



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

MODULACIÓN DE LA ACTIVIDAD ELÉCTRICA DEL *LOCUS COERULEUS* A

TRAVÉS DE LOS RECEPTORES PARA ARGININA VASOPRESINA

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

M. EN C. CAMPOS LIRA ELBA

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS:

DRA. LIMEI ZHANG JI

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

COMITÉ TUTOR:

DR. RAFAEL ÁNGEL BARRIO PAREDES

INSTITUTO DE FÍSICA, UNAM.

DR. ARTURO HERNÁNDEZ CRUZ

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM

TUTORES INVITADOS:

DR. JEROME SWINNY

SCHOOL OF PHARMACY AND BIOMEDICAL SCIENCE, UNIVERSITY OF PORTSMOUTH

DR. RAFAEL LUJÁN MIRÁS

FACULTAD DE MEDICINA, COMPLEJO HOSPITALARIO UNIVERSITARIO DE ALBACETE

MÉXICO, CD. MX. SEPTIEMBRE, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

MODULACIÓN DE LA ACTIVIDAD ELÉCTRICA DEL *LOCUS COERULEUS* A

TRAVÉS DE LOS RECEPTORES PARA ARGININA VASOPRESINA

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

M. EN C. CAMPOS LIRA ELBA

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS:

DRA. LIMEI ZHANG JI

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

COMITÉ TUTOR:

DR. RAFAEL ÁNGEL BARRIO PAREDES

INSTITUTO DE FÍSICA, UNAM.

DR. ARTURO HERNÁNDEZ CRUZ

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM

TUTORES INVITADOS:

DR. JEROME SWINNY

SCHOOL OF PHARMACY AND BIOMEDICAL SCIENCE, UNIVERSITY OF PORTSMOUTH

DR. RAFAEL LUJÁN MIRÁS

FACULTAD DE MEDICINA, COMPLEJO HOSPITALARIO UNIVERSITARIO DE ALBACETE

MÉXICO, CD. MX. SEPTIEMBRE, 2019

OFICIO CPCB/869/2019

Asunto: Oficio de Jurado para Examen de Grado.


M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 25 de marzo de 2019, aprobó el siguiente jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la alumna **CAMPOS LIRA ELBA** con número de cuenta **301131328**, con la tesis titulada **"MODULACIÓN DE LA ACTIVIDAD ELÉCTRICA DEL LOCUS COERULEUS A TRAVÉS DE LOS RECEPTORES PARA ARGININA VASOPRESINA"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. LIMEI ZHANG JI**:

Presidente: DRA. MARÍA TERESA MORALES GUZMÁN
Vocal: DRA. MARCIA HIRIART URDANIVA
Secretario: DR. RAFAEL ÁNGEL BARRIO PAREDES
Suplente: DR. ANDRÉS ELIÚ CASTELL RODRÍGUEZ
Suplente: DR. JOSÉ ALONSO FERNÁNDEZ GUASTI

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 15 de agosto de 2019


DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA
COORDINADOR DEL PROGRAMA



COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
UNIDAD DE POSGRADO

Edificio D, 1º Piso. Circuito de Posgrados, Ciudad Universitaria
Alcaldía Coyoacán. C. P. 04510 CDMX
Tel. (+5255)5623 7002 <http://pcbiol.posgrado.unam.mx/>

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios de doctorado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y tecnología (CONACyT) por la beca otorgada durante mis estudios de posgrado (CVU/No. de becario 365662/245546)

*Durante los estudios de doctorado, la autora de la tesis obtuvo generosos apoyos del programa de **Doctorado en Ciencias Biológicas, UNAM**, y de los donativos de DGAPA-UNAM (PAPIIT): IN128111 y IN216214 y CONACyT 179716 y 127777.*

*A la **Dra. en C. (Fisiológicas) Limei Zhang** y el comité tutorial integrado por los **Doctores Rafael A. Barrio Paredes, Arturo Hernández, Jerome Swinny y Rafael Luján Mirás** a los cuales les agradezco profundamente la supervisión y valiosas aportaciones para la conclusión de este trabajo.*

Agradecimientos

A mis padres que siempre están ahí para apoyarme incondicionalmente, sobre todo en los momentos más difíciles. Así como el resto de mi familia que siempre está ahí escuchándome y apoyándome.

Al resto de mi familia por sus consejos y el apoyo incondicional que siempre me brindan. Los quiero mucho Graciela, David, Santiago, Zyanya, Agata, Jonathan, abuela Loli y Abuela Ana.

A mi pareja Alejandro que está en los mejores momentos conmigo, y en los peores más presente aún. Gracias por todo el apoyo que me das.

A Kehta, porque formas parte de mi familia y sin tu apoyo me hubiera perdido muchas veces en el camino, gracias por ser una guía y por el cariño que me brindas.

A la Dra. Limei Zhang, porque bajo su tutela crecí como nunca imaginé y logré mucho más de lo que creí.

Especialmente al Dr. Jerome Swinny porque sin él este trabajo no hubiera sido posible.

Al departamento de Fisiología de la Facultad y el Bioterio de la Facultad de Medicina ya que sin su apoyo este trabajo no hubiera sido posible.

A mis amigo y compañeros de laboratorio, por sus observaciones y esas platicas muy necesarias después de un día largo de trabajo, lo quiero mucho Vito y Oscar.

A mis compañeros de vida, trabajo y amigos Ximena, Luis y Estuardo, su apoyo siempre ha sido importante para mí. Los quiero

A mis amigos que siempre estuvieron ahí para escucharme cuando más lo necesitaba Mafer Torrescano y Elvia Tapia (hermanas las amo), Diana Guizar, Marta Viniegra, Ale Paquentin, Zaira, Yoli, Yaxkin, Juan Carlos, Paco, Robert.

Índice

Resumen	1
Abstract	2
1.Introducción	3
2.Antecedentes	5
2.1 Locus coeruleus	6
2.1.1 Anatomía del locus coeruleus: Topografía, Citología y ultraestructura.	6
2.1.2 Sistema noradrenérgico del LC (LC-NA)	7
2.1.3 Fisiología del locus coeruleus	10
2.1.4 Regulación eferente del sistema LC-NA	11
2.1.5 Regulación aferente de sistema LC-NA	12
2.1.6 Funciones del sistema LC-NA	14
2.2 Sistema Vasopresinérgico	15
2.2.1 Arginina Vasopresina	15
2.2.2 Receptores para AVP	16
2.2.3 Funciones del Sistema Vasopresinérgico	19
2.4 Relación entre el sistema LC-NA y sistema Vasopresinérgico	20
3.Planteamiento de problema	23
4. Hipótesis	26
5. Objetivo general	26
5.1 Objetivos particulares	26
6. Metodología	27
6.1 Inmunohistoquímica	28
6.2 Detección del ARN mensajero del receptor V2 por medio de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real-cuantitativo (qPCR)	31
6.3 Registro electrofisiológico de rebanadas de LC mediante la técnica de Whole Cell Patch Clamp	32
6.4 Estrés agudo por restricción de movimiento	35
7. Resultados	36
7.1 Determinación de la expresión de los receptores de arginina vasopresina en LC.	37
7.2 Expresión de los receptores V1 _a y V1 _b por neuronas noradrenérgicas y no noradrenérgicas del LC en proximidad a sinapsis excitatorias e inhibitorias.	40
7.3 Evaluación electrofisiológica de los efectos de AVP sobre las neuronas noradrenérgicas del LC.	45

7.4 Determinación de la presencia de axones vasopresinérgicos en contacto con neuronas noradrenérgicas y no-noradrenérgicas del LC en proximidad a sinapsis excitatorias e inhibitorias	54
7.5 Interacción de perfiles inmunoreactivos de AVP en asociación con otras vías neuromoduladoras aferentes dentro del LC	58
7.6 Efecto del estrés agudo sobre la interacción de los sistemas LC-AVP	60
8. Discusión	62
9. Conclusiones	68
10. Literatura citada	70
11. Apéndice: Artículo requisito para la obtención del grado	82

Resumen

El locus coeruleus (LC) es un núcleo del tallo cerebral que se distingue por suministrar de noradrenalina a todo el sistema nervioso central. Además de modular diversas funciones cerebrales, como la excitación, la cognición y la respuesta al estrés; la excitabilidad neuronal del LC también corresponde a la actividad de varios sistemas periféricos, como las vísceras pélvicas y el sistema cardiovascular. Las diversas entradas neuroquímicas establecen el tono de la actividad neuronal del LC, que a su vez modulan estas respuestas adaptativas, fisiológicas y de comportamiento.

Uno de los sistemas aferentes del LC que no se conoce bien contiene a la neurohormona arginina-vasopresina (AVP). En este trabajo proporcionamos la primera evidencia de las características moleculares y funcionales del sistema LC-AVP, mediante la identificación de los receptores para AVP presentes en las neuronas del LC y la modulación de la actividad eléctrica en este núcleo.

La microscopía confocal de alta resolución reveló que la inmunorreactividad para el receptor AVP 1b (V1_bR) está localizada en las membranas plasmáticas de las neuronas LC noradrenérgicas y no adrenérgicas. En contraste, la inmunorreactividad para el receptor V1a (V1_aR) se localizó exclusivamente en las neuronas LC noradrenérgicas. No se detectó ninguna señal específica para el receptor V2 en el LC a nivel proteico, ni de ARNm. Las agrupaciones inmunoreactivas para V1a-bR se localizaron cerca de los perfiles inmunoreactivos para proteínas marcadoras sinápticas glutamatérgicas y GABAérgicas. Las varicosidades inmunopositivas de AVP también se ubicaron adyacentes al etiquetado para tales marcadores sinápticos.

La electrofisiología realizada mediante la técnica de fijación de voltaje en microáreas de membrana de célula entera (wholecell patch clamp) en rebanadas de cerebro que contenían al LC, reveló que la activación farmacológica de los receptores V1b mediante la aplicación de desmopresina, aumentó significativamente la actividad espontánea del 45% (9/20) de las neuronas noradrenérgicas registradas y el 55% restante (11/20) con una disminución significativa en su patrón basal de disparo. El bloqueo de los receptores V1a y V1b alteró la excitabilidad neuronal de manera heterogénea y semejante a aquella con la desmopresina, demostrando que el AVP endógeno establece las tasas basales de activación neuronal del LC.

Finalmente, la exposición de los animales al estrés agudo aumentó la expresión de V1bR, pero no la expresión del receptor V1a. Este estudio revela al sistema AVP-V1a-b como un componente considerable de la arquitectura molecular y regulación de la actividad del LC. Dado que AVP funciona principalmente como un regulador de la homeostasis, los datos sugieren una vía novedosa al modular el funcionamiento de una región cerebral que es integral para mediar las respuestas adaptativas.

Abstract

The locus coeruleus (LC) is a brainstem nucleus distinguished by its supply of noradrenaline throughout the central nervous system. Apart from modulating a range of brain functions, such as arousal, cognition and the stress response, LC neuronal excitability also corresponds to the activity of various peripheral systems, such as pelvic viscera and the cardiovascular system. Neurochemically diverse inputs set the tone for LC neuronal activity, which in turn modulates these adaptive physiological and behavioral responses essential for survival.

One such LC afferent system which is poorly understood contains the neurohormone arginine-vasopressin (AVP). Here we provide the first demonstration of the molecular and functional characteristics of the LCAVP system, by characterizing its receptor-specific modulation of identified LC neurons and plasticity in response to stress. High resolution confocal microscopy revealed that immunoreactivity for the AVP receptor 1b (V1b) was located on plasma membranes of noradrenergic and non-noradrenergic LC neurons. In contrast, immunoreactivity for the V1a receptor was exclusively located on LC noradrenergic neurons. No specific signal, either at the mRNA or protein level, was detected for the V2 receptor in the LC. Clusters immunoreactive for V1a-b were located in proximity to profiles immunoreactive for GABAergic and glutamatergic synaptic marker proteins. AVP immunopositive varicosities were also located adjacent to labelling for such synaptic markers.

Wholecell patch clamp electrophysiology revealed that the pharmacological activation of V1b receptors significantly increased the spontaneous activity of 45% (9/20) of recorded noradrenergic neurons, with the remaining 55% (11/20) of cells exhibiting a significant decrease in their basal firing patterns. Blockade of V1a and V1b receptors on their own significantly altered LC neuronal excitability in a similar heterogeneous manner, demonstrating that endogenous AVP sets the basal LC neuronal firing rates. Finally, exposing animals to acute stress increased V1b, but not V1a receptor expression, whilst decreasing AVP immunoreactivity. This study reveals the AVP-V1a-b system as a considerable component of the LC molecular architecture and regulator of LC activity. Since AVP primarily functions as a regulator of homeostasis, the data suggest a novel pathway by modulating the functioning of a brain region that is integral to mediating adaptive responses.

1. Introducción

El desarrollo de la ciencia como consecuencia de la necesidad humana por entender aquello que le rodea, así como el entendimiento del funcionamiento y composición del cuerpo humano ha derivado en el desarrollo de diversas ramas de la ciencia misma.

La anatomía se puede considerar una de las ramas de la ciencia descriptiva más antigua, que nos remonta al antiguo Egipto, aproximadamente 300 años a. c., donde un grupo pequeño de anatomistas comenzaron con el aprendizaje de la composición corporal *post mortem*. Claramente el cerebro, forma parte de estos primeros hallazgos, siendo Herophilus de Calcedonia la primera persona en describir la anatomía del cerebro humano. Desde entonces, el estudio del sistema nervioso, ha continuado formando parte de otras disciplinas como la fisiología y bioquímica de diversos organismos.

Es hasta la década de los 60's en el siglo XX que la rama de las neurociencias es reconocida como tal y que desde entonces ha avanzado a pasos agigantados. Sin embargo, el campo de estudio es amplio y complejo, por lo cual aún quedan muchas preguntas por resolver.

La intención de este trabajo, es un humilde aporte al entendimiento del funcionamiento del sistema nervioso, en particular la interacción de los sistemas vasopresinérgico y Locus coeruleus-noradrenérgico, los cuales se sabe que se modulan, pero aún existen interrogantes de las que vale la pena buscar respuestas.

2. Antecedentes

2.1 Locus coeruleus

2.1.1 Anatomía del locus coeruleus: Topografía, citología y ultraestructura.

El *locus coeruleus* (LC) del latín “lugar azul” (Moore, Dalley, & Agur, 2010) es un pequeño núcleo ubicado en la formación reticular del tronco encefálico, adyacente al borde latero-ventral del cuarto ventrículo (Russel, 1955; Sutin & Jacobowitz, 1991). Las células que componen al LC se organizan de manera compacta y se distinguen de las células circundantes por la producción de la catecolamina noradrenalina (NA) (Dählstrom & Fuxe, 1964).

Puede catalogarse como un núcleo pequeño en relación con su volumen y la cantidad de células que contiene; con aproximadamente 1, 600 células en roedores y hasta 15, 000 en humanos (Foote, Bloom, & Aston-Jones, 1983). Estas neuronas varían en su morfología constituyendo dos poblaciones principales: las células multipolares y las células fusiformes (Grzanna & Molliver, 1980; Swanson, 1976). Aun cuando ambos tipos de células se encuentran distribuidas a lo largo del LC, existe una mayor presencia de células multipolares en la zona ventral y las fusiformes se ubican principalmente en la zona dorsal (Swanson, 1976).

Otras características importantes de las neuronas de este núcleo son, la desarrollada arborización dendrítica que posee, aumentando así la superficie de contacto de las inervaciones aferentes que lo modulan (Groves & Wilson, 1980a; Shimizu & Imamoto, 1970). Más importante aún, la extensa colateralización de los axones de estas neuronas, permitiéndole, a pesar de su tamaño, inervar casi todo el sistema nervioso (Levitt & Moore, 1979; Lindvall & Björklund, 1974; Ungerstedt, 1971).

Los contactos sinápticos que se presentan dentro del *locus coeruleus*, en su gran mayoría son axodendríticos (Groves & Wilson, 1980a), en menor cantidad los contactos axosomáticos (Shimizu & Imamoto, 1970) y se han observado con relativa frecuencia la presencia de sinapsis dendrodendríticas y dendrosomáticas (Groves & Wilson, 1980b).

Este núcleo está altamente conservado en diferentes especies de mamíferos, el cual, a pesar de su pequeño tamaño, proyecta casi a todas las áreas del cerebro y médula espinal (Foote et al., 1983; Schwarz & Luo, 2015; Swanson & Hartman, 1975), siendo así, el sistema noradrenérgico del LC (LC-NA) la fuente principal del neurotransmisor NA en la clase mammalia. (Amaral & Sinnamon, 1977; Russel, 1955).

2.1.2 Sistema noradrenérgico del LC (LC-NA)

Biosíntesis de noradrenalina

Como ya se mencionó con anterioridad, las células del LC sintetizan noradrenalina, la cual es una catecolamina, sintetizada a partir del aminoácido tirosina por la actividad de la enzima tirosina hidroxilasa, produciendo dopa, la cual por la acción de la enzima descarboxilasa es transformada en dopamina. Posteriormente este precursor es transportado a las vesículas sinápticas para producir NA por la acción de la enzima dopamina- β -hidroxilasa (Benarroch, 2018; Bunney & Davis, 1965).

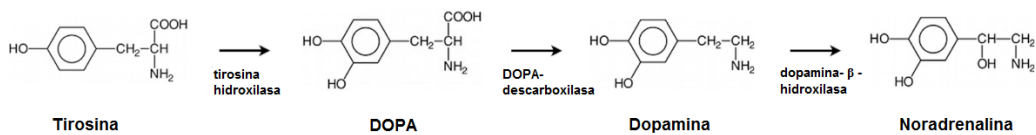


Figura 1. Síntesis de noradrenalina. (Tomada y modificada de Barron, Sjøvik, & Cornish, 2010)

Receptores de noradrenalina

La actividad de la NA, se debe a la interacción con los receptores α_1 -, α_2 - y β - adrenérgicos, con sus respectivos subtipos, todos pertenecientes a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G. Estos receptores, se encuentran heterogéneamente distribuidos en los tejidos blanco de las inervaciones eferentes del sistema LC-NA (Insel, 1996).

Benarroch (2018) describe a los receptores adrenérgicos de la siguiente forma:

- Receptores α_1 - se reportan como principalmente postsinápticos, acoplados a la vía de segundos mensajeros fosfolipasa C, inositol trifosfato y proteína cinasa C, clasificados como del tipo G_q , participan generalmente en procesos excitatorios.
- Receptores α_2 -, pueden encontrarse tanto presináptica como postsinápticamente; considerados como receptores inhibitorios, son de tipo G_i , también acoplados a la adenilato ciclasa, sin embargo, éstos promueven la activación de corrientes de K^+ , reduciendo la excitabilidad neuronal e inhibiendo presinápticamente corrientes de Ca^{++} reduciendo así la liberación de neurotransmisor.
- Receptores β - adrenérgicos como tipo G_s , acoplados a la enzima adenilato ciclasa; promueven la conversión de ATP en cAMP, afectando la excitabilidad y plasticidad sináptica, de forma directa y con la activación de la proteína cinasa A.

Dentro del sistema LC-NA se encuentran subgrupos neuronales que expresan diferencialmente neuropéptidos, así como receptores a neurotransmisores, que pueden estar relacionados con las distintas respuestas de los subgrupos neuronales dentro de este núcleo (Schwarz & Luo, 2015). Los compuestos protéicos o neuropéptidos intrínsecos identificados en los cuerpos neuronales del LC son la acetilcolinesterasa, galanina, neuropéptido Y, neurotensina y proteína intestinal vasoactiva. Sin embargo, su papel en el sistema LC-NA es aún incierto, aun cuando fueron descritos desde la década de los 90's, (Schwarz & Luo, 2015; Sutin & Jacobowitz, 1991).

Además de la composición diferencial de proteínas y neuropéptidos, las neuronas del LC, presentan también una expresión diferencial de receptores para diversos neurotransmisores. El neurotransmisor noradrenalina actúa sobre el sistema LC-NA mediante la interacción con los receptores α -adrenérgicos (Aghajanian & VanderMaelen, 1982; Alexander, Davis, & Lefkowitz, 1975; Cedarbaum & Aghajanian, 1977), los cuales se distribuyen de manera heterogénea a lo largo del eje antero-posterior. Siendo el receptor adrenérgico α_2 (RA α_2) el más abundante y localizado preferentemente en la porción anterior del LC, mientras que el receptor adrenérgico α_1 (RA α_1) presenta una expresión menor y se encuentra en la porción anterior de este núcleo (Chamba et al., 1991).

Otros receptores bien caracterizados en el LC, son los receptores nicotínicos de acetilcolina (RnACh), con un efecto despolarizante en estas células (Egan & North, 1986). Los RnACh exhiben una alta expresión de las diferentes subunidades que los componen, y se encuentran heterogéneamente distribuidos. En un estudio de 1999, se propuso una clasificación; en la que por medio de RT-PCR de célula única, se logró identificar una mayor expresión de las subunidades α_6 y β_3 en células con soma grande y en células pequeñas hay una expresión más abundante de las subunidades α_3 y β_4 (Lena et al., 1999).

También ha sido reportada la presencia de receptores de glutamato presentando una colocalización importante con receptores de opioides tipo μ (Van Bockstaele et al., 2000), además de los receptores el ácido γ -amino butírico tipo A (RGABA_A) (Luque, Malherbe, & Richards, 1994); así como los receptores para orexina, con una presencia más representativa del subtipo 1 que del subtipo 2 (Marcus et al., 2001).

2.1.3 Fisiología del locus coeruleus

Electrofisiológicamente hablando, los axones delgados y carentes de mielina que proyecta el *locus coeruleus* al sistema nervioso, se caracterizan por una variabilidad en la velocidad de conducción y periodos de latencia variable que dependen de la frecuencia de disparos espontáneos que caracterizan a las neuronas del LC (Aston-Jones & Bloom, 1981).

Las neuronas del *locus coeruleus* presentan dos patrones de disparo:

- **Tónico**, patrón de disparo que se caracteriza por descargas lentas con tasas de frecuencia baja (2-5 Hz) normalmente con ondas de disparo amplias con 1-2 ms de duración, este patrón de disparo se observa en estados de alerta y de vigilia y se ha determinado que desaparece durante el sueño REM (Usher, Cohen, Servan-Schreiber, Rajkowski, & Aston-Jones, 1999).
- **Fásico**, caracterizado por ráfagas de disparo (10-20 Hz) seguidas de largos periodos de inactividad o disparos esporádicos. Este patrón de disparo ha sido relacionado con tareas que requieren un estado de enfoque atento, filtrando todos los estímulos irrelevantes y permitiendo al sujeto concentrarse en la realización de dicha tarea y asociado con respuestas de comportamiento altamente preciso (Aston-Jones & Cohen, 2005).

2.1.4 Regulación eferente del sistema LC-NA

A partir de la segunda mitad de la década de los 70's, por medio de estudios de cito-histoquímica e inyección de trazadores retrógrados, se determinó que las proyecciones eferentes del LC se distribuyen por casi todo el sistema nervioso central y la médula espinal (Benarroch, 2018; Berridge & Waterhouse, 2003), con excepción del núcleo *accumbens*, el estriado, la *substantia nigra* y el *globus pallidus* (Swanson, 1976).

En general las proyecciones eferentes de LC, se organizan de forma diferencial topográficamente hablando. Uno de los primeros estudios que reveló tal afirmación, fue el de Manson y Fibiger (1979), en dónde establecen que las proyecciones que se dirigen hacia el prosencéfalo provienen principalmente del LC dorsal, mientras que las fibras que inervan al cerebelo y medula espinal se distribuyen mayoritariamente en la zona ventral. Otro ejemplo de esta heterogeneidad se observa en las inervaciones que se dirigen hacia el tálamo, ubicadas predominantemente hacía la parte caudal del núcleo, en tanto las inervaciones que proyectan al hipotálamo se ubican hacía la zona rostral. Por otro lado, las fibras que inervan tanto a la amígdala como la neocorteza, se distribuyen a través de todo el núcleo (Loughlin, Foote, & Grzanna, 1986; Mason & Fibiger, 1979). Algunas de estas afirmaciones han sido confirmadas en trabajos recientes, con técnicas como optogenética y el uso de animales transgénicos (Schwarz et al., 2015).

Una característica destacable de las fibras que surgen del sistema LC-NA, es la capacidad de colateralización que poseen. Ya que una misma fibra es capaz de ramificar inervando diferentes regiones tales como la corteza y el cerebelo (Nagai et al., 1981). Asimismo, existe evidencia de que los axones de las neuronas de este sistema envían fibras colaterales que inervan circuitos funcionalmente relacionados (Simpson et al., 1997; Steindler, 1981). Por otro lado, actualmente se ha descrito que las ramificaciones de los axones que se dirigen hacia la corteza son más aisladas (Chandler, Gao, & Waterhouse, 2014). En la figura 2 se puede observar al sistema LC-NA y la inervación de éste hacia el cerebro.

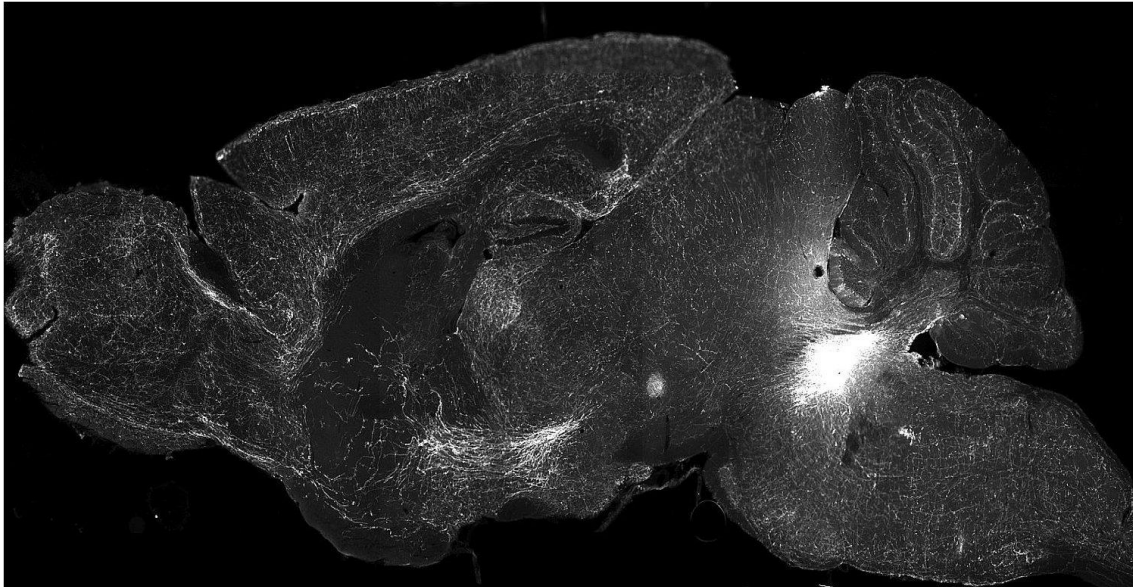


Figura 2. Cerebro de ratón en corte sagital, donde el *locus coeruleus* se encuentra marcado con fluorescencia asociada a adenovirus; destacando la extensa inervación de las neuronas del LC al resto del cerebro (Tomada de Weele, 2018).

2.1.5 Regulación aferente de sistema LC-NA

Las señales de entrada que recibe el LC constituyen una regulación diversa en términos de tipos celulares, composición neuroquímica y funcional (Chandler, 2016); recibiendo inervación del núcleo paragigantocelular y el núcleo prepósito del hipogloso, ambos núcleos ubicados en el tronco cerebral (Aston-Jones et al., 1986). Adicionalmente, recibe fibras presinápticas de la corteza prefrontal, hipotálamo lateral, amígdala, núcleo cama de la estría medullaris, núcleo reticular del cerebro medio, núcleo vestibular espinal y núcleo dorsal del rafe (Cedarbaum & Aghajanian, 1978; Mignot, 2001; Peyron et al., 1998; Pickel, Joh, & Reis, 1977; Valenzuela Harrington, Díaz, & Rodríguez-Moreno, 2007). En la figura 3 se muestra un esquema de las vías aferentes que inervan al LC.

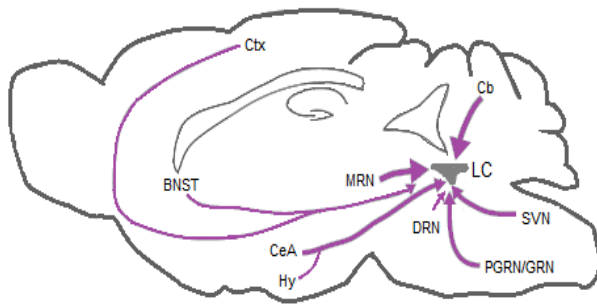


Figura 3 Proyecciones aferentes del *locus coeruleus*. Esquema de vista sagital del cerebro de ratón ilustrando la ubicación del *locus coeruleus* en gris, y las regiones del cerebro que lo inervan (flechas moradas). Abreviaturas por sus siglas en inglés: Ctx, corteza; BNST, núcleo cama de la estría terminalis; CeA, amígdala central; Hy, hipotálamo; MRN, núcleo reticular del cerebro medio; DRN, núcleo dorsal de rafe; PGRN, núcleo paragigato celular; GGRN, núcleo gigantocelular; SVN, núcleo espinal vestibular; Cb, cerebelo y LC, locus coeruleus Tomada y modificada (L. A. Schwarz & Luo, 2015).

Las fibras aferentes que recibe el LC, provenientes de la médula espinal y el tallo cerebral, integran las señales de estimulación sensorial que activan a las neuronas de este núcleo. (Igarashi, Sasa, & Takaori, 1979; Korf, Aghajanian, & Roth, 1973). Entre las provenientes de la médula espinal encontramos aferentes monoaminérgicas. Aquellas que inervan desde el núcleo del tracto solitario son de tipo noradrenérgico, así como también inervaciones serotoninérgicas provenientes del rafe y por neuronas dopaminérgicas de la *substantia nigra* (Cedarbaum & Aghajanian, 1978; Conrad, Leonard, & Pfaff, 1974; Morgane & Jacobs, 1979; Sakai et al., 1977).

Además de la modulación por parte de los neurotransmisores canónicos, muchas de las inervaciones que recibe el LC median su efecto a través de la liberación de neuropéptidos moduladores, algunos de estos provienen principalmente del diencefalo y el telencefalo. Algunos ejemplos de estos neuromoduladores son la hormona adrenocorticotropina (ACTH), neurotensina, angiotensina II, orexina y vasopresina (Buijs et al., 1978; Fuxe et al., 1976; Uhl, Goodman, & Snyder, 1979; Watson, Richard, & Barchas, 1978).

2.1.6 Funciones del sistema LC-NA

Todas las características antes mencionadas hacen al sistema LC-NA participar en la modulación de las funciones más destacadas del cerebro, tales como el estado de alerta (Carter et al., 2010), la atención (Usher et al., 1999) y la memoria (Sara, 2015). Al mismo tiempo, se ha reportado la participación de este sistema en la regulación de procesos homeostáticos periféricos como cambios en la presión sanguínea (Curtis, Drolet, & Valentino, 1993), equilibrio de fluidos (Godinot et al., 2005), contractilidad de la vejiga (Rickenbacher et al., 2008) y del intestino (Lechner et al., 1997).

Los procesos neuronales y las respuestas a nivel del sistema nervioso y periférico, se conjuntan para la adaptación a estímulos estresores tanto fisiológicos como emocionales, lo que es trascendente para la supervivencia de los organismos (Valentino & Van Bockstaele, 2008).

2.2 Sistema Vasopresinérgico

2.2.1 Arginina Vasopresina

Estructura química, Síntesis y liberación

La arginina vasopresina (AVP) es un nonapeptido (Cys-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys-Pro-Arg-Gly-NH₂) caracterizado bioquímicamente en la década de los 50's. Consiste de un anillo de 6 aminoácidos conectados por un puente disulfuro entre las cisteínas 1 y 6 y una cola de 3 aminoácidos (Figura4) (Du Vigneaud, Gish, & Katsoyannis, 1954). La AVP también conocida como hormona antidiurética (ADH) ya había sido reportada con anterioridad precisamente por el efecto por el cual lleva este nombre (Taylor, Du Vigneaud, & Kunkel, 1953) y caracterizada por primera vez en 1895 por Oliver y Schäfer, que demostraron que extractos de la hipófisis modificaban la presión arterial.

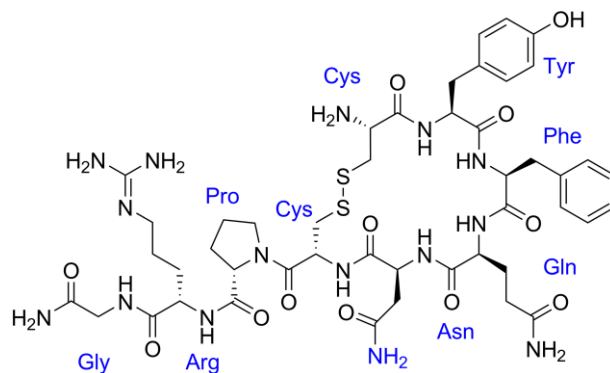


Figura 4. Estructura química de la arginina vasopresina. Se aprecia el puente disulfuro entre las cisteínas 1-6 y el aminoácido arginina (Arg) en la octava posición.

Inicialmente se pensaba que la síntesis de la AVP era en la hipófisis, en la actualidad se sabe que la síntesis se lleva a cabo en el hipotálamo y posteriormente es transportada a la hipófisis posterior (Sachs et al., 1969; Takabatake & Sachs, 1964).

La arginina vasopresina, se sintetiza como un pre-pro-péptido en conjunto con la proteína neurofisiina II y el glucopéptido coceptina, es sintetizada principalmente por las neuronas magnocelulares de los núcleos supraóptico (SON) y paraventricular (PVN) del hipotálamo, que proyectan a la neurohipófisis (Brownstein, Russell, & Gainer, 1980), además de las neuronas parvicelulares localizadas en el PVN. No obstante, también se sintetiza en el núcleo supraquiasmático (SCN), la amígdala central (CeA) y el núcleo cama de la estría terminallis (BNST); siendo las proyecciones de estos últimos núcleos, las permanecen en el cerebro (Buijs et al., 1978; De Vries & Buijs, 1983; DeVries et al., 1985).

Proveniente de las neuronas magnocelulares de SON y PVN hacia la neurohipófisis, la AVP, es liberada al torrente sanguíneo, en donde participa en regulando la reabsorción de agua en los túbulos renales y vasoconstricción (Nishimura & Fan, 2003; Young, 3rd & Gainer, 2003). En cambio, las neuronas parvicelulares mandan sus axones hacia el sistema porta hipofisario, por medio del cual, la arginina vasopresina llega a la adenohipófisis, y regula la secreción de los corticotropos que participan en procesos de estrés y el sistema inmune (Berczi et al., 2009).

2.2.2 Receptores para AVP

El efecto que tiene la vasopresina se debe a la interacción con sus receptores. Hasta ahora se han reportado tres: V_{1a} , V_{1b} y V_2 , todos pertenecientes a la familia de receptores acoplados a proteínas G (Birnbaumer, 2002).

Los receptores : V_{1a} y V_{1b} están acoplados a proteínas $G_{\alpha q}$ -GTP, donde la subunidad αq induce la activación de la fosfolipasa C, que a su vez promueve la hidrólisis del fosfatidilinositol bifosfato (PIP_2) incrementando los niveles intracelulares de diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP_3), activando a los receptores para este último en el retículo endoplásmico, comenzando la liberación de calcio (Ca^{2+}) de las reservas dentro de las célula, que conlleva a la activación de los canales *trp*, para permitir el flujo de Ca^{2+} hacia el interior de la célula para reestablecer la reservas de este mismo catión divalente (Figura 5).

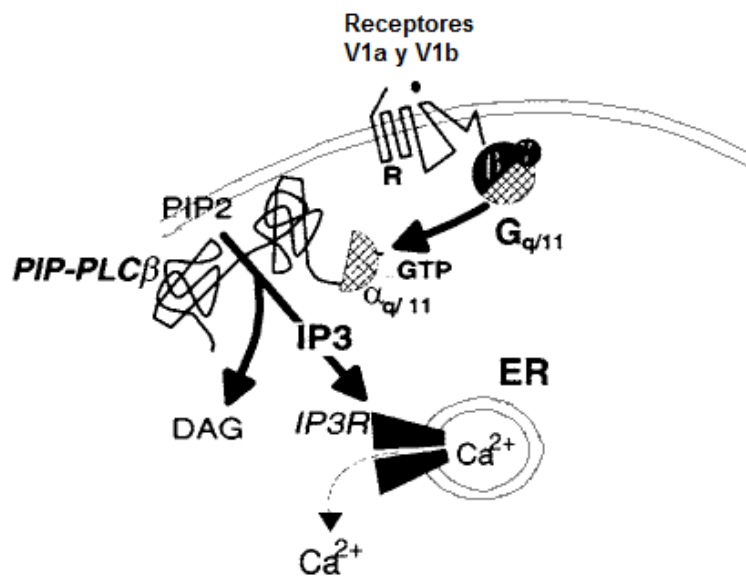


Figura 5. Mecanismo de acoplamiento de los receptores de vasopresina V1. Los receptores V1a y V1b promueven el intercambio GDP-GTP y la formación de α GTP libre a partir de proteínas G pertenecientes a la familia Gq / 11. La subunidad α libre estimulan la actividad de fosfolipasa C β (PLC β). El aumento de la actividad hidrolítica en PIP2 aumenta los niveles intracelulares de trifosfato de inositol (IP3) y diacilglicerol (DAG); IP3 a su vez estimula el receptor para IP3 (IP3R) que reside en la membrana del retículo endoplásmico (ER) y promueve la liberación de calcio (Ca^{2+}) de las reservas intracelulares, mientras que DAG promueve el reclutamiento de membrana y el aumento de la actividad de las enzimas proteína cinasa C, un proceso mejorado por el aumento de la concentración de intracelular Ca^{2+} activado por IP3 (Tomada y modificada de Birnbaumer, 2000)

Por otro lado, el receptor V_2 , se encuentra acoplado a la proteína G_s -GTP, que a través de la vía de activación de la adenilato ciclasa, seguido del incremento del adenosín monofosfato cíclico (cAMP), activando a la proteína cinasa A y favoreciendo la inserción de acuaporinas tipo 2 en las células del ducto colector en el riñón (Berrada et al., 2000; Birnbaumer, 2000; Thibonnier et al., 2002). En la figura 6 se puede apreciar el eje hipotalámico hipofisario, con la distribución de los receptores de AVP y su función en los diferentes órganos y tejidos blanco fuera del sistema nervioso. En la tabla 1 se resumen las características de los receptores para vasopresina.

Tabla 1. Subtipos de receptores para vasopresina (Tomada y modificada de Baylis & Ball, 2013)

Receptores para Vasopresina			
	V1a	V1b	V2
Sitio de expresión	Músculo liso vascular Hígado Plaquetas CNS	Adenohipófisis	Membrana basolateral de nefronas distales
Sistema de segundos mensajeros	Gq/11 → PLC, IP3, DAG, Ca ²⁺		Gs → PKA, cAMP, MAPK
Efectos fisiológicos	Vasoconstricción Glucogenólisis Agregación plaquetaria Neurotransmisión Neuromodulación	Aumento liberación de ACTH	Síntesis y translocación de AQP-2

En cuanto a la presencia de los receptores para vasopresina dentro del sistema nervioso central (CNS), el receptor V1_a, se encuentra ampliamente distribuido a través de todo el cerebro. En trabajos de principios de los noventas, se determinó que este receptor se encuentra en corteza, el septo lateral, BNST, tálamo, hipotálamo, amígdala medial, giro dentado, *substantia nigra* y el área ventral tegmental (Johnson et al., 1993; Ostrowski, Lolait, & Young, 1994). La distribución del receptor V1_b, es más prominente en el hipocampo (W. S. Young, Li, Wersinger, & Palkovits, 2006), aunque también puede ser encontrado en la amígdala, hipotálamo, bulbo olfatorio y corteza (Griebel et al., 2003). Hasta la fecha no hay una evidencia clara de la expresión del receptor V₂ en CNS (Barberis & Tribollet, 1996; Koshimizu et al., 2012)

Por supuesto al tener una distribución tan amplia en el CNS, podemos inferir que la vasopresina está involucrada tanto en procesos fisiológicos y cognitivos tan diversos como la distribución de sus receptores.

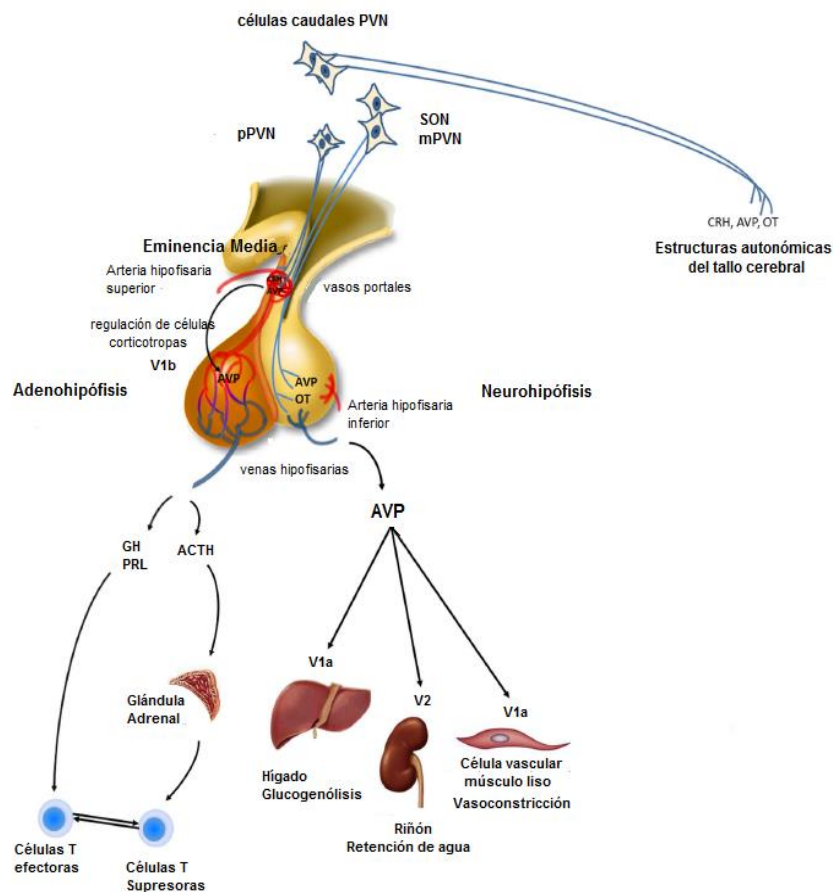


Figura 6. Representación esquemática del papel de la arginina-vasopresina (AVP) y su espectro fisiológico. Abreviaturas: CRH, hormona liberadora de corticotropina; OT, Oxitocina; pPVN, neuronas parvocelulares del núcleo paraventricular; mPVN, neuronas magnocelulares del núcleo paraventricular; GH, hormona del crecimiento; PRL, prolactina; AVP, arginina-vasopresina; V1a, V1b y V2 receptores de vasopresina. (Tomada y modificada de Rotondo et al., 2016)

2.2.3 Funciones del Sistema Vasopresinérgico

Las funciones periféricas del sistema vasopresinérgico son numerosas y variadas (Fig. 6), algunas antes ya mencionadas son la regulación de la presión arterial (Dunn et al., 1973), equilibrio hidroelectrolítico, la coagulación de la sangre (Haslam & Rosson, 1972), el metabolismo energético (Hems, Whitton, & Ma, 1975) y la liberación de la corticotropina (Scott & Dinan, 1998). En cuanto a las funciones dentro del sistema nervioso en su papel como neuromodulador, la AVP participa en procesos de memoria y aprendizaje (Alescio-Lautier et al., 1995; Croiset, Nijssen, & Kamphuis, 2000), regulación de emociones como el estrés y la ansiedad (Engelmann et al., 1998; Engelmann et al., 2000), comportamiento social (Blanchard et al., 2005; Frazier et al., 2006) y ritmos circadianos (Hut et al., 2002).

2.4 Relación entre el sistema LC-NA y sistema vasopresinérgico

Al observar las funciones que desempeña cada uno de los sistemas, es evidente una gran coincidencia, no obstante, la información hasta el momento de la cooperación entre estas dos vías homeostáticas es limitada.

La presencia de fibras vasopresinérgicas o arginina-vasopresina en el LC es conocida desde los años 70's y ha sido confirmada con trabajos y técnicas recientes, sin embargo, no hay información acerca del tipo de neuronas dentro del LC con las que estas fibras tienen contacto (Buijs et al., 1978; Rood & De Vries, 2011; Swanson, 1977).

Uno de los campos más desarrollados en cuanto a la interacción de estos dos sistemas es el funcional, ejemplos de esto es un trabajo en donde las inyecciones de AVP en el complejo de *locus coeruleus* en gatos altera la postura y los reflejo vestíbulo-espinales (Andre et al., 1992), no obstante, no se logró identificar las neuronas participantes en estos fenómenos. También, registros electrofisiológicos en neuronas del LC de gerbos mostraron un efecto excitatorio por parte de la AVP (Olpe et al., 1987).

Modificaciones en la excitabilidad por parte de la vasopresina han sido reportados en otras áreas del sistema nervioso. Un ejemplo de ello son las motoneuronas de la médula espinal, en donde la expresión de los receptores V1_a es abundante durante el desarrollo, y a través de éstos, es que la vasopresina tiene un efecto excitatorio significativo en las motoneuronas de roedores (Liu et al., 2003; Ogier et al., 2006; Raggenbass et al., 1991).

Efectos sobre la fisiología de las neuronas por parte de la AVP, han sido reportados también en la amígdala medial, con un efecto excitatorio e inhibitorio de subpoblaciones de neuronas registradas (Lu et al., 1997), así como en la habénula lateral (Zhang et al., 2016) y también en el septo lateral se ha registrado un efecto sobre la excitabilidad por parte de este neuropéptido (Raggenbass et al., 1988).

La participación de la arginina vasopresina en procesos de estrés ha sido ampliamente reportada en diversos trabajos, principalmente la en el eje hipotalámico hipofisario en donde la liberación de ACTH, está íntimamente relacionada con la interacción de la hormona liberadora de corticotropina (CRH) y AVP con sus respectivos receptores (Aguilera & Rabadan-Diehl, 2000; Gaillard et al., 1984; Tilbrook & Clarke, 2006). La excreción de ACTH por parte de la AVP depende de la interacción específica con el receptor V1_b presente en la adenohipófisis. Estudios relativamente recientes con células derivadas de la pituitaria anterior de ratones Knock out (KO) para el receptor V1_b, tras un tratamiento con vasopresina, no liberaron ACTH (Lolait et al., 2007; Tanoue et al., 2004).

Otra manera de comprobar la liberación de ACTH por la presencia de AVP, ha sido gracias al desarrollo de antagonistas específicos para el receptor V1_b; la aplicación de estos antagonistas disminuye la liberación de corticotropina (Serradeil-Le Gal et al., 2005; Serradeil-Le Gal et al., 2002).

El *locus coeruleus* también forma parte importante de las vías de respuesta al estrés. Antes del descubrimiento de la CRH, se reportó un incremento en los niveles de noradrenalina en la corteza y el hipocampo de ratas estresadas (Abercrombie, Keller, & Zigmond, 1988; Korf et al., 1973). Además de la modificación del metabolismo desde este mismo neurotransmisor en el sistema nervioso central (Cassens et al., 1981; Thierry et al., 1968), otros estudios mostraron un incremento en la expresión de tirosina hidroxilasa (TH) en neuronas del LC (Melia & Duman, 1991). Siendo esta estructura la principal fuente de noradrenalina del CNS, estas modificaciones en los niveles de neurotransmisor o participantes en el metabolismo del mismo como la TH, se presentaban como evidencia indirecta de la participación del LC en los procesos del estrés.

En estudios posteriores a la identificación de la hormona liberadora de corticotropina, fue detectada la presencia de esta hormona en axones que inervan al LC (Cummings et al., 1983; Swanson et al., 1983).

En cuanto a la identificación de los receptores que pueden estar participando en la modulación de las fibras de AVP en el LC, el trabajo reportado más cercano, es el de la expresión del receptor V1_b por medio de la identificación del RNA mensajero (mRNA) en el

puente troncoencefálico, más no hay un reporte específico de la expresión de este receptor en el LC (Young et al., 2006).

Tomando en consideración la variabilidad morfológica y neuroquímica de las neuronas noradrenérgicas y no noradrenérgicas en el LC (Corteen et al., 2011; Schwarz & Luo, 2015), la correlación entre las fibras vasopresinérgicas y el tipo de neuronas que estas interactúen en el LC derive en una variabilidad de respuestas en el sistema LC-noradrenérgico.

3.Planteamiento del problema

El *locus coeruleus* es la fuente principal de noradrenalina del sistema nervioso en mamíferos y desempeña un papel importante en la modulación de diversos procesos neuronales; tales como el estado de alerta, el aprendizaje y la memoria, así como diversos procesos homeostáticos a nivel periférico como cambios en la presión sanguínea, equilibrio de fluidos, contractilidad intestinal y de la vejiga. Asimismo, forma parte importante en las vías de respuesta al estrés. Esta modulación es dependiente de las señales que este sistema recibe, entre las cuales se encuentra el sistema vasopresinérgico.

La arginina vasopresina participa en funciones periféricas como la regulación de la presión arterial, el equilibrio hidroelectrolítico, coagulación en sangre, metabolismo energético y liberación de la corticotropina. Y a nivel de sistema nervioso central está relacionada con procesos de memoria, aprendizaje, ritmos circadianos, comportamiento social y regulación de emociones como el estrés y la ansiedad.

Conocer más a fondo la relación entre estos dos sistemas puede ayudar a comprender mejor las interacciones específicas entre ambos.

Para ello sería importante la determinación de la distribución de las fibras vasopresinérgicas, así como la identidad y distribución de los receptores para AVP presentes en el LC, así como la posible interacción del sistema vasopresinérgico con las diferentes entidades sinápticas y otros péptidos moduladores. Asimismo, los efectos que la AVP puede tener sobre la electrofisiología de las neuronas del LC.

Dada la participación de los sistemas LC-noradrenérgico y vasopresinérgico en la respuesta a procesos de estrés, es posible que exista una cooperación de estos dos sistemas y que aún no ha sido explorada.

4-5. Hipótesis y Objetivos

4. Hipótesis

La presencia de los receptores para arginina vasopresina en el *locus coeruleus* modula la interacción entre este núcleo y el sistema vasopresinérgico.

5. Objetivo general

Estudiar la neurotransmisión vasopresinérgica en la modulación del sistema LC-noradrenérgico.

5.1 Objetivos particulares

1. Identificar la distribución específica de fibras vasopresinérgicas en el LC.
2. Determinar la identidad de los subtipos de receptores para AVP que expresan las neuronas del locus coeruleus.
3. Determinar la localización de los receptores de AVP y su contribución en la excitabilidad neuronal dentro de la red celular del LC.
4. Determinar si hay un cambio en la expresión de los receptores de AVP en procesos de estrés agudo.

6. Metodología

Todos los experimentos se realizaron en colaboración con el laboratorio Neurochemical Anatomy & Psicopharmacology del Dr. Jerome Swinny en el departamento School of Pharmacy of Biomedical Science de University of Portsmouth, UK.

Todos los procedimientos que involucran experimentos con animales fueron aprobados por el Organismo de Revisión Ética y Bienestar Animal de la Universidad de Portsmouth y fueron realizados por un titular de licencia personal, bajo una licencia de proyecto emitida por el Ministerio del Interior, de conformidad con la Ley de Animales (Procedimientos Científicos), 1986 (Reino Unido) y procedimientos asociados.

Los ratones utilizados en este trabajo fueron criados dentro del bioterio de las instalaciones del departamento de School of Pharmacy of Biomedical Science de University of Portsmouth, en un ambiente de humedad y temperatura controlados, con un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas con acceso libre a comida y agua.

6.1 Inmunohistoquímica

Para la determinación la expresión de AVP, como de los subtipos de receptores para AVP, se siguió un protocolo previamente publicado por Corteen y colaboradores en 2011. Se utilizaron ratones machos adultos (2-4 meses de edad) de la cepa C57BL/6J y con la depleción gen-específica para los receptores V1a y V1b (Koshimizu et al., 2006; Tanoue et al., 2004), los animales fueron profundamente anestesiados y perfundidos vía aorta ascendente con solución salina al 0.9 % durante 2 minutos, seguido por 12 minutos de fijador frío compuesto por 1% de paraformaldehído más 15% v/v de ácido pícrico saturado en buffer de fosfato de sodio 0.1 M (PB, pH 7.4). Los cerebros fueron removidos y sometidos a post-fijación en el mismo buffer durante toda la noche a temperatura ambiente. Acto seguido, se obtuvieron rebanadas horizontales de 60 μm de grosor con ayuda de un vibratomo, lavadas y posteriormente almacenadas en buffer PB 0.1 M más 5% azida de sodio a 4°C hasta ser procesadas.

Se seleccionaron rebanadas que contenían al LC y fueron bloqueadas en buffer de Tris más NaCl 0.9% y Tritón 100x al 0.3% (TBS-Tx) más suero normal de caballo al 20% (S-2000, Vector Laboratories Inc.) por dos horas, con la finalidad de minimizar uniones inespecíficas por parte de los anticuerpos secundarios. A continuación, las rebanadas fueron incubadas en una mezcla de anticuerpos primarios diluidos en buffer TBS-TX, durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente las rebanadas fueron lavadas durante 10 minutos por triplicado en TBS-Tx, posteriormente fueron incubadas por dos horas a temperatura ambiente con la mezcla correspondiente de anticuerpos secundarios conjugados con Alexa Fluor 488, indio carbocianina (Cy3) e indio carbocianina (Cy5) ambos de Jackson ImmunoResearch. Una vez transcurrido el tiempo de incubación fueron lavadas con TBS-Tx por 10 min. por triplicado, después fueron montadas sobre portaobjetos de vidrio, con medio de montaje Vectashield (H-1000, Vector Laboratories Inc.)

Este mismo procedimiento fue seguido para determinar específicamente la distribución de los receptores para vasopresina y la interacción de las fibras vasopresinérgicas en conjunto con marcadores específicos del soma neuronal (Huc) (Jourdon et al., 2016; Okano & Darnell, 1997; Senut et al., 2009), dendrítico (MAP2) (Kosik & Finch, 1987; Kwei, Jiang, & Haddad, 1993) sinapsis excitatorias mediante la inmunodetección del transportador de glutamato (VGLUT2) (Seifi et al., 2014) y las sinapsis inhibitorias fueron identificadas mediante la inmunoreactividad del transportador del ácido gamma-amino butírico (VGAT) y la proteína citoplasmática de andamiaje, gefirina que ancla a los receptores de glicina en la postsinapsis (Corteen et al., 2011; Giesemann et al., 2003).

Para determinar la interacción con otros neuromoduladores previamente reportados en el LC, se realizó la inmunodetección del sistema vasopresinérgico en conjunto con el de la sustancia P (Guyenet & Aghajanian, 1979; Pickel et al., 1979), encefalina (Van Bockstaele, Branchereau, & Pickel, 1995), orexina A (Hagan et al., 1999; Horvath et al., 1999) y CRH (Valentino, Foote, & Aston-Jones, 1983).

Las especificaciones de los anticuerpos utilizados se encuentran en la tabla 2.

Tabla 2. Especificaciones de los anticuerpos primarios usados para este trabajo.

Anticuerpo	Huésped	Dilución	Fuente y No. de Cat.	Especificidad y Referencia
AVP	Conejo	1:3000	Abcam, ab39363	La señal puede ser eliminada por incubación simultánea con AVP, (Kerman, Akil, & Watson, 2006)
AVP	Conejo	1:200	Immunostar, 20069	Pre adsorción con AVP sintético (10 μ M) ha resultado en la pérdida total de inmunomarcaje en el PVN del hipotálamo de roedores, (Villanueva, Jacquier, & de Roux, 2012)
Receptor V1a	Conejo	1:4000	Kerim Mutig y Torsten Giesecke Instituto de Anatomía Vegetativa, Charité Universitätsmedizin Berlín, Alemania	
Receptor V1b	Conejo	1:5000	Kerim Mutig y Torsten Giesecke Instituto de Anatomía Vegetativa, Charité Universitätsmedizin Berlín, Alemania	
Receptor V2	Conejo	1:250	Millipore, AB1797P	(Sato, Numata, Saito, Ueta, & Okada, 2011)
CRH	Conejillo de Indias	1:10000	Peninsula Laboratories, T-5007.0050	Patrones de expresión en estudios previos
Encefalina	Ratón	1:3000	Abcam, ab150346	(Cuello et al., 1984)
Gefirina	Ratón	1:1000	Synaptic Systems, 147021	Ratones Knockout, (Pfeiffer, Simler, Grenningloh, & Betz, 1984)
HuC	Ratón	1:500	ThermoFisher, A-21271	Patrones de expresión en estudios previos
MAP2	Pollo	1:500	Aves Labs, MAP0607	Patrones de expresión en estudios previos
Orexina-A	Ratón	1:4000	Abcam, ab89886	Patrones de expresión en estudios previos
Substancia P	Conejillo de Indias	1:500	LSBio, LS-C76141	Patrones de expresión en estudios previos
Tirosina Hidroxilasa	Oveja	1:3000	Abcam, ab113	Patrones de expresión en estudios previos
VGAT	Conejillo de Indias	1:3000	FRONTIER INSTITUTE, VGAT-GP-Af1000	Pre adsorción con el péptido resulta en pérdida total del inmunomarcaje, (Miyazaki, Fukaya, Shimizu, & Watanabe, 2003)
VGLUT2	Conejillo de Indias	1:3000	FRONTIER INSTITUTE, VGLuT2-GP Af810	Pre adsorción con el péptido resulta en pérdida total del inmunomarcaje, (Miyazaki et al., 2003)

Obtención de imágenes

Las secciones fueron examinadas con un microscopio confocal de escaneo láser (LSM710 o LSM 880; Zeiss, Oberkochen, Alemania) utilizando un objetivo de aceite Plan Achromatic 63 x DIC (NA 1.4, tamaño de píxel de 0.13 μm). Se utilizaron Z-stacks para la evaluación de rutina del etiquetado. Todas las imágenes presentadas representan una sola sección óptica. Estas imágenes se obtuvieron mediante la adquisición secuencial de los diferentes canales para evitar interferencias entre los fluoróforos, con los orificios ajustados a una unidad Airy. Las imágenes se procesaron con el software Zen 2009 Light Edition (Zeiss, Oberkochen, Alemania) y se exportaron a Adobe Photoshop. Sólo se ajustó el brillo y el contraste para todo el fotograma y ninguna parte de un fotograma se mejoró o modificó.

6.2 Detección del ARN mensajero del receptor V2 por medio de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real-cuantitativo (qPCR)

Cinco ratones machos adultos se sacrificaron por dislocación cervical y se prepararon homogeneizados de tejido del LC y riñón. El RNA se extrajo de las muestras utilizando un RNeasy mini kit (Qiagen, 74104) de acuerdo con el protocolo del fabricante. La misma cantidad de RNA de cada tejido se transcribió de forma inversa en el primer cDNA en la siguiente reacción: 2 μl de buffer de transcripción reversa (BioLabs), 1 μl de oligo (Ungerstedt)s (ThermoFisher Scientific), 1 μl DNTP (ThermoFisher Scientific), 0,5 μl de M-Mulv transcriptasa reversa (Applied Biosystems) y 0.5 μl de Inhibidor de RNAsa RiboLock (ThermoFisher Scientific). La amplificación por PCR cuantitativa (qPCR) se realizó en placas de 96 pozos en una mezcla maestra para sondas (Roche, Burgess Hill, Reino Unido) y se ejecutó en un sistema LightCycler® 96 (Roche). Las amplificaciones de qPCR para el gen V2 de ratón (ID de ensayo: Mm00517071_m1) se realizaron utilizando cebadores/sondas Taqman prediseñados adquiridos en Life Technologies (ThermoFisher scientific). La expresión del gen Gapdh (ID de ensayo: Mm99999915_g1) se usó como el gen de mantenimiento en varias reacciones. Las condiciones de ciclo de la qPCR implicaron 95°C durante 10 minutos y 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 60 segundos (LightCycler® 96 System, Roche). Se generaron curvas estándar para cada gen utilizando diluciones en serie de una cantidad conocida de mRNA extraído de cada órgano que luego se transcribieron de forma reversa en cDNA. Cada medición se realizó por duplicado y cada valor de Ct se convirtió en ng de mRNA utilizando el análisis de regresión lineal de la curva

estándar (Microsoft Excel). Cada valor en ng de mRNA se normalizó contra el nivel en ng del gen de mantenimiento dentro de la misma muestra y los niveles promedio de mRNA para cada muestra finalmente se calcularon y compararon entre las muestras de tejido.

6.3 Registro electrofisiológico de rebanadas de LC mediante la técnica de fijación de voltaje en microáreas de membrana, en la configuración de célula completa (whole cell patch clamp)

Para determinar el efecto de la AVP, así como la participación de los receptores para AVP sobre la actividad eléctrica de las neuronas noradrenérgicas del LC, se llevaron registros electrofisiológicos que se realizaron en el tallo cerebral de ratones machos juveniles de 25-30 días de nacidos siguiendo los protocolos previamente publicados (Swinny et al., 2010). Las composiciones de las soluciones de registro utilizadas para este trabajo se observan en la Tabla 3. Todas las soluciones fueron oxigenadas con 95% O₂-5% CO₂ previamente y durante los experimentos.

Tabla 3. Soluciones para registro electrofisiológico

Solución de corte (SC)	Solución Extracelular (SEC)	Solución Intracelular (SI)
Reactivos en concentración (mM)		
Sacarosa (234)	NaCl (126)	K-gluconato (70)
KCl (2.5)	KCl (2.95)	KCl (70)
NaH ₂ PO ₄ (1.25)	NaH ₂ PO ₄ (1.25)	HEPES (10)
NaHCO ₃ (26)	NaHCO ₃ (26)	EGTA (10)
Dextrosa (10)	Dextrosa (10)	MgCl ₂ (2)
MgSO ₄ (10)	MgSO ₄ (2)	CaCl ₂ (1)
CaCl ₂ (0.5)	CaCl ₂ (2)	ATP (2)

Los animales fueron decapitados rápidamente y la cabeza se colocó en solución de corte helada y oxigenada. El cerebro fue rápidamente removido y cortado aislando la región del tallo cerebral, posteriormente fijada en un vibratomo equipado con una navaja de cerámica y sumergida en solución de corte helada y oxigenada. Se cortaron rebanadas horizontales de 200 µm de grosor del tallo cerebral que contenían al LC, acto seguido fueron colocadas en un vial contenedor con solución extracelular durante 1 hr a 37°C, después se mantuvieron a temperatura ambiente y se transfirieron un a la vez a la cámara de registro.

La evaluación electrofisiológica se realizó colocando una rebanada en la cámara de registro y con perfusión continua de SEC a un flujo de 1 ml/min a 32°C. El *locus coeruleus* fue identificado con ayuda de un objetivo 10x de baja potencia como una zona carente de mielina, las neuronas del LC se visualizaron con un microscopio vertical Olympus B50 equipado con un objetivo de inmersión en agua 40x, con contraste de interferencia diferencial y un filtro infrarrojo. Las pipetas de registro se crearon de tubos capilares de vidrio de boro silicato (1.2 mm d.o., 0.69 mm d.i.; Warner Instruments) utilizando un estirador de micropipetas Narishige PC-10. Las micropipetas fueron llenadas con solución interna de gluconato de potasio (Maguire et al., 2014) con 0.1 % de biocitina (pH 7.3) para permitir la identificación de las células posteriormente a su registro.

Una vez seleccionada una neurona, el electrodo fue aproximado a la célula formando un parche de G Ω fijando el potencial de membrana a -60 mV, acto seguido se rompió la membrana para obtener la configuración de registro de célula completa, se utilizó un amplificador Multiclamp 700B (Molecular Devices, United States). La resistencia de entrada fue monitoreada a lo largo del experimento, si ésta era inestable o excedía cuatro veces la resistencia del electrodo o 20 M Ω los datos electrofisiológicos de esa célula fueron descartados. Durante las grabaciones se controló la temperatura de la solución del baño; las temperaturas oscilan entre 31 y 32.2°C. Las señales se digitalizaron mediante el convertidor analógico digital de la serie 1320 de Digidata, se tomaron muestras a 10 KHz, se filtraron a 10 KHz y se almacenaron digitalmente con el software pClamp 10 (Molecular Devices).

Una vez adquirida la configuración en whole-cell, antes de la adquisición de datos, las células se dejaron sin perturbación como mínimo 5 minutos, para permitir un equilibrio electrolítico entre el citoplasma de la neurona y la solución intracelular. El proceso experimental para determinar la frecuencia de disparo (Hz), consistió en el registro de la actividad espontánea de las neuronas durante 2-3 minutos, los criterios para aceptar estos registros fue una amplitud del potencial de acción de 65-70 mV, la forma característica de los potenciales de acción de las neuronas del LC y un potencial de membrana entre -50 y -60 mV, manteniendo una resistencia y línea base estable además de no presentar una despolarización a lo largo del tiempo.

Para la caracterización de las propiedades de la membrana antes y después de la aplicación de los fármacos, se utilizó un protocolo de inyección de pasos de corriente (I/V) de la siguiente manera: el potencial de membrana de la célula fue hiperpolarizado con la inyección de corriente negativa hasta alcanzar los -80 mV para inhibir el disparo neuronal, posteriormente se inyectaron pasos de corriente de 20 pA desde los -40 pA hasta 180 pA con una duración de 200 ms. Una vez establecida la caracterización de las neuronas, éstas se expusieron a desmopresina y antagonistas específicos de los receptores para AVP que fueron aplicadas por perfusión en la cámara de registro por al menos 10 minutos, posteriormente se midieron una vez más las características de las células. Se registró sólo una neurona por rebanada y los datos fueron analizados con el software Clampfit (Molecular Devices) Ver apéndice A.

Después del registro, la pipeta fue retirada cuidadosamente y la rebanada removida de la cámara de registro y sumergidas en un vial con fijador paraformaldehído al 1% durante toda la noche. Al día siguiente fueron lavadas en buffer TBS-Tx, después se incubaron con suero normal de caballo al 20% a temperatura ambiente durante una hora. Transcurrido el tiempo fueron incubadas con un anticuerpo contra TH durante la noche a 4°C. Posteriormente a un proceso de lavado, las rebanadas fueron incubadas con un anticuerpo secundario anti-estreptavidina acoplado a Alexa Fluor 488 (1:1000) (Molecular Probes, United States), además de un anticuerpo secundario para visualizar TH, durante 2 horas a temperatura ambiente. Las imágenes de las rebanadas fueron tomadas con un microscopio confocal (Zeiss LMS 710) para confirmar que la neurona registrada se ubicaba dentro del LC y era inmunopositiva a TH.

6.3.1 Compuestos y fármacos

Todos los reactivos para las soluciones de registro se obtuvieron de Sigma. La Tabla 4 contiene la información sobre el agonista y los antagonistas de los receptores de AVP.

Tabla 4. Fármacos utilizados en registro electrofisiológico

Fármaco	Función	Concentración
Desmopresina	Agonista de recetores V1b y V2	200 μ M
[d(CH ₂) ₅ 1, Tyr(Me) ₂ , Arg ₈]-Vasopresina	Antagonista específico del receptor V1 _a	30 nM
TASP0390325	Antagonista específico del receptor V1 _b	20 nM

6.4 Estrés agudo por restricción de movimiento

Para de establecer si el sistema vasopresinérgico se encuentra implicado en las vías de respuesta al estrés dentro del LC, diez ratones machos, fueron utilizados en este experimento. Cinco fueron separados como animales control y los cinco restantes fueron sometidos a estrés agudo, colocándolos en un inmovilizador de roedores Plexiglas (Harvard Apparatus) durante 60 minutos. Transcurrido el tiempo fueron colocados en sus jaulas durante 60 minutos más, para posteriormente ser sacrificados siguiendo el protocolo de perfusión mencionado anteriormente y el tejido fue usado para inmunohistoquímica a manera de determinar cambios en la inmunoreactividad de los receptores para AVP.

7. Resultados

7.1 Determinación de la expresión de los receptores de arginina vasopresina en LC.

La actividad de la arginina vasopresina, está dada mediante la interacción con sus receptores, por tanto, establecer la presencia e identificación de alguno de los tres subtipos de receptores de AVP conocidos hasta ahora, en las neuronas del LC es de suma importancia. En las reacciones inmunohistoquímicas, la expresión de los receptores V1_a se observó como agrupaciones individuales principalmente distribuidas en los somas y la región dendrítica de las neuronas identificadas como noradrenérgicas por la inmunoreactividad positiva a la enzima tirosina hidroxilasa (TH) que forma parte de la ruta de síntesis de la noradrenalina (Figura 7 A1).

La especificidad del anticuerpo utilizado para la detección del receptor V1_a se demostró mediante la inmunohistoquímica (IHC) en el tejido de los ratones knock out para este receptor, donde no se identificó un patrón específico de marcaje, en la figura 7 panel A2 se puede observar sólo una señal difusa cercana al núcleo sin asociación clara a algún perfil celular.

Para el caso de la inmunoreactividad del receptor V1_b, también mostró una distribución somatodendrítica en neuronas noradrenérgicas, sin embargo, la señal fue más generalizada siendo posible evidenciar de la presencia de este receptor en neuronas no noradrenérgicas (Figura 5 B1). Igualmente, la especificidad del anticuerpo utilizado se determinó al no detectar una señal clara de expresión del receptor V1_b en el tejido de ratones knock out (Figura 7 B2).

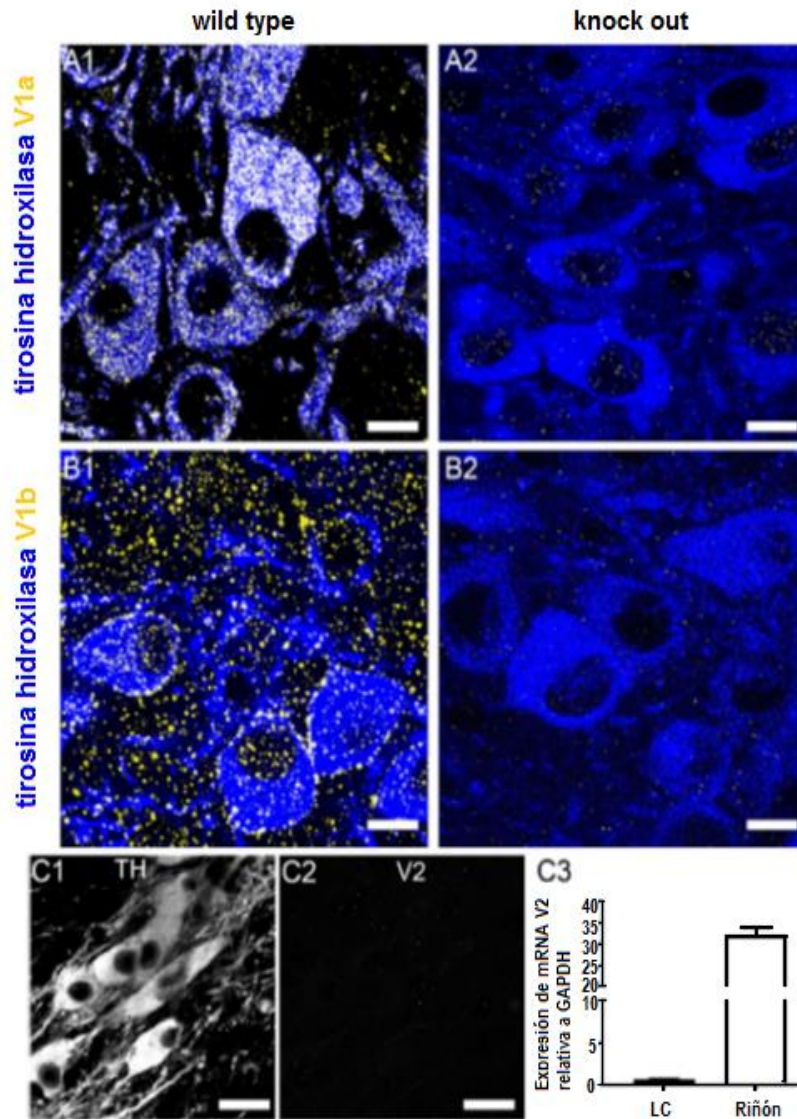


Figura 7. Identificación de la expresión de los receptores V1a y V1b y determinación de la unión-especificidad de los anticuerpos en el LC. (A1) Muestra la inmunodetección de la tirosina hidroxilasa (TH) en azul y al receptor V1_a en amarillo en el tejido de ratón WT. Se observa que la señal de V1_a se encuentra asociada únicamente al complejo somatodendrítico de células TH positivas. A2 muestra la inmunodetección de TH (azul) y el receptor V1_a (amarillo) en el tejido de ratones Knock out para V1_a, marcaje difuso e inespecífico cercano a núcleos, confirmando especificidad del anticuerpo. (B1) Inmunodetección de TH (azul) y receptor V1_b (amarillo) en tejido de ratón WT, la señal de V1_b se observa asociada tanto a células TH-inmunopositivas, así como a zonas que no presentan inmunoreactividad a TH. (B2) muestra la inmunodetección de par TH (azul) y receptor V1_b (amarillo) en el tejido del ratón Knock out para este receptor, sólo se detectan señales no específicas y muy difusas confirmando la especificidad del anticuerpo anti-V1_b. C1 Inmunodetección de TH en LC. (C2) muestra el campo de visión correspondiente a (C1) sin señal detectable del anticuerpo anti-receptor V2. (C3) El gráfico muestra la expresión del ARNm del receptor V2 en tejido de LC y riñón en donde la expresión de receptor V2 es abundante. La cantidad de ARNm de V2 es despreciable a comparación

En la inmunodetección realizada para la expresión del receptor V₂, no fue posible determinar un marcaje específico para este receptor (Figura 7 C1 y C2), por lo tanto, se decidió verificar la ausencia de este receptor a nivel de ARN mensajero, comparando la cantidad de mensajero que codifica para este receptor, con el tejido de riñón en donde la expresión de este receptor es bien conocida. Los resultados que arrojaron las pruebas de RT-PCR cuantitativo con el tejido de 5 animales, fueron una alta expresión del mensajero para V₂ en los riñones, mientras que en el LC en comparación las cantidades fueron insignificantes (Figura 7 C3). Lo que nos llevó a concluir que los receptores V_{1a} y V_{1b} son los principales subtipos que se expresan en el *locus coeruleus*.

7.2 Expresión de los receptores V1_a y V1_b por neuronas noradrenérgicas y no noradrenérgicas del LC en proximidad a sinapsis excitatorias e inhibitorias

Para tener una idea más clara de la distribución y la actividad que podrían estar desempeñando los receptores para arginina vasopresina, se realizaron distintas reacciones inmunohistoquímicas en conjunto con marcadores específicos de soma neuronal (Huc)(Okano & Darnell, 1997), dendríticos (MAP2), así como de las posibles interacciones con sinapsis excitatorias (VGLUT2) e inhibitorias (VGAT y gefirina previamente reportadas (Seifi et al., 2014, Corteen et al., 2011).

Se determinó que los subtipos de receptores para vasopresina se distribuyen diferencialmente en las entidades neuronales del LC, al parecer con una distribución más amplia por parte del subtipo V1_b, presente tanto en células noradrenérgicas como posiblemente en no-noradrenérgicas, contrario a la distribución del subtipo V1_a, fenómeno muy evidente al comparar las figuras 7 A1 y B1.

La identificación de las neuronas no noradrenérgicas se llevó a cabo con la inmunodetección del marcador panneuronal HuC. En la Figura 8 A1 Se puede observar la superposición de la inmunorreactividad de TH y HuC, en donde se observan entidades neuronales sin presencia de noradrenalina. Para el caso del receptor V1_a, se observa una distribución somato-dendrítica de este receptor en aquellas neuronas inmunorreactivas a TH (Figura 8 A2 y B2), no así en el caso para aquellas neuronas carentes de esta enzima (Figura 8 A3 y A4). Asimismo, fueron identificadas algunas agrupaciones del receptor V1_a en proximidad con punteados inmunorreactivos con VGLUT 2 (Figura 8C) y VGAT (Figura8D).

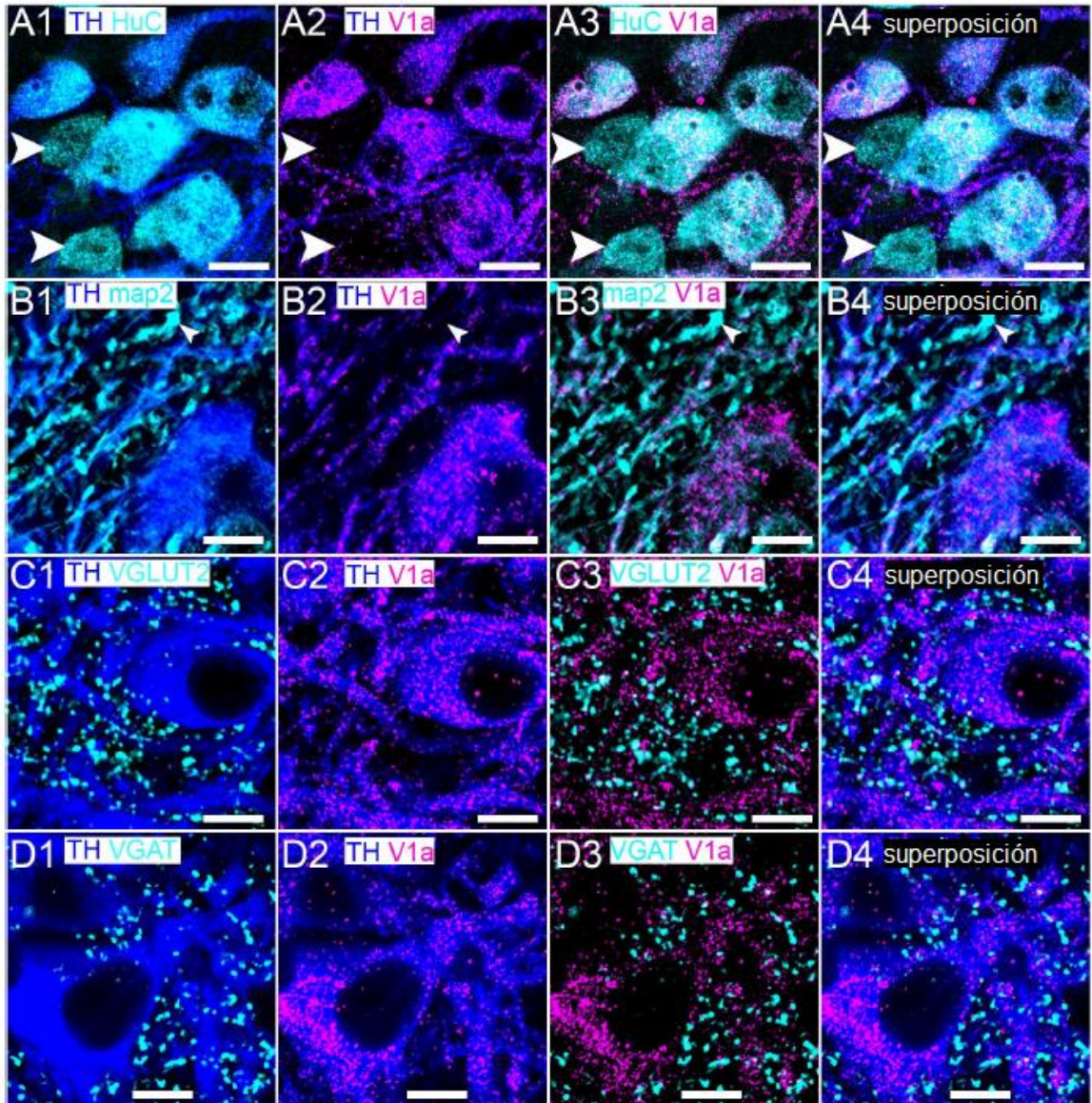


Figura 8. El receptor V1a se expresa exclusivamente en neuronas noradrenérgicas en el LC. (A1) muestra inmunodetección para TH (azul) y HuC (cian), las flechas resaltan a las neuronas no-noradrenérgicas del LC. (A2) Muestra el mismo campo de visión, con inmunodetección de TH (azul) y receptor V1a (magenta), confirmando la expresión de V1a exclusivamente en células noradrenérgicas. (A3) ausencia de receptores V1a en células no noradrenérgicas (cabeza de flechas). (A4) es la superposición de A1-A3. (B1) Muestra la inmunodetección de TH (azul) MAP2 (cian) remarcando con flechas el perfil dendrítico no-noradrenérgico. (B2) Muestra en el mismo campo de visión TH (azul) y receptores V1a (magenta) confirmando la expresión de este receptor en células noradrenérgicas, (B3) no así en células no-noradrenérgicas (cabeza de flechas). (B4) Superposición de B1-B3. (C) muestra la asociación inmunoreactiva con de V1a con VGLUT2 y (D) con el marcaje para VGAT. Barras de escala (A) 15 μ m; (B-D) 10 μ m.

En cuanto a la distribución del receptor V1_b en este núcleo, se encontró en células noradrenérgicas y en zonas donde la inmunoreactividad de la TH no es observable. La confirmación de la presencia de estos receptores en neuronas no-noradrenérgicas se puede observar en los paneles de la Figura 9, en dónde claramente observamos la colocalización de estas células con la señal de los receptores V1_b en el soma (Figura 9A), así como también es evidente la presencia de este receptor en el perfil dendrítico de las células no-noradrenérgicas (Figura 9B). Además, estas imágenes de alta resolución revelaron que la distribución del receptor V1_b se encuentra situado principalmente en la membrana plasmática de ambos tipos celulares, en comparación con la presencia significativamente menor en compartimentos citoplasmáticos, particularidad de los receptores metabotrópicos (Figura 9 A2).

La arginina vasopresina ha mostrado actividad en la modulación en la transmisión sináptica (Ostergaard et al., 2014), la identificación de la identidad sináptica con la que están relacionados los receptores para AVP presentes en el LC puede ayudar a entender el tipo de interacción que tiene el sistema vasopresinérgico con el núcleo en cuestión.

Se identificó la presencia de grupos inmunoreactivos para el transportador vesicular de glutamato tipo 2 (VGLUT2) en contacto con las superficies somatodendríticas de neuronas noradrenérgicas, determinando así los sitios de liberación de este neurotransmisor (Figura 9 C1). Al evaluar la señal conjunta del VGLUT2 y el receptor V1_b, se observó una proporción de grupos estrechamente unidos de ambas proteínas, lo que sugiere que una proporción de los receptores V1_b funcionan en proximidad a sinapsis glutamatérgicas (Figuras 9 C2, C3). No obstante, muchos de los grupos inmunoreactivos para V1_b, no se encontraron en contacto con VGLUT2. De tal forma, se identificaron los dominios de aferencias postsinápticas con la inmunodetección del transportador vesicular de GABA (VGAT), que al igual que el de glutamato, se encontró ampliamente distribuido en la superficie somatodendrítica del LC (Figura 9 D1). En cuanto a la colocalización de los receptores V1_b con VGAT, se encontraron algunos grupos adyacentes entre sí, aunque, particularmente aquellas señales de V1_b localizadas en la superficie somática no presentaron ninguna asociación con la inmunodetección de VGAT (Figura 9 D2-D4).

Para establecer la relación de los receptores V1_b con la superficie postsináptica se utilizó como marcador a la gefirina, proteína de andamiaje para los receptores de GABA y glicina en las sinapsis inhibitorias. La asociación de estos dos elementos fue detectada, sin embargo, fue escasa (Figura 9E).

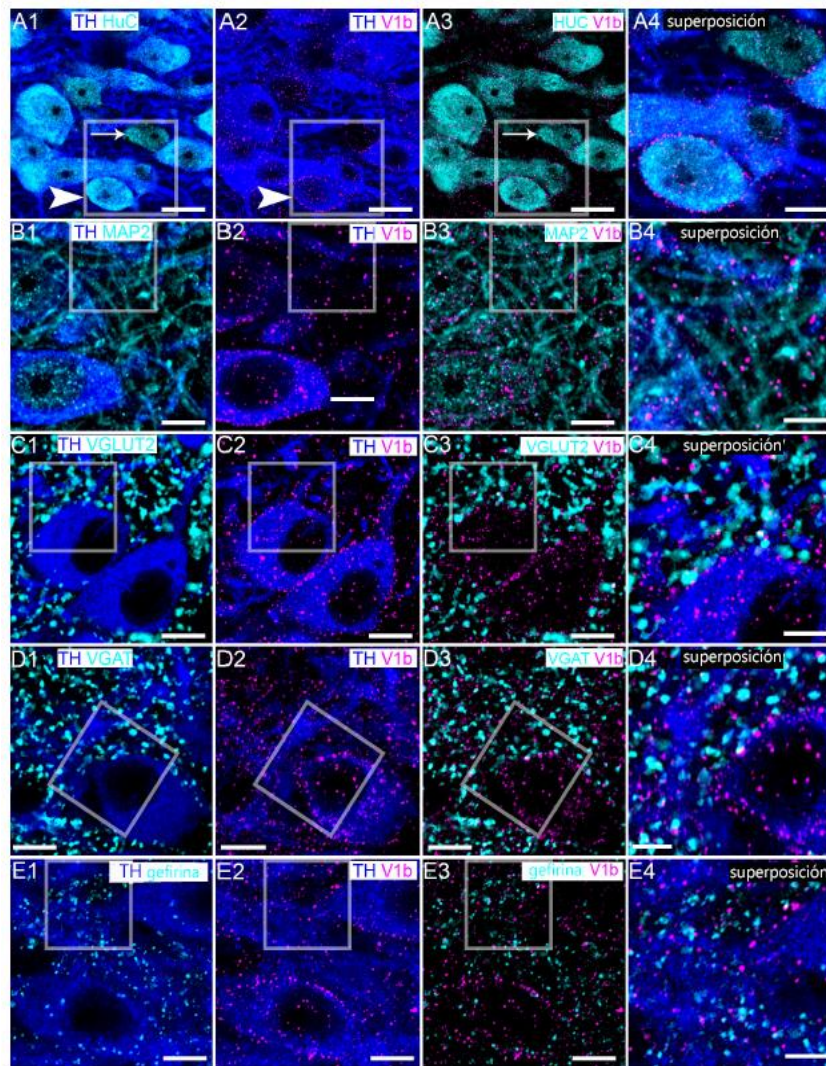


Figura 9. El receptor $V1_b$ se expresa en neuronas noradrenérgicas y no-noradrenérgicas en las neuronas del LC en proximidad con sinapsis glutamatérgicas y GABAérgicas. (A1) Inmunodetección para TH (azul) y al marcador pan-neuronal HuC (cian), identificando el soma de neuronas noradrenérgicas (cabeza de flecha) y neuronas no-noradrenérgicas (flecha) dentro del LC. (A2) Exhibe el mismo campo de visión, con inmunodetección para TH (azul) y al receptor $V1_b$ (magenta), la señal del receptor $V1_b$ se observa como grupos individuales en la membrana plasmática somatodendrítica, tipificando la expresión de un receptor metabotrópico. (A3) muestra el mismo campo visual con inmunorreactividad de HuC (cian) confirmando la presencia de neuronas no-noradrenérgicas (flecha) y la señal de $V1_b$ (magenta). (A4) superposición y magnificación del área en A1-A3. (B1) Inmunodetección de TH (azul) y la proteína asociada a microtúbulos tipo 2 (MAP2) (cian), la cual se encuentra enriquecida en dendritas. (B2) Señal de TH (azul) e inmunoreactividad de $V1_b$ (magenta) confirmando la expresión de $V1_b$ en el perfil dendrítico de las neuronas noradrenérgicas. En (B3) se puede observar el mismo campo visual con la asociación de MAP2 (cian) y $V1_b$ (magenta) confirmando la expresión de este receptor en compartimentos dendríticos. (B4) corresponde a una magnificación de las cajas presentes en B1-B3. (C1) Inmunorreactividad de TH (azul) y la señal de transportador vesicular de glutamato tipo 2 (GLUT2) (cian), marcador de dominios presinápticos en sinapsis excitatorias. (C2) Muestra el mismo campo visual, con la inmunodetección de TH (azul) y el receptor $V1_b$ (magenta). En (C3) se observa el mismo campo visual, con la asociación de la inmunorreactividad de $V1_b$ (magenta) y VGLUT2 (cian), esta asociación apunta que el receptor $V1_b$ se expresa en sinapsis excitatorias. (C4) superposición y magnificación de las cajas en C1-C3. (D1) Inmunorreactividad de TH (azul) y el transportador vesicular de GABA (VGAT) (cian), proteína abundante en las terminales axónicas GABAérgicas y glicinérgicas y utilizadas para identificar las presinapsis inhibitorias. (D2) Exhibe el mismo campo visual con la señal de TH (azul) y el receptor $V1_b$ (magenta). (D3) Muestra en el mismo campo de visión, la asociación de inmunorreactividad del receptor $V1_b$ (magenta) con VGAT (cian), lo que sugiere la expresión de $V1_b$ en las sinapsis inhibitorias dentro del LC. (D4) Superposición y magnificación del área representada por la caja en D1-D3. En (E1) Asociación de la inmunorreactividad del receptor $V1_b$ (magenta) con la proteína de anclaje para los receptores de GABA y glicina en las sinapsis inhibitorias gefirina (cian), en específico el dominio postsináptico. (E2) exhibe el mismo campo de visión con la inmunodetección de TH (azul) y el receptor $V1_b$ (magenta). (E3) mismo campo de visión se muestra la señal de $V1_b$ (magenta) con gefirina (cian). Escasa colocalización de grupos inmunorreactivos para $V1_b$ y gefirina, sugiriendo una incorporación limitada de $V1_b$ en los dominios postsinápticos inhibitorios, con estos receptores ubicados muy probablemente en los compartimentos perisinápticos. (E4) Superposición y vista ampliada del área encuadrada en E1-E3. Barras de escala (A1 – A3) 20 μm ; (A4, B–D1-D3) 10 μm ; (B–D4) 5 μm .

7.3 Evaluación electrofisiológica de los efectos de AVP sobre las neuronas noradrenérgicas del LC.

Una vez determinados los componentes del sistema vasopresinérgico dentro del *locus coeruleus*, más los antecedentes de que AVP modifica la excitabilidad de las neuronas de otros núcleos (Lu et al., 1997; Raggenbass et al., 1988; Zhang et al., 2016) y dada la cercanía de los componentes inicialmente mencionados con las entradas sinápticas en el LC, decidimos probar si la activación farmacológica de los receptores V1_a y V1_b alteraba la excitabilidad espontánea de las neuronas de este núcleo mediante el uso de la técnica electrofisiológica whole-cell patch clamp en rebanadas agudas de cerebro que contuvieran el núcleo de interés.

La identificación de las neuronas registradas se realizó mediante el uso de biocitina contenida en la solución interna, con la finalidad de verificar su localización dentro del LC y su identidad neuroquímica. Sólo aquellas neuronas identificadas como inmunopositivas a TH y dentro del núcleo fueron consideradas para el análisis (Figura 10). Se registró un total de 50 células provenientes de 15 animales.

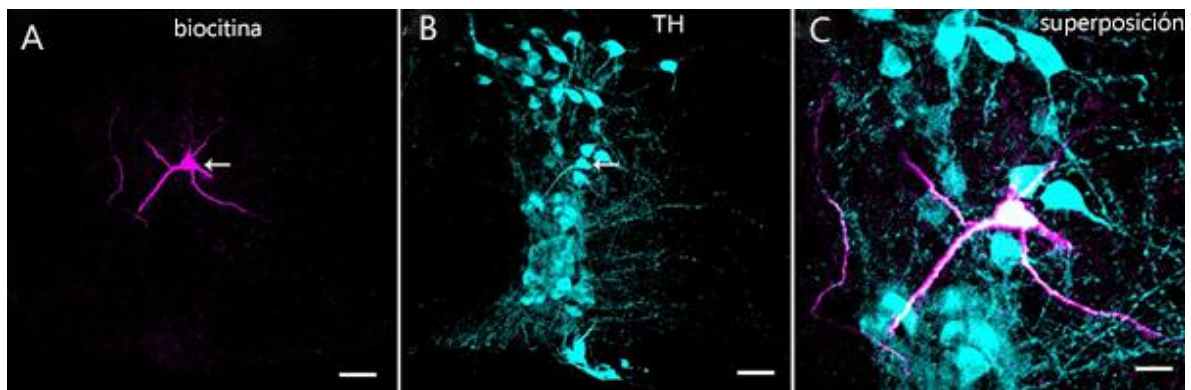


Figura 10. Confirmación microscópica de la identidad molecular y localización de neuronas registradas. (A) Muestra la inmunoreactividad para biocitina, contenida originalmente en la solución interna de registro durante la configuración whole-cell, la inmunoreactividad se presenta en una sola célula marcada con la flecha. (B) Ilustra la inmunoreactividad para TH dentro del mismo campo de visión de (A), confirmando la localización de la neurona registrada dentro del LC. (C) corresponde a la magnificación y superposición del campo de visión de la célula en (A, B) confirmando que la neurona registrada es inmunopositiva a TH y por tanto una neurona LC-noradrenérgica.

7.3.1 Actividad de las neuronas noradrenérgicas en presencia de desmopresina

Para evaluar la influencia de la AVP en la actividad eléctrica de las neuronas del LC, se utilizó desmopresina (200 μ M) un análogo sintético de vasopresina el cual ha sido reportado como más resistente a degradación y ha mostrado alta efectividad como agonista de los receptores V1_a y V1_b (Jurzak, Müller, & Gerstberger, 1995; Saito, Tahara, & Sugimoto, 1997; Sawyer, Acosta, & Manning, 1974). De un total de 20 neuronas registradas bajo estas condiciones, se observaron dos grupos de neuronas, que mostraron un aumento o una disminución de su actividad en respuesta a este fármaco.

Se llevó a cabo el análisis de las diferentes propiedades asociadas a la membrana de células excitables comparando los registros antes de la aplicación del fármaco (línea base) y posterior a la aplicación de la desmopresina. En la tabla 5 se resumen los valores de las propiedades de membrana correspondientes a las neuronas que presentaron un incremento en la actividad (N=9). Siendo el parámetro de la frecuencia de disparo (FR) el indicativo de este incremento en la actividad, cambiando significativamente de 1.7 ± 0.1 Hz a 2.9 ± 0.3 Hz, con un valor de $p= 0.01$ en un análisis de prueba de t de Student pareada. La exposición a este fármaco, también reflejó una disminución significativa en los valores de la constante de tiempo de la post-hiperpolarización (AHP tau) de 65 ± 6 ms a 53 ± 5 ms, con un valor de $p = 0.005$ con el mismo análisis estadístico (N=8).

Tabla 5. Resumen de las características de membrana de las neuronas LC-noradrenérgicas que presentaron un incremento en la frecuencia de disparo seguido a la aplicación del agonista de V1_b desmopresina. Los datos se presentan como la media \pm EEM

Parámetro,(N) = número de células	Linea base	Desmopresina	P (prueba de t de Student pareada)
Frecuencia de disparo espontanea, Hz (9)	1.7 ± 0.3	2.8 ± 0.3	0.01
Potencial de membrana en reposo, mV (9)	-49.7 ± 0.9	-50.2 ± 2.3	0.83
Umbral del potencial de acción, mV (9)	-36.0 ± 1.7	-37.0 ± 2.8	0.72
Amplitud del potencial de acción, mV (9)	68.0 ± 1.2	64.6 ± 3.0	0.20
Porcentaje de células con potenciales de acción espontáneos (9)	100	100	-
Resistencia de entrada, M Ω (9)	0.30 ± 0.02	0.31 ± 0.01	0.71
Constante de tiempo de la membrana, ms (9)	37.6 ± 4.6	41.7 ± 3.7	0.10
Constante de tiempo de AHP, ms (8)	65 ± 6	53 ± 5	0.005

En la figura 11 se observa el incremento en la frecuencia de disparo de los potenciales de acción espontáneos después del tratamiento con desmopresina (A1, A2), así como de manera gráfica se puede ver la disminución de los valores de la constante de tiempo de la post-hiperpolarización (A3). Asimismo, podemos observar los trazos representativos del grupo de neuronas que presentaron una disminución en la frecuencia de disparo (B1, B2) y el incremento de los valores en AHP tau de este grupo. Posterior a la aplicación de la desmopresina, ninguna otra característica celular mostró un cambio significativo (Tabla 5).

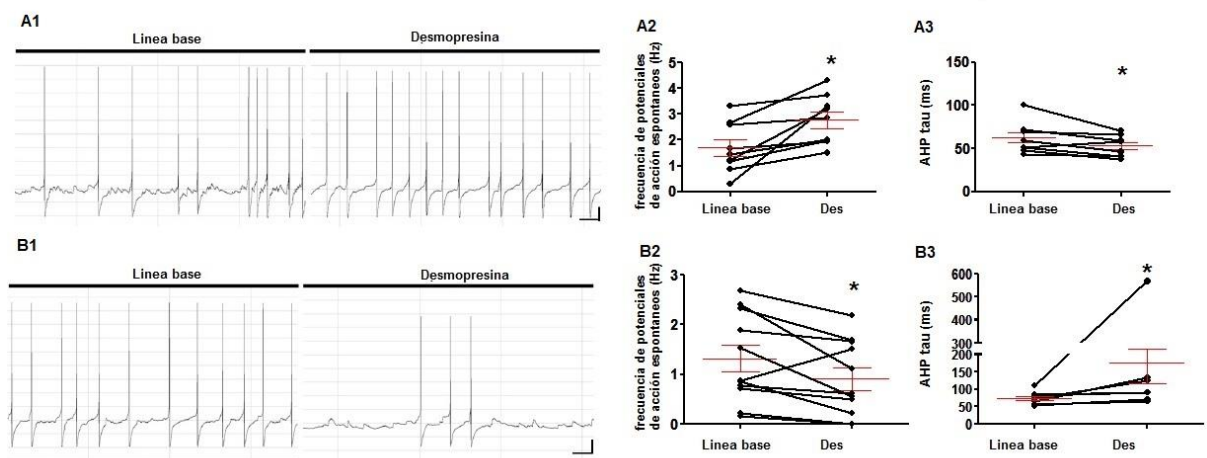


Figura 11. Efecto de la desmopresina en la modulación de la actividad neuronal LC-noradrenérgica. (A1) Trazos representativos del patrón de disparos espontáneos antes y después de la aplicación de la desmopresina 200 μ M, de una cohorte de células que respondieron con un incremento significativo en la frecuencia de potenciales de acción espontáneos. (A2) Cuantificación de las frecuencias de disparo espontáneo (Hz) de neuronas del LC antes y después de la aplicación de la desmopresina (Simpson et al.) (A3) Gráfica comparativa de la constante de tiempo de la post-hiperpolarización (msec) de neuronas del LC antes y después de la aplicación de desmopresina (B1) Trazos representativos del patrón de disparos espontáneos antes y después de la aplicación de la desmopresina 200 μ M, de un grupo de células que respondieron con una disminución significativa en la frecuencia de potenciales de acción espontáneos. (B2) Cuantificación de las frecuencias de disparo espontáneo (Hz) de neuronas del LC antes y después de la aplicación de la desmopresina (Simpson et al.). (B3) Cuantificación de la constante de tiempo de la post-hiperpolarización (msec) de neuronas del LC antes y después de la aplicación de desmopresina. En las gráficas, los puntos representan los valores individuales de las células, las barras rojas largas representan la media de todas las células del grupo y las barras rojas cortas representan el EEM. $*p < 0.05$, de una prueba pareada de *t* de Student. Las barras de escala en (A1, B1) la barra horizontal corresponde a 1 s, la barra vertical 10 mV.

En otro grupo de neuronas, las cuales fueron registradas bajo las mismas condiciones, la aplicación de la desmopresina disminuyó significativamente la frecuencia de disparo de las neuronas del LC de 1.4 ± 0.3 Hz a 0.9 ± 0.2 Hz con un valor de $p=0.02$ (Figura 11. B1, B2). En esta cohorte de células también se registró un incremento en los valores de la constante de tiempo de la post-hiperpolarización de 67 ± 8 ms a 167 ± 44 ms (Figura 11 B1), con un valor de $p= 0.03$ (Figura B3), así como una disminución significativa en la amplitud de los potenciales de acción de 69 ± 1.8 mV a 45 ± 9.3 mV con un valor de $p= 0.02$. Todos los datos corresponden a la media \pm el error estándar de la media y valores de “ p ” corresponden a pruebas pareadas de t de Student con una $N=11$. Las demás características celulares no presentaron cambios significativos para este grupo (Tabla 6).

Tabla 6. Resumen de las características de membrana de las neuronas LC-noradrenérgicas que presentaron una disminución en la frecuencia de disparo seguido a la aplicación del agonista de $V1_b$ desmopresina. Los datos se presentan como la media \pm EEM

Parámetro, (N) = número de células	Linea base	Desmopresina	P (prueba de t de Student pareada)
Frecuencia de disparo espontánea, Hz (11)	1.3 ± 0.3	0.9 ± 0.23	0.02
Potencial de membrana en reposo, mV (11)	-50.4 ± 0.8	-52.0 ± 0.8	0.12
Umbral del potencial de acción, mV (11)	-35.3 ± 0.6	-26.9 ± 536	0.10
Amplitud del potencial de acción, mV (11)	69.0 ± 1.8	45.5 ± 9.3	0.02
Porcentaje de células con potenciales de acción espontáneos (11)	100	100	-
Resistencia de entrada, $M\Omega$ (11)	0.36 ± 0.02	0.37 ± 0.04	0.79
Constante de tiempo de la membrana, ms (11)	42.1 ± 1.9	45.1 ± 3.2	0.46
Constante de tiempo de AHP, ms (11)	67.0 ± 8	167 ± 44	0.03

7.3.2 Efecto de antagonistas selectivos de los receptores V1a y V1b sobre la modulación local de AVP en *locus coeruleus*.

Dada la actividad que presentó la desmopresina, siendo un agonista del receptor V1_b, modulando la excitabilidad de las neuronas del LC. El siguiente paso en este trabajo fue determinar si la liberación de la AVP local contribuye en la frecuencia de disparo de estas neuronas, mediante el registro de éstas en presencia de los antagonistas específicos de los receptores de AVP presentes en el núcleo de interés.

En el registro realizado con el bloqueo del receptor V1_a con su antagonista específico [(d(CH₂)₅₁, Tyr (Me)₂, Arg₈)-Vasopresina, 30 nM] se obtuvieron efectos contrastantes en la frecuencia de disparo del LC. Con un 62 % de las células registradas que presentaron un incremento de FR de 1.6 ± 0.2 Hz a 2.1 ± 0.3 Hz ($p= 0.0016$), el bloque del receptor, también tuvo un efecto sobre AHP tau con una disminución en sus valores de 73 ± 9 a 60 ± 6 ms ($p= 0.0185$), el análisis se hizo mediante la obtención de la media \pm EEM y los valores de “ p ” corresponden a una prueba pareada de t de Student (N= 8) (Figura 12 A). El resto de los datos analizados se encuentran resumidos en la tabla 7

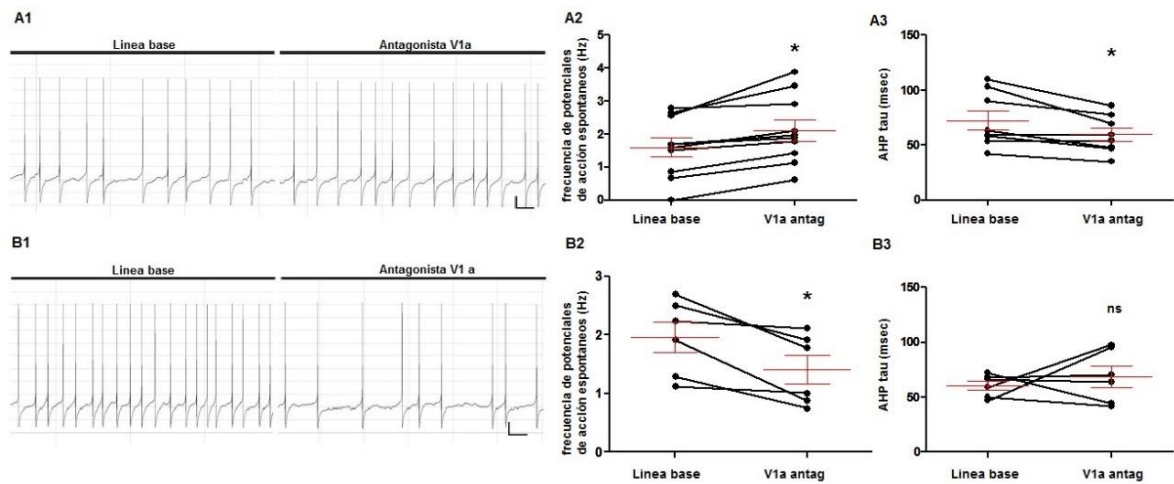


Figura 12. Efecto del antagonista específico del receptor $V1_a$ [(d(CH₂)₅1, Tyr(Me)₂, Arg₈)-Vasopresina, 30 nM] (Antg.V1_a) en la modulación de la actividad neuronal LC-noradrenérgica. (A1) Trazos representativos del patrón de disparos espontáneos antes y después de la aplicación de Antg.V1_a, de una cohorte de células que respondieron con un incremento significativo en la frecuencia de potenciales de acción espontáneos. (A2) Cuantificación de las frecuencias de disparo espontaneo (Hz) de neuronas del LC antes y después de la aplicación de Antg.V1_a. (A3) Cuantificación de la constante de tiempo de la post-hiperpolarización (msec) de neuronas del LC antes y después de la aplicación de Antg.V1_a. (B1) Trazos representativos del patrón de disparos espontáneos antes y después de la aplicación de Antg.V1_a, de un grupo de células que respondieron con una disminución significativa en la frecuencia de potenciales de acción espontáneos.(B2) Cuantificación de las frecuencias de disparo espontaneo (Hz) de neuronas del LC antes y después de la aplicación de Antg.V1_a.(B3)) Cuantificación de la constante de tiempo de la post-hiperpolarización (msec) de neuronas del LC antes y después de la aplicación de Antg.V1_a. En las gráficas, los puntos representan los valores individuales de las células, las barras rojas largas representan la media de todas las células del grupo y las barras rojas cortas representan el EEM. * $p < 0.05$, de una prueba pareada de t de Student. Las barras de escala en (A1, B1) la barra horizontal corresponde a 1 s, la barra vertical 10 mV.

Tabla 7. Resumen de las características de membrana de las neuronas LC-noradrenérgicas que presentaron un incremento en la frecuencia de disparo seguido a la aplicación del antagonista del RV1_a. Los datos se presentan como la media \pm EEM

Parámetro, (N) = número de células	Línea base	Desmopresina	P (prueba de t de Student pareada)
Frecuencia de disparo espontanea, Hz (10)	1.6 \pm 0.23	2.1 \pm 0.2	0.001
Potencial de membrana en reposo, mV (10)	-50.0 \pm 1.2493	-51 \pm 1.1	0.5411
Umbral del potencial de acción, mV (10)	-32.3 \pm 3.7	-37.6 \pm 1.3	0.14
Amplitud del potencial de acción, mV (10)	59.5 \pm 6.89	61.9 \pm 2.9	0.746
Porcentaje de células con potenciales de acción espontáneos (10)	90	100	-
Resistencia de entrada, M Ω (10)	0.4 \pm 0.01	0.4 \pm 0.01	0.114
Constante de tiempo de AHP, ms (10)	48.57 \pm 6.1702	41.42 \pm 2.7478	0.257
Constante de tiempo de AHP, ms (10)	73.0 \pm 9	60.0 \pm 6	0.018

El resto de las células registradas bajo estas condiciones, respondieron con una disminución en la frecuencia de disparo de 2.0 ± 0.2 a 1.4 ± 0.2 Hz; $p= 0.017$ (Figura 12 B1, B2), Sin embargo, no se observó una diferencia significativa entre los valores de AHP tau (Figura 12 B3) (64 ± 4 a 69 ± 10 ms, $p= 0.512$, prueba pareada de t de Student, (N=6).

Las demás características de las células registradas bajo estas condiciones no mostraron ningún cambio significativo bajo el análisis estadístico (valor de p). los valores de la media \pm EEM y los resultados del análisis estadístico de todos los parámetros analizados para este grupo de neuronas se resumen en la tabla 8.

Tabla 8. Resumen de las características de membrana de las neuronas LC-noradrenérgicas que presentaron una disminución en la frecuencia de disparo seguido a la aplicación del antagonista del RV1_a. Los datos se presentan como la media \pm EEM

Parámetro, (N) = número de células	Linea base	Desmopresina	P (prueba de t de Student pareada)
Frecuencia de disparo espontanea, Hz (6)	2.0 ± 0.3	1.4 ± 0.2	0.017
Potencial de membrana en reposo, mV (6)	-49.7 ± 0.7	-48 ± 1.1	0.0.0143
Umbral del potencial de acción, mV (6)	-32.32 ± 3.6961	-37.55 ± 1.308	0.14
Amplitud del potencial de acción, mV (6)	65.5 ± 2.0	58.3 ± 2.7	0.28
Porcentaje de células con potenciales de acción espontáneos (9)	100	100	
Resistencia de entrada, MΩ (6)	0.4 ± 0.02	0.4 ± 0.0	0.16-
Constante de tiempo de la membrana, ms (6)	39.2 ± 3.0	44.7 ± 5.6	0.2425
Constante de tiempo de AHP, ms (6)	61.0 ± 4	69.0 ± 10	0.5117

Los resultados de los registros electrofisiológicos realizados con la aplicación del antagonista selectivo para el receptor $V1_b$ TASP 0390325 (Iijima et al., 2014), mostraron un comportamiento similar al de los dos fármacos anteriores, con una cohorte de células que manifestaron un incremento significativo en la frecuencia de disparo (2.2 ± 0.1 Hz a 3.2 ± 0.3 Hz, $p= 0.01$ de prueba pareada de t de Student, $N=8$, Figura 13 A1, A2) o una disminución del mismo parámetro (1.7 ± 0.2 Hz a 1.3 ± 0.3 Hz, $p= 0.03$ de prueba pareada de t de Student, $N=6$, Figura 13 B1, B2), no obstante, en contraste con el efecto de la desmopresina, TASP 0390325 no alteró significativamente los valores de la constante de tiempo post-hiperpolarización tanto en las neuronas que presentaron un incremento en FR (65 ± 6 ms a 58 ± 4 ms, $p= 0.3442$, $N=8$, Fig. 11 A3) o las que presentaron una disminución de su FR (78 ± 13 ms a 72 ± 10 ms, $p= 0.3442$, $N=6$, Fig. 13 B3), los valores de “ p ” corresponden a una prueba pareada de t de Student y los valores de los parámetros obtenidos se expresan como la media \pm EEM, el resumen se presenta en la tabla 9 para las células con incremento en FR y la tabla 10 aquellas con disminución de FR.

Tabla 9. Resumen de las características de membrana de las neuronas LC-noradrenérgicas que presentaron un incremento en la frecuencia de disparo seguido a la aplicación del antagonista del $RV1_b$. Los datos se presentan como la media \pm EEM

Parámetro,(N) = número de células	Línea base	Desmopresina	P (prueba de t de Student pareada)
Frecuencia de disparo espontánea, Hz (8)	2.2 ± 0.1	3.2 ± 0.3	0.01
Potencial de membrana en reposo, mV (8)	-49.6 ± 1.0	-49.6 ± 1.2	0.87
Umbral del potencial de acción, mV (8)	-35.2 ± 1.1	-36.2 ± 1.0	0.06
Amplitud del potencial de acción, mV (8)	60.9 ± 3.1	58.8 ± 1.0	0.63
Porcentaje de células con potenciales de acción espontáneos (8)	100	100	-
Resistencia de entrada, $M\Omega$ (8)	0.334 ± 0.03	0.33 ± 0.03	0.43
Constante de tiempo de la membrana, ms (8)	53.1 ± 10.5	42 ± 3.8	0.88
Constante de tiempo de AHP, ms(8)	65 ± 6	58 ± 4	0.34

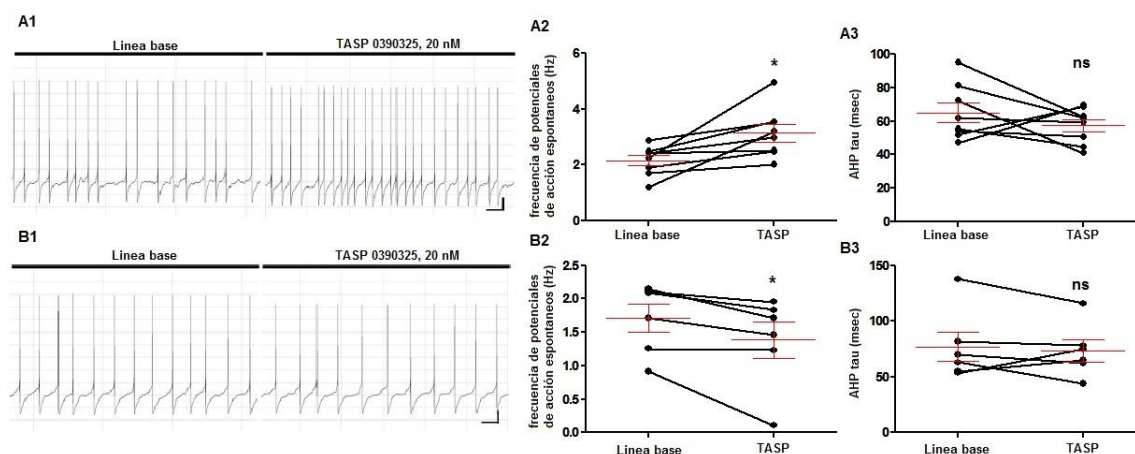


Figura 13. Efecto del antagonista específico del receptor $V1_b$ TASP 0390325, 20 nM (Antg. $V1_b$) en la modulación de la actividad neuronal LC-noradrenérgica. (A1) Trazos representativos del patrón de disparos espontáneos antes y después de la aplicación de Antg. $V1_b$, de una cohorte de células que respondieron con un incremento significativo en la frecuencia de potenciales de acción espontáneos. (A2) Cuantificación de las frecuencias de disparo espontáneo (Hz) de neuronas del LC antes y después de la aplicación de Antg. $V1_b$. (A3) Cuantificación de la constante de tiempo de la post-hiperpolarización (msec) de neuronas del LC antes y después de la aplicación de Antg. $V1_b$. (B1) Trazos representativos del patrón de disparos espontáneos antes y después de la aplicación de Antg. $V1_b$, de un grupo de células que respondieron con una disminución significativa en la frecuencia de potenciales de acción espontáneos. (B2) Cuantificación de las frecuencias de disparo espontáneo (Hz) de neuronas del LC antes y después de la aplicación de Antg. $V1_b$. (B3) Cuantificación de la constante de tiempo de la post-hiperpolarización (msec) de neuronas del LC antes y después de la aplicación de Antg. $V1_b$. En las gráficas, los puntos representan los valores individuales de las células, las barras rojas largas representan la media de todas las células del grupo y las barras rojas cortas representan el EEM. * $p < 0.05$, de una prueba pareada de t de Student. Las barras de escala en (A1, B1) la barra horizontal corresponde a 1 s, la barra vertical 10 mV.

Tabla 10. Resumen de las características de membrana de las neuronas LC-noradrenérgicas que presentaron una disminución en la frecuencia de disparo seguido a la aplicación del antagonista del $RV1_b$. Los datos se presentan como la media \pm EEM

Parámetro,(N) = número de células	Linea base	Desmopresina	P (prueba de t de Student pareada)
Frecuencia de disparo espontánea, Hz (6)	1.7 \pm 0.2	1.34 \pm 0.23	0.03
Potencial de membrana en reposo, mV (6)	-50.3 \pm 0.8	-51.4 \pm 0.8	0.10
Umbral del potencial de acción, mV (6)	-34.2 \pm 0.6	-35.1 \pm 0.6	0.07
Amplitud del potencial de acción, mV (6)	67.2 \pm 1.4	60.9 \pm 3.0	0.08
Porcentaje de células con potenciales de acción espontáneos (6)	100	100	-
Resistencia de entrada, M Ω (6)	0.34 \pm 0.03	0.33 \pm 0.03	0.39
Constante de tiempo de la membrana, ms (6)	53.1 \pm 10.5	48.1 \pm 5.1	0.35
Constante de tiempo de AHP, ms (6)	78 \pm 13	72 \pm 10	0.40

7.4 Determinación de la presencia de axones vasopresinérgicos en contacto con neuronas noradrenérgicas y no-noradrenérgicas del LC en proximidad a sinapsis excitatorias e inhibitorias

Los resultados obtenidos de los registros electrofisiológicos con la exposición a los antagonistas de los receptores de vasopresina V1_a y V1_b, son un indicio de la actividad moduladora de AVP y sus receptores en los niveles basales de la actividad del *locus coeruleus*. Para que esto suceda, la presencia y distribución de aferentes con este neuromodulador a través de este núcleo debe ser extensa.

Para dilucidar un patrón de marcaje específico de AVP dentro del LC, se utilizaron dos anticuerpos anti-AVP (AC39363, IS20069) y la región cerebral de PVN como control positivo. Ambos anticuerpos proporcionaron un patrón de inmunoreactividad en el núcleo paraventricular consistente con trabajos anteriormente publicados (Zhang & Hernandez, 2013), sin embargo, el anticuerpo que desplegó una relación señal/ruido superior fue el anticuerpo AC39363 (Figura. 12A), por lo tanto, fue seleccionado para el resto del trabajo.

Como se puede observar en la figura 6 B y C, la inmunoreactividad del AVP dentro del LC se manifiesta como plexos varicosos y como grupos individuales, además se puede recalcar que la señal se encuentra distribuida a través de todo el núcleo, tanto en el centro del mismo, así como en la región dendrítica también llamada pericoeruleus. No obstante, no se detectaron neuronas inmunoreactivas a AVP dentro de este núcleo.

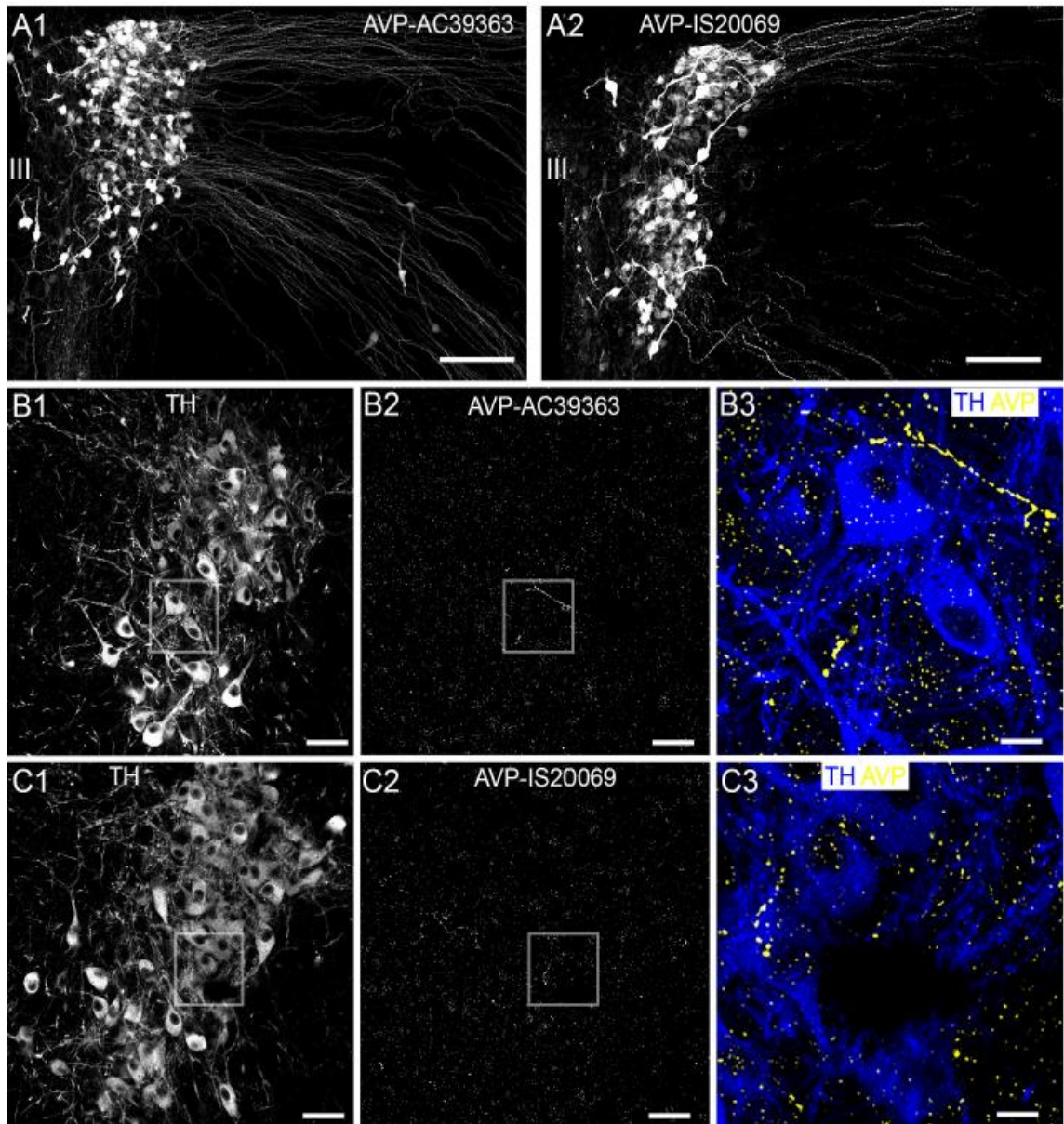


Figura 12. Confirmación de inmunoreactividad de AVP en el hipotálamo y LC. (A1, A2) Exhiben la comparación de la inmunoreactividad de dos diferentes anticuerpos, en el núcleo paraventricular del hipotálamo. AC39363 es el anticuerpo obtenido de Abcam y IS20069 se obtuvo de ImmunoStar. Ambos anticuerpos reprodujeron el patrón de expresión de la AVP esperado en esta región del cerebro (Zhang & Hernandez, 2013). (B, C) Muestran comparativamente los patrones de marcaje de estos anticuerpos anti-AVP en el LC, utilizando las mismas condiciones que las usadas para el tejido hipotalámico. (B3, C3) Muestran que dentro del LC, la inmunoreactividad presentada por AVP es una combinación de plexos varicosos y grupos individuales en contacto con la superficie somatodendrítica. Las barras de escala en (A) 100 μm ; (B1, B2, C1, C2) 50 μm ; (B3, C3) 10 μm . III, tercer ventrículo.

Cuando se realizó la inmunodetección detallada del contacto de las varicosidades de AVP, se determinó que éstas contactan tanto con células noradrenérgicas (Figura 13 A1, A2) como no-noradrenérgicas (Figura 13 A3, A4). Asimismo, fue identificado el contacto de esta varicosidades con perfiles dendríticos muy semejantes a la distribución de los receptores V1_a y V1_b en esta región (Figura 13 B), por lo cual se evaluó la inmunoreactividad de AVP junto con los marcadores neuronales y sinápticos utilizados con los dos subtipos de receptores V1.

El resultado fue una gran asociación con los grupos inmunoreactivos correspondientes a los transportadores de glutamato (Figura 13C) y con el perfil dendrítico (Figura 13B) dentro del *locus coeruleus*, y con una asociación menor con la señal correspondiente a los grupos inmunoreactivos de VGAT (Figura 13 D) y gefirina (Figura 13E).

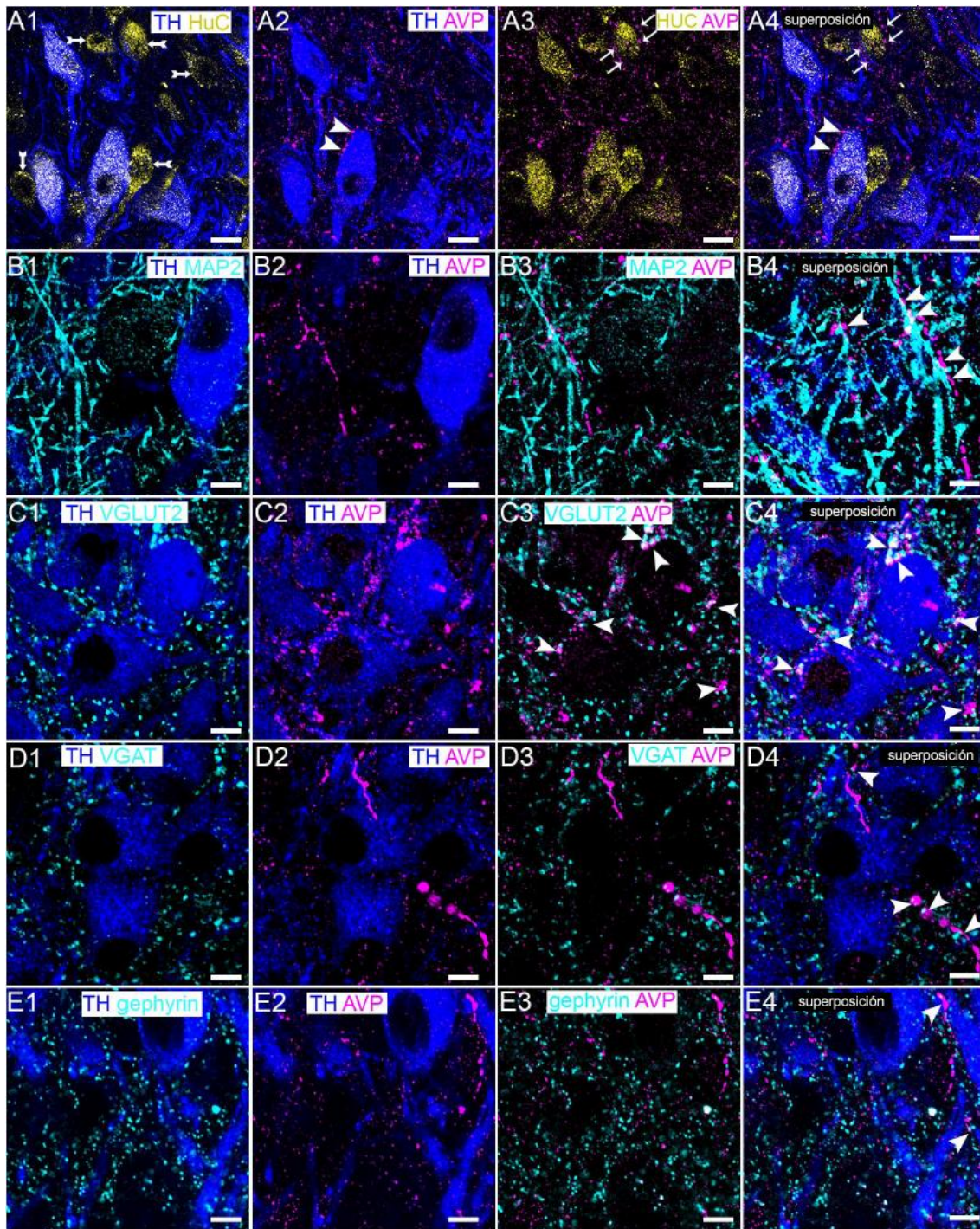


Figura 13 Perfiles axonales vasopresinérgicos nativos en contacto con células noradrenérgicas y no-noradrenérgicas dentro del LC en proximidad a sinapsis glutamatergicas y GABAérgicas. (A1) Inmunoreactividad para TH (azul) y HuC (amarillo), indicando la distribución de las neuronas noradrenérgicas y no-noradrenérgicas (flechas gruesas). (A2) Muestra el mismo campo de visión, con inmunoreactividad para TH (azul), AVP (magenta) con perfiles inmunoreactivos en contacto con células noradrenérgicas (cabeza de flecha). (A3) Mismo campo de visión, AVP (magenta) y HuC (amarillo), confirmando la asociación de AVP con células no-noradrenérgicas (flechas). (A4) superposición de (A1-A3). (B1) Inmunoreactividad para TH (azul) y MAP2 (cian). (B2) Mismo campo de visión con inmunoreactividad para TH (azul), AVP (magenta). (B3) Muestra mismo campo de visión, con la asociación de la inmunoreactividad de AVP (magenta) y MAP2 (cian). (B4) Superposición de (B1-B3) con una clara cercanía de las varicosidades de AVP con el perfil dendrítico (cabezas de flechas). (C1) Inmunoreactividad para TH (azul) y VGLUT2 (cian). (C2) Mismo campo de visión con inmunoreactividad para TH (azul), AVP (magenta). (C3) Mismo campo de visión, con una gran asociación entre la inmunoreactividad de AVP (magenta) y VGLUT2 (cian) (cabezas de flecha). (C4) Superposición de (C1-C3). (D1) Inmunoreactividad para TH (azul) y VGAT (cian). (D2) Mismo campo de visión, con inmunoreactividad para TH (azul), AVP (magenta). (D3) muestra la inmunoreactividad de AVP (magenta) en asociación con pocos grupos inmunopositivos para VGAT (cian). (D4) Superposición de (D1-D3). (E1) Inmunoreactividad para TH (azul) y gefirina (cian). (E2) Mismo campo de visión, con inmunoreactividad para TH (azul), AVP (magenta). (E3) Mismo campo de visión con una asociación dispersa de la inmunoreactividad de AVP (magenta) y gefirina (cian). (E4) Superposición de (E1-E3). Barras de escala (A) 15 μ M; (B-E) 10 μ m.

7.5 Interacción de perfiles inmunoreactivos de AVP en asociación con otras vías neuromoduladoras aferentes dentro del LC

Como se había mencionado con anterioridad, el LC es un núcleo que presenta una amplia variedad de péptidos moduladores (Schwarz et al., 2015; Sutin & Jacobowitz, 1991), no obstante, hasta la fecha no hay un reporte claro de la posible asociación de fibras inmunopositivas para AVP con fibras que contengan algún otro de los neuropéptidos moduladores reportados dentro del LC. Por tanto, se llevaron a cabo los ensayos inmunohistoquímicos pertinentes para determinar la posible colocalización de las fibras vasopresinérgicas con algún neuropéptido de los que se tiene reporte, contactan con las neuronas del LC, alterando su excitabilidad. Estos son, la sustancia P (Guyenet & Aghajanian, 1979; Pickel et al., 1979), encefalina (Van Bockstaele et al., 1995), orexina A (Hagan et al., 1999; Horvath et al., 1999) y CRH (Valentino et al., 1983).

En la inmunodetección sólo fue posible observar pequeños subconjuntos de sustancia P en colocalización con escasas varicosidades de AVP, la gran mayoría son mutuamente excluyentes (Figura 14A). La asociación de vasopresina con encefalina, orexina y CRH no fue detectable en ninguno de los casos, como puede observarse en las figuras 14 B, C y D respectivamente.

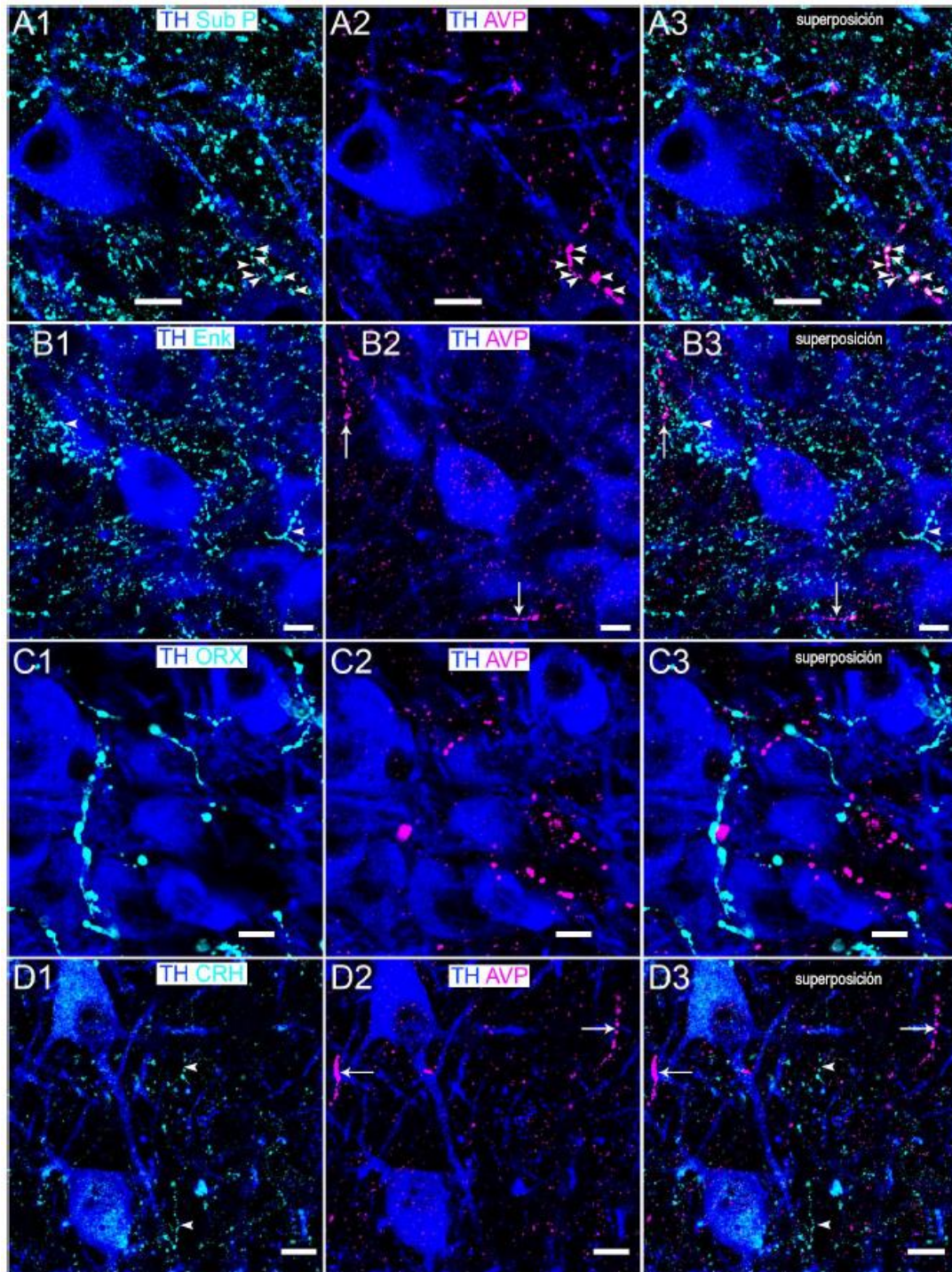


Figura 14. Asociación de AVP con sistemas aferentes neuromoduladores en LC. (A1) Inmunoreactividad para TH (azul) y sustancia p (Sub P) (cian). (A2) Mismo campo de visión, inmunoreactividad de TH (azul) y AVP (magenta). (A3) Superposición de (A1, A2) mostrando colocalización aislada de la inmunoreactividad de Sub P y AVP (cabezas de flecha). (B1) Inmunoreactividad para TH (azul) y encefalina (ENK) (cian). (B2) Inmunoreactividad para TH (azul) y AVP (magenta) varicosidades (flechas). (B3) Superposición de (B1, B2) con ausencia de colocalización de AVP (flechas) y ENK (cabezas de flecha). (C1) Inmunoreactividad para TH (azul) y orexina (ORX) (cian). (C2) inmunoreactividad par a TH (azul), AVP (magenta) (flechas). (C3) Superposición de (C1, C2) mostrando ausencia de colocalización entre AVP y ORX. (D1) Inmunoreactividad para TH (azul) y la hormona liberadora de corticotropina (CRH) (cian). (D2) Inmunodetección de TH (azul) y varicosidades de AVP (magenta) (flechas). (D3) Superposición de (D1, D2) mostrando la ausencia de colocalización de AVP (flechas) con CRH (cabezas de flecha). Barras de escala 10 μ m.

7.6 Efecto del estrés agudo sobre la interacción de los sistemas LC-AVP

El *locus coeruleus* se encuentra íntimamente relacionado con procesos de estrés, manifestando un incremento extracelular de noradrenalina en las regiones terminales del LC, como resultado de la activación de éste núcleo en respuesta tanto a estresores físicos como sociales (Abercrombie et al., 1988; Chan & Sawchenko, 1995; Kollack-Walker, Watson, & Akil, 1997; Rusnák et al., 2001; Smagin, Swiergiel, & Dunn, 1994). También se sabe que hay una activación de las vías vasopresinérgicas reguladas por PVN, específicamente hablando de las neuronas parvicelulares liberando AVP sinérgicamente con CRH resultando en la secreción de ACTH en procesos de estrés (Engelmann, Landgraf, & Wotjak, 2004; Rivier & Vale, 1983, O'Connor, O'Halloran, & Shanahan, 2000). Por ello, se decidió explorar la posible modificación del sistema LC-AVP por efecto de exposición a estrés agudo durante 1 hora (Buynitsky & Mostofsky, 2009).

Los tejidos cerebrales correspondientes a la región del LC de 5 ratones control y 5 sometidos a estrés agudo, fueron examinados mediante inmunohistoquímica para la detección de los posibles cambios en la inmunodetección de los receptores V1_a y V1_b. En la inmunoreactividad del receptor V1_a en tejido de animales control *versus* estrés (Figura 15A) no fue detectado cambio alguno. No obstante, se observó un incremento de los grupos inmunoreactivos correspondientes al receptor V1_b, principalmente aquellos localizados en la superficie somática y el citoplasma de neuronas noradrenérgicas (Figura 15B).

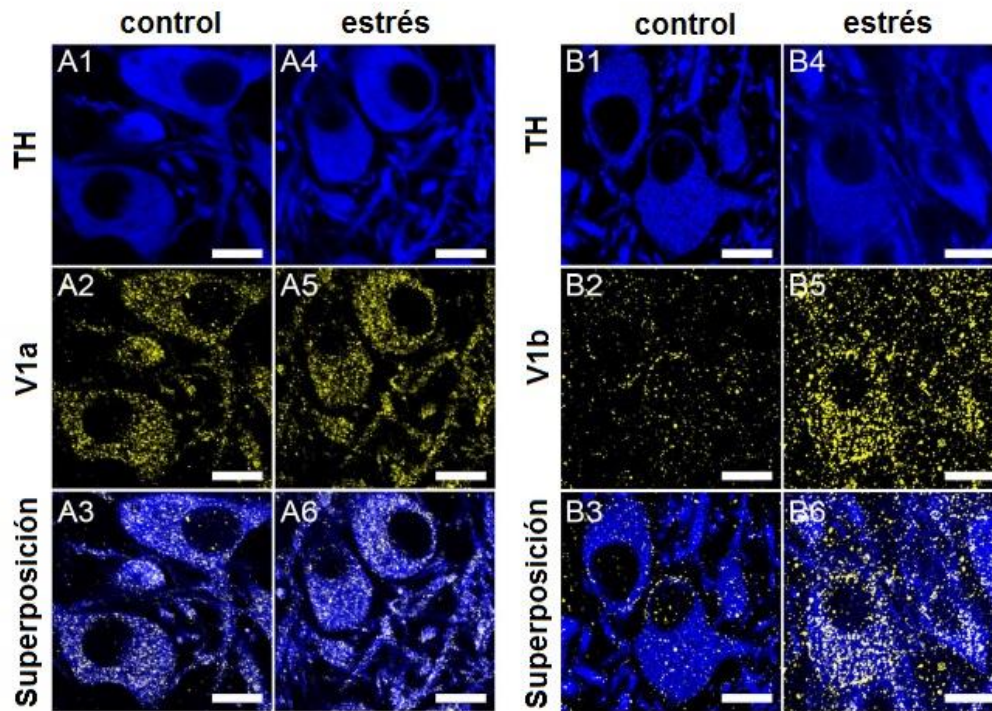


Figura 15. El estrés agudo modifica los patrones de expresión de los receptores de AVP. (A1) Muestra la inmunodetección de TH de un ratón control. (A2) Muestra el mismo campo visual, con la inmunoreactividad de V1_a. (A3) Superposición de (A1, A2). (A4) Inmunodetección de TH en el tejido de un ratón expuesto a restricción de movimiento 1 h, sacrificado 1 h después. El procesamiento del tejido y la obtención de las imágenes se realizó bajo las mismas condiciones que el animal control. (A5) Mismo campo visual con la inmunoreactividad para V1_a, con ninguna diferencia evidente en el patrón o intensidad entre las muestras control y estrés. (A6) Superposición de (A4, A5). (B1) Muestra la inmunoreactividad de TH en tejido control. (B2) Mismo campo visual con la inmunodetección de V1_b de un ratón control. (B3) Superposición de (B1, B2). (B4) Inmunoreactividad de TH en el tejido de un ratón expuesto a estrés por restricción de movimiento durante 1 h. (B5) Mismo campo visual con la inmunoreactividad para V1_b, con un notable incremento en la intensidad de la señal, tanto en la superficie como en el citoplasma de neuronas noradrenérgicas. (B6) Superposición de (B4, B5). Barras de escala 10 µm.

8. Discusión

El *locus coeruleus* es un núcleo pequeño, sin embargo, es la fuente principal de noradrenalina del prosencéfalo y la única fuente de este neurotransmisor de la corteza y el hipocampo que son centros controladores de la cognición, la memoria y comportamientos complejos, asimismo es un centro de control homeostático, que aseguran funciones vitales de muchos animales incluyendo al ser humano (Valentino & Van Bockstaele, 2008). Asimismo, es considerado un núcleo altamente heterogéneo molecularmente hablando debido a la gran cantidad de receptores, péptidos moduladores intrínsecos y foráneos que llegan a él mediante fibras aferentes de una gran diversidad de otros núcleos de sistema nervioso (Guyenet & Aghajanian, 1979; Hagan et al., 1999; Valentino et al., 1983).

Si bien la presencia de arginina vasopresina dentro de este núcleo se conoce desde la década de los 70's (Buijs et al., 1978), no era claro el papel que este neuromodulador desempeñaba dentro del LC y la presencia y distribución de sus receptores, hasta el momento eran desconocidos.

En cuanto a la anatomía del LC relacionada con el sistema vasopresinérgico, nuestros resultados determinaron la presencia de los receptores V1_a y V1_b en diferentes tipos neuronales dentro de éste núcleo. Localizado en la superficie somatodendrítica tanto de neuronas noradrenérgicas como no noradrenérgicas, la señal detectada mediante inmunohistoquímica del receptor V1_b fue mayor, contrario a lo que podía esperarse, ya que el receptor más ampliamente distribuido en el CNS es el V1_aR (Huber, Veinante, & Stoop, 2005; Ostrowski et al., 1994), lo que sugiere al LC como otra de las zonas de distribución del receptor V1_b junto con el septo lateral, amígdala, BNST, la región CA2 del hipocampo y algunas zonas corticales (Hernando et al., 2001; Salome et al., 2006; Stemmelin et al., 2005). Este es el primer reporte de la distribución de ambos receptores en este núcleo.

La distribución de las fibras vasopresinérgicas en contacto con neuronas noradrenérgica y no-noradrenérgicas, también resultó novedoso, además de la correlación con otros péptidos moduladores, en donde los axones que contienen a la vasopresina, solo mostraron una escasa asociación con la sustancia P, proveniente de otro sistema aferente que inerva al LC (Pickel et al., 1979). Lo que sugiere que la vía aferente de AVP es independiente a otros péptidos neuromoduladores.

Determinar la interacción del sistema vasopresinérgico con las entidades sinápticas del LC fue importante para entender el papel neuromodulador de la AVP dentro de este núcleo. La distribución de las fibras vasopresinérgicas y los receptores V1_a y V1_b mostraron un patrón de distribución muy semejante con respecto a la inmunodetección del VGLUT2, en donde se observó una proporción importante de fibras vasopresinérgicas y principalmente del receptor V1_b en cercanía con este transportador, sugiriendo una función en proximidad a sinapsis glutamatérgicas, así como la cercanía del sistema vasopresinérgico con sinapsis inhibitorias, la cual se detectó en menor proporción dada la señalización conjunta del sistema vasopresinérgico con VGAT y gábirina. Estos resultados pueden ser un indicador de la posible participación de la AVP en la regulación de la excitabilidad neuronal dentro del LC, la cual ya ha sido reportada en otras regiones del sistema nervioso como la amígdala central, el septo lateral y dorsal, PVN, SON el tronco cerebral y motoneuronas del hipogloso (Bailey et al., 2006; Hermes et al., 2000; Kombian et al. 2000; Ramanathan et al., 2012; Raymond-Marron, Raggenbass, & Zaninetti, 2005; Van Den Hooff & Urban, 1990).

Respecto a la modulación por parte de la AVP en las neuronas del LC. La determinación de la identidad neuronal posterior al registro electrofisiológico, señaló que todas correspondían a neuronas noradrenérgicas.

El registro con los antagonistas de los receptores de vasopresina arrojó efectos contrastantes sobre la excitabilidad neuronal. Los receptores V1_a y V1_b, ambos pertenecientes a la familia de los receptores acoplados a proteínas G (GPCR's), específicamente a las Gα_q/11 que activan las vías acopladas a la fosfolipasa C (Koshimizu et al., 2012). Sin embargo, estos efectos contrastantes por este tipo de receptores no son desconocidos. Existen reporte de que un mismo receptor GPCR es capaz de activar diferentes cascadas de segundos mensajeros, esto gracias a los diferentes estados conformacionales que adoptan una vez unido su ligando, que pueden ir de la activación a la inactivación (Kenakin, 2003), así como la capacidad de formar homo- y heterodímeros, que deriva en variaciones de las propiedades farmacológicas de estos receptores (Park & Palczewski, 2005) o bien la localización de los mismos en microdominios de la membrana plasmática como las balsas lipídicas o caveolas (Guzzi et al., 2002). El receptor V1_b es el ejemplo perfecto de esta variabilidad en la transducción de señales, ya que es capaz de activar simultáneamente la vía de Gq/-fosfato inositol y Gs-cAMP (Jard et al., 1986; Sabatier, Richard, & Dayanithi, 1998) o bien cada una por separado (Orcel et al., 2009). Sin embargo, a partir de nuestros datos, no es posible determinar si alguna de estas variables es la responsable de los efectos obtenidos con los antagonistas o bien con la desmopresina.

Si bien podemos atribuir la dualidad del efecto de estos fármacos sobre las neuronas a un estado metabólico determinado de las mismas, también es importante recordar que aún dentro de la población de las neuronas noradrenérgicas existen subpoblaciones genéticamente diversas (Plummer et al., 2017; Robertson et al., 2013). Para determinar esto, aunado a los registros electrofisiológicos y la identificación de la identidad neuronal, sería necesario determinar la identidad del receptor para AVP directamente responsable de los cambios en los patrones de disparo neuronales, así como la interacción de estos receptores con los componentes sinápticos cercanos en estas células.

Específicamente hablando los perfiles de distribución del receptor V1_b, nuestros datos los ubican también en neuronas no-noradrenérgicas del LC, las cuales tienen

características neuroquímicas de las interneuronas inhibitorias (Aston-Jones, Zhu, & Card, 2004; Corteen et al., 2011) En relación con lo anterior, el cambio en la frecuencia de disparo también podría ser atribuido a la modulación de los neurotransmisores canónicos locales, dada la cercanía de estos receptores con las entidades sinápticas glutamatérgicas y GABAérgicas que observamos en este trabajo y que ha sido reportado en otras regiones cerebrales (Raggenbass, 2008; Rood & Beck, 2014)

Uno de los cambios en las propiedades de membrana inducidos por la desmopresina, fue el cambio en la constante de tiempo de la post-hiperpolarización, característica que se encuentra directamente relacionada con la repolarización de la membrana y la capacidad de la célula para disparar el siguiente potencial de acción. Un efecto similar ha sido observado en la aplicación de otras neurohormonas como la CRH, siendo modulado por las conductancias de potasio (Jedema & Grace, 2004). También mostrando un acoplamiento diferencial con diversas proteínas G, el receptor para CRH activa cascadas de diversos segundos mensajeros resultando en la activación o inactivación de canales iónicos específicos (Aldenhoff et al., 1983; Grammatopoulos et al., 2001; Rainnie, Fernhout, & Shinnick-Gallagher, 1992) Sin embargo, la aplicación de antagonistas de CRH, no tiene ningún efecto sobre la frecuencia de disparo de las neuronas del LC (Page & Abercrombie, 1999), lo que descarta a la CRH como responsable de este parámetro de la fisiología del LC. Por el contrario, en este trabajo, el efecto de la aplicación de los antagonistas de los receptores $V1_a$ y $V1_b$ por si mismos afectaron significativamente la frecuencia de disparo del LC, lo que puede ser un indicativo de que el sistema vasopresinérgico tiene una influencia directa sobre la actividad eléctrica de las neuronas del LC. Otra diferencia que presentan nuestros datos, es la capacidad del sistema vasopresinérgico de modular al LC de manera bidireccional, lo cual no sólo marca una diferencia con CRH sino con otros péptidos neuromoduladores que provocan selectivamente un incremento o una disminución en la frecuencia de disparo (Zitnik, 2016)

Con la disminución en la amplitud de los potenciales de acción de las células que mostraron una disminución de la FR, es tentador asegurar que estos efectos se encuentran relacionados al cambio en la conductancia de iones específicos, no obstante, dada la ausencia de un cambio significativo en la resistencia de entrada de las células, cuestiona cualquier atribución a los mecanismos de compuerta de los canales de membrana.

No obstante, el efecto de la vasopresina mediado por sus receptores, en el cambio significativo de la frecuencia de disparo en las neuronas noradrenérgicas del LC, representa un impacto sobre la liberación de noradrenalina en el sistema nervioso central, dada la correlación que existe entre estos dos factores (Abercrombie et al., 1988; Korf et al., 1973).

Tras los experimentos de exposición a estrés agudo por restricción de movimiento, aun cuando no hubo un cambio en la inmunoreactividad para el receptor V1_a, los cambios en los patrones de inmunodetección para el receptor V1_b, fueron drásticos. Estos cambios parecen indicar la internalización de estos receptores dada la amplia señal correspondiente en compartimentos citoplasmáticos, siendo la internalización de los receptores acoplados a proteínas G un indicador de activación metabólica (Dale, Babwah, & Ferguson, 2002; Kelly, Bailey, & Henderson, 2008), este fenómeno puede ser un indicador de que esta vía se encuentra implicada en la respuesta al estrés en el LC, lo cual no es del todo impensable, ya que en otro estudio se demuestra que la administración de antagonistas selectivos del receptor V1_b, bloquea los efectos inducidos por estrés tanto en el eje hipotalámico hipofisario, así como en procesos de recuperación de la memoria (Barsegyan et al., 2015).

Las neuronas del *locus coeruleus* son altamente sensibles a factores estresantes tanto físico como emocionales, respondiendo con un incremento en la frecuencia cardiaca, siendo el CRF responsable de este incremento (Valentino & Van Bockstaele, 2008), por ello, no sería sorprendente que la liberación coordinada de la AVP y CRF del hipotálamo en procesos de estrés (Kormos & Gaszner, 2013) ambas vías de manera independiente estén participando en la modulación de la respuesta al estrés en el LC.

9. Conclusiones

El *locus coeruleus* se encuentra innervado por fibras vasopresinérgicas, las cuales presentan una distribución muy semejante a la distribución de los receptores V1a y V1b.

La administración del análogo de AVP, desmopresina, presenta un efecto tanto excitatorio como inhibitorio en la actividad eléctrica de las neuronas del LC.

La aplicación de los antagonistas para los receptores de AVP presentan un efecto semejante al de desmopresina.

La exposición a estrés agudo incrementa la inmunoreactividad del receptor V1_b en los compartimientos citoplasmáticos de las células noradrenérgicas del LC.

En resumen, este trabajo sugiere que la modulación de los patrones de disparo del LC, se encuentran íntimamente relacionados con los componentes del sistema vasopresinérgico presentes en este núcleo. Nuestros resultados sugieren una vía cooperativa de AVP con CRF en las respuestas adaptativas homeostáticas y de comportamiento a procesos de estrés modulados por el LC.

10. Literatura citada

- Abercrombie, E. D., Keller, R. W., Jr., & Zigmond, M. J. (1988). Characterization of hippocampal norepinephrine release as measured by microdialysis perfusion: pharmacological and behavioral studies. *Neuroscience*, *27*(3), 897-904.
- Aghajanian, G. K., & VanderMaelen, C. P. (1982). α 2-adrenoceptor-mediated hyperpolarization of locus coeruleus neurons: intracellular studies in vivo. *Science*, *215*(4538), 1394-1396.
- Aguilera, G., & Rabadan-Diehl, C. (2000). Regulation of vasopressin V1b receptors in the anterior pituitary gland of the rat. *Exp Physiol*, *85 Spec No*, 19s-26s.
- Aldenhoff, J. B., Gruol, D. L., Rivier, J., Vale, W., & Siggins, G. R. (1983). Corticotropin releasing factor decreases postburst hyperpolarizations and excites hippocampal neurons. *Science*, *221*(4613), 875-877.
- Alescio-Lautier, B., Rao, H., Paban, V., Devigne, C., & Soumireu-Mourat, B. (1995). Inhibition of the vasopressin-enhancing effect on memory retrieval and relearning by a vasopressin V1 receptor antagonist in mice. *Eur J Pharmacol*, *294*(2-3), 763-770.
- Alexander, R. W., Davis, J. N., & Lefkowitz, R. J. (1975). Direct identification and characterisation of β -adrenergic receptors in rat brain. *Nature*, *258*, 437. doi:10.1038/258437a0
- Amaral, D. G., & Sinnamon, H. M. (1977). The locus coeruleus: neurobiology of a central noradrenergic nucleus. *Prog Neurobiol*, *9*(3), 147-196.
- Andre, P., d'Ascanio, P., Ioffe, M., & Pompeiano, O. (1992). Microinjections of vasopressin in the locus coeruleus complex affect posture and vestibulospinal reflexes in decerebrate cats. *Pflugers Arch*, *420*(3-4), 376-388.
- Aston-Jones, G., & Bloom, F. E. (1981). Activity of norepinephrine-containing locus coeruleus neurons in behaving rats anticipates fluctuations in the sleep-waking cycle. *J Neurosci*, *1*(8), 876-886.
- Aston-Jones, G., & Cohen, J. D. (2005). An integrative theory of locus coeruleus-norepinephrine function: adaptive gain and optimal performance. *Annu Rev Neurosci*, *28*, 403-450. doi:10.1146/annurev.neuro.28.061604.135709
- Aston-Jones, G., Ennis, M., Pieribone, V. A., Nickell, W. T., & Shipley, M. T. (1986). The brain nucleus locus coeruleus: restricted afferent control of a broad efferent network. *Science*, *234*(4777), 734-737.
- Aston-Jones, G., Zhu, Y., & Card, J. P. (2004). Numerous GABAergic afferents to locus coeruleus in the pericoerulear dendritic zone: possible interneuronal pool. *J Neurosci*, *24*(9), 2313-2321. doi:10.1523/jneurosci.5339-03.2004
- Bailey, T. W., Jin, Y.-H., Doyle, M. W., Smith, S. M., & Andresen, M. C. (2006). Vasopressin inhibits glutamate release via two distinct modes in the brainstem. *Journal of Neuroscience*, *26*(23), 6131-6142.
- Barberis, C., & Tribollet, E. (1996). Vasopressin and oxytocin receptors in the central nervous system. *Crit Rev Neurobiol*, *10*(1), 119-154.
- Barron, A., Sjøvik, E., & Cornish, J. (2010). The Roles of Dopamine and Related Compounds in Reward-Seeking Behavior Across Animal Phyla. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *4*(163). doi:10.3389/fnbeh.2010.00163
- Barsegyan, A., Atsak, P., Hornberger, W. B., Jacobson, P. B., van Gaalen, M. M., & Roozendaal, B. (2015). The Vasopressin 1b Receptor Antagonist A-988315 Blocks Stress Effects on the Retrieval of Object-Recognition Memory. *Neuropsychopharmacology*, *40*, 1979. doi:10.1038/npp.2015.48
- Baylis, P., & Ball, S. (2013). The neurohypophysis: endocrinology of vasopressin and oxytocin. *Endotext [Internet]*. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.
- Benarroch, E. E. (2018). Locus coeruleus. *Cell Tissue Res*, *373*(1), 221-232. doi:10.1007/s00441-017-2649-1

- Berczi, I., Quintanar-Stephano, A., & Kovacs, K. (2009). Neuroimmune regulation in immunocompetence, acute illness, and healing. *Ann N Y Acad Sci*, *1153*, 220-239. doi:10.1111/j.1749-6632.2008.03975.x
- Berrada, K., Plesnicher, C. L., Luo, X., & Thibonnier, M. (2000). Dynamic interaction of human vasopressin/oxytocin receptor subtypes with G protein-coupled receptor kinases and protein kinase C after agonist stimulation. *J Biol Chem*, *275*(35), 27229-27237. doi:10.1074/jbc.M002288200
- Berridge, C. W., & Waterhouse, B. D. (2003). The locus coeruleus-noradrenergic system: modulation of behavioral state and state-dependent cognitive processes. *Brain Res Brain Res Rev*, *42*(1), 33-84.
- Birnbaumer, M. (2000). Vasopressin receptors. *Trends Endocrinol Metab*, *11*(10), 406-410.
- Birnbaumer, M. (2002). 58 - Vasopressin Receptors. In D. W. Pfaff, A. P. Arnold, S. E. Fahrbach, A. M. Etgen, & R. T. Rubin (Eds.), *Hormones, Brain and Behavior* (pp. 803-810). San Diego: Academic Press.
- Blanchard, R. J., Griebel, G., Farrokhi, C., Markham, C., Yang, M., & Blanchard, D. C. (2005). AVP V1b selective antagonist SSR149415 blocks aggressive behaviors in hamsters. *Pharmacol Biochem Behav*, *80*(1), 189-194. doi:10.1016/j.pbb.2004.10.024
- Brownstein, M. J., Russell, J. T., & Gainer, H. (1980). Synthesis, transport, and release of posterior pituitary hormones. *Science*, *207*(4429), 373-378.
- Buijs, R. M., Swaab, D. F., Dogterom, J., & van Leeuwen, F. W. (1978). Intra- and extrahypothalamic vasopressin and oxytocin pathways in the rat. *Cell Tissue Res*, *186*(3), 423-433.
- Bunney, W. E., Jr., & Davis, J. M. (1965). Norepinephrine in depressive reactions. A review. *Arch Gen Psychiatry*, *13*(6), 483-494.
- Buynitsky, T., & Mostofsky, D. I. (2009). Restraint stress in biobehavioral research: Recent developments. *Neurosci Biobehav Rev*, *33*(7), 1089-1098. doi:10.1016/j.neubiorev.2009.05.004
- Carter, M. E., Yizhar, O., Chikahisa, S., Nguyen, H., Adamantidis, A., Nishino, S., . . . de Lecea, L. (2010). Tuning arousal with optogenetic modulation of locus coeruleus neurons. *Nat Neurosci*, *13*(12), 1526-1533. doi:10.1038/nn.2682
- Cassens, G., Kuruc, A., Roffman, M., Orsulak, P. J., & Schildkraut, J. J. (1981). Alterations in brain norepinephrine metabolism and behavior induced by environmental stimuli previously paired with inescapable shock. *Behav Brain Res*, *2*(3), 387-407.
- Cedarbaum, J. M., & Aghajanian, G. K. (1977). Catecholamine receptors on locus coeruleus neurons: pharmacological characterization. *Eur J Pharmacol*, *44*(4), 375-385.
- Cedarbaum, J. M., & Aghajanian, G. K. (1978). Afferent projections to the rat locus coeruleus as determined by a retrograde tracing technique. *J Comp Neurol*, *178*(1), 1-16. doi:10.1002/cne.901780102
- Chamba, G., Weissmann, D., Rousset, C., Renaud, B., & Pujol, J. F. (1991). Distribution of alpha-1 and alpha-2 binding sites in the rat locus coeruleus. *Brain Res Bull*, *26*(2), 185-193.
- Chan, R., & Sawchenko, P. (1995). Hemodynamic regulation of tyrosine hydroxylase messenger RNA in medullary catecholamine neurons: a c-fos-guided hybridization histochemical study. *Neuroscience*, *66*(2), 377-390.
- Chandler, D. J. (2016). Evidence for a specialized role of the locus coeruleus noradrenergic system in cortical circuitries and behavioral operations. *Brain Res*, *1641*(Pt B), 197-206. doi:10.1016/j.brainres.2015.11.022
- Chandler, D. J., Gao, W. J., & Waterhouse, B. D. (2014). Heterogeneous organization of the locus coeruleus projections to prefrontal and motor cortices. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *111*(18), 6816-6821. doi:10.1073/pnas.1320827111
- Conrad, L. C., Leonard, C. M., & Pfaff, D. W. (1974). Connections of the median and dorsal raphe nuclei in the rat: an autoradiographic and degeneration study. *J Comp Neurol*, *156*(2), 179-205. doi:10.1002/cne.901560205

- Corteen, N. L., Cole, T. M., Sarna, A., Sieghart, W., & Swinny, J. D. (2011). Localization of GABA-A receptor alpha subunits on neurochemically distinct cell types in the rat locus coeruleus. *Eur J Neurosci*, *34*(2), 250-262. doi:10.1111/j.1460-9568.2011.07740.x
- Croiset, G., Nijssen, M. J., & Kamphuis, P. J. (2000). Role of corticotropin-releasing factor, vasopressin and the autonomic nervous system in learning and memory. *Eur J Pharmacol*, *405*(1-3), 225-234.
- Cuello, A. C., Milstein, C., Couture, R., Wright, B., Priestley, J. V., & Jarvis, J. (1984). Characterization and immunocytochemical application of monoclonal antibodies against enkephalins. *J Histochem Cytochem*, *32*(9), 947-957. doi:10.1177/32.9.6086744
- Cummings, S., Elde, R., Eells, J., & Lindall, A. (1983). Corticotropin-releasing factor immunoreactivity is widely distributed within the central nervous system of the rat: an immunohistochemical study. *J Neurosci*, *3*(7), 1355-1368.
- Curtis, A. L., Drolet, G., & Valentino, R. J. (1993). Hemodynamic stress activates locus coeruleus neurons of unanesthetized rats. *Brain Res Bull*, *31*(6), 737-744.
- Dahlstrom, A., & Fuxe, K. (1964). Localization of monoamines in the lower brain stem. *Experientia*, *20*(7), 398-399.
- Dale, L. B., Babwah, A. V., & Ferguson, S. S. (2002). Mechanisms of metabotropic glutamate receptor desensitization: role in the patterning of effector enzyme activation. *Neurochemistry international*, *41*(5), 319-326.
- De Vries, G. J., & Buijs, R. M. (1983). The origin of the vasopressinergic and oxytocinergic innervation of the rat brain with special reference to the lateral septum. *Brain Res*, *273*(2), 307-317.
- DeVries, G. J., Buijs, R. M., Van Leeuwen, F. W., Caffé, A. R., & Swaab, D. F. (1985). The vasopressinergic innervation of the brain in normal and castrated rats. *J Comp Neurol*, *233*(2), 236-254. doi:10.1002/cne.902330206
- Du Vigneaud, V., Gish, D. T., & Katsoyannis, P. G. (1954). A SYNTHETIC PREPARATION POSSESSING BIOLOGICAL PROPERTIES ASSOCIATED WITH ARGININEVASOPRESSIN. *Journal of the American Chemical Society*, *76*(18), 4751-4752. doi:10.1021/ja01647a089
- Dunn, F. L., Brennan, T. J., Nelson, A. E., & Robertson, G. L. (1973). The role of blood osmolality and volume in regulating vasopressin secretion in the rat. *J Clin Invest*, *52*(12), 3212-3219. doi:10.1172/jci107521
- Egan, T. M., & North, R. A. (1986). Actions of acetylcholine and nicotine on rat locus coeruleus neurons in vitro. *Neuroscience*, *19*(2), 565-571.
- Engelmann, M., Ebner, K., Landgraf, R., & Wotjak, C. T. (1998). Swim stress triggers the release of vasopressin within the suprachiasmatic nucleus of male rats. *Brain Res*, *792*(2), 343-347.
- Engelmann, M., Landgraf, R., & Wotjak, C. T. (2004). The hypothalamic–neurohypophysial system regulates the hypothalamic–pituitary–adrenal axis under stress: an old concept revisited. *Front Neuroendocrinol*, *25*(3-4), 132-149.
- Engelmann, M., Wotjak, C. T., Ebner, K., & Landgraf, R. (2000). Behavioural impact of intraseptally released vasopressin and oxytocin in rats. *Exp Physiol*, *85 Spec No*, 125s-130s.
- Foote, S. L., Bloom, F. E., & Aston-Jones, G. (1983). Nucleus locus ceruleus: new evidence of anatomical and physiological specificity. *Physiol Rev*, *63*(3), 844-914. doi:10.1152/physrev.1983.63.3.844
- Frazier, C. R., Trainor, B. C., Cravens, C. J., Whitney, T. K., & Marler, C. A. (2006). Paternal behavior influences development of aggression and vasopressin expression in male California mouse offspring. *Horm Behav*, *50*(5), 699-707. doi:10.1016/j.yhbeh.2006.06.035
- Fuxe, K., Ganten, D., Hokfelt, T., & Bolme, P. (1976). Immunohistochemical evidence for the existence of angiotensin II-containing nerve terminals in the brain and spinal cord in the rat. *Neurosci Lett*, *2*(4), 229-234.
- Gaillard, R. C., Schoenenberg, P., Favrod-Coune, C. A., Muller, A. F., Marie, J., Bockaert, J., & Jard, S. (1984). Properties of rat anterior pituitary vasopressin receptors: relation to adenylate

- cyclase and the effect of corticotropin-releasing factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81(9), 2907-2911.
- Giesemann, T., Schwarz, G., Nawrotzki, R., Berhörster, K., Rothkegel, M., Schlüter, K., . . . Kirsch, J. (2003). Complex formation between the postsynaptic scaffolding protein gephyrin, profilin, and Mena: a possible link to the microfilament system. *Journal of Neuroscience*, 23(23), 8330-8339.
- Godino, A., Giusti-Paiva, A., Antunes-Rodrigues, J., & Vivas, L. (2005). Neurochemical brain groups activated after an isotonic blood volume expansion in rats. *Neuroscience*, 133(2), 493-505. doi:10.1016/j.neuroscience.2005.02.035
- Grammatopoulos, D. K., Randeve, H. S., Levine, M. A., Kanellopoulou, K. A., & Hillhouse, E. W. (2001). Rat cerebral cortex corticotropin-releasing hormone receptors: evidence for receptor coupling to multiple G-proteins. *J Neurochem*, 76(2), 509-519.
- Griebel, G., Simiand, J., Stemmelin, J., Gal, C. S., & Steinberg, R. (2003). The vasopressin V1b receptor as a therapeutic target in stress-related disorders. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*, 2(3), 191-200.
- Groves, P. M., & Wilson, C. J. (1980a). Fine structure of rat locus coeruleus. *J Comp Neurol*, 193(4), 841-852. doi:10.1002/cne.901930402
- Groves, P. M., & Wilson, C. J. (1980b). Monoaminergic presynaptic axons and dendrites in rat locus coeruleus seen in reconstructions of serial sections. *J Comp Neurol*, 193(4), 853-862. doi:10.1002/cne.901930403
- Grzanna, R., & Molliver, M. E. (1980). The locus coeruleus in the rat: an immunohistochemical delineation. *Neuroscience*, 5(1), 21-40.
- Guyenet, P. G., & Aghajanian, G. K. (1979). ACh, substance P and met-enkephalin in the locus coeruleus: pharmacological evidence for independent sites of action. *Eur J Pharmacol*, 53(4), 319-328.
- Guzzi, F., Zanchetta, D., Cassoni, P., Guzzi, V., Francolini, M., Parenti, M., & Chini, B. (2002). Localization of the human oxytocin receptor in caveolin-1 enriched domains turns the receptor-mediated inhibition of cell growth into a proliferative response. *Oncogene*, 21(11), 1658-1667. doi:10.1038/sj.onc.1205219
- Hagan, J. J., Leslie, R. A., Patel, S., Evans, M. L., Wattam, T. A., Holmes, S., . . . Upton, N. (1999). Orexin A activates locus coeruleus cell firing and increases arousal in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(19), 10911-10916.
- Haslam, R. J., & Rosson, G. M. (1972). Aggregation of human blood platelets by vasopressin. *Am J Physiol*, 223(4), 958-967. doi:10.1152/ajplegacy.1972.223.4.958
- Hems, D. A., Whitton, P. D., & Ma, G. Y. (1975). Metabolic actions of vasopressin, glucagon and adrenalin in the intact rat. *Biochim Biophys Acta*, 411(1), 155-164.
- Hermes, M., Ruijter, J., Klop, A., Buijs, R., & Renaud, L. (2000). Vasopressin increases GABAergic inhibition of rat hypothalamic paraventricular nucleus neurons in vitro. *Journal of neurophysiology*, 83(2), 705-711.
- Hernando, F., Schoots, O., Lolait, S. J., & Burbach, J. P. (2001). Immunohistochemical localization of the vasopressin V1b receptor in the rat brain and pituitary gland: anatomical support for its involvement in the central effects of vasopressin. *Endocrinology*, 142(4), 1659-1668. doi:10.1210/endo.142.4.8067
- Horvath, T. L., Peyron, C., Diano, S., Ivanov, A., Aston-Jones, G., Kilduff, T. S., & van Den Pol, A. N. (1999). Hypocretin (orexin) activation and synaptic innervation of the locus coeruleus noradrenergic system. *J Comp Neurol*, 415(2), 145-159.
- Huber, D., Veinante, P., & Stoop, R. (2005). Vasopressin and oxytocin excite distinct neuronal populations in the central amygdala. *Science*, 308(5719), 245-248. doi:10.1126/science.1105636
- Hut, R. A., Van der Zee, E. A., Jansen, K., Gerkema, M. P., & Daan, S. (2002). Gradual reappearance of post-hibernation circadian rhythmicity correlates with numbers of vasopressin-

- containing neurons in the suprachiasmatic nuclei of European ground squirrels. *J Comp Physiol B*, 172(1), 59-70.
- Igarashi, S., Sasa, M., & Takaori, S. (1979). Feedback loop between locus coeruleus and spinal trigeminal nucleus neurons responding to tooth pulp stimulation in the rat. *Brain Res Bull*, 4(1), 75-83.
- Iijima, M., Yoshimizu, T., Shimazaki, T., Tokugawa, K., Fukumoto, K., Kurosu, S., . . . Chaki, S. (2014). Antidepressant and anxiolytic profiles of newly synthesized arginine vasopressin V1B receptor antagonists: TASP0233278 and TASP0390325. *Br J Pharmacol*, 171(14), 3511-3525. doi:10.1111/bph.12699
- Insel, P. A. (1996). Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Adrenergic receptors--evolving concepts and clinical implications. *N Engl J Med*, 334(9), 580-585. doi:10.1056/nejm199602293340907
- Jard, S., Gaillard, R. C., Guillon, G., Marie, J., Schoenenberg, P., Muller, A. F., . . . Sawyer, W. H. (1986). Vasopressin antagonists allow demonstration of a novel type of vasopressin receptor in the rat adenohypophysis. *Mol Pharmacol*, 30(2), 171-177.
- Jedema, H. P., & Grace, A. A. (2004). Corticotropin-releasing hormone directly activates noradrenergic neurons of the locus ceruleus recorded in vitro. *J Neurosci*, 24(43), 9703-9713. doi:10.1523/jneurosci.2830-04.2004
- Johnson, A. E., Audigier, S., Rossi, F., Jard, S., Tribollet, E., & Barberis, C. (1993). Localization and characterization of vasopressin binding sites in the rat brain using an iodinated linear AVP antagonist. *Brain Res*, 622(1-2), 9-16.
- Jourdon, A., Gresset, A., Spassky, N., Charnay, P., Topilko, P., & Santos, R. (2016). Prss56, a novel marker of adult neurogenesis in the mouse brain. *Brain Structure and Function*, 221(9), 4411-4427.
- Jurzak, M., Müller, A., & Gerstberger, R. (1995). Characterization of vasopressin receptors in cultured cells derived from the region of rat brain circumventricular organs. *Neuroscience*, 65(4), 1145-1159.
- Kelly, E., Bailey, C. P., & Henderson, G. (2008). Agonist-selective mechanisms of GPCR desensitization. *Br J Pharmacol*, 153(S1), S379-S388.
- Kenakin, T. (2003). Ligand-selective receptor conformations revisited: the promise and the problem. *Trends Pharmacol Sci*, 24(7), 346-354. doi:10.1016/s0165-6147(03)00167-6
- Kerman, I. A., Akil, H., & Watson, S. J. (2006). Rostral elements of sympatho-motor circuitry: a virally mediated transsynaptic tracing study. *J Neurosci*, 26(13), 3423-3433. doi:10.1523/jneurosci.5283-05.2006
- Kollack-Walker, S., Watson, S., & Akil, H. (1997). Social stress in hamsters: defeat activates specific neurocircuits within the brain. *Journal of Neuroscience*, 17(22), 8842-8855.
- Kombian, S., Mougnot, D., Hirasawa, M., & Pittman, Q. (2000). Vasopressin preferentially depresses excitatory over inhibitory synaptic transmission in the rat supraoptic nucleus in vitro. *Journal of neuroendocrinology*, 12(4), 361-367.
- Korf, J., Aghajanian, G. K., & Roth, R. H. (1973). Increased turnover of norepinephrine in the rat cerebral cortex during stress: role of the locus coeruleus. *Neuropharmacology*, 12(10), 933-938.
- Kormos, V., & Gaszner, B. (2013). Role of neuropeptides in anxiety, stress, and depression: from animals to humans. *Neuropeptides*, 47(6), 401-419. doi:10.1016/j.npep.2013.10.014
- Koshimizu, T. A., Nakamura, K., Egashira, N., Hiroyama, M., Nonoguchi, H., & Tanoue, A. (2012). Vasopressin V1a and V1b receptors: from molecules to physiological systems. *Physiol Rev*, 92(4), 1813-1864. doi:10.1152/physrev.00035.2011
- Koshimizu, T. A., Nasa, Y., Tanoue, A., Oikawa, R., Kawahara, Y., Kiyono, Y., . . . Tsujimoto, G. (2006). V1a vasopressin receptors maintain normal blood pressure by regulating circulating blood volume and baroreflex sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(20), 7807-7812. doi:10.1073/pnas.0600875103

- Kosik, K. S., & Finch, E. A. (1987). MAP2 and tau segregate into dendritic and axonal domains after the elaboration of morphologically distinct neurites: an immunocytochemical study of cultured rat cerebrum. *Journal of Neuroscience*, *7*(10), 3142-3153.
- Kwei, S., Jiang, C., & Haddad, G. G. (1993). Acute anoxia-induced alterations in MAP2 immunoreactivity and neuronal morphology in rat hippocampus. *Brain Res*, *620*(2), 203-210.
- Lechner, S. M., Curtis, A. L., Brons, R., & Valentino, R. J. (1997). Locus coeruleus activation by colon distention: role of corticotropin-releasing factor and excitatory amino acids. *Brain Res*, *756*(1-2), 114-124.
- Lena, C., de Kerchove D'Exaerde, A., Cordero-Erausquin, M., Le Novere, N., del Mar Arroyo-Jimenez, M., & Changeux, J. P. (1999). Diversity and distribution of nicotinic acetylcholine receptors in the locus ceruleus neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *96*(21), 12126-12131.
- Levitt, P., & Moore, R. Y. (1979). Origin and organization of brainstem catecholamine innervation in the rat. *J Comp Neurol*, *186*(4), 505-528. doi:10.1002/cne.901860402
- Lindvall, O., & Björklund, A. (1974). The organization of the ascending catecholamine neuron systems in the rat brain as revealed by the glyoxylic acid fluorescence method. *Acta Physiol Scand Suppl*, *412*, 1-48.
- Liu, X., Tribollet, E., Ogier, R., Barberis, C., & Raggenbass, M. (2003). Presence of functional vasopressin receptors in spinal ventral horn neurons of young rats: a morphological and electrophysiological study. *Eur J Neurosci*, *17*(9), 1833-1846.
- Lolait, S. J., Stewart, L. Q., Jessop, D. S., Young, W. S., 3rd, & O'Carroll, A. M. (2007). The hypothalamic-pituitary-adrenal axis response to stress in mice lacking functional vasopressin V1b receptors. *Endocrinology*, *148*(2), 849-856. doi:10.1210/en.2006-1309
- Loughlin, S. E., Foote, S. L., & Grzanna, R. (1986). Efferent projections of nucleus locus coeruleus: morphologic subpopulations have different efferent targets. *Neuroscience*, *18*(2), 307-319.
- Lu, Y. F., Moriwaki, A., Tomizawa, K., Onuma, H., Cai, X. H., & Matsui, H. (1997). Effects of vasopressin and involvement of receptor subtypes in the rat central amygdaloid nucleus in vitro. *Brain Res*, *768*(1-2), 266-272.
- Luque, J. M., Malherbe, P., & Richards, J. G. (1994). Localization of GABAA receptor subunit mRNAs in the rat locus coeruleus. *Brain Res Mol Brain Res*, *24*(1-4), 219-226.
- Maguire, E. P., Macpherson, T., Swinny, J. D., Dixon, C. I., Herd, M. B., Belevi, D., . . . Lambert, J. J. (2014). Tonic inhibition of accumbal spiny neurons by extrasynaptic alpha4betadelta GABAA receptors modulates the actions of psychostimulants. *J Neurosci*, *34*(3), 823-838. doi:10.1523/jneurosci.3232-13.2014
- Marcus, J. N., Aschkenasi, C. J., Lee, C. E., Chemelli, R. M., Saper, C. B., Yanagisawa, M., & Elmquist, J. K. (2001). Differential expression of orexin receptors 1 and 2 in the rat brain. *J Comp Neurol*, *435*(1), 6-25.
- Mason, S. T., & Fibiger, H. C. (1979). Regional topography within noradrenergic locus coeruleus as revealed by retrograde transport of horseradish peroxidase. *J Comp Neurol*, *187*(4), 703-724. doi:10.1002/cne.901870405
- Melia, K. R., & Duman, R. S. (1991). Involvement of corticotropin-releasing factor in chronic stress regulation of the brain noradrenergic system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *88*(19), 8382-8386.
- Mignot, E. (2001). A commentary on the neurobiology of the hypocretin/orexin system. *Neuropsychopharmacology*, *25*(5 Suppl), S5-13. doi:10.1016/s0893-133x(01)00316-5
- Miyazaki, T., Fukaya, M., Shimizu, H., & Watanabe, M. (2003). Subtype switching of vesicular glutamate transporters at parallel fibre-Purkinje cell synapses in developing mouse cerebellum. *Eur J Neurosci*, *17*(12), 2563-2572.
- Moore, K. L., Dalley, A. F., & Agur, A. M. R. (2010). *Clinically Oriented Anatomy*: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.
- Morgane, P. J., & Jacobs, M. S. (1979). Raphe projections to the locus coeruleus in the rat. *Brain Res Bull*, *4*(4), 519-534.

- Nagai, T., Satoh, K., Imamoto, K., & Maeda, T. (1981). Divergent projections of catecholamine neurons of the locus coeruleus as revealed by fluorescent retrograde double labeling technique. *Neurosci Lett*, *23*(2), 117-123.
- Nishimura, H., & Fan, Z. (2003). Regulation of water movement across vertebrate renal tubules. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, *136*(3), 479-498.
- O'Connor, T. M., O'Halloran, D. J., & Shanahan, F. (2000). The stress response and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: from molecule to melancholia. *Qjm*, *93*(6), 323-333.
- Ogier, R., Tribollet, E., Suarez, P., & Raggensbass, M. (2006). Identified motoneurons involved in sexual and eliminative functions in the rat are powerfully excited by vasopressin and tachykinins. *J Neurosci*, *26*(42), 10717-10726. doi:10.1523/jneurosci.3364-06.2006
- Okano, H. J., & Darnell, R. B. (1997). A hierarchy of Hu RNA binding proteins in developing and adult neurons. *J Neurosci*, *17*(9), 3024-3037.
- Oliver, G., & Schäfer, E. A. (1895). On the Physiological Action of Extracts of Pituitary Body and certain other Glandular Organs. *The Journal of Physiology*, *18*(3), 277-279. doi:10.1113/jphysiol.1895.sp000565
- Olpe, H. R., Steinmann, M. W., Pozza, M. F., & Haas, H. L. (1987). Comparative investigations on the actions of ACTH1-24, somatostatin, neurotensin, substance P and vasopressin on locus coeruleus neuronal activity in vitro. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, *336*(4), 434-437.
- Orcel, H., Albizu, L., Perkovska, S., Durroux, T., Mendre, C., Ansanay, H., . . . Rabie, A. (2009). Differential coupling of the vasopressin V1b receptor through compartmentalization within the plasma membrane. *Mol Pharmacol*, *75*(3), 637-647. doi:10.1124/mol.108.049031
- Ostergaard, L., Rudiger, A., Wellmann, S., Gammella, E., Beck-Schimmer, B., Struck, J., . . . Gassmann, M. (2014). Arginine-vasopressin marker copeptin is a sensitive plasma surrogate of hypoxic exposure. *Hypoxia (Auckl)*, *2*, 143-151. doi:10.2147/hp.s57894
- Ostrowski, N. L., Lolait, S. J., & Young, W. S., 3rd. (1994). Cellular localization of vasopressin V1a receptor messenger ribonucleic acid in adult male rat brain, pineal, and brain vasculature. *Endocrinology*, *135*(4), 1511-1528. doi:10.1210/endo.135.4.7925112
- Page, M. E., & Abercrombie, E. D. (1999). Discrete local application of corticotropin-releasing factor increases locus coeruleus discharge and extracellular norepinephrine in rat hippocampus. *Synapse*, *33*(4), 304-313.
- Park, P. S., & Palczewski, K. (2005). Diversifying the repertoire of G protein-coupled receptors through oligomerization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *102*(25), 8793-8794. doi:10.1073/pnas.0504016102
- Peyron, C., Tighe, D. K., van den Pol, A. N., de Lecea, L., Heller, H. C., Sutcliffe, J. G., & Kilduff, T. S. (1998). Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. *J Neurosci*, *18*(23), 9996-10015.
- Pfeiffer, F., Simler, R., Grenningloh, G., & Betz, H. (1984). Monoclonal antibodies and peptide mapping reveal structural similarities between the subunits of the glycine receptor of rat spinal cord. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *81*(22), 7224-7227.
- Pickel, V. M., Joh, T. H., & Reis, D. J. (1977). A serotonergic innervation of noradrenergic neurons in nucleus locus coeruleus: demonstration by immunocytochemical localization of the transmitter specific enzymes tyrosine and tryptophan hydroxylase. *Brain Res*, *131*(2), 197-214.
- Pickel, V. M., Joh, T. H., Reis, D. J., Leeman, S. E., & Miller, R. J. (1979). Electron microscopic localization of substance P and enkephalin in axon terminals related to dendrites of catecholaminergic neurons. *Brain Res*, *160*(3), 387-400.
- Plummer, N. W., Scappini, E. L., Smith, K. G., Tucker, C. J., & Jensen, P. (2017). Two Subpopulations of Noradrenergic Neurons in the Locus Coeruleus Complex Distinguished by Expression of the Dorsal Neural Tube Marker Pax7. *Front Neuroanat*, *11*, 60. doi:10.3389/fnana.2017.00060

- Raggenbass, M. (2008). Overview of cellular electrophysiological actions of vasopressin. *Eur J Pharmacol*, 583(2-3), 243-254. doi:10.1016/j.ejphar.2007.11.074
- Raggenbass, M., Dubois-Dauphin, M., Tribollet, E., & Dreifuss, J. J. (1988). Direct excitatory action of vasopressin in the lateral septum of the rat brain. *Brain Res*, 459(1), 60-69.
- Raggenbass, M., Goumaz, M., Sermasi, E., Tribollet, E., & Dreifuss, J. J. (1991). Vasopressin generates a persistent voltage-dependent sodium current in a mammalian motoneuron. *J Neurosci*, 11(6), 1609-1616.
- Rainnie, D. G., Fernhout, B. J., & Shinnick-Gallagher, P. (1992). Differential actions of corticotropin releasing factor on basolateral and central amygdaloid neurones, in vitro. *J Pharmacol Exp Ther*, 263(2), 846-858.
- Ramanathan, G., Cilz, N. I., Kurada, L., Hu, B., Wang, X., & Lei, S. (2012). Vasopressin facilitates GABAergic transmission in rat hippocampus via activation of V1A receptors. *Neuropharmacology*, 63(7), 1218-1226.
- Reymond-Marron, I., Raggenbass, M., & Zaninetti, M. (2005). Vasopressin facilitates glycinergic and GABAergic synaptic transmission in developing hypoglossal motoneurons. *European Journal of Neuroscience*, 21(6), 1601-1609.
- Rickenbacher, E., Baez, M. A., Hale, L., Leiser, S. C., Zderic, S. A., & Valentino, R. J. (2008). Impact of overactive bladder on the brain: central sequelae of a visceral pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(30), 10589-10594. doi:10.1073/pnas.0800969105
- Rivier, C., & Vale, W. (1983). Modulation of stress-induced ACTH release by corticotropin-releasing factor, catecholamines and vasopressin. *Nature*, 305(5932), 325-327. doi:10.1038/305325a0
- Robertson, S. D., Plummer, N. W., de Marchena, J., & Jensen, P. (2013). Developmental origins of central norepinephrine neuron diversity. *Nat Neurosci*, 16(8), 1016-1023. doi:10.1038/nn.3458
- Rood, B. D., & Beck, S. G. (2014). Vasopressin indirectly excites dorsal raphe serotonin neurons through activation of the vasopressin1A receptor. *Neuroscience*, 260, 205-216. doi:10.1016/j.neuroscience.2013.12.012
- Rood, B. D., & De Vries, G. J. (2011). Vasopressin innervation of the mouse (*Mus musculus*) brain and spinal cord. *J Comp Neurol*, 519(12), 2434-2474. doi:10.1002/cne.22635
- Rotondo, F., Butz, H., Syro, L. V., Yousef, G. M., Di Ieva, A., Restrepo, L. M., . . . Kovacs, K. (2016). Arginine vasopressin (AVP): a review of its historical perspectives, current research and multifunctional role in the hypothalamo-hypophysial system. *Pituitary*, 19(4), 345-355. doi:10.1007/s11102-015-0703-0
- Rusnák, M., Kvetňanský, R., Jeloková, J., & Palkovits, M. (2001). Effect of novel stressors on gene expression of tyrosine hydroxylase and monoamine transporters in brainstem noradrenergic neurons of long-term repeatedly immobilized rats. *Brain Res*, 899(1-2), 20-35.
- Russel, G. V. (1955). The nucleus locus coeruleus (dorsalis tegmenti). *Texas Reports on Biology and Medicine*, 13, 939-988.
- Sabatier, N., Richard, P., & Dayanithi, G. (1998). Activation of multiple intracellular transduction signals by vasopressin in vasopressin-sensitive neurones of the rat supraoptic nucleus. *J Physiol*, 513 (Pt 3), 699-710.
- Sachs, H., Fawcett, P., Takabatake, Y., & Portanova, R. (1969). Biosynthesis and release of vasopressin and neurophysin. *Recent Prog Horm Res*, 25, 447-491.
- Saito, M., Tahara, A., & Sugimoto, T. (1997). 1-desamino-8-D-arginine vasopressin (DDAVP) as an agonist on V1b vasopressin receptor. *Biochem Pharmacol*, 53(11), 1711-1717.
- Sakai, K., Touret, M., Salvert, D., Leger, L., & Jouvet, M. (1977). Afferent projections to the cat locus coeruleus as visualized by the horseradish peroxidase technique. *Brain Res*, 119(1), 21-41.
- Salome, N., Stemmelin, J., Cohen, C., & Griebel, G. (2006). Differential roles of amygdaloid nuclei in the anxiolytic- and antidepressant-like effects of the V1b receptor antagonist,

- SSR149415, in rats. *Psychopharmacology (Berl)*, 187(2), 237-244. doi:10.1007/s00213-006-0424-1
- Sara, S. J. (2015). Locus Coeruleus in time with the making of memories. *Curr Opin Neurobiol*, 35, 87-94. doi:10.1016/j.conb.2015.07.004
- Sato, K., Numata, T., Saito, T., Ueta, Y., & Okada, Y. (2011). V(2) receptor-mediated autocrine role of somatodendritic release of AVP in rat vasopressin neurons under hypo-osmotic conditions. *Sci Signal*, 4(157), ra5. doi:10.1126/scisignal.2001279
- Sawyer, W., Acosta, M., & Manning, M. (1974). Structural changes in the arginine vasopressin molecule that prolong its antidiuretic action. *Endocrinology*, 95(1), 140-149.
- Schwarz, L. A., & Luo, L. (2015). Organization of the locus coeruleus-norepinephrine system. *Curr Biol*, 25(21), R1051-r1056. doi:10.1016/j.cub.2015.09.039
- Schwarz, L. A., Miyamichi, K., Gao, X. J., Beier, K. T., Weissbourd, B., DeLoach, K. E., . . . Luo, L. (2015). Viral-genetic tracing of the input-output organization of a central noradrenergic circuit. *Nature*, 524, 88. doi:10.1038/nature14600
- <https://www.nature.com/articles/nature14600#supplementary-information>
- Scott, L. V., & Dinan, T. G. (1998). Vasopressin and the regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis function: implications for the pathophysiology of depression. *Life Sci*, 62(22), 1985-1998.
- Seifi, M., Corteen, N. L., van der Want, J. J., Metzger, F., & Swinny, J. D. (2014). Localization of NG2 immunoreactive neuroglia cells in the rat locus coeruleus and their plasticity in response to stress. *Front Neuroanat*, 8, 31. doi:10.3389/fnana.2014.00031
- Senut, M.-C., Azher, S., Margolis, F. L., Patel, K., Mousa, A., & Majid, A. (2009). Distribution of carnosine-like peptides in the nervous system of developing and adult zebrafish (*Danio rerio*) and embryonic effects of chronic carnosine exposure. *Cell Tissue Res*, 337(1), 45-61. doi:10.1007/s00441-009-0796-8
- Serradeil-Le Gal, C., Wagnon, J., 3rd, Tonnerre, B., Roux, R., Garcia, G., Griebel, G., & Aulombard, A. (2005). An overview of SSR149415, a selective nonpeptide vasopressin V(1b) receptor antagonist for the treatment of stress-related disorders. *CNS Drug Rev*, 11(1), 53-68.
- Serradeil-Le Gal, C., Wagnon, J., Simiand, J., Griebel, G., Lacour, C., Guillon, G., . . . Le Fur, G. (2002). Characterization of (2S,4R)-1-[5-chloro-1-[(2,4-dimethoxyphenyl)sulfonyl]-3-(2-methoxy-phenyl)-2-oxo-2,3-dihydro-1H-indol-3-yl]-4-hydroxy-N,N-dimethyl-2-pyrrolidine carboxamide (SSR149415), a selective and orally active vasopressin V1b receptor antagonist. *J Pharmacol Exp Ther*, 300(3), 1122-1130.
- Shimizu, N., & Imamoto, K. (1970). Fine structure of the locus coeruleus in the rat. *Arch Histol Jpn*, 31(3), 229-246.
- Simpson, K. L., Altman, D. W., Wang, L., Kirifides, M. L., Lin, R. C., & Waterhouse, B. D. (1997). Lateralization and functional organization of the locus coeruleus projection to the trigeminal somatosensory pathway in rat. *J Comp Neurol*, 385(1), 135-147.
- Smagin, G., Swiergiel, A., & Dunn, A. (1994). SODIUM-NITROPRUSSIDE INFUSIONS ACTIVATE CORTICAL AND HYPOTHALAMIC NORADRENERGIC SYSTEMS IN RATS. *Neuroscience Research Communications*, 14(2), 85-91.
- Steindler, D. A. (1981). Locus coeruleus neurons have axons that branch to the forebrain and cerebellum. *Brain Res*, 223(2), 367-373.
- Stemmelin, J., Lukovic, L., Salome, N., & Griebel, G. (2005). Evidence that the lateral septum is involved in the antidepressant-like effects of the vasopressin V1b receptor antagonist, SSR149415. *Neuropsychopharmacology*, 30(1), 35-42. doi:10.1038/sj.npp.1300562
- Sutin, E. L., & Jacobowitz, D. M. (1991). Neurochemicals in the dorsal pontine tegmentum. *Prog Brain Res*, 88, 3-14.
- Swanson, L. W. (1976). The locus coeruleus: a cytoarchitectonic, Golgi and immunohistochemical study in the albino rat. *Brain Res*, 110(1), 39-56.

- Swanson, L. W. (1977). Immunohistochemical evidence for a neurophysin-containing autonomic pathway arising in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Brain Res*, *128*(2), 346-353.
- Swanson, L. W., & Hartman, B. K. (1975). The central adrenergic system. An immunofluorescence study of the location of cell bodies and their efferent connections in the rat utilizing dopamine-beta-hydroxylase as a marker. *J Comp Neurol*, *163*(4), 467-505. doi:10.1002/cne.901630406
- Swanson, L. W., Sawchenko, P. E., Rivier, J., & Vale, W. W. (1983). Organization of ovine corticotropin-releasing factor immunoreactive cells and fibers in the rat brain: an immunohistochemical study. *Neuroendocrinology*, *36*(3), 165-186. doi:10.1159/000123454
- Swinny, J. D., O'Farrell, E., Bingham, B. C., Piel, D. A., Valentino, R. J., & Beck, S. G. (2010). Neonatal rearing conditions distinctly shape locus coeruleus neuronal activity, dendritic arborization, and sensitivity to corticotrophin-releasing factor. *Int J Neuropsychopharmacol*, *13*(4), 515-525. doi:10.1017/s146114570999037x
- Takabatake, Y., & Sachs, H. (1964). VASOPRESSIN BIOSYNTHESIS. 3. IN VITRO STUDIES. *Endocrinology*, *75*, 934-942. doi:10.1210/endo-75-6-934
- Tanoue, A., Ito, S., Honda, K., Oshikawa, S., Kitagawa, Y., Koshimizu, T. A., . . . Tsujimoto, G. (2004). The vasopressin V1b receptor critically regulates hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity under both stress and resting conditions. *J Clin Invest*, *113*(2), 302-309. doi:10.1172/jci19656
- Taylor, S. P., Jr., Du Vigneaud, V., & Kunkel, H. G. (1953). Electrophoretic studies of oxytocin and vasopressin. *J Biol Chem*, *205*(1), 45-53.
- Thibonnier, M., Coles, P., Thibonnier, A., & Shoham, M. (2002). Molecular pharmacology and modeling of vasopressin receptors. *Prog Brain Res*, *139*, 179-196.
- Thierry, A. M., Javoy, F., Glowinski, J., & Kety, S. S. (1968). Effects of stress on the metabolism of norepinephrine, dopamine and serotonin in the central nervous system of the rat. I. Modifications of norepinephrine turnover. *J Pharmacol Exp Ther*, *163*(1), 163-171.
- Tilbrook, A. J., & Clarke, I. J. (2006). Neuroendocrine mechanisms of innate states of attenuated responsiveness of the hypothalamo-pituitary adrenal axis to stress. *Front Neuroendocrinol*, *27*(3), 285-307. doi:10.1016/j.yfrne.2006.06.002
- Uhl, G. R., Goodman, R. R., & Snyder, S. H. (1979). Neurotensin-containing cell bodies, fibers and nerve terminals in the brain stem of the rat: immunohistochemical mapping. *Brain Res*, *167*(1), 77-91.
- Ungerstedt, U. (1971). Stereotaxic mapping of the monoamine pathways in the rat brain. *Acta Physiol Scand Suppl*, *367*, 1-48.
- Usher, M., Cohen, J. D., Servan-Schreiber, D., Rajkowski, J., & Aston-Jones, G. (1999). The role of locus coeruleus in the regulation of cognitive performance. *Science*, *283*(5401), 549-554.
- Valentino, R. J., Foote, S. L., & Aston-Jones, G. (1983). Corticotropin-releasing factor activates noradrenergic neurons of the locus coeruleus. *Brain Res*, *270*(2), 363-367.
- Valentino, R. J., & Van Bockstaele, E. (2008). Convergent regulation of locus coeruleus activity as an adaptive response to stress. *Eur J Pharmacol*, *583*(2-3), 194-203. doi:10.1016/j.ejphar.2007.11.062
- Valenzuela Harrington, M., Díaz, J. V., & Rodriguez-Moreno, A. (2007). *Nucleus ceruleus. Neurotransmitters, functions and pathology* (Vol. 19).
- Van Bockstaele, E. J., Branchereau, P., & Pickel, V. M. (1995). Morphologically heterogeneous met-enkephalin terminals form synapses with tyrosine hydroxylase-containing dendrites in the rat nucleus locus coeruleus. *J Comp Neurol*, *363*(3), 423-438. doi:10.1002/cne.903630307
- Van Bockstaele, E. J., Saunders, A., Commons, K. G., Liu, X. B., & Peoples, J. (2000). Evidence for coexistence of enkephalin and glutamate in axon terminals and cellular sites for functional interactions of their receptors in the rat locus coeruleus. *J Comp Neurol*, *417*(1), 103-114.

- Van Den Hooff, P., & Urban, I. J. (1990). Vasopressin facilitates excitatory transmission in slices of the rat dorso-lateral septum. *Synapse*, 5(3), 201-206.
- Villanueva, C., Jacquier, S., & de Roux, N. (2012). DLK1 is a somato-dendritic protein expressed in hypothalamic arginine-vasopressin and oxytocin neurons. *PLoS One*, 7(4), e36134. doi:10.1371/journal.pone.0036134
- Watson, S. J., Richard, C. W., 3rd, & Barchas, J. D. (1978). Adrenocorticotropin in rat brain: immunocytochemical localization in cells and axons. *Science*, 200(4346), 1180-1182.
- Weele, C. V. (2018). Coffe Break with Dr. Lindsay Schwarz. Retrieved from <http://media.inscopix.com/coffee-break-with-dr.-lindsay-schwarz>
- Young, W. S., 3rd, & Gainer, H. (2003). Transgenesis and the study of expression, cellular targeting and function of oxytocin, vasopressin and their receptors. *Neuroendocrinology*, 78(4), 185-203. doi:10.1159/000073702
- Young, W. S., Li, J., Wersinger, S. R., & Palkovits, M. (2006). The vasopressin 1b receptor is prominent in the hippocampal area CA2 where it is unaffected by restraint stress or adrenalectomy. *Neuroscience*, 143(4), 1031-1039. doi:10.1016/j.neuroscience.2006.08.040
- Zhang, L., & Hernandez, V. S. (2013). Synaptic innervation to rat hippocampus by vasopressin-immuno-positive fibres from the hypothalamic supraoptic and paraventricular nuclei. *Neuroscience*, 228, 139-162. doi:10.1016/j.neuroscience.2012.10.010
- Zhang, L., Hernandez, V. S., Vazquez-Juarez, E., Chay, F. K., & Barrio, R. A. (2016). Thirst Is Associated with Suppression of Habenula Output and Active Stress Coping: Is there a Role for a Non-canonical Vasopressin-Glutamate Pathway? *Front Neural Circuits*, 10, 13. doi:10.3389/fncir.2016.00013
- Zitnik, G. A. (2016). Control of arousal through neuropeptide afferents of the locus coeruleus. *Brain Res*, 1641, 338-350.

11. Apéndice (Artículo para la obtención del grado)

11.1 Publicaciones científicas

- **Campos-Lira, E.**, Kelly, L., Seifi, M., Jackson, T., Giesecke, T., Mutig, K., Swinny, J. D. (2018). Dynamic Modulation of Mouse Locus Coeruleus Neurons by Vasopressin 1a and 1b Receptors. *Front Neurosci*, 12, 919. doi:10.3389/fnins.2018.00919
- Campos-Lira, E., Carrillo, E., Aguilar, M. B., Gajewiak, J., Gomez-Lagunas, F., & Lopez-Vera, E. (2017). Conorfamide-Sr3, a structurally novel specific inhibitor of the Shaker K(+) channel. *Toxicon*, 138, 53-58. doi:10.1016/j.toxicon.2017.07.024

11.2 Presentaciones en congresos Internacionales.

Campos-Lira, E, Kelly, L. Hernández, V. S., Zhang, L., Swinny, J. 2018. The effect of vasopressin receptor activation on mouse *locus coeruleus* neuronal activity” at the annual congress 48nd Annual Meeting Neuroscience of Society for Neuroscience, San Diego, CA.

Campos-Lira, E, Kelly, L. Hernández, V. S., Zhang, L., Swinny, J. 2018. The effect of vasopressin receptor activation on mouse *locus coeruleus* neuronal activity” at 22nd International Symposium on Regulatory Peptides, Acapulco Diamante, México.
“**Travel award**, poster and talk in the RegPep2018 Data Blitz”

Campos-Lira, E, Kelly, L. Hernández, V. S., Zhang, L., Swinny, J. 2018. The effect of vasopressin receptor activation on mouse *locus coeruleus* neuronal activity” at 11th FENS Forum of neuroscience, Berlin, Germany.



Dynamic Modulation of Mouse Locus Coeruleus Neurons by Vasopressin 1a and 1b Receptors

Elba Campos-Lira^{1†}, Louise Kelly^{2†}, Mohsen Seifi², Torquill Jackson², Torsten Gleesecke², Kerim Mutig^{3,4}, Taka-aki A. Koshimizu⁵, Vito S. Hernandez¹, Limei Zhang^{1*} and Jerome D. Swinny^{2*}

OPEN ACCESS

Edited by:

Vincent Goonon,
University of Liège, Belgium

Reviewed by:

David Murphy,
University of Bristol, United Kingdom
Anniina Aramantidis,
University of Dorn, Switzerland

*Correspondence:

Limei Zhang
limei.zhang@berno1@gmail.com
Jerome D. Swinny
jromo.swinny@port.ac.uk

†These authors have contributed
equally to this work

*Present address:

Louise Kelly,
Faculty of Medicine, University
of Southampton, Southampton,
United Kingdom

Specialty section:

This article was submitted to
Neuroendocrine Science,
a section of the journal
Frontiers in Neuroscience

Received: 28 August 2018

Accepted: 22 November 2018

Published: 10 December 2018

Citation:

Campos-Lira E, Kelly L, Seifi M,
Jackson T, Gleesecke T, Mutig K,
Koshimizu TA, Hernandez VS,
Zhang L and Swinny JD (2018)
Dynamic Modulation of Mouse Locus
Coeruleus Neurons by Vasopressin
1a and 1b Receptors.
Front. Neurosci. 12:919.
doi: 10.3389/fnins.2018.00919

¹ Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

² Institute for Biomedical and Biomolecular Sciences, School of Pharmacy and Biomedical Sciences, University

of Portsmouth, Portsmouth, United Kingdom, ³ Department of Anatomy, Charité - Universitätsmedizin Berlin, Berlin,

Germany, ⁴ I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation

(Sechenovskiy University), Moscow, Russia, ⁵ Division of Molecular Pharmacology, Department of Pharmacology, Jichi
Medical University, Shimotsuki, Japan

The locus coeruleus (LC) is a brainstem nucleus distinguished by its supply of noradrenaline throughout the central nervous system. Apart from modulating a range of brain functions, such as arousal, cognition and the stress response, LC neuronal excitability also corresponds to the activity of various peripheral systems, such as pelvic viscera and the cardiovascular system. Neurochemically diverse inputs set the tone for LC neuronal activity, which in turn modulates these adaptive physiological and behavioral responses essential for survival. One such LC afferent system which is poorly understood contains the neurohormone arginine-vasopressin (AVP). Here we provide the first demonstration of the molecular and functional characteristics of the LC-AVP system, by characterizing its receptor-specific modulation of identified LC neurons and plasticity in response to stress. High resolution confocal microscopy revealed that immunoreactivity for the AVP receptor 1b (V1b) was located on plasma membranes of noradrenergic and non-noradrenergic LC neurons. In contrast, immunoreactivity for the V1a receptor was exclusively located on LC noradrenergic neurons. No specific signal, either at the mRNA or protein level, was detected for the V2 receptor in the LC. Clusters immunoreactive for V1a-b were located in proximity to profiles immunoreactive for GABAergic and glutamatergic synaptic marker proteins. AVP immunopositive varicosities were also located adjacent to labeling for such synaptic markers. Whole-cell patch clamp electrophysiology revealed that the pharmacological activation of V1b receptors significantly increased the spontaneous activity of 45% (9/20) of recorded noradrenergic neurons, with the remaining 55% (11/20) of cells exhibiting a significant decrease in their basal firing patterns. Blockade of V1a and V1b receptors on their own significantly altered LC neuronal excitability in a similar heterogeneous manner, demonstrating that endogenous AVP sets the basal LC neuronal firing rates. Finally, exposing animals to acute stress increased V1b, but not V1a receptor expression, whilst decreasing AVP immunoreactivity. This study reveals the AVP V1a/b system as

a considerable component of the LC molecular architecture and regulator of LC activity. Since AVP primarily functions as a regulator of homeostasis, the data suggest a novel pathway by modulating the functioning of a brain region that is integral to mediating adaptive responses.

Keywords: V1b, desmopressin, patch clamp, TASP 0390325, restraint, stress

INTRODUCTION

The LC is a cluster of neurons located within the pons distinguished from surrounding cell groups by their production of the neurotransmitter noradrenaline (NA) (Dahlstrom and Fuxe, 1964). Despite the compact size of this nucleus, the principal neurons project to almost all regions of the brain and spinal cord, thereby serving as the primary source of NA for the central nervous system (Schwarz and Luo, 2015). The result is a LC-NA system that modulates some of the most salient aspects of brain function such as arousal (Carter et al., 2010), attention (Usher et al., 1999), and memory (Sara, 2015). These neural processes are combined to mediate a core responsibility of the LC-NA system, that being the modulation of adaptive responses to emotional and physiological stressors, which is a process essential for survival in an ever dynamic world (Valentino and Van Bockstaele, 2008). This is accomplished by a highly dynamic excitability profile of LC neurons, which results in the release of NA in precise spatiotemporal and brain-state specific patterns. However, this contribution of the LC-NA system to homeostasis extends beyond the CNS. Indeed, changes in the activity of LC neurons have been associated with diverse peripheral physiological states, such as intestinal contractility (Lechner et al., 1997), changes in blood pressure (Curtis et al., 1993), bladder contractility (Rickenbacher et al., 2008) and fluid balance (Godino et al., 2005). Therefore, the factors that govern LC neuronal excitability have the potential to impact on a vast array of physiological processes both within the CNS and in a number of major peripheral organs in health and disease.

The principal noradrenergic neurons of the LC have the ability to fire action potentials spontaneously and independently of synaptic inputs (Williams et al., 1991). However, their firing frequency is strongly modulated by conventional neurotransmitters (Cherubini et al., 1988; Singewald and Philippu, 1998). Often co-expressed with GABAergic and glutamatergic inputs are an assortment of neuropeptides which either exert direct effects on LC neuronal excitability or modulate the effects of the co-released neurotransmitters, and are thus considered as neuromodulators (Zitnik, 2016). In contrast, the role of another LC afferent system, distinguished by the expression of the neurohormone AVP (Rood and De Vries, 2011) is relatively poorly understood in terms of its contribution to LC function.

The primary signature of AVP is that of a hormone that acts on a range of physiological systems and is integral for the maintenance of homeostasis. Primarily produced by the hypothalamus, its multitude of functions include contributing to the regulation of fluid balance (Bankir et al., 2017), blood pressure (Lozic et al., 2018), thermoregulation (Daikoku et al., 2007),

stress, (Caldwell et al., 2017) as well as emotional and social behavior (Wu et al., 2015). Although many of these functions mirror those of the LC-NA system detailed above, evidence for the cooperativity of these two homeostatic systems is rather limited. This is due to the dearth of information on the molecular, cellular and behavioral correlates of the AVP system within brain pathways such as the LC.

In the mouse, AVP-immunoreactive axonal profiles have been demonstrated in the region of the pons occupied by the LC (Rood and De Vries, 2011). However, this single labeling study failed to demonstrate the association of such fibers with identified LC neurons or other LC neuromodulatory afferent systems. This is important because the LC is composed of morphologically diverse noradrenergic (Schwarz and Luo, 2015) and neurochemically diverse non-noradrenergic neurons (Corteen et al., 2011). Furthermore, the specific receptors, through which AVP might communicate with LC neurons remain to be identified. Three AVP receptor subtypes have been identified, namely AVP receptor 1a (V1a), 1b (V1b) and 2 (V2) (Thibonnier et al., 2002). Expression of the V1b receptor at the mRNA level has been reported in the pons, but not on identified LC neurons (Young et al., 2006). Evidence for the association of AVP with LC is more developed at the functional level. Recordings from neurons in the LC showed an excitatory effect of AVP in gerbil (Olpe et al., 1987) and rat (Berecek et al., 1987), whilst the injection of AVP into the LC complex, not on identified LC neurons, of cats, altered posture and vestibulospinal reflexes (Andre et al., 1992). However, such effects on LC excitability have yet to be demonstrated in other species, which is an important caveat given the demonstrated species differences of the CNS AVP system (Tribollet et al., 1998). Finally, although the contribution of AVP in the stress response has been demonstrated in specific stress circuits (Herman and Tasker, 2016), the activation of the LC AVP system, during stress, has yet to be demonstrated. Here we provide the first demonstration of the molecular and physiological characteristics of AVP-receptor system within neurochemically defined cellular networks of the mouse LC. We also show that exposing mice to a single episode of stress dramatically alters the expression of the LC AVP receptor system, providing evidence for the direct interaction of two major homeostatic systems.

MATERIALS AND METHODS

All procedures involving animal experiments were approved by the Animal Welfare and Ethical Review Body of the University of Portsmouth and were performed by a personal license holder,

under a Home Office-issued project license, in accordance with the Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 (United Kingdom) and associated procedures.

Tissue Preparation for Immunohistochemistry

Adult male C57BL/6J, as well as V1a and V1b receptor specific gene-deleted (Tanoue et al., 2004; Koshimizu et al., 2006) mice, 2 months of age, were used to determine the native AVP and AVP receptor subtype expression patterns, according to a previously published protocol (Corteen et al., 2011). Briefly, under anesthesia, animals were perfused transcardially with 0.9% saline solution for 2 min, followed by 12 min fixation with a fixative consisting of 1% paraformaldehyde and 15% v/v saturated picric acid in 0.1 M phosphate buffer (PB), pH 7.4. The brains were post-fixed overnight at room temperature in the same perfusion fixative, sectioned with a vibratome and stored in 0.1 M PB and 0.05% sodium azide until further processing.

Immunohistochemistry

Non-specific binding of the secondary antibodies was minimized by incubating the sections in TBS-Tx containing 20% normal horse serum (S-2000, Vector Laboratories Inc.) for 2 h. Sections were incubated in a cocktail of primary antibodies overnight at 4°C (Supplementary Table S1). The next day, the sections were washed with TBS-Tx for 30 min after which they were incubated at room temperature in a cocktail of an appropriate mixture of secondary antibodies, conjugated with Alexa Fluor 488, indocarbocyanine (Cy3) and indocarbocyanine (Cy5), all provided by Jackson ImmunoResearch, for 2 h. The sections were washed in TBS-Tx for 30 min after which they were mounted on glass slides, air dried and coverslipped using Vectashield mounting medium (H-1000, Vector Laboratories Inc.).

Image Acquisition

Sections were examined with a confocal laser-scanning microscope (LSM710 or LSM 880; Zeiss, Oberkochen, Germany) using a Plan Apochromatic 63x DIC oil objective (NA 1.4, pixel size 0.13 μm). Z-stacks were used for routine evaluation of the labeling. All images presented represent a single optical section. These images were acquired using sequential acquisition of the different channels to avoid cross talk between fluorophores, with the pinholes adjusted to one Airy unit. Images were processed with the software Zen 2009 Light Edition (Zeiss, Oberkochen, Germany) and exported into Adobe Photoshop. Only brightness and contrast were adjusted for the whole frame, and no part of a frame was enhanced or modified in any way.

Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction (qPCR) Detection of V2 mRNA

For complete methods, please see Supplementary Information.

Whole Cell Patch Clamp Electrophysiology Recordings in Acute Brain Slices of the LC

Recordings were performed in juvenile (postnatal day 25–30) mice according to previously published protocols (Swinny et al., 2010). Briefly, animals were rapidly decapitated and the head placed in ice-cold oxygenated sucrose-cutting solution containing (mM): sucrose (234), KCl (2.5), NaH_2PO_4 (1.25), NaHCO_3 (26), dextrose (10), MgSO_4 (10), CaCl_2 (0.5). The brain was rapidly removed and blocked to isolate the brainstem region. The trimmed brain was affixed to a Vibratome equipped with a ceramic blade and submerged in ice cold oxygenated sucrose cutting solution. Horizontal 200 μm slices of the brainstem containing the LC were cut and placed in a holding vial containing extracellular solution (ECS) containing (mM): NaCl (126), KCl (2.95), NaH_2PO_4 (1.25), NaHCO_3 (26), dextrose (10), MgSO_4 (2), CaCl_2 (Sigma) for 1 h at 37°C, after which they were kept at room temperature, and transferred one at a time to the recording chamber.

A single slice was placed in the recording chamber and continuously superfused with ECS at 1 ml/min at 32°C. LC neurons were visualized using an Olympus B50 upright microscope fitted with a 40x water immersion objective, differential interference contrast and infrared filter. Recording pipettes were fashioned from borosilicate glass capillary tubing (1.2 mm o.d., 0.69 mm i.d.; Warner Instruments) using a Narishige PC-10 micropipette puller. Pipettes were filled with potassium gluconate intracellular solution containing: κ -Gluconate (70), KCl (70), HEPES (10), EGTA (10), MgCl_2 (2), CaCl_2 (1), ATP (2) (Maguire et al., 2014) and 0.1% biocytin (pH 7.3) to allow *post-hoc* identification of the cell.

A visualized cell was approached with the electrode, a G Ω seal established and the cell membrane ruptured to obtain a whole cell recording using a Multiclamp 700B amplifier (Molecular Devices, United States). Series resistance was monitored throughout the experiment. If the series resistance of the electrode was unstable or exceeded four times the electrode resistance, electrophysiological data from the cell were discarded. The main criteria for accepting a recording were an action potential amplitude of 65–70 mV, action potential shape characteristic of an LC neuron and membrane potential between –50 and –60 mV. If the cell retained a stable baseline and resistance and did not depolarize over time, the cell was retained for analysis. Signals were digitized by Digidata 1320-series analog-to-digital converter and stored online using pClamp 9 software (Molecular Devices). Only one cell per slice was recorded. The experimental protocol involved recording baseline cell characteristics in current clamp, including FR (Hz), input resistance [derived from the linear portion of a voltage–current plot of hyperpolarizing current steps (M Ω)], resting membrane potential (mV), membrane time constant (τ , ms), action potential amplitude (mV) and duration (ms) and AHP amplitude (mV), and AHP $t_{1/2}$ duration (measured from the peak of the AHP to half the amplitude of the AHP, in ms). After determining baseline characteristics, the drugs were bath-applied for at least 10 min after which the cell characteristics were measured

again. Data were analyzed with Clampfit software (Molecular Devices).

Following the recording, the pipette was gently retracted, the slice removed from the recording chamber and submerged in a vial containing 1% paraformaldehyde fixative overnight. Following washing in TBS-Tx buffer, the sections were then incubated with 20% normal horse serum for 1 h at room temperature, followed by incubation with an antibody against TH overnight at 4°C. Following further washing with TBS-Tx, the sections were incubated with a streptavidin conjugated to Alexa Fluor 488 secondary antibody (1:1000) (Molecular Probes, United States), in addition to an appropriate secondary antibody to visualize TH, for 2 h at room temperature. Sections were then imaged on a confocal microscope (Zeiss LSM 710) in order to confirm that the recorded cell was located within the LC and was immunopositive for TH.

Drugs

All chemicals for the recording solutions were obtained from Sigma. Desmopressin, [d(CH₂)₅1, Tyr(Me)₂, Arg₈]-Vasopressin and TASP 0390325 were obtained from Tocris, United Kingdom, and dissolved in ECS.

Acute Restraint Stress

A total of 10 (5 control and 5 stress) male mice, aged 2 months were used in this part of the study. The animals were placed in a rodent Plexiglas restrainer (Harvard Apparatus) for 60 min. The animals were then returned to their home cages for a further 60 min, after which they were killed, using the perfusion-fixation protocol above and the tissue used for quantitative immunohistochemistry.

Quantification of AVP and V1a-b Receptor Immunoreactivity in the LC of Tissue From Restraint Stress and Control Mice

One hour after the cessation of the stress period, animals were killed by perfusion fixation and the tissue prepared for semi-quantitative analyses of AVP and V1a-b receptor immunoreactivity as above. The quantitative method has been previously described (Gunn et al., 2013) and is detailed in **Supplementary Method**.

Statistical Analysis

All quantitative data are presented as the mean ± SEM. Statistical differences between means were assessed using GraphPad Prism software, with the names of statistical tests used indicated in the Results section. A *p*-value less than 0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

The overall aims of the project were to identify the AVP receptor subtypes expressed by LC neurons, the location of these receptors within the cellular networks of the LC, their contribution to

LC neuronal excitability and whether they are engaged by acute stress.

Verification of the Specificity of AVP Receptor Immunoreactivity

A key determinant of a direct AVP influence on LC function would be the presence, and subtype, of AVP receptors in this brain region. Since there is evidence for the expression of all AVP receptor subtypes in the brain, from the outset, we sought to identify whether specific AVP receptor subtypes are expressed on identified LC neurons. In tissue from wild type (WT) mice, V1a receptor immunoreactivity presented as individual clusters enriched on the somata and dendrites of LC noradrenergic neurons, identified by immunoreactivity for the NA synthesizing enzyme tyrosine hydroxylase (TH) (**Figure 1A1**). In tissue from V1a receptor knockout mice, no such specific V1a receptor labeling pattern was detectable, with most of the signal enriched in nuclei or scattered diffusely showing no clear association with any cellular profiles, thus confirming the specificity of the V1a antibody used (**Figure 1A2**). In WT tissue, immunoreactivity for the V1b receptor also presented as clustered signal on somatodendritic compartments of LC noradrenergic neurons. However, in contrast to V1a, signal for V1b appeared more widespread and was likely contained on LC non-noradrenergic neurons as well (**Figure 1B1**). This labeling pattern was absent in tissue from V1b receptor knockout mice, thus confirming the specificity of the V1b antibody used (**Figure 1B2**). No specific labeling for the V2 receptor was detectable in the LC (**Figures 1C1,C2**). We further verified the lack of V2 receptor expression in the LC, at the mRNA level, by performing quantitative RT-PCR on tissue from the LC and another tissue site known to express this receptor, namely the kidney (*N* = 5 mice). Whilst robust V2 receptor mRNA expression was detected in kidney samples, only negligible amounts were evident in LC samples (**Figure 1C3**). We therefore conclude that V1a-b receptors are the major subtypes expressed in the mouse LC.

The V1b Receptor Is Expressed by Noradrenergic and Non-noradrenergic Neurons of the LC in Close Proximity to Excitatory and Inhibitory Synapses

We first examined the expression profile of the V1b receptor as it appeared to be more widely distributed throughout the LC, compared to the V1a receptor, and is possibly associated with both noradrenergic and non-noradrenergic profiles (compare **Figures 1A1,B1**). We have shown that the LC is composed of not only noradrenergic neurons, but also a range of neurochemically diverse non-noradrenergic neurons (**Figure 2A1**) (Corteen et al., 2011). In order to gain an integrative perspective of the role of the AVP system within the cellular networks of the LC, we sought to characterize the location of the V1b receptor throughout LC circuitry. High resolution imaging revealed that V1b receptor immunoreactivity was enriched on the plasma membranes of LC neurons with significantly lower levels of signal located in their cytoplasmic compartments, characteristic of a metabotropic receptor (**Figure 2A2**). Signal

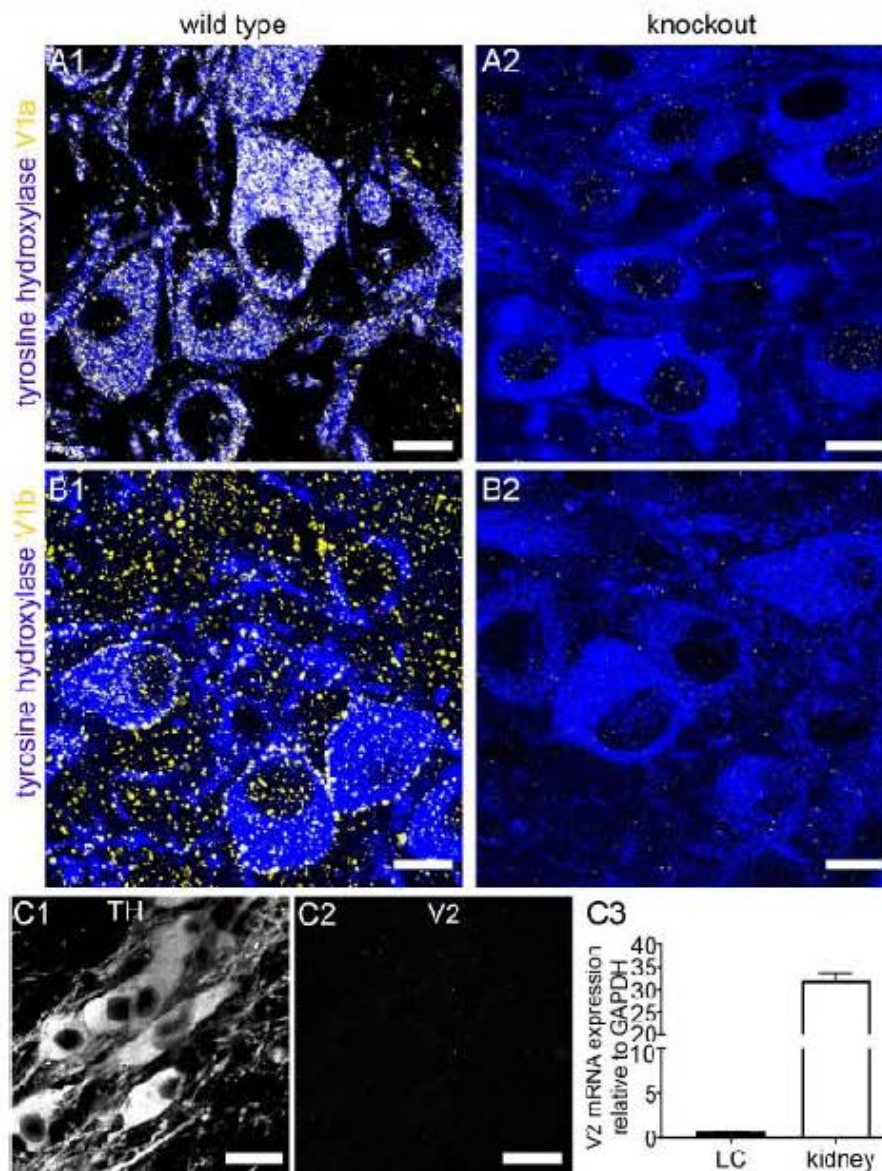


FIGURE 1 | Confirmation of the specificity of the V1a and V1b receptor antibody labeling in the LC. **(A1)** Shows immunoreactivity for tyrosine hydroxylase (TH) (blue) and the V1a receptor (yellow) in tissue from WT mouse. TH is the enzyme essential for noradrenaline synthesis and thus identifies the principal neurons of the LC. V1a signal is exclusively associated with TH-immunopositive profiles. **(A2)** Shows, immunoreactivity for TH (blue) and V1a receptor (yellow) in tissue from a V1a knock out mouse. Only weak, non-specific nuclear signal is evident confirming the specificity of the V1a antibody labeling pattern. **(B1)** Shows immunoreactivity for tyrosine hydroxylase (TH) (blue) and the V1b receptor (yellow) in tissue from WT mouse. V1b signal is associated with TH-immunopositive cells as well as areas not containing TH immunopositive profiles. **(B2)** Shows, immunoreactivity for TH (blue) and V1b receptor (yellow) in tissue from a V1b knock out mouse. Only weak, non-specific signal is evident confirming the specificity of the V1b antibody labeling pattern. **(C1)** Shows TH immunoreactivity. **(C2)** Shows, in the corresponding field of view, labeling for an antibody against the V2 receptor. No specific signal was detectable. **(C3)** Shows the expression of mRNA for the V2 receptor in tissue from the LC and the kidney which is known to express this receptor subtype. Whilst robust mRNA expression was detected in kidney, negligible expression was evident in LC samples. $N = 5$ animals, with the bars representing the means and the error bars, the SEM. Scale bars **(A,B)**, 10 μm ; **(C)** 20 μm .

was also located on the somata of non-noradrenergic LC neurons (Figure 2A3), identified by immunoreactivity for the pan-neuronal marker protein HuC (Okano and Darnell, 1997) (Figures 2A3,A4). In addition to somatic labeling, V1b receptor was also located on dendritic profiles, delineated by immunoreactivity for microtubule associated protein 2 (MAP2) (Figure 2B).

This clustered distribution of V1b receptor immunoreactivity across the surfaces of LC neurons overlapped with the locations of previously demonstrated GABAergic (Corteen et al., 2011) and glutamatergic (Seifi et al., 2014) inputs. Furthermore, since AVP has been shown to modulate synaptic transmission (Ostergaard et al., 2014), we investigated the proximity of V1b receptor-immunoreactive clusters to excitatory and

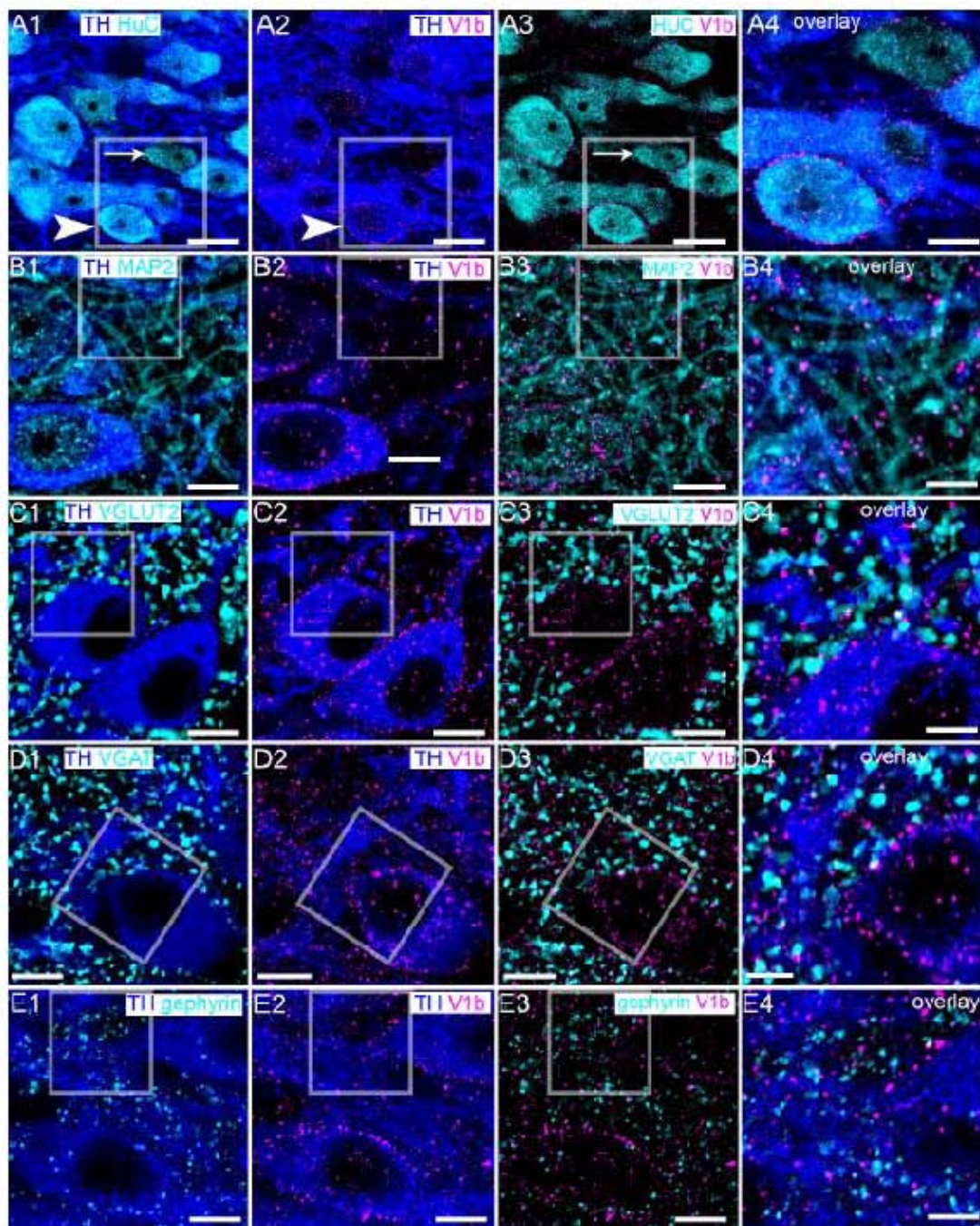


FIGURE 2 | V1b receptor is expressed on noradrenergic and non-noradrenergic LC neurons in close proximity to glutamatergic and GABAergic synapses. **(A1)** Shows immunoreactivity for TH (blue), a marker of noradrenergic neurons and HuC (cyan), a pan-neuronal marker. Thus, in this brain region, HuC identifies noradrenergic (arrowhead) and non-noradrenergic (arrow) neurons of the LC. **(A2)** Shows, in the same field of view, immunoreactivity for TH (blue) and V1b receptor (magenta), confirming its expression in LC noradrenergic neurons (arrowhead). V1b receptor signal presents as individual clusters concentrated on somatodendritic plasma membranes, typifying the expression pattern of a metabotropic receptor. **(A3)** shows, in the same field of view, immunoreactivity for V1b receptor (magenta) and HuC (cyan), confirming V1b receptor expression in LC non-noradrenergic neurons as well (arrow). **(A4)** is an overlay and magnified view of the boxed area in **(A1–A3)**. **(B1)** Shows immunoreactivity for TH (blue), and microtubule associated protein 2 (MAP2) (cyan), a protein enriched in dendrites. **(B2)** shows, in the same field of view, immunoreactivity for TH (blue) and V1b receptor (magenta), which confirms V1b expression on dendritic compartments. **(B3)** Shows, in the same field of view, the association of immunoreactivity for V1b (magenta) with MAP2 (cyan), confirming V1b expression in dendritic compartments as well. **(B4)** is an overlay and magnified view of the boxed area in **(B1–B3)**. **(C1)** Shows immunoreactivity for TH (blue), and vesicular glutamate transporter 2 (VGLUT2) (cyan), a protein enriched in glutamatergic axon terminals and used here to identify presynaptic domains of excitatory synapses. **(C2)** Shows, in the same field of view, immunoreactivity for TH (blue) and V1b receptor (magenta). **(C3)** Shows, in the same field of view, the association of immunoreactivity for V1b receptor (magenta) with VGLUT2 (cyan). The

(Continued)

FIGURE 2 | Continued

close association suggests that the V1b receptor in LC neurons is expressed in close proximity to excitatory synapses. **(C4)** is an overlay and magnified view of the boxed area in **(C1–C3)**. **(D1)** Shows immunoreactivity for TH (blue) and vesicular GABA transporter (VGAT) (cyan), a protein enriched in GABAergic and glycinergic axon terminals and used here to identify presynaptic domains of inhibitory synapses. **(D2)** Shows, in the same field of view, immunoreactivity for TH (blue) and V1b (magenta). **(D3)** Shows, in the same field of view, the association of immunoreactivity for V1b (magenta) with VGAT (cyan). The close association suggests that V1b on LC neurons is expressed in close proximity to inhibitory synapses as well. **(D4)** is an overlay and magnified view of the boxed area in **(D1–D3)**. **(E1)** Shows immunoreactivity for TH (blue), and gephyrin (cyan), a protein that anchors GABA_A and glycine receptors in inhibitory synapses and used here to identify postsynaptic domains of inhibitory synapses. **(E2)** Shows, in the same field of view, immunoreactivity for TH (blue) and V1b (magenta). **(E3)** Shows, in the same field of view, the association of immunoreactivity for V1b (magenta) with gephyrin (cyan). There is sparse colocalization of clusters immunoreactive for V1b and gephyrin suggesting a limited incorporation of V1b in inhibitory postsynaptic domains, with the receptors located most likely on perisynaptic compartments. **(E4)** is an overlay and magnified view of the boxed area in **(E1–E3)**. Scale bars **(A1–A3)** 20 μm ; **(A4,B–D1–D3)** 10 μm ; **(B–D4)** 5 μm .

inhibitory synaptic marker proteins. Clusters immunoreactive for the vesicular glutamate transporter 2 (VGLUT2) contacted the somatic and dendritic surfaces of TH-immunopositive neurons, thereby identifying glutamate release sites on these neurons (Figure 2C1). Evaluation of immunoreactivity for VGLUT2 alongside the V1b receptor revealed a proportion of closely apposed clusters for either molecule, suggesting that a proportion of V1b receptors function in proximity to glutamatergic synapses (Figures 2C2,C3). However, there was also a notable proportion of V1b receptor-immunoreactive clusters located on cell surfaces which were devoid of VGLUT2-immunoreactive contacts (Figures 2C3,C4). Immunoreactivity for the vesicular GABA transporter (VGAT) was used to identify the domains of inhibitory synaptic inputs. VGAT signal was widely distributed across the somatodendritic surfaces of LC neurons (Figure 2D1). In a similar manner, a proportion of V1b receptor immunoreactive clusters were adjacent to clusters immunoreactive for VGAT, although some, particularly those on somatic membranes were not associated with VGAT signal (Figures 2D2–D4). Since VGAT and VGLUT2 identify presynaptic compartments, we used gephyrin, a protein that anchors GABA_A and glycine receptors in the postsynaptic compartments of inhibitory synapses, in order to assess any enrichment of the V1b receptor in postsynaptic junctions. A relatively sparse association of V1b and gephyrin immunoreactivity was evident (Figure 2E). However, at the light microscopical level, it is not possible to determine the precise location of these receptors, or other proteins, in proximity to presynaptic, postsynaptic, perisynaptic or extrasynaptic compartments. Therefore, further ultrastructural analyses, using immunohistochemistry and transmission electron microscopy is required to unequivocally determine the location of these receptors in proximity to synaptic junctions.

V1b Receptor Activation Has Contrasting Effects on the Spontaneous Firing of LC Noradrenergic Neurons

Given the close proximity of V1b receptor signal to synaptic inputs, we next investigated whether the pharmacological activation of V1b receptors alters the spontaneous excitability of identified LC neurons by using whole cell patch clamp electrophysiology in acute brain slices containing the LC. In light of the LC consisting of noradrenergic and non-noradrenergic neurons, all cells were loaded with biocytin during the recording

in order to verify their location within the LC and their neurochemical identity. Only cells positively identified as TH-immunopositive and located within the LC core, were included in the analyses (Figure 3A). The spontaneous firing rates (FR) of the recorded neurons were indistinguishable from previously published studies, with the mean \pm SEM FR of 1.7 ± 0.1 Hz, ranging from 0.2 Hz to 3.2 Hz, $N = 50$ cells from 15 animals (Supplementary Tables S2–S7). The associated membrane properties of the neurons are also detailed in Supplementary Tables S2–S7. It was noticeable from the outset that V1b receptor activation, by applying the synthetic vasopressin analog desmopressin (200 μM), which acts as an agonist at V1b and V2 receptors, either increased, or decreased the spontaneous FRs of LC neurons. We therefore categorized the recorded neurons into groups which exhibited either an increase or decrease in their activity in response to the drug. Desmopressin significantly increased the FR of LC neurons from 1.7 ± 0.3 Hz to 2.9 ± 0.3 Hz, $p = 0.01$, paired Student's *t*-test; $N = 9$ cells (Figures 3B1,B2). Desmopressin also significantly decreased the afterhyperpolarization (AHP) time constant from 65 ± 6 ms to 53 ± 5 ms, $p = 0.005$, paired Student's *t*-test; $N = 8$ cells (Figure 3B3). There were no significant differences in any other cell characteristics following the application of desmopressin (Supplementary Table S2). In a separate cohort of cells, recorded under identical conditions, desmopressin significantly decreased the FR of LC neurons from 1.4 ± 0.3 Hz to 0.9 ± 0.2 Hz, $p = 0.02$, paired Student's *t*-test; $N = 11$ cells (Figures 3C1,C2). In this group of cells, desmopressin also significantly decreased the action potential amplitude (69 ± 1.8 mV to 45.5 ± 9.3 mV, $p = 0.02$, paired Student's *t*-test; $N = 11$ cells, Figure 3C1) and increased the AHP time constant from 67 ± 8 ms to 167 ± 44 ms, $p = 0.03$, paired Student's *t*-test; $N = 11$ cells (Figure 3C3). In this group of cells, there were no significant differences in any other cell characteristics following the application of desmopressin (Supplementary Table S2). Thus, the activation of V1b receptors bi-directionally modulates the excitability of LC neurons.

We then explored whether locally released AVP contributes to the basal FR of LC neurons by recording the FR of LC neurons following the blockade of V1b receptors in the presence of the V1b receptor selective antagonist TASP 0390325 (Iijima et al., 2014). In a similar trend to desmopressin, TASP 0390325, 20 nM, either increased (2.2 ± 0.1 Hz to 3.2 ± 0.3 Hz, $p = 0.01$, paired Student's *t*-test, $N = 8$ cells, Figures 3D1,D2) or decreased (1.7 ± 0.2 Hz to 1.3 ± 0.3 Hz, $p = 0.03$, paired Student's *t*-test, $N = 6$ cells, Figures 3E1,E2) the spontaneous FR of neurons.

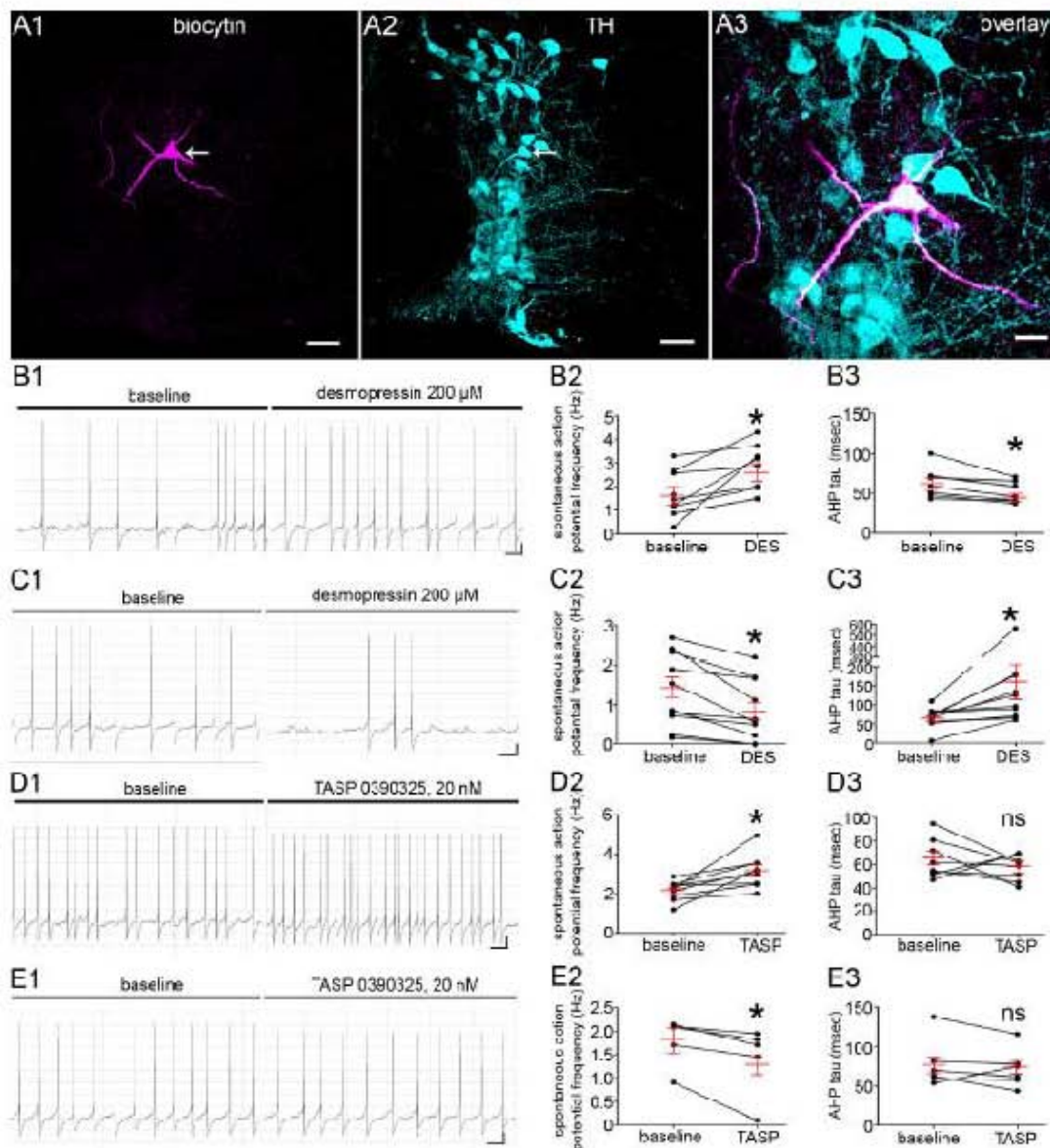


FIGURE 3 | V1b receptor modulation directly alters LC noradrenergic neuronal activity. **(A)** *Post hoc* microscopical confirmation of the molecular identity and location of recorded neurons. **(A1)** Shows immunoreactivity for biocytin which was originally contained within the intracellular solution used for recording the neuron in the whole-cell configuration. Note that immunoreactivity is located exclusively within the single neuron (arrow). **(A2)** Shows immunoreactivity for TH within the same field of view as **(A1)**, confirming that the recording was from the LC, with the arrow highlighting the recorded cell. **(A3)** is an overlay and magnified view of the cell in **(A1,A2)** confirming that the recorded cell is TH immunopositive and thus a noradrenergic LC neuron. **(B1)** Representative traces of the spontaneous firing pattern of an LC neuron before and after the application of the V1b receptor agonist desmopressin 200 μ M, from a cohort of neurons that responded with a significant increase in the frequency of spontaneous action potentials. **(B2)** Quantification of the spontaneous firing rates (Hz) of LC neurons before and after the application of desmopressin (DES). **(B3)** Quantification of the after hyperpolarization time constant (msec) of LC neurons before and after the application of desmopressin. **(C1)** Representative traces of the spontaneous firing pattern of an LC neuron before and after the application of the V1b receptor agonist desmopressin 200 μ M, from a cohort of neurons that responded with a significant decrease in the frequency of spontaneous action potentials. **(C2)** Quantification of the spontaneous firing rates (Hz) of LC neurons before and after the application of desmopressin. **(C3)** Quantification of the after hyperpolarization time constant (msec) of LC neurons before and after the application of desmopressin. **(D1)** Representative traces of the spontaneous firing pattern of an LC neuron before and after the application of the V1b receptor antagonist TASP 0390325, 20 nM, from a cohort of neurons that responded with a significant increase in the frequency of spontaneous action potentials. **(D2)** Quantification of the spontaneous firing rates (Hz) of LC neurons before and after the application of TASP 0390325. **(D3)** Quantification of the afterhyperpolarization time constant (msec) of LC neurons before and after the application of TASP 0390325. **(E1)** Representative traces of the spontaneous firing pattern of an LC neuron before and after the application of the V1b antagonist TASP 0390325, 20 nM, from a cohort of neurons that responded with a significant decrease in the frequency of spontaneous action potentials. **(E2)** Quantification of the spontaneous firing rates (Hz) of LC neurons before and after the application of TASP 0390325. **(E3)** Quantification of the afterhyperpolarization time constant (msec) of LC neurons before and after the application of TASP 0390325. For graphs in **(B–E)**, the dots represent the values for individual cells, the long red bars represents the mean for all cells within that group, and the short red bars represent the SEM. * $p < 0.05$, paired Student's *t*-test. Scale bars **(A1,A2)** 50 μ m; **(A3)** 20 μ m; **(B1,C1,D1,E1)** horizontal bar 1 s, vertical bar 10 mV.

However, in contrast to desmopressin, TASP 0390325 did not significantly alter the AHP time constant either in those cells that showed an increased (65 ± 6 ms to 58 ± 4 , $p = 0.3442$, paired Student's *t*-test; $N = 8$ cells, Figure 3D3) or decreased FR (78 ± 13 ms to 72 ± 10 ms, $p = 0.3442$, paired Student's *t*-test; $N = 6$ cells, Figure 3E3). This provides evidence that endogenous AVP and V1b receptor activation contributes to the basal level of LC activity.

The V1a Receptor Is Expressed Exclusively by Noradrenergic Neurons of the LC

In contrast to the V1b receptor, V1a receptor immunoreactivity was restricted to LC TH-immunopositive neurons, both on somatic (Figure 4A) and dendritic (Figure 4B) compartments, with TH immunonegative cell, identified by HUC immunoreactivity devoid of any TH signal. In common with the V1b receptor, clusters immunoreactive for V1a were also located, on occasion, in proximity to puncta immunoreactive for VGLUT2 (Figure 4C) and VGAT (Figure 4D).

V1a Receptor Blockade Has Contrasting Effects on the Spontaneous Firing of LC Noradrenergic Neurons

In a similar trend to the V1b receptor, blockade of the V1a receptor with the antagonist [(d(CH₂)₅1, Tyr(Me)₂, Arg₈)-Vasopressin, 30 nM] ($n = 16$) also had contrasting effects on LC FR. Indeed, 62% of the cells responded with an increase in their FR (1.6 ± 0.2 Hz to 2.1 ± 0.3 Hz; $p = 0.0016$, paired Student's *t*-test, $N = 8$ cells, Figures 5A1,A2). However, in contrast to the effects of the V1b antagonist, V1a blockade did result in a significant decrease in AHP of the neurons (73 ± 9 ms to 60 ± 6 , $p = 0.0185$, paired Student's *t*-test; $N = 8$ cells, Figure 5A3). The remaining cells responded with a decrease in their FR (2.0 ± 0.2 Hz to 1.4 ± 0.2 Hz; $p = 0.0172$, paired Student's *t*-test, $N = 6$ cells, Figures 5B1,B2). However, in these subset of cells, there were no significant differences between the AHP (61 ± 4 ms to 69 ± 10 , $p = 0.5117$, paired Student's *t*-test; $N = 6$ cells, Figure 5B3). This provides evidence that endogenous AVP and V1a-b receptors contributes to the basal level of LC activity. These data are summarized in Supplementary Tables S6, S7.

AVP-Containing Axons Contact Noradrenergic and Non-noradrenergic Neurons of the LC in Close Proximity to Excitatory and Inhibitory Synapses

The V1a-b antagonist data above provide evidence that AVP within the LC regulates the basal levels of neuronal activity. This could identify a novel pathway that modulates behavioral states associated with changes in both AVP production (Caldwell et al., 2017), and LC neuronal activity (McCall et al., 2015), such as psychosocial stress. For native AVP to exert a significant control over LC-mediated brain functions, there would need to be a considerable distribution of afferents containing this neurohormone throughout the LC. Since previous reports

provide only low resolution images of AVP-immunoreactive profiles within the region of the pons occupied by the LC (Rood and De Vries, 2011), we undertook a high resolution characterization of the native association of AVP-containing profiles with identified LC neurons.

The specificity of the LC AVP labeling pattern was replicated using two different AVP antibodies, and the paraventricular nucleus (PVN) as a positive control brain region. Both antibodies provided a pattern of immunoreactivity within the PVN that was consistent with previously published reports (Zhang and Hernandez, 2013) (Figure 6A). However, antibody AC39363 produced a superior signal to noise ratio and was therefore used for remainder of the study. Within the LC, AVP immunoreactivity presented as a mixture of varicose plexuses and individual clusters contacting LC neurons (Figures 6B,C). Importantly, AVP immunoreactivity was distributed through the entire extent of the LC, both within the nuclear core, as well as in the pericoeruleur dendritic region (Figures 6B,C). We found no evidence of specific AVP-immunoreactive neurons within the LC.

Upon close inspection, AVP immunoreactive varicosities contacted both noradrenergic (Figures 7A1,A2) and non-noradrenergic (Figures 7A3,A4) neurons of the LC. In addition to this association with somatic compartments, AVP-immunoreactive varicosities also contacted dendritic profiles (Figure 7B), thus closely mirroring the distribution of V1a-b receptors in this brain region. Unfortunately, both antibodies for AVP and V1a-b receptors were raised in the same species, thus precluding co association studies. Nevertheless, we evaluated the association of AVP immunoreactivity alongside the synaptic marker proteins used for the V1a-b receptors receptor analyses, in an attempt to extrapolate the degree of coherence for their respective locations within these neurons. AVP-immunoreactive profiles were strongly associated with VGLUT2 immunopositive clusters (Figure 7C). However, AVP immunoreactivity showed relatively less association with the inhibitory synaptic markers proteins VGAT (Figure 7D) and gephyrin (Figure 7E). Thus, AVP-immunoreactive axonal profiles are distributed throughout the LC, suggesting a pool of this neurohormone that has the potential to impact on LC neurons.

AVP-Immunoreactive Profiles Show Sparse Association With Other LC Neuromodulatory Afferent Pathways

It is currently unclear whether LC AVP-immunopositive fibers contain other neuropeptides known to provide modulatory input to this nucleus. We therefore assessed the degree of colocalization between AVP-immunoreactive profiles and varicosities immunopositive for the predominant neuropeptides that have been shown to directly contact LC neurons and alter their excitability, namely substance P (Guyenet and Aghajanian, 1979; Pickel et al., 1979), enkephalin (Valentino and Wehby, 1989; Van Bockstaele et al., 1995), orexin A (Hagan et al., 1999; Horvath et al., 1999), and CRH (Valentino et al., 1983; Van Bockstaele et al., 1996). Only subsets of AVP-immunoreactive varicosities showed colocalization with substance P-immunopositive puncta with the vast majority

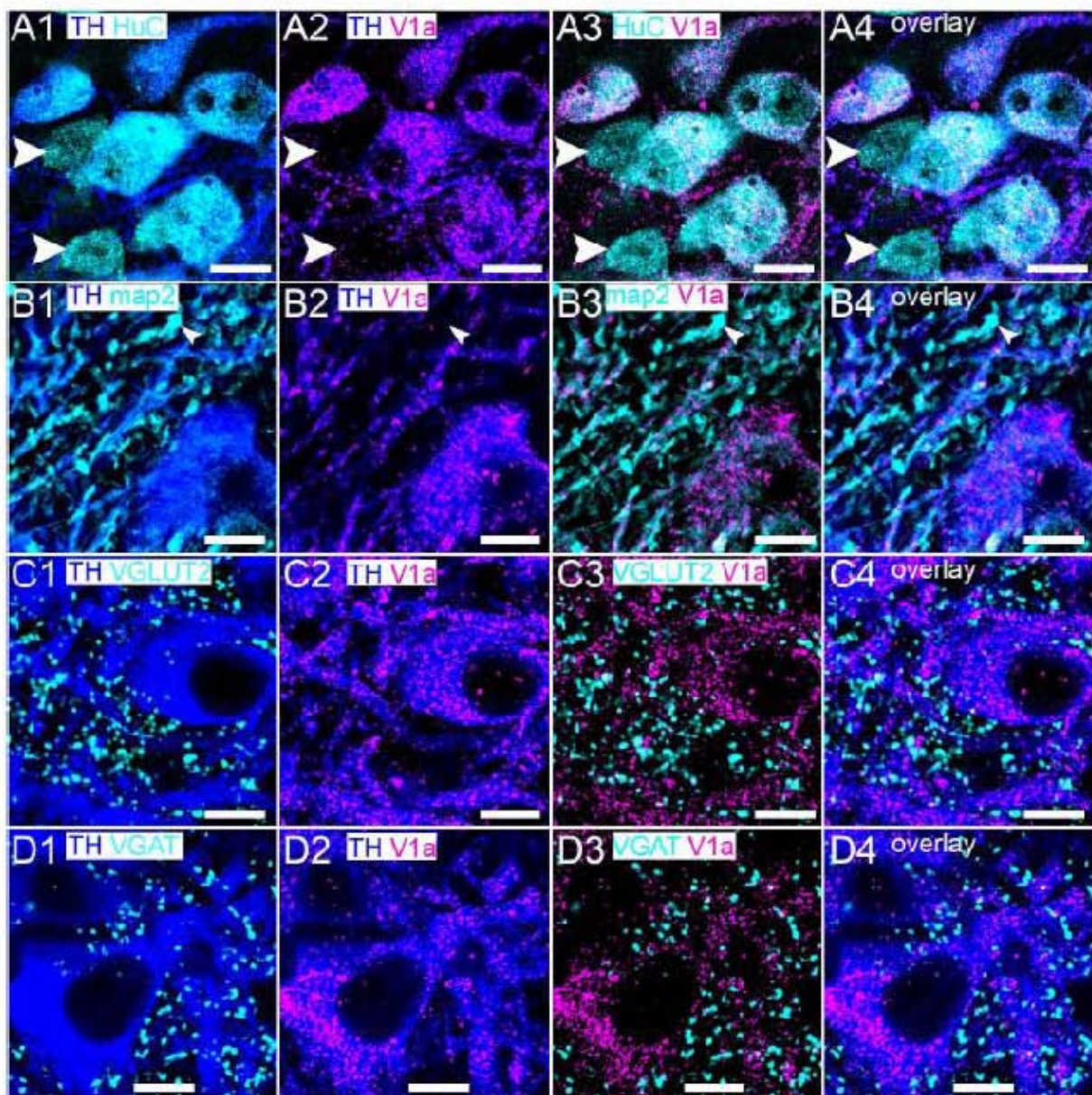


FIGURE 4 | Within the LC, the V1a receptor is expressed exclusively on noradrenergic neurons: **(A1)** Shows immunoreactivity for TH (blue) and HuC (cyan), with the arrowheads highlighting non-noradrenergic neurons of the LC. **(A2)** Shows, in the same field of view, immunoreactivity for TH (blue) and V1a receptor (magenta), confirming that its expression, within the LC, is restricted to noradrenergic neurons and **(A3)** is not located on non-noradrenergic neurons (arrowheads). **(A4)** is an overlay of **(A1–A3)**. **(B1)** Shows immunoreactivity for TH (blue) and MAP2 (cyan) with the arrowhead highlighting a non-noradrenergic dendritic profile. **(B2)** shows, in the same field of view, immunoreactivity for TH (blue) and V1a receptor (magenta), which confirms V1a expression on noradrenergic profiles and **(B3)** not on non-noradrenergic profiles (arrowhead). **(B4)** is an overlay of **(B1–B3)**. **(C)** and **(D)** show the association of V1a immunoreactivity with VGLUT2 and VGAT labeling respectively. Scale bars **(A)** 15 μm ; **(B–D)** 10 μm .

appearing mutually exclusive (Figure 8A). There was no detectable association between profiles immunoreactive for AVP and enkephalin (Figure 8B), orexin A (Figure 8C), and CRH (Figure 8D). An obvious caveat is that whilst AVP and these other neuropeptides may be contained in the same axons, they may not necessarily be located within the same regions of the axon, thus precluding the confirmation of their co-expression using colocalization analysis. Nevertheless, the data suggests

that AVP containing afferents could represent a distinct axonal pathway within the LC.

Acute Stress Engages the LC-AVP System

A key contribution of the LC to brain function is the modulation of behavior that allows for adaptation to psychosocial stress

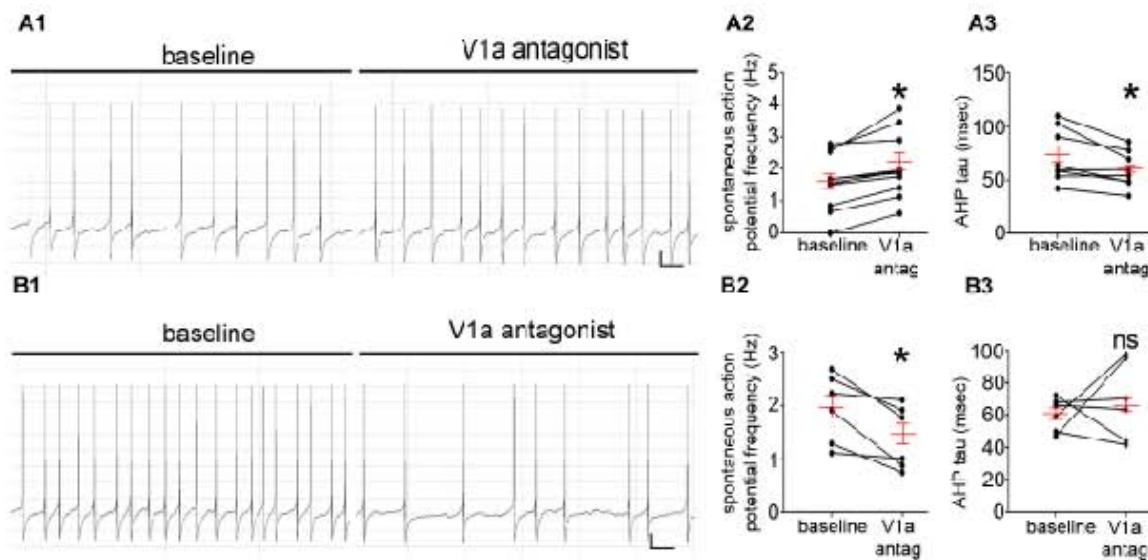


FIGURE 5 | V1a receptor modulation directly alters LC noradrenergic neuronal activity. **(A1)** Representative traces of the spontaneous firing patterns of an LC neuron before and after the application of the V1a receptor antagonists: [d(CH₂)51, Tyr(Me)₂, Arg³]-Vasopressin, 30 nM, from a cohort of neurons that responded with a significant increase in the frequency of spontaneous action potentials. **(A2)** Quantification of the spontaneous firing rates (Hz) of LC neurons before and after the application of the V1a receptor antagonist. **(A3)** Quantification of the afterhyperpolarization time constant (msec) of LC neurons before and after the application of the V1a receptor antagonist. **(B1)** Representative traces of the spontaneous firing patterns of an LC neuron before and after the application of the V1a receptor antagonist, from a cohort of neurons that responded with a significant decrease in the frequency of spontaneous action potentials. **(B2)** Quantification of the spontaneous firing rates (Hz) of LC neurons before and after the application of the V1a receptor antagonist. **(B3)** Quantification of the afterhyperpolarization time constant (msec) of LC neurons before and after the application of the V1a receptor antagonist. In the graphs, the dots represent the values for individual cells, the long red bars represent the mean for all cells within that group, and the short red bars represent the SEM. **p* < 0.05, paired Student's *t*-test. Scale bars **(A1,B1)** horizontal bar 1 s, vertical bar 10 mV.

(Valentino and Van Bockstaele, 2008). The neurohormone corticotrophin releasing hormone (CRH) (Vale et al., 1981), released from afferents originating from the amygdala (Van Bockstaele et al., 2001), is the primary driver of the increased activity of LC neurons that underlies this behavioral response (Valentino et al., 1983; McCall et al., 2015). However, AVP is also released, together with CRH, from the hypothalamus, as part of the hypothalamic-pituitary-adrenal stress axis (O'Connor et al., 2000). Given the evidence that both AVP and CRH are contained in afferents that target LC neurons and both have now been shown to alter LC neuronal activity (this study for AVP), we explored whether acute stress engages the LC-AVP system following exposure to 1 h of restraint stress (Buynitsky and Mostofsky, 2009).

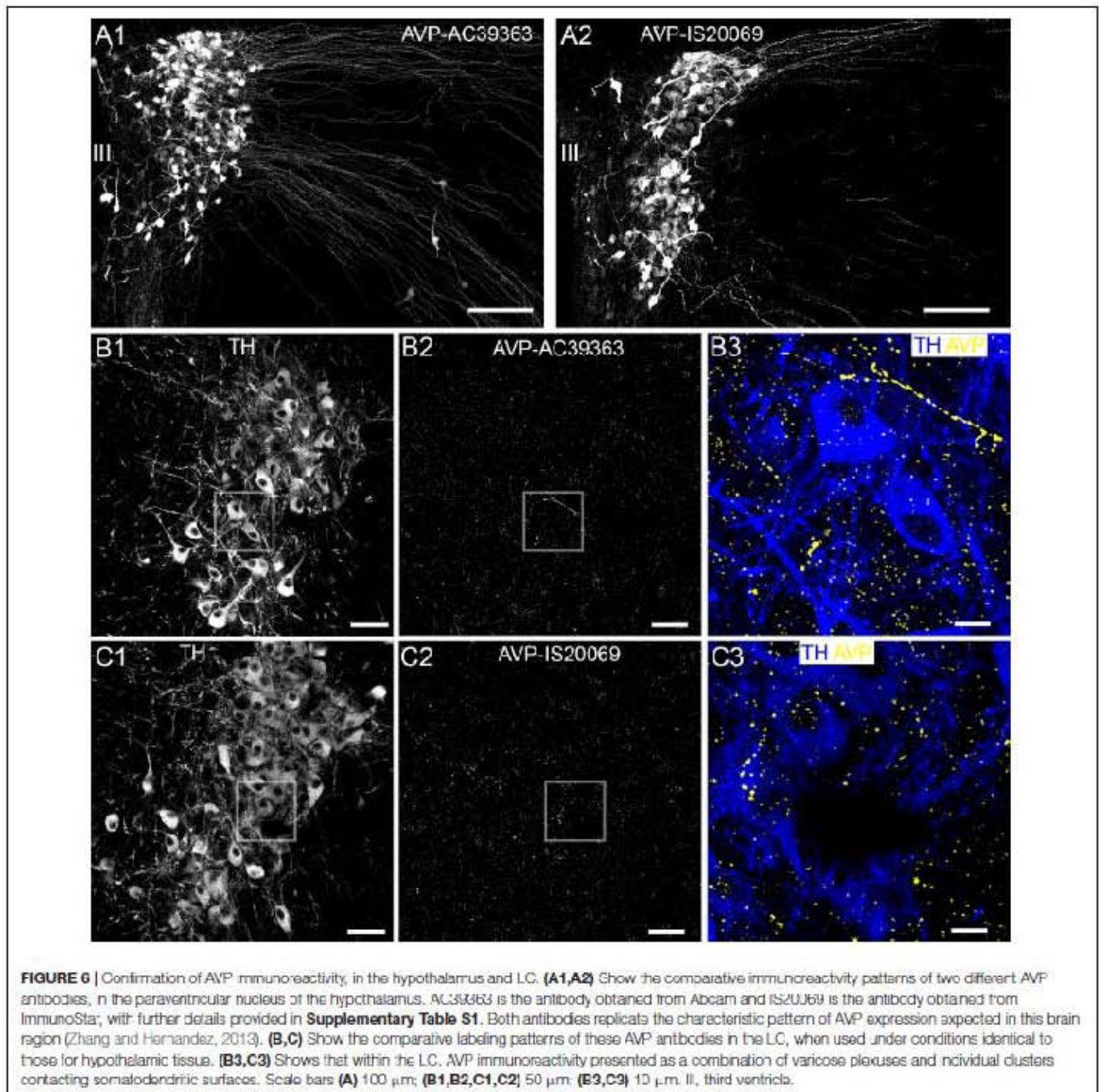
The intensity and pattern of V1a receptor immunoreactivity was indistinguishable in tissue from control and stress animals, processed and imaged under identical conditions (Figure 9A). Semi-quantitative analysis of the density (number of clusters per area) of V1a receptor immunoreactive clusters revealed no significant differences between control and stress subjects (control: 5782 ± 409 clusters per $100 \mu\text{m}^2$ versus stress: 4844 ± 753 clusters per $100 \mu\text{m}^2$; *p* = 0.3054, unpaired Student's *t*-test, *N* = 5 animals).

In contrast, we detected a significant increase in the number of V1b receptor immunoreactive clusters, especially within cytoplasmic domains (Figure 9B). Semi-quantitative analysis of the density (number of clusters per area) of V1b receptor

immunoreactive clusters revealed a significant increase in tissue in stress subjects (control: 945 ± 173 clusters per $100 \mu\text{m}^2$ versus stress: 4462 ± 307 clusters per $100 \mu\text{m}^2$; *p* < 0.0001 unpaired Student's *t*-test, *N* = 5 animals). This dramatic stress-induced alteration in V1b receptor immunoreactivity was accompanied by a change in the AVP immunoreactivity pattern. In tissue from control animals, AVP immunoreactivity presented as a mixture of varicose plexuses and individual clusters throughout the LC (Figures 9C1–C3). However, in tissue from stress subjects, processed and imaged under conditions identical to control, there was a noticeable decrease in the intensity of AVP immunoreactivity within the LC, with a relative lack of varicose plexuses (Figures 9C4–C6). Because AVP signal presented as a mixture of varicose plexuses and individual clusters, we performed the semi-quantitative analysis using fluorescence intensity which will incorporate both patterns of signal. Stress induced a moderate, though statistically significant decrease in the AVP fluorescence intensity [control: 35 ± 2 arbitrary units (AU) versus stress: 27 ± 2 AU, *p* = 0.04, unpaired Student's *t*-test, *N* = 5 animals]. This suggests that stress engages the LC AVP-receptor system.

DISCUSSION

The current study provides the first demonstration of the association of AVP-immunopositive axons with identified



noradrenergic and non-noradrenergic neurons of the LC. These AVP-containing axons showed only a sparse association with another neuropeptide afferent system within this brain region, namely substance P. This suggests that AVP input to the LC represents a pathway distinct to the myriad of neuropeptide systems that modulate information transfer to this nucleus. Furthermore, we identify the specific AVP receptors within the LC, by localizing the V1a and V1b receptors to the somatodendritic surfaces of these different LC cell types. The modulation of both receptor subtypes induced heterogeneity in the excitability of LC noradrenergic

neurons, manifesting as either an increase or decrease in their spontaneous FR. Given the strong association between LC FR and the level of NA release, this suggests that this individual neurohormone is capable of both increasing and diminishing CNS NA levels. Finally, we provide evidence that exposing mice to a form of stress which generally induces adaptive behavioral and physiological responses, results in molecular plasticity in the AVP-receptor system. This potentially identifies AVP as an integral component of the molecular machinery utilized in LC-mediated homeostatic responses.

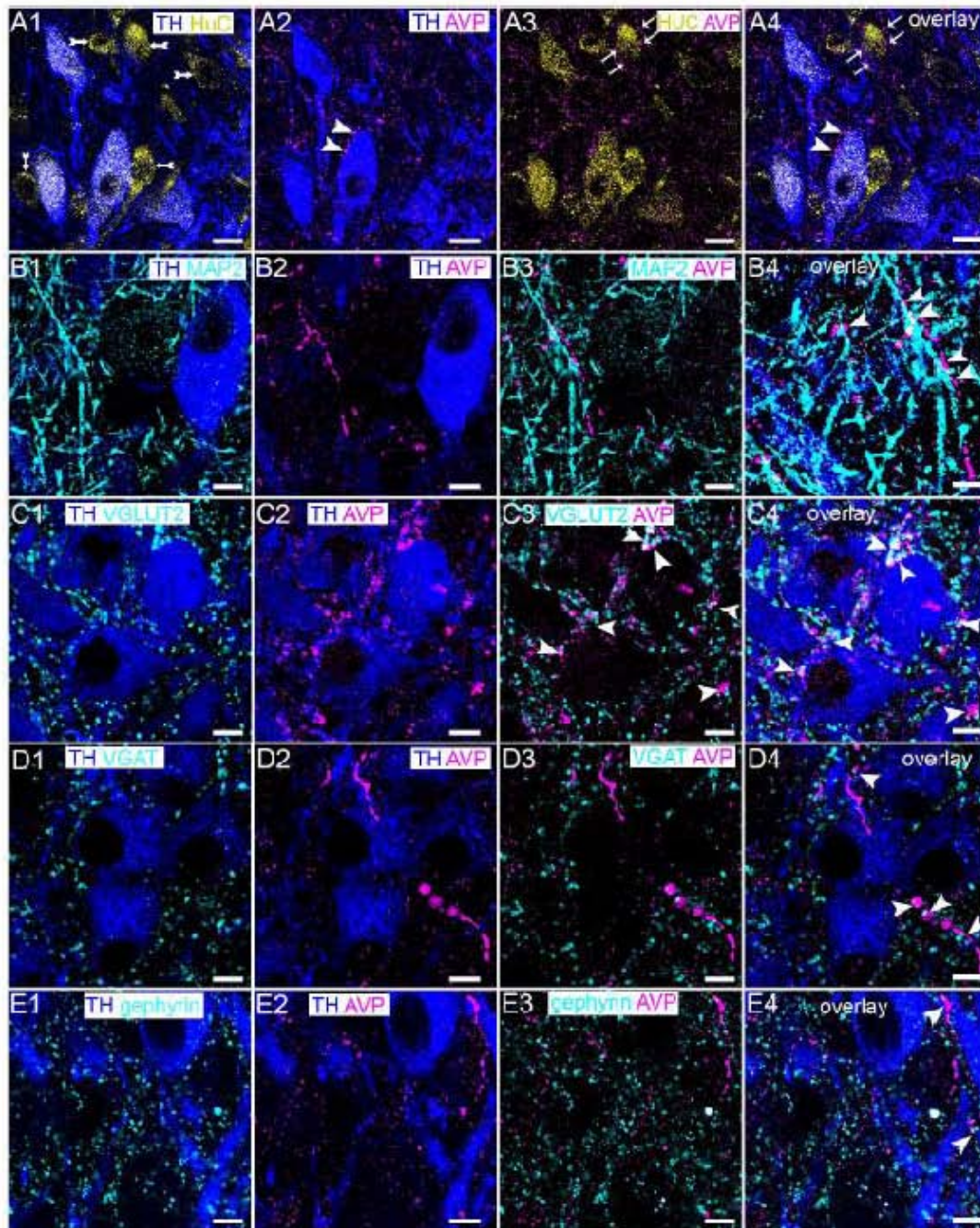


FIGURE 7 | Native AVP-containing axonal profiles contact both noradrenergic and non-noradrenergic LC neurons in close proximity to glutamatergic and GABAergic synapses. **(A1)** Shows immunoreactivity for TH (blue) and HuC (yellow), indicating the distribution of noradrenergic and non-noradrenergic neurons (double arrow). **(A2)** shows, in the same field of view, immunoreactivity for TH (blue) and AVP (magenta) immunoreactive profiles contacting LC noradrenergic neurons (arrowhead). **(A3)** Shows, in the same field of view, immunoreactivity for AVP (magenta) and HuC (yellow), confirming the association of AVP with LC non-noradrenergic neurons as well (arrows). **(A4)** is an overlay of **(A1–A3)**. **(B1)** Shows immunoreactivity for TH (blue), and MAP2 (cyan). **(B2)** Shows, in the same field of view, immunoreactivity for TH (blue) and AVP (magenta). **(B3)** Shows, in the same field of view, the association of immunoreactivity for AVP (magenta) with MAP2 (cyan). Note the close apposition of the AVP-immunopositive varicosity with the dendritic profile (arrowheads). **(B4)** is an overlay of **(B1–B3)**. **(C1)** Shows immunoreactivity for TH (blue), and VGLUT2 (cyan). **(C2)** Shows, in the same field of view, immunoreactivity for TH (blue) and AVP (magenta). **(C3)** Shows, in the same field of view, the strong association of immunoreactivity for AVP (magenta) with VGLUT2 (cyan) (arrowheads). **(C4)** is an overlay of **(C1–C3)**. **(D1)** Shows immunoreactivity for TH (blue), and VGAT (cyan). **(D2)** Shows, in the same field of view, immunoreactivity for TH (blue) and AVP (magenta). **(D3)** Shows, in the same field of view, the association of immunoreactivity for AVP (magenta) with a few VGAT-immunopositive clusters (cyan). **(D4)** is an overlay of **(D1–D3)**. **(E1)** Shows immunoreactivity for TH (blue), and gephyrin (cyan). **(E2)** Shows, in the same field of view, immunoreactivity for TH (blue) and AVP (magenta). **(E3)** Shows, in the same field of view, the relatively sparse association of immunoreactivity for AVP (magenta) with gephyrin (cyan). **(E4)** is an overlay of **(E1–E3)**. Scale bars **(A)** 15 μm ; **(B–E)** 10 μm .

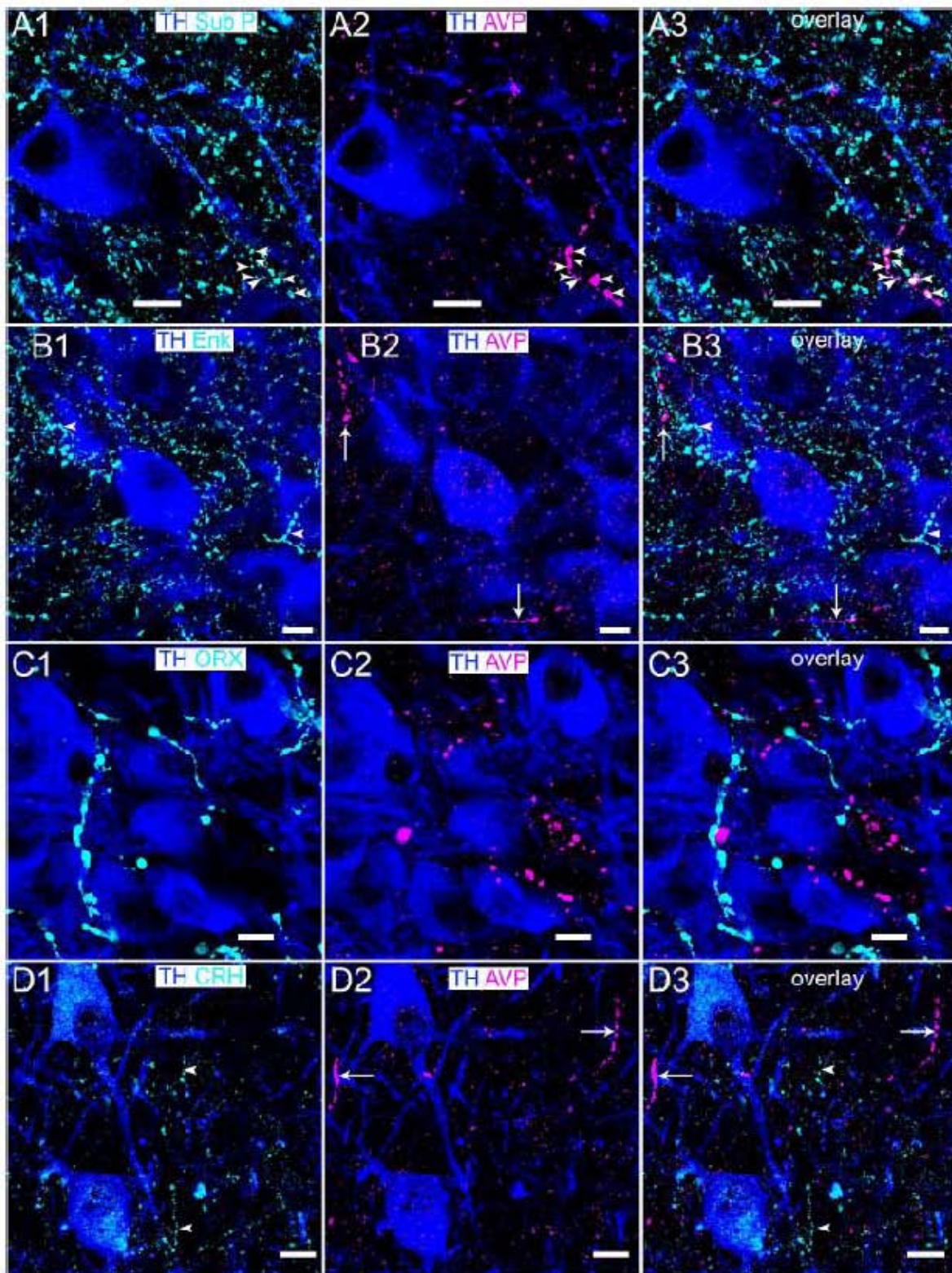


FIGURE 8 | Association of AVP with LC neuromodulatory afferent systems. **(A1)** Immunoreactivity for TH (blue) and substance P (Sub P) (cyan). In the same field of view, **(A2)** immunoreactivity of TH with AVP. **(A3)** Is an overlay of **(A1,A2)** showing isolated instances of colocalization of immunoreactivity for substance P and AVP (arrowheads). Immunoreactivity for TH with **(B1)** enkephalin (ENK), **(C1)** orexin A (ORX) and **(D1)** CRH, with arrowheads highlighting a subset of varicosities in **(B1,D1)**. **(B2,C2,D2)** Show immunoreactivity of TH with AVP in the corresponding fields of view, with AVP immunopositive varicosities highlighted by arrows in **(B2,D2)**. **(B3,C3,D3)** Are overlays of **(B,C,D1,D2)** showing the lack of colocalization of AVP signal with that of the corresponding neuropeptides. Scale bars 10 μ m.

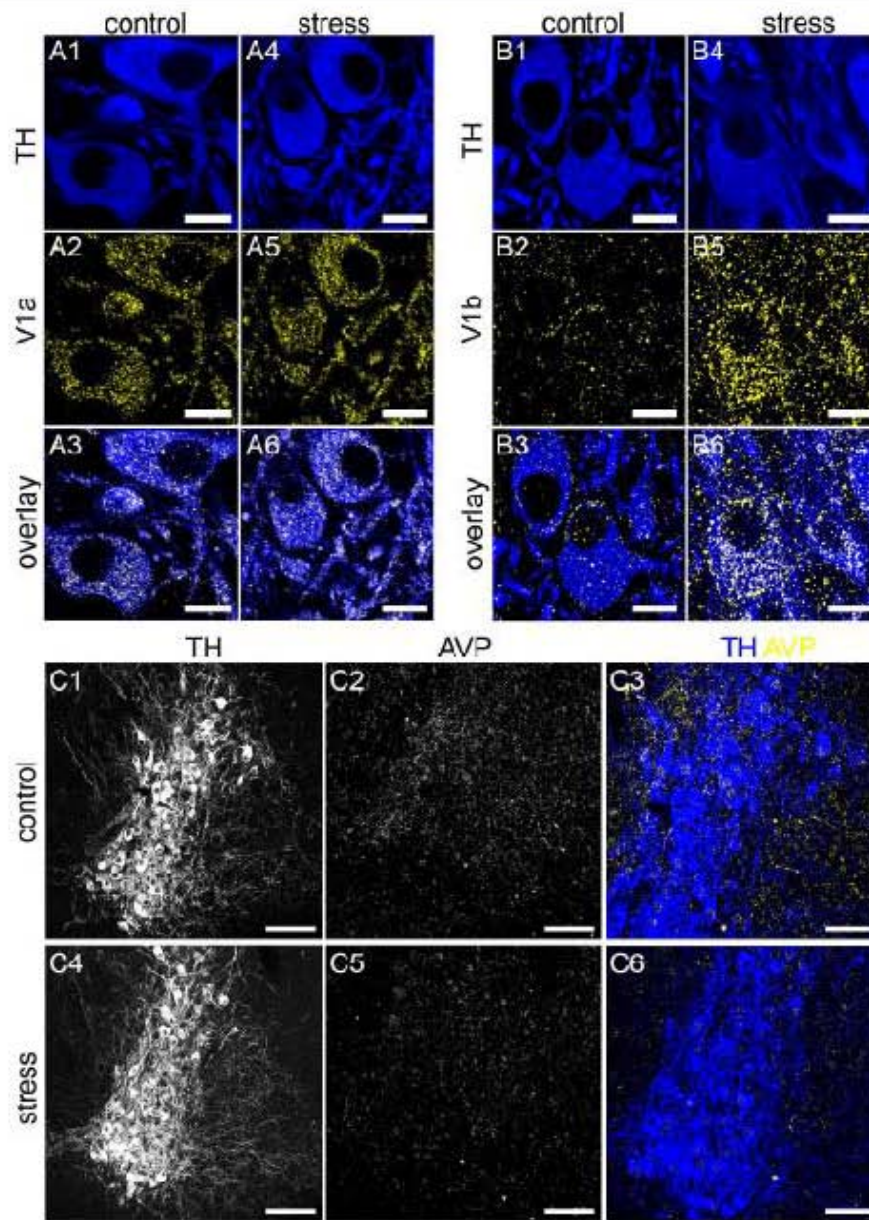


FIGURE 9 | Acute stress engages the AVP V1a, b system in the LC. **(A1)** Shows TH immunoreactivity in the LC from a control mouse. **(A2)** Shows, in the same field of view, immunoreactivity for the V1a receptor. **(A3)** Is an overlay of **(A1,A2)**. **(A4)** Shows TH immunoreactivity in the LC from tissue of a mouse exposed to 1 h of restraint stress and killed an hour later, processed and imaged under conditions identical to control subjects. **(A5)** Shows, in the same field of view, immunoreactivity for V1a, with no discernible difference in labeling pattern and intensity evident between stress and control samples. **(A6)** Is an overlay of **(A4,A5)**. **(B1)** Shows TH immunoreactivity in the LC from a control mouse. **(B2)** Shows, in the same field of view, immunoreactivity for the V1b receptor. **(B3)** Is an overlay of **(B1,B2)**. **(B4)** Shows TH immunoreactivity in the LC from tissue of a mouse exposed to 1 h of restraint stress. **(B5)** Shows, the same field of view, immunoreactivity for V1b. A dramatic stress-induced increase in the intensity of V1b signal is noticeable, both on cell surfaces but also in cytoplasmic components, suggesting a stress-induced internalization, presumably via prolonged activation. **(B6)** Is an overlay of **(B4,B5)**, which exemplifies the differences between the immunoreactivity patterns in control and stress samples. **(C1)** Shows TH immunoreactivity in the LC from a control mouse. **(C2)** Shows, the same field of view, immunoreactivity for AVP. **(C3)** Is an overlay of **(C1,C2)** with TH and AVP pseudo-colored blue and yellow respectively. **(C4)** Shows TH immunoreactivity in the LC from tissue of a mouse exposed to 1 h of restraint stress and killed an hour later, processed and imaged under conditions identical to control subjects. **(C5)** Shows, the same field of view, immunoreactivity for AVP. A stress-induced decrease in the intensity of AVP signal is noticeable as well as the relative lack of immunoreactive varicosities. This is exemplified in **(C6)**, when compared to **(C3)**. Scale bars **(A,B)** 10 μm ; **(C)** 100 μm .

One of the most intriguing findings of the study is that V1a-b receptor ligands had contrasting effects on the spontaneous firing activity of LC neurons. *Post hoc* neurochemical analyses

confirmed that all recorded neurons were located within the LC and were noradrenergic. There could be a number of reasons why, presumably, the activation of a single receptor

type, on a specific cell type, induces contrasting effects on cellular excitability. Firstly, contrasting downstream receptor signaling cascades could be induced in different populations of LC noradrenergic neurons, following their activation. As receptors coupled to G protein (GPCRs), V1a and V1b receptors conventionally couple to the Gq and phospholipase C (PLC) pathway with the V2 receptor engaging the Gs and adenylate cyclase (Gs-cAMP) pathway (Koshimizu et al., 2012). However, individual AVP receptors engaging differing secondary messenger cascades is not unprecedented. Indeed, multiple mechanisms have been identified which result in the differential activation of secondary messenger pathways by individual GPCRs. These include receptors adopting different active and inactive conformational states when bound to ligands (Kenakin, 2003), having the ability to homo- or heterodimerise, leading to variations in their pharmacological properties (Park and Palczewski, 2005) and the location of receptors within specialized microdomains of the plasma membrane such as rafts or caveolae (Guzzi et al., 2002). Such versatility in signal transduction has been exemplified by the V1b receptor which has been shown to activate either the IP or cAMP pathways (Jard et al., 1986; Thibonnier et al., 1997; Sabatier et al., 1998). Furthermore, the V1b receptor is capable of simultaneously activating both the Gq/11-inositol phosphate (IP) and Gs-cAMP pathways (Orcel et al., 2009). We are unable to distinguish from our data which of the above variables could contribute to the differences in the effects of desmopressin on the recorded neurons. A fundamental question is whether the directionality of the AVP response depends on the activity or metabolic state of the neuron, or it is a central feature of specific sub populations of LC neurons. If the former, this could identify a role for AVP driving LC activity toward basal levels following various triggers which elevate excitability, such as stress (discussed below), or those which decrease LC activity, such as the release of opioids, thus in keeping with its universal role of a homeostatic regulator. If the latter applies, this could be a mechanism for magnifying the diversity of LC noradrenergic neuron sub-populations. Indeed, the LC has been shown to be composed of genetically diverse noradrenergic neurons which are considered to represent different cell types (Robertson et al., 2013; Plummer et al., 2017). Future high resolution molecular, physiological and behavioral correlative studies are required to address these questions. Irrespective, and given the correlation between LC FR and NA release, these data identify the AVP-V1a-b receptor system as possibly being capable of both enhancing or diminishing NA release within the brain.

Precisely how AVP receptors change the spontaneous FR of LC neurons is unclear. This could be an indirect response to the modulation of local neurotransmitters, given the close association of these receptors with GABA and glutamate synaptic molecular machinery demonstrated in this study, and functional evidence in other brain regions (Raggenbass, 2008; Rood and Beck, 2014). Although we recorded from only noradrenergic neurons of the LC, our immunohistochemical data confirm the presence of V1b receptors in non-noradrenergic LC neurons. These neurons bear the neurochemical hallmarks of inhibitory interneurons (Aston-Jones et al., 2004; Corteen et al., 2011). If so, applied desmopressin could induce the release of their neurotransmitter content

locally, thereby impacting on the excitability of the recorded noradrenergic neuron. Paired recordings between identified interneuron-principal cell pairs would be essential to understand this dynamic of the AVP-LC system.

However, based on the changes in membrane properties induced by desmopressin, AVP could also directly alter LC neuronal excitability. In addition to changes in spontaneous action potential frequency, desmopressin also altered the membrane time constant for the AHP, thus impacting on the time taken for the neuron to repolarise and thus be capable of initiating the next action potential. This effect on the LC inter spike interval, by other neurohormones such as CRH, has been shown to be modulated by potassium conductances (Jedema and Grace, 2004). Furthermore, CRH, in different cell types, has been shown to engage different secondary messenger pathways (Grammatopoulos et al., 2001), resulting in either the activation or inhibition of specific ion channels (Aldenhoff et al., 1983; Rainnie et al., 1992; Yu and Shinnick-Gallagher, 1998). Finally, desmopressin also significantly altered the action potential amplitude, but only in those cells which exhibited a decreased FR. It is therefore reasonable to speculate that AVP directly alters LC activity via the downstream modulation of ion channels associated with spontaneous FR. However, desmopressin did not alter the input resistance of the entire cell, thus arguing against any potential impact on membrane channel gating. Future studies investigating LC neuronal excitability in AVP receptor subtype-specific knock out mice will hopefully confirm the receptor subtype signaling cascaded in individual LC neurons.

A novel discovery was the changes in the patterns of AVP and V1b receptor immunoreactivity following exposure to acute stress. Importantly, V1a receptor immunoreactivity remained unchanged. An indicator of metabotropic receptor activation is receptor internalization from plasma membranes and incorporation within cytoplasmic compartments. Thus, the dramatic stress-induced internalization of V1b localization suggests engagement of stress signals with this receptor system and a potential pathway mediating the LC stress response. Future functional and behavioral studies are essential to identify the underlying mechanisms. We deliberately chose an acute stress protocol that is likely to engage adaptive or homeostatic pathways throughout the body including the LC. This has been widely demonstrated with the acute exposure to restraint stress used in this study (Buynitsky and Mostofsky, 2009). LC neurons are exquisitely sensitive to both emotional and physiological stressors, responding with an increased FR (Valentino and Van Bockstaele, 2008). The principal mediator of this stress-induced LC excitability is CRH, originating from a variety of brain centers (Valentino et al., 1992). Although AVP release from the hypothalamus coincides with that of CRH and the stress response (Kormos and Gaszner, 2013), its involvement in the LC stress pathways has yet to be documented. However, this would not be surprising, given the overlap of the LC, and AVP in general, in mediating adaptive or homeostatic responses to various psychological and physiological challenges (Valentino and Van Bockstaele, 2008; Koshimizu et al., 2012). If so, this could signal a novel partnership with CRH in regulating LC activity during

times of stress. Precisely how these systems might cooperate is unclear. An important distinction would be their contribution to resting LC FR. CRH antagonists do not alter resting LC FR thus indicating that this aspect of LC physiology is not mediated by the CRH system. In contrast, this study demonstrated that selective V1a-b receptor antagonists, on their own, significantly altered basal LC FR, indicating that endogenous AVP sets the tone of LC activity. Another difference would be the ability of the AVP-V1a-b receptor system to bi-directionally modulate LC activity. This distinguishes AVP-V1a-b system not only from the CRH but other neuropeptide systems that influence LC activity by either selectively increasing or decreasing activity, but never both (Zitnik, 2016). It would be intriguing to explore whether AVP would increase, or decrease, the activity of LC neurons, in a behavioral or physiological state-dependent manner. CRH is called upon during the stress response to elevate LC activity and enhance NA release. However, central to an adaptive or healthy stress system is the appropriate cessation of the stress response once the organism has effectively contended with the challenge. If AVP did work in tandem with CRH in this process, it could provide a counter measure by reversing any increase in LC activity, thereby ensuring effective resetting of basal LC activity. This could provide unique opportunities for V1a-b receptor ligands in psychiatric disorders associated with an impaired stress response and LC dysregulation, such as anxiety and depression (Itoi and Sugimoto, 2010). Indeed, in humans, the dysregulation of brain and CSF AVP levels are associated with a number of anxiety disorders (Neumann and Landgraf, 2012). Furthermore, the pharmacological blockade of either the V1a or V1b receptors showed anxiolytic and antidepressant actions (Koshimizu et al., 2012; Caldwell et al., 2017). The actions of these receptors on such emotional states have been attributed to changes in the functions of a range of brain regions such as the hypothalamus, the bed nucleus of the stria terminalis and amygdala, with the LC largely ignored. The current data suggest that the LC should be considered as a site of action for such agents in altering such psychiatric

symptoms. The use of cell type-specific AVP receptor knock out mice will be instrumental in dissecting the association of specific brain regions and AVP receptor subtypes in these brain functions.

In summary, the study provides a new vista on the central AVP system, by providing the molecular and physiological constructs of this neurohormone, and its associated receptor system, in the mouse LC. The data will serve as the basis to further dissect the contribution of what is conventionally a homeostatic system, to the functioning of a brain region that is integral to mediating adaptive responses to a variety of threats.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

JS conceived and led the study. EC-L, LK, MS, and JS designed the experiments. EC-L, LK, MS, TJ, VII, LZ, and JS performed the experiments and analyzed the data. VH, TG, KM, TK, and LZ contributed unique resources. JS wrote the manuscript with all authors approving the final version.

FUNDING

EC-L was funded by the Posgrado en Ciencias Biológicas program of Universidad Nacional Autónoma de México (CVU/Becario: 365662/245546) and a traveling scholarship from the Mexican National Council of Science and Technology Academy of Sciences (CONACYT/Conacyt Becas Mixtas) and grant CONACYT CB-238744 (LZ).

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnins.2018.00919/full#supplementary-material>

REFERENCES

- Aldeiloff, J. B., Gruol, D. L., Rivier, J., Vale, W., and Siggins, G. R. (1983). Corticotropin releasing factor decreases postburst hyperpolarizations and excites hippocampal neurons. *Science* 221, 875–877. doi: 10.1126/science.6603658
- Andre, P., D'ascario, P., Ioffe, M., and Pompeiano, O. (1952). Microinjections of vasopressin in the locus coeruleus complex affect posture and vestibulospinal reflexes in decerebrate cats. *Pflugers Arch.* 420, 376–388. doi: 10.1007/BF00374473
- Aston-Jones, G., Zhu, Y., and Card, J. P. (2004). Numerous GABAergic afferents to locus coeruleus in the pericerebral dendritic zone: possible interneuronal pool. *J. Neurosci.* 24, 2313–2321. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5339-03.2004
- Bankir, L., Biche, D. G., and Morgenthaler, N. G. (2017). Vasopressin: physiology, assessment, and osmosensation. *J. Intern. Med.* 282, 284–297. doi: 10.1111/joim.12645
- Berecek, K. H., Olpe, H. R., and Hofbauer, K. G. (1987). Responsiveness of locus coeruleus neurons in hypertensive rats to vasopressin. *Hypertension* 9, 3110–3113. doi: 10.1161/01.HYP.9.6.Pt.2.III110
- Buynitsky, T., and Mosofsky, D. I. (2009). Restraint stress in biobehavioral research: Recent developments. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 33, 1089–1098. doi: 10.1016/j.neubiorev.2009.05.004
- Caldwell, H. K., Aulino, E. A., Rodriguez, K. M., Witchev, S. K., and Yaw, A. M. (2017). Social context, stress, neuropsychiatric disorders, and the vasopressin 1b receptor. *Front. Neurosci.* 11:567. doi: 10.3389/fnins.2017.00567
- Carter, M. E., Yizhar, O., Chikahisa, S., Nguyen, H., Adamantidis, A., Nishino, S., et al. (2010). Tuning arousal with optogenetic modulation of locus coeruleus neurons. *Nat. Neurosci.* 13, 1526–1533. doi: 10.1038/nn.2682
- Cherubini, E., North, R. A., and Williams, J. T. (1988). Synaptic potentials in rat locus coeruleus neurons. *J. Physiol.* 406, 431–442. doi: 10.1113/jphysiol.1988.sp017389
- Corteen, N. L., Cole, T. M., Sarna, A., Sieghart, W., and Swyny, J. D. (2011). Localization of GABA A receptor alpha subunits on neurochemically distinct cell types in the rat locus coeruleus. *Eur. J. Neurosci.* 24, 250–262. doi: 10.1111/j.1460-9568.2011.07740.x
- Curtis, A. L., Erolet, G., and Valentino, R. J. (1993). Hemodynamic stress activates locus coeruleus neurons of unanesthetized rats. *Brain Res. Bull.* 31, 737–744. doi: 10.1016/0361-9230(93)90150-A

- Dahlstrom, A., and Fuxe, K. (1964). Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system. I. demonstration of monoamines in the cell bodies of brain stem neurons. *Acta Physiol. Scand Suppl.* 232, 1–55.
- Daikoku, E., Kunitake, T., Kato, K., Tanoue, A., Tsujimoto, G., and Kannan, H. (2007). Body water balance and body temperature in vasopressin V1b receptor knockout mice. *Auton. Neurosci.* 136, 58–62. doi: 10.1016/j.autneu.2007.04.007
- Godino, A., Giusi Paiva, A., Antunes Rodrigues, J., and Vivas, L. (2005). Neurochemical brain groups activated after an isotonic blood volume expansion in rats. *Neuroscience* 133, 493–505. doi: 10.1016/j.neuroscience.2005.02.025
- Grammatopoulos, D. K., Randeve, H. S., Levine, M. A., Kanellopoulou, K. A., and Hillhouse, E. W. (2001). Rat cerebral cortex corticotropin-releasing hormone receptors: evidence for receptor coupling to multiple G-proteins. *J. Neurochem.* 76, 509–519. doi: 10.1046/j.1471-4155.2001.00067.x
- Gunn, B. G., Curningham, L., Cooper, M. A., Corteen, N. L., Seifi, M., Swirny, J. D., et al. (2013). Dysfunctional astrocytic and synaptic regulation of hypothalamic glutamatergic transmission in a mouse model of early-life adversity: relevance to neurosteroids and programming of the stress response. *J. Neurosci.* 33, 19534–19554. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1337-13.2013
- Guyenet, P. G., and Aghajanian, G. K. (1979). ACh, substance P and met-enkephalin in the locus coeruleus: pharmacological evidence for independent sites of action. *Eur. J. Pharmacol.* 53, 319–328. doi: 10.1016/0014-2999(79)90455-2
- Guzzi, F., Zanchetta, D., Cassoni, P., Guzzi, V., Francolini, M., Parenti, M., et al. (2002). Localization of the human oxytocin receptor in caveolin-1 enriched domains turns the receptor-mediated inhibition of cell growth into a proliferative response. *Oncogene* 21, 1658–1667. doi: 10.1038/sj.onc.1205219
- Hagan, J. J., Leslie, R. A., Patel, S., Evans, M. L., Wattam, T. A., Helmes, S., et al. (1999). Orexin A activates locus coeruleus cell firing and increases arousal in the rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 10911–10916. doi: 10.1073/pnas.96.19.10911
- Herman, J. P., and Tasker, J. G. (2016). Paraventricular hypothalamic mechanisms of chronic stress adaptation. *Front. Endocrinol.* 7:137. doi: 10.3389/fendo.2016.00137
- Hervath, T. L., Peyron, C., Diano, S., Ivanov, A., Aston-Jones, G., Kilduff, T. S., et al. (1999). Hypocretin (orexin) activation and synaptic innervation of the locus coeruleus noradrenergic system. *J. Comp. Neurol.* 415, 145–159. doi: 10.1002/(SICI)1096-9861(19991213)415:2<145::AID-CNE1>3.0.CO;2-2
- Iijima, M., Yoshimizu, T., Shimazaki, T., Tokugawa, K., Fukumoto, K., Kurosu, S., et al. (2014). Antidepressant and anxiolytic profiles of newly synthesized arginine vasopressin V1b receptor antagonists TASP023278 and TASP0390325. *Br. J. Pharmacol.* 171, 3511–3525. doi: 10.1111/bph.12699
- Itoi, K., and Sugimoto, N. (2010). The brainstem noradrenergic system in stress, anxiety and depression. *J. Neuroendocrinol.* 22, 355–361. doi: 10.1111/j.1365-2826.2010.01988.x
- Jard, S., Gaillard, R. C., Gailion, G., Marie, J., Schoenenberg, P., Muller, A. F., et al. (1985). Vasopressin antagonists allow demonstration of a novel type of vasopressin receptor in the rat adenohypophysis. *Mol. Pharmacol.* 30, 171–177.
- Jedema, H. P., and Grace, A. A. (2004). Corticotropin-releasing hormone directly activates noradrenergic neurons of the locus coeruleus recorded in vitro. *J. Neurosci.* 24, 9705–9713. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2830-04.2004
- Kenakin, T. (2003). Ligand-selective receptor conformations revisited: the promise and the problem. *Trends Pharmacol. Sci.* 24, 346–354. doi: 10.1016/S0165-6147(03)00167-6
- Kormos, V., and Gaszner, B. (2013). Role of neuropeptides in anxiety, stress, and depression: from animals to humans. *Neuropeptides* 47, 401–419. doi: 10.1016/j.nepe.2013.10.014
- Koshimizu, T. A., Nakamura, K., Egashira, N., Hiroyama, M., Nonoguchi, H., and Tanoue, A. (2012). Vasopressin V1a and V1b receptors: from molecules to physiological systems. *Physiol. Rev.* 92, 1813–1864. doi: 10.1152/physrev.00035.2011
- Koshimizu, T. A., Nasa, Y., Tanoue, A., Oikawa, R., Kawahara, Y., Kiyono, Y., et al. (2006). V1a vasopressin receptors maintain normal blood pressure by regulating circulating blood volume and baroreflex sensitivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 7807–7812. doi: 10.1073/pnas.0600875103
- Lehrer, S. M., Curtis, A. L., Brons, R., and Valentino, R. J. (1997). Locus coeruleus activation by colon distention: role of corticotropin-releasing factor and excitatory amino acids. *Brain Res.* 756, 114–124. doi: 10.1016/S0006-8993(97)00116-5
- Lozic, M., Sarenac, O., Murphy, D., and Japundzic-Zigon, N. (2018). Vasopressin, central autonomic control and blood pressure regulation. *Curr. Hypertens Rep.* 20:11. doi: 10.1007/s11906-018-0811-0
- Maguire, E. P., Macpherson, T., Swinny, J. D., Dixon, C. L., Herd, M. B., Beleti, D., et al. (2014). Tonic inhibition of accumbal spiny neurons by extrasynaptic alpha(2)delta GABA receptors modulates the actions of psychostimulants. *J. Neurosci.* 34, 823–838. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2222-13.2014
- McCall, J. G., Al-Hasari, R., Studa, E. R., Hong, D. Y., Norris, A. J., Ford, C. P., et al. (2015). CRH engagement of the locus coeruleus noradrenergic system mediates stress-induced anxiety. *Neuron* 87, 605–620. doi: 10.1016/j.neuron.2015.07.002
- Neumann, I. D., and Landgraf, R. (2012). Balance of brain oxytocin and vasopressin: implications for anxiety, depression, and social behaviors. *Trends Neurosci.* 35, 649–659. doi: 10.1016/j.tins.2012.08.001
- O'Connor, T. M., O'Halloran, D. J., and Shanahan, F. (2000). The stress response and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: from molecule to melancholia. *QJM* 93, 323–333. doi: 10.1093/qjmed/93.6.323
- Okano, H. J., and Darnell, E. E. (1997). A hierarchy of Hu RNA binding proteins in developing and adult neurons. *J. Neurosci.* 17, 3024–3037. doi: 10.1523/JNEUROSCI.17-09.03024.1997
- Olpe, H. R., Steirermann, M. W., Pozza, M. F., and Haas, H. L. (1987). Comparative investigations on the actions of ACTH1-24, somatostatin, neurotensin, substance P and vasopressin on locus coeruleus neuronal activity in vitro. *Neuropharmacology Arch. Pharmacol.* 336, 434–437. doi: 10.1007/BF00164879
- Orcel, H., Albizati, L., Perkovska, S., Durroux, T., Mendre, C., Ansanay, H., et al. (2005). Differential coupling of the vasopressin V1b receptor through compartmentalization within the plasma membrane. *Mol. Pharmacol.* 75, 637–647. doi: 10.1124/mol.108.049031
- Ostergaard, L., Rudiger, A., Wellmann, S., Gammella, E., Beck-Schimmer, B., Strack, J., et al. (2014). Arginine-vasopressin marker copeptin is a sensitive plasma surrogate of hypoxic exposure. *Hypoxia* 2, 143–151. doi: 10.2147/HIP.S57894
- Park, P. S., and Palczewski, K. (2005). Diversifying the repertoire of G protein-coupled receptors through oligomerization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 8793–8794. doi: 10.1073/pnas.0504016102
- Pickel, V. M., Joh, T. H., Reis, D. J., Leeman, S. E., and Miller, R. J. (1979). Electron microscopic localization of substance P and enkephalin in axon terminals related to dendrites of catecholaminergic neurons. *Brain Res.* 160, 387–400. doi: 10.1016/0006-8993(79)91068-0
- Plummer, N. W., Scappini, E. L., Smith, K. C., Tucker, C. J., and Jensen, P. (2017). Two subpopulations of noradrenergic neurons in the locus coeruleus complex distinguished by expression of the dorsal neural tube marker pax7. *Front. Neuroanat.* 11:60. doi: 10.3389/fnana.2017.00060
- Raggenbass, M. (2008). Overview of cellular electrophysiological actions of vasopressin. *Eur. J. Pharmacol.* 583, 243–254. doi: 10.1016/j.ejphar.2007.11.074
- Rainnie, D. G., Fehmour, R. J., and Shinnick-Gallagher, P. (1992). Differential actions of corticotropin releasing factor on basolateral and central amygdala neurons, in vitro. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 265, 846–858.
- Rickenbacher, E., Baez, M. A., Hale, L., Leiser, S. C., Zdenec, S. A., and Valentino, R. J. (2008). Impact of overactive bladder on the brain: central sequelae of a visceral pathology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 10589–10594. doi: 10.1073/pnas.0800959105
- Robertson, S. D., Plummer, N. W., De Marchena, J., and Jensen, P. (2013). Developmental origins of central norepinephrine neuron diversity. *Nat. Neurosci.* 16, 1016–1023. doi: 10.1038/nn.3458
- Rood, B. D., and Beck, S. G. (2014). Vasopressin indirectly excites dorsal raphe serotonin neurons through activation of the vasopressin1A receptor. *Neuroscience* 260, 205–216. doi: 10.1016/j.neuroscience.2013.12.012
- Rood, B. D., and De Vries, G. J. (2011). Vasopressin innervation of the mouse (*Mus musculus*) brain and spinal cord. *J. Comp. Neurol.* 519, 2434–2474. doi: 10.1002/cne.22635
- Sabatier, N., Riclaud, P., and Dreyanille, C. (1998). Activation of multiple intracellular transduction signals by vasopressin in vasopressin-sensitive neurons of the rat supraoptic nucleus. *J. Physiol.* 513(Pt 3), 699–710. doi: 10.1111/j.1469-7793.1998.699ba.x

- Sara, S. J. (2015). Locus Coeruleus in time with the making of memories. *Curr. Opin. Neurobiol.* 35, 87–94. doi: 10.1016/j.conb.2015.07.004
- Schwarz, L. A., and Luc, L. (2015). Organization of the locus coeruleus-norepinephrine system. *Curr. Biol.* 25, R1051–R1056. doi: 10.1016/j.cub.2015.09.039
- Seifi, M., Corteen, N. L., Van Der Want, J. J., Metzger, F., and Swinny, J. D. (2014). Localization of NG2 immunoreactive neuroglial cells in the rat locus coeruleus and their plasticity in response to stress. *Front. Neuroanat.* 8:31. doi: 10.3389/fnana.2014.00031
- Singewald, N., and Philippa, A. (1998). Release of neurotransmitters in the locus coeruleus. *Prog. Neurobiol.* 56, 257–267. doi: 10.1016/S0304-0382(98)00039-2
- Swinny, J. D., O'Farrell, E., Bingham, B. C., Piel, D. A., Valentino, R. J., and Beck, S. G. (2010). Neonatal rearing conditions distinctly shape locus coeruleus neuronal activity, dendritic arborization, and sensitivity to corticotrophin-releasing factor. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 13, 515–525. doi: 10.1017/S146114570999037X
- Tanoue, A., Ito, S., Honda, K., Oshikawa, S., Kitagawa, Y., Koshimizu, T. A., et al. (2004). The vasopressin V1b receptor critically regulates hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity under both stress and resting conditions. *J. Clin. Invest.* 113, 302–309. doi: 10.1172/JCI2004.9656
- Thibonnier, M., Coles, P., Thibonnier, A., and Shoham, M. (2002). Molecular pharmacology and modeling of vasopressin receptors. *Prog. Brain Res.* 139, 179–196. doi: 10.1016/S0079-6123(02)39016-2
- Thibonnier, M., Preston, J. A., Dullin, N., Wilkins, P. L., Berti-Mattera, L. N., and Mattera, R. (1997). The human V3 pituitary vasopressin receptor: ligand binding profile and density-dependent signaling pathways. *Endocrinology* 138, 4109–4122. doi: 10.1210/endo.138.10.5432
- Tribollet, E., Arsenijević, Y., and Barberis, C. (1998). Vasopressin binding sites in the central nervous system: distribution and regulation. *Prog. Brain Res.* 119, 45–55. doi: 10.1016/S0079-6123(08)61561-7
- Usher, M., Cohen, J. D., Servan-Schreiber, D., Rajkowski, J., and Aston-Jones, G. (1999). The role of locus coeruleus in the regulation of cognitive performance. *Science* 283, 549–554. doi: 10.1126/science.283.5401.549
- Vale, W., Spiess, J., Rivier, C., and Rivier, I. (1981). Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin. *Science* 213, 1394–1397. doi: 10.1126/science.6267699
- Valentino, R. J., Foote, S. L., and Aston-Jones, G. (1983). Corticotropin-releasing factor activates noradrenergic neurons of the locus coeruleus. *Brain Res.* 270, 363–367. doi: 10.1016/0006-8993(83)90615-7
- Valentino, R. J., Page, M., Van Bockstaele, E., and Aston-Jones, G. (1992). Corticotropin releasing factor innervation of the locus coeruleus region: distribution of fibers and sources of input. *Neuroscience* 48, 689–705. doi: 10.1016/0306-4522(92)90412-U
- Valentino, R. J., and Van Bockstaele, E. (2008). Convergent regulation of locus coeruleus activity as an adaptive response to stress. *Eur. J. Pharmacol.* 583, 194–203. doi: 10.1016/j.ejphar.2007.11.062
- Valentino, R. J., and Wehby, R. G. (1989). Locus coeruleus discharge characteristics of morphine-dependent rats: effects of naltrexone. *Brain Res.* 488, 126–134. doi: 10.1016/0006-8993(89)90701-4
- Van Bockstaele, E. J., Bann, D., Proudfit, H., and Valentino, R. J. (2001). Topographic architecture of stress-related pathways targeting the noradrenergic locus coeruleus. *Physiol. Behav.* 73, 273–283. doi: 10.1016/S0031-9384(01)00448-6
- Van Bockstaele, E. J., Branchereau, P., and Pickel, V. M. (1995). Morphologically heterogeneous met-enkephalin terminals form synapses with tyrosine hydroxylase-containing dendrites in the rat nucleus locus coeruleus. *J. Comp. Neurol.* 363, 423–438. doi: 10.1002/cne.903630307
- Van Bockstaele, E. J., Colago, E. E., and Valentino, R. J. (1996). Corticotropin-releasing factor-containing axon terminals synapse onto catecholamine dendrites and may presynaptically modulate other afferents in the rostral pole of the nucleus locus coeruleus in the rat brain. *J. Comp. Neurol.* 364, 523–534. doi: 10.1002/(SICI)1096-9861(1996)364<523::AID-CNE10>3.0.CO;2-Q
- Williams, J. T., Bobker, D. H., and Harris, G. C. (1991). Synaptic potentials in locus coeruleus neurons in brain slices. *Prog. Brain Res.* 88, 157–172. doi: 10.1016/S0079-6123(08)63806-6
- Wu, N., Shang, S., and Su, Y. (2015). The arginine vasopressin V1b receptor gene and prosociality: mediation role of emotional empathy. *Psych J.* 4, 160–165. doi: 10.1002/pchj.102
- Young, W. S., Li, J., Wersinger, S. R., and Pakuvils, M. (2006). The vasopressin 1b receptor is prominent in the hippocampal area CA2 where it is unaffected by restraint stress or adrenalectomy. *Neuroscience* 143, 1031–1039. doi: 10.1016/j.neuroscience.2006.08.040
- Yu, R., and Shinrick-Gallagher, P. (1998). Corticotropin-releasing factor increases dihydropyridine- and neurite-resistant calcium currents in neurons of the central amygdala. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 284, 170–179.
- Zhang, L., and Hernandez, V. S. (2013). Synaptic innervation to rat hippocampus by vasopressin-immuno-positive fibres from the hypothalamic supraoptic and paraventricular nuclei. *Neuroscience* 228, 139–162. doi: 10.1016/j.neuroscience.2012.10.010
- Zitnik, G. A. (2016). Control of arousal through neuropeptide afferents of the locus coeruleus. *Brain Res.* 1641, 338–350. doi: 10.1016/j.brainres.2015.12.010

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2018 Campos-Lira, Kelly, Seifi, Jackson, Gieserice, Mutig, Koshimizu, Hernandez, Zhang and Swinny. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.



Conorfamide-Sr3, a structurally novel specific inhibitor of the *Shaker* K⁺ channel



Elba Campos-Lira ^a, Elisa Carrillo ^a, Manuel B. Aguilar ^b, Joanna Gajewiak ^c,
Froylán Gómez-Lagunas ^{d, **}, Estuardo López-Vera ^{a, *}

^a Laboratorio de Toxinología Marina, Unidad Académica de Ecología y Biodiversidad Acuática, Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Ciudad de México, 04510, Mexico

^b Laboratorio de Neurofarmacología Marina, Departamento de Neurobiología Celular y Molecular, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Campus Juriquilla, Querétaro, 76230, Mexico

^c Department of Biology, University of Utah, 257 South 1400 East, Salt Lake City, UT, 84112, USA

^d Department of Physiology, School of Medicine, National Autonomous University of Mexico, Ciudad Universitaria, México City, 04510, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 June 2017

Received in revised form

25 July 2017

Accepted 26 July 2017

Available online 31 July 2017

Keywords:

Conus spurius

Mexico

Conorfamide

Ion channel blocker

Potassium channels

Shaker

ABSTRACT

Conorfamides (CNFs) are toxins initially characterized from the venom duct of the venomous marine snail *Conus spurius* from the Gulf of Mexico; at their C-termini, these toxins are amidated and have high sequence similarity with the molluskan cardioexcitatory tetrapeptide Phe-Met-Arg-Phe-NH₂ (FMRfa-mide or FMRfa) and other FMRfa-related peptides (FaRPs) found in the five molluskan classes, and in other invertebrate and vertebrate phyla. These peptides were the first FaRPs found to be present in any venom, and they are biologically active in mice, limpets, and/or freshwater snails. However, the molecular targets of the known CNFs (CNF-Sr1 and CNF-Sr2 from *C. spurius*, and CNF-Vc1 from *C. victoriae*) remain unidentified. Very recently, three FaRPs from *C. textile* have been found to potentiate the currents of acid-sensing ion channels. In this work, we characterized a novel conorfamide, CNF-Sr3 (ATSGPMCWLPVFYRF-NH₂), comprised of 15 amino acid residues, and with a specific blocking activity for the *Shaker* subtype of the voltage-gated potassium channels, without significant effect on the *Shab*, *Shaw*, *Shal* and *Eag* channels. This peptide is the third type of disulfide-free conotoxins that has been discovered to target K⁺ channels.

© 2017 Published by Elsevier Ltd.

1. Introduction

It has been more than 40 years since the first biochemical characterization of a peptide toxin isolated from the venom of the marine snails belonging to the genus *Conus* (Cruz et al., 1978). Since then, a plethora of these toxins (better known as conotoxins) has been systematically classified into two broad types of categories based on the molecular target they bind to (pharmacological families) and the similarity of the signal sequence of their precursors (gene superfamilies) (Cruz et al., 1978; Terlau and Olivera, 2004; Robinson and Norton, 2014). Also, conotoxins can be simply classified into those that are disulfide-poor peptides, which include

conophans, conulakins, and conorfamides, among others, and those that contain multiple disulfide bonds, which represents the majority of the venom peptides (Akondi et al., 2014; Lebbe and Tytgat, 2016). Independently of these classifications, conotoxins have become highly valuable molecular probes to distinguish different subtypes of G-protein-coupled receptors as well as ligand- and voltage-gated ion channels. One of them (ω -conotoxin MVIIA) has been approved for the treatment of chronic pain (Bingham et al., 2010), while few other conotoxins have reached human clinical trials for the treatment of neuropathic pain and other disorders (Olivera and Teicher, 2007; Lewis et al., 2012; Vetter and Lewis, 2012).

Each *Conus* species (approximately 700) presumably expresses in its venom system more than 100 distinct conotoxins, with no molecular overlap between them (Röckel et al., 1995; Puillandre et al., 2015); thus, the probability of finding new conotoxins specific for a particular ion channel or receptor in any given non-studied or understudied species is high.

* Corresponding author.

** Corresponding author.

E-mail addresses: froylanagl@yahoo.com (F. Gómez-Lagunas), vera@cmar.unam.mx (E. López-Vera).

Thus far, K⁺ channel-blocking conotoxins belong to the A- (α -conotoxins), I2- (κ -I2-conotoxins), J- (κ/α -J-conotoxins), M- (κ M-conotoxins and conopeptides Y), O1- (κ -conotoxins), and O2- (contryphans) gene superfamilies, and to the conkunitzin class. Except for conopeptides Y and peptide Mo1659, which are Cys-free peptides, the other K⁺ channel blocker conotoxins contain 1–4 disulfide bonds.

Here, we report on the purification and biochemical characterization of a novel Cys-free conopeptide, conorfamide-Sr3 that blocks *Shaker* K⁺ channels, but not *Shab*, *Shaw*, *Shal*, and *Eag* channels.

2. Experimental procedures

2.1. Snail collection

Live marine snails *Conus spurius* were collected off the Gulf of México and immediately kept at -20°C until used. Dissection of the venom ducts was carried out on a cold block, and the ducts were placed in microcentrifuge tubes and stored at -70°C until peptide extraction.

2.2. Venom duct extract

The venom duct extract was obtained by homogenization of the ducts in 40% aqueous acetonitrile containing 2% trifluoroacetic acid.

2.3. Purification of CNF-Sr3

HPLC was performed on an Agilent Technologies 1200 Infinity series (G1311C Quaternary Pump, G1365D Multilength Detector, 5067–4141 Manual Injector; Hewlett-Packard, Waldbronn, Germany). The venom extract was fractionated with a Vydac (Hesperia, CA) C18 analytical reversed-phase column (218TP54, 5 μm particle size, 4.6 \times 250 mm) equipped with a Vydac C18 guard column (218GK54, 5 μm particle size, 4.6 \times 10 mm). Peptides were eluted with a linear gradient of 5–100% solution B over 95 min at a flow of 1 ml/min, where solution A is 0.1% (v/v) aqueous trifluoroacetic acid and solution B is 0.09% (v/v) trifluoroacetic acid in 90% (v/v) acetonitrile. The same column was employed to repurify the component of the venom eluting at 49 min, using a linear gradient of 35–55% of solution B over 60 min after an isocratic step at 35% solution B for 5 min, at a flow rate of 1 ml/min; a final purification of the most abundant component from the previous step was performed with a gradient of 25–50% of solution B over 75 after an isocratic step at 25% solution B for 5 min, at a flow rate of 1 ml/min.

2.4. Amino acid sequence

An aliquot of the purified component was adsorbed onto a polybrene-treated (Biobrene Plus; Applied Biosystems, Foster City, CA) glass fiber filter, and the amino acid sequence was determined by automated Edman degradation using a Procise 491 Protein Sequencing System (Applied Biosystems) with the Pulsed-liquid method.

2.5. Mass spectrometry analysis

Matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) mass spectra were obtained, in the reflector mode, using a Voyager System 4271 (Applied Biosystems) at the University of Utah Mass Spectrometry Core Facility.

2.6. Peptide synthesis by Fmoc chemistry

CNF-Sr3 was synthesized using an Apex 396 automated peptide synthesizer (AAPPTec; Louisville, KY) applying standard solid-phase Fmoc (9-fluorenylmethyloxy-carbonyl) protocols. Peptide was constructed on preloaded Fmoc-Phe-RinkAmide MBAH resin (substitution: 0.28 mmol/g) (Peptides International, Louisville, KY). All standard amino acids were purchased from AAPPTec. Side-chain protection for the amino acids was as follows: Trp, tert-butylloxycarbonyl (Boc); Ser, Thr and Tyr, tert-butyl ether (tBu) and Arg, 2,2,4,6,7-pentamethyl-dihydrobenzofuran-5-sulfonyl (Phf). Tenfold excess of amino acids was used and the coupling activation was achieved with one equivalent of 0.4 M benzotriazol-1-yl-oxy-tripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate (PyBOP) and two equivalents of 2 M *N,N*-diisopropylethyl amine (DIPEA) in *N*-methyl-2 pyrrolidone (NMP) as the solvent. Each coupling reaction was conducted for 60 min. Fmoc deprotection was carried out for 20 min with 20% piperidine in dimethylformamide (DMF).

2.7. Peptide cleavage and purification

The peptide was cleaved from 35 mg resin by a 3-h treatment with 1 mL of Reagent K (TFA/water/phenol/thioanisole/1,2-ethanedithiol 82.5/5/5/5/2.5 by volume). The cleavage mixture was filtered and precipitated with 10 mL of cold methyl-tert-butyl ether (MTBE). The crude peptide was then precipitated by centrifugation at 7000g for 6 min and washed once with 10 mL cold MTBE. The crude peptide was purified by reversed-phase (RP) HPLC using a preparative C18 Vydac column (2181P510, 250 \times 10 mm, 5- μm particle size) eluted with a linear gradient ranging from 25% to 55% solvent B in 30 min at a flow rate 4 ml/min. The HPLC solvents were 0.1% (v/v) TFA in water (solvent A) and 0.1% TFA (v/v) in 90% aqueous acetonitrile (v/v) (solvent B). The eluent was monitored by measuring absorbance at 220 and 280 nm. Purity of the peptide was assessed by analytical C18 Vydac RP-HPLC (218TP54, 250 \times 4.6 mm, 5- μm particle size) using a linear gradient ranging from 25% to 55% of solvent B in 30 min with a flow rate 1 ml/min. The peptide was quantified by UV absorbance at 280 nm, using an extinction coefficient (ϵ) value of 6999/M cm.

2.8. Cell culture

Sf9 cells grown in Grace's medium (Gibco; Waltham MA) were infected, with a multiplicity of infection of ~ 10 , with a baculovirus containing *Shab* (dShab 11) or *Shaker* (Shaker-B) K⁺-channel cDNA, as reported (Gómez-Lagunas, 1997, 2007).

Human embryonic kidney 293 cells (HEK 293) were grown in DMEM/F12 media (Gibco) supplemented with 10% FBS, penicillin G (100 units/ml) and streptomycin (0.1 mg/ml). The cells were transiently transfected. The cDNA coding for the *Shal* and *Shaw* channels were subcloned into pIRES-hrGFP-1a vector (Stratagene; San Diego, CA) (Sandoval et al., 2004; Gandini et al., 2014).

Stably transfected HEK293 cells constitutively expressing the *Eag* channel (Kv10.1) were kept in culture at 37 $^{\circ}\text{C}$, in a humidified atmosphere of 95% air and 5% CO₂, in DMEM/F12 media supplemented with 10% FBS and zeocin (300 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

Experiments were conducted 48 h after infection of the cells.

2.9. Electrophysiological recordings

Macroscopic currents were recorded under whole-cell patch-clamp with an Axopatch 1D amplifier (Axon Instruments; Union City, CA). Currents were filtered on line with the filter of the amplifier and sampled with a Digidata 1322A interface (Axon Instruments; Silicon Valley, CA) at frequencies fulfilling the Nyquist

criteria. Electrodes were made of borosilicate glass (KIMAX 51) having resistances in the range of 1–1.5 M Ω . 80% series-resistance compensation was always applied. Experiments were carried out at room temperature, as reported.

2.9.1. Solutions

The internal solution contained (in mM): 90 KF, 30 KCl, 10 EGTA-K, 10 Hepes-K, pH 7.2. The external solution contained (in mM): 5 KCl, 10 CaCl₂, 145 NaCl, 10 Hepes-Na, pH 7.2. Conorfamide-Sr3 was dissolved in external solution. External solution was applied at a flow rate of ~8 mL/min with a gravity-driven perfusion system.

2.9.2. Data analysis

Unless otherwise specified, measurements are reported as the mean \pm SEM of at least 4 independent experiments. K_d = fraction of channels blocked (fb) as a function of [CNF-Sr3], at 0 mV. $fb = 1 - (I_{CNF-Sr3}/I_C)$, where $I_{CNF-Sr3}$ is the current in the presence of [CNF-Sr3] in log nM. I_C is the control IC, measured from at least 4 experiments.

3. Results

3.1. Purification of native CNF-Sr3

Conorfamide Sr3 was purified as the major peak in the HPLC profile of the extract of five venom ducts from *C. spurtus* (Fig. 1A). Two more steps of HPLC purification were required to purify it to

Table 1

Primary structure of conorfamide-Sr3 and comparison with conorfamide-Sr1 and conorfamide-Vr1. The one-letter code is employed for the standard amino acids; *, amidated C-terminus; _ substitution of L for V in CNF-Sr3 with respect to CNF-Sr1.

Conorfamide-Sr1	-C ₁ -PMGWV-P-VFYRF*
Conorfamide-Sr3	ATSG-PMGWL-P-VFYRF*
Conorfamide Vr1	HSCFLAWSGPRNRFVRF*

homogeneity (Fig. 1B and C).

3.2. Determination of sequence and mass

The sequence of the purified peak was determined to be ATSGPMGWLPVYRF by Edman degradation. The calculated monoisotopic mass is 1727.83 Da, which differs from the experimental monoisotopic mass, 1726.77 Da (m/z signal of 1727.78), obtained by MALDI-TOF by +1.06 Da. This difference indicates that this peptide has an amidated C-terminus (calculated monoisotopic mass, 1726.85 Da). The name CNF-Sr3 was given to the purified peptide since it presents 73.3% of similarity with CNF-Sr1 from the same species (Maillo et al., 2002) (Table 1).

3.3. Chemical synthesis of CNF-Sr3

CNF-Sr3 was chemically synthesized using the standard solid-phase Fmoc protocol. Out of 35 mg of the cleaved resin, 2.6 mg of

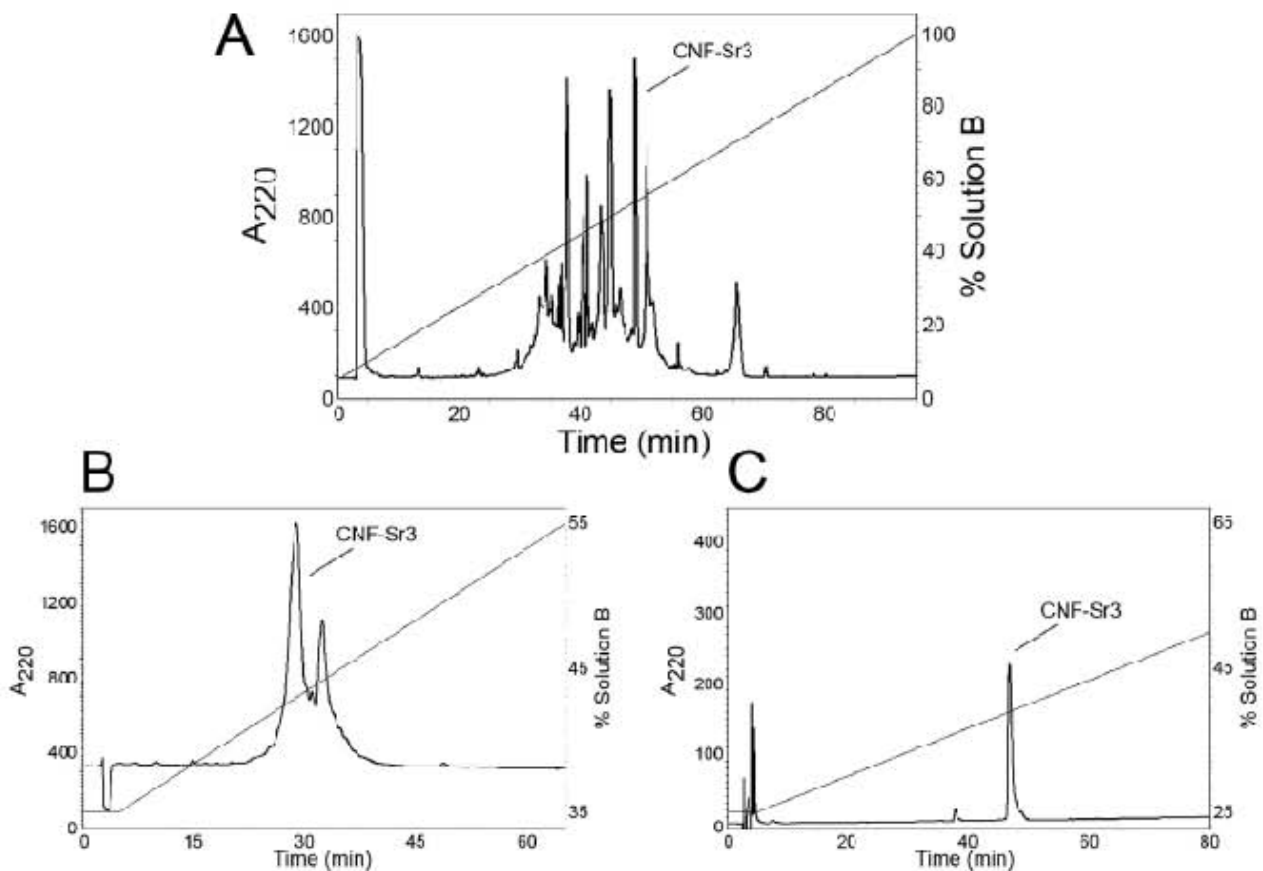


Fig. 1. Purification of conorfamide-Sr3 by HPLC. A) Fractionation of the crude venom extract by an analytical RP C18 column using a linear gradient of 5–100% solution B over 95 min, at a flow rate of 1 ml/min. Fraction indicated in (A) as CNF-Sr3 was re-purified using a gradient of 35–55% of solution B over 60 min after an isocratic step at 35% solution B for 5 min, at a flow rate of 1 ml/min. C) Peak indicated in (B) was re-purified to the final product; the gradient used was of 25–50% of solution B over 75 min after an isocratic step at 25% solution B for 5 min, at a flow rate of 1 ml/min.

the desired product was prepared with 99% purity. The mass of the peptide was confirmed by MALDI MS (calculated monoisotopic MH^{+1} : 1727.87, determined monoisotopic MH^{+1} : 1727.79) at the Salk Institute for Biological Studies. The mass of the synthetic CNF-Sr3 (1726.78) was confirmed to be identical to that of the native CNF-Sr3 (1726.77 Da).

3.4. Identification of a molecular target of CNF-Sr3

Considering that CNF-Sr1 elicits hyperactivity in mouse (Maillo et al., 2002), a behavior consistent with the possible inhibition of K^{+} channels (Papazian et al., 1988; Ganetzky et al., 1999), we decided to examine the effect of CNF-Sr3 on the complete *Shaker* family of voltage-dependent K^{+} channels (Wei et al., 1996).

Fig. 2 presents representative K^{+} currents recorded before (left traces of each panel, filled circles) and upon the addition of CNF-Sr3 [5 μ M] (right traces of each panel, empty circles) to the extracellular solution as indicated (see Methods). Note that CNF-Sr3 notably affects the activity of *Shaker* (Fig. 2A) but, in contrast, it does not significantly affect *Shab* (Fig. 2B), *Shaw* (Fig. 2C), and *Shal* (Fig. 2D) channels. Additionally, we also found that CNF-Sr3 up to 10 μ M concentration does not affect the distant *Eag* K^{+} channel (Fig. 2E).

CNF-Sr3 inhibition of *Shaker* is characterized in Fig. 3. Inhibition is fully reversible as illustrated by the currents in Fig. 3A and the corresponding I/V curve in Fig. 3B. Fraction inhibition is basically the same at all potentials, similar to the inhibition exerted by scorpion toxins (Fig. 3C). The fit of the fraction inhibited as a function of CNF-Sr3 concentration to a Hill equation yielded a $n = 0.9$ that indicates that CNF-Sr3 inhibits the channel with one-to-one stoichiometry and with a $K_d = 2.7 \pm 0.35 \mu$ M (mean \pm SEM; $n = 4$) (Fig. 3D). Despite a relatively low affinity, our observations demonstrate that CNF-Sr3 block of *Shaker* is quite

specific within the KV family of K^{+} channel proteins.

4. Discussion

In this work, we characterized a new member of the conorfamide family, from the venom of the vermivorous *C. spurius*, from the Gulf of Mexico. Based on the amino acid similarity with the two conorfamides characterized from the venom of this species (Maillo et al., 2002; Aguilar et al., 2008), we decided to name it conorfamide-Sr3 (CNF-Sr3). The sequence identity of CNF-Sr3 with CNF-Sr2 is 31%, but CNF-Sr3 has 73.3% sequence identity with CNF-Sr1; they share the same amino acid sequence with the addition of three amino acid residues at the amino-terminus and Leu instead of Val at position 8 in CNF-Sr3 (Table 1).

The members of the FMRFamide-related peptides family participate in a variety of physiological processes in mollusks, including basic life functions, reproduction and development, among others (López-Vera et al., 2008). All the conorfamides reported so far have biological activity in mice. CNF-Sr1 and CNF-Sr2 from *C. spurius* elicit hyperactivity when injected intracranially (Maillo et al., 2002; Aguilar et al., 2008). In contrast, CNF-Vc1 from *Conus victoriae* completely incapacitates the animals for any movement (except for leg and head twitches) after intracranial injection of 2.5–20 nmol; however, at the lowest dose, this peptide also causes hyperactivity (Robinson et al., 2015). RPRFa from *C. textile* coinjected with pH 6.5 saline solution in the mouse gastrocnemius muscle induces mechanical hyperalgesia (Reimers et al., 2017).

No molecular target for any conorfamide had been identified until recently. For CNF-Sr1 H^{+} -gated ENaC channels were suggested as possible targets (Maillo et al., 2002), whereas G-protein-coupled receptors, FMRFamide-activated channels, or acid-sensing ion

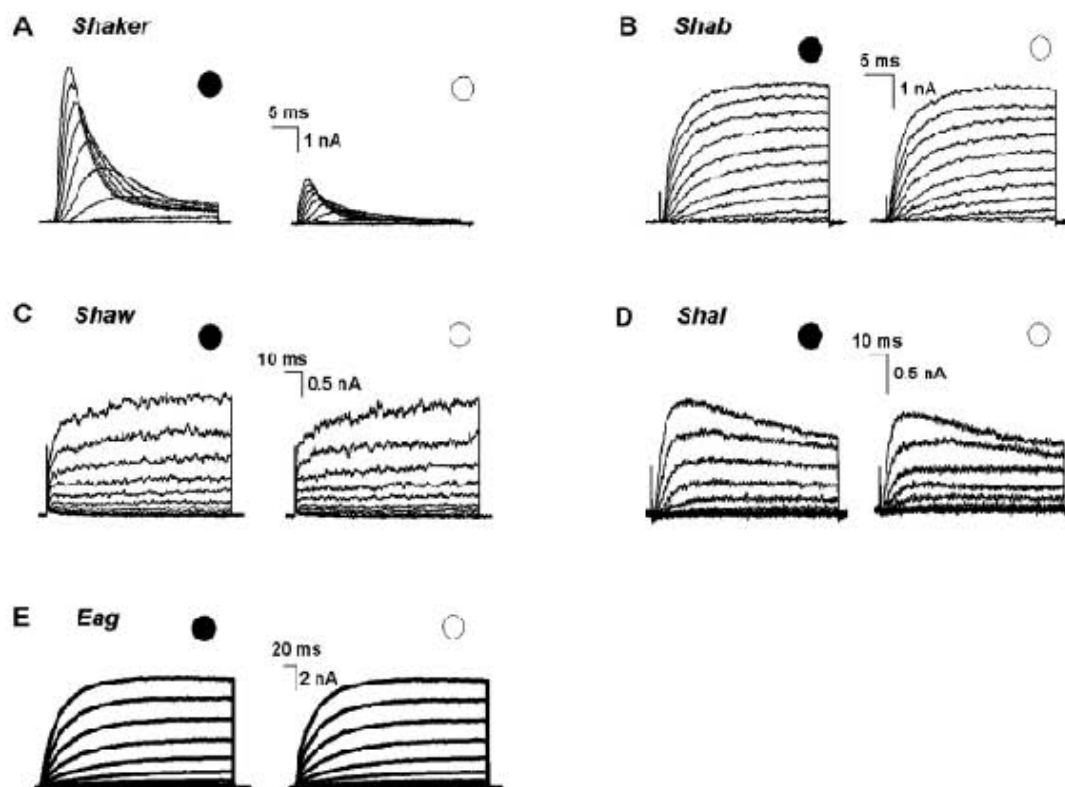


Fig. 2. Block of potassium channels by CNF-Sr3. (A) *Shaker* currents. Left traces, control IK (●). Right traces, IK recorded after adding an external solution containing 5 μ M CNF-Sr3 (○). (B) *Shab* currents. Left traces, control IK. Right traces, IK recorded with 5 μ M CNF-Sr3. (C) *Shaw* currents. (D) *Shal* currents. (E) *Eag* currents. Symbols for B, C, D, and E as in A.

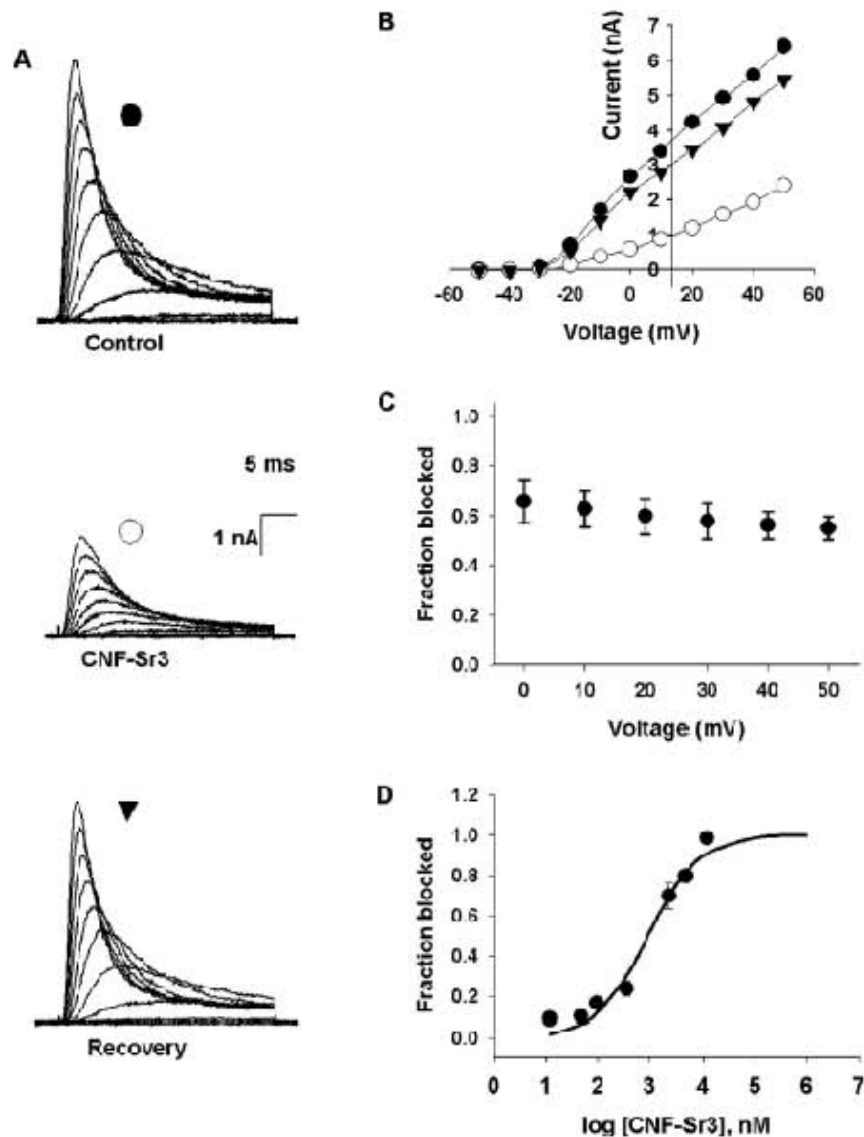


Fig. 3. CNF-Sr3 blocks *Shaker* channel. (A) Control currents (●), currents blocked with 2.4 μM CNF-Sr3 (○) washing cell (▼). (B) I/V plot from traces in A. (C) Fraction blocked vs. mV with 2.4 μM CNF-Sr3 as in A. (D) Fraction blocked vs. [CNF-Sr3], at 0 mV. The line is the fit to a Hill equation with $K_d = 2.7 \pm 0.35 \mu\text{M}$.

channels were proposed for CNF-Sr2 (Aguilar et al., 2008). CNF-Vc1 causes an increase in cytosolic calcium in a specific subset (large-diameter) of DRG neurons and in non-neuronal cells (presumably glia), whereas CNF-Sr1 has no apparent activity on these cells (Robinson et al., 2015), but no molecular target of CNF-Vc1 could be defined. The difference between CNF-Vc1 and CNF-Sr1 suggests that they affect different targets; this is not unexpected due to the low sequence identity between CNF-Vc1 and CNF-Sr1 (33.3%); the same could be suggested for CNF-Sr3, given its also low sequence identity with CNF-Vc1 (37.8%). However, RPRFa has been shown to potentiate the currents of the rat acid-sensing ion channel ASIC3, although with moderate affinity ($EC_{50} = 4.3 \pm 0.44 \mu\text{M}$) (Reimers et al., 2017). This finding is the first direct evidence of a molecular target for any conorfamide.

In this work, we have shown that CNF-Sr3 blocks the *Shaker* voltage-dependent K^+ channel, but it does not block the *Shab*, *Shaw*, *Shal* and *hEag* channels. Thus, our results provide the second direct evidence of a molecular target for a conorfamide. Given the rather moderate affinity of CNF-Sr3 for the *Shaker* channel, we can not rule out the possibility that this toxin affects other target type

with higher affinity.

Thus far, the *Conus* venom peptides conopressins and conotulakins, homologous to the neuropeptides vasopressin/oxytocin and neurotensin, respectively, have been shown to be agonists of the respective receptors of these endogenous peptides. CNF-Sr3 is the first homologue of endogenous peptides, the FMRFa-related peptides, that has an antagonistic effect over a possible molecular target distinct of the known receptors of these neuropeptides (G-protein coupled receptors, FMRFa gated Na^+ channels, and acid-sensing ion channels) (Robinson et al., 2015; Reimers et al., 2017).

A key role of CNF-Vc1 in the envenomation strategy of *C. victoriaræ* has been proposed based on its high expression level, its presence in the injected venom, and its strong bioactivity (Robinson et al., 2015). Although CNF-Sr3 has a relatively moderate affinity for the *Shaker* channel ($K_d = 2.7 \pm 0.35 \mu\text{M}$), it is one of the most abundant components of the venom duct extract of *C. spurius* and thus it might have an important role in prey capture, defense and/or competition.

Conus venom peptides targeting distinct types of K^+ channels (κ -conotoxins, in general) have been found to be Cys-containing

peptides (1–4 disulfide bonds) (Lewis et al., 2012), except for three peptides from vermivorous species from the Indo-Pacific. These exceptions are peptide Mo1569 from *C. monile* (Sudarslal et al., 2004) and two Tyr-rich peptides (conopeptides Y; CPY-Fe1 and CPY-P11) from *C. ferrugineus* and *C. planorbis* (Imperial et al., 2008). Peptide Mo1569 blocks non-inactivating K⁺ channels in rat DRG neurons (Sudarslal et al., 2004), whereas conopeptides Y preferentially block the human Kv1.6 subtype (but also, to a lesser degree, the Kv1.2 subtype). Now, we have discovered a third type of Cys-free conopeptides that block K⁺ channels, from a vermivorous species of the Western Atlantic (Gulf of Mexico). Although the specific non-inactivating subtypes blocked by Mo1659 in rat DRG neurons were not identified (possibly, Kv1.1, Kv1.2, and Kv7.2/Kv7.3 (Moldovan et al., 2013)). It is interesting that the subtypes affected by conopeptides Y (Kv1.6 and Kv1.2) are homologs of the *Shaker* channel specifically blocked by CNF-Sr3.

The O-conotoxin κ-PVIIA (Terlau et al., 1996) and the κA-conotoxin SIVA (Craig et al., 1998) have been shown to block the *Shaker* K⁺ channel, but no vertebrate homologs blocked by these six-Cys-containing toxins have been identified; κ-PVIIA did not block the rat Kv1.1 and Kv1.4 subtypes at 1 μM.

Therefore, given the specificity of CNF-Sr3 for the *Shaker* channel and its easy synthesis, this toxin could be a useful molecular tool to elucidate the role of its homolog channels in the mammalian nervous system. Experiments are in progress to assess the action of CNF-Sr3 over the distinct human Kv1 subtypes.

Acknowledgments

This work was supported by Grants 153915 from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México (CONACYT), IN204116 from Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT-UNAM) to E.L.-V, and DGAPA IN224616-RN224616 to F.G.L. This work was also supported by the grant GM48677 from the National Institute of General Medical Sciences GM48677 to J.G. E.C.L. and E.C. were supported by fellowships from CONACYT (245545) and Programa de Becas Posdoctorales de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM), respectively. We gratefully acknowledge the assistance of Dr. Baldomero M. Olivera for comments on the manuscript and Pablo Martínez Gutiérrez for the chromatogram artwork.

Transparency document

Transparency document related to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2017.07.024>.

References

- Aguilar, M.B., Luna-Ramírez, K.S., Echeverría, D., Falcón, A., Olivera, B.M., Heimer de la Cotera, E.P., Mañón, M., 2003. Conoramidato-Sr2, a gamma-carboxyglutamate-containing FMRamide-related peptide from the venom of *Conus spurius* with activity in mice and mollusks. *Peptides* 29, 186–195. <http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2007.09.022>.
- Akondi, K.B., Mutenthaler, M., Dutertre, S., Kaas, O., Craik, D.J., Lewis, R.L., Alewood, P.W., 2014. Discovery, synthesis, and structure/activity relationships of conotoxins. *Chem. Rev.* 114, 5815–5847. <http://dx.doi.org/10.1021/cr400431e>.
- Bingham, J.P., Mitsunaga, E., Bergeron, Z., 2010. Drugs from slugs—Past, present and future perspectives of α-conotoxin research. *Chem. Biol. Interact.* 183, 1–18. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cb.2009.09.021>.
- Craig, A.G., Zafaralla, G., Cruz, L.J., Santos, A.D., Hillyard, D.R., Dykert, J., Rivier, J.E., Gray, W.R., Imperial, J., DeLacruz, R.G., Sporning, A., Terlau, H., West, P.J., Yoshikami, D., Olivera, B.M., 1998. An O-glycosylated neuroexcitatory *Conus* peptide. *Biochemistry* 37, 16019–16025. <http://dx.doi.org/10.1021/bi981390a>.
- Cruz, L.J., Gray, W.R., Olivera, B.M., 1978. Purification and properties of a myotoxin from *Conus geographus*. *Arch. Biochem. Biophys.* 190, 539–548. [http://dx.doi.org/10.1016/0003-9861\(78\)90308-9](http://dx.doi.org/10.1016/0003-9861(78)90308-9).
- Gandini, M.A., Sandoval, A., Felix, R., 2014. Whole-cell patch-clamp recording of recombinant voltage-sensitive Ca²⁺ channels heterologously expressed in HEK-293 cells. *Cold Spring Harb. Protoc.* 1, 396–401. <http://dx.doi.org/10.1101/prb.prot071213>.
- Ganetzky, B., Robertson, G.A., Wilson, F.G., Trudeau, M.C., Titus, S.A., 1989. The eag family of K⁺ channels in *Drosophila* and mammals. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 868, 356–369. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1749-6632.1999.tb11297.x>.
- Gómez-Lagunas, F., 2007. Stability of the *Shab* K channel conductance in 0 K⁺ solutions. The role of the membrane potential. *Biophys. J.* 93, 4197–4208. <http://dx.doi.org/10.1529/biophysj.106.095794>.
- Gómez-Lagunas, F., 1997. *Shaker* K⁺ conductance in Na⁺ solutions lacking K⁺ ions: a remarkably stable nonconducting state produced by membrane depolarizations. *J. Physiol.* 499, 3–15. <http://dx.doi.org/10.1113/jphysiol.1997.sp021507>.
- Imperial, J.S., Chen, P., Sporning, A., Terlau, H., Daly, N.L., Craik, D.J., Alewood, P.F., Olivera, B.M., 2008. Tyrosine-rich conopeptides affect voltage-gated K⁺ channels. *J. Biol. Chem.* 283, 23026–23032. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M80084200>.
- Lebbe, E.K., Tygat, J., 2016. In the picture: disulfide-poor conopeptides, a class of pharmacologically interesting compounds. *J. Venom. Anim. Toxins Ind. Trop. Dis.* 7, 22–30. <http://dx.doi.org/10.1186/s40409-016-0083-6>.
- Lewis, R.J., Dutertre, S., Vetter, L., Christie, M.J., 2012. *Conus* venom peptide pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 62, 259–298. <http://dx.doi.org/10.124/pr.111005322>.
- López-Vera, E., Aguilar, M.B., Heimer de la Cotera, E.P., 2008. FMRamide and related peptides in the phylum Mollusca. *Peptides* 29, 310–317. <http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2007.09.025>.
- Mañón, M., Aguilar, M.B., López-Vera, E., Craig, A.G., Bulaj, G., Olivera, B.M., Heimer de la Cotera, E.P., 2007. Conoramidato, a *Conus* venom peptide belonging to the RFamide family of neuropeptides. *Toxicon* 40, 401–407. [http://dx.doi.org/10.1016/S0041-0101\(01\)00176-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0041-0101(01)00176-3).
- Moldovan, M., Alvarez, S., Roseberg, M.R., Krarup, C., 2013. Axonal voltage-gated ion channels as pharmacological targets for pain. *Eur. J. Pharmacol.* 708, 105–112. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.03.001>.
- Olivera, B.M., Teichert, E.S., 2007. Diversity of the neurotoxic *Conus* peptides. *Mol. Interv.* 7, 251–259. <http://dx.doi.org/10.1124/ml.7.5.7>.
- Papazian, D.M., Schwarz, T.L., Tempel, B.L., Timpe, L.C., Jan, L.Y., 1988. Ion channels in *Drosophila*. *Annu. Rev. Physiol.* 50, 379–394. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.ph.50.03.379>.
- Puillandre, N., Duda, T.F., Meyer, C., Olivera, B.M., Bouchet, P., 2015. One, four or 1000 genera? A new classification of the cone snail. *J. Molluscan Stud.* 81, 1–23. <http://dx.doi.org/10.1093/mollus/lev055>.
- Reimers, C., Lee, C.H., Kallbacher, H., Tian, Y., Hung, C.H., Schmidt, A., Prokop, L., Kaufenstein, S., Mebs, D., Chen, C.C., Gründer, S., 2017. Identification of a conoramidato from the venom of *Conus textile* that targets ASIC3 and enhances muscimol pain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114, E3507–E3515. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1422941112>.
- Robinson, S.D., Norton, R.S., 2014. Conotoxin gene superfamilies. *Mar. Drugs* 12, 608–611. <http://dx.doi.org/10.3390/md12126058>.
- Robinson, S.D., Safavi Hemami, H., Raghuraman, S., Imperial, J.S., Papenfuss, A.T., Teichert, R.W., Purcell, A.W., Olivera, B.M., Norton, R.S., 2015. Discovery by proteogenomics and characterization of an RF-amide neuropeptide from cone snail venom. *J. Proteomics* 114, 38–47. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2014.11.003>.
- Röckel, D., Korn, W., Kohn, A.J., 1995. *Manual of the Living Conidae*. Verlag Christa Hemmen, Wiesbaden.
- Sandoval, A., Oviedo, N., Andrade, A., Felix, R., 2004. Glycosylation of asparagines 136 and 184 is necessary for the α2δ subunit-mediated regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. *FEBS Lett.* 8, 21–26. <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2004.08.054>.
- Sudarslal, S., Singaravadivelan, G., Ramasamy, P., Anand, K., Sarma, S.P., Sikdar, S.K., Krishnan, K.S., Balaran, P., 2004. A novel 13 residue acyclic peptide from the marine snail, *Conus monile*, targets potassium channels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 317, 682–688. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.03.100>.
- Terlau, H., Olivera, B.M., 2004. *Conus* venoms: a rich source of novel ion channel-targeted peptides. *Physiol. Rev.* 84, 41–68. <http://dx.doi.org/10.1152/physrev.00020.2003>.
- Terlau, H., Shon, K.J., Grille, M., Stocker, M., Stuhmer, W., Olivera, B.M., 1996. Strategy for rapid immobilization of prey by a fish-hunting marine snail. *Nature* 381, 148–151. <http://dx.doi.org/10.1038/381148a>.
- Vetter, L., Lewis, R.J., 2012. Therapeutic potential of cone snail venom peptides (conopeptides). *Curr. Top. Med.* 12, 1546–1552. <http://dx.doi.org/10.2174/15680261280252457>.
- Wei, A., Jegla, T., Selkoff, L., 1996. Eight potassium channel families revealed by the *C. elegans* genome project. *Neuropharmacology* 35, 805–829. [http://dx.doi.org/10.1016/0078-3008\(96\)00176-8](http://dx.doi.org/10.1016/0078-3008(96)00176-8).