de cerebelo de rata de distintas edades. A:** Inmunodetección con anticuerpo específico para la isoforma V2b. **B:** Inmunodetección con anticuerpo específico para el receptor V2. Aumento: 40X.

En la figura 20 B se puede observar la inmunodetección para el receptor V2 en el cuerpo celular de las células de Purkinje. Diferente es lo que ocurre con la distribución de la inmunodetección en esta misma edad para el receptor V2b de vasopresina, figura 20 A. Esta distribución comprende el soma y las dendritas de estas células.

En la figura 21 B se observa una marcada inmunotinción para el receptor V2 de vasopresina. Si se compara con la inmunotinción para la isoforma V2b, figura 21 A, se puede notar un incremento notorio de la marca a nivel del soma y dendritas de las células de Purkinje.

En el día 30 postnatal la inmunotinción del receptor V2 disminuye en comparación con el día 15 y se localiza solamente en el soma de las células de Purkinje (figura 22 B). En comparación con la expresión de la isoforma V2b en este mismo estadio del desarrollo (figura 22 A), la expresión del receptor V2 es más intensa. Lo que es lógico si pensamos que la inmunodetección V2 corresponde a la sumatoria de las isoformas V2a y V2b, en estas células se detecta en forma individual la isoforma V2b, y además se espera que este acompañada del receptor V2a.

En la figura 23, columna B, podemos observar en forma simultánea la expresión de ambas isoformas del receptor V2 de vasopresina a través del desarrollo. Aquí se denota un cambio dinámico, que es diferente al que se observa para la isoforma V2b.

## 5. DISCUSIÓN

Previamente, mediante RT-PCR, el mRNA del receptor V2 de vasopresina fue encontrado en riñón de ratas adultas, mientras que en ratas recién nacidas el mRNA del receptor V2 de vasopresina fue encontrado, no sólo en riñón, sino también, en cerebro. En cerebros de rata, los niveles de mRNA del receptor V2 de vasopresina disminuyen con la edad y no pueden ser detectados en ratas de más de dos semanas de vida.

Nuestros resultados demuestran la expresión extrarrenal del receptor V2 de vasopresina en cerebros de rata recién nacida. Por lo tanto la expresión se ve alterada dinámicamente en el proceso de desarrollo (Hirasawa y colaboradores, 1994). Existe la posibilidad de que este mensajero no desaparezca, sino que la proporción de mensajero sobre cantidad de masa cerebral sea menor, y por lo tanto el mensajero resulte indetectable mediante RT-PCR.

Existen dos isoformas del receptor V2 de vasopresina, V2a y V2b (Sarmiento y colaboradores, 2004), las cuales fueron estudiadas mediante diversas técnicas en sistema nervioso central, en especial en cerebelo. Se tomaron zonas discretas de los diversos tejidos para aumentar la proporción de los mensajeros específicos para las isoformas del receptor de vasopresina sobre la masa de tejido cerebral. Los sectores discretos fueron: corteza cerebral, tronco cerebral y cerebelo. La isoformas V2a y V2b se expresaron en todos los sectores investigados. Además de las isoformas canónica y de empalme alternativo se puede observar otro producto de amplificación por RT-PCR de un tamaño aproximado de 500pb que corresponde al mRNA del receptor V2 de vasopresina sin procesar. Por otro lado, la expresión de estos mRNA sufrió un cambio dinámico en su cantidad relativa al ser monitoreados a través del tiempo. Con

anterioridad se observó que la expresión del mRNA del receptor V2 de vasopresina en el hipocampo cambia dinámicamente durante los procesos de desarrollo (Kato, 1995). La proporción que se observa entre los productos de amplificación de las isoformas V2a y V2b en sistema nervioso central son distintas a las observadas normalmente en el riñón. En riñón no se observa ningún cambio a través del desarrollo siendo la expresión de la isoforma V2b un 15% de la expresión de la isoforma V2a (Firsov y colaboradores, 1994).

Si bien se expresaron los mRNA de la isoforma V2a y V2b del receptor V2 de vasopresina en estos sectores discretos, faltaba determinar en qué tipos celulares se expresaban estas isoformas, lo cual fue dilucidado mediante la técnica de hibridación *in situ*. El mensajero para el receptor de vasopresina en el cerebelo fue localizado en las células de Purkinje. Sin embargo, la técnica no permitió discriminar entre las dos isoformas debido a que la secuencia nucleotídica es igual, excepto que la isoforma V2b contiene 76 bases menos. Al estudiar el comportamiento de estos mRNA a través del tiempo se observa que su ubicación se mantiene en las células de Purkinje y sufre un cambio en su distribución dentro de la célula. Se pudo observar una redistribución de los mensajeros en el interior de los dominios subcelulares. Las células de Purkinje comienzan a tomar su forma característica a partir del día 4 postnatal y cerca del día 30 termina su cambio morfológico. Es sabido que en las neuronas la síntesis de proteína ocurre fundamentalmente en el soma neuronal, por lo tanto estos cambios pueden ser el reflejo del proceso de diferenciación celular ocurrido durante la ontogenia del SNC.

Para investigar la expresión de los receptores V2 de vasopresina a nivel proteico, se fabricaron anticuerpos específicos para el receptor V2b y para el receptor V2 (V2a y

V2b). Nuestro trabajo es el primero en describir la presencia de los receptores por medio de inmunocitoquímica en el sistema nervioso central y específicamente en el cerebelo. En el día 1 postnatal, ambas isoformas se expresan discretamente en células esféricas que aproximadamente en el día 4 postnatal, comienzan a diferenciarse en las células de Purkinje. En el día 5 las células ya han adoptado una forma más diferenciada y expresan ambos receptores. Pero se diferencian en la distribución, ya que V2b se expresa en las dendritas de estas células en esta etapa y con el anticuerpo anti V2 no se detectó en esta estructura. Esto puede ser explicado por los anticuerpos son generados en contra de epitopes diferentes. Esta expresión y distribución de la proteína es coincidente con la expresión del mensajero para dichas isoformas. Estas evidencias nos permiten afirmar concluyentemente que ambas isoformas del receptor V2 de vasopresina se expresan en cerebelo de rata.

El cerebelo no ha estado exento de ser relacionado con vasopresina y sus receptores. Lepetit y colaboradores (1993) detectaron mediante hibridación *in situ* en cerebelo y otras secciones distintas al núcleo supraóptico y paraventricular del hipotálamo, el mRNA del neuropéptido vasopresina. Los niveles más altos (0,3–0,2 pmol/g), medidos por autorradiografía cuantitativa, fueron observados en el lóbulo posterior de la pituitaria y las capas granulares del cerebelo y giro dentado.

Hawthorn y colaboradores (1980) también detectaron vasopresina en cerebelo, pero lo hicieron mediante radioinmunoensayo sensible.

Además de esto existen pequeñas neuronas que contienen vasopresina, conocidas por dar origen a los sistemas de fibras que se extienden a través del cerebro y de la médula espinal, que podrían llegar hasta el cerebelo. Las funciones intrínsecas

de estos sistemas de fibras no son conocidas (Niermann y colaboradores, 2001). También fueron descritos sitios de unión para [<sup>3</sup>H]AVP en fracciones microsomales de lugares discretos, entre los cuales se cuenta el cerebelo. En este sector la unión de [<sup>3</sup>H]AVP fue de 200 fmol/ mg de proteína (Pearlmutter y colaboradores, 1983).

Existen algunos sitios de unión para vasopresina que se expresan transitoriamente en el cerebro de fetos de rata e infantes, que probablemente representan receptores neuronales funcionales, ya que tienen la misma afinidad y selectividad por el ligando que los sitios de unión para AVP presentes en adultos. Esto sugeriría que AVP no solamente actúa como un neuropéptido en el cerebro adulto sino que puede jugar un rol significativo durante la maduración del sistema nervioso central (Tribollet y colaboradores, 1991).

Esta hipótesis es apoyada por el hecho de que vasopresina está presente tempranamente en el cerebro, y tiene varias acciones mitogénicas, metabólicas y fisiológicas. Además, la ausencia de vasopresina cerebral en la rata mutante Brattleboro coincide con un deterioro del desarrollo cerebral y algunos defectos fisiológicos y conductuales de esas ratas, que no son mejorados con el tratamiento con vasopresina. Regionalmente, el cerebelo parece ser el área cerebral más afectada, morfológica y bioquímicamente. Solamente cuando la suplementación con vasopresina se hace prenatalmente, este desorden puede ser restaurado, lo cual sugiere un rol temprano para vasopresina en la neurogénesis (Boer, 1985).

Los receptores sobre los cuales vasopresina está actuando, podrían ser aquellos que en esta tesis fueran encontrados expresándose en células de Purkinje de cerebelo a nivel de mRNA y proteína. Algo relevante en este sentido es que la expresión se

presenta por lo menos a partir del día 1, cuando sólo se observa un esbozo de lo que será el cerebelo.

Un posible ligando para estos receptores en el cerebelo podría ser el metabolito cerebral pGlu-Asn-Cyt-Pro-Arg, AVP (4-8) (Yu-Cang Du y colaboradores, 1994) o AVP (4-9) (Hirasawa y colaboradores, 1994). Ambos metabolitos tiene efectos documentados sobre la memoria y el aprendizaje. Hirasawa y colaboradores (1994) postulan que el efecto de AVP (4-9) es mediado por un nuevo subtipo de receptor distinto de V1a, V1b o V2.

En nuestro laboratorio (Sarmiento y colaboradores, 2004), se ha descrito la regulación de la expresión del receptor V2a de vasopresina mediada por la variante de empalme alternativo, V2b. Esta regulación se produce por oligomerización. Es posible entonces que la oligomerización altere las propiedades farmacológicas del receptor V2, adquiriendo éste nuevas propiedades distintas a las de los receptores ya descritos. Es importante recalcar que en el cerebelo se expresan ambas isoformas del receptor V2 en una proporción de aproximadamente 1:1, lo cual es completamente diferente a lo observado en riñón.

En neuronas de hipocampo de rata, vasopresina activa receptores V1a y V2, siendo capaz de activar ambas señales de transducción, pero una de ellas potencia a la otra (Omura y colaboradores, 1999). Por lo tanto, estos resultados indican que existirían receptores funcionales para varias isoformas del receptor de vasopresina y que podrían interactuar.

Existen diversas acciones biológicas desplegadas después de la estimulación con AVP, entre las cuales se destacan memoria y aprendizaje (de Wied, 1965),

comportamiento social en mamíferos monógamos (Stribley y colaboradores, 1999), regulación del volumen celular en astrocitos (Sarfraz y colaboradores, 1999) y potenciación de crisis inducidas por inyección intracerebroventricular del agonista muscarínico pilocarpina (Croset y colaboradores, 1997). Aún no se dilucida el receptor mediante el cual AVP genera tales funciones. Se postula que podría ejercer estas funciones como neurotransmisor o como neuromodulador, siendo más probable esta última alternativa, ya que todos los receptores para neuropéptidos descritos hasta el momento, incluyendo AVP, son de la superfamilia GPCR. Esto sugiere que los neuropéptidos no activan ni inhiben directamente la excitabilidad neuronal, sino que más bien alteran la sensibilidad de las neuronas a otras aferencias, es decir, actuarían como moduladores de la transmisión sináptica.

Como antes se dijo, en riñón y en cerebelo se expresan las dos isoformas del receptor V2 de vasopresina. Una posibilidad es que vasopresina controle o module el flujo de agua en el cerebro, haciendo un paralelo con la situación en el riñón, donde vasopresina controla el flujo de agua por regulación de la translocación y expresión de acuaporina 2 (Nielsen, 1995, Andersen-Beckh, 1999). Una acuaporina altamente expresada en la neurópila cerebral es acuaporina 4. Vasopresina podría estar ejerciendo un rol a nivel de regulación de agua por las siguientes razones: primero, vasopresina es endógena en el cerebro, y el cerebro tiene un sistema de fibras intrínseco que contiene vasopresina. Segundo, vasopresina incrementa la velocidad de cambio de volumen inducido por osmolaridad de astrocitos en cultivo (Niermann y colaboradores, 2001). Además, a partir del día 7 postnatal los niveles de mRNA de acuaporina 4 en la capa de células de Purkinje se ven incrementados y se mantienen

así hasta la adultez. La expresión de este mRNA también se observa en los procesos de Bergmann (Wen y colaboradores, 1999). Sin embargo, habría que demostrar que aquaporina 4 es regulada por AVP.

Kato y colaboradores (1995), ya describieron la expresión del mRNA del receptor V2 de vasopresina en cerebelo. Nuestro aporte consiste en describir la expresión de la isoforma de empalme alternativo V2b en cerebelo, complementariamente a la isoforma V2a. Además, no solamente se describió la expresión a nivel del mensajero sino también a nivel de la proteína. Otro aporte consiste en que la ubicación celular en cerebelo de ambos mensajeros y proteínas en las células de Purkinje. Ambas isoformas se expresan en células principales de túbulo colector de riñón de rata (Urra, 2003). Esto es congruente con los reportes de Sarmiento y colaboradores (2004) sobre la posible función de la isoforma V2b. Esta isoforma del receptor secuestra al receptor V2a por oligomerización, cambiando los parámetros funcionales de la unión a vasopresina.

El cerebelo está subdividido en módulos parasagitales definidos según criterios anatómicos, fisiológicos y bioquímicos. Existen a lo menos tres clases de bandas organizadas sagitalmente de células de Purkinje, de acuerdo a las proteínas marcadoras que expresan (Leclerc y colaboradores, 1992). Sería importante, por lo tanto, determinar en cuáles de estos sectores se expresan ambas isoformas del receptor V2 de vasopresina, y si en realidad la expresión de estos receptores está ubicada en la misma célula.

## 6. BIBLIOGRAFIA

- Antoni, F. Novel ligand specificity of pituitary vasopressin receptors in the rat. *Neuroendocrinology* 39:186-188, 1984.
- Andersen-Beckh, B., Dehe, M., Schulein, R., Wiesner., Rutz, C., Liebenhoff, U., Rosenthal, W. y A. Oksche. Polarized expression of the vasopressin V2 receptor in Mandin-Darby canine kidney cell. *Kidney Int.* 56:517-527, 1999.
- Birnbaumer, M. Vasopressin receptors. *TEM* 11:406-410, 2000.
- Boer G. J. Vasopressin and brain development: Studies using the Brattleboro rat. *Peptides* 6: 49-62, 1985.
- Croset G. y D. de Wied. Proconvulsive effect of vasopressin; mediation by a putative V2 receptor subtype in the central nervous system. *Brain res.* 759:18-23, 1997.
- de wied, D. Influence of the posterior and intermediate lobe of the pituitary and pituitary peptides of the maintenance of a conditioned avoidance response in rats. *Int J Neuropharmacol.* 4:157-167, 1965.
- Firsov, D., Mandon, B., Morel, A., Merot, J., Le Maout, S., Bellanger, A. C., de Rouffignae, C., Elalouf, J. M. y J. M. Buhler. Molecular analysis of vasopressin receptors in the rat nephron. Evidence for alternative splicing of the V2 receptor. *Pflugers Arch.* 429:79-89, 1994.
- González, C. B., Figueroa, C. D., Reyes, C. E., Caorsi, C. E., Troncoso, S., y Menzel, D. Immunolocalitation of V1 vasopressin receptors in the rat kidney using anti-receptor antibodies. *Kidney int.* 52:1206-1215, 1997.

- Guillon, G., Butlen, D., Cantau, B., Barth, T. y S. Jard. Kinetic and pharmacological characterization of vasopressin membrane receptors from human kidney medulla: relation to adenylate cyclase activation. *Eur J Pharmacol.* 85(3-4):291-304, 1982.
- Hawthorn, J., Ang, V. T. Y. y J. S. Jenkins. Localization of vasopressin in the rat brain. *Brain res.* 197(1): 75-81, 1980.
- Hirasawa, A., Hashimoto, K. y G. Tsujimoto. Distribution and developmental change of vasopressin V1A and V2 receptor mRNA in rats. *Eur J Pharmacol.* 267(1):71-5, 1994.
- Hirasawa, A., Nakayama, Y., Ishiharada, N., Honda, K., Saito, R., Tsujimoto, G., Takano, Y. y H. Kamiya. Evidence for the existence of vasopressin V2 receptor mRNA in rat hippocampus. *Biochem Biophys Res Commun.* 205(3): 1702-1706, 1994.
- Jard, S., Elands, J., Schmidt, A. y C. Barberis. Vasopressin and oxytocin receptors *Progress in Endocrinology.* 1988.
- Jard, S., Gaillard, J.M.R., Guillon, G., Marie, J., Shoenenberg, P., Muller, A.F., Manning, M. y W.H. Sawyer. Vasopressin antagonists allow demonstration of a novel type of vasopressin receptors in the rat adenohypophysis. *Mol. Pharmacol.* 30:171-177, 1986.
- Kato, Y., Igarashi, N., Hirasawa, A., Tsujimoto, G. y M. Kobayashi. Distribution and developmental changes in vasopressin receptor mRNA in rat brain. *Differentiation.* 59:163-169, 1995.
- Klussmann, E., Maric, K. y W. Rosenthal. The mechanism of aquaporin control in the renal collecting duct. *Rev. Physiol. Biochem. Farmacol.* 141:33-95, 2000.

- Landgraf, R. Central release of vasopressin: stimuli, dynamics, consequences. *Prog Brain Res.* 91:29-39, 1992.
- Leclerc, N., Schwarting, G.A., Herrup, K., Hawkes, R. y M. Yamamoto. Compartmentation in mammalian cerebellum: Zebrin II and P-path antibodies define three classes of sagittally organized bands of Purkinje cells. *Neurobiology.* 89: 5006-5010, 1992.
- Lepetit, P., Fevre-Montange, M., Gay, N., Belin, M. y P. Bobillier. Vasopressin mRNA in the cerebellum and circumventricular organs: a quantitative in situ hybridization study. *Neurosci Lett.* 159(1-2):171-174, 1993.
- Nielsen, S., Chou, C.L., Marples, D., Christensen, E.I., Kishore, B.K. y M.A. Knepper. Vasopressin increases water permeability of kidney collecting duct by inducing translocation of aquaporin-Cd water channels to plasma membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92:1013-1017, 1995.
- Niermann, H., Amiry-Moghaddam, M., Holthoff, K., Witte, O. W. y O. P. Ottersen. A novel role of vasopressin in the brain: Modulation of activity-dependent water flux in the neocortex. *J Neurosci.* 21(9):3045-3051, 2001.
- Omura, T., Nabekura, J. y N. Akaike. Intracellular pathways of V1 and V2 receptores activated by arginine vasopressin in rat hippocampal neurons. *J Biol Chem.* 274(46): 32762-32770, 1999.
- Pearlmutter, A. F., Costantini, M. G. y B. Loeser. Characterization of <sup>3</sup>H-AVP binding sites in particulate preparations of rat brain. *Peptides.* 4:335-341, 1983.
- Robinson I.C. Neurohypophysial peptides in cerebrospinal fluid. *Prog Brain Res.* 60:129-145, 1983

- Sambrook, J.; Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*.
- Sarfaraz, D. y C. L. Fraser. Effects of arginine vasopressin on cell volume regulation in brain astrocyte in culture. *Am. J. Physiol.* 596-601, 1999.
- Sarmiento, J. M., Añazco, C. C., Campos, D. M., Prado, G. N., Navarro, J. y C. B. Gonzalez. Novel Down-regulatory mechanism of the surface expression of vasopressin V2 receptor by an alternative splice receptor variant. *J Biol Chem.* 279(45):47017-23, 2004.
- Seibold, A., Brabet, P., Rosenthal, W. y M. Birnbaumer. Structure and chromosomal localization of the human antidiuretic hormone receptor gen. *Am. J. Hum. Genet.* 51, 1078-1083, 1992.
- Sofroniew, M. V. y A. Weindl. Central nervous system distribution of vasopressin oxytocin and neurophysin. En: *Endogenous peptides and learning and memory process*, editado por J. L. Martinez, Jr., R. A. Jensen, R. B. Messing, H. Rigter and J. L. McGangh. New York: Academic Press, 1981, pp. 327-369.
- Stribley, J. M. y C. S. Carter. Developmental exposure to vasopressin increases aggression in adult prairie voles. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:12601-12604, 1999.
- Thompson, R. Localization of a "passive avoidance memory system" in the rat. *Physiol psychol.* 6: 263-274, 1978.
- Tribollet, E., Goumaz, M., Raggénbass, M., Dubois-Dauphin, M. y J.J. Dreifuss. Early appearance and transient expression of vasopressin receptors in the brain of rat fetus and infant. An autoradiographical and electrophysiological study. *Brain Res Dev.* 58(1): 13-24, 1991.

- Urra, C. A. (2003). Localización inmunohistoquímica de las isoformas V2a y V2b del receptor V2 de vasopresina en riñón de rata. Tesis de Grado, Escuela de Ciencias, Facultad de Ciencias. Universidad Austral de Chile.
- van Ree, J. M., Bohus, B., Versteeg, D. H. G. y D. de Wied. Neurohypophyseal principles and memory proceses. *Biochem Pharmacol.* 27: 1793-1800, 1978.
- van Wimersma Greidanus, T. B., Bohus, B. y D. de Wied. Vasopressin and oxytocin in learning and memory. En: *Endogenous peptides and learning and memory process*, edited by J. L. Martinez, Jr., R. A. Jensen , R. B. Messing, H. Rigter and J. L. McGangh. New York: Academic Press, 1981, pp. 413-443
- Wen, H., Nagelhus, E. A., Amiry-Moghaddam, M., Agre, P., Ottersen, O.P. y S. Nielsen. Ontogeny of water transport in rat brain: postnatal expression of the aquaporin-4 water channel. *Eur J Neurosci.* 11: 935-945, 1999.
- Yu-Cang, D., Jian-Hua, W., Xiao-Ming, J. y G. Yong-Jun. Characterization of binding sites of a memory-enhancing peptide AVP(4–8) in rat cortical synaptosomal membranes. *Peptides.* 15(7): 1273-1279, 1994.