

302827

13
24



UNIVERSIDAD MOTOLINIA, A.C.

ESCUELA DE QUIMICA

Con Estudios Incorporados a la U.N.A.M.

**EFFECTO DE LA CISTEAMINA SOBRE LA
BIOSINTESIS Y DEGRADACION DE
SOMATOSTATINA, VASOPRESINA
Y OXITOCINA**

T E S I S

Que para obtener el título de:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P r e s e n t a :

Aurelio Octavio Rodríguez Hernández

México, D. F.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1991



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

ABREVIATURAS	iv
--------------------	----

CAPITULO I

INTRODUCCION

1.1 Antecedentes	1
1.2 Planteamiento del Problema	3
1.3 Hipótesis del Trabajo	4
1.4 Objetivos	5

CAPITULO II

INFORMACION GENERAL SOBRE EL TEMA

2.1 Generalidades

2.1.1 Somatostatina	7
2.1.2 Vasopresina	9
2.1.3 Oxitocina	12

2.2 Metabolismo de la Cisteamino 13 |

2.3 La Cisteamino depleta a la Somatostatina inmunoreactiva en el hipotálamo de la rata. Mecanismo de acción. Importancia de la S-Carboximetilación	15
--	----

CAPITULO III

PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Diagrama Experimental	20
3.2 Material, Reactivos y Equipo	
3.2.1 Material Biológico	21
3.2.2 Material de Laboratorio	21
3.2.3 Reactivos	22

3.2.4	Equipo -----	23
3.3	Metodología -----	24
3.3.1	Implantación intracraneal de cánulas- guía dirigidas al III ventrículo de ratas -----	25
3.3.2	Administración intracerebroventricular de L-(35S)Cys a ratas con cánulas- guía intracraneales -----	28
3.3.3	Administración de diversas drogas -----	31
3.3.4	Diseción de bloques hipotalámicos y de neurohipófisis -----	31
3.3.5	Extracción y purificación de Somatostatina-14, Vasopresina y Oxitocina, marcadas con L-(35S)Cys, de hipotálamos y neurohipófisis individuales -----	32
3.3.6	S-Carboximetilación -----	34
3.3.7	Medición por espectrometría de centelleo líquido de la incorporación de L-(35S)Cys a los neuropéptidos en las fracciones obtenidas por cromatografía -----	34
3.3.8	Análisis Estadístico -----	36

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 Resultados

4.1.1	Comportamiento cromatográfico de Somatostatina-14, Vasopresina y Oxitocina en los sistemas I y II -----	38
4.1.2	Comportamiento cromatográfico de Somatostatina-14, Vasopresina y Oxitocina en los sistemas I y II después de S-Carboximetilar -----	40
4.1.3	Niveles de Somatostatina-14 marcada con L-(35S)Cys y S-Carboximetilada en hipotálamos de ratas control y de ratas tratadas con cisteamina -----	43

4.1.4 Niveles de Vasopresina y Oxitocina marcadas con L-(35S)Cys y S-Carboximetiladas en neurohipófisis de ratas control y de ratas tratadas con cisteamina -----	46
4.1.5 Contenido endógeno de Vasopresina y Oxitocina en las neurohipófisis de ratas control y de ratas tratadas con cisteamina -----	50

4.2 Discusión

CAPITULO V

CONCLUSIONES -----	55
--------------------	----

BIBLIOGRAFIA -----	57
--------------------	----

ABREVIATURAS

A B R E V I A T U R A S

AIA.....	Acido Iodoacético
AVP.....	Arginina-Vasopresina
AVP-L-(35S)Cys-S-CM.....	Derivado S-Carboximilado de arginina--vasopresina que contiene cisteína marcada con 35S
AVP-S-CM.....	Derivado S-Carboximilado de arginina--vasopresina
C18.....	Octadecilsilano, es-la fase unida a la sílica de la columna del sistema cromatográfico
C-G.....	Cánula-Guía
CLAP.....	Cromatografía Líquida de alta presión
CLAP-I.....	Cromatografía Líquida de alta presión-I
CLAP-II.....	Cromatografía líquida de alta presión--II
CSH.....	Cisteamina
CSH/L-(35S)Cys.....	Experimento de Biosíntesis
dpm.....	Desintegraciones por minuto
DTT.....	Ditiotreitol
icv.....	Intracerebroventricular
INNSZ.....	Instituto Nacional - de la Nutrición "Salvador Zubirán"

L-(35S)Cys.....Cisteína marcada con 35S
 L-(35S)Cys/CSH.....Experimento de Degradación
 DT.....Oxitocina
 DT-L-(35S)Cys-S-CM.....Derivado S-Carboximilado de la DT que contiene cisteína -- marcada con 35S
 DT-S-CM.....Derivado S-Carboximilado de la DT
 POPDP.....(1,4-bis-(4-methyl-5-phenyl)-2-oxazolyl)benzeno. "Dimetil PD POP".
 PPO.....2,5 difeniloxazol
 Prl.....Prolactina
 S-CM.....S-Carboximetilación
 SRIF.....Somatostatina
 SRIF-14.....Somatostatina-14
 SRIF-28.....Somatostatina-28
 SRIF-14-L-(35S)Cys.....Somatostatina-14 con cisteína marcada con 35S
 SRIF-14-L-(35S)Cys-S-CM.....Derivado S-Carboximilado de la somatostatina con cisteína-- marcada con 35S
 SRIF-14-S-CM.....Derivado S-Carboximilado de la somatostatina-14
 SRIF-28-S-CM.....Derivado S-Carboximilado de la Somatostatina-28

C A P I T U L O I

INTRODUCCION

1.1 ANTECEDENTES

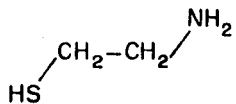
Estudios realizados en ratas demostraron que la administración de CSH (esquema 1), abate la inmunoreactividad de la SRIF en varios tejidos (91, 105, 106, 107), entre ellos el hipotálamo (58, 72). Esta depleción, que se consideró selectiva, pues la detección inmune de otros péptidos (encefalina, colecistocinina, etc.) no se alteró (58, 72), no fue atribuida a una interacción química directa entre la CSH y la SRIF, ya que la medición de SRIF in vitro, no se altera cuando la CSH se adiciona a los tubos del radioinmunoanálisis (105, 106).

En busca de una explicación sobre la disminución de la SRIF inmunoreactiva en el hipotálamo, Franco-Bourland midió la biosíntesis (30) y la degradación in vivo (31) de SRIF, además de la de AVP, cuya detección inmune no es afectada por la CSH, y de la de OT, sobre la cual no existen antecedentes, en el hipotálamo y neurohipófisis de ratas tratadas con CSH. Estas determinaciones fueron realizadas después de marcar a los péptidos icv con L-(35S)Cys, identificarlos por CLAP al coeluir con sus acarreadores sintéticos nativos y finalmente cuantificarlos por espectrometría de centelleo líquido, según la metodología descrita anteriormente (29).

Los resultados de Franco-Bourland confirmaron -- por una parte la ausencia de efecto de la CSH sobre la AVP, al no encontrar alteración en los niveles de AVP-L-(35S)Cys en los

ESQUEMA 1

CISTEAMINA



β -mercaptaetilamina

experimentos de biosíntesis y de degradación, y sugirieron por otra parte, un efecto inhibitorio de la CSH sobre la biosíntesis y uno activador sobre la degradación de SRIF y OT, al encontrar disminuidos los niveles de SRIF-L-(355)Cys y OT-L-(355)Cys en los experimentos respectivos.

Estos resultados ofrecieron entonces dos alternativas (efecto sobre biosíntesis y sobre degradación) para explicar la disminución de SRIF inunoreactiva en las ratas tratadas con CSH y por primera vez dieron a conocer un efecto sobre la OT

1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Después de publicados los primeros trabajos sobre la SRIF (72, 105), se demostró que la CSH también abate la inunoreactividad de la Prl adenohipofisaria (65). En torno a esto, algunos especularon que la CSH inducía una alteración en la estructura primaria de la Prl que evitaba su detección inmuno lógica (51, 52). Sin embargo, esta interacción no pudo demostrarse ya que in vitro, y de modo análogo que con la SRIF, la adición de CSH a los tubos del radioinmunoanálisis no alteró la medición de la Prl (66).

Fue más tarde, con los trabajos de Lorenson realizados con la Prl (52), en los que se propuso un mecanismo de acción de la CSH, viable para explicar los datos inunoreactivos de la Prl y la SRIF. Esto sugirió que in vivo, la CSH sí puede interaccionar directamente con la Prl, formando puentes

disulfuro mixtos, lo que resulta en la disminución de inmuno--- reactividad y en la depleción aparente de sus niveles adenohipofisarios.

Estas observaciones obligaron a reconsiderar -- los estudios de Franco-Bourland (30, 31). La disminución en los niveles de SRIF-L-(35S)Cys y OT-L-(35S)Cys en el hipotálamo, que habían sido identificados por su coelución con acarreadores sintéticos nativos en CLAP y que sugirieron la inhibición de su big síntesis (30) y activación de su degradación (31), ahora podían ser atribuidos a un cambio en su posición de elución en relación con sus acarreadores, debido a la formación in vivo de puentes - disulfuro mixtos entre la SRIF-L-(35S)Cys o la OT-L-(35S)Cys y la CSH.

1.3 HIPOTESIS DEL TRABAJO

La disminución de los niveles de SRIF-L-(35S)-Cys y OT-L-(35S)Cys en el hipotálamo de las ratas tratadas con - CSH, pudieron deberse a la formación de puentes disulfuro mixtos entre los péptidos y la CSH, los cuales cambiaron su posición de elución, en relación a sus acarreadores nativos, con los que se había calibrado el sistema de CLAP y evitaron su detección.

En consecuencia, para determinar los niveles - de SRIF-L-(35S)Cys y OT-L-(35S)Cys en extractos tisulares de ratas tratadas con CSH, es preciso que los péptidos sean S-CM para reducir los puentes disulfuro mixtos formados con la CSH y ---

generar los productos correspondientes S-CM (SRIF-L-(35S)Cys-S-CM y OT-L-(35S)Cys-S-CM) que serán identificados en CLAP al coincidir con sus acarreadores sintéticos S-CM. De esta manera, los resultados ahora sí reflejarán la cantidad de péptido biosintetizado o que ha permanecido estable a la degradación, independientemente de que haya ocurrido o no alguna interacción directa con la CSH.

1.4 OBJETIVOS

1. Establecer las condiciones de reacción para la S-CM de SRIF-14, OT y AVP.
2. Calibrar los sistemas de CLAP con patrones sintéticos de SRIF-14-S-CM, OT-S-CM y AVP-S-CM.
3. Medir en los nuevos sistemas de CLAP por espectrometría de centelleo líquido a SRIF-14-L-(35S)Cys-S-CM, OT-L-(35S)Cys-S-CM y AVP-L-(35S)Cys-S-CM en extractos de hipotálamo y neurohipófisis de ratas tratadas con CSH, antes o después de recibir L-(35S)Cys-icv.
4. Comparar estos resultados con los descritos por Franco-Bourland (30, 31) para determinar si existe o no, una interacción directa entre la CSH y la SRIF-14 o la OT.
5. Una disminución en los niveles de los péptidos S-CM

(SRIF-14-L-(35S)Cys-S-CM y DT-L-(35S)Cys-S-CM ahora -
se representarán una disminución real en su biosíntesis o una mayor velocidad de su degradación.

C A P I T U L O I I

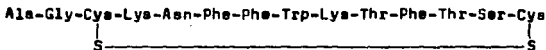
INFORMACION GENERAL
SOBRE EL TEMA

2.1 GENERALIDADES

2.1.1 SOMATOSTATINA (14, 38, 56)

La SRIF (Somatotropin Release Inhibiting Factor= Factor Inhibidor de la Secreción de Somatotropina) es una hormona cuyo estudio amplió los conceptos clásicos de la endocrinología. Es la primera hormona peptídica que mostró acción fisiológica en el sistema nervioso central y en la periferia.

S R I F -- 14



Fue aislada del hipotálamo de la rata en 1973 (15) y posteriormente se demostró la existencia de células somatostatínicas en el estómago, intestino y páncreas (células D), por ello se le considera como el prototipo de las hormonas peptídicas con amplia distribución anatómica.

La síntesis de la SRIF, al igual que el de otras proteínas destinadas a "exportación" por la célula, se efectúa gradualmente. El RNA mensajero codifica para una proteína de elevado peso molecular llamada preprosomatostatina que es dirigida hacia el retículo endoplásmico por la secuencia de aminoácidos de su extremo amino terminal - péptido señal -. En el interior-

del retículo endoplásmico, esta secuencia es retirada quedando la prohormona. La prohormona pasa al aparato de Golgi y es empaquetada en los gránulos de secreción donde termina de procesarse y se genera la hormona "madura". El procesamiento puede diferir de un tejido a otro, de esta manera, mientras que en el intestino la preprosomatostatina genera una especie de 28 aminoácidos (SRIF-28), en el páncreas, estómago y sistema nervioso central se genera una de 14 aminoácidos (SRIF-14), que es hasta ahora la especie más estudiada.

En el hipotálamo, las neuronas del núcleo paraventricular sintetizan y procesan a la SRIF, y la secretan en el sistema porta hipofisario, de donde es transportada a la adenohipófisis para inhibir la secreción de la hormona de crecimiento. A la fecha y con buenos resultados, se han probado algunos análogos de SRIF-14 (con una vida media mayor que la del péptido nativo) en el tratamiento de la acromegalia.

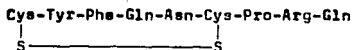
La SRIF tiene efectos inhibitorios sobre la secreción endocrina y exócrina del páncreas. En los islotes de Langerhans inhibe la secreción de insulina y glucagon. La presencia local de células somatostatinérgicas sugiere que esto ocurra mediante un mecanismo paracrino. El uso de análogos de SRIF-14 en el tratamiento de insulinomas y glucagonomas es alentador. En la diabetes mellitus, estos análogos han mostrado eficacia en disminuir la hipersecreción de glucagon. La inhibición de la secreción exócrina del páncreas por la SRIF, ha llevado a estudiar el valor terapéutico de sus análogos en la pancreatitis.

Actualmente se estudia el papel de la SRIF en la gastritis y en la úlcera duodenal y gástrica debido a que puede inhibir la secreción de ácido, gastrina y secretina.

2.1.2 VASOPRESINA (38, 56)

La AVP es una hormona peptídica cuyo nombre deriva de su propiedad para contraer el músculo liso y elevar la presión arterial. Su síntesis y secreción la realizan las neuronas de los núcleos paraventricular y supraóptico del hipotálamo

A V P



En la rata, el gen de la AVP contiene 3 exones y 2 intrones (70). Primero se sintetiza un precursor de alto peso molecular - preprovasopresina - que contiene a partir de su extremo amino terminal la secuencia del péptido señal, de la --AVP, de la neurofisiina y de un glucopéptido. Estas secuencias son removidas durante el tránsito del precursor por el retículo endoplásmico, aparato de Golgi y gránulos de secreción para liberar a la "hormona madura". Los gránulos de secreción, que son desplazados por movimientos axoplásmicos, viajan desde el somacelular en los núcleos paraventricular y supraóptico hasta las-

terminales neuronales en la neurohipófisis, donde vierten su -- contenido al espacio extracelular por exocitosis, de ahí, la -- hormona ingresa a la sangre. Este sistema es conocido como el -- sistema neurosecretor clásico.

En la última década se ha descrito un segundo - sistema neurosecretor, en el cual, algunas neuronas vasopresi-- nérgicas del núcleo paraventricular, presentan terminales en el sistema porta hipofisiario de modo que pueden verter su secre-- ción en esta red de capilares que irrigan a la adenohipófisis - para regular la secreción de ACTH (99).

El riñón es el principal órgano blanco de la -- AVP. A nivel de los túbulos colectores, aumenta la permeabili-- dad a la urea y al agua, por lo cual la AVP también es llamada-- la hormona antidiurética. En la porción gruesa del asa de Henle la AVP estimula la resorción de los iones de sodio y cloruro. - Estos efectos están mediados por receptores específicos acopla-- dos al sistema de la adenilato ciclasa.

Fisiológicamente la secreción de AVP esté regu-- lada en primer lugar por la osmolaridad del plasma y después -- por el volumen sanguíneo y la presión arterial. Un incremento - de la presión osmótica del plasma, como ocurre en la deshidrata-- ción constituye una señal que los osmoreceptores del hipotálamo detectan para estimular la síntesis (29) y secreción de la AVP. En la hemorragia, la secreción de AVP es estimulada para contra-- rrestar la hipovolemia e hipotensión consecuentes.

Existen enfermedades causadas por la alteración permanente de los niveles plasmáticos de AVP. Su disminución, como en la diabetes insípida neurógena, está causada por la degeneración idiopática de los axones de las neuronas vasopresinérgicas o por la lesión de estos en cirugías de la hipófisis lo que ocasiona la excreción abundante de orina diluída.

En la diabetes insípida nefrógena, los niveles plasmáticos de AVP son normales o elevados, pero la orina está diluída y su volumen aumentado, probablemente por la falta del receptor de AVP en el riñón.

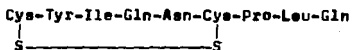
Algunos tumores diferentes a los de la hipófisis (como los carcinomas del pulmón), secretan AVP y elevan su nivel en el plasma, esto causa que la orina se concentre, que se retenga agua y el plasma se diluya, no obstante que la ingesta de agua sea normal.

Actualmente se realizan otros estudios de la AVP a) se ha sugerido que la presencia de terminales vasopresinérgicas en el encéfalo, en zonas fuera del hipotálamo, estén involucradas en procesos de aprendizaje y memoria, b) también se busca el significado fisiológico de terminales vasopresinérgicas en la médula espinal y en el núcleo Tracto Solitario donde se les ha asociado con la regulación de la presión arterial. c) Se investigan las razones de la expresión del gen de AVP en el timo, ovario, testículo y médula adrenal.

2.1.3 OXITOCINA (38, 56)

La OT es un nonapéptido sintetizado en el núcleo paraventricular del hipotálamo.

O T



El gen de la OT es similar al de la AVP, pues se supone que ambos evolucionaron de un gen ancestral común. Tiene 3 exones y 2 intrones. Al igual que otras hormonas peptídicas, inicialmente se sintetiza un precursor de alto peso molecular - que en este caso contiene, a partir de su extremo amino terminal, la secuencia del péptido señal, la de la OT y la de la neurofisiina (diferente a la de AVP).

Durante el parto, la distensión del útero estimula la secreción de la OT para causar la contracción del músculo liso uterino y facilitar la liberación del feto, sin embargo, llama la atención que el parto es casi normal en aquellas hembras en las que los axones de las neuronas oxitocinérgicas que llegan a la neurohipófisis están destruidos.

En la lactancia, la estimulación del pezón acelera la secreción de la OT para contraer a las células ----

miospiteliales que recubren los conductos mamarios y así expulsan la leche.

A la fecha se investiga si la OT tiene efecto fisiológico antidiurético (22, 55) y se busca el significado de la presencia de terminales oxitocinérgicas fuera del hipotálamo (112).

2.2 METABOLISMO DE LA CISTEAMINA

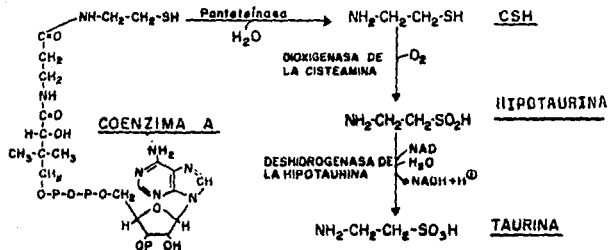
La CSH o B-mercaptoetilamina es un compuesto que se genera in vivo a partir de la hidrólisis de la coenzima A -- (esquema 2), en una reacción catalizada por la pantoteínasa (24 86, 87).

El metabolismo ulterior de la CSH ocurre en el -- grupo sulfhidrilo de la molécula. La dioxigenasa de la cisteamⁱna introduce una molécula de oxígeno al azufre de la CSH transformándola en hipotaurina (24, 46, 105), luego la hipotaurina es oxidada con un átomo más de oxígeno y transformada en taurina. Esta reacción es catalizada por la deshidrogenasa de la hipotaurina que requiere de NAD (62, 74, 104, 116).

El destino de la taurina puede ser variable. Actualmente se estudia su papel como neurotransmisor o neuromodulador (39) en el sistema nervioso central. Es posible que una fracción de la taurina total continúe metabolizándose para formar ácido isetiónico (74, 116). La taurina se excreta como tal-

ESQUEMA 2

METABOLISMO DE LA CISTEAMINA



en la orina y como taurocolato en las heces, previa conjugación en la bilis con el ácido taurocólico (116).

2.3 LA CISTEAMINA DEPLETA A LA SOMATOSTATINA INMUNOREACTIVA EN EL HIPOTALAMO DE LA RATA. MECANISMO DE ACCION. IMPORTANCIA DE LA S-CARBOXIMETILACION

En 1981 Szabo y Reichlin reportaron que la administración in vivo de la CSH causaba la depleción reversible de SRIF inmunoreactiva en el hipotálamo, el páncreas y en las mucosas gástrica y duodenal de la rata (105). Se observó también -- que los niveles de SRIF inmunoreactiva en el hipotálamo y la médula espinal volvían a la normalidad en 48 hrs (58) y una semana respectivamente, después de administrar la CSH.

También otros han corroborado ampliamente el efecto depletor de la CSH sobre la somatostatina inmunoreactiva en la retina (92), cultivo de islotes de Langerhans (40, 71, 80), y en diversas regiones del sistema nervioso central de la rata (73, 91), aunque sin proponer un mecanismo de acción para la -- CSH.

Además de su efecto sobre la SRIF, otras hormonas que no parecen ser afectadas por la CSH son, en cerebro: la hormona liberadora de la hormona luteinizante, la encefalina, el péptido vasoactivo intestinal, la colecistocinina (58, 72), el relacionado con el gen de la calcitonina (16). En la adenohipofisis de ratas tratadas con CSH, tampoco se alteran los niveles

de la hormona del crecimiento, la hormona estimulante del folículo, aunque sí se observa la depleción tisular de la Prl (65).

Algunos autores trabajaron con la taurina y observaron que esta podía inducir la secreción de la SRIF en células de corteza cerebral en cultivo (1), y sugirieron en base a estas observaciones y al esquema 2, que la CSH, por ser precursor de la taurina, podía estar estimulando la secreción del péptido causando así su depleción tisular.

Además no había sido posible atribuir este efecto del aminotiol a una interacción química directa entre la CSH y la SRIF a través de puentes disulfuro mixtos (suponiendo que la formación de puentes disulfuro ocurre espontáneamente sin catálisis enzimática), porque la adición de CSH, aún a altas concentraciones a los tubos con SRIF, no altera su medición por radioinmunoanálisis (105, 107). Observaciones semejantes se hicieron también en el caso de la Prl (65).

Habiendo sido descartados la hipersecreción de la SRIF, la necrosis de células somatostatinérgicas (20), así como una interacción química directa entre la CSH y la SRIF, como mecanismos de acción de la CSH para depletar a la SRIF inmunoreactiva, faltaba por conocer el efecto del aminotiol sobre la biosíntesis y degradación del péptido.

Marcando in vivo a los péptidos con L-(35S)Cys y empleando la CLAP como método de su purificación (29), Franco-Bourland presentó evidencia sugiriendo que la CSH podía inhibir

la biosíntesis de SRIF-14 y la de OT, aunque sin afectar la de AVP (30), en hipotálamos y neurohipófisis de ratas tratadas con la droga; más tarde, en los mismos tejidos, encontré aumentada la degradación de SRIF y OT y sin ningún cambio la de AVP (31). Estas observaciones concordaban con el efecto depletor de la CSH sobre la SRIF (58, 91), la falta de efecto sobre la AVP (30) y demostraba por primera vez un efecto sobre la OT.

No fue hasta que Lorenson (51, 52) sugirió que la depleción de la Prl adenohipofisaria podría ser atribuida a una interacción directa entre la CSH y la Prl, a través de puentes disulfuro mixtos, que volvió a surgir la posibilidad de una interacción química directa entre la SRIF y la CSH como mecanismo de su acción depletora sobre los niveles tisulares del péptido.

En base a sus estudios acerca del comportamiento electroforético de la Prl, que se altera cuando la Prl se incubaba con CSH y se normaliza cuando las mismas muestras se trataban después con 0.1 M de B-mercaptoetanol, alteraciones que sugerían una interacción directa entre el péptido y la CSH a través de puentes disulfuro mixtos, Lorenson especuló que esta interacción podría causar la deformación espacial de la Prl y con ello evitar que fuese reconocida por su anticuerpo, lo que conduciría a la pérdida de su inmunoreactividad en las ratas tratadas con CSH (52).

Como consecuencia de estos trabajos, hubo que ---

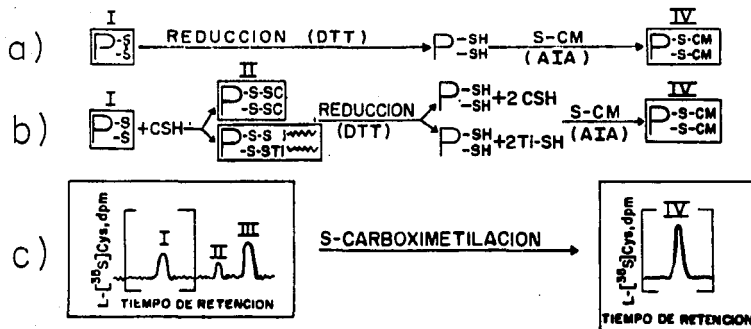
reinterpretar los resultados de biosíntesis (30) y de degradación (31) de Franco-Bourland.

De ocurrir la formación de puentes disulfuro mixtos entre los péptidos y la CSH (figura 1, producto II), o de "agregados" del péptido entre sí o con algún tiol intracelular (figura 1, producto III), el producto de ambas interacciones sería químicamente diferente al péptido nativo (figura 1, especie I) y por lo tanto no identificable en un sistema CLAP calibrado con péptidos sintéticos iguales al nativo (figura 1, c).

En base a estas observaciones, es que ahora se ha medido la biosíntesis y degradación in vivo de SRIF-14, AVP y -OT en hipotálamos o neurohipófisis de ratas tratadas con CSH -- que recibieron L-(35S)Cys. A diferencia de las ocasiones anteriores y con el propósito de destruir cualquier posible interacción entre el péptido y la CSH o cambio inducido por el amino tiol, esta vez, los extractos tisulares de estos animales, incluyendo los del grupo control, han sido sometidos a S-CM antes de su purificación por CLAP.

La S-CM es una reacción química, que implica primeramente, la reducción de cualquier puente disulfuro y después la carboximetilación de los grupos tiol resultantes (figura 1, a). De esta manera, la S-CM, rinde un solo producto peptídico - S-CM (figura 1, producto IV), independientemente del posible -- compuesto formado entre la CSH y el péptido, identificable en un sistema cromatográfico calibrado con péptidos-S-CM (figura 1 c).

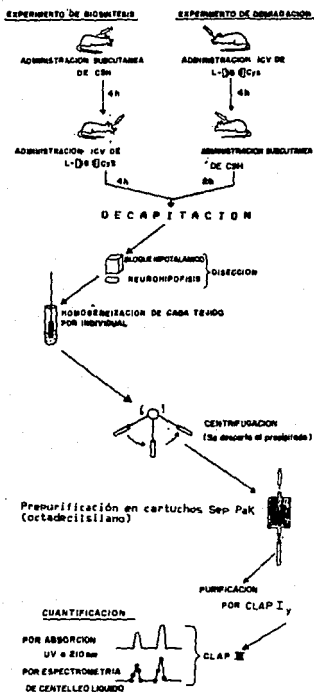
FIGURA 1



C A P I T U L O I I I

PARTE EXPERIMENTAL

3.1. DIAGRAMA EXPERIMENTAL



3.2 MATERIAL, REACTIVOS Y EQUIPO

3.2.1 Material Biológico

Se utilizaron ratas Wistar macho criadas en el bioterio - del INNSZ.

Los animales fueron trasladados al laboratorio pesando en tre 150 y 180 g para su acondicionamiento por 2 o 3 semanas, an tes de ser sometidos a manipulación alguna.

En el laboratorio fueron distribuidos por pares en jaulas colgantes de acero inoxidable y mantenidas con iluminación natu rel a una temperatura que fluctuó entre 20 y 25°C; teniendo ac- ceso libre a agua de la llave y a alimento para roedores Furina

Para los experimentos únicamente se emplearon las ratas - que finalmente alcanzaron un peso de 240-260 g. Su asignación a diferentes grupos experimentales fue al azar.

3.2.2 Material de Laboratorio

Acrílico Dental autopolimerizable Orthodont (Dientes Acrílicos)

Bisturí # 11 (Aesculap-Werke, AB, Tuttlinge, Alemania)

CANULAS-GUIA. Diseñadas y fabricadas por el Dr. Hugo Solís y el Sr. Raúl Bernal de la Unidad de Investigaciones Cerebrales y - Neurocirugía en colaboración con la Dra. Rebecca E. Franco-Bourland del INNSZ.

Cartuchos Sep Pak C18

Cera para hueso Bonewax (Ethicon W31)

Esponja de Gelatina Estéril Gelfoam (The Up-John Co, Kalamazoo-MI)

Frascos de polietileno (5 ml)

Jeringa Hamilton 75-N (5 ul)

Mandril de acero inoxidable de 1.60 a 1.65 cm de longitud

Tornillos # MX-080-2F de acero inoxidable (Small Part Inc, Miami, Fl)

Tubos de polipropileno (varios volúmenes)

Vasos de precipitado (varios volúmenes)

Matraces volumétricos (varios volúmenes)

3.2.3 Reactivos

Todos los reactivos son del grado de pureza más alto disponible en el mercado.

Acetonitrilo grado HPLC (Fisher Scientific Co, Pittsburg, PA)

Acido Acético (JT Baker, México)

Acido Iodoacético (JT Baker, México)

Albúmina Sérica Bovina (Sigma Chemical Co, St Louis MO)

Azul de Metileno (JT Baker, México)

Bis-(O-metil estiril)-benceno, "Bis MSB", (New England Nuclear-Corp, Londres)

1,4 bis (2-(4-metil-5-fenil)oxazolil)-benceno, "Dimetil POPOP"- (Packard Instruments)

Cisteamina (clorhidrato de cisteamina), (Sigma Chemical Co, St-Louis MO)

2,5 difeniloxazol (PPO), (Sigma Chemical Co, St Louis MO)

Ditiotreitól (JT Baker, México)
EDTA (JT Baker, México)
Ketalar (Quetamina), (Parke Davis, México)
L-(35S)Cys (Amershan, Amershan UK)
Nitrógeno (INFRA, México)
Oxitocina (Vega Biochemicals, Tucson AZ)
Pompún (Xilacina), (Bayer, México)
Somatostatina-14 (Sigma Chemical Co, St Louis MO)
Somatostatina-28 (Sigma Chemical Co, St Louis MO)
Tris (JT Baker, México)

3.2.4 Equipo

Centrífugas:

Centrífuga Sorvall RC-5b (Dupont Instruments, Newton, CT)
Microcentrífuga TM 12 (Beckman Instruments, Anaheim, CA)

Sistema de Cromatografía Líquida de Alta Presión:

Cromatógrafo para gradientes 332 con un microprocesador 420 (Beckman Instruments)

Columna u Bondapak C18 de dimensiones 3.9 cm X 30 cm, protegida - con una precolumna (Whatman CSK I), empacada con Co:Pell ODS

Un calentador para columnas LC-23A (Bioanalytical Systems, Inc, - West Lafayette, IN)

Integrador Chromatopac C-RIA (Shimadzu Corp)

Detector UV de LKB (alfa 138 Uvicord)

Otros:

Espectrómetro de Centelleo Líquido TPI CARB (Packard Instruments)

modelo 3330), ajustado a 14°C

Liofilizador Speed Vac (Savant Instruments)

Estereotáxico (David Kopf Instruments, Tujunga, CA)

3.3 METODOLOGIA

Se usaron ratas Wistar macho de 240-260 g a las que se les implantó una cánula-guía dirigida al III ventrículo para administrar L-(35S)Cys y marcar a SRIF-14, AVP y OT.

Días después se realizaron los experimentos siguiendo dos protocolos: uno para medir la biosíntesis de los neuropéptidos y el otro para evaluar su degradación. En el de biosíntesis se administraron subcutáneamente 300 mg/kg de CSH y 4 hrs después 40 uCi de L-(35S)Cys vía icv. La rata fue sacrificada cada 4 hrs más tarde. En el de degradación, primero se administró la L-(35S)Cys y después la CSH. La rata fue sacrificada 2 hrs más tarde.

El sacrificio de los animales se hizo por decapitación con ayuda de una guillotina, luego se efectuó la disección del hipotálamo y la neurohipófisis. Se usó una solución ácida-fría para homogeneizar a cada tejido individualmente y para extraer a los péptidos.

Posteriormente se centrifugó a los extractos y se procesó el sobrenadante. Los péptidos fueron prepurificados por adsorción a octadecilsilano y luego S-CM. La purificación se hizo en dos sistemas de CLAP. El contenido neurohipofisario de -

AVP y OT se determinó por absorción UV a 206 nm y la radioactividad se midió por espectrometría de centelleo líquido. En el análisis estadístico se usó la prueba U de Mann-Whitney.

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

Bajo control estereotáxico implantar intracranealmente, - cánulas-guía dirigidas al III ventrículo de las ratas. Las cánulas-guía son de acero inoxidable, calibre # 21, de 1.60-1.65 cm de longitud (fig. 2).

Estando profundamente anestesiada la rata, centrar y fijar su cabeza (previamente rasurada) en el estereotáxico, conforme a las coordenadas de Paxinos y Watson (79). Lavar la cabeza con agua y jabón, después, efectuar una incisión sagital en la piel y sujetar a esta con un blefarostato. Remover el tejido conectivo del cráneo presionando con un aplicador estéril y raspar suavemente con una legra, para visualizar las suturas y preparar la superficie en la cual se fijará el acrílico.

Estando la cánula-guía atornillada a un soporte del estereotáxico, ponerla en la línea media, a 1.5 mm posterior a bregma (fig. 3), definida según Paxinos y Watson (79). Marcar esta posición en el cráneo y trepanar manualmente con una broca fina de 1.2 mm de sección transversal, y que tiene un tope de polietileno ajustado a 3 mm de la punta. Aspirar y detener el sangre proveniente del seno sagital superior, bajar la cánula sobre la trepanación hasta llegar al tope de teflón. Antes de ---

FIGURA 2

CANULA - GUIA

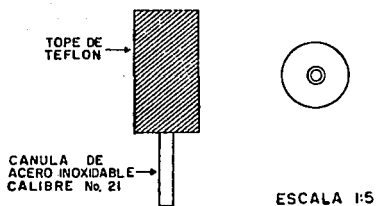
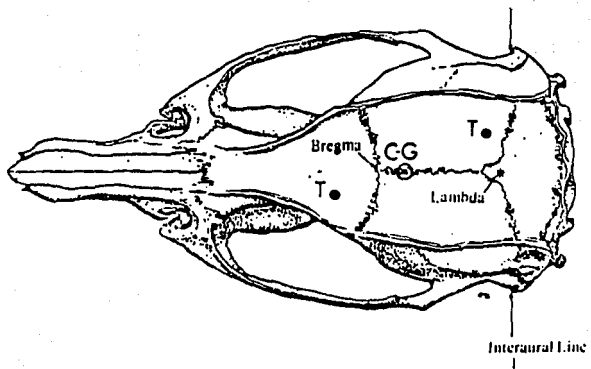


FIGURE 3



fijar la cánula con el acrílico, controlar cualquier sangrado -- del cráneo con cera para hueso y del músculo circundante con esponja de gelatina estéril. De ser necesario, limpiar el área con una solución salina estéril.

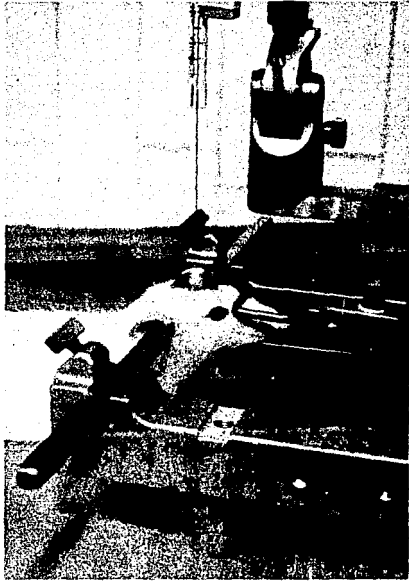
Fijar la cánula con acrílico dental autopolimerizable --- transparente y con 2 tornillos de acero inoxidable colocados a - 5 mm de distancia, como se ilustra en la fig. 3

Una vez endurecido el acrílico, destornillar el soporte de la cánula, y colocar un mandril de acero inoxidable de 1.60-1.65 cm de longitud dentro de ella.

3.3.2 Administración intracerebroventricular de L-(35S)Cys a ratas con cánulas-guía intracraneales

Bajo control estereotáxico (fotografía) y anestesia ligera inducida con éter, administrar al III ventrículo (figura 4), vía la cánula-guía, 40 uCi de L-(35S)Cys en 2 ul de una solución de ditiotreitol 10 mM en solución salina. Emplear una jeringa Hamilton 75-N de 5 ul, y fijar al soporte del estereotáxico. Hacer -- descender la aguja 9 mm dentro del cerebro, hasta alcanzar el -- III ventrículo (figura 4), quedando la punta entre 1.0-1.2 mm de la base del cráneo. La inyección del radioisótopo requiere 5 min La precisión de la colocación de la cánula-guía y del sitio de - la inyección se verifican anatómicamente en otro grupo de ratas, inyectando 1 ul de azul de metileno.

FOTOGRAFJA



3.3.3 Administración de diversas drogas

Inducción de anestesia profunda

Inducir la anestesia profunda en las ratas administrando - por vía intramuscular, 10 mg/kg de peso corporal de clorhidrato de xilacina (Rompún) seguido, 10 min después, de 80 mg/kg de peso corporal de quetamina (Ketalar).

Administración subcutánea de Cisteamina

Ratas con cánulas-guía intracraneales reciben vía subcutánea, una dosis única de clorhidrato de cisteamina, 300 mg/kg de peso corporal, en un volumen de 0.5 ml de una solución acuosa - ajustada a pH 7 con NaOH 0.1 N. Independientemente de la dosis, - la administración de CSH siempre origina una hemorragia en el si - tío de la inyección. Algunas ratas tratadas con CSH se vuelven - ligeramente letárgicas en comparación con las controles, aunque - no dejan de beber ni de comer en forma normal.

Las ratas control reciben vía subcutánea 0.5 ml de NaCl -- 0.1 M.

3.3.4 Disección de bloques hipotalámicos y de neurohipófisis

Extirpar el cerebro cortando ventralmente los nervios ópti - cos y luego el tallo hipofisario, de tal forma, que éste quede - unido al hipotélamo. Colocar el cerebro en una placa de vidrio - sobre hielo, con la parte ventral viendo hacia arriba.

Emplear un bisturí # 11, obtener una rebanada de cerebro -

haciendo dos cortes coronales, uno anterior al quiasma óptico y otro anterior a los cuerpos mamilares. Luego, colocar la rebana da sobre su superficie caudal, y hacer 2 cortes sagitales a 3 mm de cada lado de la línea media. Obtener el bloque hipotalámico - haciendo el último corte a la altura de la comisura anterior.

Separar las neurohipófisis de las adenohipófisis con unas pinzas finas y con ayuda de una lupa.

3.3.5 Extracción y prepurificación de Somatostatina-14, Vasopresina y Oxitocina, marcadas con L-(35S)Cys, de hipotálamos y neurohipófisis individuales de ratas

Los bloques hipotalámicos y las neurohipófisis de ratas ca nuladas, que recibieron vía icv L-(35S)Cys, se procesan por indi vidual a 4°C en tubos de polipropileno inmediatamente después de su disección. Extraer los neuropéptidos-L-(35S)Cys por homogenei zación de los tejidos en 4 ml de ácido acético 2 M, conteniendo 0.01% de albúmina sérica bovina más azida de sodio 0.01%, en pre sencia de 2 ug de cada uno de los péptidos sintéticos: AVP, OT - y SRIF-14, los cuales se utilizan como scarreadores de los pépti dos radioactivos, como marcadores cromatográficos en CLAP, ade más de que permiten medir el rendimiento de los péptidos radioac tivos al final del proceso de purificación. La AVP y OT endóge nas neurohipofisiarias también sirven como scarreadores y marca dores cromatográficos.

Centrifugar los homogeneizados a 10,000 X g durante 1 hr,

en una centrífuga Sorvall RC-5. Separar los extractos ácidos solubles, lavar las pastillas de la proteína precipitada en el ácido acético con 4 ml de la solución ácida extractante. Combinar los extractos y los lavados correspondientes, filtrarlos a través de cartuchos Sep Pak C18 con octadecilsilano, previamente humedecidos con isopropanol, acetonitrilo y lavados exhaustivamente con agua.

Lavar los neuropéptidos-L-(355)Cys adsorbidos, con 3 ml de ácido acético y eluirlos con 9 ml de acetonitrilo al 40% en ácido acético 2 M.

A cada muestra adicionar 1 mg de albúmina sérica bovina para concentrarla a 1 ml en un liofilizador Speed Vac y posteriormente S-CM. Luego, concentrarlas a 200 ul y purificarlas en CLAP.

Purificar en CLAP en dos pasos secuenciales. En el primero, usar dos soluciones de Formiato de Trietilamonio 0.005 M, pH 4.5, en acetonitrilo (5 y 60%). Efectuar un gradiente lineal de 5 a 48% de acetonitrilo en 40 min. Finalizado este procedimiento, colectar las muestras y juntarlas en un solo volumen; concentrar a 200 ul y analizar en el segundo paso de CLAP. En este paso, usar dos soluciones de hexanosulfonato de Na 0.1% en ácido acético 0.02 M y acetonitrilo (10 y 60%). Efectuar un gradiente lineal de 10 a 60% de acetonitrilo en 60 min. Colectar las muestras para cuantificar por espectrometría de centelleo líquido.

3.3.6 S-CARBOXIMETILACION

A los extractos peptídicos, ya prepurificados y concentrados, añadir una solución amortiguadora que contiene 500 ul de - Tris 0.5 M, pH 8.8 y EDTA al 0.36%

Gasificar cada extracto con Nitrógeno durante 3 min y someter a reducción durante 2 hrs con 100 ul de ditiotreitól 83 - mM en un baño de agua a 35°C.

Para evitar la carboximetilación inespecífica a otros aminoácidos de los neuropéptidos-L-(35S)Cys, o bien, la formación de complejos entre dichos aminoácidos y el yodo (42), gasificar nuevamente las muestras con nitrógeno y colocarlas en hielo para ser S-CM durante 30 min con 100 ul de ácido iodoacético 143- mM.

La mezcla de reacción que ahora contiene AVP-L-(35S)Cys-- S-CM, DT-L-(35S)Cys-S-CM y SRIF-14-L-(35S)Cys-S-CM es concentrada a 200 ul para CLAP.

3.3.7 Medición por espectrometría de centelleo líquido de la incorporación de L-(35S)Cys a los neuropéptidos en las fracciones obtenidas por cromatografía

Medir la L-(35S)Cys asociada a las fracciones obtenidas - por CLAP en frasquitos de polietileno, que contienen 3 ml de la solución centelleante de Bray para muestras acuosas, con la siguiente composición química:

Etilenglicol	-	40 ml
Metanol	-	200 ml
Naftaleno	-	120 g
PPD	-	8 g
Dimetil-POPOP	-	0.4 g
Dioxano	-	aforar a 2 l

La eficiencia máxima de conteo de (35S) en estas condiciones es del 84% decrece con el decaimiento del radioisótopo, pero es independiente del volumen y de la composición química de las muestras.

Evaluar la cantidad total de radioactividad asociada a cada fracción peptídica de hipotálamo o neurohipófisis, normalizando las dpm totales de cada fracción (menos el nivel de fondo) y ajustándolas a un 100% de recuperación.

El factor de normalización para las fracciones de una neurohipófisis en particular es el valor de la relación entre las dpm totales del extracto soluble crudo de ácido acético de la neurohipófisis en cuestión y el promedio de las dpm totales de los extractos solubles crudos de todas las neurohipófisis del experimento.

El factor de normalización para las fracciones de un hipotálamo en particular, es el valor de la relación entre las dpm totales del extracto de ácido acético del hipotálamo en cuestión y la media de las dpm totales de todos los hipotálamos del experimento.

Las dpm totales de los extractos solubles crudos de hipotálamos y de neurohipófisis se determinan a partir de las dpm-

de alícuotas de los extractos, contadas en 3 ml de Bray.

Los % de recuperación de los neuropéptidos-L-(35S)Cys-S--CM de hipotálamos, obtenidos por CLAP son iguales a los % de recuperación de sus similares sintéticos añadidos a los extractos al inicio de su proceso de purificación.

Los % de recuperación de los péptidos neurohipofisarios-endógenos (AVP y OT ya S-CM), y de los péptidos radioactivos y-S-CM que acarrean, son iguales a los % de recuperación de la SRIF-14 añadida a los extractos neurohipofisarios al inicio de su purificación y posteriormente S-CM.

El % de recuperación de un péptido sintético se determina por absorbancia UV a 206 nm e integración del área bajo el pico comparativamente contra el área de un patrón. Estos valores se determinan individualmente para cada péptido sintético añadido a cada una de las preparaciones tisulares.

La radioactividad asociada a cada péptido está expresada por bloque hipotalámico o neurohipófisis.

3.3.8 ANALISIS ESTADISTICO

Se empleó la estadística descriptiva habitual para expresar los datos con la media \pm 1 desviación estándar de las observaciones.

Se requirió de la estadística no paramétrica para hacer la inferencia estadística. Específicamente se empleó la prueba

U de Mann-Whitney. Su uso se justificó dado que los datos satisfacen una escala ordinal (y mucho más), que las muestras son independientes y que la prueba no exige una distribución normal de los datos. La U de Mann-Whitney es una alternativa No paramétrica de la t de Student. Las probabilidades (p) están dadas bilateralmente.

C A P I T U L O I V

R E S U L T A D O S Y D I S C U S I O N

4.1 RESULTADOS

Buscando mejor comprensión de los resultados, estos fueron segmentados lógicamente.

4.1.1 Comportamiento cromatográfico de Somatostatina-14, Vasopresina y Oxitocina en los sistemas I y II

En la gráfica I se presenta el perfil de absorbancia UV-a 206 nm de SRIF-14, AVP y OT sintéticos, corridos en CLAP I y CLAP II. Los tiempos de retención están dados en min.

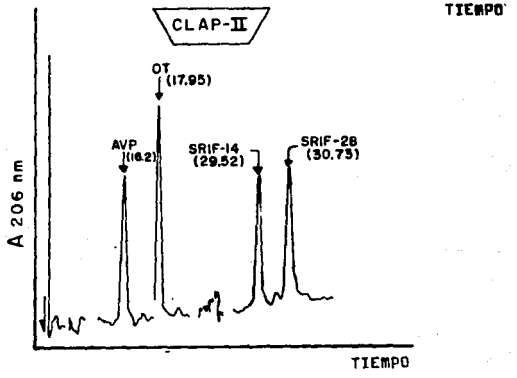
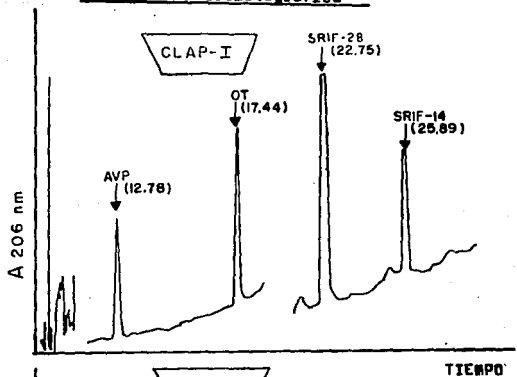
En CLAP I se analizaron 0.46 ug de cada péptido a excepción de la SRIF-28 (0.92 ug). En CLAP II la cantidad analizada fué 0.46 ug para cualquier péptido.

Los tiempos de retención en CLAP II son mayores que en CLAP I. En CLAP II se usó hexanosulfonato de sodio como agente apareador iónico.

SRIF-14 y SRIF-28 tuvieron diferentes posiciones de elución uno respecto al otro. La SRIF-14 sirvió como patrón interno y externo de cromatografía.

Independientemente del sistema de CLAP usado, el nivel de absorbancia de OT fue mayor que el de AVP. La absorbancia de SRIF-14 y SRIF-28 fue similar en CLAP II; en CLAP I se analizaron diferentes cantidades de cada péptido. De CLAP I a CLAP II las somatostatinas invirtieron su orden de elución.

GRAFICA I
Análisis Cromatográfico



Los promedios de los tiempos de retención de los péptidos sintéticos fueron:

en CLAP I:

AVP = 12.57 ± 0.05 min, n=10
OT = 17.44 ± 0.05 min, n=10
SRIF-28 = 22.57 ± 0.07 min, n=10
SRIF-14 = 25.68 ± 0.05 min, n=10

en CLAP II:

AVP = 16.64 ± 0.07 min, n=10
OT = 17.92 ± 0.07 min, n=10
SRIF-14 = 29.53 ± 0.08 min, n=10
SRIF-28 = 30.73 ± 0.10 min, n=10

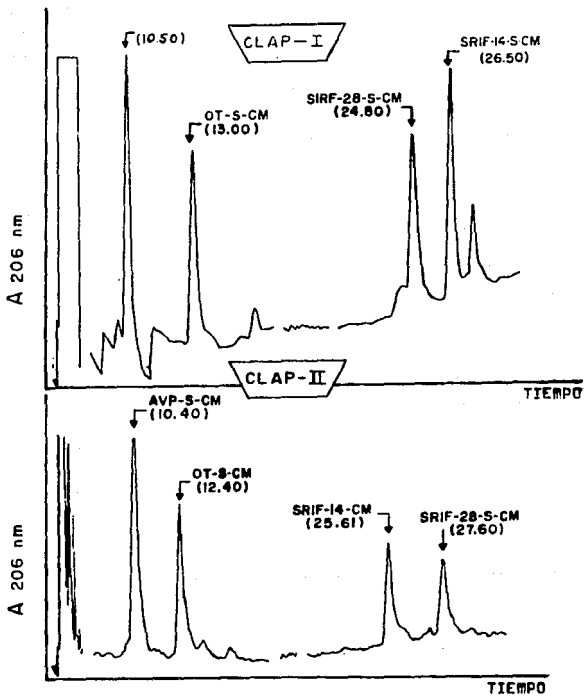
4.1.2 Comportamiento cromatográfico de Somatostatina-14, Vasopresina y Oxitocina en los Sistemas Cromatográficos I y II, después de S-Carboximetilar

En la gráfica II se muestra el cromatograma obtenido por absorbancia UV a 206 nm de los péptidos sintéticos, previamente S-CM y analizados en CLAP I y CLAP II. Se indican los picos correspondientes a SRIF-14-S-CM, SRIF-28-S-CM, AVP-S-CM y OT-S-CM, así como sus tiempos de retención en mins.

Las medias de los tiempos de retención en CLAP I y CLAP-II fueron:

GRAFICA II

Análisis Cromatográfico después de 5-CM



en CLAP I:

AVP-S-CM = 10.1 ± 0.05 min, n=10

OT-S-CM = 13.6 ± 0.05 min, n=10

SRIF-28-S-CM = 24.8 ± 0.07 min, n=10

SRIF-14-S-CM = 26.5 ± 0.05 min, n=10

en CLAP II:

AVP-S-CM = 10.9 ± 0.07 min, n=10

OT-S-CM = 12.8 ± 0.07 min, n=10

SRIF-14-S-CM = 25.5 ± 0.08 min, n=10

SRIF-28-S-CM = 27.5 ± 0.10 min, n=10

Al igual que en el análisis de los péptidos nativos, el orden de elución de SRIF-14-S-CM y SRIF-28-S-CM se invirtió de CLAP I a CLAP II.

La recuperación de los péptidos sintéticos después de S-CM fué:

AVP-S-CM = 15.0 ± 2.0 % n=10

OT-S-CM = 10.0 ± 3.0 % n=10

SRIF-14-S-CM = 66.2 ± 5.3 % n=10

SRIF-28-S-CM = 30.3 ± 7.3 % n=10

4.1.3 Niveles de Somatostatina-14 marcada con L-(35S)Cys y S-Carboximetilada en hipotálamos de ratas control y de ratas tratadas con cisteamina

En la gráfica III están ilustrados los perfiles de radioactividad asociados a las fracciones de la SRIF-14-S-CM de extractos de hipotálamos individuales, identificados por absorción UV a 206 nm y obtenidos por CLAP II (en cromatogramas similares a los de la gráfica II). De izquierda a derecha (gráfica III) se aprecian los niveles de SRIF-14-L-(35S)Cys-S-CM en el extracto de hipotálamo de una rata control, en el de una rata que fué tratada con CSH antes de la administración de la L-(35S)Cys (experimento de biosíntesis) y en el de una rata -- que recibió el precursor radioactivo antes que la CSH (experimento de degradación).

En el caso del experimento de biosíntesis ocurrió una -- disminución notable de la incorporación de la marca a la ---- fracción de SRIF-14-L-(35S)Cys-S-CM en relación al caso con--- trol. El fenómeno resultó incluso más drástico en otros animales en cuyos hipotálamos no fue posible medir un nivel de biosíntesis de la SRIF-14-L-(35S)Cys-S-CM.

En el experimento de degradación, el nivel de radioactividad asociada a la SRIF-14-S-CM fué igual al caso control.

Los resultados obtenidos en los experimentos control, -- biosíntesis y degradación, están resumidos en la fig I. Las ba rras representan las medias \pm 1 desviación estándar de las dpm

GRAFICA III

NIVELES DE SRIF-14-L-[³⁵S]Cys-S-CM EN EXTRACTOS INDIVIDUALES DE RATAS CONTROL Y DE RATAS TRATADAS CON CSH

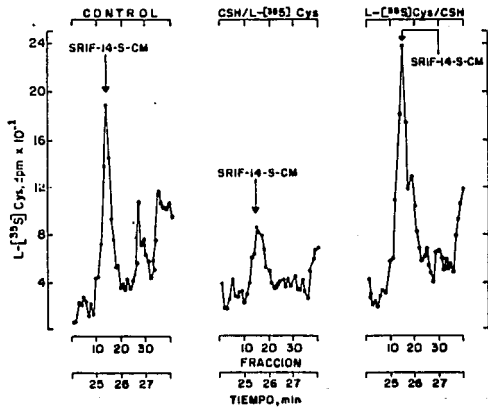
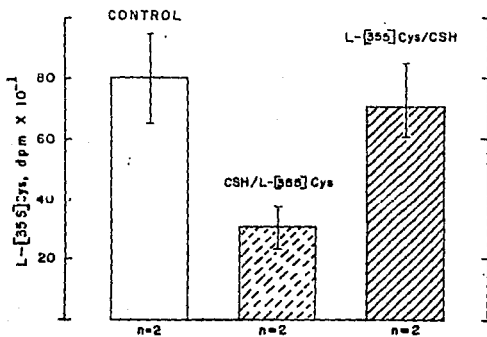


FIGURA 1

NIVELES DE SRIF-14-L-[³⁵S]CYS-S-CM EN EXTRACTOS INDIVIDUALES DE RATAS CONTROL Y DE RATAS TRATADAS CON CISTEAMINA



* vs Control

p < 0.05^{**}

NS

NS = No Significativo

normalizadas y asociadas a las fracciones de SRIF-14-L-(35S)--
Cys-S-CM.

4.1.4 Niveles de Vasopresina y Oxitocina, marcadas con L-(35S)Cys y S-Carboximetiladas en neurohipófisis de ratas control y ratas tratadas con cisteamina

Los niveles de acumulación de AVP-L-(35S)Cys-S-CM y de -
OT-L-(35S)Cys-S-CM en la neurohipófisis, reflejan la actividad
biosintética de las neuronas hipotalámicas.

En la gráfica IV se ilustran los perfiles de radioactivi-
dad asociadas a las fracciones neurohipofisiarias de AVP-L-(35
S)Cys-S-CM y OT-L-(35S)Cys-S-CM, identificadas a partir de los
perfiles de absorbancia a 206 nm, similares a los de la gráfi-
ca II y obtenidos por CLAP I. En la gráfica IV se ilustran los
niveles de una rata control, de una que recibiera la CSH antes
que la L-(35S)Cys (experimento de biosíntesis) y en una a la -
que se le administró el precursor radioactivo antes que la CSH
(experimento de degradación). Los números romanos indican el -
sistema de CLAP utilizado finalmente en la purificación.

Los niveles de AVP-L-(35S)Cys-S-CM, tanto en el caso de-
biosíntesis como en el de degradación fueron muy similares res-
pecto al caso control. Estas observaciones fueron reproduci---
bles en cada caso (fig II).

La media de las dpm normalizadas y asociadas a AVP-L-(35
S)Cys-S-CM fué 152 ± 44 en el grupo control ($n=3$), 335 ± 198 -

GRAFICA IV

NIVELES DE AVP-L-[³⁵S]Cys-S-CM Y DE OT-L-[³⁵S]Cys-S-CM EN NEUROHIPOFISIS INDIVIDUALES DE RATAS CONTROL Y DE RATAS TRATADAS CON CSH

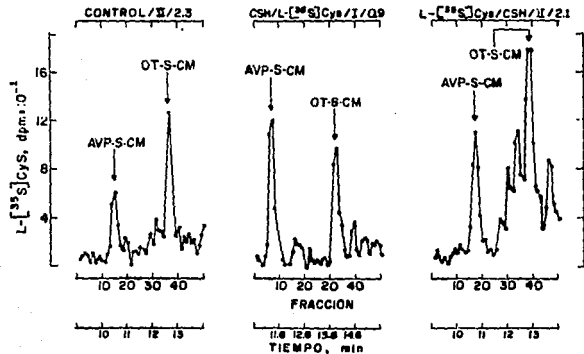
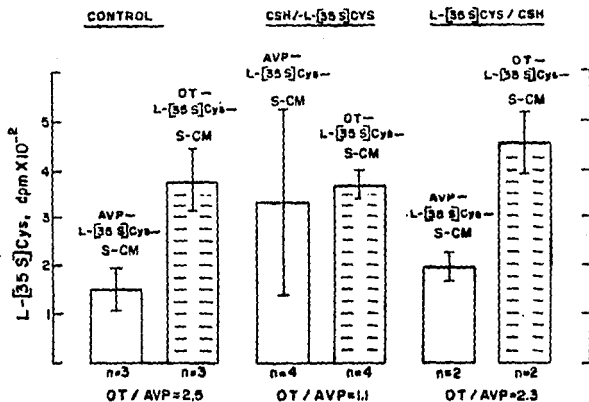


FIGURA II

NIVELES DE AVP-L-[35 S]CYS-S-CM Y OT-L-[35 S]CYS-S-CM EN EXTRACTOS INDIVIDUALES DE RATAS CONTROL Y RATAS TRATADAS CON CSH



en el de biosíntesis ($n=4$) y 198 ± 25 en el de degradación ($n=2$). Usando la prueba U de Mann-Whitney no se hallaron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre el grupo control y el de biosíntesis y entre el grupo control y el de degradación.

La biosíntesis de OT se estimó determinándose el valor de la razón de los niveles de OT-L-(35S)Cys-S-CM a AVP-L-(35S)Cys-S-CM en cada animal y en cada grupo experimental; en estos últimos, el cálculo se realizó usando la media de los niveles de radioactividad de cada péptido.

Los perfiles de radioactividad en extractos neurohipofisarios individuales, ilustrados en la gráfica IV, tienen anotado (números arábigos) el valor de la razón de los niveles de OT-L-(35S)Cys-S-CM / AVP-L-(35S)Cys-S-CM. En el caso control fue 2.3, lo que indica que normalmente la incorporación de la marca a la OT es alrededor del doble que a AVP.

En el extracto neurohipofisario de la rata del grupo de degradación, gráfica IV, la razón de los niveles de OT-L-(35S)Cys-S-CM / AVP-L-(35S)Cys-S-CM fue 2.1, muy parecida a la del control (2.3), por lo que la CSH no alteró la degradación de la OT.

En cambio, en el extracto de la rata del grupo de biosíntesis, gráfica IV, la razón de los niveles de OT-L-(35S)Cys-S-CM / AVP-L-(35S)Cys-S-CM fue 0.9, casi la mitad del valor del caso control, resultado de una disminución de la incorporación de la marca a la OT (biosíntesis inhibida por CSH).

Estas observaciones fueron reproducibles (fig II). Los valores que resultaron de las razones de los niveles medios de OT-L-(35S)Cys-S-CM / AVP-L-(35S)Cys-S-CM fueron 2.5 en el grupo control, 2.3 en el de degradación y 1.1 en el de biosíntesis.

4.1.5 Contenido endógeno de Vasopresina y Oxitocina en las neurohipófisis de ratas control y de ratas tratadas con cisteamina

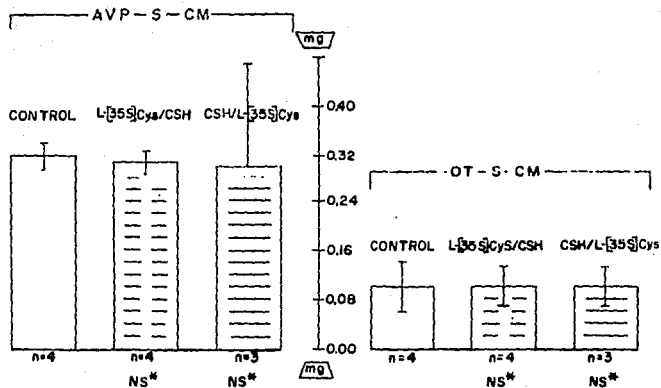
En la fig III se ilustra el contenido endógeno (mg) de AVP y OT en las neurohipófisis de ratas del grupo control, del de biosíntesis (CSH/L-(35S)Cys) y del de degradación (L-(35S)Cys/CSH), como la media \pm 1 desviación estándar. No se encontraron diferencias significativas entre el grupo control y el de biosíntesis y entre el grupo control y el de degradación (U de Mann-Whitney, $p > 0.05$ en ambos casos).

4.2 DISCUSION

Desde que se diera a conocer el efecto depletor de la CSH sobre la SRIF inmunoreactiva en varios tejidos de la rata (58, 72, 91, 92, 97, 105, 106, 107), surgió el interés por conocer el mecanismo por medio del cual este fenómeno ocurría, dado el uso de la CSH en estudios experimentales relacionados a la fisiología de la SRIF (100, 103).

FIGURA III

NEUROHIPOFISIS: MATERIAL ENDOGENO, S-CM



*Vs CONTROL

NS- No Significant

Varios mecanismos viables fueron descartados al comprobarse que la CSH, en la dosis comúnmente empleada, (300 ng/kg de peso corporal), no es tóxica para las células somatostatinérgicas (20, 107) y que no estimula la secreción del péptido (107). Además, se concluyó que la CSH no interaccionaba directamente con la SRIF, ya que su adición in vitro no altera la detección de SRIF por radioinmunoanálisis (105, 106, 107).

Los primeros trabajos que ofrecieron una explicación tentativa del efecto de la CSH sobre la depleción in vivo de la SRIF inmunoreactiva, fueron de Franco-Bourland (30, 31). En estudios realizados in vivo, en ratas, obtuvo resultados que sugerían que el tiol podía inhibir la biosíntesis de la SRIF-14-L-(35S)Cys (30) y activar su degradación (31) en hipotálamo. Simultáneamente, observó el mismo efecto sobre la OT-L-(35S)--Cys pero no sobre la AVP-L-(35S)Cys, demostrando con ello un espectro de acción de la CSH más amplio. Recientemente, Cameron y Fernstrom han comprobado estos resultados para la SRIF--14 y la OT (21).

Estudios realizados con la PrI (52), sugirieron un nuevo mecanismo de acción de la CSH. Los resultados obtenidos sugirieron la formación de puentes disulfuro mixtos entre el grupo sulfhidrilo de la CSH y los puentes disulfuro de la proteína, además de la formación de "agregados" entre la PrI y otras moléculas con grupos tiol disponibles, lo cual, podría alterar la estructura tridimensional de la proteína e impedir el reconocimiento con su anticuerpo.

Estas observaciones también podrían explicar los efectos de la CSH sobre la depleción tisular de la SRIF, así como explicar la disminución en los niveles de SRIF-14-L-(35S)Cys y OT-L-(35S)Cys en los experimentos de biosíntesis (30) y de degradación (31). La formación de puentes disulfuro mixtos de estos péptidos con la CSH, podría no solo alterar su estructura primaria - sino también su movilidad en el sistema cromatográfico original. Los efectos de la CSH sobre la disminución de la biosíntesis y el aumento en la velocidad de degradación de los péptidos podría haber sido, tan solo, aparentes.

Aquí se han reevaluado estos parámetros de biosíntesis y de degradación de SRIF-14-L-(35S)Cys, OT-L-(35S)Cys y AVP-L-(35S)-Cys, pero S-CM a los péptidos para romper los puentes disulfuro mixtos que pudieron haber formado con la CSH. Además, la separación de los péptidos marcados se hizo en sistemas de CLAP calibrados ahora con péptidos S-CM. En estas condiciones, se confirmó que la biosíntesis de SRIF-14 y OT está inhibida en las ratas tratadas con el tiol (30), pero no se encontró alteración en la degradación de la SRIF ni de la OT.

Se concluye que la ausencia o disminución en los niveles de SRIF-14-L-(35S)Cys y OT-L-(35S)Cys observadas con anterioridad (30, 31), se debieron en el caso de los experimentos de biosíntesis, y en el caso de los experimentos de degradación, a una alteración en sus posiciones de elución en CLAP, en relación -- con los péptidos nativos, debido probablemente a la formación de puentes disulfuro mixtos entre ellos y la CSH. La ruptura de

esta interacción por S-CM y su aislamiento en sistemas de CLAP-calibrados con los péptidos nativos S-CM, permitió su detección en los extractos tisulares de ratas tratadas con CSH, 4 hrs después de haber recibido la marca vfa icv. Resulta pues, que la -depleción de la SRIF inmunoreactiva, pudiera atribuírse tanto -a su interacción directa con la CSH como a una disminución en -su nivel de biosíntesis, pero no a un aumento en su velocidad -do degradación.

Nuevamente la medición de AVP-L-(35S)Cys, ahora en forma de AVP-L-(35S)Cys-S-CM en extractos de neurohipófisis de ratas tratadas con CSH, no reveló alteraciones de su biosíntesis ni de -su degradación. Dada la similitud estructural entre la OT y la-AVP, llama la atención la insensibilidad de esta a la acción de la CSH. Por ahora no se tiene una explicación satisfactoria que aclare esta especificidad de acción de la CSH.

C A P I T U L O V

CONCLUSIONES

C O N C L U S I O N E S

1. Se establecieron las condiciones de reacción para la S-CM - de SRIF-14, OT y AVP (objetivo 1).
2. Se calibraron los sistemas de CLAP (I y II) con acarreadores sintéticos de SRIF-14-S-CM, OT-S-CM y AVP-S-CM (objetivo 2).
3. La disminución de la incorporación de la marca a SRIF-14 y OT, después de haber administrado la CSH - experimento de biosíntesis - (objetivo 3), confirmó la inhibición de la biosíntesis de SRIF y OT en las ratas tratadas con CSH que sugirió Franco-Bourland (30, objetivo 4).
4. La disminución de los niveles de SRIF-14-L-(35S)Cys y OT-L-(35S)Cys, marcados previamente a la administración de la CSH - experimentos de degradación -, que habían sido observados en las ratas tratadas con CSH (31) se debieron a la alteración del puente disulfuro de los péptidos, que entonces cambiaron su posición de elución respecto a sus acarreadores nativos en CLAP, porque ahora, al S-CM y calibrar el sistema de CLAP con acarreadores S-CM, los niveles de SRIF-14-L-(35S)Cys-S-CM y OT-L-(35S)Cys-S-CM no mostraron alteración, lo que descartó al mismo tiempo un efecto de la CSH - sobre la degradación de SRIF y OT (objetivos 3 y 4).

5. La falta de efecto de la CSH sobre la biosíntesis y degradación in vivo de la AVP, confirmó las observaciones de Franco-Bourland (31, 32, objetivos 3 y 4).

BIBLIOGRAFIA

B I B L I O G R A F I A

1. Aguila MC, McCann SM. Stimulation of somatostatin release - from median eminence tissue incubated in vitro by taurine - and related amino acids. Endocrinology 116: 1158, 1987
2. Alei M, Fenselau C. Non-enzymatic formation of insulin-glutathione mixed disulfides: evidence for a transient species by plasma desorption mass spectrometry. Biochem Biophys Res Commun 146: 815, 1987
3. Anderson WL, Wetlaufer DB. The folding pathway of reduced - lysosyme. J Biol Chem 251: 3147, 1976
4. Anfinsen CB, Haber E. Studies on the reduction and reformation of protein disulfide bond. J Biol Chem 236: 1361, 1961
5. Badger TM, Sagar SM, Millard WJ, Martin JB, Rosenblum P. -- Cysteamine reduces serum gonadotropin concentration in a -- adult male rats. Life Sci 30: 245, 1982
6. Bakhit C, Rode R, Benoit R, Morrison JH, Bloom FE. Evidence for selective release of somatostatin-14 and somatostatin--28(1-12) from rat hypothalamus. J Neurosci 4: 411, 1984
7. Baldwin RL, Eisenber D. Protein Stability. En: Protein engineering, Ed. Alan R Liss Inc, pag 127, 1987
8. Banerjee A, Jordan MA, Little M, Luduena RE. The interaction of cysteamine with bovine brain tubulin. Eur J Biochem 165: 443, 1987
9. Banks WA, Kastin AJ, Horvath A, Michals EA. Carrier mediated transport of vasopressin across the blood brain barrier of the mouse. J Neurosci Res 18: 326, 1987
10. Baskin DG, Ensink JW. Immunocytochemical evidence that somatostatin-28 is a terminal peptide in rat intestinal mucosa. Diabetes 32 (Supl 1): abstract 167, 1983
11. Benoit R, et al. Somatostatin-28(1-12)-like immunoreactivity in the rat. Endocrinology 111: 2149, 1982

12. Bernstejn HH, Ansorge S, Aurin H, Mielke K, Preusser I, ---
Wiss J, Down A. Immunohistochemical evidence of thiol prote-
in disulfide oxidoreductase (TPD) in neurosecretory nerve -
cells of different vertebrates. Cellular Molec Biol 32: 37,
1986
13. Blackburn RE, Leng G, Russell JA. Control of magnocellular-
oxytocin neurones by the region anterior and ventral to the
third ventricle (AV3V) in rats. J Endocrinology 114: 253, -
1987
14. Brazeau P. Somatostatin: a peptide with unexpected physiolo-
gic activities. Amer J Med 81 (Supl 6b): 8, 1986
15. Brazeau P, Vale W, Burgus R, Ling N, Butcher M, Rivier J, -
Guillemin R. Hypothalamic polypeptide that inhibits the se-
cretion of immunoreactive pituitary growth hormone. Science
179: 77, 1973
16. Brown M, Fisher L, Mason RT, Rivier J, Vale W. Neurobiologi-
cal actions of cysteamine. Fed Proc 44: 2556, 1985
17. Browntein MJ. Biosynthesis of vasopressin and oxytocin. ---
Annual Rev Physiol 45: 129, 1983
18. Burford GD, Cyball REJ, Moss RL, Pickering BT. Synthesis of
both neurohypophyseal hormones in both the paraventricular-
and supraoptic nuclei of the rat. J Anat 117: 261, 1974
19. Butler J de B, Zatz M. Panethine and cysteamine deplete -
cystine from cystinotic fibroblast via efflux of cysteamine
-cystein mixed disulfide. J Clin Invest 74: 411, 1984
20. Cairns PD, McComb DJ, Horvath E, Kovacs K, Milligan JV, SZA
Raft. Morphologic effects of cysteamine on the rat adeno-hy-
pophysis. Exp Molec Pathol 41: 298, 1984
21. Cameron JL, Fernstrom JD. Effects of cysteamine administra-
tion on the in vivo incorporation of (35S)Cysteine into so-
matostatin-14, somatostatin-28, arginine-vasopressin, and -
oxytocin in rat hypothalamus. Endocrinology 119: 1292, 1986
22. Conrad KP, Gellai M, North WG, Valtin H. Influence of oxyto-
cin on renal hemodynamics and electrolyte and water ---

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- retention. Amer J Physiol 251: F290, 1986
23. Cupo A, Rougon-Rapozzi G, Delaage MA. Immunochemical detection of vasopressin precursors: artificial processing and quantification along the hypothalamo hypophyseal axis. Eur J Biochem 115: 169, 1981
 24. Duffel MW, Logan DJ, Ziegler DM. Cysteamine and Cystamine-En: Methods in Enzymology, Ed. Academic Press, vol 143, -- pag 149, 1987
 25. Edman JC, Ellis L, Blacher RW, Roth RA, Rutter WJ. Sequence of protein disulphide isomerase and implications of its relationship to thioredoxin. Nature 317: 167, 1985
 26. Epstein Y, Catel M, Glick SM, Sivan N, David R. Changes in hypothalamic and extra-hypothalamic vasopressin content of water-deprived rats. Cell Tissue Res 233, 99, 1983
 27. Fernstrom JD, Fischer LA, Cusack BM, Gillis MA. Radioimmuno logic detection and measurement of nonapeptides in the pineal gland. Endocrinology 106: 143, 1980
 28. Flint BM, Martin JB. Depletion of striatal somatostatin by local cysteine injection. Brain Res 308: 319, 1984
 29. Franco-Bourland RE, Fernstrom JD. In vivo biosynthesis of L-(35S)Cys-Arginine Vasopressin, -Oxytocin, -Somatostatin: rapid estimation using reverse phase high pressure liquid chromatography. Endocrinology 109: 1097, 1981
 30. Franco-Bourland RE. Effect of cysteine on the biosynthesis in vivo of vasopressin, oxytocin and somatostatin. En: Memories of the 13th Annual Meeting of Society for Neurosci, Boston, MA, abstract 219.4, pag 746, 1983
 31. Franco-Bourland RE. In vivo degradation after cysteine - of L-(35S)Cys- labeled vasopressin, oxytocin, somatostatin -14 and somatostatin-28 in rat hypothalamus and neurohypophysis. En: Memories of the 14th Annual Meeting of Society for Neurosci, (abstract), Anaheim, CA, 1984
 32. Freedman RB. How many distinct enzymes are responsible for

the several cellular processes involving thiol:protein-disulphide interchange. FEBS Lett 97: 201, 1979

33. Freedman RB. Native disulphide bond formation in protein biosynthesis; evidence for the role of protein disulphide isomerase. IIBS 9: 438, 1984
34. Freedman RB. Protein disulfide isomerase: multiple roles in the modification of nascent secretory proteins. Cell 57: -1069, 1989
35. Gainer H, Serne Y, Brownstein M. Biosynthesis and axonal transport of rat neurohypophyseal proteins and peptides. J Cell Biol 73: 366, 1977
36. Gan ZR, Wells MW. Purification and properties of thiol transferase. J Biol Chem 261: 996, 1986
37. González-Guijarro L, López-Ruiz MP, Bodegas G, Prieto JC, Arilla E. Effect of cysteamine on cytosolic somatostatin binding sites in rabbit duodenal mucosa. Exp Molec Pathol 46: 153, 1987
38. Greenspan FS, Forsham PH. Endocrinología Básica y Clínica. Ed. El Manual Moderno, págs 2, 131, y 508, 1988
39. Hanretta AT, Lombardini JB. Is taurine a hypothalamic neurotransmitter: a model of the differential uptake and compartmentalization of taurine by neuronal and glial cell particles from the rat hypothalamus. Brain Res Rev 12: 167, 1987
40. Hashimoto N, Kanatsuka A, Makino H, Sekurada M, Yoshida S. Mechanisms involved in the depleting effect of cysteamine on pancreatic somatostatin. Horm Metabol Res 19: 11, 1987
41. Helke CJ, Selsky JH. The effects of cysteamine and capsaicin on somatostatin and substance P in medullary nuclei. Peptides 4: 669, 1983
42. Hirs CHW. Reduction and S-Carboxymethylation of proteins. - En: Methods in Enzymology, Ed. Academic Press, vol 11, pag-199, 1967

43. Ida S, Tanaka Y, Ohkuma S, Kuriyama K. Determination of cysteamine by High-Performance-Liquid Chromatography. Anal Biochem 136: 352, 1984 .
44. Jacobs LS, Lorenson MY. Cysteamine inhibition of prolactin-immunoassayability and secretion: studies with aminothiophenols and other analogs. Endocrinology 115: 1210, 1984
45. Jacobs LS, Lorenson MY. Cysteamine, zinc, and thiols modify detectability of rata pituitary prolactin: a comparison --- with effects on bovine prolactin suggests differences in -- hormone storage. Metabolism 35: 209, 1986
46. Jacobsen JG, Smith LH. Biochemistry and physiology of taurine and taurine derivatives. Physiological Rev 48: 424, 1968
47. Kline J, Kenneth HR. Variability of Bregma in 300 gram Long Evans and Sprague-Dawley rats. Physiol & Behavior 33: 301, 1984
48. Lash LH, Jones DP. Distribution of oxidized and reduced -- forms of glutathione and cysteine in rat plasma. Arch Biochem Biophys 240: 583, 1985
49. Lestage P, Gonon M, Vitte PA, Debilly G, Sobillier P. Mesure in vivo de l'incorporation de L-méthionine-35S dans les - protéines cérébrales par autoradiographie quantitative chez le rat libre de se mouvoir ou anesthésié. CR Acad Sc Paris-301: 239, 1985
50. Lorenson MY. Cysteamine inhibition of bovine pituitary secretory granule prolactin immunoassayability and release. - Endocrinology 115: 728, 1984
51. Lorenson MY, Jacobs L. Thiol regulation of protein growth - hormone, and prolactin release from isolated adenohypophysial secretory granules. Endocrinology 110: 1164, 1984
52. Lorenson MY, Jacobs L. Depletion of bovine pituitary prolactin by cysteamine involves a thiol:disulfide mechanism. --- Endocrinology 115: 1492, 1984

53. Lorensen MY, Robson DL, Jacobs LS. Divalent cation inhibition of hormone release from isolated adenohypophysial secretory granules. J Biol Chem 258: 8612, 1983
54. Lou MF, Poulsen LL, Ziegler DM. Cellular protein-mixed disulfides. En: Methods in Enzymology, Ed. Academic Press Inc vol 143, pag 124, 1987
55. Lyness J, Robinson AG, Sheridan MN, Gash DL. Antidiuretic - effects of oxytocin in the Brattleboro rat. Experientia 41: 1444, 1985
56. Martin DW, Mayes PA, Rodwell VW, Granner DK. Bioquímica de Harper. Ed. El Manual Moderno, décima edición, pag 612, -- 1986
57. Martínez-Escalera G, Clapp C, Morales MT, Lorensen MY, Mena F. Reversal by thiols of dopamine-, stalk-median eminence-, and zinc-induced inhibition of prolactin transformation in adenohypophysis of lactating rats. Endocrinology 118: 1803, 1986
58. McComb DJ, Cairns PD, Kovacs KS, Szabo S. Effects of cysteamine on the hypothalamic-pituitary axis in the rat. End --- Proc 44: 2551, 1985
59. McKay WJ, Bonds JS. Oxidation of protein sulphhydryl groups - as an initial event in protein degradation. En: Intracellular Protein Catabolism, Ed. Alan R Liss Inc, pag 351, 1986
60. Meister A, Anderson ME. Glutathione. Annual Rev Biochem 52: 711, 1983
61. Mena F, Clapp C, Aguayo D, Lorensen MY, Martínez-Escalera G. Thiol regulation of depletion-transformation and release of prolactin by the pituitary of the lactating rat. Endocrinology 118: 1795, 1986
62. Michel G. Biochemical Pathways Index. (cartel), Ed. Boehringer Mannheim GmbH, Alemania, 1982
63. Millard WJ, et al. The effects of cysteamine on thyrotropin and immunoreactive 8-endorphin secretion in the rat. Endocrinology 112: 518, 1983

64. Millard WJ, Sagar SM, Badger TM, Martin JB. Cysteamine effects on growth hormone secretion in the male rat. Endocrinology 112: 509, 1983
65. Millard WJ, Sagar SM, Landis DMD, Martin JB. Cysteamine: - a potent and specific depletor of pituitary prolactin. Science 217: 452, 1982
66. Millard WJ, Sagar SM, Martin JB. Cysteamine-induced depletion of somatostatin and prolactin. Fed Proc 44: 2546, -- 1985
67. Moreau JP, DeFeudis FV. Pharmacological studies of somatostatin and somatostatin-analogues: therapeutic advances and perspectives. Life Sciences 40: 419, 1987
68. Nicotera P, Hartzell P, Baldi C, Svensson SA, Bellomo G, - Orrenius S. Cystamine induce toxicity in hepatocytes through the elevation of cytosolic Ca^{2+} and the stimulation of a nonlysosomal proteolytic system. J Biol Chem 261: 14628, 1986
69. Milaver G, Zimmerman EA, Wilkin J, Michaelis J, Hoffman D, - Silverman AJ. Magnocellular hypothalamic projections to - the lower brain stem and spinal cord of the rat. Immunocytochemical evidence for predominance of the oxytocin-neurophysin system compared to the vasopressin-neurophysin system. Neuroendocrinol 30: 150, 1985
70. North W. Biosynthesis of vasopressin and neurophysin. Ent-Vasopressin, Gash DM, Boer GJ (editores), Ed. Plenum Publishing Corp, pag 175, 1987
71. Ostenson CG, Efendic S. Cysteamine exerts multiple effects on the endocrine cells of the rat pancreas. Biochim Bio---phys Acta 846: 242, 1985
72. Palkovits M, et al. Selective depletion of somatostatin in rat brain by cysteamine. Brain Res 240: 178, 1982
73. Parsons JA, Peterson EK, Hartfel MA. Effect of cysteamine on pituitary M₁TW₁₅ tumor, and serum prolactin levels measured by rat lymphoma cell bioassay and radioimmunoassay. Endocrinology 114: 1812, 1984

74. Pasantes-Morales H. Taurine. En: Aminoácidos y Péptidos en la integración de funciones nerviosas. Ed. Biblioteca de -- Ciencias, UNAM, Pasantes-Morales H y Archiga H (compiladores), pág 83, 1983
75. Patel YC, Pierzchala I. Effect of cysteamine and antibody - to somatostatin on islet cell function in vitro. Evidence - that somatostatin deficiency augments insulin and glucagon secretion. J Clin Invest 75: 1249, 1982
76. Patel YC, Pierzchala I. Depletion of islet somatostatin by-cysteamine augments insulin and glucagon secretion. Diabe--ta 32 (Supl 1): abstract 32, 1983
77. Patel YC, Pierzchala I. Cysteamine induces a loss of tissue somatostatin-28 when measured as somatostatin-28(15-28)----like immunoreactivity but not when assessed as somatostatin-28(1-14)-like immunoreactivity: evidence for the importance of the disulfide bond for cysteamine action. Endocrinology 116: 1699, 1985
78. Patel YC, Ravazzola M, Amherdt M, Orci L. Somatostatin-14--like antigenic sites in fixed islet D cells are unaltered - by cysteamine: a quantitative electron microscopy immunocytochemical evaluation. Endocrinology 120: 1663, 1987
79. Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. Ed. Academic Press, Orlando, FL, 1987
80. Peterson B, Hellerstrom C. Rapid depletion of somatostatin-in isolated mouse pancreatic islets after treatment with --cysteamine. Acta Endocrinologica 110: 227, 1985
81. Pickering BT, Jones CW. Isolation of radioactive oxytocin - and vasopressin from the posterior pituitary gland of the - rat after treatment with cysteamine. Acta Endocrinologica - 49: 93, 1971
82. Pigiet VP, Schuster BJ. Thioredoxin catalyzed refolding of-disulfide containing proteins. Proc Nat Acad Sci 83: 7643,-1986
83. Prescott LF, Critchley JH. The treatment of acetaminophen - poisoning. Annual Rev Pharmacol Toxicol 23: 87, 1983

84. Rehben M, Miollers M, Mohr E, Ivell R, Morley S, Schwale H, Richter D. The neurohypophysial hormones vasopressin and oxytocin. Precursor structure, synthesis and regulation. -- Biol Chem-Hoppe-Seyler 367: 695, 1986
85. Reichlin S. Somatostatin. New England J Med 309: 1495-1501-1556-1563, 1983
86. Reichlin S, Bollinger-Grubar JA. Panthethine, a cysteamine-precursor, depletes immunoreactive somatostatin and prolactin in the rat. Endocrinology 117: 492, 1985
87. Robertson GL. The regulation of vasopressin function in -- health and disease. Recent Prog Horm Res 33: 333, 1977
88. Robertson GL. Physiology of ADH secretion. Kidney Int 32 -- (Supl 21): 5-20, 1987
89. Sachs H. Vasopressin Biosynthesis-II. Incorporation of (35S) cysteine into vasopressin and protein associated with cell-fractions. J Neurochem 10: 299, 1963
90. Sachs H, Fawcett P, Takabatake Y, Portanova R. Biosynthesis and release of vasopressin and neurophysin. Recent Prog -- Horm Res 25: 447, 1969
91. Sagar SM, et al. Depletion of somatostatin-like immunoreactivity in the rat central nervous system by cysteamine. J - Neurosci 2: 225, 1982
92. Sagar SM, Martin JB. The effect of cysteamine on immunoreactive somatostatin in the rabbit retina. Neurosci Lett 34: -265, 1982
93. Saunders SL, Shin SH, Reisfel CW. Cysteamine acts immediately to inhibit prolactin release and induce cellular changes in estradiol-primed male rats. Neuroendocrinol 38: 182, --1984
94. Scammell JG, Burrage TG, Eisenfeld AJ, Dannies PS. Cysteamine causes reduction of prolactin monomers followed by aggregation in the rat pituitary gland. Endocrinology 116: 2347, 1985

95. Scammell JG, Dannies PS. Depletion of pituitary prolactin by cysteamine is due to loss of immunological activity. - Endocrinology 114: 712, 1984
96. Schmale H, Fehr S, Richter D. Vasopressin biosynthesis -- from gene to peptide hormone. Kidney Int 32 (Supl 21): 5-8, 1987
97. Sager MA, Burbach PH. The presence and in vivo biosynthesis of fragments of CPP (The C-Terminal glycopeptide of the rat vasopressin precursor) in the hypothalamo-neurohypophyseal system. Peptides 8: 757, 1987
98. Shimadzu A, Kato Y, Matsushita N, Ohta H, Kabayama Y, -- Imura H. Glucagon-induced somatostatin release from perfused rat hypothalamus: calcium dependency and effect of cysteamine treatment. Neurosci Lett 37: 1285, 1983
99. Silverman AJ, Zimmerman EA. Magnocellular neurosecretory system. Annual Rev Neurosci 6: 357, 1980
100. Silvestre RA, Miralles P, Moreno P, Villanueva ML, Marco J. Somatostatin, insulin and glucagon secretion by the -- perfused pancreas from cysteamine-treated rat. Biochem -- Biophys Res Commun 134: 1291, 1986
101. Sipkins JW, Estes KS, Millard WJ, Sager SM, Martin JB. -- Cysteamine depletes prolactin in young and old hyperprolactinemic rats. Endocrinology 112: 1889, 1983
102. Small CW, Watkins WE. Glutathione-oxytocin transhydrogenase of human placental origin with specificity towards neurohypophyseal hormones. Nature 251: 237, 1974
103. Sorenson RL, Goose LH, Elde RP. Cysteamine blocks somatostatin secretion without altering the course of insulin or glucagon release. A new model for the study of islet function. Diabetes 32: 377, 1983
104. Stipanuk MH. Metabolism of sulfur-containing amino acids. Annual Rev Nutr 6: 179, 1986
105. Jzabo S, Reichlin S. Somatostatin in rat tissues is depleted by cysteamine administration. Endocrinology 109: 2225 1981

106. Szabo S, Reichlin S. Somatostatin depletion of the gut -- and pancreas by cysteamine is not prevented by vagotomy. Regul Peptides 6: 43, 1983
107. Szabo S, Reichlin S. Somatostatin depletion by cysteamine mechanism and implication for duodenal ulceration. Fed -- Proc 44: 2540, 1985
108. Takabatake Y, Sachs H. Vasopressin biosynthesis III. In vitro studies. Endocrinology 75: 934, 1964
109. Takagi Y, Shikita M. Cysteamine rapidly decreases mitotic cells in random culture of HELA S-3 cells. J Radiat Res - 24: 285, 1983
110. Terry LC, Craig R, Free R, Rylan J, Petersen N. Cysteamine effects on dopamine beta-hydroxylase and the hypothalamic pituitary axis: in vivo and in vitro studies. En: Memories of the 65th Annual Meeting of Endocrine Society. - Abstract 323, pag 161, San Antonio, TX, 1983
111. Thoene JG. Cysteamine treatment of nephropatic cystinosis. En: Orphan Drugs and Orphan diseases: clinical realities and public policy, Ed. Alan R Liss Inc, pag 125, 1983
112. Van Wiersma GTJB, Burbach JPH, Veldhuis HD. Vasopressin and oxytocin, their presence in the central nervous system and their functional significance in brain processes related to behavior and memory. Acta Endocrinologica (Suplemento 276): 85, 1986
113. Verbalis JG, Robinson AG. Characterization of neurophysin vasopressin prohormones in human posterior pituitary tissue. J Clin Endocrinol & Metab 57: 1, 1983
114. Weinstein LA, Landis DMD, Sagar S, Millard WJ, Martin JB. Cysteamine depletes prolactin (PRL) but does not alter -- the structure of PRL-containing granules in the anterior-pituitary. Endocrinology 115: 1543, 1984
115. White JD, Drauser JE, McElvy JF. In vivo biosynthesis and transport of oxytocin, vasopressin, and neurophysins to posterior pituitary and nucleus of the solitary tract. J Neurosci 4:2160, 1984

116. Wright CE, Tallen HH, Lin YY. Taurine: Biological update.-
Annual Rev Biochem 55: 427, 1986
117. Yost RW, Ettre LS, Conlon RD. Practical Liquid Chromatography. An Introduction. Ed. Perkin-Elmer Corp, Norwalk, CT,-
1980
118. Zimmerman EA, Nilaver G. The organization of neurosecretory pathways to the hypophysial portal system. En: Pituitary Hyperfunction: physiopathology and clinical aspects. Ed Raven Press, Camanni F, Muller EE (editores),pág 1, 1984