

TD
407

DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA MEDICA
Y BIOLOGIA MOLECULAR.

FACULTAD DE MEDICINA. UNIVERSIDAD DE SEVILLA.

"MECANISMOS Y ACCIONES DEL PEPTIDO INTESTINAL
VASOACTIVO (VIP) EN GLANDULA HARDERIANA DE RATA".

por

María Isabel Caraballo Mauri

Tesis presentada para
optar al grado de
Doctor en Biología.
Sevilla, 1997.



DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA MEDICA

Y BIOLOGIA MOLECULAR.

FACULTAD DE MEDICINA. UNIVERSIDAD DE SEVILLA.

"MECANISMOS Y ACCIONES DEL PEPTIDO INTESTINAL VASOACTIVO (VIP) EN GLANDULA HARDERIANA DE RATA".

Autora:

Maria-Isabel Caraballo Mauri

51 269
27 FEB. 1997
El libro por el momento de la tesis.
Alvaro Raffello

Directores:

Juan Ramón Calvo Gutiérrez

Juan Miguel Guerrero Montávez

Tesis presentada para
optar al grado de
Doctor en Biología.
Sevilla, 1997.



DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA MEDICA Y
BIOLOGIA MOLECULAR

AVDA. SANCHEZ PIZJUAN, 4
41009 SEVILLA

D. JUAN RAMON CALVO GUTIERREZ y D. JUAN MIGUEL GUERRERO
MONTAVEZ, Profesores Titulares del Departamento de Bioquímica Médica y Biología
Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla,

CERTIFICAN:

que el trabajo titulado " Mecanismo y acciones del péptido intestinal vasoactivo
(VIP) en glándula Harderiana de rata", ha sido realizado en este Departamento por Dña.
María Isabel Caraballo Mauri, bajo la dirección de los Dres. D. Juan Ramón Calvo
Gutiérrez y D. Juan Miguel Guerrero Montávez y cumple con todos los requisitos
necesarios para su presentación como Tesis Doctoral.

Sevilla, Abril de 1997

Fdo.: Dr. J. R. Calvo Gutiérrez

Fdo.: Dr. J. M. Guerrero Montávez



DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA MEDICA Y
BIOLOGIA MOLECULAR

AVDA. SANCHEZ PIZJUAN, 4
41009 SEVILLA

DÑA. CARMEN OSUNA FERNANDEZ, Profesora Titular y Directora del Departamento de Bioquímica Médica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla,

CERTIFICA:

que el trabajo titulado " Mecanismo y acciones del péptido intestinal vasoactivo (VIP) en glándula Harderiana de rata", ha sido realizado en este Departamento por Dña. María Isabel Caraballo Mauri, bajo la dirección de los Dres. D. Juan Ramón Calvo Gutiérrez y D. Juan Miguel Guerrero Montávez y cumple con todos los requisitos necesarios para su presentación como Tesis Doctoral.

Sevilla, Abril de 1997

Fdo.: Dra. Carmen Osuna Fernández

Una parte de los resultados que se exponen en esta tesis doctoral han sido publicados en los siguientes artículos:

"VIP receptor-effector system in rat Harderian gland and its coupling to activation of type II thyroxine 5'-deiodinase".

J. R. Calvo, M. I. Caraballo, D. Pozo, J. S. Segura, C. Osuna y J. M. Guerrero.
Peptides, 1995, 16: 551-557.

"Characterization of binding sites for β -adrenergic agonists and vasoactive intestinal peptide in the rat Harderian gland".

J. M. Guerrero, C. Osuna, P. Molinero, M. I. Caraballo, A. Harmouch, D. Pozo, M. Ráfii-El-Idrissi, J. F. García-Macías y J. R. Calvo.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. C. Osuna, Directora del Departamento de Bioquímica Médica y Biología Molecular por su amable acogida y por su colaboración en todo momento.

A los Dr. J. R. Calvo y J. M. Guerrero, directores de esta tesis, por la amistad que me han brindado y su constante apoyo y orientación en la realización de este trabajo.

A los Dres. Miguel Angel López-González y Juan José Segura, por su colaboración en el inicio de estas investigaciones y su interés en las mismas.

Al resto de Doctores y compañeros del Departamento, por su amistad y ayuda en todo momento.

A mis padres.

INDICE

<u>INTRODUCCION</u>	1
1. LA GLANDULA HARDERIANA.	3
1.1 LOCALIZACION Y MORFOLOGIA.	4
1.2 HISTOLOGIA.	4
1.2.1 Células epiteliales.	5
1.2.2 Células mioepiteliales.	8
1.2.3 El tejido intersticial.	8
1.3 INERVACION.	9
1.4 VASCULARIZACION.	10
1.5 PRODUCTOS DE LA GLANDULA.	10
1.5.1 Lípidos.	10
1.5.2 Porfirinas.	11
1.5.3 Indoles.	14
1.6 HORMONAS.	15
1.6.1 Receptores hormonales.	15
1.6.2 Efecto de las hormonas en la estructura y actividad de la glándula Harderiana.	15
1.6.3 Efectos de las hormonas pituitarias y tiroideas sobre la estructura y actividad de la glándula Harderiana.	16
1.6.3.1 Hormonas pituitarias.	16
1.6.3.2 Hormonas tiroideas.	17
1.7 DESARROLLO ONTOGENICO.	19
1.8 FUNCIONES.	20
2. EL PEPTIDO INTESTINAL VASOACTIVO.	21
2.1 ESTRUCTURA QUIMICA DEL VIP.	21
2.2 LOCALIZACION DEL VIP.	28
2.3 EL GEN DEL VIP. BIOSÍNTESIS DEL VIP.	33
2.4 EL VIP COMO NEUROTRANSMISOR.	35
2.5 ACCIONES BIOLOGICAS DEL VIP.	35
2.6 FISIOPATOLOGIA DEL VIP EN HUMANOS.	46

2.6.1 Aplicaciones terapéuticas.	46
2.7 MECANISMO DE ACCION DEL VIP.	47
2.7.1 Interacción VIP-receptor.	49
2.7.2 Proteínas G.	56
2.7.3 Activación de la adenilato ciclasa.	58
2.7.4 Proteína quinasa dependiente de AMPc.	59
2.7.5 Otros mecanismos de acción del VIP.	60
<u>MATERIAL Y METODO</u>	62
1. MATERIALES.	63
1.1 REACTIVOS.	63
1.2 APARATOS.	64
1.3 ANIMALES.	64
2. METODOS.	65
2.1 AISLAMIENTO DE MEMBRANAS DE CELULAS DE GLANDULAS HARDERIANAS DE RATA.	65
2.1.a Reactivos.	65
2.1.b Método.	65
2.2 DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE PROTEINAS.	66
2.3 MARCAJE DEL VIP CON ¹²⁵ I.	66
2.3.a Reactivos.	66
2.3.b Método.	67
2.3.c Purificación del VIP marcado.	67
2.3.d Cálculo del porcentaje de incorporación.	68
2.3.e Cálculo de la actividad específica.	69
2.4 UNION DEL ¹²⁵ I-VIP A SUS RECEPTORES ESPECIFICOS DE MEMBRANA.	69
2.4.a Reactivos.	69
2.4.b Método general: dosis-efecto.	70
2.4.c Cinética de asociación.	71
2.4.d Concentración de proteínas.	71

2.4.e Degradación del ^{125}I -VIP.	71
2.4.f Cinética de disociación.	72
2.4.g Especificidad.	72
2.4.h Nucleótidos.	73
2.5 DETERMINACION DE LA MASA MOLECULAR RELATIVA DEL RECEPTOR DE VIP MEDIANTE LA TECNICA DE CROSS-LINKING.	73
2.5.1 Cross-linking del ^{125}I -VIP a las membranas.	73
2.5.1.a Reactivos.	73
2.5.1.b Método.	74
2.5.2 SDS-PAGE y autoradiografía.	74
2.5.2.a Reactivos.	74
2.5.2.b Método.	75
2.6 DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ADENILATO CICLASA ESTIMULADA POR VIP EN MEMBRANAS DE GLANDULA HARDERIANA DE RATA.	75
2.6.1 Producción de AMPc.	75
2.6.1.a Reactivos.	75
2.6.1.b Método.	76
2.6.2 Determinación cuantitativa de AMPc.	76
2.6.2.a Reactivos.	77
2.6.2.b Método.	77
2.7 MEDIDA DE LA ACTIVIDAD 5'-DESYODASA (5'-D) TIPO II.	78
2.7.1 Radioyodación de la 3,5,3'-triyodotironina.	78
2.7.1.a Reactivos.	78
2.7.1.b Método.	79
2.7.2 Medida de la actividad 5'-D tipo II.	81
2.7.1.a Reactivos.	81
2.7.1.b Método.	81

2.8 MEDIDA DE LA CONCENTRACION DE PORFIRINAS EN GLANDULAS HARDERIANAS DE RATA.	83
2.8.a Reactivos.	83
2.8.b Método.	83
2.9 TRATAMIENTO ESTADÍSTICO.	84
<u>RESULTADOS</u>	85
1. UNION DEL VIP A SUS RECEPTORES EN MEMBRANAS DE GLANDULA HARDERIANA DE RATA.	86
1.1 EFECTO DEL TIEMPO Y DE LA TEMPERATURA.	86
1.2 EFECTO DE LA CONCENTRACION DE MEMBRANAS.	86
1.3 CINETICA DE DISOCIACION.	91
1.4 ESTUDIO ESTEQUIOMETRICO: DOSIS-EFECTO DE VIP.	91
1.5 ESPECIFICIDAD.	96
1.6 EFECTO DE LOS GUANIL NUCLEOTIDOS SOBRE LA UNION DEL ¹²⁵ I-VIP A MEMBRANAS DE GLÁNDULA HARDERIANA DE RATA.	99
1.7 DETERMINACION DE LA MASA MOLECULAR RELATIVA DEL RECEPTOR DE VIP.	99
1.8 EFECTO DEL VIP EN LA ACTIVIDAD ADENILATO CICLASA.	99
2. ESTUDIO DEL EFECTO <i>IN VIVO</i> DEL VIP SOBRE LA ACTIVIDAD 5'-DESYODASA (5'-D)TIPO II EN GLANDULA HARDERIANA Y EN DIVERSOS ORGANOS DE RATA.	103
2.1 EFECTO DEL VIP EN LA ACTIVIDAD 5'-D EN GLÁNDULA HARDERIANA DE RATA.	103
2.2 EFECTO DEL VIP EN LA ACTIVIDAD 5'-D EN GLÁNDULA PINEAL DE RATA.	103
2.3 EFECTO DEL VIP EN LA ACTIVIDAD 5'-D EN TIMO DE RATA.	106
2.4 EFECTO DEL VIP EN LA ACTIVIDAD 5'-D EN TEJIDO ADIPOSO MARRON (TAM) DE RATA.	106

2.5 EFECTO DEL VIP, SECRETINA, PACAP-27 Y PACAP-38 EN LA ACTIVIDAD 5'-D EN GLÁNDULA HARDERIANA, PINEAL Y TAM DE RATA.	109
2.6 EFECTO DEL VIP Y SUS ANTAGONISTAS EN LA ACTIVIDAD 5'-D EN GLÁNDULA HARDERIANA, PINEAL Y TAM DE RATA.	110
3. EFECTO <i>IN VIVO</i> DEL VIP, ISOPROTERENOL, METOXAMINA, T ₄ E HIPOTIROIDISMO SOBRE LA PRODUCCION DE PORFIRINAS EN GLANDULA HARDERIANA DE RATA.	114
3.1 EFECTO DEL VIP EN LA PRODUCCION DE PORFIRINAS EN GLÁNDULA HARDERIANA DE RATA.	114
3.2 EFECTO DEL VIP Y ANALOGOS DEL VIP EN LA PRODUCCION DE PORFIRINAS EN GLÁNDULA HARDERIANA DE RATA.	118
3.3 EFECTO DEL ISOPROTERENOL, METOXAMINA Y METIMAZOL EN LA PRODUCCION DE PORFIRINAS EN GLÁNDULA HARDERIANA DE RATA.	120
3.4 EFECTO DEL METIMAZOL Y TIROXINA (T ₄) EN LA PRODUCCION DE PORFIRINAS EN GLÁNDULA HARDERIANA DE RATA.	120
<u>DISCUSION</u>	123
1. CARACTERIZACION DEL RECEPTOR DEL VIP EN MEMBRANAS DE GLÁNDULA HARDERIANA DE RATA.	124
2. EFECTO <i>IN VIVO</i> DEL VIP SOBRE LA ACTIVIDAD 5'-DESYODASA (5'-D)TIPO II Y ESTUDIO FARMACOLOGICO (VIP, ANALOGOS Y ANTAGONISTAS) DE LA ACTIVIDAD 5'-D EN GLANDULA HARDERIANA Y EN DIVERSOS ORGANOS DE RATA.	133

3. EFECTO <i>IN VIVO</i> DEL VIP Y OTRAS SUSTANCIAS SOBRE LA PRODUCCION DE PORFIRINAS EN GLANDULA HARDERIANA DE RATA.	137
<u>CONCLUSIONES</u>	141
<u>BIBLIOGRAFIA</u>	144

ABREVIATURAS

Ac	Anticuerpo
AC	Adenilato ciclasa
ACTH	Hormona corticotropa
ADN	Acido desoxirribonucleico
ADNc	Acido desoxirribonucleico cíclico
ADP	Adenosina 5'-difosfato
Ae	Actividad específica
AMPc	Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
ARNm	Acido ribonucleico mensajero
ATP	Adenosina 5'-trifosfato
AT	Actividad total
B	Capacidad de unión de los receptores
BSA	Albúmina sérica bovina
°C	Grado Celsius
CaM	Calmodulina
CCK	Colecistoquinina
Ci	Curio
cpm	Cuentas por minuto
CTP	Citosina 5'-trifosfato
DMSO	Dimetilsulfósido
dpm	Desintegraciones por minuto
DTSP	Succinimidil propionato
DTT	D,L-ditiotreitol
DYN	Dinorfina
5'-D	Tiroxina 5'-desyodasa tipo II
ED₅₀	Dosis efectiva semimáxima
EDTA	Etilen-diamino-tetraacetato sódico
et al.	y colaboradores

Fig.	Figura
FSH	Hormona folículoestimulante
g	Gravedad
GABA	Acido gamma amino butírico
GDP	Guanosina 5'-difosfato
GH	Hormona del crecimiento
GIP	Péptido inhibidor gástrico
GMPc	Guanosina 5'-monofosfato cíclico
Gpp(NH)p	5'-guanililimidodifosfato
GRFh	Factor liberador de hormona del crecimiento humano
GRFr	Factor liberador de hormona del crecimiento de rata
Gs	Proteína G estimuladora
Gi	Proteína G inhibidora
GTP	Guanosina 5'-trifosfato
HB	Tampón fosfato potásico, 1mM de EDTA
HEPES	N-(2-hidroxi-etil)piperazina-N'-(ácido 2-hidroxi-propanosulfónico)
IBMX	3-isobutil-1-metil-xantina
IC₅₀	Concentración inhibidora semimaxima
% I	Porcentaje de incorporación
KDa	KiloDalton
Kd	Constante de disociación
Km	Constante de Michaelis-Menten
LH	Hormona luteinizante
Log	Logaritmo
M	Molar
MbNa	Metabisulfito sódico
min	Minuto
Mr	Masa molecular relativa
NPY	Neuropéptido Y
PACAP	Péptido activador de la adenilato ciclasa pituitaria

PHI	Péptido histidina amino terminal isoleucina-amida carboxi terminal
PHM	Péptido histidina-amino terminal metionina-amida carboxi terminal
PKCα	Proteína quinasa C nuclear
PMSF	Fenil-metil-sulfoni-fluorido
PRL	Prolactina
PTH	Hormona paratiroidea
PTU	6-n-propil-2-tiouracilo
RIA	Radioinmunoanálisis
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sodio sulfato
SEM	Error estándar de la media
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
TAM	Tejido adiposo marrón
TB	Tampón Tris 50 mM, BSA 2% (p/v), pH 7.5
TBB	Tampón Tris, BSA 2%(p/v), bacitracina 2mg/ml, pH 7.5
TCA	Acido tricloroacético
TLCK	N- α -tosil-L-lisina clorometil cetona
Tris	Trihidroximetilaminometano
TSH	Hormona tirotropa
T₃	3,5,3'triyodotironina
T₃r	Triyodotironina reversa
T₄	Tiroxina
UTP	Uridina 5'-trifosfato
VIP	Péptido intestinal vasoactivo

INTRODUCCION

La glándula Harderiana de la rata y de otros mamíferos contiene, además de fibras nerviosas adrenérgicas y colinérgicas, un considerable número de fibras VIPérgicas localizadas en las proximidades de los acinos y rodeadas por vasos sanguíneos (TSUKARA y JACOBIWITZ, 1987) lo cual sugiere un papel del VIP en la fisiología de la glándula.

Sin embargo, aún no se ha caracterizado el receptor para el VIP en la glándula ni se conocen los efectos fisiológicos que ejerce sobre ésta. El objetivo de este trabajo es la caracterización del receptor de VIP y el estudio in vivo de la acción del péptido sobre la actividad del enzima tiroxina 5'-desyodasa tipo II y sobre los niveles de porfirinas.

1. LA GLANDULA HARDERIANA.

La glándula Harderiana fue descrita por primera vez en 1694 por Johann Jacob Harder (1656-1711) en el ciervo. Posteriormente, se ha comprobado que está presente en la gran mayoría de los vertebrados terrestres (BROWNSCHEIDLE y NIEWENHUIS, 1978; SAKAI, 1981; SHIRAMA et al., 1982) estando ausente en ciertos mamíferos como murciélagos, vacas, caballos, carnívoros y primates superiores, siendo rudimentaria en monos y no existiendo en el hombre, aunque se han encontrado vestigios en fetos humanos de 11 a 30 semanas y en adultos con anormalidades (KENNEDY, 1970). Para el estudio de esta glándula nos centraremos sobre todo en la de mamíferos y en concreto en el grupo de los roedores.

1.1 LOCALIZACION Y MORFOLOGIA.

En mamíferos, la glándula Harderiana se halla localizada en la zona medioposterior de la cavidad ocular, abriendo su conducto generalmente a la superficie de la membrana nictitante. Es una glándula túbuloalveolar exocrina cuyo número de lóbulos es variable según la especie. En ratas, la glándula Harderiana es alargada, irregular y cubre gran parte de la superficie posterior del globo ocular y el borde orbital (VENERABLE y GRAFFIN, 1940) mide de 10 a 12 mm de longitud por unos 7 de ancho y de 3 a 4 mm de grosor aproximadamente.

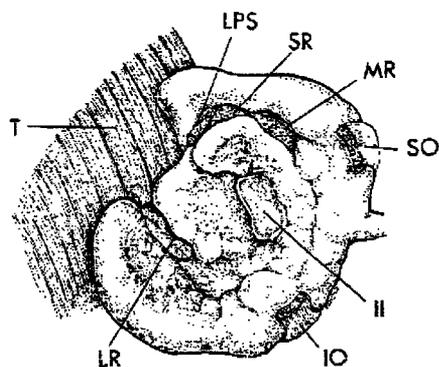


Fig.1. Glándula Harderiana de rata y estructuras anexas. II, nervio óptico; LPS, LR, MR, SR, IO, SO, diversos músculos de la zona; T, músculo temporal. (Tomado de PAYNE, 1994 con modificaciones).

1.2 HISTOLOGIA.

La histología de esta glándula es la típica de las glándulas exocrinas. Los túbulos se encuentran rodeados por una red de células epiteliales, poseyendo depósitos de porfirinas intraluminales. El tejido intersticial es generalmente escaso, pudiendo contener grandes agregaciones de tejido linfoide, los vasos sanguíneos son capilares fenestrados y sinusoides y se encuentra envuelta por una cápsula de colágeno y una capa externa de células endoteliales del seno venoso orbital (DJERIDANE, 1992).

1.2.1 Células epiteliales.

En mamíferos, se han descrito hasta tres tipos distintos de estas células. Según la especie, y a veces el sexo, se pueden encontrar desde uno hasta los tres tipos. En roedores, existe normalmente dos tipos: el A y el B, cuyas diferencias celulares son apreciables incluso desde los primeros estadios del desarrollo. Ambas coexisten en el mismo alvéolo (BROWNSCHEILLE y NIEWENHUIS, 1978). Generalmente, las células tipo A poseen grandes vacuolas secretoras (de más de $2.5 \mu\text{m}$ de diámetro) que contienen lípidos y material granular filamentoso. En el tipo B se encuentran numerosas vacuolas secretoras mas pequeñas que las anteriores ($1.7 \mu\text{m}$ de diámetro como máximo), así como gran número de mitocondrias, un extenso retículo endoplásmico y aparato de Golgi (WATANABE, 1980; BROWNSCHEIDLE y NIEWENHUIS, 1978). Las células tipo A se encuentran en mayor proporción que las B (BROWNSCHEIDLE y NIEWENHUIS, 1978). En ratas, tanto las células tipo A como las B se caracterizan por poseer un retículo endoplásmico bien desarrollado y se diferencian en cuanto a tamaño, número (las A suelen ser mas numerosas que las B) y contenido en vacuolas lipídicas, ya que el A tiene grandes vacuolas lipídicas, mientras que en el B son pequeñas, (DJERIDANE, 1992). En el hámster, aparece un marcado dimorfismo sexual en cuanto al tipo de célula. Así, en hembras sólo se ha encontrado el tipo celular B, mientras que en machos existen ambos (HOFFMAN, 1971) (Fig.2a y 2b). Este dimorfismo parece estar regulado por hormonas sexuales, en concreto por andrógenos, ya que la castración de machos lleva a que las glándulas sólo presenten el tipo B, desapareciendo el A y presentando así una estructura típica de glándula femenina (LIN y NADAKAVUKAREN, 1979). Si a los machos castrados administramos andrógenos, aparecen de nuevo las células tipo A (PAYNE et al., 1977). Dando andrógenos a hembras, aparece el tipo celular A (SUN y NADAKAVUKAREN, 1980).

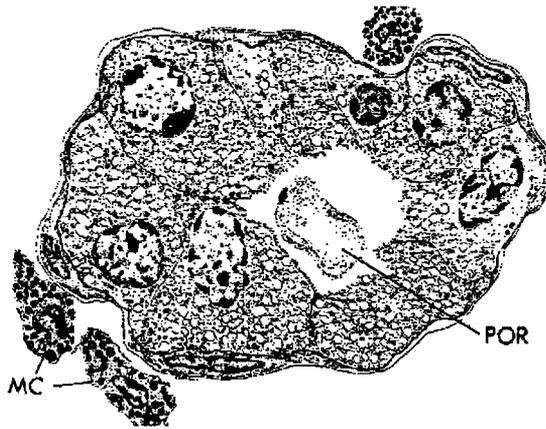


Fig.2a. Morfología de las células tipo B en glándula Harderiana de hámster hembra. Obsérvense además las células cebadas (MC) y los acúmulos luminales de porfirinas (POR). (Tomado de PAYNE, 1994 con modificaciones).

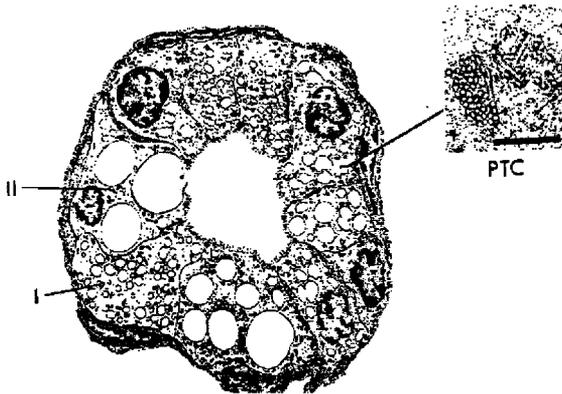


Fig.2b. Células tipo A (II) y B (I) en glándula Harderiana de hámster macho. PTC: complejo politubular (la barra equivale a 25 μm). (Tomado de PAYNE, 1994 con modificaciones).

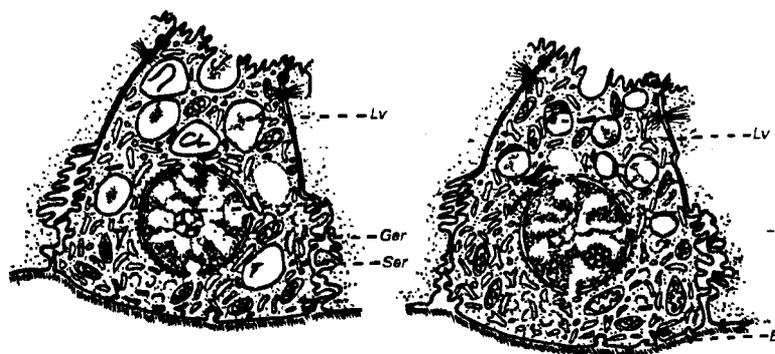


Fig.3. Célula tipo A (izquierda) y tipo B (derecha) de glándula Harderiana de rata.
Lv: vesículas lipídicas; Bl: lámina basal. (Tomado de PAYNE, 1994 con modificaciones).

1.2.2 Células mioepiteliales.

Son una constante en estas glándulas. Están interpuestas entre la superficie basal de las células epiteliales y la membrana que rodea al túbulo. Normalmente, tienen forma estrellada con una porción central que contiene un núcleo elongado y la mayoría de los orgánulos. Posee extensiones citoplasmáticas que contienen fibrillas contráctiles de 6-7 nm de anchas. Por analogía con las células del músculo liso, se cree que estas fibrillas son de actina (STRUM y SHEAR, 1982).

Las células mioepiteliales forman una red contráctil alrededor del sistema tubular de la glándula, ayudando así a la secreción del producto de ésta. Del CACHO et al., 1991, proponen que estas células pueden transformarse a miofibroblastos, los cuales pueden formar colágeno (ODA et al., 1990) y secretar moléculas presentadoras de antígenos como la fibronectina (Del CACHO et al., 1993).

1.2.3 El tejido intersticial.

Constituye un tejido relativamente escaso en glándula Harderiana. Presenta fibras de colágeno, fibroblastos, células cebadas, macrófagos, melanocitos y células inmunocompetentes.

Los fibroblastos se caracterizan por poseer un retículo endoplásmico granular muy desarrollado, además de complejo de Golgi, mitocondrias y ribosomas.

Las células cebadas o mastocitos se encuentran localizados en el hámster cerca de los vasos sanguíneos, nervios y macrófagos (PAYNE et al., 1982). Son esféricas u ovoides y entre 10-14 μm de diámetro aproximadamente (excluyendo los micropili y pliegues). En el citoplasma aparecen numerosos gránulos secretorios que muestran un amplio rango de tamaños. Normalmente, los gránulos mas grandes se unen con los de al lado, dando lugar a la formación de un canal intracelular implicado en el mecanismo de secreción (LAGUNOFF, 1972).

En el ratón, los macrófagos son grandes células poligonales, con núcleo generalmente irregular y citoplasma con numerosos ribosomas y membranas ligadas a fagosomas. A veces los macrófagos contienen gránulos de melanina, lo que sugiere que éstos fagocitan a melanocitos (SHIRAMA et al., 1988).

Se han descrito dos tipos distintos de melanocitos en el ratón. El primero, de forma irregular, con citoplasma denso, un basto retículo endoplásmico y aparato de Golgi, mitocondrias y granos de melanina. El segundo es más regular, con gránulos de melanina maduros unidos a la membrana y citoplasma poco denso. Parece ser que ambos tipos de células pertenecen a un mismo tipo celular, ya que se han encontrado formas intermedias entre ambas.

Las glándulas Harderianas de muchas especies contienen gran número de células inmunocompetentes. Son generalmente células plasmáticas, aunque también se han encontrado otros tipos tales como linfocitos, células dendríticas y granulocitos eosinófilos (SCHRAMM, 1980).

1.3 INERVACION.

Se han encontrado fibras nerviosas autónomas en glándula Harderiana de hámster (BUCANA y NADAKVUKAREN, 1972a; 1972b) y de ratas (HUHTALA et al., 1977) entre otras especies. Los alvéolos de la glándula parecen recibir inervación de tipo colinérgico (GARDINER et al., 1962; BROWNSCHIEDLE y NIEWENHUIS, 1978), localizándose estas fibras entre el tejido conectivo alrededor de la glándula y en el interior de los canales de ésta (NORWELL y CLABOUGH, 1972). En ratas, la inervación colinérgica deriva del ganglio pteridopalatino (HUHTALA et al., 1977), el cual inerva de igual modo la glándula lacrimal (RUSKELL, 1971). En las terminaciones nerviosas se encuentran una serie de vesículas claras localizadas en rata cerca de la lámina basal de las células secretoras. Se ha encontrado también una inervación de tipo adrenérgica tanto en ratas (HUHTALA et al., 1977) como en hámster (NORWELL y CLABOUCH, 1972) que llega hasta los vasos sanguíneos de la glándula Harderiana. En las terminaciones nerviosas de dichas fibras se hallan numerosas vesículas con un núcleo denso electrónicamente. Se ha demostrado recientemente que en rata existe además de las inervaciones anteriores otra de tipo peptidérgica. Usando técnicas inmunohistoquímicas, se han observado inervaciones peptidérgicas en su mayoría tipo VIP y colecistoquinina y otras pocas que contienen neurotensina, neuropéptido Y y péptido relacionado con el gen de la calcitonina (TSUKARA y JACOBOWITZ, 1987).

Parece ser que el VIP está presente en neuronas parasimpáticas sin mielina y posiblemente actúe como un vasodilatador, tanto en la glándula Harderiana como en la lacrimal, siendo probablemente además un estimulador de la secreción proteica (BUTLER et al., 1984). Tanto en ratas como en hámsters se ha encontrado además somatostatina, variando en el hámster los niveles con el sexo y con manipulaciones hormonales (PUIG-DOMINGO et al., 1988).

La oxitocina, arginina, vasopresina y la neurofisisina también se encuentran en la glándula Harderiana, sufriendo además un ritmo día-noche (GAUQUELIN et al., 1988). No se conoce mucho sobre el papel que estos péptidos realizan en la glándula Harderiana.

1.4 VASCULARIZACION.

En roedores, la glándula Harderiana se encuentra muy vascularizada. En ratón, los capilares son fenestrados y localizados cerca de las células secretoras (STRUM y SHEAR, 1982). En hámster y rata son largos, variables y sinusoidales (MENENDEZ-PELAEZ et al., 1990).

En ratas, el suministro arterial se realiza por la bifurcación anterior de la vena oftálmica y los vasos se extienden a través del tejido conectivo asociado a células secretoras (GREENE, 1935). El drenaje venoso de la glándula es vía vena oftálmica (SLONAKER, 1918) o en el interior del seno venoso retroorbital en las especies que lo posean.

El sistema linfático de la glándula Harderiana es extenso, aunque no se han realizado muchos estudios sobre él.

1.5 PRODUCTOS DE LA GLANDULA.

La glándula Harderiana de roedores se comporta como una glándula mixta, segregando principalmente lípidos, porfirinas e indoles.

1.5.1 Lípidos.

Constituyen el producto mayoritario de secreción exocrina en la gran mayoría

de los mamíferos, siendo más del 35% del peso seco de la glándula (WATANABE, 1980).

Algunos autores han mantenido que el mecanismo de liberación de lípidos es tipo apocrino (TSUTSUMI et al., 1966) aunque actualmente se acepta que se excretan mayoritariamente por exocitosis (WOODING, 1980). Como consecuencia de esto, se observan acúmulos de lípidos en las vacuolas secretorias de las células tipo A y B. En hámster, existe un dimorfismo sexual en cuanto a la composición lipídica y en concreto respecto a la longitud de la cadena de los ácidos grasos (LIN y NADAKAVUKAREN, 1981). Tanto en hámster como en ratón, se ha encontrado como lípido mayoritario de secreción el 1-alkil-2,3-diacilglicerol (LIN y NADAKAVUKAREN, 1981) mientras que en rata son lípidos tipo cériidos.

1.5.2 Porfirinas.

Constituyen el producto mayoritario de secreción de la glándula Harderiana de roedores.

Las porfirinas son moléculas formadas por un anillo tetrapirrólico con distintos sustituyentes que dan lugar a las distintas protoporfirinas, siendo de todas ellas la protoporfirina IX (Fig.4) la precursora del grupo hemo (molécula que actúa como grupo próstetico de muchas proteínas como hemoglobina, mioglobina, catalasa, peroxidasa y citocromo C) la que se encuentra presente en la mayoría de los sistemas biológicos. La protoporfirina IX es la que se encuentra en mayor proporción en homogenados de células de glándulas Harderianas de ratas (JACKSON et al., 1976). Se ha encontrado además en ratas, una porfirina tricarbóxílica denominada harderoporfirina (KENNEDY, 1970) que se sintetiza en las células epiteliales de la glándula. La biosíntesis de porfirinas en harderianas, requiere enzimas mitocondriales y citoplasmáticas, siendo de todas ellas la más importante la enzima mitocondrial 5-aminolevulín sintetasa (MENENDEZ-PELAEZ et al., 1991) (Fig.5).

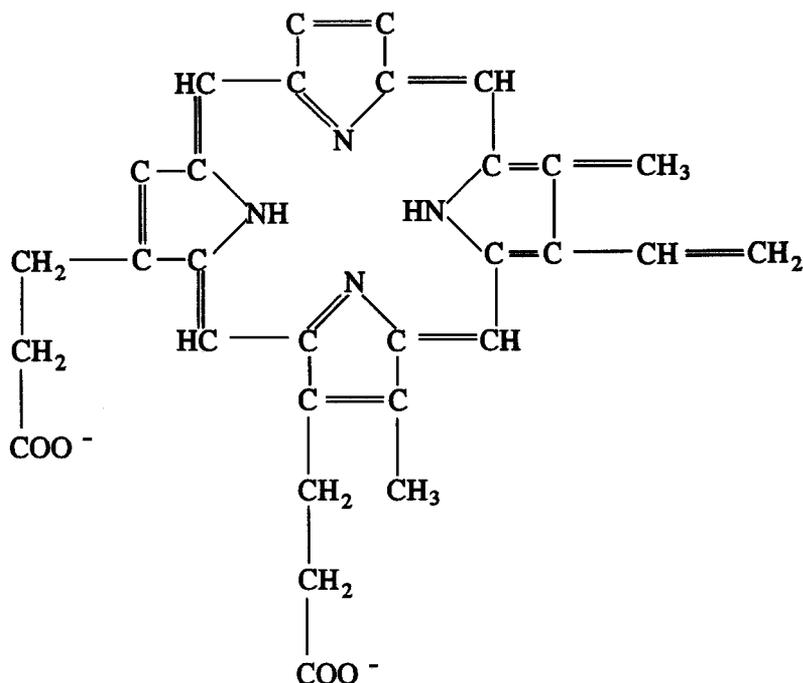


Fig.4. Molécula de protoporfirina IX.

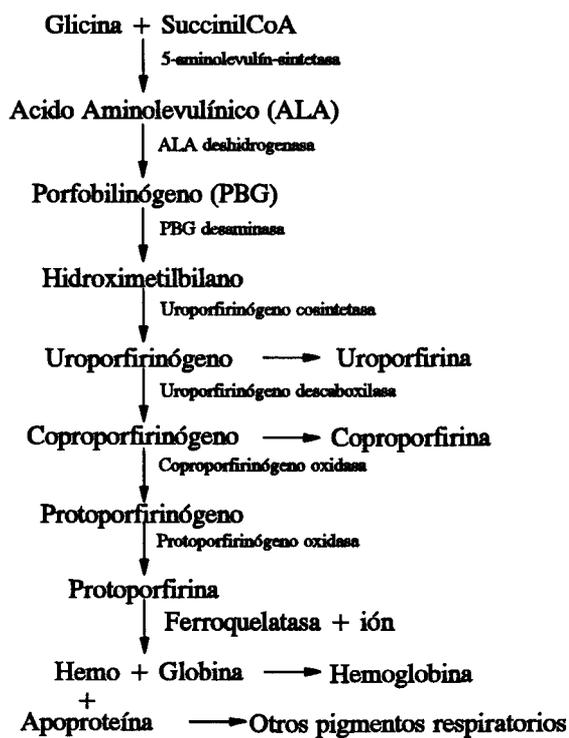


Fig.5. Esquema de la biosíntesis de porfirinas y del grupo hemo.

No está claro cómo se liberan las porfirinas de las células epiteliales. La mayoría de los autores creen que se almacenan en el interior de vacuolas lipídicas (STRUM y SHEAR, 1982). CARRIERE, (1985) demuestra la existencia de cristales de porfirinas en el citoplasma de algunas células epiteliales en glándulas Harderianas de ratas. La presencia de éstos está acompañada por dilataciones inusuales de las vesículas del retículo endoplásmico, sugiriendo CARRIERE que es un indicio de muerte celular. De acuerdo con estas hipótesis, las porfirinas son liberadas por un mecanismo holocrino y no por el típico de secreción de lípidos que es de tipo merocrino. En ratas, el mecanismo de secreción es holocrino mayoritariamente (CARRIERE, 1985).

El contenido total de porfirinas en glándulas Harderianas muestra una considerable variación entre individuos de distintas especies, existiendo incluso especies en la que existe un marcado dimorfismo sexual, siendo generalmente la hembra la que contiene una mayor proporción de porfirinas (PAYNE et al., 1992), lo cual sugiere un control hormonal de los niveles de porfirinas. En roedores, el marcado dimorfismo sexual presente en las células epiteliales se refleja en la síntesis de porfirinas: la hembra produce más porfirinas que el macho, ya que ésta se produce principalmente en las células tipo B, que son más abundantes en hembras que en machos (WATANABE, 1980), por lo que la actividad 5-aminolevulin sintetasa es mayor en hembras (LIN y NADAKAVUKAREN, 1982). La castración de hámsters machos hace que las glándulas Harderianas produzcan niveles de porfirinas semejantes a los producidos por hembras (HOFFMAN, 1971). Si a estos machos se les trata posteriormente con andrógenos, los niveles de porfirinas vuelven a la normalidad. La ovariectomía o el tratamiento con andrógenos en ratas hembra produce una bajada de la concentración de porfirinas (ULRICH et al., 1974). Por tanto, todo esto parece indicar que la síntesis de porfirinas está regulada por las hormonas sexuales. En este sentido, se han encontrado receptores androgénicos en la glándula (VILCHIS et al., 1987). Otros factores que también parecen influenciar los niveles de porfirinas son la luz y el sistema visual. WETTERBERG et al., (1970) observaron que los niveles de porfirinas en glándulas Harderianas de ratas se incrementan rápidamente a los doce días de edad, coincidiendo con la maduración de la zona cortical responsable de los estímulos visuales. ULRICH

et al., (1974) demuestran que en luz continua o bien en oscuridad durante 35 días, decrecen significativamente los niveles de porfirinas en ratas. Existe una estrecha relación entre el contenido en porfirinas y las variaciones en la intensidad lumínica (WETTERBERG, 1972). La administración de pulsos de luz a ratas producen un aumento de la secreción de porfirinas al saco conjuntival, lo cual podría tener como objeto que éstas funcionaran como un filtro que protege al ojo de la luz (HUGO et al., 1987).

1.5.3 Indoles.

La producción de indoles, como la melatonina, se da principalmente en la pineal, aunque también se produce en otros órganos como glándulas Harderianas y retina. La glándula Harderiana ha sido considerada como un eslabón del eje retino-pineal (WETTERBERG et al., 1970; REITER et al., 1983) identificándose en éstas distintos tipos de indoles y sus enzimas asociados, encontrándose entre ellos la melatonina y la N-acetil serotonina (BUBENIK et al., 1976). Se han identificado indoles en glándulas Harderianas de gran número de especies de roedores y reptiles (VIVIEN-ROELS et al., 1981) y aves (COGBURN, 1987).

En cuanto a la síntesis de indoles, MENENDEZ-PELAEZ y BUZZELL (1992) han encontrado evidencias de que:

- 1) Los indoles han sido producidos dentro de la glándula Harderiana.
- 2) Se han sintetizado fuera de la glándula.
- 3) Ocurren ambos mecanismos.

Por lo tanto, la presencia de indoles en glándulas Harderianas no necesariamente implica que éstos se hayan sintetizado en esta glándula.

Entre los factores que controlan el nivel de indoles en glándulas Harderianas se encuentran los siguientes:

- 1) Diferencias sexuales y hormonales: las glándulas de hámster hembra tiene niveles mas altos de melatonina que las del macho (HOFFMAN et al., 1985).
- 2) Ritmo: los niveles máximos de melatonina y serotonina se alcanzan en periodo de oscuridad y bajan en presencia de luz (HOFFMAN et al., 1985).

3) Factores estacionales: BALEMANS et al., (1983) encontró que la 5-metoxitriptamina y el triptófano se encuentran ausentes durante el verano en las glándulas Harderianas de hámster.

1.6 HORMONAS.

1.6.1 Receptores hormonales.

Se han descrito distintos tipos de receptores hormonales en glándulas Harderianas tales y como receptores androgénicos en glándulas Harderianas de ratas macho (GUSTAFSSON y POUSETTE, 1975) y de hámsters macho y hembra (VILCHIS et al., 1987); receptores para otras hormonas esteroideas tal y como el estradiol en hámster (VILCHIS y PEREZ-PALACIOS, 1989) y ratas (VILCHIS et al., 1992) y receptores para glucocorticoides en hámsters (VILCHIS y PEREZ-PALACIOS, 1989) y otros roedores (VILCHIS et al., 1992). Sin embargo, no se han encontrado receptores de progesterona en glándulas Harderianas de mamíferos, pero sí en reptiles (VILCHIS et al., 1992).

1.6.2 Efecto de las hormonas en la estructura y actividad de la glándula Harderiana.

La mayoría de estos estudios se han realizado en el hámster, una especie cuya glándula Harderiana presenta un gran dimorfismo sexual que parece ser debido a las hormonas. Así, la castración de machos adultos hace que la glándula Harderiana se ajuste tanto morfológica como bioquímicamente al modelo femenino (PAYNE et al., 1977). En cambio, si a los machos castrados se le suministra andrógenos, la glándula se vuelve a ajustar al patrón masculino (HOFFMAN, 1971). La administración de andrógenos a hembras adultas, inducirá la aparición de células tipo A, complejos politubulares y un marcado decremento de los niveles de porfirinas (SUN y NADAKAVUKAREN, 1980). La distinta proporción de ácidos grasos (LIN y NADAKAVUKAREN, 1981), composición de proteínas (HOH et al., 1984), concentraciones de iones metálicos (HOFFMAN y JONES, 1981), somatostatina (PUIG-DOMINGO et al., 1988) e indoles (HOFFMAN et al., 1985), pueden modificarse por

la manipulación de los niveles de andrógenos.

El ovario juega un papel menos importante en el control de la estructura y actividad de la glándula de hámster hembra (SPIKE et al., 1985). La ovariectomía lleva a una serie de progresivos cambios degenerativos en la glándula Harderiana y lo mismo ocurre en las hembras una vez acabado el periodo reproductivo (SPIKE et al., 1988). No está claro cómo actúan los productos ováricos sobre la glándula, aunque es sabido que ésta posee receptores para el estradiol (VILCHIS y PEREZ-PALACIOS, 1989).

1.6.3 Efectos de las hormonas pituitarias y tiroideas sobre la estructura y actividad de la glándula Harderiana.

1.6.3.1 Hormonas pituitarias.

Parece ser que las hormonas pituitarias tales como la prolactina, se encuentran implicadas en el control de la glándula Harderiana. Cortando el tallo pituitario o trasplantando la pituitaria a un lugar periférico, se suprime el control ejercido por el hipotálamo sobre la hipófisis, siendo entonces su principal producto de secreción la prolactina, que es inhibida por la dopamina. Si se realiza este proceso en hámsters machos, se observa una feminización de la glándula Harderiana, desapareciendo las células tipo A y aumentando el nivel de porfirinas (BUZZELL y MENENDEZ-PELAEZ, 1992). La administración de bromocriptina (un agonista de la dopamina) evita la feminización de la glándula Harderiana en hámsters castrados. En hámsters hembras a los que se les han quitado los ovarios, la administración continua de bromocriptina lleva a la supresión de la síntesis de porfirinas y a la masculinización de la glándula. Estos cambios pueden suprimirse por la administración simultánea de prolactina. Por tanto, en hámster parece ser que la prolactina puede actuar como un regulador fisiológico adicional de la glándula tanto a nivel estructural como de síntesis de porfirinas. En ratas, VAUGHAN et al., (1988) concluyen que la prolactina ejerce un importante control sobre las enzimas lisosomales. En ratas, se ha encontrado inmunoreactividad a la vasopresina en el citoplasma de las células del ducto excretorio de la glándula Harderiana (DJERIDANE, 1992). Se ha demostrado que tras el ejercicio

físico en ratas se incrementa el contenido en vasopresina en glándula Harderiana, concluyéndose que esta variación con respecto a los niveles basales puede estar ligada al incremento de temperatura y al balance osmótico, lo cual no excluye otras funciones tales y como la modulación del ducto excretorio de la harderiana y el consiguiente transporte hacia el canal nasolacrimal (DJERIDANE, 1992).

1.6.3.2 Hormonas tiroideas.

La conversión de tiroxina (T_4) producida en el tiroides a la hormona activa 3,5,3'triyodotironina o T_3 mediante la desyodación del anillo fenólico es realizada por el enzima tiroxina 5'-desyodasa, la cual posee dos isoenzimas, la tipo I y la tipo II, que actúan en tejidos distintos. Ambos tipos llevan a cabo la conversión de T_4 a T_3 . La tipo I, además puede producir una desyodación del anillo tirosil, dando lugar a la T_3 reversa (T_{3r}) (Fig.6). La desyodasa es un enzima que juega un importante papel en mantener los niveles intracelulares de T_3 (KAPLAN, 1984) y como defensa ante la deficiencia de esta hormona (VISSER et al., 1983).

La desyodasa tipo I es una proteína intrínseca de membrana localizada principalmente en el hígado (VISSER et al., 1978) y riñón (LEONARD y ROSENBERG, 1978) aunque se puede encontrar en la mayoría de los tejidos incluido el tiroides donde hay una alta actividad específica. Este enzima posee una Km de 0.5 μ M, siendo muy sensible a la inhibición por 6-n-propil-2-tiouracilo (PTU) y por ácido iopanoico (LEONARD, 1990). Su actividad depende principalmente de la estimulación por TSH, la cual está encargada de mantener los niveles globales de T_3 en suero.

La tiroxina 5'-desyodasa tipo II está presente en varios tejidos como cerebro (CRANTZ y LARSEN, 1980), pituitaria anterior (KAPLAN, 1980), tejido adiposo marrón (LEONARD et al., 1982), glándulas Harderianas (GUERRERO et al., 1987), timo (VAN DOORN et al., 1986), pineal (TANAKA et al., 1986), y queranocitos (KAPLAN et al., 1988) entre otros. Tiene una Km de 3.3 nM y es inhibida por ácido iopanoico y por T_4 , siendo estimulada por DTT y moderadamente sensible a la acción del PTU (GUERRERO et al., 1987).

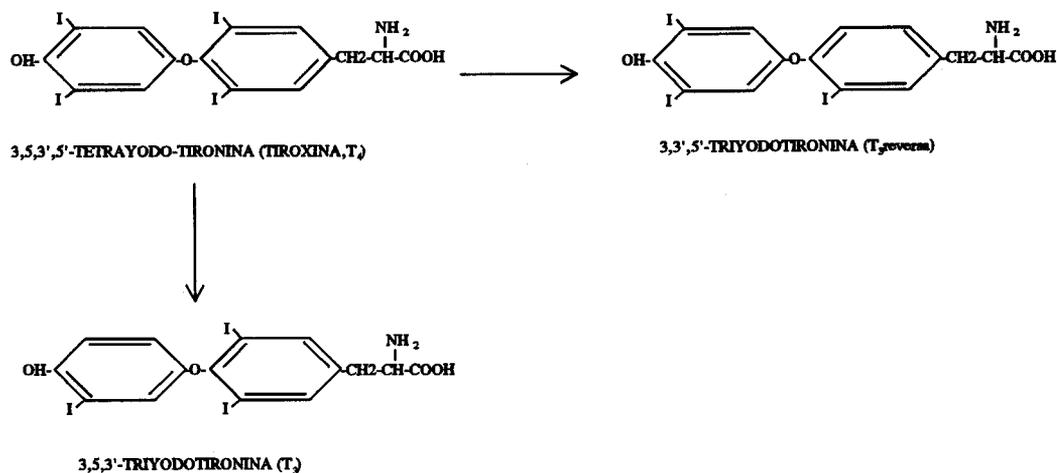


Fig. 6. Desyodación de la tiroxina por el enzima tiroxina 5'-desyodasa.

En glándulas Harderianas de ratas se ha encontrado que la actividad del enzima tiroxina 5'-desyodasa (actividad 5'-D) tipo II aumenta en el hipotiroidismo con respecto a los valores basales (GUERRERO et al., 1987). La exposición de los animales a bajas temperaturas parece modular la actividad enzimática tanto en harderianas como en otros tejidos (GUERRERO et al., 1990b). La actividad 5'-D tipo II en glándula Harderiana de rata muestra un marcado ritmo día-noche (GUERRERO et al., 1989). En un día de 14L:10D, el pico es máximo ocho horas después de apagarse la luz (GUERRERO et al., 1987,1989). Se ha comprobado que este ritmo puede alterarse si se cambian el número de horas de luz/oscuridad, es decir, el fotoperiodo (VAUGHAN et al., 1991). Parece ser que este ritmo está controlado por mecanismos adrenérgicos, ya que el isoproterenol (un β -agonista) causa un aumento de la actividad enzimática, al igual que ocurre durante el periodo de oscuridad (GUERRERO et al.,1989). El ganglio cervical superior está implicado en esta regulación adrenérgica (OSUNA et al., 1992). Se ha

comprobado que los receptores β - y α -adrenérgicos, regulan la actividad del enzima tiroxina 5'-desyodasa tipo II (RUBIO et al., 1991a; 1991b).

Por otro lado, inyecciones de T_4 o T_3 bajan los niveles de porfirinas en glándulas Harderianas de hámsters hembras y machos castrados, anulando así la esperada elevación del nivel de porfirinas en éstos (HOFFMAN et al., 1989, 1990). También se ha observado que tanto en animales hipotiroideos como en hipertiroideos se tiende a reducir la concentración de porfirinas (BUZZELL y MENENDEZ-PELAEZ, 1992).

Tanto la tiroidectomía como la hipofisectomía en ratas trae como consecuencia una disminución del peso de la glándula Harderiana, la cual puede volver a su peso normal por tratamiento con tiroxina (EBLING et al., 1975).

1.7 DESARROLLO ONTOGENICO.

No se tienen muchos datos sobre la glándula Harderiana durante el periodo de desarrollo. Desde el nacimiento presenta ya una diferenciación de tipo sexual respecto al tipo de células existentes y a su morfología (FERIA-VELASCO et al., 1983). Sobre el día 14 después del nacimiento tiene lugar la apertura ocular, produciéndose entonces en la glándula Harderiana una rápida alteración en la morfología celular acompañada de un incremento de la secreción.

Los valores máximos de actividad 5'-D tipo II se alcanzan durante la primera semana de vida, disminuyendo gradualmente a medida que el individuo se hace adulto. (OSUNA et al., 1990).

Respecto a las porfirinas, la secreción aparece en la primera semana de vida y aumenta rápidamente a los 12 días tras el nacimiento, aumento que coincide con la maduración de las primeras respuestas a los impulsos visuales (WETTEBERG et al., 1970)

1.8 FUNCIONES.

Se ha aceptado que la función primordial de la glándula Harderiana es la contribución a la lubricación de la zona ocular, pero se ha demostrado la existencia de otras funciones en roedores tales y como:

1)FOTOPROTECCION: las secreciones de la glándula Harderiana en roedores (en concreto las porfirinas) contribuyen a la fotoprotección (HUGO et al., 1987). La rápida respuesta existente en ratas respecto a las condiciones de luz ambiental, junto a que las porfirinas son moléculas que absorben luz ultravioleta, ha sido interpretado como que las porfirinas poseen una función fotoprotectora del ojo.

2)FUENTE DE FEROMONAS: la glándula Harderiana de muchos mamíferos y entre ellos la de roedores, parece ser que actúa como fuente de feromonas. Así, esta glándula acumula selectivamente el precursor de una determinada feromona esteroidea (THIESSEN et al., 1976). Se ha demostrado que al realizarse una harderianactomía a gerbils machos, decrece la respuesta agresiva hacia éstos por parte de los otros gerbils, así como la pérdida del interés de las hembras hacia éstos (THIESSEN y HARRIMAN, 1986). Igual se ha observado en hámsters (PAYNE, 1977). La influencia directa de las gónadas en la glándula Harderiana vía androgénica parece determinar la producción de feromonas en la glándula Harderiana del macho.

3)TERMORREGULACION: el contenido lipídico de las secreciones de la glándula Harderiana actúa en la termorregulación a bajas temperaturas, tal y como ocurre en el gerbil, donde la harderianectomía reduce la resistencia al frío y humedad. No existen evidencias de esta termorregulación en rata, ratón y hámster (THIESSEN y KITTRELL, 1980).

2. EL PEPTIDO INTESTINAL VASOACTIVO.

El péptido intestinal vasoactivo (VIP) es un octacosapéptido aislado por SAID y MUTT en 1970 a partir de intestino porcino. Debe su nombre al origen y a la vasodilatación sistémica que producía en perros (SAID y MUTT, 1970). Aunque al principio fue considerado como una hormona intestinal, el posterior descubrimiento de su localización neuronal (LARSSON et al, 1976) hizo que se le considerara como un neurotransmisor o neuromodulador ampliamente distribuido en neuronas tanto del sistema nervioso central como del sistema nervioso periférico (ROSTENE, 1984).

El VIP es un regulador de muchas funciones biológicas distintas en diferentes órganos y tejidos. Entre ellas se encuentran la regulación de la secreción endocrina y exocrina, la estimulación de la secreción de agua y electrolitos, la relajación del músculo liso, la regulación del flujo sanguíneo y una actividad neuroendocrina e inmunitaria (SAID, 1986).

Los efectos biológicos del VIP son posibles gracias a su interacción con receptores específicos de membranas en las células blanco.

2.1 ESTRUCTURA QUIMICA DEL VIP.

El VIP es un péptido de naturaleza básica de 28 aminoácidos cuyo peso molecular es de 3326 Da, presenta una histidina en el extremo N-terminal y una asparagina en el C-terminal (Fig. 7). Fue secuenciado por sus propios descubridores (SAID y MUTT, 1972) y sintetizado por BODANSZKY et al., 1974.

H S D A V F T D N Y T R L R K Q M A V K K Y L N S I L N

Fig.7. Secuencia aminoacídica del VIP (humano, porcino, y rata). Las claves utilizadas son: A, alanina; D, ácido aspártico; E, ácido glutámico; F, fenilalanina; G, glicina; H, histidina; I, isoleucina; K, lisina; L, leucina; M, metionina; N, asparagina; Q, glutamina; R, arginina; S, serina; T, treonina; V, valina; W, triptófano; Y, tirosina.

Al fragmentar la molécula de VIP, los fragmentos de cadenas de aminoácidos obtenidos muestran siempre menor potencia de acción que la molécula de VIP completa, es decir, que el peptido de 28 aminoácidos. Así, fragmentos pequeños de VIP, poseen una actividad muy débil, llegando incluso a convertirse en algunos tejidos en antagonistas, como ocurre con el VIP₁₀₋₂₈ en intestino de cobaya (GRIDER y RIVIER, 1990). La acción se incrementa al aumentar el número de aminoácidos de la cadena (BODANSZKY et al., 1973). Los estudios de estructura/función realizados indican que es necesaria toda la molécula, y que ninguna secuencia parcial del VIP es capaz de emular por completo la potencia y afinidad de la secuencia aminoacídica completa (COUVINEAU et al., 1984). Se ha destacado la importancia de seis residuos de aminoácidos de la molécula para la actividad biológica del péptido. Estos son: Asp³, Phe⁶, Thr⁷, Tyr¹⁰, Tyr²² y Leu²³ (O'DONNELL et al., 1991). La eliminación de la His N-terminal de la molécula de VIP, disminuye la afinidad del VIP por su receptor unas 80 veces (COUVINEAU et al., 1984), aunque sigue siendo capaz de estimular la actividad de la adenilato ciclasa.

La estructura tridimensional del VIP ha sido expuesta por FRY et al., 1989, observándose que en soluciones acuosas, el VIP presenta una estructura terciaria en forma de ovillo y dispuesta al azar, mientras que en presencia de detergentes o solventes lipídicos y orgánicos se induce la formación de una hélice en la región central de la molécula (ROBINSON et al., 1982; FRY et al., 1989). La proyección de Schiffer-Edmundson del VIP como una π -hélice revela la segregación de los residuos polares y apolares en caras opuestas de la hélice y el carácter anfipático, que es evidente cuando el VIP es modelado como una α -hélice distorsionada (MUSSO et al., 1988). Estas observaciones han sugerido un papel de la hélice anfifílica en el reconocimiento del VIP por las células diana. La formación de una hélice puede facilitar la unión a receptores proteicos y también provocar interacciones directas con los lípidos de la membrana. Parece ser, que este tipo de estructura es la que adopta el VIP durante la interacción con el receptor (LUIS et al., 1988).

Los péptidos helicoidales anfifílicos son conocidos por formar agregados ordenados que exponen residuos aminoacídicos apolares a los solventes y mantienen los

residuos polares dentro del agregado. Estos agregados se unen a membranas lipídicas debido a efectos hidrofóbicos, teniendo lugar al mismo tiempo interacciones electrostáticas entre los residuos peptídicos cargados y los grupos de cabeza de los fosfolípidos. Se han descrito este tipo de interacciones en la melitina, el péptido venenoso de avispa, el GRF, un fragmento sintético de la β -FSH y el factor de necrosis tumoral. Se han descrito interacciones directas del VIP con la membrana (NODA et al., 1994), observándose una asociación directa del VIP marcado con vesículas de fosfatidil-colina, lo cual puede explicar algunas asociaciones del VIP. Se ha demostrado que los detergentes aniónicos y los lípidos inducen la formación de una hélice en la molécula de VIP, secretina y glucagón (ROBINSON et al., 1982), la cual parece ser que puede jugar un papel fisiológico importante, ya que puede modificar la interacción del VIP con su receptor.

La estructura del VIP se ha conservado muy bien durante la evolución, lo cual puede indicarnos su importante papel fisiológico. La secuencia de aminoácidos es idéntica en el cerdo (SAID y MUTT, 1972), vaca (CARLQUIST et al., 1979), perro (WANG et al., 1985), conejo (MUTT, 1988), rata (DIMALINE et al., 1984) y hombre (CARLQUIST et al., 1982). El VIP de pollo (NILSSON, 1974) y el de cobaya (DU et al., 1985), por el contrario, poseen 4 aminoácidos diferentes y el de bacalao y el de tiburón, 5 aminoácidos distintos (THORNDYKE et al., 1989). (Tabla I).

Por otra parte, se han observado grandes analogías entre la secuencia de aminoácidos del VIP y la de otros neuropéptidos y hormonas gastrointestinales. La secretina posee 27 aminoácidos de los que 9 están en común con los del VIP, el glucagón, 29 residuos y 6 en común con el VIP y el péptido inhibidor gástrico (GIP) con 43 aminoácidos y 4 en común con el VIP. Estos cuatro péptidos se agruparon en un principio en la denominada familia de la secretina-glucagón, la cual se ha ido incrementando a medida que se han descubierto otros péptidos estructuralmente relacionados con el VIP, como el factor liberador de la hormona del crecimiento (GRF), ya sea el de rata (GRFr) con 43 residuos y 12 en común con el VIP o el humano (GRFh), aislado a partir de extractos tumorales pancreáticos (GUILLEMIN et al., 1982), con 44 aminoácidos y 9 en común con el VIP, el péptido histidina amino

terminal isoleucina-amida carboxi terminal (PHI) con 27 aminoácidos y 13 en común con el VIP, aislado en el cerdo por TATEMOTO y MUTT en 1981, y su homólogo en el hombre y en el mono, el péptido histidina-amino terminal metionina-amida carboxi terminal o PHM (27 aminoácidos, 12 en común con el VIP), aislado por ITOH et al. en 1983, la helodermina, con 35 aminoácidos y 15 en común con el VIP y aislada a partir del veneno del *Heloderma suspectum* (HOSHINO et al., 1984) y el péptido activador de la adenilato ciclase pituitaria o PACAP, ya sea el PACAP-38, con 38 residuos y 18 en común con el VIP y el PACAP-27, con 27 aminoácidos y 18 en común con el VIP (MIYATA et al., 1989), siendo el PACAP-27 el más cercano estructuralmente al VIP. (Tabla II). También presentan homologías estructurales con el VIP la urotensina 1 (SAID, 1991), la helospectina (ROBBERECHT et al., 1984; SAID, 1991), la sauvagina (SAID, 1991) y la α_1 -timosina (GOLDSTEIN et al., 1977). Se han descrito además secuencias similares a la del VIP en la estructura del péptido T (que es parte de la secuencia de la proteína de la cubierta del virus responsable del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA)) (SACERDOTE et al, 1987) y en algunas proteínas del virus de la Influenza (ZHILINSKAYA et al., 1991).

TABLA I. SECUENCIA AMINOACIDICA DEL VIP EN DISTINTAS ESPECIES.

VIP*: His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-Lys-Gln-
Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn

POLLO: His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-**Ser-Arg-Phe**-Arg-Lys-Gln-
Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-**Val-Leu-Thr**

COBAYA: His-Ser-Asp-Ala-**Leu**-Phe-Thr-Asp-**Thr**-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-Lys-
Gln-Met-Ala-**Met**-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-**Val**-Leu-Asn

TIBURON: His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-**Ser-Arg-Ile**-Arg-Lys-
Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-**Ile**-Asn-Ser-**Leu-Leu-Ala**

BACALAO: His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-**Ser-Arg-Phe**-Arg-Lys-
Gln-Met-Ala-**Ala**-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-**Val-Leu-Ala**

: VIP humano, de vaca, cerdo, rata, conejo y perro. Las letras en negrilla, indican los aminoácidos en que difieren del VIP.

TABLA II. SECUENCIA DE AMINOACIDOS DE LOS MIEMBROS MAS IMPORTANTES DE LA FAMILIA DEL VIP.

VIP: His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn

GRFr: His-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Ser-Ser-Tyr-Arg-Arg-Ile-Leu-Gly-Gln-Leu-Tyr-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-His-Glu-Ile-Met-Asn...

GRFh: Tyr-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asp-Ser-Tyr-Arg-Lis-Val-Leu-Gly-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Met-Ser...

PHI: His-Ala-Asp-Gly-Val-Phe-Thr-Ser-Asp-Phe-Ser-Arg-Leu-Leu-Gly-Gln-Leu-Ser-Ala-Lys-Lys-Tyr-Leu-Glu-Ser-Leu-Ile

PHM: His-Ala-Asp-Gly-Val-Phe-Thr-Ser-Asp-Phe-Ser-Lis-Leu-Leu-Gly-Gln-Leu-Ser-Ala-Lys-Lys-Tyr-Leu-Glu-Ser-Leu-Met

SEC(1): His-Ser-Asp-Gly-Tyr-Phe-Thr-Ser-Glu-Leu-Ser-Arg-Leu-Arg-Asp-Ser-Ala-Arg-Leu-Gln-Arg-Leu-Leu-Gln-Gly-Leu-Val

SEC(2): His-Ser-Asp-Gly-Tyr-Phe-Thr-Ser-Glu-Leu-Ser-Arg-Leu-Arg-Glu-Gly-Ala-Arg-Leu-Gln-Arg-Leu-Leu-Gln-Gly-Leu-Val

GLU: His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn...

TABLA II. SECUENCIA DE AMINOACIDOS DE LOS MIEMBROS MAS IMPORTANTES DE LA FAMILIA DEL VIP.(Cont.)

GIP(1): Tyr-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Ile-Ser-Asp-Tyr-Ser-Ile-Ala-Met-Asp-Lys-Ile-Arg-Gln-Gln-Asp-Phe-Val-Asp-Trp-Leu-Leu-Ala...

GIP(2): Tyr-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Ile-Ser-Asp-Tyr-Ser-Ile-Ala-Met-Asp-Lys-Ile-His-Gln-Gln-Asp-Phe-Val-Asp-Trp-Leu-Leu-Ala...

HEL: His-Ser-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Gln-Gln-Tyr-Ser-Lys-Leu-Leu-Ala-Lys-Leu-Ala-Leu-Gln-Lys-Tyr-Leu-Ala-Ser-Ile-Leu-Gly...

PAC.1: His-Ser-Asp-Gly-Ile-Phe-Tyr-Asp-Ser-Tyr-Ser-Arg-Tyr-Arg-Lys-Glu-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Ala-Ala-Val-Leu

PAC.2: His-Ser-Asp-Gly-Ile-Phe-Thr-Asp-Ser-Tyr-Ser-Arg-Tyr-Arg-Lys-Glu-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Ala-Ala-Val-Leu-Gly...

Los puntos suspensivos indican que sólo se representan los 28 primeros aminoácidos de la cadena. Las claves utilizadas son: SEC (1), secretina porcina; SEC (2), secretina humana; GIP (1), GIP porcino ; GIP (2), GIP humano; PAC.1, PACAP 27; PAC.2, PACAP 38. Las letras en negrita, indican los aminoácidos en que difieren del VIP.

2.2 LOCALIZACION DEL VIP.

A pesar de ser considerado desde un principio como un péptido de acción exclusivamente intestinal, se han identificado por radioinmunoensayo e inmunoanálisis terminaciones nerviosas VIPérgicas no sólo en el tracto digestivo, sino en prácticamente todo el organismo (Tabla III). El VIP se encuentra ampliamente distribuido tanto en el sistema nervioso central como en el sistema nervioso periférico. Alcanza altas concentraciones en neuronas y terminaciones nerviosas de córtex cerebral, hipotálamo (núcleo supraquiasmático), amígdala, hipocampo y estriado, donde parece coexistir con los neurotransmisores clásicos (acetilcolina y norepinefrina), el neuropéptido Y (NPY), la colecistoquinina (CCK), la dinorfina (DYN) y el ácido gamma amino butírico (GABA) (KOSAKA et al., 1985). Fuera del sistema nervioso central, las mayores concentraciones de VIP se encuentran en neuronas de los plexos submucoso y mientérico del tracto gastrointestinal. Así, se han descrito fibras nerviosas inmunoreactivas para VIP a lo largo de todas las capas de la pared intestinal: muscular, submucosa y mucosa, especialmente alrededor de los vasos. El origen de estas fibras VIPérgicas, se encuentra en los ganglios de los plexos submucoso y mientérico del tracto gastrointestinal. Estas fibras VIPérgicas, finalizan en un entramado nervioso en relación con células epiteliales, arteriolas de la mucosa y submucosa y con la capa de músculo circular subyacente. Las mayores concentraciones de VIP se encuentran en fundus gástrico, duodeno, yeyuno, íleon y colon. También existe VIP en los cuerpos neuronales locales del páncreas, tanto endocrino como exocrino. Se han descrito terminaciones nerviosas VIPérgicas en el tracto genito-urinario, sistema cardiovascular, árbol traqueobronquial y en glándulas secretoras. No se han encontrado terminaciones nerviosas, pero si inmunoreactividad para VIP en la placenta (ATTIA et al., 1976). En el individuo sano, existe VIP libre circulante en plasma. Mediante radioinmunoanálisis, se ha cuantificado su concentración, obteniéndose valores que oscilan entre 1-5 pM (CHANG et al., 1979) y 15-52 pM en el límite superior de los individuos sanos (KREJS et al., 1980). Se ha postulado que la presencia de VIP circulante se debería a un fenómeno de rebosamiento a nivel de las terminaciones nerviosas. Sin embargo, en determinadas situaciones fisiológicas, como el ayuno o el ejercicio físico, los niveles

plasmáticos de VIP pueden incrementarse (WIJK et al., 1988). La vida media del péptido en el plasma no excede de 3 min (DOMSCHKE et al., 1978), siendo degradado por enzimas específicas en hígado, cerebro y riñón (KELTZ et al., 1980). Se ha detectado también inmunoreactividad para VIP en células de origen hematopoyético, como mastocitos (CUTZ et al., 1978), plaquetas (GIACHETTI et al., 1978), neutrófilos (O'DORISIO et al., 1980), mononucleares (LYGREN et al., 1984), basófilos (GOETZL et al., 1988), linfoblastos (GOMARIZ et al., 1990) y sobre todo en eosinófilos (ALIAKBARI et al., 1987). Se ha demostrado que el VIP es producido en estas células (GOMARIZ et al., 1993; 1994). Se sabe que es producido por los mastocitos-basófilos formando parte de una mezcla de péptidos estructuralmente relacionados pero distintos al VIP (GOETZL et al., 1988) y que es secretado tras la estimulación con agentes desgranulantes como el ionóforo del calcio A23187 y el compuesto 48780 (CUTZ et al., 1978). En el sistema inmune, se ha demostrado la existencia de terminaciones VIPérgicas en los órganos linfoides primarios (timo y bursa de Fabricio), donde los linfocitos adquieren su inmunocompetencia, y en algunos órganos linfoides secundarios. Así, se han descrito terminaciones nerviosas para VIP en timo (GOMARIZ et al., 1990), corteza de timo de rata (FELTEN et al., 1985), en la vasculatura y parénquima tímicos (LACEY et al., 1991), en las placas de Peyer de ratón (OTTAWAY et al., 1987), en el tejido linfoide asociado a los bronquios (NOHR y WEIHE, 1991) y en la bursa de Fabricio de pollo (LACEY et al., 1991).

TABLA III. LOCALIZACION DE TERMINACIONES NERVIOSAS INMUNOREACTIVAS PARA EL VIP.

	<u>AUTORES</u>
<u>SISTEMA NERVIOSO.</u>	
Córtex cerebral	SAID y ROSENBERG, 1976.
Núcleo amigdalino	BESSON et al., 1979.
Ganglios basales	WAHLE y MEYER, 1989.
Médula espinal	ROMUALDI et al., 1990.
Retina	PETERS, 1990.
Ganglios simpáticos	BALDWIN et al., 1991
Nervios cerebrovasculares.	LARSSON et al., 1976.
Nervio esplácnico	GIACHETTI et al., 1979.
Nervio ciático	LUNDBERG et al., 1979.
Nervio vago	LINNOILA et al., 1980.
Nervio celíaco	KONDO y YUI, 1982.
<u>SISTEMA CARDIOVASCULAR.</u>	
Ganglios intracardíacos	THULIN et al., 1984.
Vasos periféricos	MORRIS et al., 1985.
Cuerpo carotídeo	KAMEDA, 1989.
<u>SISTEMA RESPIRATORIO.</u>	
Vías aéreas superiores	UDDMAN et al., 1978a.
Vías aéreas inferiores	UDDMAN et al., 1978a.
Parénquima pulmonar	SAID, 1982.
<u>PIEL.</u>	
Folículo piloso	HARTSCHUH et al., 1984.
Células de Merckel	HARTSCHUH et al., 1984.
Glándulas sudoríparas	WEIHE et al., 1981.
Glándulas sebáceas	HARTSCHUH et al., 1984.
Piel axilar	WALLENGREN et al., 1987

TABLA III. LOCALIZACION DE TERMINACIONES NERVIOSAS INMUNOREACTIVAS PARA EL VIP. (Cont.)

	<u>AUTORES</u>
<u>SISTEMA DIGESTIVO.</u>	
Glándulas salivales	UDDMAN et al., 1980.
Pared esofágica	UDDMAN et al., 1978b.
Esfínter esofágico inferior.	RATTAN et al., 1977.
Músculo liso gástrico	LARSSON et al., 1976.
Intestino delgado	LARSSON et al., 1976.
Intestino grueso	SUNDLER et al., 1979.
Lámina propia intestinal	GAGINELLA et al., 1979.
Vesícula biliar	SUNDLER et al., 1977.
Páncreas	LARSSON et al., 1978.
<u>APARATO GENITO-URINARIO.</u>	
Riñón	BARAJAS et al., 1983.
Vías urinarias	CROWE et al., 1986.
Cérvix uterino	LARSSON et al., 1977.
Trompas de Falopio	ALM et al., 1977.
Miometrio	OTTESEN et al., 1980.
Ovario	AHMED et al., 1986.
Utero	BRYMAN et al., 1989.
Próstata	ALM et al., 1977.
Estroma testicular	HAKANSON et al., 1982.
Vesículas seminales	FAHRENKRUG, 1988.
Vasos deferentes	FEHER y BURNSTOCK, 1987.
<u>SISTEMA NEUROENDOCRINO.</u>	
Neurohipófisis	GAJKOWSKA y VIRON, 1991.
Adenohipófisis	HSU et al., 1989.
Hipotálamo	SAMSON et al., 1979.

TABLA III. LOCALIZACION DE TERMINACIONES NERVIOSAS INMUNOREACTIVAS PARA EL VIP. (Cont.)

	<u>AUTORES</u>
<u>SIST.NEUROENDOCRINO (Cont.)</u>	
Pineal	SHIOTANI et al., 1986.
Tiroides	AHREN et al., 1980.
Corteza suprarrenal	LINNOILA et al., 1980.
Médula suprarrenal	LINNOILA et al., 1980.
Islotes de Langerhans	FUJII et al., 1980.
Glándulas lacrimales	SIBONY et al., 1988.
Glándula mamaria	ERIKSSON et al., 1988.
<u>SISTEMA INMUNOLOGICO.</u>	
Timo	GOMARIZ et al., 1990
Corteza de timo	FELTEN et al., 1985
Bursa de Fabricio	LACEY et al., 1991
Placas de Peyer	OTTAWAY et al., 1987
	ICHIKAWA et al., 1994
Tejido linfoide asociado a bronquios	NOHR y WEIHE, 1991
Nódulo linfático auricular	ENZMANN y DRÖSSLER, 1994

2.3 EL GEN DEL VIP. BIOSÍNTESIS DEL VIP.

El VIP se biosintetiza junto con otro péptido activo, el PHI en ratas o el PHM en humanos (NISHIZAWA et al., 1985).

El gen que codifica tanto al VIP como al PHM-27 en humanos, se encuentra situado en el cromosoma 6, en concreto en la región 6q24 (GOZES et al., 1987). Está formado por 8.837 pares de bases y contiene 7 exones interrumpidos por 6 intrones (BODNER et al., 1985). Los exones 1 y 7 codifican regiones de ARNm que no serán traducidas, el 2 codifica el péptido señal, el exón 3 el péptido N-terminal, el 4 el PHM, el 5 el VIP y el 6 el péptido C-terminal (TSUKARA et al., 1985). Las secuencias codificadoras del VIP y del PHM-27 se encuentran en exones distintos pero adyacentes, tan solo separados por 0,75 Kbases de ADN (BODNER et al., 1985). Este hecho sugiere la cosíntesis de ambos péptidos en el mismo tejido, sin embargo, a pesar de coexistir tanto el PHM como el VIP en el mismo precursor, no siempre ambas moléculas se cosintetizan dentro de una misma célula. Esta selectividad parece deberse a procesos posttraduccionales tejido-específicos (ITOH et al., 1983). Así, hay neuronas que contienen VIP y no PHM y viceversa (HÖKFELT et al., 1982). Se ha encontrado casos en que coexisten los dos péptidos, como ocurre en tumores pancreáticos tipo VIPoma (BLOOM et al., 1973) y neuroblastomas (ITOH et al., 1983). La expresión del gen del VIP parece estar regulada por señales neuronales y endocrinas (TSUKARA et al., 1987), llevándose principalmente a cabo en células de origen nervioso.

Se ha descrito también la estructura completa del gen del VIP en ratas (GILADI et al., 1990), encontrándose un 80-90% de homología con el humano. Posee 7.400 pares de bases, con 7 exones separados por 6 intrones, codificando el exón 4 al PHI y el 5 al VIP. En pollo, la zona codificadora del PHI es distinta a la encontrada en mamíferos (McFARLIN et al., 1995).

El pre-pro-VIP/PHM-27 (Fig. 8), es la proteína precursora de ambos péptidos. Su peso molecular es de 19.169 Da, estando constituida por 170 aminoácidos (ITOH et al., 1983). Contiene la molécula de VIP y la de PHM-27, por lo que ambos coexisten en el mismo precursor proteico. El primer aminoácido de la molécula de pre-pro-VIP/PHM-27 es la metionina, que junto hasta el aminoácido número 20, recuerda a los

péptidos señal de las regiones aminoterminales de las proteínas secretoras. La secuencia del VIP se encuentra entre las parejas de aminoácidos (Lys¹²³- Arg¹²⁴) y (Lys¹⁵⁴- Arg¹⁵⁵) los cuales son puntos de ruptura proteolítica que sirven para separar el VIP de su precursor. La secuencia del PHM está precedida por un aminoácido básico (Arg⁸⁰) y en el extremo opuesto, aparece el par (Lys¹⁰⁹-Arg¹¹⁰), siendo señales para la ruptura proteolítica. Se ha descrito una molécula de 17500 Da que sería producto de modificaciones posttraduccionales en la molécula de pre-pro-VIP/PHM-27 y, por tanto, el precursor directo del VIP (OBATA et al., 1981).

Otros péptidos de la familia del VIP, son codificados por genes que muestran una estructura similar y poseen además precursores similares al pre-pro-VIP/PHM-27, como es el caso del GRFh (MAYO et al., 1985) y del glucagón (BELL et al., 1983).

Se ha detectado la expresión del gen del VIP en timo y bazo de rata (GOMARIZ et al., 1993), córtex sensorial y visual de mono y rata (BENSON et al., 1991), pituitaria anterior de rata (CHEW et al., 1993), colon humano (SCHULTE-BOCKHOLT et al., 1995), linfocitos T y B de rata (GOMARIZ et al., 1994), tumor bucal humano (GOZES et al., 1986), línea celular PC12 (feocromocitoma humano) (TSUKARA et al., 1995) y línea celular NB-1 (neuroblastoma humano) (GEORG et al., 1994).

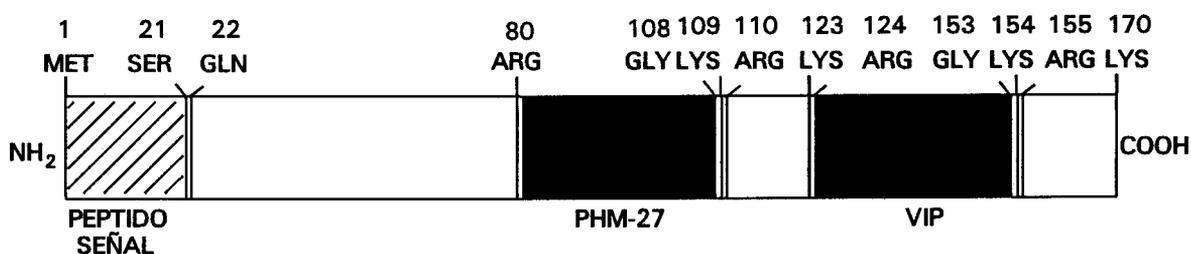


Fig.8. Representación esquemática de la estructura de la molécula precursora del VIP humano (pre-pro-VIP/PHM-27). Se muestran los residuos de aminoácidos más importantes en los procesos posttraduccionales y su posición. (Tomado de ITOH et al., 1983).

2.4 EL VIP COMO NEUROTRANSMISOR

Actualmente se considera al VIP como un neuropéptido con funciones neurotransmisoras y neuroreguladoras (SAID, 1986), ya que cumple una serie de criterios reunidos por los neurotransmisores (FAHRENKRUG, 1980):

- 1) Estar presente en neuronas y concentrado en las terminaciones presinápticas.
- 2) Poseer mecanismos específicos en las neuronas para su síntesis e inhibición.
- 3) Ser liberado por estimulación de la terminación presináptica.
- 4) Poseer alguna acción sobre la terminación postsináptica.
- 5) Bloquearse la acción por antagonistas específicos.
- 6) Existir un receptor específico en las membranas postsinápticas.

Por tanto, el VIP actúa como neurotransmisor, ya que se almacena en neuronas y terminaciones nerviosas, desde donde se libera al espacio sináptico tras la despolarización (SAID, 1986), uniéndose a receptores de membrana específicos (TAYLOR y PERT, 1979).

2.5 ACCIONES BIOLÓGICAS DEL VIP.

Debido a la amplia distribución del VIP por el organismo, éste presenta un amplio perfil de efectos biológicos, entre los que se encuentran (Tabla IV):

- 1) Relajante del músculo liso: fue la primera función biológica descrita para el VIP, en concreto la acción relajante de la musculatura lisa de los vasos de la circulación mesentérica (SAID y MUTT, 1970). Actualmente se sabe de este efecto en otros órganos y sistemas, como en bronquios (FRANDSEN et al., 1978), esófago (RATTAN et al., 1977) e intestino (SAID y MAKHLOUF, 1974) entre otros.
- 2) Regulador del flujo vascular: es sabido que el VIP produce vasodilatación de los vasos sanguíneos con el consiguiente incremento del flujo vascular. Esto se ha observado a nivel de arterias coronarias (SMITHERMAN et al., 1982), mucosa nasal (MALM et al., 1980), cerebro (LARSEN et al., 1981) y miometrio (OTTESEN et al., 1980). Por tanto, el VIP actúa como vasodilatador coronario y sistémico (BEVAN y BRAYDEN, 1986).
- 3) Actividad neuroendocrina: en el sistema neuroendocrino, el VIP realiza varias

funciones entre las que destacan: estimulación de la secreción de insulina y glucagón (SHEBALIN et al., 1977), de la secreción pancreática de somatostatina (IPP et al., 1978), de hormona adrenocorticotropa (ACTH) (OLIVA et al., 1982), de la secreción de hormona luteinizante (LH) (VIJAYAN et al., 1979), de la hormona del crecimiento (GH) y la prolactina (PRL) (SCHOLAR y PAUL, 1991), de catecolaminas por las células cromafines de las glándulas suprarrenales (GOZES y BRENNEMAN, 1989) y de hormonas tiroideas (AHREN et al., 1980) y parathormona (PTH) (JOBORN et al., 1991). Favorece la liberación de hormonas hipofisarias como la oxitocina (BARDRUM et al., 1988) y estimula la síntesis y liberación de melatonina en pineal (SIMONNEAU et al., 1990).

4) Efectos sobre el sistema inmune: tanto in vivo como in vitro, se han encontrado numerosas acciones del VIP sobre este sistema, entre las que destacan: inhibición de la síntesis de ADN (STANISZ et al., 1986), de la migración de linfocitos T₄ in vivo (MOORE, 1984), de los linfocitos T in vitro (OTTAWAY, 1984), de la producción de IgA e IgM (STANISZ et al., 1986), de la producción de interferón gamma (MUSCETTOLA y GRASSO, 1990), del estallido respiratorio en monocitos (WIJK, 1989), de la producción de interleukina 2 (OTTAWAY, 1987), del tráfico de linfocitos (MOORE et al., 1988) y de la citotoxicidad de las células NK (ROLA-PLESZCZYNSKI et al., 1985). Induce un incremento en la motilidad de macrófagos peritoneales (DE LA FUENTE et al., 1994), estimula la liberación de histamina por mastocitos (PIOTROWSKY y FOREMAN, 1985), la producción de interleukina 5 (WEINSTOCK, 1991) e interleukina 6 (MAIMONE et al., 1993), aumenta la producción y secreción de α y β interferones en células HT-29 en cultivo (CHELBI-ALIX et al., 1990; 1991) y en células gliales (CHELBI-ALIX et al., 1994), actúa como mediador de la inflamación y modulador de la respuesta inmune (O'DORISIO et al., 1985b), estimula el estallido respiratorio en linfocitos (LOPEZ-GONZALEZ et al., 1992; BELLIDO et al., 1994) y en neutrófilos (LOPEZ-GONZALEZ y LUCAS, 1994), estimula la quimiotaxis y la adherencia en linfocitos T (JOHNSTON et al., 1994), inhibe la adherencia en macrófagos peritoneales (SEGURA et al., 1993) y la fagocitosis y la quimiotaxis en macrófagos alveolares (LITWIN et al., 1992), estimula la

fagocitosis en macrófagos peritoneales (DE LA FUENTE et al., 1993), inmunosuprime la producción de citoquinas en el humor acuoso (TAYLOR et al., 1994), protege a los linfocitos frente a metales tóxicos (NORDLIND et al., 1992) y modula la muerte celular de timocitos en cultivo (ERNSTRÖM et al., 1995). El efecto del VIP sobre las células mononucleares sanguíneas humanas es distinto según la concentración: a bajas concentraciones (10^{-14} - 10^{-12}) se estimula la capacidad migratoria y a concentraciones elevadas (10^{-7} - 10^{-9}) se ve inhibida, pudiendo tener este doble efecto importancia fisiológica dadas las diferentes concentraciones de VIP en plasma y en las terminaciones nerviosas donde se secreta (BONDESSON et al., 1991). Por tanto, existe una relación entre el VIP y el sistema inmune (OTTAWAY et al., 1987; TSENG y O'DORISIO, 1989), proponiéndose al VIP como uno de los péptidos fundamentales en el eje neuroinmunoendocrino (O'DORISIO et al., 1985b). Los hechos que conducen a esta hipótesis, son básicamente el hallazgo de terminaciones VIPérgicas en los órganos linfoides primarios y secundarios del sistema inmune en íntima relación con las células inmunes (ZENTEL y WEIHE, 1991), la caracterización de receptores para VIP en células que participan en la respuesta inmune y los distintos efectos del VIP sobre las células y las funciones del sistema inmune.

5) Acciones biológicas en otros sistemas como el nervioso, digestivo, respiratorio y genitourinario. En el sistema nervioso central, el VIP estimula la glucogenolisis y la utilización local de glucosa (MAGISTRETTI et al., 1981) en el córtex cerebral, produce un efecto excitatorio neuronal en córtex, hipocampo y médula espinal (DODD et al., 1979), estimula la secreción de serotonina en el núcleo supraquiasmático (ROSTENE, 1984), inhibe la liberación de somatostatina (SHIMATSU et al., 1982), favorece y estimula la acetilcolinesterasa en retina (LUINE et al., 1984). Además, produce una acción hipnogénica (RIOU et al., 1982), antidipsogénica (ITOH et al., 1985), hipertérmica (SAID, 1986) y analgésica (KOMISARUK et al., 1988). En el sistema nervioso periférico, el VIP ejerce una regulación fisiológica de la sudoración (EEDY et al., 1990), estimula la secreción de electrolitos (DENNISS y YOUNG, 1978) y aumenta la secreción de amilasa (INOUE et al., 1985). En el aparato digestivo, destaca entre otras funciones la relajación de la vesícula biliar (RYAN y COHEN, 1977), de

la musculatura lisa gástrica (KONTUREK et al, 1975) e intestinal (MAKHLOUF y SAID, 1975), estimulación de la secreción salival (LUNDBERG et al., 1981), estimulación de la secreción de pepsinógeno (GESPACH et al.,1983), estimulación de la secreción ácida del estómago (HERNANDEZ et al., 1987), inhibición de la liberación de gastrina (CHIBA et al., 1980) e inhibición de la absorción intestinal (MAKHLOUF y SAID, 1975) y estimulación de la secreción exocrina pancreática (SAID y MUTT, 1972). En el sistema respiratorio ejerce, entre otros efectos, funciones como la relajación de los anillos traqueobronquiales (FRANDSEN et al., 1978), incremento de la ventilación pulmonar (SAID y MUTT, 1970), estimulación de la secreción bronquial (SAID, 1986), de la secreción mucosa (BARANIUK y KALINER, 1991) y un gran efecto broncodilatador (SAID, 1986). En el aparato genito-urinario, el VIP disminuye la filtración glomerular (DIMALINE et al .,1983), aumenta la secreción de renina por el riñón (PORTER y GANONG, 1988), provoca la vasodilatación de las vías urinarias (ANDERSSON et al., 1987), estimula la relajación muscular de las vías urinarias (KLARSKOV et al., 1984), relaja el miometrio (OTTESEN et al., 1980), estimula la esteroidogénesis en el ovario (OTTESEN et al., 1986), estimula la síntesis de andrógenos en el testículo (KASSON et al., 1986), provoca la vasoconstricción de los vasos deferentes (KASTIN et al., 1978) y estimula la secreción en la vesícula seminal (STJERNQUIST et al., 1983).

6) Estimulación de la secreción de agua y electrolitos: es una acción ejercida por el VIP principalmente a nivel de intestino delgado (SCHWARTZ et al., 1974), colon (WALDMAN et al., 1977) y vesícula biliar (KONTUREK et al., 1975).

7) Efectos metabólicos: se han descrito en tejidos en los que no se han encontrado terminaciones nerviosas VIPérgicas, como el hígado y el tejido adiposo marrón (TAM). En hígado, estudios in vitro muestran que el VIP estimula la glucogenolisis en hígado de conejo (KERINS y SAID, 1973) y rata (KORINEK et al., 1979). En hepatocitos aislados, existe un efecto glucogenolítico a la vez que gluconeogénico (FELIU et al., 1983). In vivo, el VIP causa hiperglucemia en perros (KERINS y SAID, 1973), ratas (SANCHEZ et al., 1991) y humanos (DOMSCHKE et al., 1978). En TAM, la acción es lipolítica (FRANDSEN y MOODAY, 1973). Estos efectos metabólicos, unidos al

aumento de los niveles plasmáticos del VIP durante el ayuno y el ejercicio (GALBO et al., 1979) parecen indicar un posible papel del VIP como movilizador energético (SANCHEZ et al., 1991). Además, el VIP actúa en la inhibición de la fosfodiesterasa dependiente de calmodulina (BARNETTE y WEISS, 1985).

TABLA IV. PRINCIPALES ACCIONES BIOLÓGICAS DEL VIP.

<u>SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.</u>	<u>AUTORES</u>
Estímula la glucogenolisis en córtex cerebral	MAGISTRETTI et al., 1981
Estimula la utilización local de glucosa en córtex cerebral	MAGISTRETTI et al., 1981
Estimula a las neuronas del córtex, hipocampo y médula espinal	DODD et al., 1979
Estimula la secreción de serotonina en el núcleo supraquiasmático	ROSTENE, 1984
Inhibe la liberación de somatostatina	SHIMATSU et al., 1982
Acción hipnogénica	RIOU et al., 1982
Acción antidipsogénica	ITOH et al., 1985
Acción hipertérmica	SAID, 1986
Acción analgésica	KOMISARUK et al., 1988
Estimula la acetilcolinesterasa en retina	LUINE et al., 1984
<u>SISTEMA NERVIOSO PERIFÉRICO.</u>	
Regula la sudoración	EEDY et al., 1990
Estimula la secreción de electrolitos	DENNISS y YOUNG, 1978
Aumenta la secreción de amilasa	INOUE et al., 1985
<u>SISTEMA CARDIOVASCULAR.</u>	
Relajante de la musculatura lisa de los vasos de la circulación mesentérica	SAID y MUTT, 1970
Vasodilatación de arterias coronarias	SMITHERMAN et al., 1982
Vasodilatación de los vasos sanguíneos de la mucosa nasal	MALM et al., 1980

TABLA IV. PRINCIPALES ACCIONES BIOLÓGICAS DEL VIP (Cont.).

<u>SIST.CARDIOVASCULAR (Cont.).</u>	<u>AUTORES</u>
Vasodilatación de los vasos sanguíneos del cerebro	LARSEN et al., 1981
Vasodilatación de los vasos sanguíneos del miometrio	OTTESEN et al., 1980
Vasodilatador coronario y sistémico	BEVAN y BRAYDEN, 1986
<u>SISTEMA RESPIRATORIO.</u>	
Relaja el músculo liso bronquial	FRANSEN et al., 1978
Relaja los anillos traqueobronquiales	FRANSEN et al., 1978
Incrementa la ventilación pulmonar	SAID y MUTT, 1970
Estimula la secreción bronquial	SAID, 1986
Estimula la secreción mucosa	BARANIUK y KALINER, 1991
<u>SISTEMA DIGESTIVO</u>	
Relajante de la musculatura lisa del esófago	RATTAN et al., 1977
Relajante de la musculatura lisa del intestino	SAID y MAKHLOUF, 1974
Relajante de la musculatura lisa gástrica	KONTUREK et al, 1975
Relajación de la musculatura lisa de la vesícula biliar	RYAN y COHEN, 1977
Estimulación de la secreción exocrina pancreática	SAID y MUTT, 1972
Estimulación de la secreción de agua y electrolitos en intestino delgado	SCHWARTZ et al., 1974
Estimulación de la secreción de agua y electrolitos en colon	WALDMAN et al., 1977

TABLA IV. PRINCIPALES ACCIONES BIOLÓGICAS DEL VIP (Cont.).

<u>SISTEMA DIGESTIVO (Cont.)</u>	<u>AUTORES</u>
Estimulación de la secreción de agua y electrolitos en vesícula biliar	KONTUREK et al., 1975
Estimulación de la secreción salival	LUNDBERG et al., 1981
Estimulación de la secreción de pepsinógeno	GESPACH et al., 1983
Estimulación de la secreción ácida del estómago	HERNANDEZ et al., 1987
Inhibición de la liberación de gastrina	CHIBA et al., 1980
Inhibición de la absorción intestinal	MAKHLOUF y SAID, 1975
<u>SISTEMA GENITO-URINARIO</u>	
Relajación del miometrio	OTTESEN et al., 1980
Estimulación de la esteroidogénesis en el ovario	OTTESEN et al., 1986
Estimulación de la síntesis de andrógenos en el testículo	KASSON et al., 1986
Vasoconstricción de los vasos deferentes	KASTIN et al., 1978
Estimulación de la secreción en la vesícula seminal	STJERNQUIST et al., 1983
Disminución de la filtración glomerular	DIMALINE et al., 1983
Estimulación de la secreción de renina por el riñón	PORTER y GANONG, 1988
Vasodilatación de las vías urinarias	KLARSKOV et al., 1984 ANDERSSON et al., 1987

TABLA IV. PRINCIPALES ACCIONES BIOLÓGICAS DEL VIP (Cont.).

<u>SIST.NEUROENDOCRINO</u>	<u>AUTORES</u>
Estimulación de la secreción de insulina y glucagón	SHEBALIN et al., 1977
Estimulación de la secreción pancreática de somatostatina	IPP et al., 1978
Estimulación de la secreción de ACTH	OLIVA et al., 1982
Estimulación de la secreción de GH	SCHOLAR y PAUL, 1991
Estimulación de la secreción de LH	VIJAYAN et al., 1979
Estimulación de la secreción de PRL	SCHOLAR y PAUL, 1991
Estimulación de la secreción de catecolaminas	GOZES y BRENNEMAN, 1989
Estimulación de la secreción de hormonas tiroideas	AHREN et al., 1980
Estimulación de PTH en paratiroides	JOBORN et al., 1991
Estimulación de la secreción de corticoesteroides	WESTENDORF et al., 1983
Estimulación de la liberación de hormonas hipofisarias	BARDRUM et al., 1988
Estimulación de la síntesis y liberación de melatonina en pineal	SIMONNEAU et al., 1990
<u>SISTEMA INMUNE</u>	
Inhibición de la síntesis de ADN en linfocitos	STANISZ et al., 1986
Inhibición de la migración de linfocitos T ₄ in vivo	MOORE, 1984
Inhibición de los linfocitos T in vitro	OTTAWAY, 1984
Inhibición de la producción de IgA e IgM	STANISZ et al., 1986
Inhibición del tráfico de linfocitos	MOORE et al., 1988

TABLA IV. PRINCIPALES ACCIONES BIOLÓGICAS DEL VIP (Cont.).

<u>SISTEMA INMUNE (Cont.)</u>	<u>AUTORES</u>
Inhibición de la producción de interferon gamma	MUSCETTOLA y GRASSO, 1990
Inhibición de la citotoxicidad de las células NK	ROLA-PLESZCZYNSKI et al., 1985
Inhibición de la producción de interleukina 2	OTTAWAY, 1987
Inhibición del tráfico de linfocitos	MOORE et al., 1988
Incremento en la motilidad de macrófagos peritoneales	DE LA FUENTE et al., 1994
Estimulación de la producción de interleukina 5	WEINSTOCK, 1991
Estimulación de la producción de interleukina 6	MAIMONE et al., 1993
Estimulación de la liberación de histamina por mastocitos	PIOTROWSKY y FOREMAN, 1985
Aumento de la producción y secreción de α y β interferones en células HT-29 en cultivo	CHELBI-ALIX et al., 1990; 1991
Aumento de la producción y secreción de α y β interferones en células gliales	CHELBI-ALIX et al., 1994
Mediador de la inflamación y modulador de la respuesta inmune	O'DORISIO et al., 1985b
Inhibición del estallido respiratorio en monocitos	WIIK, 1989
Estimulación del estallido respiratorio en linfocitos	LOPEZ-GONZALEZ et al., 1992; BELLIDO et al., 1994
Estimulación del estallido respiratorio en neutrófilos	LOPEZ-GONZALEZ y LUCAS, 1994

TABLA IV: PRINCIPALES ACCIONES BIOLÓGICAS DEL VIP (Cont.).

<u>SISTEMA INMUNE (Cont.)</u>	<u>AUTORES</u>
Modulador de la migración de monocitos	BONDESSON et al., 1991
Inductor de la quimiotaxis y adherencia en linfocitos T	JOHNSTON et al., 1994
Inhibidor de la adherencia en macrófagos peritoneales	SEGURA et al., 1993
Inhibidor de la fagocitosis y quimiotaxis en macrófagos alveolares	LITWIN et al., 1992
Estimulador de la fagocitosis en macrófagos peritoneales	DE LA FUENTE et al., 1993
Inmunosupresor de las citoquinas del humor acuoso	TAYLOR et al., 1994
Protección de los linfocitos frente a metales tóxicos	NORDLIND et al., 1992
Modulador de la muerte celular de timocitos en cultivo	ERNSTRÖM et al., 1995
<u>METABOLISMO</u>	
Estimulación de la glucogenolisis en hígado	KORINEK et al., 1979
Efecto glucogenolítico a la vez que gluconeogénico en hepatocitos aislados	FELIU et al., 1983
Hiper glucemia	DOMSCHKE et al., 1978
Estimulación de la lipólisis en TAM	FRANSEN y MOODAY, 1973
Movilizador energético	SANCHEZ et al., 1991
Inhibición de la fosfodiesterasa dependiente de calmodulina	BARNETTE y WEISS, 1985

2.6 FISIOPATOLOGIA DEL VIP EN HUMANOS.

En humanos, se han relacionado distintos procesos patológicos con el VIP:

- 1) La enfermedad de Verner-Morrison o síndrome de diarrea hídrica o cólera pancreático, cuyos síntomas son diarrea acuosa, hipocaliemia y aclorhidría, está causada por la hipersecreción de VIP por determinados tumores endocrinos (VIPomas) localizados en los islotes pancreáticos. BLOOM et al., 1973, hallaron una fuerte elevación de los niveles de VIP en el plasma y extractos tumorales de pacientes que padecían dicha enfermedad.
- 2) En pacientes con fibrosis quística se ha descrito una deficiente inervación VIPérgica de las glándulas sudoríparas (HEINZ-ERIAN et al., 1985). Esto también ocurre en el tracto respiratorio de asmáticos (OLLERENSHAW et al., 1989).
- 3) En personas afectadas por la enfermedad de Crohn se ha encontrado un incremento de la inervación VIPérgica unas 200 veces superior a lo normal en las regiones del aparato digestivo afectadas por la enfermedad (POLAK y BLOOM, 1983).
- 4) Se han hallado altas concentraciones plasmáticas de VIP en enfermos con reflujo gastroesofágico grave y úlceras esofágicas por disminución de la presión del esfínter esofágico inferior (ROSSITER et al., 1991).
- 5) En enfermos de cirrosis hepática, se han encontrado aumentos moderados de VIP en el plasma (SAID, 1986).
- 6) Parece ser que la disminución de las concentraciones tisulares de VIP, así como de las terminaciones nerviosas VIPérgicas en los segmentos agangliónicos, están en relación con la enfermedad de Hirschsprung y con la achalasia esofágica (TSUTO et al., 1982; AGGESTRUP et al., 1983).
- 7) Los niveles del VIP en el líquido cefalorraquídeo, están disminuidos en la depresión atípica, hidrocefalia normotensa, demencia multi-infarto y tras el infarto cerebral reciente (SAID, 1986).

2.6.1 Aplicaciones terapéuticas.

Debido a sus propiedades vasodilatadoras, el VIP es un candidato para promover el flujo local o regional de la sangre en algunos casos de insuficiencia coronaria,

impotencia masculina e isquemia periférica. Por otra parte, disminuye la resistencia vascular en la hipertensión.

El VIP, es un relajador de los músculos traqueobronquiales, por lo que su efecto contra la broncoconstricción en animales experimentales y su capacidad de reducir la liberación inmunológica de ciertos mediadores, hacen de él un agente de control de los broncoespasmos asmáticos, por lo que se está utilizando en aerosol.

2.7 MECANISMO DE ACCION DEL VIP.

El mecanismo de acción nos indica el modo de interaccionar el VIP con una determinada célula blanco sobre la que induce una serie de cambios metabólicos que dan como resultado final un efecto biológico. Al ser el VIP un neurotransmisor, ejerce sus acciones biológicas a través de las vías utilizadas por los neurotransmisores:

- Neuroparacrina: el VIP es liberado de la terminación nerviosa en el medio extracelular que baña las células diana (epitelio intestinal).
- Neuroendocrina: el VIP es liberado de la terminación nerviosa directamente en el torrente circulatorio, alcanzando las células diana a través del mismo (sistema porta-hipofisiario).
- Neurocrina o neurotransmisión: el VIP es liberado de la terminación nerviosa en el espacio sináptico (SNC).

Una vez liberado el VIP y alcanzada la célula diana, comienza el mecanismo de acción del VIP, el cual es similar al de otros neuropéptidos y hormonas de naturaleza peptídica (LABURTHE, 1985; SAID, 1986). Así, el péptido interacciona con un receptor específico situado en la membrana de la célula blanco, desencadenándose una serie de acontecimientos (Fig. 9):

- a) Activación de proteínas transductoras o proteínas G.
- b) Activación del enzima adenilato ciclasa con formación de AMPc.
- c) Activación de proteínas quinasas por AMPc.
- d) Fosforilación de proteínas blanco por quinasas.

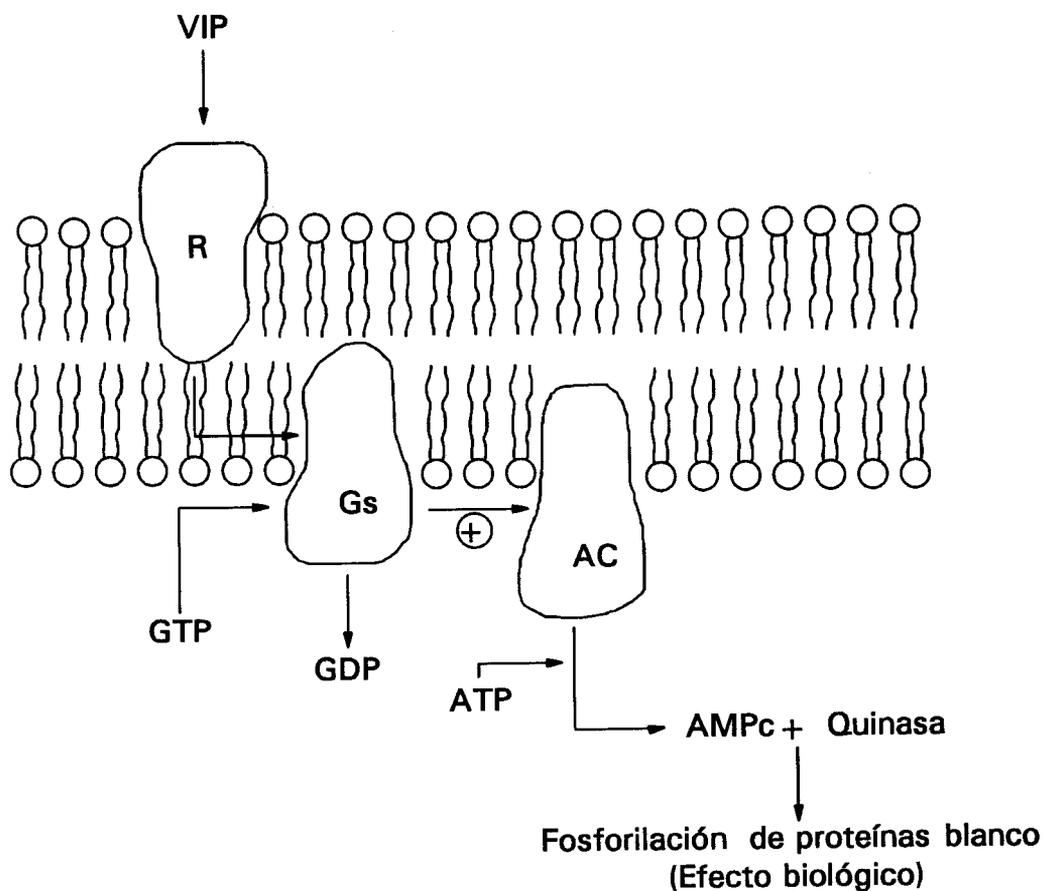


Fig.9. Esquema general del mecanismo de acción del VIP. La interacción del VIP con su receptor (R), produce la sustitución del GDP de la proteína G (Gs) por un GTP, quedando activada la proteína Gs, que estimula al enzima adenilato ciclasa (AC), que forma AMPc a partir de ATP. Este AMPc, se une a la proteína quinasa, activándola. La proteína quinasa, fosforila ciertas proteínas blanco que regulan respuestas celulares (efecto biológico).

2.7.1 Interacción VIP-receptor. El VIP interacciona al llegar a la célula blanco con receptores específicos situados en la membrana plasmática (señal estimuladora externa). A partir de esta interacción se generan una serie de procesos que dan como resultado un efecto biológico, cumpliéndose las propiedades de afinidad, reversibilidad, saturabilidad, especificidad y acoplamiento a un efecto biológico (FREYCHET, 1976).

Los primeros estudios sobre interacciones del VIP con receptores específicos en las células diana, fueron realizados en membranas hepáticas de rata por DESBUQUOIS en 1974 y en membranas de adipocitos y de hígado de rata (BATAILLE et al., 1974), caracterizándose posteriormente receptores para VIP en la mayoría de los aparatos y sistemas en que se han encontrado terminaciones VIPérgicas, y también en determinadas células (Tabla V). Estos se han descrito usando como modelo experimental membranas plasmáticas purificadas de determinados órganos o tejidos o bien células aisladas. En la gran mayoría de los receptores caracterizados, se ha descrito 2 tipos de poblaciones (LUIS et al., 1988): una de alta afinidad y baja capacidad de unión (K_d entre 0.2 y 1 nM; 5.000 a 60.000 sitios/célula) y otra de baja afinidad y alta capacidad de unión (K_d entre 10-80 nM; 100.000-1.000.000 sitios/célula), siendo sólo los receptores de alta afinidad los que se encuentran acoplados al sistema adenilato ciclasa (LABURTHE et al., 1979a), ya que la mitad de la estimulación máxima de la adenilato ciclasa suele estar entre 0,2 y 5 nM, valores muy parecidos a los de la K_d de los receptores de alta afinidad. Existen sistemas en los que ciertos autores han descrito una sola población de receptores, tales como cerebro de rata (TAYLOR y PERT, 1979), linfocitos T humanos de sangre periférica (DANEK et al., 1983) y células intestinales de cobaya (BINDER et al., 1980), siendo la K_d y la capacidad de unión de estos receptores similares a los de los receptores de alta afinidad (O'DORISIO et al., 1988; AMENTA et al., 1989).

El receptor de VIP está estructuralmente relacionado con los receptores de otros péptidos de la familia VIP-secretina-glucagón, siendo el del VIP el de más baja especificidad (LUIS et al., 1988), por lo que interacciona también con otros péptidos de la familia que compiten con el VIP por el receptor, como PHI, PHM, GRF, secretina y helodermina (LABURTHE, 1985). Sin embargo, no se ha descrito en ningún caso interacción de los receptores de VIP con GIP o con glucagón (LUIS et al., 1988).

TABLA V. RECEPTORES PARA VIP EN DISTINTOS TEJIDOS, CELULAS Y LINEAS CELULARES.

<u>SISTEMA NERVIOSO</u>	<u>AUTORES</u>
Córtex cerebral	O'DORISIO, 1988
Hipocampo	ETGEN y BROWING, 1983
Hipófisis	WANKE y RORSTAD, 1990
Retina	SWEDLUND y ROSENZWEIG, 1990
Células gliales	HANSSON y RONNBACK, 1988
<u>SISTEMA CARDIOVASCULAR</u>	
Corazón	CHRISTOPHE et al., 1984.
Aorta	HIRATA, 1985
Arteria cerebral	SUZUKI et al., 1985
Arteria mesentérica	HUANG y RORSTAD, 1987
<u>SISTEMA RESPIRATORIO</u>	
Vías respiratorias	ELGAVISH et al., 1989
Pulmón	SHAFFER et al., 1987
Mucosa nasal	AGHAMIRSALIM et al., 1991.
<u>PIEL</u>	
Glándulas sudoríparas	EEDY et al., 1990
Células de Leydig	HUESO et al., 1989
<u>SISTEMA DIGESTIVO</u>	
Parótida	INOUE, 1985
Estómago	DUPONT et al., 1980
Intestino delgado	PRIETO et al., 1979
Intestino grueso	BROYART et al., 1981
Hígado	COUVINEAU y LABURTHE, 1985a
Vesícula biliar	DUPONT, 1981
Páncreas	CHRISTOPHE et al., 1976

TABLA V. RECEPTORES PARA VIP EN DISTINTOS TEJIDOS, CELULAS Y LINEAS CELULARES (Cont.)

<u>APARATO GENITO-URINARIO</u>	<u>AUTORES</u>
Riñón	MAGISTRETTI et al., 1988
Próstata	CARMENA y PRIETO, 1983
Vesícula seminal	GUIJARRO et al., 1991
Utero	OTTESEN et al., 1982
<u>SISTEMA NEUROENDOCRINO</u>	
Hipófisis	WANKE y RORSTAD, 1990.
Pineal	KAKU et al., 1983
Glándulas lacrimales	DARTT et al., 1984
Tiroides	MOLINERO et al., 1985
Suprarrenal	MAGISTRETTI et al., 1988
<u>SISTEMA INMUNE</u>	
Linfocitos humanos de sangre periférica	GUERRERO et al., 1981
	DANEK et al., 1983
	CALVO et al., 1986a
Macrófagos peritoneales de rata	SEGURA et al., 1991
	CALVO et al., 1994a
Macrófagos peritoneales de ratón	CALVO et al., 1994b
Células de mieloma humano	FINCH et al., 1989
Linfocitos T humanos	FINCH et al., 1989
Timocito de pollo	LACEY et al., 1991
Bursa de Fabricio de pollo	LACEY et al., 1991
<u>OTRAS LOCALIZACIONES</u>	
Tejido adiposo	BATAILLE et al., 1974
Plaquetas	ERCAL et al., 1988

TABLA V. RECEPTORES PARA VIP EN DISTINTOS TEJIDOS, CELULAS Y LINEAS CELULARES (Cont.)

<u>LINEAS CELULARES</u>	<u>AUTORES</u>
SH-SY5Y	MULLER et al., 1989
SK-N-SH	MULLER et al., 1989
Líneas celulares de glioma humano	NIELSEN et al., 1990
GH ₄ C ₁	BJORO, 1987
GH ₃	WOOD et al., 1985
SUP-T1	CHRISTOPHE et al., 1990
U266	FINCH et al., 1989
Molt 4b	BEED et al., 1983
IGR39	LUIS, 1989
BL/VL ₃	ABELLO et al., 1989

Por otra parte, se ha encontrado que el péptido T no interacciona con el receptor de VIP (POZO et al., 1994).

La estructura molecular del receptor de VIP ha sido descrita en distintos sistemas por la técnica de formación de puentes covalentes (cross-linking) (Tabla VI) utilizando reactivos bifuncionales o cross-linkers y posterior electroforesis (SDS-PAGE). Se observa que el peso molecular del receptor oscila entre 50-85 KDa, variando éste según la especie y dentro de una misma especie, según el tejido estudiado y el cross-linker usado. El aspecto difuso de las bandas obtenidas en las autorradiografías sugiere que el receptor podría estar glucosilado, siendo ésto comprobado por NGUYEN et al., 1986 y DICKINSON et al., 1986a. Estudios realizados en células HT29 indican la presencia de una cadena de carbohidratos de 20 KDa constituida en parte por ácido siálico (LUIS et al., 1988). Por tanto, la heterogeneidad de los pesos moleculares del receptor encontrado en los diferentes sistemas podría deberse en parte a distintos grados de glicosilación.

Se han aportado nuevos datos sobre la estructura molecular del receptor de VIP gracias a la solubilización activa del receptor mediante detergentes no desnaturizantes como Tritón X-100, Lubrol-PX o CHAPS. Así, en membranas de hígado de rata se han encontrado dos componentes cuyos pesos moleculares (deducidos a partir de sus características hidrodinámicas) son de 150 KDa para el componente mayor y de 52 KDa para el menor, siendo el menor el receptor de VIP y el mayor un complejo formado por el receptor y una proteína Gs (COUVINEAU et al., 1986b). El mismo resultado se ha obtenido en intestino delgado de rata, encontrándose un componente mayor de 152 KDa que corresponde al complejo receptor-proteína Gs y otro menor de 54 KDa que sería el receptor de VIP (CALVO et al., 1989). El receptor de VIP, se ha solubilizado además en hígado de rata (GUERRERO et al., 1986; GUIJARRO et al., 1989), pulmón de rata (PROVOW y VELIÇELEBI, 1987; PATTHI et al., 1988), pulmón de cobaya (PAUL y SAID, 1987) y células de adenocarcinoma colónico humano (EL BATTARI et al., 1988). COUVINEAU et al., 1990a ha purificado a partir de hígado de cerdo, mediante cromatografía de afinidad, una proteína de 53.000 Da que se correspondería con el receptor de VIP.

TABLA VI. CARACTERIZACIÓN DEL RECEPTOR DE VIP MEDIANTE CROSS-LINKING.

<u>TEJIDO/LINEA CELULAR</u>	<u>AUTORES</u>
Córtex de rata	O'DORISIO et al., 1988
Enterocitos de rata	LABURTHER et al., 1984
Enterocitos humanos	COUVINEAU y LABURTHER, 1985b
Hígado de rata	NGUYEN y KAISER, 1990
Pulmón de rata	PROVOW y VELIÇELEBI, 1987
Pulmón de conejo	DICKINSON et al., 1986b
Pulmón de cobaya	DICKINSON et al., 1986b
Pulmón humano	DICKINSON et al., 1986b
Vesícula seminal de rata	GUIJARRO et al., 1991
Linfocito B humano	O'DORISIO et al., 1989a
Macrófagos peritoneales de rata	CALVO et al., 1994a
Macrófagos peritoneales de ratón	CALVO et al., 1994b
HT29 humano	COUVINEAU et al., 1985
AR 4-2 J rata	SVOBODA et al., 1988
Molt 4b humano	WOOD y O'DORISIO, 1985
Cl. 19A intestino humano	ROUYER-FESSARD et al., 1989

La aplicación de la biología molecular ha permitido la clonación del receptor de VIP a partir de ARNm aislado de distintos tipos celulares por transcripción inversa de éste y amplificación por PCR. Utilizando como cebadores (primers) secuencias de los segmentos III y VII de receptores análogos al del VIP (como el receptor de la secretina), se ha aislado el receptor de VIP de una librería de ADNc de pulmón de rata por hibridación con el ADNc del receptor de secretina (ISHIHARA et al., 1992), encontrándose que el receptor de VIP aislado consiste en una proteína de 459 aminoácidos con un peso molecular de 52.054 Da que contiene 7 dominios transmembranas, estando estructuralmente relacionado con el receptor de la secretina, calcitonina y hormona paratiroidea, sugiriéndose que constituye una nueva subfamilia de los receptores acoplados a proteínas G. Posteriormente, se ha clonado el receptor de VIP en la línea celular HT-29 de células del epitelio intestinal humano (SREEDHARAN et al., 1993), hígado humano (GAGNON et al., 1994), bulbo olfatorio de rata (LUTZ, 1993), células epiteliales de yeyuno (COUVINEAU et al., 1994), línea celular SUP-T1 de linfoblastos humanos (SVOBODA et al., 1994), cerebro de rata (SHEWARD et al., 1995) y pituitaria de rata (SHEWARD et al., 1995).

La dinámica del receptor de VIP se ha estudiado en células HT29 (MULLER et al., 1985), en la línea celular AR4-2S (SVOBODA et al., 1988), en células epiteliales de intestino de rata (IZZO et al., 1991) y en macrófagos peritoneales de rata (POZO et al., 1995), donde se ha observado que una vez formado el complejo péptido-receptor, éste es rápidamente internalizado (posiblemente por endocitosis activa, como ha sido demostrado en células B de páncreas de rata (ANTEUNIS et al., 1989)), lo cual produce una disminución de receptores o "down regulation" (LUIS et al., 1988) y una desensibilización homóloga de la adenilato ciclasa (WIJK, 1988). Una vez en el interior celular, el VIP es degradado en los lisosomas junto con cantidades pequeñas de receptores, siendo el resto de los receptores reciclados hacia la superficie celular.

Se ha observado que la unión del VIP a su receptor es sensible a la digestión con tripsina (DESBUQUOIS, 1974; SARRIEAU et al., 1983) y a la digestión con fosfolipasa A₂ o C (DESBUQUOIS, 1974; SARRIEAU et al., 1985), lo cual sugiere la intervención de los fosfolípidos en la capacidad del receptor para unirse al VIP.

Además, el aumento del contenido en colesterol de la membrana disminuye el acoplamiento receptor-efector (CARMENA et al., 1991).

Por tanto, el receptor de VIP es una glicoproteína de membrana (LABURTHE y COUVINEAU, 1988), que pertenece a la familia de receptores acoplados positivamente a la adenilato ciclasa y cuya estructura parece diferir no sólo entre especies, sino también entre distintos tejidos dentro de una misma especie, lo cual podría explicar la gran variedad funcional del VIP y las diferentes propiedades farmacológicas encontradas entre distintas especies.

2.7.2 Proteínas G. las proteínas G pertenecen a la superfamilia de las GTPasas fijadoras de nucleótidos de guanina (fundamentalmente GTP) (BOURNE et al., 1990), diferenciándose de los otros miembros de la superfamilia por su función transductora en el acoplamiento receptor-efector y por su estructura heterotrimérica (SPIEGEL, 1989). Las proteínas G, se encuentran en la membrana celular y dan lugar al acoplamiento entre el receptor y la adenilato ciclasa (RODBELL, 1980). Así, al formarse el complejo VIP-receptor, se produce un cambio conformacional en el receptor que se transmite a una proteína reguladora asociada a él (proteína G).

En el sistema generador de AMPc, existen dos tipos de proteína G implicadas: la G_s o activadora (controla el proceso de activación de la adenilato ciclasa (AC)) y la G_i o inhibidora (inhibe la AC). La G_s interviene en el caso del VIP, glucagón, TSH, PTH y agonistas β -adrenérgicos y la G_i para la somatostatina, bombesina y agonistas D₂-dopaminérgicos (SPIEGEL, 1989). En el sistema generador de AMPc, la G_s estimula la producción de AMPc y la G_i la inhibe. Tanto la G_s como la G_i son estructuralmente proteínas heterotriméricas constituidas por tres subunidades:

- 1) Una subunidad α de peso molecular entre 45-52 KDa, cuya secuencia aminoacídica está bastante conservada y que define los diferentes tipos de proteínas G. Fija los nucleótidos de guanina (unión dependiente de Mg^{2+}) y posee actividad GTPasa intrínseca. Esta subunidad, es sustrato para la ADP-ribosilación catalizada por algunas toxinas bacterianas.

- 2) Una subunidad β de peso molecular 35-36 KDa, de la que se han encontrado dos

tipos distintos (STERNWEIS y ROBISHAW, 1984), dato confirmado posteriormente por clonación (GAWLER et al., 1987).

3) Una subunidad γ que es un pequeño péptido de unos 8 KDa fuertemente asociada a la subunidad β (MILLIGAN, 1988), ambas con propiedades reguladoras y de anclaje a la membrana.

Tanto la Gs como la Gi pueden encontrarse en dos estados funcionales distintos: la forma inactiva y la activa. En la forma inactiva, la subunidad α está unida a una molécula de GDP, dando el complejo α -GDP. El estado activo se produce cuando la subunidad α -GDP intercambia en presencia de Mg^{2+} la molécula de GDP por otra de GTP, dando el complejo activo α -GTP. El mecanismo de acción de las proteínas Gs es idéntico para todos sus efectores (VIP, glucagón, TSH, PTH y agonistas β -adrenérgicos): al interaccionar el efector (VIP) con su receptor específico, el complejo VIP-receptor produce un cambio conformacional sobre la proteína, lo que hace que ésta pase de su estado inactivo al activo al intercambiar en presencia de Mg^{2+} la molécula de GDP por otra de GTP. Esto trae como consecuencia la disociación del trímero en un dímero $\beta\gamma$ y un complejo activo α -GTP, que es el que activa a la adenilato ciclasa. La otra consecuencia es la disminución de la afinidad del receptor por el VIP (SPIEGEL, 1989), lo cual hace que el incremento de la tasa de disociación del péptido en presencia de GTP proporcione una evidencia indirecta de la participación de una proteína G en su mecanismo efector (LABURTHE et al., 1984; COUVINEAU et al., 1986a, 1990b; CALVO et al., 1990). La hidrólisis del GTP a GDP inhibe la actividad del complejo α -GTP. Esta hidrólisis es posible gracias a la actividad GTPásica intrínseca de la subunidad α , siendo éste un mecanismo de autoregulación del sistema (GILMAN, 1987). El complejo resultante α -GDP se une de nuevo al dímero $\beta\gamma$, volviendo a constituirse el trímero inactivo.

Tanto Gs como Gi son activadas por nucleótidos de guanina o por el ión fluoruro o Al^{3+} en presencia de Mg^{2+} (MILLIGAN, 1988).

Las subunidades α de las proteínas G, son sustratos de ciertas toxinas bacterianas, como la colérica (producida por *Vibrio cholerae*) y la pertúsica (*Bordetella pertussis*), que interfieren la correcta transducción de la señal a través de las membranas

plasmáticas al introducir un grupo ADP-ribosa en la subunidad α . La toxina colérica inhibe la actividad GTPásica intrínseca de la subunidad α s, con lo que se mantiene esta subunidad en su forma activa y se produce así una estimulación mantenida de la adenilato ciclasa incluso en ausencia de señal externa. La proteína Gs que transduce la señal del VIP en hígado (COUVINEAU et al., 1990b) y en intestino de rata (CALVO et al., 1989), es sensible a dicha toxina.

El mecanismo de acción de la proteína Gi es idéntico al de la Gs con la excepción de que el complejo formado por la subunidad α de la proteína Gi y el GTP ($Gi\alpha$ -GTP), inhibe a la adenilato ciclasa. KATADA et al., 1986, proponen además que el dímero $\beta\gamma$ proveniente de Gi, posee un efecto inhibitorio sobre la actividad adenilato ciclasa al interactuar con la subunidad α de la Gs, anulando así su efecto.

La toxina pertúsica impide el intercambio de la molécula de GDP por la de GTP en la subunidad α i, lo cual hace que la proteína Gi quede desacoplada de su receptor. La proteína Gi que media la acción de la somatostatina es sensible a la toxina pertúsica (SPIEGEL, 1989).

Estudios realizados en hígado de rata (COUVINEAU et al., 1990b), han aportado evidencias funcionales e inmunoquímicas de que los complejos VIP-receptor, solubilizados en Tritón X-100, se asocian físicamente a la subunidad α de la proteína Gs.

Las proteínas G se encargan del acoplamiento receptor-efector no sólo en el sistema de generación de AMPc, sino también en otros mecanismos efectores de la acción hormonal como el sistema GMPc-fosfodiesterasa (Gt), apertura de canales de Ca^{2+} (Gs) (BOKOCH et al., 1984; HILDEBRANDT et al., 1984; GILMAN, 1987)) y estimulación de la fosfolipasa C (Gp) (BOURNE et al., 1990).

2.7.3 Activación de la adenilato ciclasa. La adenilato ciclasa (AC) es un enzima transmembranar de unos 120-150 KDa muy sensible al calor y a la desnaturalización que se encuentra en la membrana plasmática y cuya función es catalizar la formación de AMPc a partir de ATP en presencia de Mn^{2+} o Mg^{2+} al ser estimulada por las proteínas G. Se han descrito en eucariontes 8 tipos diferentes de AC, todas ellas con

un modelo estructural común consistente en una región amino terminal acompañada de dos dominios catalíticos situados en el citosol, entre los que se intercalan dos dominios intermembranosos formados por 6 hélices (TANG y GILMAN, 1992; TAUSSIG y GILMAN, 1995). La activación o inhibición de la AC se inicia con la unión del ligando a su receptor. Esta unión, produce un cambio conformacional en la molécula receptora que favorece su interacción con la proteína G (Gi o Gs), activándose la proteína G, que intercambia su GDP por GTP, se disocia del receptor e interacciona a su vez con la AC, estimulando o inhibiendo (según se trate de una proteína Gs o Gi) su componente catalítico y modulando así los niveles intracelulares de AMPc. El efecto estimulador del VIP sobre la actividad AC, ha sido descrito utilizando tanto células aisladas como membranas en: enterocitos de ratas (LABURTHE et al., 1979b), vesícula biliar humana (DUPONT et al., 1981), células mononucleares humanas (GUERRERO et al., 1981), linfocitos humanos (CALVO et al., 1986a), membrana de tiroides bovino (MOLINERO et al., 1985), y macrófagos peritoneales de rata (SEGURA et al., 1992a) y ratón (CALVO et al., 1994b). En la mayoría de los casos, el efecto del VIP es dosis-dependiente, obteniéndose la mitad de la concentración máxima (ED_{50}) con concentraciones de péptido entre 0'5 a 5 nM, muy similares a las constantes de disociación (Kd) de los receptores de VIP de alta afinidad.

2.7.4 Proteína quinasa dependiente de AMPc. Las proteína quinasa dependiente de AMPc es un tetrámero formado por dos subunidades reguladoras de diferente peso molecular y dos subunidades catalíticas iguales y con la misma capacidad para interaccionar con las anteriores.

El AMPc producido en respuesta al VIP, estimula a un sistema de proteínas quinasa que fosforila a otras proteínas intracelulares; éstas, serán, en último término, las que regulen los procesos fisiológicos (LABURTHE et al., 1979c; GUERRERO et al., 1984; COHN, 1987). Al unirse el AMPc a las subunidades reguladoras de las proteínas quinasa, se produce un cambio conformacional en el cual se separan las subunidades catalíticas que, una vez libres, transfieren grupos fosforilos sobre grupos hidroxilos de restos de serina o treonina de determinadas proteínas blanco intracelulares,

modificando así su actividad biológica. En las fosforilaciones, el dador de grupos fosfato es el complejo ATP-Mg²⁺. Las fosfatasas son enzimas que hidrolizan el enlace fosfoéster formado por las quinasas en las proteínas blanco, regulándose de este modo la actividad de las proteínas blanco al devolverlas a su antiguo estado funcional. (Fig.10).

La activación por el VIP de quinasas dependientes de AMPc ha sido descrita en enterocitos de ratas (LABURTHE et al., 1979c), células HeLa de carcinoma de cérvix humano (PRIETO, 1982), células mononucleares sanguíneas humanas (GUERRERO et al., 1984) y en linfoblastos T de la línea Molt 4b (O'DORISIO et al., 1985a).

2.7.5 Otros mecanismos de acción del VIP. Se han encontrado evidencias que existen otros mecanismos de acción del VIP. No obstante, la vía de transducción principal es la de la adenilato ciclasa.

La unión del VIP a la CaM, fue descrita por primera vez en membranas de pulmón (BRUGGER et al., 1991), aunque ya se había observado previamente por métodos indirectos (MALENCIK y ANDERSON, 1983).

Aunque el AMPc es el segundo mensajero predominantemente utilizado por el VIP, es conocida también la activación por el péptido de otros sistemas de transducción de señales, como síntesis de GMPc (JIN et al., 1993; CHAKDER y RATTAN, 1993), movimiento transmembrana e intracelulares de Ca²⁺ (OETTLING et al., 1990; TATSUNO et al., 1992), activación de los canales de K⁺ (LARSSON et al., 1988), y síntesis de fosfatos de inositol (AUDIGIER et al., 1987). Así, se ha encontrado que bajas concentraciones de VIP potencian la estimulación muscarínica de la vía de los fosfoinositoles en córtex cerebral de rata (RAITERI et al., 1987).

Por otra parte, se ha descrito la activación por el VIP de una proteína quinasa C nuclear (PKCn), en núcleos aislados de esplenocitos de rata (ZORN y RUSSELL, 1990), de forma que el VIP interaccionaría en primer lugar con un receptor de membrana, siendo luego internalizado por endocitosis y por último, interaccionaría con un receptor nuclear activando las PKCn y desencadenando fosforilaciones que podrían ocasionar cambios a nivel de transcripción.

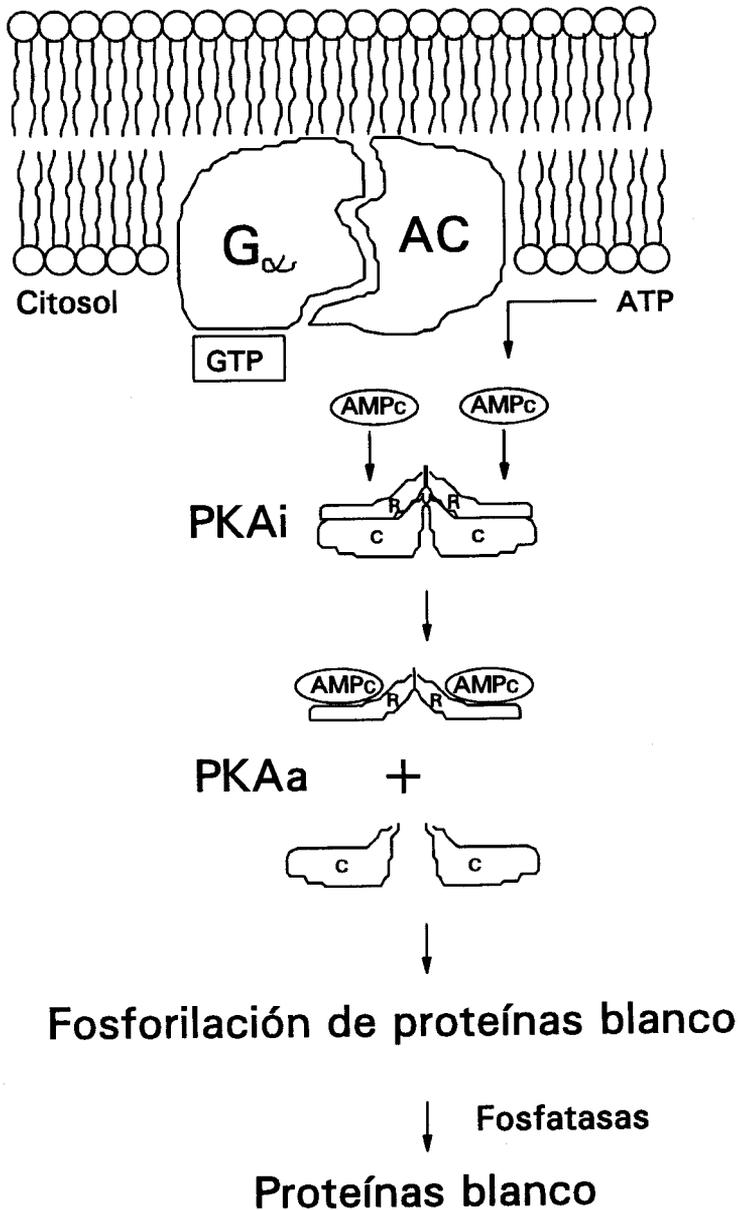


Fig.10. Activación de la proteína quinasa dependiente de AMPc. El AMPc se une a las subunidades reguladoras (R) de la proteína quinasa inactiva (PKAi), la cual sufre un cambio conformacional y pasa a forma activa (PKAa), liberando las subunidades catalíticas (C), que fosforilan y activan a la proteína blanco, produciendo así el efecto biológico. Las proteínas blanco son inactivadas por las fosfatasas, que devuelven a las proteínas blanco a su forma original y actúan como proteínas reguladoras del sistema.

MATERIAL Y METODO

1. MATERIALES.

1.1 REACTIVOS.

El VIP sintético de rata, helodermina, factor liberador de la hormona del crecimiento (GRFr), pancreastatina porcina, secretina, somatostatina, y los antagonistas A1 ((4-Cl-D-Phe⁶,Leu¹⁷)VIP) y A2 ((Ac-Tyr¹,D-Phe²)GRF₁₋₂₉-NH₂) del VIP fueron obtenidos de Peninsula Laboratories Europe (Merseyside, UK).

El glucagón y la insulina porcina provenían de Novo (Copenhagen, Denmark).

La bacitracina, albúmina sérica bovina (BSA), 3-isobutil-1-metil-xantina (IBMX), etilen-diamino-tetraacetato sódico (EDTA), N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-(ácido 2-hidroxi-propanosulfónico) (HEPES), Tris (Trihidroximetilaminometano), melatonina, 3',3,5-triyodotironina (T₃), tiroxina (T₄), D,L-ditiotreitol (DTT), resina de intercambio iónico Dowex-50W, metimazol, (-)-isoproterenol, metoxamina, coproporfirina III tetrametil éster, GTP y otros nucleótidos fueron obtenidos de Sigma Chemical (St. Louis, MO, USA).

El fenil-metil-sulfoni-fluorido (PMSF), N- α -tosil-L-lisina clorometil cetona (TLCK) y leupeptina, de Boehringer Mannheim GmbH (Germany).

Los productos químicos para la electroforesis y los estándares de masa molecular fueron de Bio Rad Laboratories (Richmond, USA).

El ditiobis (succinimidil propionato) (DTSP), de Pierce Chemical Company (Rockford, IL, USA).

¹²⁵INa (IMS 30, 100 mCi/ml) y el kit de radioinmunoanálisis de AMPc (RPA 509) se obtuvo de Radiochemical Center (Amersham, UK).

La resina Sephadex LH-20, fue obtenida de Pharmacia (Uppsala, Swenden).

Eter, ácido acético, metanol y NH₄OH de Fluka (Buchs, Switzerland).

Los reactivos de grado analítico no citados, fueron adquiridos de Merk (Darmstadt, Germany).

1.2 APARATOS.

- Sonicador MSE.
- Politrón (KINEMATICA, Gmbh).
- Centrífuga microfuga (Sigma, 2K-15).
- Centrífuga (Beckman, TJ-6).
- Centrífuga Dupont RC5C GIRALT.
- Agitador Heidolph REAX 2000.
- Multiagitador (SMI Modelo 2601).
- Baño Unitronic 320 OR.
- Contador de radioactividad gamma LKB 1261 Multigamma.
- Espectrofotómetro LKB Biochrom Ultrospec II E.
- Fluorímetro HITACHI F-2000 GIRALT.
- Congelador -80°C REVCO ULT-790-7-VBA.
- Estufa P-SELECTA Ref. S-381 mod.381.

1.3 ANIMALES.

Se usaron ratas Wistar macho de 1,5 a 2 meses de edad, nacidas y criadas en el animalario, de unos 200 g de peso aproximadamente y sometidas a un ciclo controlado de luz-oscuridad con 14 horas de luz y 10 de oscuridad (14:10). La luz se apaga desde las 20.00 hasta las 06.00 horas. Todos los animales recibieron agua y comida (Purina rat chow) ad libitum y fueron mantenidos bajo condiciones constantes de temperatura (22°C) y humedad (45±5%).

Algunos animales requirieron tratamiento. Ciertos grupos fueron tratados en el agua de bebida con BSA al 0'01% (p/v); BSA al 0'01% (p/v)+metimazol al 0'02% (p/v); BSA al 0'01% (p/v)+metimazol al 0'02% (p/v) +T₄ al 1%(p/v) durante 10 días antes de la toma de las muestras. Los animales que lo requirieron, fueron inyectados intracardíacamente con 250 µl de salino (solución de ClNa al 0'9% (p/v) en agua destilada) como grupo control; otros con 250 µl de VIP a una concentración 1 µM y otros lo fueron con análogos o con antagonistas del VIP a la misma concentración. La solución en que se inyectó el VIP, sus análogos o sus antagonistas a las ratas contenía

CINa al 0'9% (p/v); BSA al 0'5% (p/v) e inhibidores de proteasas tales como bacitracina (10% (p/v)), TLCK (1% (p/v)), PMSF (disuelto previamente en un volumen pequeño de etanol) a una concentración del 5% (p/v) y leupeptina al 1% (p/v). Algunos animales fueron inyectados subcutáneamente con un volumen de 100 μ l de salino (grupo control), (-)-isoproterenol (1 mg/kg peso rata disuelto en salino) o metoxamina (1 mg/kg peso rata disuelto en salino). Para alcanzar el hipotiroidismo, fueron tratados con metimazol al 0'02% (p/v) en el agua de bebida durante 10 días antes de la obtención de las muestras.

Para la obtención de muestras, los animales fueron sacrificados mediante decapitación, siendo anteriormente anestesiados con éter etílico. Las muestras fueron rápidamente extraídas, congeladas en CO₂ sólido y almacenadas a -80°C hasta el día de su utilización.

2. METODOS.

2.1 AISLAMIENTO DE MEMBRANAS DE CELULAS DE GLANDULAS HARDERIANAS DE RATA.

Se realizó siguiendo el método de CARDINALI et al., 1979 y de VENECEK et al., 1987 con algunas modificaciones.

2.1.a Reactivos:

-Tampón de homogenización Tris-HCl 0'01 M pH 7'5, conteniendo sacarosa 0'25 M; EDTA 0'5 mM e inhibidores de proteínas: bacitracina 0'1 mg/ml; TLCK 0'01mg/ml; leupeptina 0'01 mg/ml; PMSF 0'05 mg/ml.

-Tampón Hepes 20 mM, pH 7'5.

-Tampón Hepes 20 mM con PMSF.

2.1.b Método:

Todos los pasos se realizaron en frío. En primer lugar, se homogenizaron las glándulas Harderianas, poniendo de 3 a 4 glándulas por tubo de centrifuga RC5C

GIRALT con 30 ml de tampón Tris-HCl con inhibidores, usando el Polytron fijado a posición 6 (velocidad media) durante 2×1 min. El homogenado se centrifugó durante 30 min. a $30.000 \times g$ a una temperatura de 4°C . Se desechó el sobrenadante y la capa lipídica aspirando al vacío con pipeta Pasteur, dejando sólo el pellet en cada tubo, a cada uno de los cuales se añadió 30 ml de tampón Hepes 20 mM pH 7'5. Se homogenizó y centrifugó al igual que antes y se desechó también el sobrenadante y la capa lipídica, añadiendo al pellet 5 ml de tampón Hepes 20 mM con PMSF por glándula. Se sonicó cada tubo durante 5 sg a velocidad media, se mezclaron todos los tubos y se distribuyeron en alícuotas, almacenándose a -80°C . Una alícuota de éstas se utilizó para la determinación de proteínas.

2.2 DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE PROTEINAS.

La determinación de proteínas se realizó según el método de LOWRY et al., (1951), utilizando como estándar albúmina sérica bovina (BSA).

Para ello, se prepararon distintas disoluciones patrones de BSA, con las que se construyó una curva estándar sobre la que se calculó, por interpolación, la concentración de proteína existente en distintas diluciones de la muestra (1/10, 1/15 y 1/20). Las concentraciones se expresaron como μg de proteínas/ml.

2.3 MARCAJE DEL VIP CON ^{125}I .

Se realizó según la técnica descrita por LABURTHE et al., 1977.

2.3.a Reactivos:

-VIP: se disuelven 0'5 mg de VIP porcino en 0'5 ml de HCl 0'005 N, quedando a una concentración de 3×10^{-4} M. Se agita durante 60 min y se reparte en fracciones (20 alícuotas de $5 \mu\text{l}$ para su posterior marcaje y 8 alícuotas de $50 \mu\text{l}$ como stock de VIP a 3×10^{-4} M), conservándolas a -20°C hasta su uso.

-Tampón fosfato (TP) 0'3 M, pH 7'5.

-Cloramina T (1 mg/ml): se disuelven 10 mg de cloramina T ($\text{C}_7\text{H}_7\text{ClNaO}_2\text{S} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) en 10 ml del tampón fosfato anterior. Preparar 10-15 min antes del marcaje,

manteniéndose en oscuridad hasta su uso. En el marcaje, actúa como oxidante débil.

-Metabisulfito sódico (MbNa) (2 mg/ml): se disuelven 10 mg de metabisulfito sódico ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) en 5 ml de tampón fosfato. El metabisulfito sódico actúa como reductor, deteniendo la reacción de oxidación desencadenada por la cloramina T.

- ^{125}I Na de actividad 100 mCi ^{125}I /ml (16,5 mCi/ μg de yodo), preparado en NaOH, pH 7-11, libre de reductores y 99'6% de pureza radioquímica.

-TB: tampón tris 50 mM, BSA 2% (p/v), pH 7'5.

-TBB: tampón tris 50 mM, BSA 2%, bacitracina 2 mg/ml, pH 7'5.

-Acido acético 1 N al 50% (v/v) con etanol absoluto.

-Acido acético 0'2 M, BSA 0'5% (p/v), bacitracina 0'03% (p/v).

-Talco: 100 mg/ml, en agua destilada.

2.3.b Método:

El marcaje se realizó a temperatura ambiente, en una campana extractora y con la debida radioprotección. La mezcla de marcaje se preparó en un tubo de plástico, en el que se pusieron por este orden:

-20 μl de tampón fosfato.

-5 μl de VIP (1mg/ml).

-15 μl de ^{125}I Na (1'5 mCi).

-5 μl de la solución de cloramina T.

Se agitó exactamente durante 30 sg. Se añadió 5 μl de la solución de metabisulfito sódico y se volvió a agitar. Se añadió 400 μl de TBB, agitándose nuevamente. Se tomó una alícuota de 5 μl de la mezcla de marcaje y se pasó a un tubo que contenía 5 ml de TB. Esto se usaría para calcular el grado de incorporación de ^{125}I Na al péptido.

2.3.c Purificación del VIP marcado:

El VIP marcado se purificó por adsorción al talco. Para ello, se añadió a la mezcla de marcaje 0'1 ml de la suspensión de talco. Tras agitar, se centrifugó a 2.000 $\times\text{g}$ durante 10 min, desechándose el sobrenadante, el cual contenía yodo libre y pequeños péptidos. El sedimento de talco se resuspendió en 1 ml de acético 1 N/etanol

y se agitó fuertemente para separar el péptido yodado del talco. A continuación, se centrifugó durante 10 min a 2.000 ×g, recuperándose el sobrenadante, que contiene el $^{125}\text{I-VIP}$ puro, el cual se repartió en alícuotas de 50 μl que se conservaron a -20°C hasta el momento de su utilización. Con este método, el $^{125}\text{I-VIP}$ debe ser repurificado antes de su uso en el experimento, añadiendo al tubo que contiene al péptido marcado 350 μl de TB y 100 μl de la suspensión de talco, agitando bien y centrifugando después durante 10 min a 2.000 ×g. El sobrenadante, contenía yodo radiactivo libre y fragmentos de péptido y se desechó. El sedimento, que contenía $^{125}\text{I-VIP}$ puro, se resuspendió en 1 ml de la solución de acético/etanol y después de agitar fuertemente, se centrifugó de nuevo a 2.000 ×g durante 10 min, recuperándose el sobrenadante en el que se encuentra el $^{125}\text{I-VIP}$ purificado.

2.3.d Cálculo del porcentaje de incorporación:

Se tomó una alícuota de la mezcla de marcaje de 5 μl y se pasó a un tubo que contenía 5 ml de TB, agitándolo a continuación. De este tubo, se tomaron 100 μl y se añadieron a un tubo de plástico que contenía 300 μl de TBB y 100 μl de la suspensión de talco, todo ello por triplicado. Tras agitar fuertemente, se centrifugó durante 10 min a 2.000 ×g y se separaron los sobrenadantes de los precipitados. Se determinaron las cuentas por minuto tanto en el precipitado como en el sobrenadante en un contador gamma, calculándose así el porcentaje de radiactividad del precipitado respecto al total:

$$\% \text{ incorporación} = \frac{\text{cpm en el precipitado}}{\text{cpm en el precipitado} + \text{cpm en el sobrenadante}}$$

En los marcajes realizados, el porcentaje de incorporación medio estuvo sobre el 80%.

2.3.e Cálculo de la actividad específica:

La actividad específica nos muestra la cantidad de radiactividad en μCi incorporada por μg de péptido. La actividad específica del ^{125}I -VIP se calculó a partir del porcentaje de incorporación, conociendo los mCi de ^{125}I y los μg de VIP utilizados en el marcaje:

$$\text{Actividad específica} = \frac{\mu\text{Ci de } ^{125}\text{I} \times \% \text{ incorporación}}{\mu\text{g de VIP} \times 100}$$

La actividad específica media alcanzada fue de unos $250 \mu\text{Ci } ^{125}\text{I} / \mu\text{g VIP}$.

2.4 UNION DEL ^{125}I -VIP A SUS RECEPTORES ESPECIFICOS DE MEMBRANA.

2.4.a Reactivos:

- TB: Tris 50 mM, BSA 2%, pH 7'5.
- TBB: Tris 50 mM, BSA 2%, bacitracina 2 mg/ml, pH 7'5.
- Tris-sacarosa: Tris 50 mM, pH 7,5, sacarosa 10%(p/p).
- VIP frío: añadir 1.450 μl de TB a una alícuota de 50 μl de VIP stock (3×10^{-4} M), quedando el VIP a una concentración de 10^{-5} M. Agitar y repartir en alícuotas de 50 μl , las cuales se utilizarán en los experimentos de dosis-efecto, en algunos de los cuales se necesitará preparar mediante diluciones sucesivas con TB diferentes concentraciones de VIP frío comprendidas entre 10^{-11} y 10^{-7} M. Para la determinación de la unión inespecífica, se utilizó VIP frío a una concentración de 10^{-6} M en el medio de incubación (VIPns). A tan elevada concentración, el VIP frío debería desplazar por completo al ^{125}I -VIP de su unión a los receptores específicos, considerándose que el que sigue unido a las membranas no está unido a receptores específicos, representando la unión no específica.

- ^{125}I -VIP: tras repurificar con talco una alícuota de 30 μl de VIP marcado, se diluyó ésta con TB para alcanzar una concentración en el medio de incubación de 45 pM, similar a la existente en el plasma.

- Preparación de membranas: resuspender las membranas crudas de harderianas en el volumen necesario de Tris 50 mM para que en el medio de incubación quede a la concentración requerida.

2.4.b Método general: dosis-efecto.

Excepto en la incubación, los experimentos se realizaron en frío. Se emplearon tubos de plástico de 3 ml y el volumen final de la incubación fue de 500 μl . Cada punto se hizo por triplicado. A cada uno de los tubos se añadió por este orden:

-250 μl de TBB.

-50 μl de TB.

-50 μl de TB, VIP frío (a distintas concentraciones) o VIPns.

-50 μl de ^{125}I -VIP.

-100 μl de la preparación de membranas (quedando a una concentración final de 50 μg /ml).

Se agitó e incubó durante 30 min a 15 y 30°C. Se detuvo la reacción tomando alícuotas de 200 μl de la mezcla que se pasaron a tubos de microfuga que contenían 200 μl de TB frío. Luego, se centrifugaron en la microfuga a 12.000 $\times\text{g}$ durante 10 min a 4°C. Se aspiró al vacío los sobrenadantes y se lavaron los precipitados dos veces con Tris-sacarosa frío. A continuación, se cortaron las puntas de los tubos y se contó en el contador gamma durante 2 min.

En todos los experimentos se tomaron 3 alícuotas de 200 μl de los medios de incubación, las cuales no se centrifugaron, contándose la radiactividad directamente, siendo utilizadas para determinar la actividad específica (radiactividad total, en cpm que hay en 200 μl del medio de incubación), la cual se toma como referencia para expresar en porcentaje la radiactividad (cpm) que muestran los sedimentos de membranas al contarlos, obteniéndose así el porcentaje de unión total que al restarle la unión inespecífica (radiactividad, en cpm, que muestra las membranas incubadas en presencia

de VIPns), proporciona la unión específica, es decir, el porcentaje de ^{125}I -VIP unido específicamente:

$$\% \text{Unión Específica} = \% \text{Unión Total} - \% \text{Unión inespecífica.}$$

2.4.c Cinética de asociación:

Se estudió la cinética de la unión del ^{125}I -VIP a sus receptores en membranas de harderianas de rata a dos temperaturas: 15 y 30°C. Para ello, se determinó la unión específica del trazador a las membranas a los 2, 5, 10, 15, 30, 60, 90 y 120 min de incubación para cada una de las temperaturas para así poder determinar el tiempo en que se alcanza el estado de equilibrio y la estabilidad de la unión, lo cual permitió elegir las condiciones óptimas de tiempo y temperatura a utilizar en los demás experimentos.

2.4.d Concentración de proteínas:

Con el fin de determinar la concentración óptima de proteínas, se estudió la unión específica del ^{125}I -VIP para distintas concentraciones (desde 2 hasta 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$) a 30°C. Así, se determinó la concentración de proteína óptima.

2.4.e Degradación del ^{125}I -VIP:

Tanto en los experimentos de cinética de asociación como en los de concentración de proteínas, se determinó para cada tiempo, temperatura y concentración de proteínas, la cantidad de ^{125}I -VIP indemne que quedaba en los sobrenadantes de los tubos de microfuga, la cual reflejó la degradación sufrida por el trazador durante la incubación. Para ello, se pusieron en tubos de 3 ml de plástico:

- 200 μl del sobrenadante postmicrofuga.
- 200 μl de TB frío.
- 100 μl de talco.

Se agitó bien y se centrifugó a 2.000 $\times g$ durante 10 min. Se separaron los precipitados

de los sobrenadantes, contándose ambos en el contador gamma. El porcentaje de ^{125}I -VIP indemne se calculó dividiendo las cpm que dió el precipitado (donde se encuentra el trazador indemne adsorbido al talco) entre la suma de las cpm del precipitado mas las del sobrenadante (donde se encuentran los fragmentos degradados de péptido marcado), de forma similar a lo descrito anteriormente para el cálculo del porcentaje de incorporación:

$$\% \text{ } ^{125}\text{I-VIP indemne} = \frac{\text{cpm del precipitado}}{\text{cpm del precipitado} + \text{cpm del sobrenadante}}$$

El porcentaje de ^{125}I -VIP indemne es fundamental en la valoración de la cinética de asociación y del efecto de la concentración de proteínas en el momento de elegir las condiciones óptimas de incubación.

2.4.f Cinética de disociación:

Para el estudio de la disociación del complejo ^{125}I -VIP-receptor, se realizó una incubación a 30°C durante 30 min en las condiciones descritas. Tras los 30 min y alcanzado el estado de equilibrio, se añadió al medio de incubación una sobrecarga de VIP frío a una concentración final de 10^{-7} M para que indujese la disociación del complejo. A continuación, manteniendo la temperatura de incubación a 30°C , se determinó la unión específica del trazador a las membranas a los 0, 1, 2, 5, 10, 15, 30 y 60 min, expresándola como porcentaje de la existente en el tiempo 0, justo al añadir la sobrecarga de VIP frío.

2.4.g Especificidad:

Se estudió la unión específica del ^{125}I -VIP a las membranas en presencia de péptidos estructuralmente relacionados o no con el VIP con el fin de determinar si los receptores son o no específicos para VIP.

-Péptidos relacionados con el VIP: helodermina, GRFr, PHI, glucagón,

secretina.

-Péptidos no relacionados con el VIP: insulina, somatostatina, pancreastatina, melatonina.

El protocolo es similar al de dosis-efecto con la variante de que en vez de hacer competir al ^{125}I -VIP con el VIP frío, se hizo con estos péptidos a distintas concentraciones desde 10^{-11} hasta 10^{-6} M.

2.4.h Nucleótidos:

Se estudió el efecto de diferentes nucleótidos sobre la unión específica del ^{125}I -VIP a sus receptores en membranas de harderianas.

El protocolo es similar al de dosis-efecto excepto que en vez de hacer competir al ^{125}I -VIP con el VIP frío, se hizo con estos péptidos a concentraciones entre 10^{-10} y 10^{-3} M. Los nucleótidos utilizados fueron: GTP, Gpp(NH)p, ATP, CTP y UTP.

2.5 DETERMINACION DE LA MASA MOLECULAR RELATIVA DEL RECEPTOR DE VIP MEDIANTE LA TECNICA DE CROSS-LINKING.

2.5.1 Cross-linking del ^{125}I -VIP a las membranas.

2.5.1.a Reactivos:

- Tampón Hepes 20 mM, pH 7'5.
- Tampón Hepes 20 mM, pH 7'5, BSA 2% (p/v), bacitracina 0'1% (p/v).
- Tampón Hepes 20 mM, pH 7'5, DTSP (ditiobis (succinimidil propionato)) 1mM.
- Tampón Hepes 20 mM, pH 7'5, glicina 60 mM.
- Tris 60 mM-HCl pH 8'8, glicerol 10% (v/v), azul de bromofenol 0'001%, SDS (dodecil sodio sulfato) 3% (p/v).
- ^{125}I -VIP 0,3 nM.
- VIP frío 10^{-6} M.
- Preparación de membranas a una concentración final de 100 μg /ml.

2.5.1.b Método:

Las membranas, (100 $\mu\text{g/ml}$) se incubaron durante 30 min a 30°C en 5 ml de tampón Hepes 20 mM, pH 7,5, BSA 2% (p/v), bacitracina 0,1 % (p/v) con ^{125}I -VIP 0,3 nM. Para determinar la unión inespecífica, se hizo la misma incubación anterior a la que además se le añadió un exceso de VIP frío a una concentración de 10^{-6} M. Tras la incubación, se detuvo la reacción añadiendo 25 ml de tampón Hepes 20 mM pH 7'5 frío y posteriormente se centrifugó a 30.000 $\times\text{g}$ durante 15 min a 4°C. El precipitado se resuspendió en 1 ml de Hepes 20 mM pH 7'5 que contenía DTSP 1mM. La reacción se llevó a cabo durante 15 min a 4°C y se detuvo al añadir 20 μl de Hepes 20 mM pH 7'5 frío que contenía glicina 60 mM para parar la reacción. Esta mezcla se centrifugó a 4°C durante 15 min a 30.000 $\times\text{g}$ y el precipitado resultante fue resuspendido en 0'1 ml de Tris 60 mM-HCl pH 8'8 conteniendo glicerol 10% (v/v), azul de bromofenol 0'001%, SDS 3% (p/v), por 5 pasadas sucesivas a través de una aguja de calibre 25. Tras calentar durante 30 min a 60°C, la suspensión fue centrifugada durante 15 min a 48.000 $\times\text{g}$ y el sobrenadante fue sometido al gel de electroforesis SDS-poliacrilamida (apartado siguiente).

2.5.2 SDS-PAGE y autoradiografía.

2.5.2.a Reactivos:

- Gel de poliacrilamida al 12%.
- Gel de poliacrilamida al 5 %.
- Marcadores de masa molecular (Mr) conocida: Fosforilasa b (Mr 97.400); BSA (Mr 66.200); Ovalbúmina (Mr 42.699); Anhidrasa carbónica (Mr 31.000); Inhibidor de tripsina (Mr 21.500); Lisozima (Mr 14.400).
- Solución fijadora de geles: metanol 43 % (v/v), ácido acético 1'6 M.
- Solución para teñir geles: azul de Comasie 0'1 % (p/v).
- Film Du Pont Cronex-4.

2.5.2.b Método:

Se realizó según el método de LAEMMLI, 1970. En primer lugar, se procedió al montaje de los geles, añadiendo el gel de poliacrilamida al 12%, se esperó a su polimerización y posteriormente se añadió el gel de poliacrilamida al 5% y se esperó a que polimerizara. Tras la polimerización, se montó la cubeta. A continuación, se añadió la muestra y los marcadores de peso molecular citados anteriormente en el apartado de reactivos. Los geles fueron fijados en metanol al 43% (v/v) y acético 1'6 M; teñidos en azul de Comasie al 0'1% (p/v) y desteñidos en la solución de fijación. Los geles fueron secados y expuestos durante 8-12 días a -80°C en una placa Du Pont Cronex-4 en oscuridad.

2.6 DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ADENILATO CICLASA ESTIMULADA POR VIP EN MEMBRANAS DE GLANDULA HARDERIANA DE RATA.

La determinación de la actividad adenilato ciclasa (AC), se realizó en 2 etapas:

- Producción de AMPc debido a la estimulación de la AC por el VIP.
- Determinación cuantitativa del AMPc producido en la etapa anterior por radioinmunoanálisis (RIA).

2.6.1 Producción de AMPc.

Se determinó tanto la producción basal como la producción estimulada por concentraciones crecientes de VIP (desde 10^{-11} a 10^{-6}) de AMPc.

2.6.1.a Reactivos:

- Solución compuesta por Tris 25 mM-HCl, pH 7'5, 3-isobutil-1-metil-xantina (IBMX) 1 mM, MgSO₄ 5mM, EDTA 1 mM, bacitracina 1mg /ml, GTP 10 μM, sistema regenerador de ATP (7,4 mg/ml de creatín fosfato, 1 mg/ml de creatín kinasa).
- ATP a concentración 1,5 mM.
- VIP diluido en TB a concentraciones entre 10^{-11} - 10^{-6} M.
- Preparación de membranas a concentración de 50 μg /ml.

- Metanol absoluto.

2.6.1.b Método:

La incubación se realiza para un volumen final de 100 μ l en tubos de plástico de 3 ml. Cada punto se hace por triplicado. En cada tubo, se añade por este orden:

- 50 μ l de la solución del apartado a.
- 10 μ l de TB para basal o de efector (VIP 10^{-11} - 10^{-6} M).
- 10 μ l de ATP.
- 30 μ l de la preparación de membranas.

Las concentraciones finales de cada uno de los reactivos en los tubos de incubación son las indicadas en el apartado anterior.

Una vez preparados los tubos, se incubaron a 30°C durante 20 min. La reacción se detuvo añadiendo 2'5 ml de metanol, lo cual hace que precipite la fracción proteica. Se centrifugó durante 10 min a 2000 \times g , se tomaron alícuotas de 100 μ l del sobrenadante y se pasaron a tubos de vidrio que se dejaron en la estufa a 60°C hasta que se evaporó por completo el metanol, quedando solamente el extracto seco de la fracción soluble del sobrenadante, en la cual se encuentra el AMPc producido. Los tubos con el extracto seco se conservaron a -80°C hasta la realización del radioinmunoanálisis de AMPc.

2.6.2 Determinación cuantitativa de AMPc.

Se realizó por radioinmunoanálisis (RIA), utilizando para ello un kit suministrado por Amersham capaz de cuantificar concentraciones de AMPc del orden femtomolar. El RIA de AMPc, se fundamenta en la elevada capacidad antigénica del AMPc, que posibilita la producción de anticuerpos (Ac) muy específicos frente a él a partir del suero de conejos a los que se le ha inyectado y en la facilidad con que se puede marcar radiactivamente con ^{125}I , preparándose en la forma ^{125}I -AMPc. Al añadir una elevada cantidad de ^{125}I -AMPc a una muestra que contiene una cantidad desconocida de AMPc y a continuación se añade una cantidad limitada de anticuerpos, ambas formas de AMPc compiten por unirse al anticuerpo específico, formándose complejos del tipo Ac-AMPc y Ac- ^{125}I -AMPc. Cuanto más AMPc contenga la muestra, más trazador libre

queda. Al hacer posteriormente precipitar por centrifugación los complejos Ac-AMPc y Ac-¹²⁵I-AMPc mediante un anticuerpo anti-inmunoglobulina de conejo (Amerlex-M) unido a polímeros magnetizables y deseamos el sobrenadante con el trazador libre, la radiactividad que queda en el precipitado corresponde sólo al complejo Ac-¹²⁵I-AMPc, siendo inversamente proporcional a la cantidad de AMPc que tenga la muestra.

2.6.2.a Reactivos:

- Excepto la muestra, el resto de los componentes pertenecen al kit.
- Tampón de análisis: acetato 0,05 M, pH 5,8, thimerosal 0,01%.
 - Trazador: ¹²⁵I-AMPc diluido en tampón de análisis de forma que 100 µl corresponden a 27.000 cpm.
 - Antisero o anticuerpo: anti-AMPc en acetato 0,05 M, BSA 0,5%, thimerosal 0,01%. Obtenido de conejo.
 - Segundo anticuerpo: Amerlex-M, anti-IgG de conejo. Obtenido de asno.
 - AMPc estándar: AMPc a una concentración 32 pM.
 - Muestra: obtenida por reconstitución, añadiendo 200 µl de tampón de análisis al extracto seco obtenido en el punto 2.6.1.

2.6.2.b Método:

b.1: preparación de la curva estándar.

Se prepararon distintas diluciones a partir de AMPc 32 pM (1600, 800, 400, 200, 100, 50, 25 y 12'5 fM). También se preparó un blanco (Bo).

b.2: preparación de las muestras.

Ya explicada en el apartado a.

b.3: procedimiento.

Se añadió a cada tubo por este orden:

- 50 µl de estándar, o de tampón de análisis, o de muestra.
- 50 µl de trazador a todos los tubos.
- 50 µl de antisero a todos los tubos excepto a los de actividad total (AT).

Se agitó todo bien y se incubó durante 3 horas a 4°C. Tras la incubación, se

detuvo la reacción añadiendo a cada tubo (excepto a los AT), 500 μ l del segundo anticuerpo. Se agitó e incubó a temperatura ambiente durante 10 min con el fin de que el segundo anticuerpo se uniese a los complejos antígeno/anticuerpo formados durante la primera incubación. Se centrifugaron los tubos a 2000 \times g durante 10 min y posteriormente se desechó el sobrenadante aspirando al vacío, contándose a continuación la radiactividad de los precipitados (fracción ligada) en el contador gamma durante 2 min. Se construyó una curva estándar a partir de los valores de los estándares, tomándose como punto 0 de AMPc al punto Bo. La radiactividad ligada (B) encontrada en cada concentración estándar y en las muestras, se expresa como porcentaje de la radiactividad en Bo. La cantidad de AMPc (fmoles/tubo) en cada muestra, se calcula por interpolación a partir de la curva estándar.

2.7 MEDIDA DE LA ACTIVIDAD 5'-DESYODASA (5'-D) TIPO II.

Se estudió el efecto *in vivo* que tanto el VIP, como análogos de éste, como antagonistas ejercían sobre distintas glándulas, entre ellas la glándula Harderiana y el tejido adiposo marrón (TAM).

Este método consta de dos partes: en primer lugar la radioyodación de la 3,5,3'-triyodotironina para así obtener la tiroxina marcada y posteriormente la determinación de la actividad 5'-D en la cual actúa como sustrato la tiroxina marcada anteriormente.

2.7.1 Radioyodación de la 3,5,3'-triyodotironina.

Para la obtención de tiroxina marcada se empleó la metodología de NAKAMURA et al., (1977) también llamado método de la cloramina T.

2.7.1.a Reactivos:

- Triyodotironina (T_3): 0'1 mM en metanol.
- TP 0'4 M: fosfato potásico 0'4 M, pH 6'2.
- TP 0'05 M: fosfato potásico 0'05 M, pH 6'2.
- 125 INa, 1mCi: en el día 0 indicado por la casa comercial, 1mCi corresponde a 10 μ l. Si se realiza el marcaje antes o después de dicha fecha, es necesario aplicar un

factor de corrección en el volumen que se añada al ensayo.

- Solución de metanol / NH_4OH 2 N en una proporción de 99: 1.
- Cloramina T: 4 mg en 10 ml de TP 0'05. La solución se prepara justo antes de realizarse el marcaje.
- MbNa: solución saturada al 10% en TP 0'05.
- Sephadex LH-20, previamente hinchada en H_2O desionizada.

2.7.1.b Método:

b.1: radioyodación de la 3,5,3'-triyodotironina.

Se añaden en un tubo de plástico de 3 ml por este orden:

- 25 μl de TP 0'4.
- 10 μl de T_3 (10^{-9} moles).
- 1 mCi de ^{125}I Na.
- 4 μl de cloramina T.

Agitar la mezcla de ensayo durante 2 min y detener la reacción añadiendo 10 μl de MbNa.

b.2: Purificación de la tiroxina marcada.

La mezcla de marcaje se depositó en una columna de Sephadex LH-20 de 2-3 ml previamente equilibrada con TP 0'05. Después de colocar la muestra en la columna, se lavó con 1ml de agua desionizada y se recogió el eluido (correspondiente al ^{125}I) en un tubo de plástico de 3 ml. Este lavado se repitió 8 veces. Tras estos lavados, se añadió 600 μl de la solución de metanol/ NH_4OH para eliminar el agua de la columna y se repitieron los lavados anteriores, también en fracciones de 1 ml pero esta vez con metanol/ NH_4OH para obtener la hormona marcada. De los eluidos, se tomaron 5 μl por tubo y se contó la radioactividad en un contador gamma durante 2 min, obteniéndose dos picos de actividad: el primero, correspondiente al ^{125}I libre y el segundo a la hormona marcada.

b.3: Cálculo de la actividad específica. Para realizar este cálculo, es necesario conocer previamente el porcentaje de incorporación del ^{125}I a la T_3 (% I):

$$\% \text{ I} = \frac{\sum \text{cpm } (^{125}\text{I})\text{T}_4}{\sum \text{cpm } (^{125}\text{I})\text{T}_4 + \sum \text{cpm de } ^{125}\text{I}} \times 100$$

El porcentaje de incorporación nos indica el tanto por ciento de ^{125}I que se ha incorporado a la T_3 . En la mayoría de los casos, suele oscilar entre el 75-90 %.

El cálculo de la actividad específica (Ae) se realiza por la fórmula:

$$\text{Ae} = \frac{^{125}\text{I} (\text{mCi}) \times \% \text{ I}}{\text{moles de T}_4 \times 100}$$

Donde:

- $^{125}\text{I} (\text{mCi}) = 1 \text{ mCi}$.
- moles de $\text{T}_4 = \text{moles de T}_4$ utilizados en el marcaje. Como se añaden $10 \mu\text{l}$ a una concentración inicial de 10^{-4} , entonces el número de moles es 10^{-9} .

Al utilizar la T_4 marcada en el ensayo de la 5'-D, es necesario conocer la equivalencia entre las cpm que se cuentan en el contador gamma y los fmoles existentes (pasamos de mCi /mol a Ci /fmol). Entonces:

$$\text{cpm} = \text{dpm} \times \text{eficiencia del contador}$$

$$\text{donde: dpm} = \text{Ci} \times 2'22 \cdot 10^{12} \quad \text{y} \quad \text{eficiencia} = 0'66;$$

$$\text{Por tanto: cpm} = \text{Ci} \times 2'22 \cdot 10^{12} \times 0'66$$

Siendo el resultado final las cpm que corresponden a un fmol de tiroxina marcada para nuestro marcaje.

2.7.2 Medida de la actividad 5'-D tipo II.

Este método está basado en la capacidad de la tiroxina 5'-desyodasa tipo II para transformar la T₄ en la hormona activa T₃. Es un método específico para el isoenzima tipo II debido a que el sustrato contiene el ¹²⁵I sólo en la posición 5' del anillo fenólico sustituido de la tiroxina marcada. Durante la incubación, se produce la conversión de T₄ a T₃, siendo la liberación de ¹²⁵I proporcional a la actividad enzimática. Tras la incubación, se obtienen los dos productos de la reacción: el ¹²⁵I y la T₃, quedando además algo del sustrato de la reacción, T₄. Tanto los productos como la T₄ se separan mediante cromatografía de intercambio iónico en columna, reteniéndose la T₃ y la T₄ marcada y eluyendo el ¹²⁵I libre, que indica la actividad del enzima.

2.7.2.a Reactivos:

- Tampón de homogenización (HB): fosfato potásico 0'1 M, EDTA 1 mM, pH 7'0.
- Ditioneitol (DTT) 100 mM en HB. Prepararlo justo antes del ensayo.
- BSA al 2 % en HB.
- Acido tricloroacético (TCA) al 10 % en agua destilada.
- Acido acético glacial al 10 % en agua destilada.
- Homogenado de la muestra.
- T₄ marcada a una concentración de 400 fmoles por 10 µl.
- Columnas de purificación: columnas de 1 ml con 0'5 ml de resina de intercambio iónico Dowex-50 W equilibradas con acético glacial al 10%, siendo previamente activadas y regeneradas con NaOH 1N.

2.7.2.b Método:

b.1 Obtención del homogenado de la muestra.

Tanto en glándulas Harderianas como en tejido adiposo marrón (TAM) se homogenizó cada glándula en 1 ml de HB utilizando el polytron. Se centrifugó a 2000 rpm durante 15 min, descartándose posteriormente el sobrenadante graso y el precipitado. En la pineal, se añadió a cada glándula 100 µl de HB y posteriormente se

homogenizó en el sonicador. De cada muestra, se reservaron alícuotas a -80°C para su posterior medida de proteínas.

b.2 Procedimiento.

Los ensayos se realizaron en tubos de plástico de 3ml y excepto las incubaciones, todos los pasos se hicieron en frío. A cada tubo, se añadió por este orden:

- 100 μl de HB (a lo blancos y actividad total, 150 μl).
- 40 μl de DTT.
- 50 μl de homogenado (excepto a los blancos y actividad total).
- 10 μl de T_4 marcada.

El volumen final de incubación fue de 200 μl .

Se agitaron los tubos y se incubaron durante 60 min a 37°C . Tras la incubación, se detuvo la reacción añadiendo 100 μl de BSA frío y 750 μl de TCA a todos excepto a los de actividad total, a los cuales se añadieron 750 μl de acético y no es necesario centrifugarlos. Se agitaron los tubos y se centrifugaron durante 10 min a 3000 rpm. Se tomaron 500 μl del sobrenadante y se depositó en las columnas de Dowex, lavándose a continuación las columnas con 500 μl de acético glacial al 10% (las actividades totales, no se pasan por las columnas por lo que para que se encuentren a igual dilución que las muestras se diluyeron en una proporción 1:2 en acético glacial al 10 %). El eluido, se recogió en tubos de plástico de 3 ml y se contó durante 2 min en el contador gamma.

b.3 Cálculo de la actividad $5'$ -D.

$$(\text{cpmM} - \text{cpmB}) \times 400 \text{ fmol} \times \text{factor de dilución}$$

$$\text{Actividad} = \frac{\text{_____}}{\text{AT}}$$

Donde:

- cpmM = cuentas por minuto para cada determinación.
- cpmB = cuentas por minuto del blanco.
- 400 fmol = concentración de tiroxina marcada por determinación.
- AT = cuentas totales añadidas a cada tubo (actividad total).

- Factor de dilución = tanto para la glándula Harderiana como para el TAM es 20 por homogenizarse en un volumen de 1000 μ l y tomar 50. Para la pineal es de 2 porque de 100 μ l que es el volumen de homogenización, sólo se toman 50.

El resultado se expresa como fmol de 125 I liberado/glándula/hora y mas usualmente como fmol de 125 I liberado/mg de proteína/hora para lo cual es necesario determinar la concentración de proteínas de cada glándula por el método de LOWRY et al., (1951).

2.8 MEDIDA DE LA CONCENTRACION DE PORFIRINAS EN GLANDULAS HARDERIANAS DE RATA.

La medida de la concentración de porfirinas se realizó según el método de SHIRAMA et al., 1987 con modificaciones, el cual se basa en que las porfirinas son moléculas altamente solubles en disolventes orgánicos, en concreto una mezcla de etil-acetato/acético y que extraídas en ácido clorhídrico, puede leerse su fluorescencia a 604 nm que es la longitud de onda a la cual las protoporfirinas (el tipo mayoritario de porfirinas en los seres vivos) poseen su máximo de absorción característico, siendo la longitud de onda de excitación de las porfirinas de 405 nm. Como estándar, se usó la coproporfirina III tetrametil éster debido esencialmente a que es muy estable, mientras que las protoporfirinas son inestables y difíciles de mantener en disolución.

2.8.a Reactivos:

- Etil-acetato/acético glacial en proporción 8:2 (v/v).
- HCl 1'5 M.
- Coproporfirina III tetrametil éster como estándar a concentración de 10 μ g/ml: disolver 1 mg de coproporfirina III tetrametil éster en 100 ml de HCl 1'5 M.
- Homogenado de la muestra en etil-acetato/acético.

2.8.b Método:

b.1: preparación de la curva estándar.

Se prepararon distintas diluciones a partir de coproporfirina III tetrametil éster

(2×10^{-1} , 10^{-1} , 5×10^{-2} , 2.5×10^{-2} , 1.25×10^{-2} , 6.25×10^{-3} , 3.125×10^{-3} $\mu\text{g/ml}$) empleando HCl 1.5 M para la dilución.

b.2:preparación de las muestras.

Se pesaron entre 20-30 mg de glándula y se añadió 1 ml de etil-acetato/acético. Se homogenizó en el polytron a velocidad media y posteriormente se centrifugó a 3000 rpm durante 30 min. Tras descartar el precipitado, se tomaron 10 μl del sobrenadante, (fracción en que van disueltas las protoporfirinas) al que se añadieron 2 ml de ácido clorhídrico 1.5 M para su extracción.

b.3:procedimiento.

Una vez preparada la curva estándar y las muestras, se procedió a la medición de protoporfirinas en el fluorímetro a una longitud de onda de excitación de 405 nm y a 604 nm para la absorción máxima. El fluorímetro, midió cada punto por triplicado.

b.4:cálculo de la concentración de porfirinas .

A partir de los valores de fluorescencia dados por los estándares, se construjo una recta de regresión poniendo en ordenadas la concentración de los estándares y en abscisas la fluorescencia. Los valores de concentración de la muestra se hallaron por interpolación a partir de la recta de regresión, expresándose finalmente en μg de porfirinas/mg de glándula.

2.9 TRATAMIENTO ESTADÍSTICO.

En la mayoría de los experimentos, cada punto ha sido realizado siempre por triplicado, expresándose los valores como la media \pm el error estándar de la media (SEM). El número de animales utilizado para cada grupo (n) varió de un experimento a otro, oscilando entre 4-8. El cálculo de las constantes de afinidad (Kd) y de las capacidades de unión de los receptores se realizó con los programas EBDA, original de McPHERSON (1983), y LIGAND, original de MUNSON y RODBARD (1980), modificado para microordenadores por McPHERSON (1985), editados ambos por BIOSOFT, P.O. Box 580, Milltown, New Jersey, 08850, USA. El análisis de regresión y correlación lineal efectuado para hallar la curva estándar fue realizado por el programa GPIS (Graft Pad In Stat), (1989), versión 1.0.

RESULTADOS

1. UNION DEL VIP A SUS RECEPTORES EN MEMBRANAS DE GLANDULA HARDERIANA DE RATA.

1.1 EFECTO DEL TIEMPO Y DE LA TEMPERATURA.

La unión específica del ^{125}I -VIP a membranas de glándula Harderiana de rata fue un proceso dependiente del tiempo y de la temperatura (Fig. 1). A 30°C , la unión específica del trazador a las membranas fue rápida, obteniéndose la mitad de la unión máxima pasados los primeros 5 minutos, el máximo a los 30, manteniéndose estable hasta los 120 minutos, que es el tiempo máximo del experimento. A 15°C , la velocidad de la reacción disminuyó respecto a la alcanzada a los 30°C , alcanzándose la mitad de la unión máxima a los 5 minutos, el máximo a los 15, y manteniéndose estable hasta los 120 minutos, pero la unión máxima alcanzada fue menor que la obtenida a 30°C . La degradación del trazador fue también un proceso dependiente del tiempo y la temperatura (Fig. 2). La degradación fue ligeramente menor a 15°C que a 30°C . A 30°C , el equilibrio observado entre los 30-120 minutos (Fig.1) se acompaña por un aumento de la degradación del trazador a medida que transcurre el tiempo. Igual ocurre a 15°C . En base a estos resultados, en los experimentos siguientes la incubación se llevó a cabo a 30°C durante 30 minutos con el fin de conseguir una unión específica máxima con una mínima degradación del trazador.

1.2 EFECTO DE LA CONCENTRACION DE MEMBRANAS.

La unión específica del ^{125}I -VIP fue una función lineal ($r=0.996$) de la concentración de proteína de membrana hasta una concentración de $50\ \mu\text{g/ml}$ (Fig.3). A concentraciones mayores de proteína, la unión observada fue menor que la esperada, debido probablemente a la relativamente elevada degradación del trazador (Fig.4). Los siguientes experimentos se realizaron a una concentración de proteína de $50\ \mu\text{g/ml}$, concentración a la cual la unión había sido máxima y sólo se había degradado un 20% del trazador.

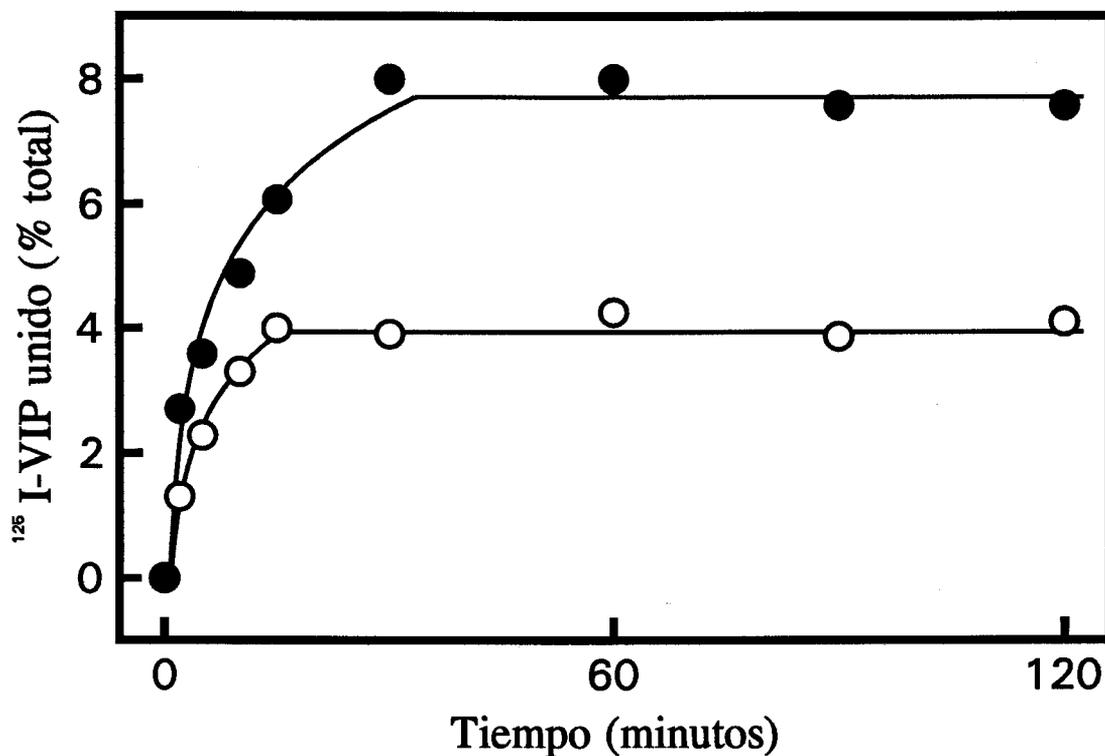


Fig.1. Unión del ¹²⁵I-VIP a membranas de glándula Harderiana de rata en función del tiempo y de la temperatura. Las membranas (50 μ g/ml) fueron incubadas en presencia de ¹²⁵I-VIP 50 pM a 15°C (○) o a 30°C (●), determinándose la unión específica del péptido marcado para cada uno de los periodos de tiempo indicados. Cada punto es la media de 3 experimentos independientes realizados por triplicado.

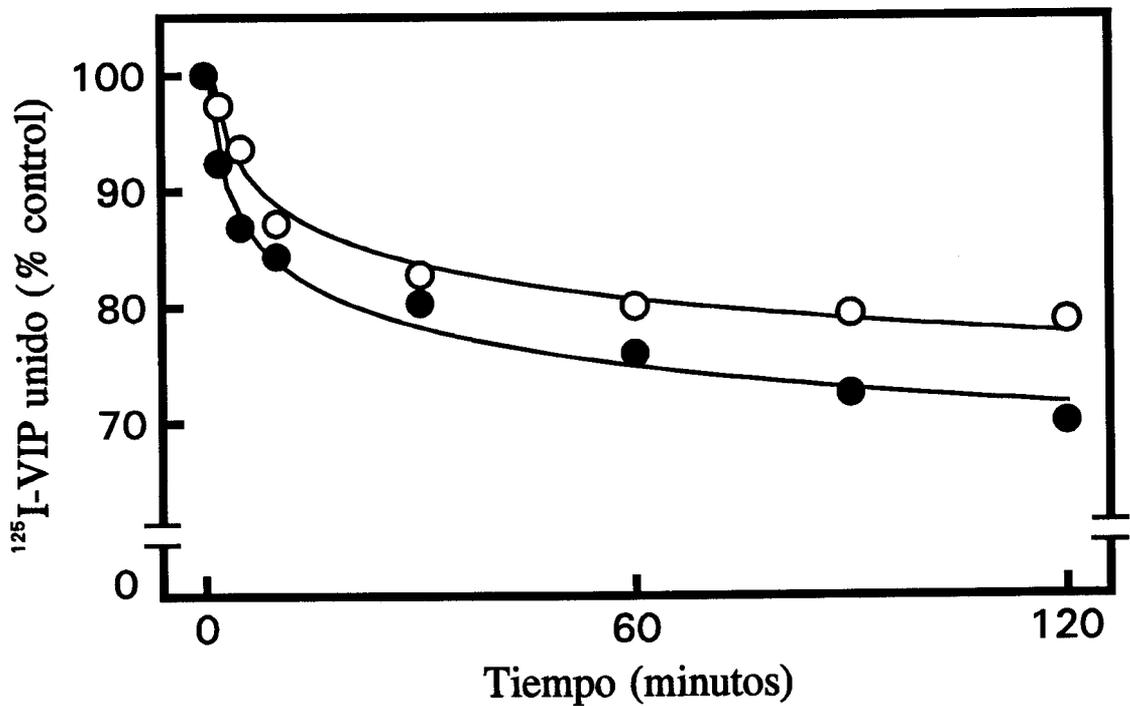


Fig.2. Degradación del ¹²⁵I-VIP en función del tiempo y de la temperatura en membranas de glándula Harderiana de rata. Las membranas (50 μg/ml) se incubaron en presencia de ¹²⁵I-VIP 50 pM a 15°C (○) o a 30°C (●), determinándose el porcentaje de trazador libre indemne en el medio de incubación para cada uno de los periodos de tiempo indicados. Cada punto es la media de tres experimentos independientes realizados por triplicado.

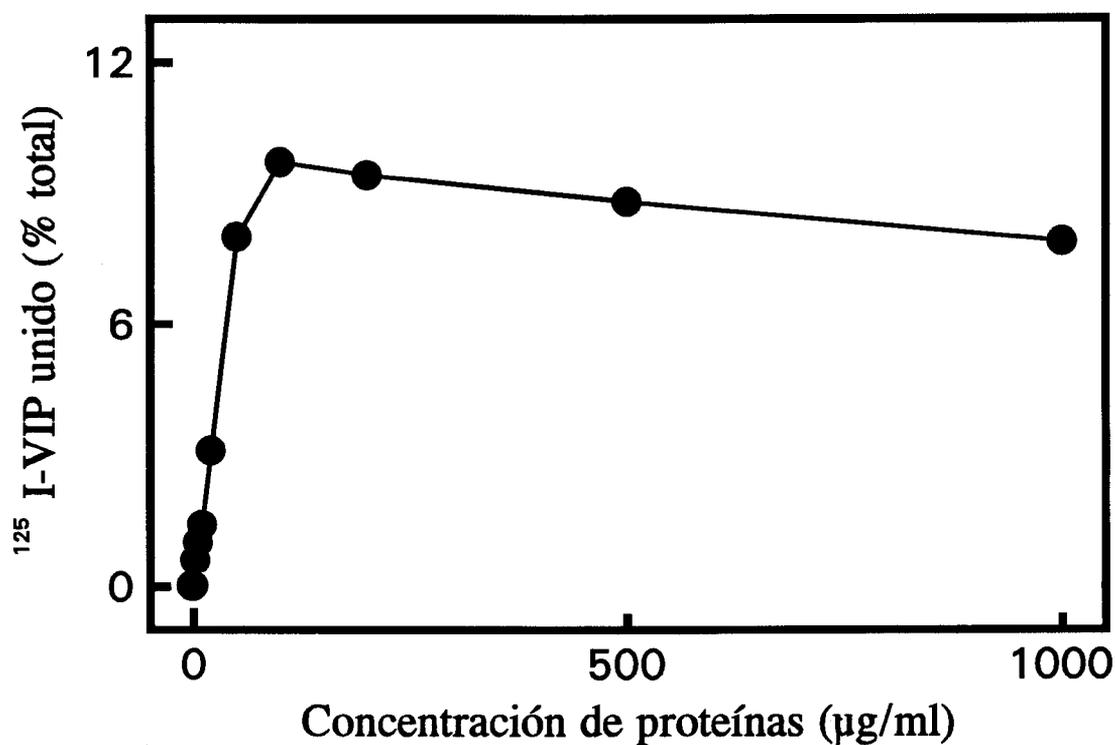


Fig.3. Efecto de la concentración de proteínas sobre la unión del ¹²⁵I-VIP a membranas de glándula Harderiana de rata. Se incubaron concentraciones crecientes de proteína de membrana durante 30 minutos a 30°C en presencia de ¹²⁵I-VIP 50 pM, determinándose la unión específica del trazador para cada una de ellas. Cada punto es la media de 3 experimentos independientes realizados por triplicado.

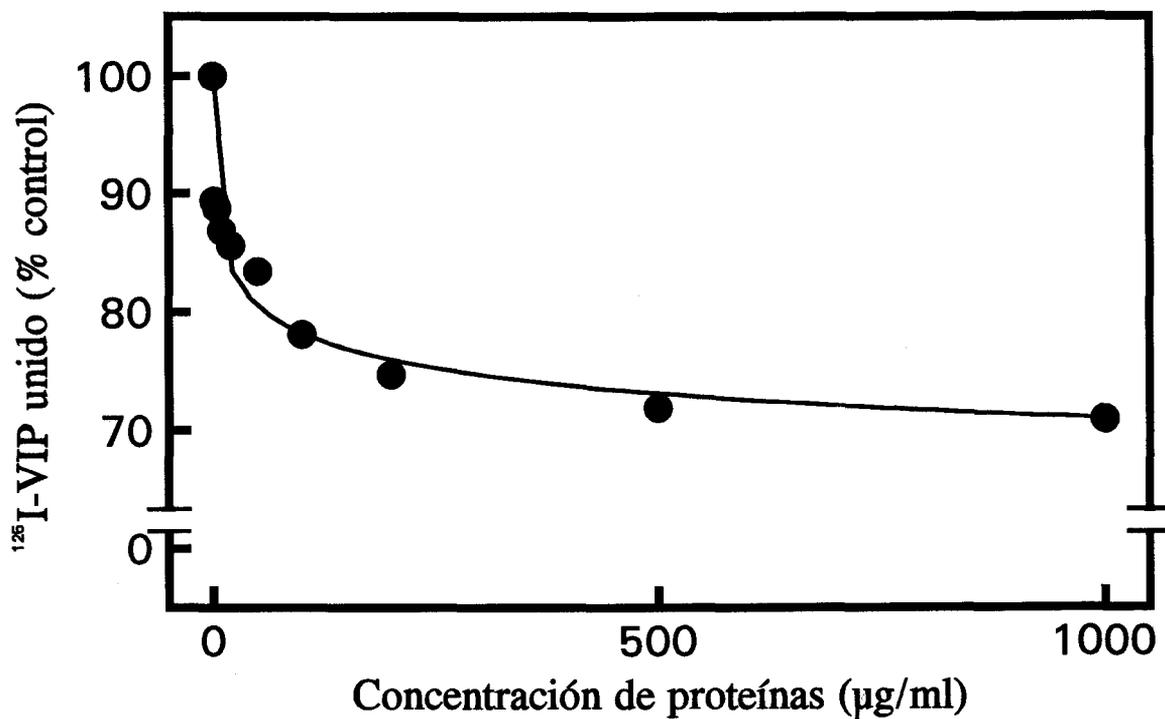


Fig.4. Degradación del ¹²⁵I-VIP en función de la concentración de proteínas en membranas de glándula Harderiana de rata. Concentraciones crecientes de proteína de membrana fueron incubadas en presencia de ¹²⁵I-VIP 50 pM durante 30 minutos a 30°C, determinándose para cada una de ellas el porcentaje de trazador libre indemne en el medio de incubación. Cada punto es la media de 3 experimentos realizados por triplicado.

1.3 CINETICA DE DISOCIACION.

La unión del ^{125}I -VIP a sus receptores específicos en membranas de glándula Harderiana de rata, fue un proceso reversible, demostrándose la disociación del complejo péptido-receptor por la progresiva disminución de la unión del trazador a las membranas en función del tiempo (Fig.5) cuando, tras alcanzarse el estado de equilibrio con una incubación de 30 minutos a 30°C , se añadió al medio de incubación una sobrecarga de VIP frío $1\ \mu\text{M}$. El 50% del VIP marcado se disoció en los primeros 10 minutos, llegando al 86% a los 60 minutos. El tiempo empleado en la disociación del complejo trazador-membrana tras la sobrecarga de VIP frío, parece indicar una cinética de disociación de orden múltiple, lo cual sugiere una heterogeneidad de los sitios de unión del VIP.

1.4 ESTUDIO ESTEQUIOMETRICO: DOSIS-EFECTO DE VIP.

La adición al medio de incubación de concentraciones crecientes de VIP frío (0.01 - $100\ \text{nM}$) manteniendo fija la concentración de ^{125}I -VIP ($50\ \text{pM}$) produjo una progresiva disminución de la unión específica, debida a la inhibición competitiva entre el VIP frío y el ^{125}I -VIP al unirse a sus receptores en las membranas de glándula Harderiana de rata, que desplaza al trazador (Fig.6). La concentración de VIP frío que inhibió en un 50% la unión específica del trazador a las membranas de glándula Harderiana de rata (IC_{50}) fue $1.3 \pm 0.2\ \text{nM}$. Al aplicar el análisis de SCATCHARD (SCATCHARD, 1949) a los datos del experimento y representar gráficamente el resultado (Fig.7), se obtiene una curva de concavidad superior que puede resolverse en 2 líneas rectas, lo cual indica la existencia de 2 poblaciones de receptores, lo que se confirma al tratar los resultados del análisis de SCATCHARD con el programa de ajuste no lineal LIGAND (MUNSON y RODBARD, 1980), adaptado por Mc PHERSON (1985), obteniéndose el mejor ajuste para el supuesto de 2 poblaciones de receptores: una de alta afinidad y baja capacidad de unión y otra de baja afinidad y alta capacidad de unión (Tabla I).

TABLA I

CONSTANTES DE DISOCIACION(Kd (nM)) Y CAPACIDAD DE UNION (B (fmol VIP/mg proteína)) PARA LOS RECEPTORES DE VIP EN MEMBRANAS DE GLÁNDULA HARDERIANA DE RATA, CALCULADOS A PARTIR DEL ANALISIS DE SCATCHARD DE LOS ESTUDIOS ESTEQUIOMETRICOS.

RECEPTOR	Kd (nM)	B (fmol VIP/mg proteína)
Alta afinidad	0'36 ± 0'06	323'00 ± 54'00
Baja afinidad	65'37 ± 8'08	39'53 ± 3'10

Se aplicó el análisis de SCATCHARD a cada uno de los experimentos de dosis-efecto de VIP en membranas de glándula Harderiana de rata. Tanto las constantes de disociación (Kd) como la capacidad de unión de los receptores (B) se calcularon utilizando el programa de ajuste no lineal LIGAND (MUNSON y RODBARD, 1980), adaptado por Mc PHERSON (1985). En todos los casos, el mejor ajuste correspondió a un modelo de 2 poblaciones de receptores. La Kd y la capacidad de unión representadas en la tabla son la media ± E.S.M. de los 12 experimentos a que hace referencia la fig. 6 y 7.

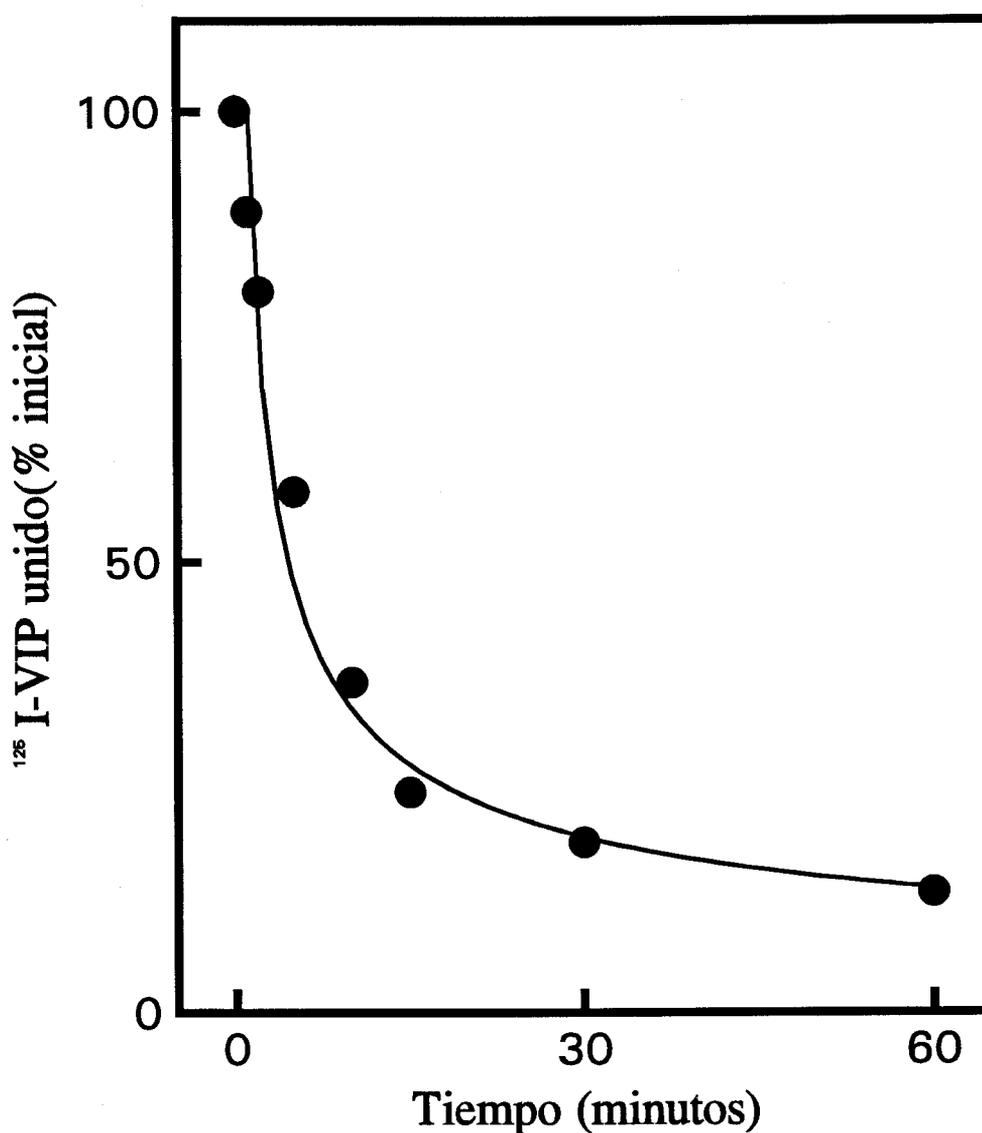


Fig.5. Cinética de disociación del complejo ¹²⁵I-VIP-receptor en membranas de glándula Harderiana de rata. Las membranas (50 μg/ml), fueron incubadas antes de la disociación en presencia de ¹²⁵I-VIP 50 pM durante 30 minutos a 30°C. Entonces, se les añadió VIP 1 μM, determinándose la unión específica para cada uno de los intervalos de tiempo indicados, expresándola como porcentaje de la existente en el tiempo 0, justo al añadir la sobrecarga de VIP frío. Cada punto es la media de 3 experimentos independientes realizados por triplicado.

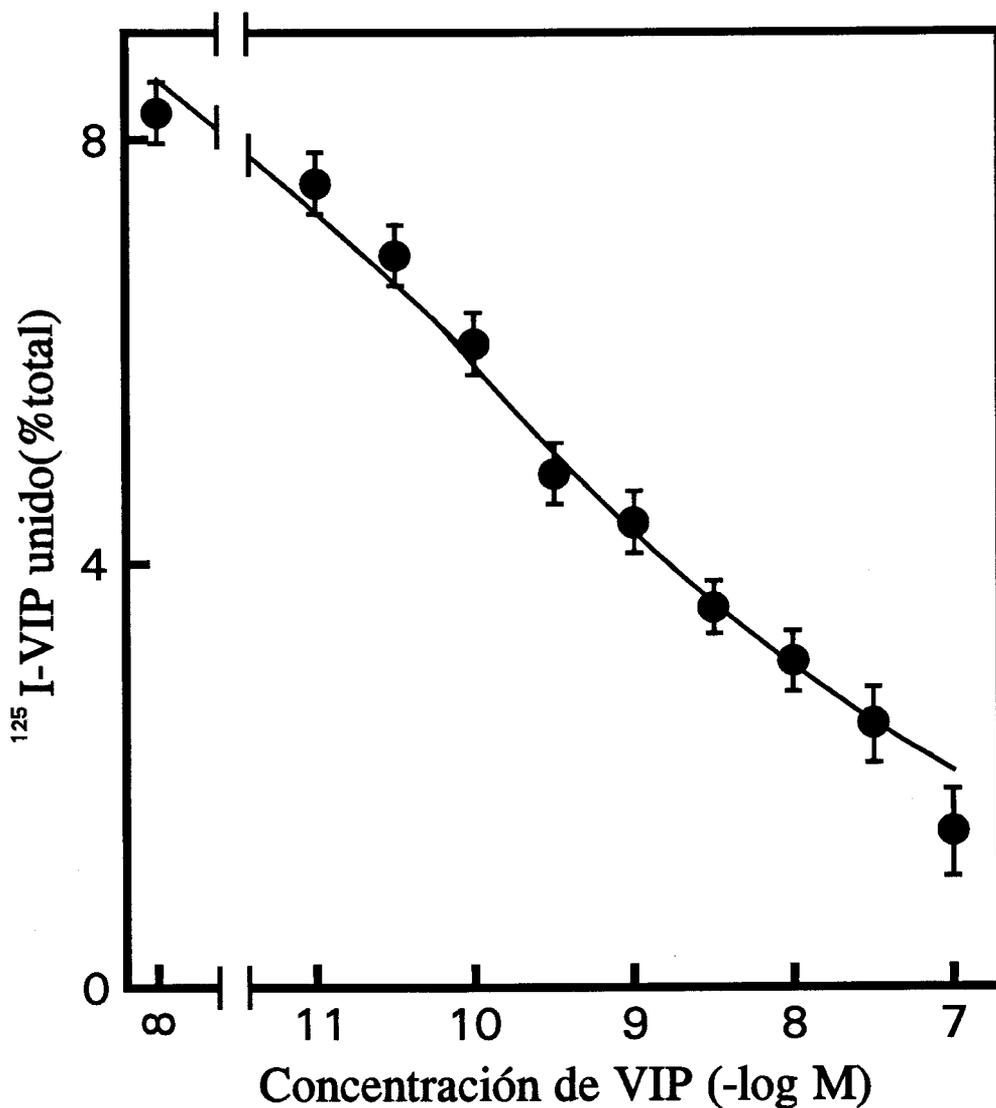


Fig.6. Inhibición competitiva por VIP frío de la unión específica del ¹²⁵I-VIP a membranas de glándula Harderiana de rata. Las membranas (50 μ g/ml), fueron incubadas con ¹²⁵I-VIP 50 pM durante 30 minutos a 30°C en presencia de concentraciones crecientes de VIP frío, determinándose para cada concentración la unión específica del trazador. Cada punto, es la media \pm E.S.M. de 12 experimentos independientes realizados por triplicado.

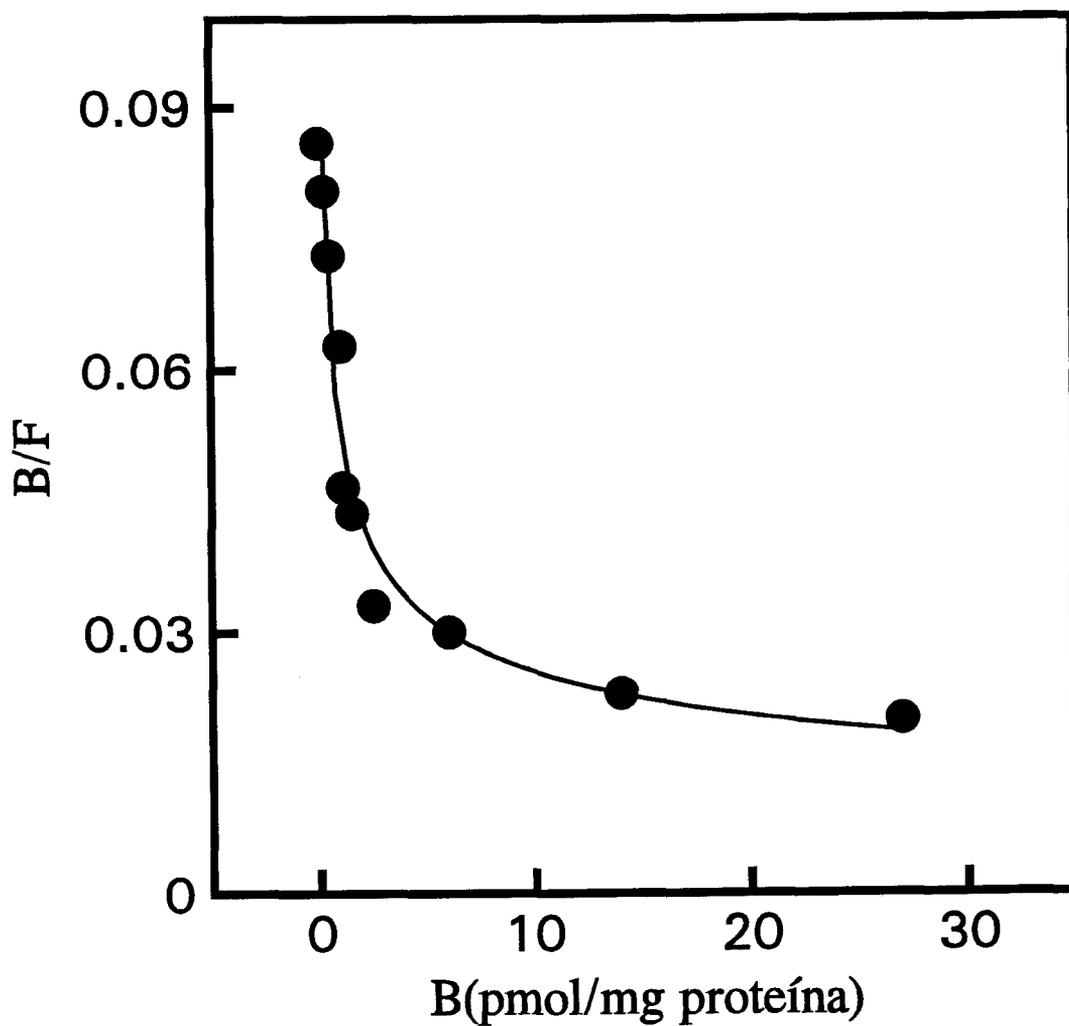


Fig.7. Análisis de SCATCHARD (1949) de los datos de la fig.6. B: VIP unido. F: VIP libre.

1.5 ESPECIFICIDAD.

Para el estudio de la especificidad de los receptores para VIP en membranas de glándula Harderiana de rata, se investigó la capacidad de distintos péptidos, estructuralmente relacionados o no con el VIP, para inhibir competitivamente la unión del ^{125}I -VIP a sus receptores (Fig.8). La helodermina, GRFr (factor liberador de hormona del crecimiento de rata) y PHI (péptido histidina amino-terminal isoleucina amida carboxi-terminal) inhibieron la unión del trazador pero con una potencia 3'5, 35 y 165 veces menor, respectivamente, que el VIP. La secretina, otro péptido estructuralmente relacionado con el VIP, produjo una ligera inhibición de la unión del ^{125}I -VIP, pero a concentraciones más elevadas. Los valores de la IC_{50} para cada péptido, se recogen en la tabla II. Ni el glucagón, relacionado estructuralmente con el VIP, ni otros péptidos sin relación estructural con él, como la somatostatina, insulina, pancreastatina y la melatonina, mostraron efecto alguno incluso a concentraciones tan elevadas como 10^{-6} M.

TABLA II

CONCENTRACIONES INHIBIDORAS SEMIMAXIMAS (IC₅₀ (nM)) DE VIP Y DE LOS PEPTIDOS QUE INHIBIERON LA UNION DEL ¹²⁵I-VIP A SUS RECEPTORES EN MEMBRANAS DE GLÁNDULA HARDERIANA DE RATA.
(media de 6 experimentos, 12 para el VIP)

Péptido	IC₅₀ (nM)
VIP	1'30
Helodermina	4'60
GRFr	46'30
PHI	215'30

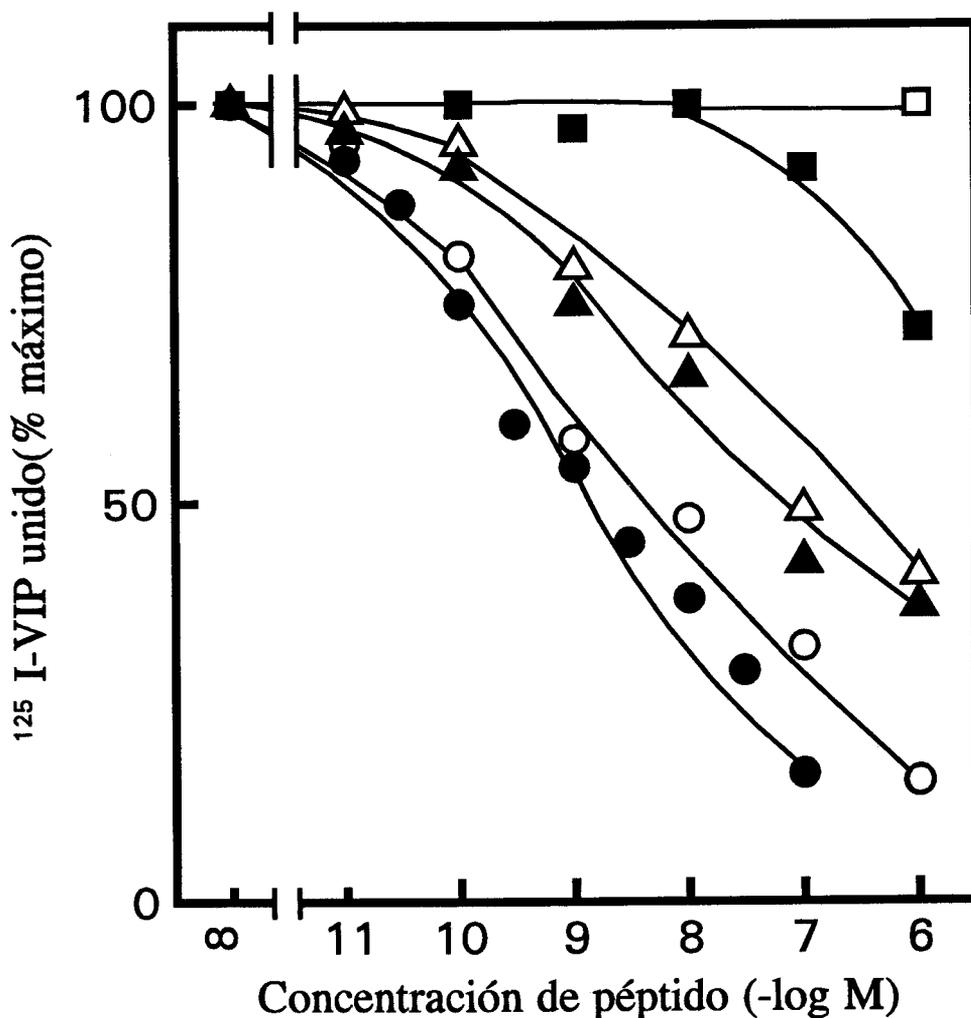


Fig.8. Inhibición competitiva por VIP frío de la unión del ¹²⁵I-VIP a membranas de glándula Harderiana de rata por el VIP frío (●), helodermina (○), GRFr (▲), PHI (△), secretina (■), glucagón, somatostatina, insulina, pancreastatina y melatonina (□). Las condiciones de incubación son idénticas a las del pie de la fig.6. La unión específica se expresa como porcentaje de la existente en ausencia de VIP frío (100 %). Cada punto es la media ± E.S.M. de 6 experimentos (12 para el VIP) independientes realizados por triplicado. Para mayor claridad, los errores estándar no se indican; fueron siempre inferiores al 10 % de los valores medios.

1.6 EFECTO DE LOS GUANIL NUCLEOTIDOS SOBRE LA UNION DEL ¹²⁵I-VIP A MEMBRANAS DE GLÁNDULA HARDERIANA DE RATA.

Se estudiaron los efectos del GTP, ATP, CTP, UTP y Gpp(NH)p (un análogo no hidrolizable del GTP) sobre la unión específica del ¹²⁵I-VIP a las membranas de glándula Harderiana de rata, en un amplio rango de concentraciones (0'1nM-1mM). Se observó una inhibición dosis-dependiente de la unión del trazador a las membranas (Fig.9). Tanto el GTP como su análogo no hidrolizable, Gpp(NH)p, inhibieron la unión del ¹²⁵I-VIP con una potencia similar ($IC_{50} \approx 10 \mu M$), observándose la máxima inhibición con GTP o Gpp(NH)p a una concentración 1 mM, a la que sólo un 22% del trazador permaneció unido a las membranas. Los restantes nucleótidos, (ATP, CTP y UTP) fueron prácticamente inefectivos en la inhibición de la unión, y a concentraciones tan altas como 1mM, no llegaron a producir una inhibición superior al 70%.

1.7 DETERMINACION DE LA MASA MOLECULAR RELATIVA DEL RECEPTOR DE VIP.

En la autorradiografía, (Fig.10) la banda mayor se identificó con una masa molecular relativa de 57 KDa. Se observó además una banda menor que se correspondía con 35 KDa. Cuando el cross-linking (unión covalente de ¹²⁵I-VIP) se realizó en presencia de VIP frío 1 μ M, estas bandas fueron intensamente reducidas.

1.8 EFECTO DEL VIP EN LA ACTIVIDAD ADENILATO CICLASA.

El VIP estimuló la actividad adenilato ciclasa en membranas de glándula Harderiana de rata de forma dosis-dependiente (Fig.11). La respuesta tuvo lugar en un rango de concentraciones crecientes de VIP entre 0'01-100 nM. La actividad adenilato ciclasa se incrementó hasta un 100% con respecto a los valores basales cuando las membranas fueron incubadas en presencia de VIP 0'1 μ M.

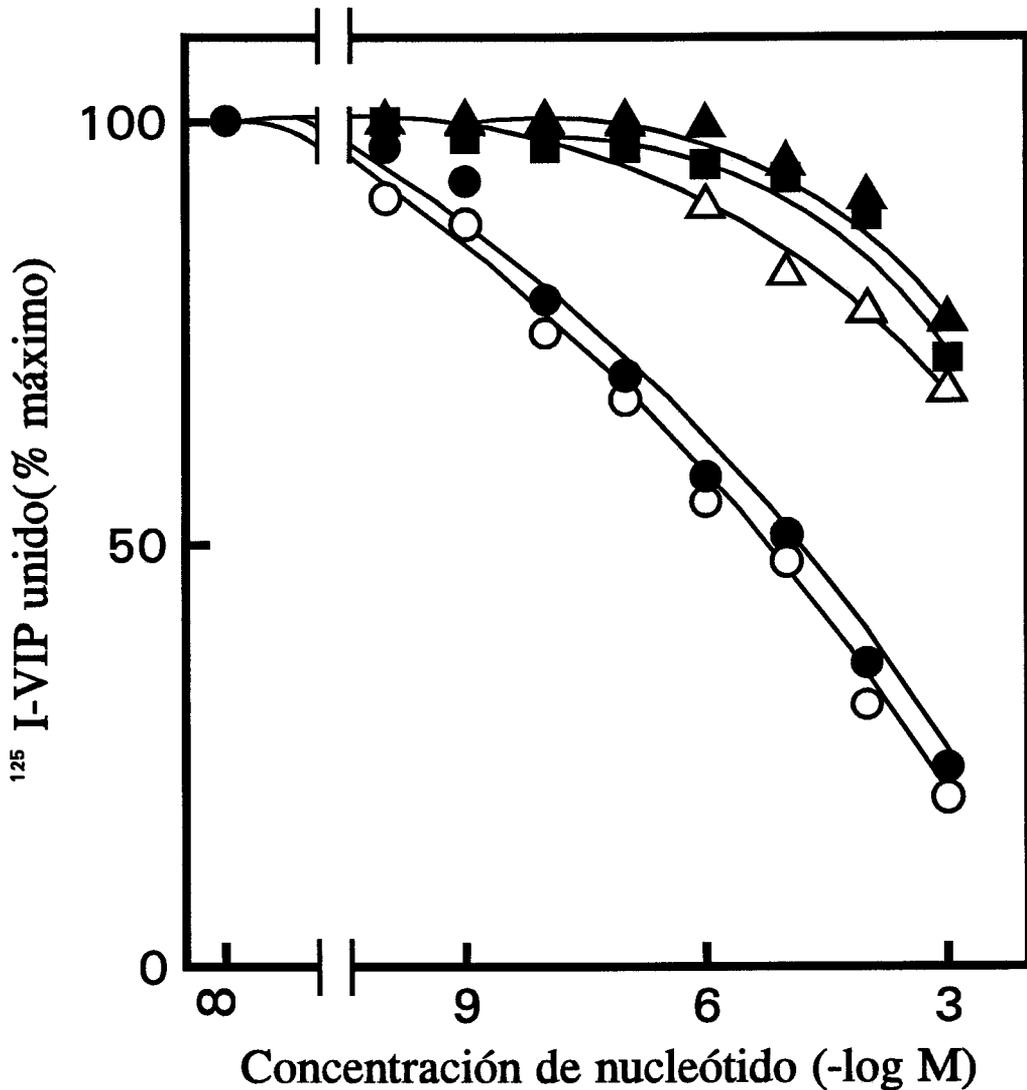


Fig.9. Efecto de los guanil nucleótidos sobre la unión del ¹²⁵I-VIP a membranas de glándula Harderiana de rata. Las membranas (50 μ g/ml) fueron incubadas con ¹²⁵I-VIP 50 pM a 30°C durante 30 minutos en presencia de concentraciones crecientes de GTP (●), Gpp(NH)p (○), ATP(▲), CTP (△) y UTP (■) entre 10⁻¹⁰ y 10⁻³ M. Los resultados se expresan como porcentaje de unión específica respecto al control (unión específica en ausencia de nucleótido). Cada punto es la media \pm E.S.M. de 15 experimentos realizados por triplicado. Para mayor claridad, no se indican los errores estándar; fueron siempre inferiores al 12% de los valores medios.

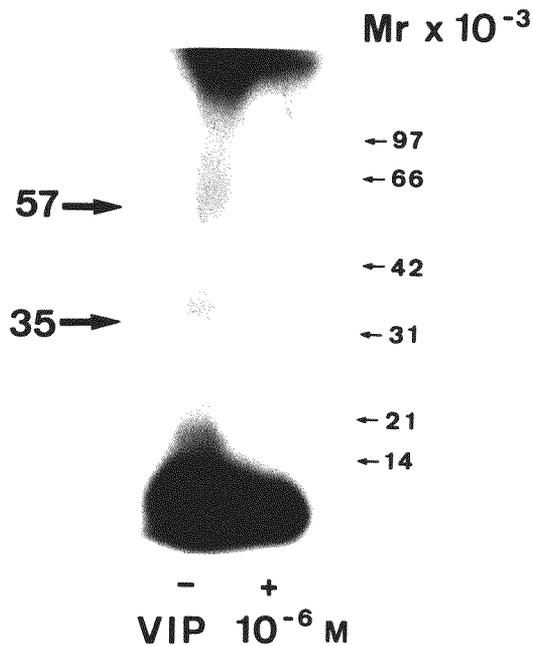


Fig.10. Determinación de la masa molecular relativa de los receptores de VIP en membranas de glándula Harderiana de rata. Se realizó un cross-linking seguido de electroforesis en gel SDS-poliacrilamida usando proteínas de masa molecular relativa (Mr) conocida (ver Material y Método). En la autorradiografía, se observan dos carriles, uno correspondiente a ¹²⁵I-VIP incubado en ausencia (-) de VIP frío 1 μ M y el otro al trazador incubado en presencia (+) de VIP frío 1 μ M. Se indica masa molecular relativa de las proteínas de referencia (Mr). La autorradiografía, es representativa de 4 experimentos.

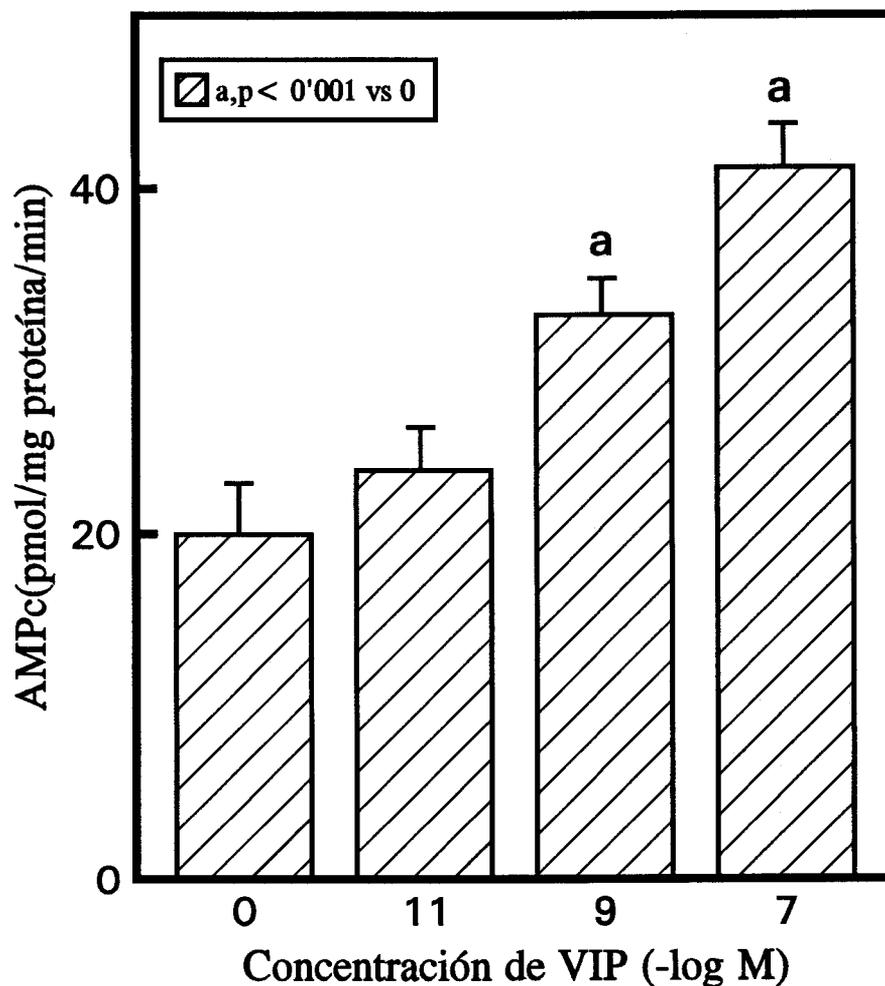


Fig.11. Efecto del VIP sobre la actividad adenilato ciclasa en membranas de glándula Harderiana de rata. Se incubaron las membranas (50 $\mu\text{g/ml}$) durante 20 minutos a 30°C con concentraciones crecientes de VIP (desde 10^{-11} a 10^{-7} M). Cada punto es la media de 3 experimentos independientes realizados por triplicado. Los valores estadísticos fueron determinados por ANOVA seguido de un test de Student-Neuman-Keuls.

2. ESTUDIO DEL EFECTO *IN VIVO* DEL VIP SOBRE LA ACTIVIDAD 5'-DESYODASA (5'-D) TIPO II EN GLÁNDULA HARDERIANA Y EN DIVERSOS ORGANOS DE RATA.

2.1 EFECTO DEL VIP EN LA ACTIVIDAD 5'-D EN GLÁNDULA HARDERIANA DE RATA.

Se estudió, *in vivo*, el efecto del VIP sobre la actividad 5'-D en glándula Harderiana de ratas eutiroideas e hipotiroideas. Para ello, se realizó una cinética de tiempo (0, 20, 40 y 60 minutos) (Fig.12). La inyección de VIP estimuló la actividad del enzima en ratas eutiroideas e hipotiroideas con respecto al grupo control (tiempo 0). En ratas eutiroideas, el efecto del VIP alcanzó su máximo valor a los 20 minutos, bajando la actividad hasta los 60 minutos (tiempo máximo del experimento), mientras que en hipotiroideas, la actividad 5'-D fue aumentando con respecto al tiempo. La actividad 5'-D siempre se mantuvo mayor en ratas hipotiroideas respecto a eutiroideas a lo largo del tiempo.

2.2 EFECTO DEL VIP EN LA ACTIVIDAD 5'-D EN GLÁNDULA PINEAL DE RATA.

Al igual que en glándula Harderiana de rata, se estudió *in vivo* el efecto del VIP sobre la actividad 5'-D en glándula pineal de ratas eutiroideas e hipotiroideas. Para ello, se realizó una cinética de tiempo (0, 20, 40 y 60 minutos) (Fig.13). La inyección de VIP estimuló la actividad del enzima tanto en ratas eutiroideas como en hipotiroideas respecto al grupo control (tiempo 0). A tiempo 0, la actividad 5'-D fue mayor en los animales hipotiroideos. En ratas eutiroideas, el efecto del VIP alcanzó su máximo valor a los 20 minutos, disminuyendo rápidamente la actividad hasta los 60 minutos (tiempo máximo del experimento), en el que se alcanzaron niveles semejantes a los basales, mientras que en hipotiroideas, la actividad 5'-D fue aumentando a medida que transcurría el tiempo. Excepto a los 20 minutos, donde la actividad del enzima en los animales eutiroideos superó a la actividad de los hipotiroideos, en los restantes tiempos la actividad 5'-D fue siempre mayor en el grupo hipotiroideo.

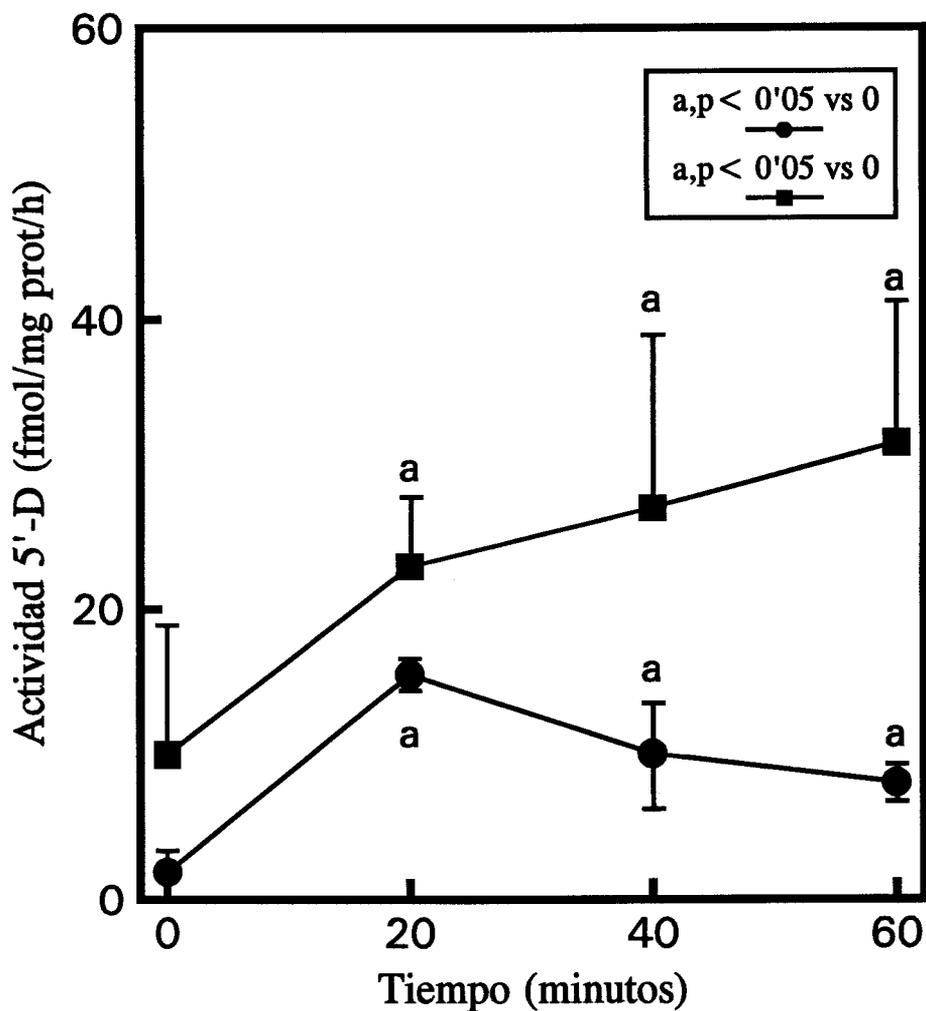


Fig.12. Efecto del VIP en la actividad 5'-D en glándula Harderiana de rata. Ratas eutiroideas (●) e hipotiroideas (■) fueron inyectadas intracardíacamente con 250 μ l de VIP 0'1 μ M (excepto el grupo control (tiempo 0), al que se inyectó salino al 0'9%) y sacrificadas a los tiempos indicados (20, 40 y 60 minutos) tras la inyección. Posteriormente, se midió la actividad 5'-D. Cada punto es la media \pm E.S.M. de 5 animales.

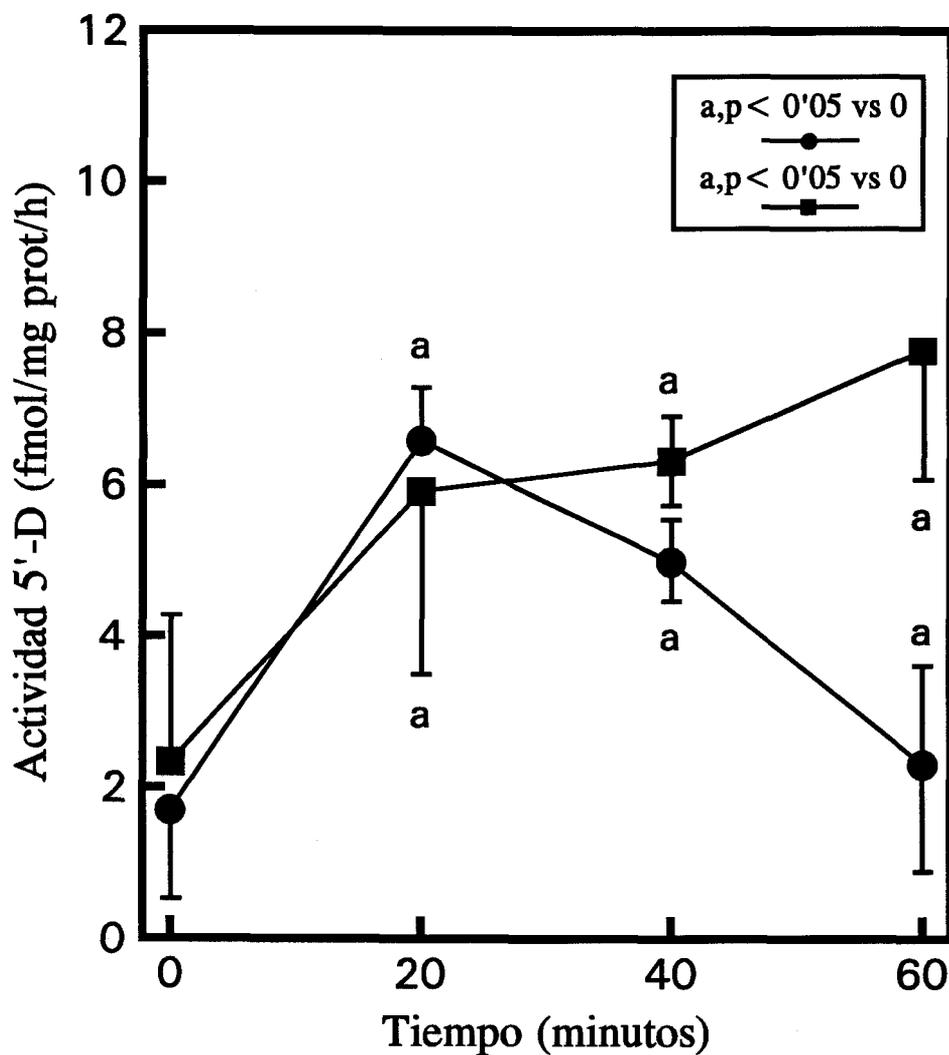


Fig.13. Efecto del VIP en la actividad 5'-D en glándula pineal de rata. Ratas eutiroideas (●) e hipotiroideas (■) fueron inyectadas intracardíacamente con 250 μ l de VIP 0'1 μ M (excepto el grupo control (tiempo 0), al que se inyectó salino al 0'9%) y sacrificadas a los tiempos indicados (20, 40 y 60 minutos) tras la inyección. Posteriormente, se midió la actividad 5'-D. Cada punto es la media \pm E.S.M. de 5 animales.

2.3 EFECTO DEL VIP EN LA ACTIVIDAD 5'-D EN TIMO DE RATA.

El efecto del VIP sobre la actividad 5'-D en timo de rata se estudió, al igual que en glándula Harderiana de rata, *in vivo* tanto en ratas eutiroideas como hipotiroideas, realizándose para ello una cinética de tiempo (0, 20, 40 y 60 minutos) (Fig.14). La inyección de VIP estimuló la actividad enzimática en ambos grupos de animales con respecto a los niveles basales (tiempo 0). A tiempo 0, la actividad 5'-D fue mayor en los animales hipotiroideos. En ratas eutiroideas, el efecto del VIP alcanzó su máximo valor a los 20 minutos, disminuyendo la actividad hasta los 60 minutos (tiempo máximo del experimento), en que se alcanzaron niveles ligeramente menores a los basales, mientras que en hipotiroideas, la actividad 5'-D fue aumentando a medida que transcurría el tiempo. Excepto a los 20 minutos, donde la actividad del enzima en los animales eutiroideos superó a la actividad de los hipotiroideos, en los restantes tiempos la actividad 5'-D fue siempre mayor en el grupo hipotiroideo.

2.4 EFECTO DEL VIP EN LA ACTIVIDAD 5'-D EN TEJIDO ADIPOSEO MARRON (TAM) DE RATA.

Se estudió *in vivo*, al igual que en glándula Harderiana de rata, el efecto del VIP sobre la actividad 5'-D en TAM de ratas eutiroideas e hipotiroideas. Para ello, se realizó una cinética de tiempo (0, 20, 40 y 60 minutos) (Fig.15). La inyección de VIP estimuló la actividad del enzima tanto en ratas eutiroideas como hipotiroideas respecto a los niveles basales (tiempo 0). A tiempo 0 la actividad 5'-D fue mayor en los animales hipotiroideos. En ratas eutiroideas, el efecto del VIP alcanzó su máximo valor a los 40 minutos, mientras que en hipotiroideas, la actividad 5'-D fue máxima a los 20 minutos, comenzando a disminuir rápidamente hasta los 60 minutos. La actividad 5'-D siempre se mantuvo mayor en ratas hipotiroideas respecto a eutiroideas a lo largo del tiempo.

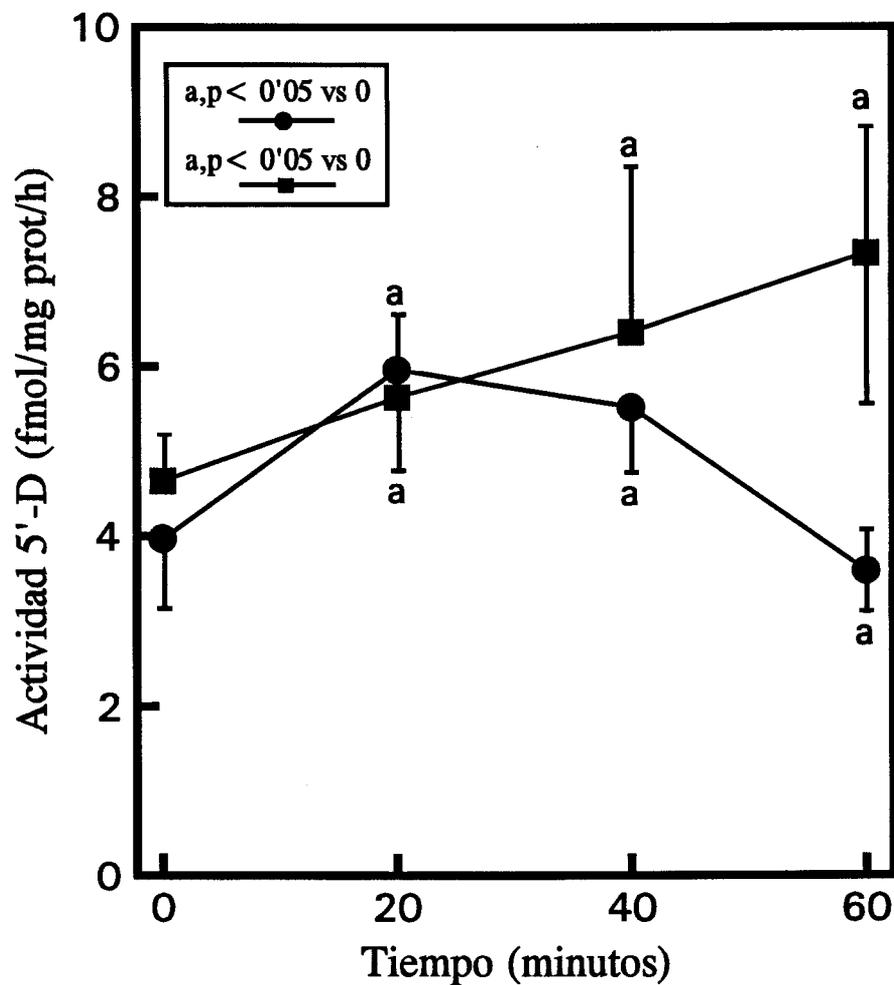


Fig.14. Efecto del VIP en la actividad 5'-D en timo de rata. Ratas eutiroides (●) e hipotiroides (■) fueron inyectadas intracardíacamente con 250 μ l de VIP 0'1 μ M (excepto el grupo control (tiempo 0), al que se inyectó salino al 0'9%) y sacrificadas a los tiempos indicados (20, 40 y 60 minutos) tras la inyección. Posteriormente, se midió la actividad 5'-D. Cada punto es la media \pm E.S.M. de 5 animales.

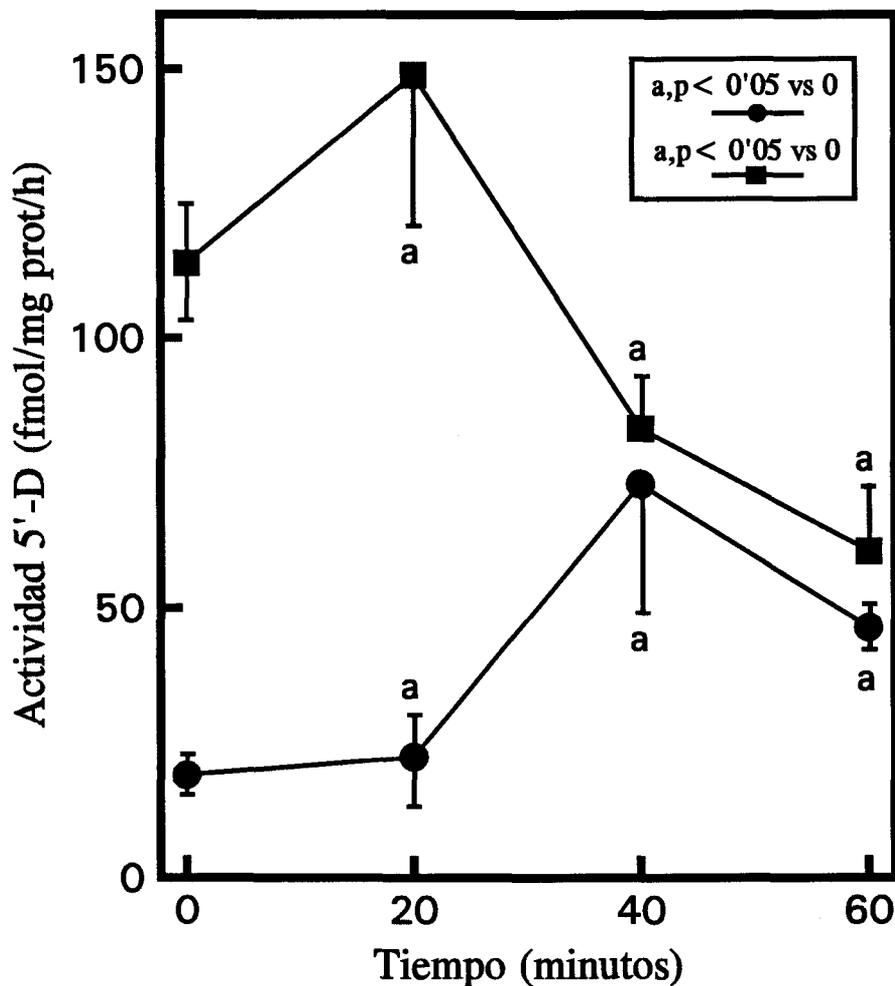


Fig.15. Efecto del VIP en la actividad 5'-D en tejido adiposo marrón (TAM) de rata. Ratas eutiroides (●) e hipotiroides (■) fueron inyectadas intracardíacamente con 250 μ l de VIP 0'1 μ M (excepto el grupo control (tiempo 0), al que se inyectó salino al 0'9%) y sacrificadas a los tiempos indicados (0, 20, 40 y 60 minutos) tras la inyección. Posteriormente, se midió la actividad 5'-D. Cada punto es la media \pm E.S.M. de 5 animales.

2.5 EFECTO DEL VIP, SECRETINA, PACAP-27 Y PACAP-38 EN LA ACTIVIDAD 5'-D EN GLÁNDULA HARDERIANA, PINEAL Y TAM DE RATA.

Se estudió, *in vivo*, el efecto del VIP y péptidos estructuralmente relacionados con el VIP (análogos) como la secretina y el péptido activador de la adenilato ciclasa pituitaria (PACAP: PACAP-27 y PACAP-38) sobre la actividad 5'-D en glándula Harderiana, pineal y TAM de ratas eutiroideas (Fig.16 y Tabla III). Para ello, se inyectó VIP y los diversos análogos a distintos grupos de ratas, sacrificándolas a los 20 minutos postinyección por ser éste el tiempo al cual la actividad 5'-D potenciada por el VIP en glándula Harderiana fue máxima en los experimentos anteriores. El grupo control fue inyectado con salino al 0'9%. La inyección de VIP y secretina estimularon la actividad del enzima en todos los tejidos estudiados respecto al grupo control, mientras que el PACAP-27 y PACAP-38 mantuvieron la actividad estable e incluso la bajaron con relación a los niveles basales. La secretina fue el péptido que más incrementó la actividad 5'-D respecto al grupo control en glándula Harderiana y TAM, siendo el VIP el que más efecto realizó sobre la actividad en pineal. La actividad del enzima fue activada levemente respecto a los valores basales por el PACAP-27 y PACAP-38 en TAM, mientras que en pineal bajaron los niveles y en glándula Harderiana los mantuvieron estables frente al grupo control.

2.6 EFECTO DEL VIP Y SUS ANTAGONISTAS EN LA ACTIVIDAD 5'-D EN GLÁNDULA HARDERIANA, PINEAL Y TAM DE RATA.

Se estudió, *in vivo*, el efecto del VIP y antagonistas de éste (4-Cl-D-Phe⁶,Leu¹⁷)VIP (antagonista A1) y (Ac-Tyr¹,D-Phe²)GRF₁₋₂₉-NH₂ (antagonista A2) sobre la actividad 5'-D en glándula Harderiana, pineal y TAM de ratas eutiroides (Fig.17 y Tabla III). Para ello, se inyectó VIP y los diversos antagonistas a distintos grupos de ratas, sacrificándolas a los 20 minutos postinyección por ser éste el tiempo al cual la actividad 5'-D potenciada por el VIP en glándula Harderiana fue máxima en los experimentos anteriores. El grupo control fue inyectado con salino al 0'9%. La inyección de VIP estimuló la actividad del enzima en todos los tejidos estudiados respecto al grupo control, mientras que los antagonistas bajaron la actividad 5'-D respecto al VIP y a los niveles basales, siendo el antagonista A1 el que mas inhibió en TAM y el antagonista A2 el que mas bajó la actividad en glándula Harderiana y pineal.

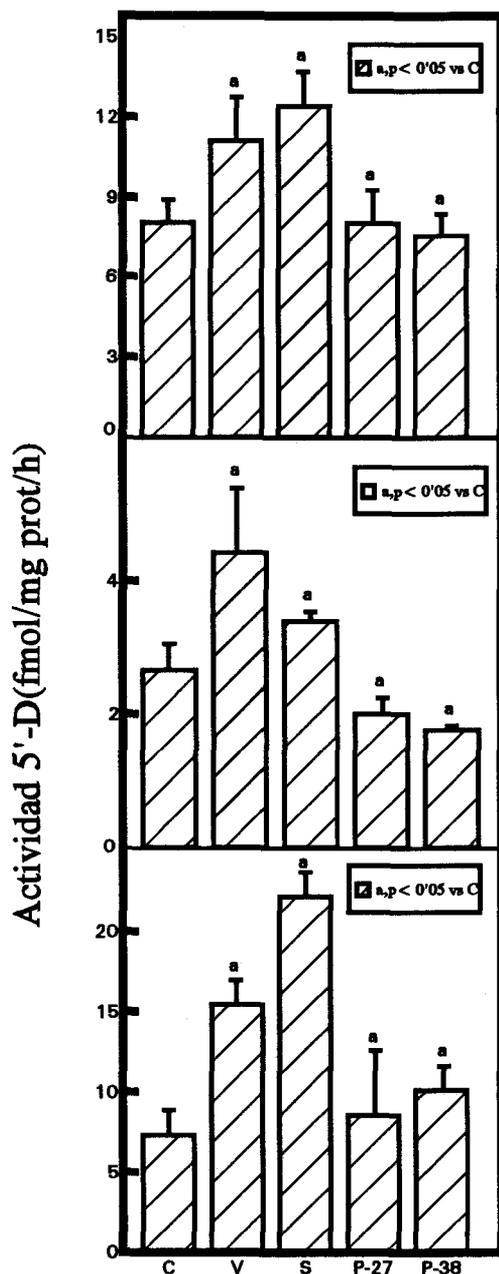


Fig.16. Efecto del VIP, secretina, PACAP-27 y PACAP-38 en la actividad 5'-D en glándula Harderiana, pineal y tejido adiposo marrón (TAM) respectivamente de rata. Ratas eutiroides fueron inyectadas intracardíacamente con 250 μ l de VIP, secretina, PACAP-27 o PACAP-38 0'1 μ M (excepto el grupo control, al que se inyectó salino al 0'9%) y sacrificadas a los 20 minutos tras la inyección. Posteriormente, se midió la actividad 5'-D en cada tejido. Cada punto es la media \pm E.S.M. de 5 animales.

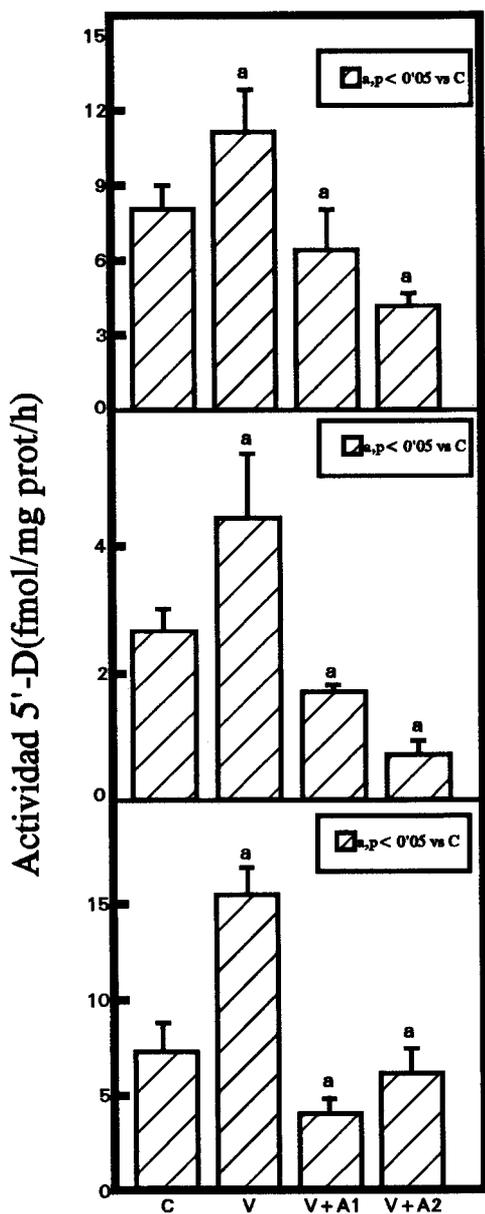


Fig.17. Efecto del VIP y sus antagonistas en la actividad 5'-D en glándula Harderiana, pineal y tejido adiposo marrón (TAM) respectivamente de rata. Ratas eutiroides fueron inyectadas intracardiácamamente con 250 μ l de VIP o sus antagonistas (VIP + antagonista A1 (VIP+A1); VIP + antagonista A2 (VIP+A2)) 0.1 μ M (excepto el grupo control, al que se inyectó salino al 0.9%) y sacrificadas a los 20 minutos tras la inyección. Posteriormente, se midió la actividad 5'-D en cada tejido. Cada punto es la media \pm E.S.M. de 5 animales.

TABLA III

ESTUDIO FARMACOLOGICO (VIP, ANALOGOS Y ANTAGONISTAS) DE LA ACTIVIDAD 5'-D (fmol/mg proteína) EN GLÁNDULA HARDERIANA, PINEAL Y TEJIDO ADIPOSO MARRON (TAM) DE RATA.

(media \pm S.E.M; n=5).

	Glándula Harderiana	Pineal	TAM
Control	8'04 \pm 0'90	2'66 \pm 0'33	7'32 \pm 1'48
VIP	11'12 \pm 1'69	4'43 \pm 0'97	15'47 \pm 1'39
Secretina	12'40 \pm 1'30	3'40 \pm 0'13	22'16 \pm 2'21
PACAP-27	8'03 \pm 1'20	2'00 \pm 0'24	8'58 \pm 3'93
PACAP-38	7'55 \pm 0'84	1'76 \pm 0'04	10'14 \pm 1'45
VIP+A1	6'40 \pm 1'53	1'70 \pm 0'11	4'01 \pm 0'83
VIP+A2	4'15 \pm 0'46	0'70 \pm 0'22	6'14 \pm 1'17

3. EFECTO *IN VIVO* DEL VIP, ISOPROTERENOL, METOXAMINA, T₄ E HIPOTIROIDISMO SOBRE LA PRODUCCION DE PORFIRINAS EN GLANDULA HARDERIANA DE RATA.**3.1 EFECTO DEL VIP EN LA PRODUCCION DE PORFIRINAS EN GLÁNDULA HARDERIANA DE RATA.**

Se estudió, *in vivo*, el efecto del VIP sobre la producción de porfirinas en glándula Harderiana de ratas eutiroideas e hipotiroideas, realizándose para ello una cinética de tiempo a 0, 20, 40 y 60 minutos, correspondiendo el tiempo 0 a los niveles basales (Fig.18). La inyección de VIP estimuló la producción de porfirinas en ratas hipotiroideas, disminuyéndola en los animales eutiroideos con respecto a los valores basales. En los niveles basales, la producción de porfirinas fue mucho mayor en el grupo eutiroideo con respecto al hipotiroideo. En ratas eutiroideas, la producción de porfirinas fue decreciendo con respecto al tiempo, manteniéndose siempre por menos de la mitad de los niveles basales, mientras que en los animales hipotiroideos la producción aumentó respecto al tiempo, siendo estable a partir de los 40 minutos. Se relacionó el efecto del VIP en la producción de porfirinas con el efecto del VIP en la actividad 5'-D en glándula Harderiana de rata (Fig.19 y 20), observándose en ratas eutiroideas (Fig.19) que la actividad 5'-D aumentó con respecto a los valores basales y la producción de porfirinas bajó con el tiempo con respecto al grupo control por efecto del VIP. En los animales hipotiroideos (Fig.20), tanto la actividad enzimática como la producción de porfirinas aumentó respecto a los valores basales y al tiempo.

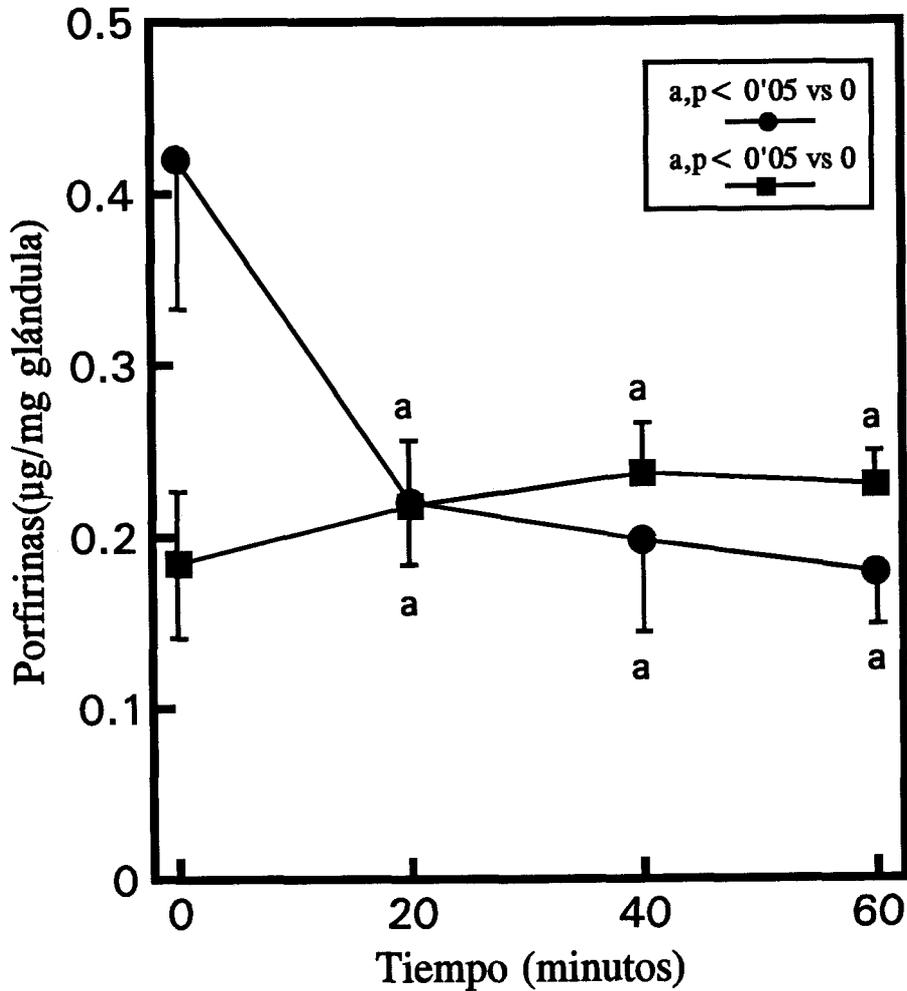


Fig.18. Efecto del VIP en la producción de porfirinas en glándula Harderiana de rata. Ratas eutiroides (●) e hipotiroides (■) fueron inyectadas intracardíacamente con 250 μ l de VIP 0.1 μ M (excepto el grupo control, al que se inyectó salino al 0.9%) y sacrificadas a los tiempos indicados (0, 20, 40 y 60 minutos) tras la inyección. Posteriormente, se midió la producción de porfirinas. Cada punto es la media \pm E.S.M. de 5 animales.

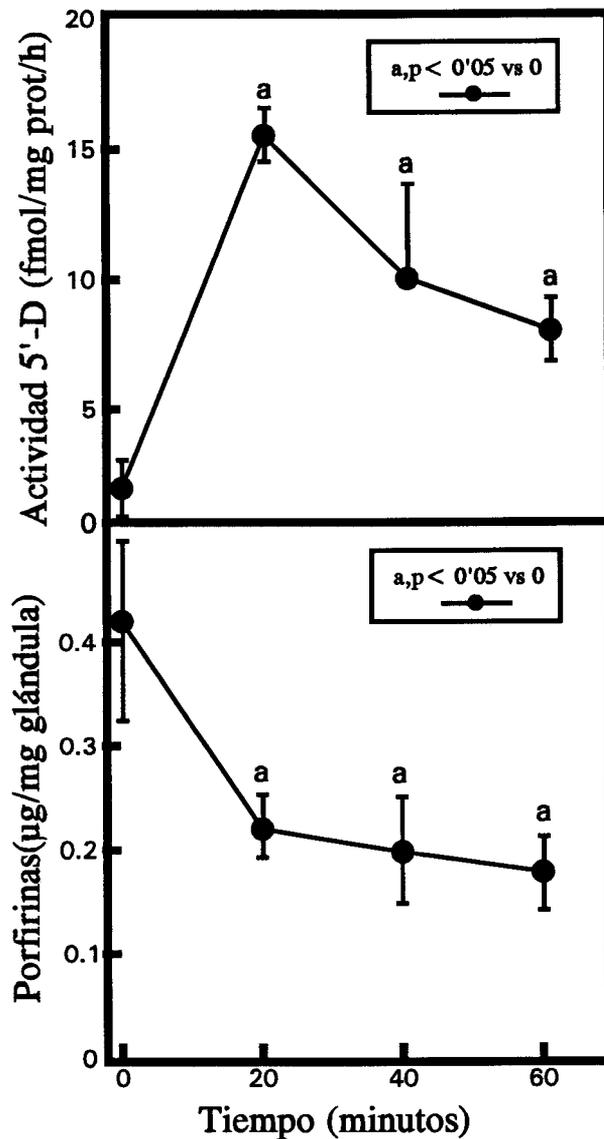


Fig.19. Efecto del VIP en la actividad 5'-D y la producción de porfirinas en glándula Harderiana de ratas eutiroides. Ratas eutiroides fueron inyectadas intracardiácamente con 250 μ l de VIP 0'1 μ M (excepto el grupo control, al que se inyectó salino al 0'9%) y sacrificadas a los tiempos indicados (0, 20, 40 y 60 minutos) tras la inyección. Posteriormente, se midió la actividad 5'-D (arriba) y la producción de porfirinas (abajo). Cada punto es la media \pm E.S.M. de 5 animales.

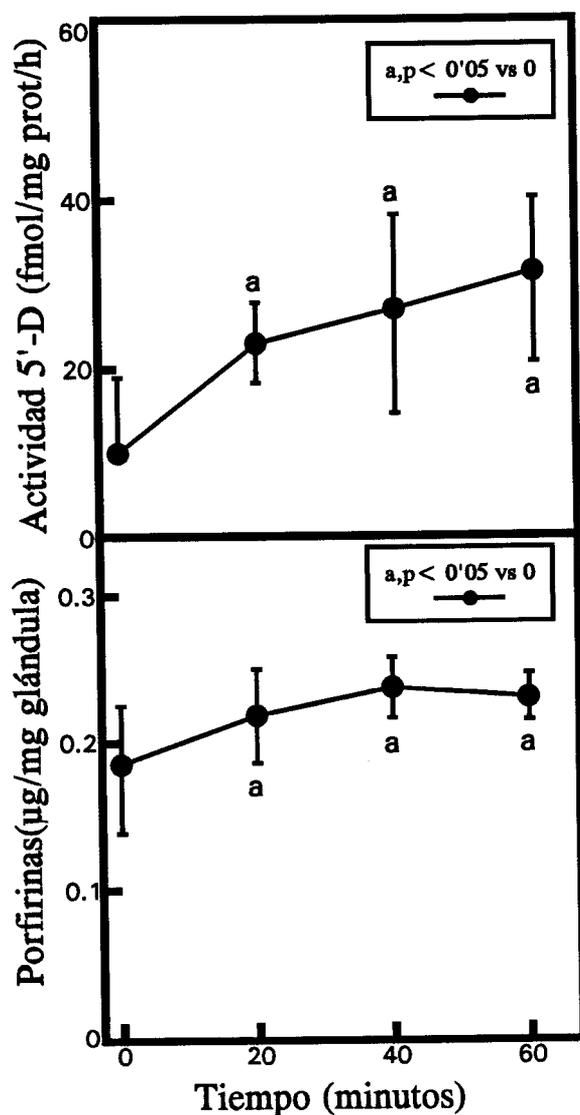


Fig.20. Efecto del VIP en la actividad 5'-D y la producción de porfirinas en glándula Harderiana de ratas hipotiroideas. Ratas hipotiroideas fueron inyectadas intracardiácamente con 250 μ l de VIP 0.1 μ M (excepto el grupo control, al que se inyectó salino al 0.9%) y sacrificadas a los tiempos indicados (0, 20, 40 y 60 minutos) tras la inyección. Posteriormente, se midió la actividad 5'-D (arriba) y la producción de porfirinas (abajo). Cada punto es la media \pm E.S.M. de 5 animales.

3.2 EFECTO DEL VIP Y ANALOGOS DEL VIP EN LA PRODUCCION DE PORFIRINAS EN GLÁNDULA HARDERIANA DE RATA.

Se estudió, *in vivo*, el efecto del VIP y análogos de éste (secretina, PACAP-27 y PACAP-38) sobre la producción de porfirinas en glándula Harderiana de ratas eutiroideas (Fig.21). Para ello, se inyectó VIP y los diversos análogos a distintos grupos de ratas, sacrificándolas a los 20 minutos postinyección por ser éste el tiempo al cual la actividad 5'-D potenciada por el VIP en glándula Harderiana fue máxima en los experimentos anteriores. El grupo control fue inyectado con salino al 0'9%. Todas las sustancias inyectadas estimularon la producción de porfirinas respecto a los niveles basales, siendo el PACAP-27 el que más estimuló la producción (el doble de los valores basales). Tanto el VIP, la secretina y el PACAP-38 potenciaron la producción de porfirinas pero en menor medida y con valores muy parecidos entre sí.

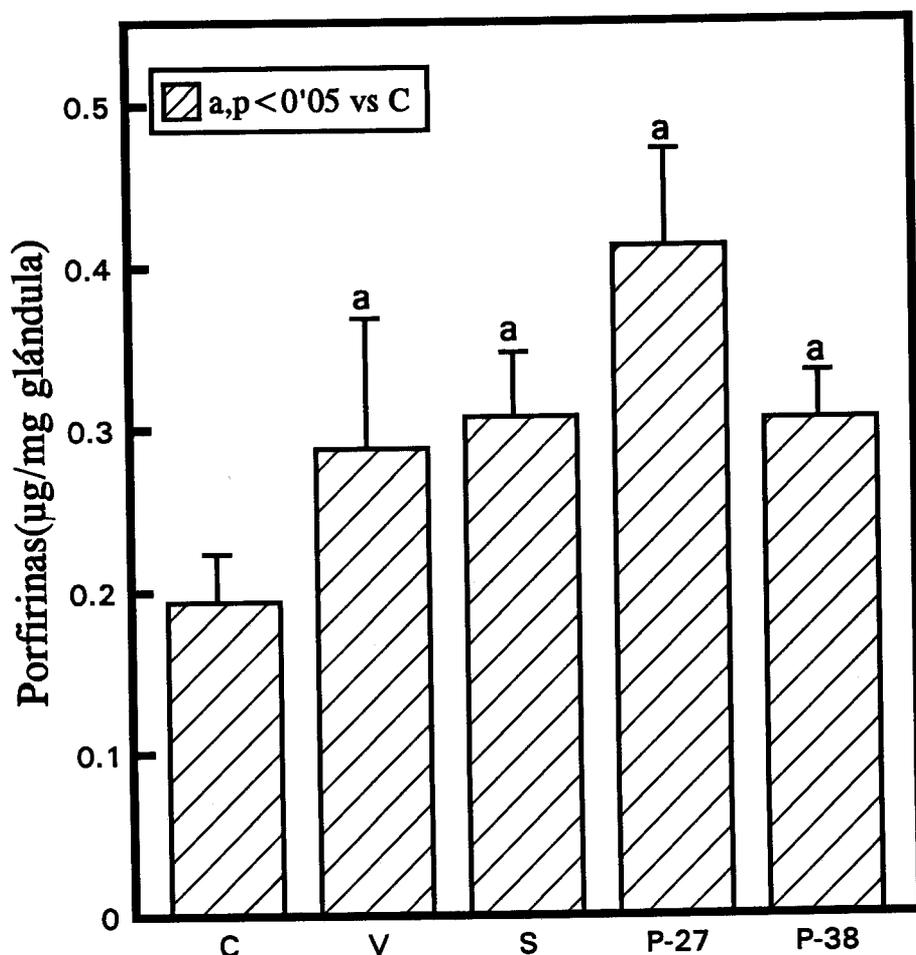


Fig.21. Efecto del VIP, secretina, PACAP-27 y PACAP-38 en la producción de porfirinas en glándula Harderiana de rata. Ratas eutiroides fueron inyectadas intracardíacamente con 250 µl de VIP, secretina, PACAP-27 o PACAP-38 0.1 µM (excepto el grupo control, al que se inyectó salino al 0.9%) y sacrificadas a los 20 minutos tras la inyección. Posteriormente, se midió la producción de porfirinas. Cada punto es la media ± E.S.M. de 5 animales.

3.3 EFECTO DEL ISOPROTERENOL, METOXAMINA Y METIMAZOL EN LA PRODUCCION DE PORFIRINAS EN GLÁNDULA HARDERIANA DE RATA.

Se estudió, *in vivo*, el efecto del isoproterenol, metoxamina y metimazol sobre la producción de porfirinas en glándula Harderiana de rata (Fig.22). Para ello, se emplearon animales eutiroideos e hipotiroideos. Las ratas eutiroideas fueron inyectadas subcutáneamente con 100 μ l de salino, isoproterenol (1mg/kg de peso) o metoxamina (1mg/kg de peso), mientras que las hipotiroideas (tratadas durante 10 días con metimazol al 0'02% (p/v)) fueron inyectadas subcutáneamente con 100 μ l de salino. Todas las ratas fueron sacrificadas 1 hora después de la inyección. Se observó que sólo el isoproterenol incrementó la producción de porfirinas respecto a los valores basales, mientras que la metoxamina y el estado hipotiroideo bajaron la concentración de porfirinas respecto al grupo control.

3.4 EFECTO DEL METIMAZOL Y TIROXINA (T_4) EN LA PRODUCCION DE PORFIRINAS EN GLÁNDULA HARDERIANA DE RATA.

Se estudió, *in vivo*, el efecto del metimazol y la tiroxina (T_4) sobre la producción de porfirinas en glándula Harderiana de rata (Fig.23). Para ello, se hicieron 3 grupos de ratas, los cuales contenían en el agua de bebida: el primero BSA al 0'01% p/v ; el segundo BSA al 0'01% p/v y metimazol al 0'02% (p/v) y el tercero BSA al 0'01% p/v, metimazol al 0'02% (p/v) y T_4 al 1%(p/v). Todas las ratas fueron sacrificadas tras 10 días de tratamiento. Se observó que sólo el segundo grupo bajó la producción de porfirinas respecto al grupo control (primer grupo), mientras que el tercero alcanzó niveles de porfirinas semejantes al primero.

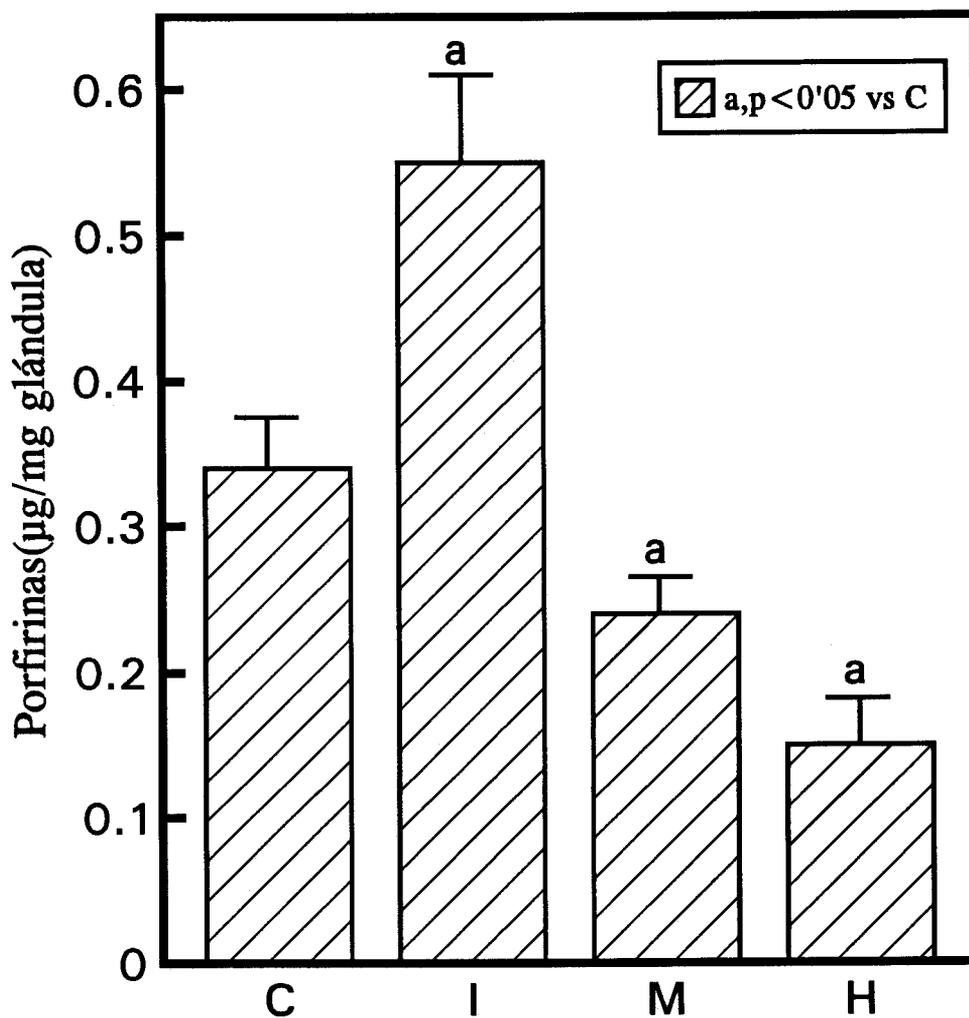


Fig.22. efecto del isoproterenol, metoxamina y metimazol en la producción de porfirinas en glándula harderiana de rata. Ratas eutiroides fueron inyectadas subcutáneamente con 100 μ l de salino (C), isoproterenol (1mg/kg de peso) (I) o metoxamina (M) (1mg/kg de peso) y ratas hipotiroideas (H) (tratadas durante 10 días con metimazol al 0'02% (p/v)) fueron inyectadas subcutáneamente con 100 μ l de salino. Todos los animales fueron sacrificados 1 hora después de la inyección. Posteriormente, se midió la producción de porfirinas. Cada punto es la media \pm E.S.M. de 8 animales.

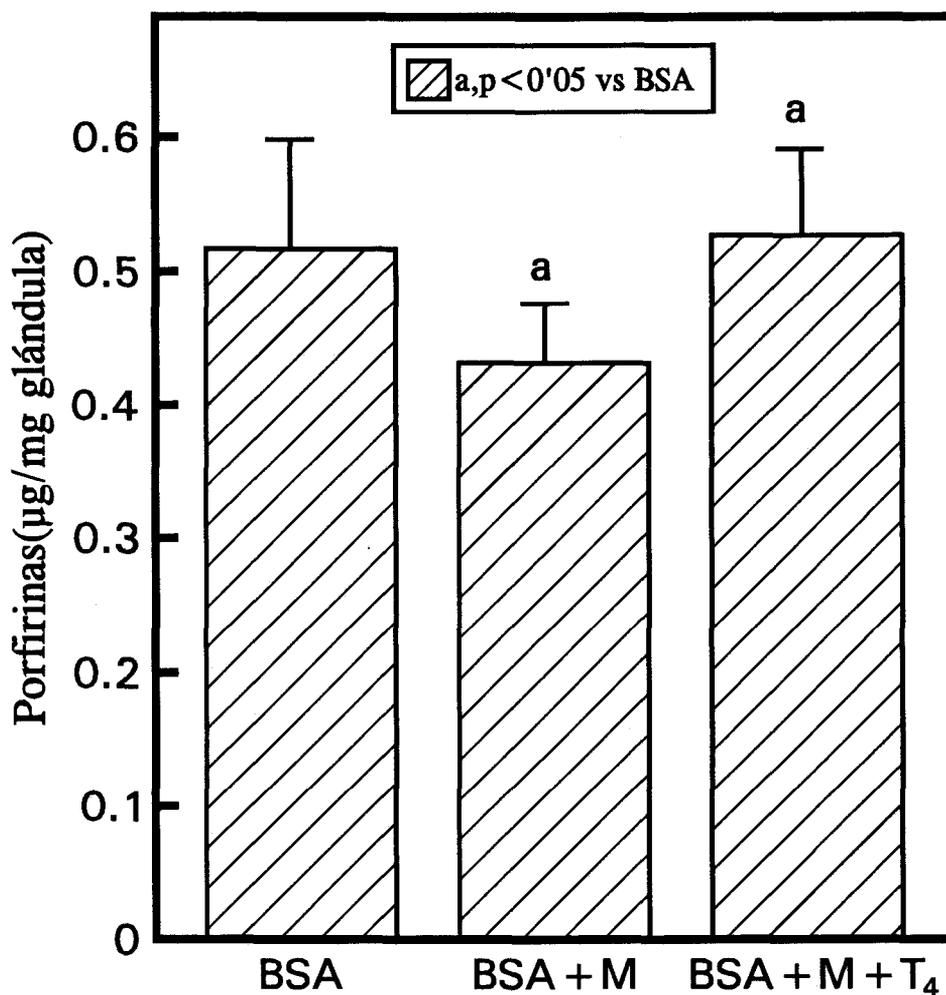


Fig.23. Efecto del metimazol y tiroxina (T₄) en la producción de porfirinas en glándula Harderiana de rata. 3 grupos de ratas, los cuales contenían en el agua de bebida: el primero BSA al 0'01% p/v ; el segundo BSA al 0'01% p/v y metimazol al 0'02% (p/v) y el tercero BSA al 0'01% p/v, metimazol al 0'02% (p/v) y T₄ al 1%(p/v), fueron sacrificados tras 10 días de tratamiento. Posteriormente, se midió la producción de porfirinas. Cada punto es la media \pm E.S.M. de 8 animales.

DISCUSSION

Se ha descrito la existencia de receptores para VIP en distintos tejidos, células y líneas celulares (Tabla V de la introducción). Sin embargo, no es conocida la existencia de receptores para VIP en glándula Harderiana, por lo que en el presente trabajo se ha caracterizado por primera vez el receptor de VIP en membranas de glándula Harderianas de ratas y su peso molecular. Este receptor, cumple los criterios de reversibilidad, saturabilidad, especificidad y alta afinidad, de acuerdo con lo observado en otros sistemas de membranas aisladas de distintos tejidos (CALVO et al., 1994a; GUIJARRO et al., 1991; ROBBERECHT et al., 1982a).

Una vez caracterizado el receptor de VIP en glándula Harderiana de rata, se procedió a hacer un estudio *in vivo* sobre la relación existente entre la actividad del enzima 5'-D tipo II y el VIP en glándula Harderiana de ratas, tanto eutiroides como hipotiroides. A continuación, se realizó el mismo estudio tanto con análogos como con antagonistas del VIP pero sólo en ratas eutiroides. Estos experimentos, se hicieron también en otros órganos como pineal, timo y TAM.

Posteriormente, se procedió al estudio *in vivo* de la concentración de porfirinas en glándula Harderiana de rata. Se estudió la relación entre la actividad del enzima 5'-D tipo II y el VIP con la producción de porfirinas en glándula Harderiana de rata, tanto eutiroides como hipotiroides. A continuación, se realizó el mismo estudio tanto con análogos como con antagonistas del VIP pero sólo en ratas eutiroides. También se estudió cómo afectaban diversas sustancias a la producción de porfirinas en glándula Harderiana de rata.

1. CARACTERIZACION DEL RECEPTOR DEL VIP EN MEMBRANAS DE GLÁNDULA HARDERIANA DE RATA.

Para poder estudiar el receptor del VIP en membranas de glándula Harderiana de rata, fue preciso utilizar una preparación de membranas, cuya obtención se realizó siguiendo el método de CARDINALI et al., 1979 y de VENECEK et al., 1987 con algunas modificaciones. Teniendo en cuenta la gran cantidad de proteasas lisosomales y proteasas de superficie presentes en las células de glándula Harderiana, que se

liberarían tras lisarse las células en el procedimiento para la preparación de membranas y que podrían afectar a la integridad del receptor, el tampón de lisis utilizado contenía varios inhibidores de proteasas: bacitracina, TLCK, leupeptina y PMSF. Por la misma razón, las membranas se conservaron en Hepes 20 mM, pH 7.5 con PMSF.

El VIP, ha sido marcado mediante el método de la cloramina T (LABURTHE et al., 1977), consiguiéndose una actividad específica de 800 Ci/mmol. Teniendo en cuenta que la máxima actividad específica posible es de 2200 Ci/mmol y que todas y cada una de las moléculas de VIP han sido marcadas con una molécula de ^{125}I , lo que sólo se consigue utilizando VIP monoiodado purificado (MARIE et al., 1985; MARTIN et al., 1986), el trazador que se ha utilizado contiene, aproximadamente, 0.39 átomos de ^{125}I por molécula de VIP, actividad específica suficiente para la caracterización de receptores (LABURTHE et al., 1986).

Los estudios cinéticos y estequiométricos mostraron que la unión del VIP a sus receptores en membranas de glándula Harderiana de rata es dependiente del tiempo, de la temperatura y de la concentración de membranas, reversible, saturable y específica, de acuerdo con lo observado en otros sistemas de membranas aisladas de distintos tejidos (CALVO et al., 1994a; GUIJARRO et al., 1991; ROBBERECHT et al., 1982a).

La unión específica del ^{125}I -VIP a membranas de glándula Harderiana de rata fue un proceso dependiente del tiempo y de la temperatura, al igual que la degradación del trazador, obteniéndose unas condiciones experimentales óptimas de 30°C y 30 minutos de incubación. A continuación, se buscó la concentración óptima de proteína de membrana, observándose que la unión específica del ^{125}I -VIP fue una función lineal ($r=0.996$) de la concentración de proteína de membrana hasta una concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$. A concentraciones mayores de proteína, la unión observada fue menor que la esperada, debido probablemente a la relativamente elevada degradación del trazador.

Los experimentos de unión se realizaron bajo condiciones experimentales óptimas: 30°C de temperatura, 30 minutos de incubación y una concentración de proteínas de 50 $\mu\text{g/ml}$. En dichas condiciones, la degradación del trazador fue del 20%.

La unión del ^{125}I -VIP a sus receptores específicos en membranas de glándula Harderiana de rata, es un proceso reversible: cuando, tras alcanzarse el estado de equilibrio con una incubación de 30 minutos a 30°C , se añadió al medio de incubación una sobrecarga ($1\ \mu\text{M}$) de VIP frío, el 50% del VIP marcado se disoció en los primeros 10 minutos, llegando al 86% a los 60 minutos. El tiempo empleado en la disociación del complejo trazador-membrana tras la sobrecarga de VIP frío, parece indicar una cinética de disociación que puede desglosarse en dos procesos de primer orden, lo que sugiere la presencia de 2 poblaciones de receptores: una de baja afinidad y rápida disociación y otra de alta afinidad y lenta disociación. El mismo tipo de cinética de disociación, ha sido encontrada en otros sistemas VIP-receptor e interpretada en este mismo sentido, como en enterocitos (PRIETO et al., 1979), músculo liso de útero (OTTESEN et al., 1982), próstata ventral de rata (PRIETO y CARMENA, 1983), monocitos circulantes humanos (WIJK et al., 1985) y en macrófagos peritoneales de rata (SEGURA et al., 1991), habiendo sido comprobada la ausencia de cooperatividad negativa entre los receptores (PRIETO et al., 1979; PRIETO y CARMENA, 1983).

La adición de concentraciones crecientes de VIP frío (0.01 - $100\ \text{nM}$) al medio, inhibió la unión del trazador a las membranas de glándula Harderiana de rata, siendo la concentración inhibitoria semimáxima (IC_{50}) igual a $1.3 \pm 0.2\ \text{nM}$, del mismo orden a la encontrada en otros sistemas VIP-receptor estudiados: carcinoma pulmonar humano (LABURTHER et al., 1981), membranas de pulmón de rata (ROBBERECHT et al., 1981), sinaptosomas de córtex de rata (STAUN-OLSEN et al., 1982), vesícula seminal de rata (GUIJARRO et al., 1991), monocitos sanguíneos humanos (WIJK et al., 1985), células mononucleares sanguíneas de rata (CALVO et al., 1986b), macrófagos peritoneales de rata (SEGURA et al., 1991) y membranas de macrófagos peritoneales de rata (CALVO et al., 1994a).

La curva de concavidad superior observada en la representación gráfica del análisis de SCATCHARD (SCATCHARD, 1949) de los datos del estudio estequiométrico, puede interpretarse de varias formas (DE MEYTS, 1976). En primer lugar, podría deberse a la existencia de errores técnicos en la separación del péptido unido y libre, pero esta posibilidad debe ser descartada, ya que el método utilizado para

la separación de ambas formas del péptido, está bien acreditado, siendo ampliamente utilizado (DE MEYTS, 1976; PRIETO et al., 1979; GUERRERO et al., 1981; WOOD et al., 1985; SHAFFER et al., 1987; CALVO et al., 1990; SEGURA et al., 1991; CALVO et al., 1994a). Otra explicación de la curva de concavidad superior, sería que la afinidad del VIP frío por el receptor sea distinta a la del ^{125}I -VIP, lo que debe descartarse porque se ha comprobado que ambas formas del péptido, se unen por igual a los receptores (PRIETO et al., 1979) y estimulan por igual la producción de AMPc (LABURTHE et al., 1979c; MARIE et al., 1985). Otra posible explicación, sería la existencia de cooperatividad negativa entre los sitios de unión (DE MEYTS, 1976). El hecho de que en ningún sistema se haya encontrado cooperatividad negativa en la interacción del VIP con sus receptores y de haberse demostrado la ausencia de la misma en células de próstata ventral de rata (PRIETO y CARMENA, 1983) y en células HeLa de carcinoma de cérvix humano (PRIETO et al., 1981), nos lleva a descartar esta posibilidad. La interpretación del análisis de SCATCHARD mas probable sugiere la existencia de 2 poblaciones distintas de receptores: una de alta afinidad (0.36 ± 0.06 nM) y baja capacidad de unión (323.00 ± 54.00 fmol VIP/mg proteína) y otra de baja afinidad (65.37 ± 8.08 nM) y alta capacidad de unión (39.53 ± 3.10 fmol VIP/mg proteína), resultados similares a los obtenidos por otros autores en la gran mayoría de los sistemas VIP-receptor caracterizados (CHRISTOPHE et al., 1976; ROBBERECHT et al., 1978; ROBBERECHT et al., 1982b; PRIETO et al., 1979; AMIRANOFF et al., 1980; PRIETO Y CARMENA, 1983; CARMENA y PRIETO, 1985; SAID, 1986; HUESO et al., 1989; WANKE et al., 1990; GUIJARRO et al., 1991; RODRIGUEZ-PENA et al., 1991; CALVO et al., 1990; SEGURA et al., 1991; CARMENA et al., 1992; MAO et al., 1993; CALVO et al., 1994a; CALVO et al., 1994b), donde la población de alta afinidad y baja capacidad de unión se encuentra con K_d entre 0.2 y 1 nM; 5.000 a 60.000 sitios/célula y la de baja afinidad y alta capacidad de unión con K_d entre 10-80 nM; 100.000-1.000.000 sitios/célula, siendo sólo los receptores de alta afinidad los que se encuentran acoplados al sistema adenilato ciclasa (LABURTHE et al., 1979a), ya que la mitad de la estimulación máxima de la adenilato ciclasa suele estar entre 0,2 y 5 nM, valores muy parecidos a los de la K_d de los receptores de alta

afinidad. Existen sistemas en los que ciertos autores han descrito una sola población de receptores, tales como cerebro de rata (TAYLOR y PERT, 1979), linfocitos T humanos de sangre periférica (DANEK et al., 1983) y células intestinales de cobaya (BINDER et al., 1980). A nivel funcional, lo realmente importante es la presencia de receptores de alta afinidad, ya que son los únicos que estarían acoplados a la adenilato ciclasa, estimulando la formación de AMPc (LABURTHER et al., 1979a; GUERRERO et al., 1981; CARMENA y PRIETO, 1983; CALVO et al., 1986a) y activando la proteína quinasa dependiente de AMPc (GUERRERO et al., 1984). Los receptores de baja afinidad no producirían la activación de la adenilato ciclasa (WILLIAMS y LEFKOWITZ, 1977), pero no se puede descartar que la población de receptores de baja afinidad, presente un estado funcional distinto de una única clase de receptor, sugiriéndose que la existencia de dos tipos de receptores puede ser debida a la modulación de la afinidad de un solo receptor por un componente GTP-regulador, y cada una de las poblaciones de receptores, no sería más que un diferente estado de asociación entre un único receptor y una proteína G (PAUL y SAID, 1987; LABURTHER y COUVINEAU, 1988). Al ser el receptor de VIP en membranas de glándula Harderiana de rata sensible al GTP, hay que tener esta posibilidad en cuenta. El valor de la K_d del receptor de alta afinidad (0.36 ± 0.06 nM), indica que las membranas de células de glándula Harderiana de rata, pueden reconocer concentraciones de VIP del orden nanomolar, por lo que siendo la glándula Harderiana de rata un órgano con terminaciones nerviosas peptidérgicas en su mayoría tipo VIP y colecistoquinina (TSUKARA y JACOBOWITZ, 1987), éstas pueden ser células diana de la acción neuroparacrina del VIP.

Los receptores estudiados en membranas de glándula Harderiana de rata son específicos para VIP, aunque también reconocen a varios péptidos relacionados estructuralmente con él. Al estudiar la inhibición de la unión del ^{125}I -VIP en membranas de glándula Harderiana de rata producida por diferentes péptidos, sólo la helodermina, el GRFr, el PHI y la secretina (pero con muy baja potencia), inhibieron la unión del trazador a las membranas, siendo el orden de potencia observado: VIP ($\text{IC}_{50}=1.30$ nM) > helodermina ($\text{IC}_{50}=4.60$ nM) > GRFr ($\text{IC}_{50}=46.30$ nM) > PHI ($\text{IC}_{50}=215.30$ nM).

nM) >> secretina. Ni el glucagón, miembro de la familia del VIP ni otros péptidos sin relación estructural con el VIP como la somatostatina, insulina, pancreastatina y la melatonina, inhibieron la unión del trazador a las membranas de células de glándula Harderiana de rata incluso a concentraciones tan elevadas como 10^{-6} M. Estos resultados, concuerdan en parte con los encontrados en otros sistemas VIP-receptor (COUVINEAU et al., 1985; DICKINSON et al., 1986b; ROSSELIN, 1986; O'DORISIO et al., 1988, 1989a, 1989b; ROUYER-FESSARD et al., 1989; GUIJARRO et al., 1991; SEGURA et al., 1991; CALVO et al., 1994a, 1994b). El hecho de que los receptores estudiados en membranas de glándula Harderiana específicos para VIP, lo sean también para otros péptidos relacionados con él, aunque en menor medida, sea quizás debido a las grandes analogías observadas entre la secuencia de aminoácidos del VIP y la de los péptidos estudiados: la secretina posee 27 aminoácidos de los que 9 están en común con los del VIP; el glucagón, 29 residuos y 6 en común con el VIP; el factor liberador de hormona del crecimiento de rata (GRFr) con 43 residuos y 12 en común con el VIP; el péptido histidina amino terminal isoleucina-amida carboxi terminal (PHI) con 27 aminoácidos y 13 en común con el VIP; la helodermina, con 35 aminoácidos y 15 en común con el VIP (ver Tabla II de la introducción). Por otra parte, se ha destacado la importancia de seis residuos de aminoácidos de la molécula para la actividad biológica del VIP. Estos son: Asp³, Phe⁶, Thr⁷, Tyr¹⁰, Tyr²² y Leu²³ (O'DONNELL et al., 1991). Estos seis residuos, se encuentran en común con el VIP en el caso de la helodermina, mientras que en el GRFr, la Tyr²² presente en el VIP se encuentra sustituida por leucina y en el PHI, la Tyr¹⁰ del VIP por fenilalanina. La secretina, no posee dos de estos seis residuos: la Tyr¹⁰, en cuyo lugar aparece leucina y la Tyr²², sustituida por leucina también. El glucagón, es el que posee más diferencias con el VIP en este aspecto, ya que de estos seis aminoácidos, sólo posee en común con el VIP tres aminoácidos, siendo los residuos en que difieren, el Asp³, que se encuentra sustituido por glutamina, la Tyr²², en cuyo lugar se encuentra fenilalanina y la Leu²³, sustituida por valina en el glucagón. Observando el orden de potencia (VIP (IC₅₀=1'30 nM) > helodermina (IC₅₀=4'60 nM) > GRFr (IC₅₀=46'30 nM) > PHI (IC₅₀=215'30 nM) >> secretina), la helodermina es el péptido que sigue al VIP en el orden,

encontrándose que posee 15 aminoácidos en común con el VIP y que posee los 6 aminoácidos esenciales de la molécula para la actividad biológica del VIP. El siguiente péptido es el GRFr, con 43 residuos y 12 en común con el VIP y un solo aminoácido de diferencia con los 6 aminoácidos esenciales para la actividad biológica del VIP. Algo parecido ocurre con el siguiente péptido, el PHI, con 27 aminoácidos y 13 en común con el VIP y un solo aminoácido de diferencia con los 6 aminoácidos esenciales para la actividad biológica del VIP. Con muy baja potencia, se encuentra la secretina, que posee 27 aminoácidos de los que 9 están en común con los del VIP y 2 aminoácidos de diferencia con los 6 aminoácidos esenciales para la actividad biológica del VIP. El glucagón, a pesar de pertenecer a la familia del VIP, no inhibió la unión del trazador a las membranas de células de glándula Harderiana de rata . Posee 29 residuos y 6 en común con el VIP y 3 aminoácidos de diferencia con los 6 aminoácidos esenciales para la actividad biológica del VIP. Como puede observarse, a medida que los péptidos poseen mayor número de aminoácidos totales en común con el VIP, mayor es el orden de potencia observado.

Por otra parte, la estructura tridimensional del VIP ha sido expuesta por FRY et al., 1989. Parece ser que la formación de una hélice puede facilitar la unión a receptores proteicos y también provocar interacciones directas con los lípidos de la membrana, por lo que se sugiere que este tipo de estructura es la que adopta el VIP durante la interacción con el receptor (LUIS et al., 1988). Por tanto, el número de aminoácidos en común con el VIP, y la estructura tridimensional del péptido en cuestión, parecen ser determinantes para el reconocimiento del péptido por el receptor de VIP en membranas de células de glándula Harderiana de rata.

Con el fin de especificar si los nucleótidos de guanina regulan la unión del ^{125}I -VIP a las membranas de glándula Harderiana de rata, se estudiaron los efectos del GTP, ATP, CTP, UTP y Gpp(NH)p (un análogo no hidrolizable del GTP) sobre la unión específica del ^{125}I -VIP a las membranas de glándula Harderiana de rata en un amplio rango de concentraciones (10nM-1mM). Concentraciones de GTP tan bajas como 1nM, inhibieron ya de forma significativa la unión del trazador a las membranas, con una $\text{IC}_{50} \approx 10 \mu\text{M}$, similar a la encontrada en otros sistemas VIP-receptor (CARMENA y

PRIETO, 1985; COUVINEAU et al., 1986a; CALVO et al., 1990; SEGURA et al., 1992b). El Gpp(NH)p, tuvo una potencia muy similar a la encontrada en el GTP ($IC_{50} \approx 10 \mu M$), como ocurre también en otros tipos celulares (RAMIREZ-CARDENAS et al., 1981; CALVO et al., 1990, 1994a). Por el contrario, en otros sistemas VIP-receptor, el Gpp(NH)p ha mostrado ser más potente inhibidor de la unión del VIP a sus receptores que el GTP (CARMENA y PRIETO, 1985; AGUI y MATSUMOTO, 1990). Otros nucleótidos como el ATP, CTP y UTP fueron prácticamente inefectivos en la inhibición de la unión, y a concentraciones tan altas como 1mM, no llegaron a producir una inhibición superior al 70%, similar a lo que ocurre en hígado (DESBUQUOIS, 1974; RAMIREZ-CARDENAS et al., 1981), intestino (AMIRANOFF et al., 1980), próstata ventral (CARMENA y PRIETO, 1985), hipófisis anterior de rata (AGUI y MATSUMOTO, 1990), tiroides bovino (CALVO et al., 1991) y macrófagos peritoneales de rata (CALVO et al., 1994a). Estos resultados, demuestran un efecto del GTP y de su análogo no hidrolizable (Gpp(NH)p) sobre la unión del VIP a membranas de glándula Harderiana de rata, aportando una evidencia indirecta de que existe una interacción entre el receptor de VIP y una proteína fijadora de nucleótidos de guanina, probablemente una proteína Gs, sugiriendo indirectamente que el acoplamiento entre el receptor de VIP y la adenilato ciclasa en membranas de glándula Harderiana de rata, está mediado por una proteína Gs.

Para determinar la masa molecular del receptor de VIP en membranas de glándula Harderiana de rata, se realizó un cross-linking seguido de electroforesis en gel SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) usando como referencia proteínas de masa molecular conocido. En la autorradiografía, la banda mayor se identificó con una masa molecular aparente de 57 KDa. Se observó además una banda menor que se correspondía con una masa molecular aparente de 35 KDa. Estas bandas son específicas. Suponiendo que existe una molécula de VIP unida por proteína, la masa molecular relativa de cada proteína es de 54 y 32 KDa respectivamente. Existen varias hipótesis que podrían explicar la naturaleza de estos complejos ^{125}I -VIP-proteína:

- 1) El complejo ^{125}I -VIP-proteína de 57 KDa, podría ser el receptor de alta afinidad y baja capacidad de unión. Así, el valor de la masa molecular relativa es similar al

encontrado en aorta y distintos tejidos de rata (SHREEVE et al., 1992), en páncreas de ternero (LE MEUTH et al., 1991) y en macrófagos peritoneales de rata y ratón (CALVO et al., 1994a; 1994b).

2) El complejo ^{125}I -VIP-proteína de 35 KDa, podría estar originado a partir del complejo ^{125}I -VIP-proteína de 57 KDa por rotura proteolítica y desglicosilación de éste. Aunque en el aislamiento de las membranas se han empleado inhibidores de proteasas, existe la posibilidad de que algunas proteasas no se inhiban y sigan activas cuando se utilice la preparación de membranas. Otra posibilidad, es que el complejo ^{125}I -VIP-proteína de 35 KDa, podría corresponderse con el receptor de baja afinidad y alta capacidad de unión. En este contexto, han sido observadas bandas entre 33-36 KDa en enterocitos humanos (COUVINEAU et al., 1985) y de rata (LABURTHE et al., 1984), en páncreas de ternero (LE MEUTH et al., 1991) y en macrófagos peritoneales de rata y ratón (CALVO et al., 1994a; 1994b).

El VIP, al igual que los demás neuropéptidos y hormonas, sólo puede producir modificaciones funcionales en las células diana si de la interacción con su receptor específico se sigue la formación de un segundo mensajero intracelular que, en el caso del VIP es el AMPc. La naturaleza funcional de los receptores para VIP en membranas de glándula Harderiana de rata fue demostrada por la capacidad del VIP para estimular la actividad adenilato ciclasa en membranas de glándula Harderiana de rata de forma dosis-dependiente, alcanzándose valores máximos cuando las membranas fueron incubadas en presencia de VIP $0.1 \mu\text{M}$. Estos resultados, concuerdan con los observados en otros sistemas de membranas (ROBBERECHT et al., 1982a).

En definitiva, se ha demostrado la existencia de receptores funcionales específicos para el VIP en membranas de glándula Harderiana de rata, lo que sugiere que el VIP puede modular algunas de las funciones de la glándula Harderiana de rata y por tanto, intervenir en su fisiología.

2. EFECTO *IN VIVO* DEL VIP SOBRE LA ACTIVIDAD 5'-DESYODASA (5'-D) TIPO II Y ESTUDIO FARMACOLOGICO (VIP, ANALOGOS Y ANTAGONISTAS) DE LA ACTIVIDAD 5'-D EN GLANDULA HARDERIANA Y EN DIVERSOS ORGANOS DE RATA.

La desyodasa es un enzima que juega un importante papel en mantener los niveles intracelulares de T_3 (KAPLAN, 1984) y como defensa ante la deficiencia de esta hormona (VISSER et al., 1983). Se han encontrado dos isoenzimas presentes en distintos tejidos: la desyodasa tipo I localizada principalmente en el hígado (VISSER et al., 1978) y riñón (LEONARD y ROSENBERG, 1978) y la tiroxina 5'-desyodasa tipo II, presente en cerebro (CRANTZ y LARSEN, 1980), pituitaria anterior (KAPLAN, 1980), tejido adiposo marrón (LEONARD et al., 1982), glándula Harderiana (GUERRERO et al., 1987), timo (VAN DOORN et al., 1986), pineal (TANAKA et al., 1986), y queranocitos (KAPLAN et al., 1988).

Con el fin de comprobar si el VIP influye sobre la actividad del enzima tiroxina 5'-desyodasa (actividad 5'-D) tipo II, se realizó un estudio *in vivo* en glándula Harderiana y en diversos órganos de rata: glándula pineal, timo y tejido adiposo marrón (TAM), en los que se emplearon tanto ratas eutiroides como hipotiroideas para comprobar si el efecto del VIP era dependiente del estado tiroideo.

Las ratas, fueron inyectadas intracardíacamente con la finalidad de que el VIP no pasara por el hígado y fuera degradado en ese lugar. El VIP fue preparado en una solución que contenía inhibidores de proteasas tales como bacitracina, TLCK, PMSF y leupeptina para evitar que el péptido fuera degradado en su trayecto. El grupo control, fue inyectado con salino al 0'9%.

Para la obtención de muestras, los animales fueron sacrificados mediante decapitación, siendo anteriormente anestesiados con éter etílico. Las muestras fueron rápidamente extraídas y congeladas en CO_2 sólido (para evitar la posible actividad y degradación enzimática que pudiera producirse) y almacenadas a $-80^\circ C$ hasta el día de su utilización.

La medida de la actividad 5'-D en glándula Harderiana de rata, pineal, timo y

TAM, se realizó según el método de NAKAMURA et al., 1977 también llamado método de la cloramina T, muy utilizado por diversos autores (PUIG-DOMINGO et al., 1989; GUERRERO et al., 1987, 1990a; RUBIO et al., 1991a, 1991b; TANAKA et al., 1986).

Para que el VIP pueda ejercer su acción, es necesario que llegue al órgano diana. A pesar de ser considerado desde un principio como un péptido de acción exclusivamente intestinal, se han identificado por radioinmunoensayo e inmunoanálisis terminaciones nerviosas VIPérgicas no sólo en el tracto digestivo, sino en prácticamente todo el organismo (Tabla III de la introducción). Usando técnicas inmunohistoquímicas, se han observado terminaciones nerviosas VIPérgicas en glándula Harderiana de rata (TSUKARA y JACOBOWITZ, 1987), en pineal (SHIOTANI et al., 1986) en timo (GOMARIZ et al., 1990), corteza de timo (FELTEN et al., 1985) y en la vasculatura y parénquima tímicos (LACEY et al., 1991). Existen tejidos en los que no se han encontrado terminaciones nerviosas VIPérgicas, pero si inmunoreactividad para VIP como el tejido adiposo marrón (TAM). Esto nos asegura la llegada del VIP a los órganos estudiados *in vivo*.

En glándula Harderiana de rata, el VIP estimuló la actividad del enzima tiroxina 5'-desyodasa (actividad 5'-D) tipo II, tanto en ratas eutiroideas como en hipotiroideas con respecto a los niveles basales, siendo la activación dependiente del estado tiroideo y del tiempo. Se ha comprobado que el VIP estimula la actividad 5'-D en otros tejidos como pineal (cultivo de pinealocitos), donde el efecto del VIP fue también dependiente del estado tiroideo y del tiempo (MOLINERO y GUERRERO, 1993). En ambas glándulas, el estado tiroideo parece estar regulado por la actividad 5'-D (GUERRERO et al., 1987).

En ratas eutiroideas, el efecto del VIP alcanzó su máximo valor a los 20 minutos, mientras que en las hipotiroideas, la actividad 5'-D fue aumentando con respecto al tiempo. La actividad 5'-D siempre se mantuvo mayor en ratas hipotiroideas respecto a eutiroideas a lo largo del tiempo. Por tanto, el hipotiroidismo no sólo causó un incremento con respecto a los valores basales, sino que además intensificó el efecto del VIP. Se ha comprobado, que en glándula Harderiana de rata la actividad del enzima

5'-D tipo II aumenta en el hipotiroidismo con respecto al eutiroidismo (GUERRERO et al., 1987), lo que podría explicar la mayor activación de la 5'-D por el VIP alcanzada en los animales hipotiroideos.

Al igual que en glándula Harderiana de ratas, el VIP estimuló la actividad del enzima 5'-D tipo II en pineal, tanto en ratas eutiroides como en hipotiroideas con respecto a los niveles basales, siendo la activación dependiente del estado tiroideo y del tiempo.

En ratas eutiroides, el efecto del VIP alcanzó su máximo valor a los 20 minutos (igual que en glándula Harderiana), mientras que en las hipotiroideas, la actividad 5'-D fue aumentando con respecto al tiempo. La actividad 5'-D siempre se mantuvo mayor en ratas hipotiroideas respecto a eutiroides a lo largo del tiempo, excepto a los 20 minutos, donde la estimulación de la actividad 5'-D de las ratas eutiroides por el VIP, superó al valor de las hipotiroideas. El hipotiroidismo no sólo causó un incremento con respecto a los valores basales, sino que además intensificó el efecto del VIP. Se ha comprobado que en pineal de ratas la actividad del enzima tiroxina 5'-desyodasa (actividad 5'-D) tipo II aumenta en el hipotiroidismo con respecto al eutiroidismo (TANAKA et al., 1986), lo que podría explicar la mayor activación de la 5'-D por el VIP alcanzada en los animales hipotiroideos.

El VIP estimuló la actividad 5'-D tipo II en timo, al igual que en glándula Harderiana y en pineal de rata, tanto en ratas eutiroides como en hipotiroideas con respecto a los niveles basales, siendo la activación dependiente del estado tiroideo y del tiempo.

En ratas eutiroides, el efecto del VIP alcanzó su máximo valor a los 20 minutos (igual que en glándula Harderiana y pineal), mientras que en las hipotiroideas, la actividad 5'-D fue aumentando con respecto al tiempo (igual que en glándula Harderiana y pineal). La actividad 5'-D siempre se mantuvo mayor en ratas hipotiroideas respecto a eutiroides a lo largo del tiempo, excepto a los 20 minutos, donde la estimulación de la actividad 5'-D de las ratas eutiroides, superó al valor de las hipotiroideas. El hipotiroidismo no sólo causó un incremento con respecto a los valores basales, sino que además intensificó el efecto del VIP. Se ha comprobado que, en timo de rata la

actividad 5'-D tipo II aumenta en el hipotiroidismo con respecto al eutiroidismo (VAN DOORN et al., 1986), lo que podría explicar la mayor activación de la 5'-D por el VIP alcanzada en los animales hipotiroideos.

El VIP estimuló la actividad 5'-D tipo II en TAM, al igual que en los órganos estudiados previamente, tanto en ratas eutiroides como en hipotiroideas con respecto a los niveles basales, siendo la activación dependiente del estado tiroideo y del tiempo.

En ratas eutiroides, el efecto del VIP alcanzó su máximo valor a los 40 minutos, a diferencia de los otros órganos, donde el tiempo máximo fue a los 20 minutos. En ratas hipotiroideas, la actividad 5'-D alcanzó su máximo valor a los 20 minutos, comenzando a disminuir a partir de ese tiempo, alcanzándose valores incluso por debajo de los niveles basales, pero sin llegar a alcanzar los valores eutiroides. La actividad 5'-D siempre se mantuvo mayor en ratas hipotiroideas respecto a eutiroides a lo largo del tiempo. El hipotiroidismo no sólo causó un incremento con respecto a los valores basales, sino que además intensificó el efecto del VIP. Se ha comprobado, que en TAM la actividad 5'-D tipo II aumenta en el hipotiroidismo con respecto al eutiroidismo (VAN DOORN et al., 1986), lo que podría explicar la mayor activación de la 5'-D por el VIP alcanzada en los animales hipotiroideos. Estudios *in vitro*, muestran que la actividad 5'-D en TAM es mayor que en otros tejidos (LEONARD et al., 1982; KAPLAN, 1984), lo cual podría explicar la mayor actividad 5'-D encontrada en TAM respecto a los demás órganos estudiados. Se ha demostrado, que la conversión intracelular de la tiroxina en T₃ por medio de la 5'-D en TAM, es necesaria para la termogénesis en este tejido (BLANCO y SILVA, 1987), por lo que el VIP podría activar la termogénesis al activar la actividad 5'-D.

Con estos resultados, se ha demostrado que el VIP estimula la actividad 5'-D en todos los órganos estudiados en dependencia del tiempo y del estado tiroideo.

A continuación, se procedió a realizar un estudio farmacológico *in vivo* del efecto del VIP, análogos (secretina, PACAP-27 y PACAP-38) y antagonistas del VIP (antagonista A1 y antagonista A2) sobre la actividad 5'-D en glándula Harderiana, pineal y TAM de ratas eutiroides. Para ello, se inyectó VIP y los diversos análogos y antagonistas (250 µl a concentración 0'1 µM) a distintos grupos de ratas,

sacrificándolas a los 20 minutos postinyección por ser éste el tiempo al cual la actividad 5'-D potenciada por el VIP en glándula Harderiana fue máxima en los experimentos anteriores. La inyección de VIP y secretina estimularon la actividad del enzima en todos los órganos estudiados respecto al grupo control, mientras que el PACAP-27 y PACAP-38 mantuvieron la actividad estable e incluso la bajaron con relación a los niveles basales. La secretina fue el péptido que más incrementó la actividad 5'-D respecto al grupo control en glándula Harderiana y TAM, siendo el VIP el que más efecto realizó sobre la actividad en pineal. La actividad del enzima fue activada levemente respecto a los valores basales por el PACAP-27 y PACAP-38 en TAM, mientras que en pineal bajaron los niveles y en glándula Harderiana los mantuvieron estables frente al grupo control. Los antagonistas bajaron la actividad 5'-D respecto al VIP y a los niveles basales, siendo el antagonista A1 el que más inhibió en TAM y el antagonista A2 el que más bajó la actividad en glándula Harderiana y pineal. En conjunto, pudo observarse que tanto el VIP como la secretina estimularon la actividad 5'-D, los antagonistas la inhibieron y el PACAP-27 y PACAP-38 la mantuvieron en niveles similares a los valores basales.

3. EFECTO IN VIVO DEL VIP Y OTRAS SUSTANCIAS SOBRE LA PRODUCCION DE PORFIRINAS EN GLANDULA HARDERIANA DE RATA.

Las porfirinas, constituyen el producto mayoritario de secreción de la glándula Harderiana de roedores. Existen pocos estudios realizados sobre estas moléculas en glándula Harderiana de rata, por lo que se han realizado distintos estudios sobre ellas, todos *in vivo*.

La medida de la concentración de porfirinas se realizó según el método de SHIRAMA et al., 1987 con modificaciones.

En primer lugar, se estudió la relación entre la actividad del enzima 5'-D tipo II y el VIP con la producción de porfirinas en glándula Harderiana de rata, tanto eutiroideas como hipotiroideas. El VIP inhibió la producción de porfirinas en glándula Harderiana de ratas eutiroideas, alcanzando valores similares a los hipotiroideos y

estimuló la producción de porfirinas en glándula Harderiana de ratas hipotiroideas con respecto a los niveles basales y en dependencia del tiempo. Así, el efecto del VIP sobre la producción de porfirinas fue dependiente del tiempo y del estado tiroideo. En los niveles basales, la producción de porfirinas fue mucho mayor en el grupo eutiroideo con respecto al hipotiroideo, resultados que concuerdan con los de BUZZELL y MENENDEZ-PELAEZ, 1992.

A continuación, se relacionó el efecto del VIP en la producción de porfirinas con el efecto del VIP sobre la actividad 5'-D en glándula Harderiana de rata, observándose en ratas eutiroideas que la actividad 5'-D aumentó con respecto a los valores basales y la producción de porfirinas bajó con el tiempo con respecto al grupo control por efecto del VIP y que en los animales hipotiroideos, tanto la actividad enzimática como la producción de porfirinas aumentó respecto a los valores basales y al tiempo. El VIP, estimuló la actividad 5'-D en glándula Harderiana de rata eutiroidea, alcanzando valores semejantes a los hipotiroideos basales. Es sabido, que en el hipotiroidismo los niveles basales de porfirina son menores que los presentados en los animales eutiroideos (BUZZELL y MENENDEZ-PELAEZ, 1992). En este caso, el VIP, al activar en las ratas eutiroideas la actividad 5'-D, hace que a su vez baje la producción de porfirinas, por lo que las ratas se comportan como si fueran hipotiroideas. En el caso de las ratas hipotiroideas, el VIP aumenta la actividad 5'-D y la concentración de porfirinas, aumenta respecto al tiempo pero sin alcanzar los valores basales presentados por los animales eutiroideos, lo cual podría resultar contradictorio a lo que ocurre en el caso de las ratas eutiroideas, es decir, que a medida que aumenta la actividad 5'-D baja la concentración de porfirinas. Esto, podría explicarse diciendo que el aumento de la concentración de porfirinas no es muy alto, no llegando a alcanzarse los valores basales presentados por los animales eutiroideos.

A continuación, se procedió a realizar un estudio farmacológico *in vivo* del efecto del VIP y análogos del VIP (secretina, PACAP-27 y PACAP-38) sobre la producción de porfirinas en glándula Harderiana de ratas eutiroideas. Para ello, se inyectó VIP y los diversos análogos (250 μ l a concentración 0'1 μ M) a distintos grupos de ratas, sacrificándolas a los 20 minutos postinyección por ser este el tiempo al cual

la actividad 5'-D potenciada por el VIP en glándula Harderiana fue máxima en los experimentos anteriores. Se encontró que todas las sustancias inyectadas estimularon la producción de porfirinas respecto a los niveles basales, siendo el PACAP-27 el que más estimuló la producción de porfirinas (el doble de los valores basales). Tanto el VIP, la secretina y el PACAP-38 potenciaron la producción de porfirinas pero en menor medida y con valores muy parecidos entre sí.

Se estudió, *in vivo*, el efecto del isoproterenol (un agonista β -adrenérgico), metoxamina (un agonista α -adrenérgico) y metimazol (hipotiroidismo) sobre la producción de porfirinas en glándula Harderiana de rata. Los agonistas α y β -adrenérgicos, parecen intervenir en la regulación del nivel de porfirinas: el isoproterenol incrementó la producción de porfirinas respecto a los valores basales, mientras que la metoxamina bajó la concentración de porfirinas respecto al grupo control, por lo que parece ser que los agonistas β -adrenérgicos activan la producción de porfirinas, mientras que los α -adrenérgicos la bajan. El metimazol bajó, al igual que en los experimentos anteriores, la producción de porfirinas.

Por último, se estudió *in vivo*, el efecto del metimazol (hipotiroidismo) y la tiroxina (T_4) sobre la producción de porfirinas en glándula Harderiana de rata. Los resultados, confirmaron que sólo el grupo hipotiroideo bajó la producción de porfirinas respecto al grupo control mientras que el grupo tratado con metimazol y T_4 alcanzó niveles de porfirinas semejantes al control, lo que confirmaría que el aporte de T_4 inhibió el efecto del metimazol y por tanto las ratas no fueron hipotiroideas. Aquí, se confirma otra vez más que el hipotiroidismo baja los niveles de porfirinas (BUZZELL y MENENDEZ-PELAEZ, 1992).

CONCLUSIONES

1. Las membranas de glándula Harderiana de rata poseen receptores específicos, reversibles y saturables para el péptido intestinal vasoactivo, siendo la IC_{50} igual a $1'3 \pm 0'2$ nM. Se evidencian dos poblaciones de receptores para el VIP: una de alta afinidad y baja capacidad de unión ($Kd = 0'36 \pm 0'06$ nM y $323'00 \pm 54'00$ fmol VIP/mg proteína) y otra de baja afinidad y alta capacidad de unión ($Kd = 65'37 \pm 8'08$ nM y $39'53 \pm 3'10$ fmol VIP/mg proteína).
2. El estudio a nivel molecular de estos receptores, reveló bandas específicas de 57 KDa y 35 KDa. Suponiendo que existe una molécula de VIP unida por proteína, la masa molecular relativa de estas proteínas que unen específicamente VIP es de 54 y 32 KDa respectivamente.
3. Los receptores para VIP en membranas de glándula Harderiana de rata son específicos para VIP, aunque también reconocen a varios peptidos relacionados estructuralmente con él, siendo el orden de potencia observado: VIP ($IC_{50} = 1'30$ nM) > helodermina ($IC_{50} = 4'60$ nM) > GRFr ($IC_{50} = 46'30$ nM) > PHI ($IC_{50} = 215'30$ nM) >> secretina. Ni el glucagón, miembro de la familia del VIP ni otros péptidos sin relación estructural con el VIP como la somatostatina, insulina, pancreastatina y la melatonina, inhibieron la unión del trazador a las membranas de glándula Harderiana de rata.
4. Tanto el GTP como su análogo no hidrolizable Gpp(NH)p, inhiben la unión del ^{125}I -VIP con una potencia similar ($IC_{50} \approx 10$ μ M). Los restantes nucleótidos, (ATP, CTP y UTP) fueron prácticamente inefectivos en la inhibición de la unión del trazador a las membranas de glándula Harderiana de rata.

5. El VIP estimula la producción de adenilato ciclasa y promueve la síntesis de AMPc en membranas de glándula Harderiana de rata.

6. Estudios *in vivo*, muestran que tanto en glándula Harderiana, pineal, timo y tejido adiposo marrón de ratas, el VIP estimula la actividad del enzima tiroxina 5'-desyodasa (actividad 5'-D) tipo II respecto a los niveles basales, siendo la activación dependiente del tiempo y del estado tiroideo. Esta actividad también es estimulada por la secretina, inhibida por los antagonistas del VIP (A1 y A2) y mantenida en niveles similares a los basales por el PACAP-27 y PACAP-38.

7. Estudios *in vivo* sobre producción de porfirinas, muestran que la activación por el VIP de la actividad 5'-D baja la producción de porfirinas en ratas eutiroideas, alcanzando los niveles basales de las hipotiroideas por lo que las ratas se comportan como si fueran hipotiroideas. En ratas hipotiroideas, no se observa una variación apreciable en el nivel de porfirinas respecto a los niveles basales.

8. Los agonistas α y β -adrenérgicos, parecen intervenir en la regulación del nivel de porfirinas en glándula Harderiana. Los agonistas β -adrenérgicos incrementan la concentración de porfirinas, mientras que los agonistas α -adrenérgicos la disminuyen.

BIBLIOGRAFIA

- Abello, J., Robberecht, P., Damien, D., Tastenoy, M., Hooghe, R. y Christophe, J. (1989)**
Identification and properties of β -adrenergic receptors and VIP receptors in murine radiation leukemia virus-induced lymphomas. Second Forum on Peptides. 174: 147-150.
- Aggestrup, S., Uddman, R., Sundler, F., Fahrenkrug, J., Hakanson, R., Sorensen, H. y Hambræus, G. (1983)**
Lack of vasoactive intestinal polypeptide nerves in esophageal achalasia. Gastroenterology. 84: 924-927.
- Aghamirsalim, S., Baumgarten, C., Jahnke, V., Niedobitek, G. y Kunkel, G. (1991)**
Presence of vasoactive intestinal peptide receptors in nasal mucosa. Skin Pharmacol. 4: 213-219.
- Agui, T. y Matsumoto, K. (1990)**
Direct demonstration of guanine nucleotide sensitive receptors for vasoactive intestinal peptide in the anterior lobe of the rat pituitary gland. Peptides. 11: 609-611.
- Ahmed, C. E., Dees, W. L. y Ojeda, S. R. (1986)**
The immature rat ovary is innervated by vasoactive intestinal peptide (VIP)-containing fibers and responds to VIP with steroid secretion. Endocrinology. 118: 1682-1689.
- Ahren, B., Alumets, J., Ericsson, M., Fahrenkrug, L., Hakanson, R., Hedner, D., Loren, I., Melander, A., Rerup, C. y Sundler, F. (1980)**
VIP occurs in intrathyroidal nerves and stimulates thyroid hormone secretion. Nature 2: 751-754.
- Aliakbari, J., Sreedharan, S. P., Turck, C. W. y Goetzl, E. J. (1987)**
Selective localization of vasoactive intestinal peptide and substance P in human eosinophils. Biochem. Biophys. Res. Commun. 148: 1440-1445.
- Alm, P., Alumets, J., Hakanson, R. y Sundler, F. (1977)**
Peptidergic (VIP) nerves in the genito-urinary tract. Neuroscience 2: 751-754.
- Amenta, F., Cavallotti, C., Collier, W. L., Geppetti, P. y Ricci, A. (1989)**
Autoradiographic localization of vasoactive intestinal polypeptide receptors in the rat mesenteric vascular tree. Regul. Pept. 26: 9-17.
- Amiranoff, B., Laburthe, M. y Rosselin, G. (1980)**
Characterization of specific binding sites for vasoactive intestinal peptide in rat intestinal epithelial cell membranes. Biochim. Biophys. Acta. 627: 215-224.
- Anderson, P. O., Bloom, S. R., Mattiasson, A. y Uvelius, B. (1987)**
Vasodilatation and release of vasoactive intestinal polypeptide from the urinary bladder of the cat in response to pelvic nerve stimulation. J. Urol. 138: 671-673.
- Anteunis, A., Artesano, A., Portha, B., Hejblum, G. y Rosselin, G. (1989)**
Ultrastructural analysis of VIP internalization in rat B- and acinar cells *in situ*. Am. J. Physiol. 256: G689-G697.
- Attia, R. R., Ebeid, A. M., Murray, P. y Fischer, J. E. (1976)**
The placenta as a possible source of gut peptide hormones. Surg. Forum. 27: 432-434.
- Audigier, S., Barberis, C. y Jard, S. (1987)**
Vasoactive intestinal polypeptide increases inositol phospholipid breakdown in the rat superior cervical ganglion. Ann. NY Acad. Sci. 493: 579-581.
- Baldwin, C., Sasek, C. A. y Zigmond, R. E. (1991)**
Evidence that some preganglionic sympathetic neurons in the rat contain vasoactive intestinal peptide-like or peptide histidine isoleucine amide-like immunoreactivities. Neuroscience. 40: 175-184.
- Balemans, M. G. M., Pevet, P., Van Benthem, J., Haldar-Misra, C., Smith, I. y Hendriks, H. (1983)**
Day/night rhythmicity in the methylating capacities for different 5-hydroxyindoles in the pineal, the retina and the Harderian gland of the golden hamster (*Mesocricetus auratus*) during the annual seasons. J. Neur. Transm. 56: 53-72.
- Barajas, L., Sokolski, K. N. y Lechago, J. (1983)**
Vasoactive intestinal polypeptide-immunoreactive nerves in the kidney. Neurosci. Lett. 43: 263.
- Baraniuk, J. N. y Kaliner, M. (1991)**
Neuropeptides and nasal secretion. Am. J. Physiol. 261: L223-L235.
- Bardrum, B., Ottesen, B., Fahrenkrug, J. y Fuchs, A. R. (1988)**
Release of oxytocin and vasopressin by intracerebroventricular vasoactive intestinal peptide. Endocrinology. 123: 2249-2254.

- Barnette, M. S. y Weiss, B. (1985)**
Inhibition of calmodulin-stimulated phosphodiesterase activity by vasoactive intestinal peptide. J. Neurochem. 45:640-643.
- Bataille, D., Freychet, P. y Rosselin, G. (1974)**
Interactions of glucagon, gut glucagon, vasoactive intestinal polypeptide and secretin with liver and fat cell plasma membranes: binding to specific sites and stimulation of adenylate cyclase. Endocrinology 95: 713-721.
- Beed, E. A., O'Dorisio, T. M. y Gaginella, T. S. (1983)**
Demonstration of a functional receptor for vasoactive intestinal polypeptide on Molt 4b T-lymphoblast. Regul. Pept. 6: 1-12.
- Bell, G. I., Sanchez-Pescador, R., Laybourn, P. J. y Najarian, R. C. (1983)**
Exon duplication and divergence in the human pre-pro-glucagon gene. Nature. 304: 3 68-371.
- Bellido, L., López-González, M. A., Pedrera, C. y Lucas, M. (1994)**
Vasoactive intestinal peptide inhibits fMLP-induced respiratory burst in human lymphocytes. Life Scien. 54: 1909-1916.
- Benson, D. L., Isackson, P. J. y Jones, E. D. (1991)**
In situ hybridization reveals VIP precursor mRNA-containing neurons in monkey and rat neocortex. Mol. Brain Res. 9:169-174.
- Besson, J., Rotsztein, W., Laburthe, M., Epelbaum, J. y Rosselin, G. (1979)**
Vasoactive intestinal peptide (VIP): brain distribution, subcellular localization and effect of deafferentation of the hypothalamus in wale rats. Brain Res. 165: 79-85.
- Bevan, J. A. y Brayden, J. E. (1986)**
In vitro demonstration that vasoactive intestinal peptide is a cerebrovascular neurovasodilatador: technical difficulties and limitations of in vitro methodology. In: Neural Regulation of Brain Circulation. C. Owman and J. E. Hardebo (Eds.)1986 Elsevier Publishers B. V. (Biomedical Division).
- Binder, H. G., Lemp, G. F. y Gardner, J. D. (1980)**
Receptors for vasoactive intestinal peptide and secretin on small intestinal epithelial cells. Amer. J. Physiol. 238: G190-G196.
- Bjoro, T., Wiik, P., Opstad, P. K., Gautvik, K. M. y Haug, E. (1987)**
Binding and degradation of vasoactive intestinal peptide in prolactin-producing cultured rat pituitary tumour cells GH₄C₁. Acta Physiol. Scand. 130: 609-618.
- Blanco, A. C. y Silva, J. E. (1987)**
Intracellular conversion of thyroxine to triiodothyronine is required for the optimal thermogenic function of brown adipose tissue. Amer. Soc. Clin. Inv. 79: 295-300.
- Bloom, S. R., Polak, J. M. y Pearse, A. G. E. (1973)**
Vasoactive intestinal peptide and water-diarrhoea syndrome. Lancet 2: 14-16.
- Bodanszky, M., Klausner, Y. S. y Said, S. I. (1973)**
Biological activities of synthetic peptides corresponding to fragments of and to the entire secuencia of the vasoactive intestinal peptide. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 70: 382-384.
- Bodanszky, M., Klausner, Y. S., Lin, C. Y., Mutt, V. y Said, S. I. (1974)**
Synthesis of the vasoactive intestinal peptide (VIP). J. Amer. Chem. Soc. 96: 4973-4978.
- Bodner, M., Fridkin, M. y Gozes, I., (1985)**
Coding sequences for vasoactive intestinal peptide and PHM-27 peptide are located on two adjacent exons in the human genome. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82: 3548-3551.
- Bokoch, G. M., Katada, T., Northup, J. K., Ui, M. y Gilman, A. G. (1984)**
Purification and properties of the inhibitory guanine nucleotide-binding regulatory component of adenylate cyclase. J. Biol. Chem. 259: 3560-3567.
- Bondesson, L., Nordlind, K., Liden, S., Gafvelin, G., Theodorsson, E. y Mutt, V. (1991)**
Dual effect of vasoactive intestinal peptide (VIP) on leucocyte migration. Acta Physiol. Scand. 141: 477-481.
- Bourne, H. R., Sanders, D. A. y Mc Cormick, F. (1990)**
The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. Nature 348: 125-132.
- Brownschidle, C. M. y Niewenhuis, R. J. (1978)**
Ultrastructure of the Harderian gland in male albino rats. Anat. Rec. 190: 735-754.
- Broyart, J. P., Dupont, C., Laburthe, M. y Rosselin, G. (1981)**
Characterization of vasoactive intestinal peptide receptors in human colonic epithelial cells. J. Clin. Endocrinol. Metab. 52, 4: 715-721.

- Brugger, C., Satllwood, D. y Paul, S. (1991)**
Isolation of a low molecular weight vasoactive intestinal peptide binding protein. J. Biol. Chem. 266: 18358-18362.
- Bryman, I., Norström, A., Lindblom, B. y Dahiström, A. (1989)**
Histochemical localization of vasoactive intestinal polypeptide and its influence on contractile activity in the non-pregnant and pregnant human cervix. Gynecol. Obstet. Invest. 28: 57-61.
- Bubenik, G. A., Brown, G. M. y Grota, L. J. (1976)**
Immunohistochemical localization of melatonin in the rat Harderian gland. J. Histochem. Cytochem. 24: 1173-1177.
- Bucana, C. D. y Nadakavukaren, M. (1972a)**
Innervation of the hamster Harderian gland. Science. 175: 205-206.
- Bucana, C. D. y Nadakavukaren, M. (1972b)**
Fine structure of the hamster Harderian gland. Anatomie. 129: 178-187.
- Butler, J. M., Ruskell, G. L., Cole, D. F., Unger, W. G., Zhang, S. Q. y Blank, M. A. (1984)**
Effects of VIIth (facial) nerve degeneration on vasoactive intestinal polypeptide and substance P levels in ocular and orbital tissues of the rabbit. Experim. Eye Research. 39: 523-532.
- Buzzell, G. R. y Menendez-Pelaez, A. (1992)**
The inter-relationship between the Harderian glands and the neuroendocrine-thyroid axis in rodents. Porf. Met. Behav. Endoc. Effects. pp 255-270.
- Calvo, J.R., Guerrero, J.M., Molinero, P., Blasco, R. y Goberna, R. (1986a)** Interaction of vasoactive intestinal peptide (VIP) with human peripheral blood lymphocytes: specific binding and cyclic AMP production. Gen. Pharmac. 17: 185-189.
- Calvo, J.R., Molinero, P., Jimenez, J., Goberna, R. y Guerrero, J.M. (1986b)**
Interaction of vasoactive intestinal peptide (VIP) with rat lymphoid cells. Peptides. 7: 177-181.
- Calvo, J. R., Couvineau, A., Guijarro, L. y Laburthe, M. (1989)**
Solubilization and hidrodinamic characterization of guanine nucleotide sensitive vasoactive intestinal peptide-receptor complexes from rat intestine. Biochemistry 28: 1667-1672.
- Calvo, J. R., Morales, M. F., Mesa, J. C. y Goberna, R. (1990)**
Nucleotide regulation of vasoactive intestinal peptide binding to bovine thyroid plasma membranes. Biosc. Rep. 10: 519-525.
- Calvo, J.R., Guerrero, J.M., Lopez-Gonzalez, M.A, Osuna, C y Segura, J.J. (1994a)**
Characteristics of receptors for VIP in rat peritoneal macrophage membranes. Peptides. 15: 309-315.
- Calvo, J.R., Montilla, M.L., Guerrero, J.M. y Segura, J.J. (1994b)**
Expression of VIP receptors in mouse peritoneal macrophages: functional and molecular characterization. J. Neuroimmunol. 50: 85-93.
- Cardinali, D. P., Vacas, M. I. y Boyer, E. E. (1979)**
Specific binding of melatonin in bovine brain. Endocrinology. 105: 437-441.
- Carlquist, M., Mutt, V. y Jörnvall, H. (1979)**
Isolation and characterization of bovine vasoactive intestinal peptide. FEBS Lett. 108: 457-460.
- Carlquist, M., Mc Donald, T. J., Go, V.L., Bataille, D., Johansson, C. y Mutt, V. (1982)**
Isolation and aminoacid composition of human vasoactive intestinal polypeptide (VIP). Horm. Metabol. Res. 28-29.
- Carmena, M. J. y Prieto, J. C. (1983)**
Cyclic-AMP stimulating effect of vasoactive intestinal peptide in isolated epithelial cells of rat ventral prostate. Biochim. Biophys Acta 763: 414-418.
- Carmena, M. J. y Prieto, J. C. (1985)**
VIP binding to epithelial cell membranes of rat ventral prostate: effect of guanine nucleotides. Gen. Pharmac. 16: 495-500.
- Carmena, M. J., Hueso, C., Guijarro, L. G. y Prieto, J. C. (1991)**
Cholesterol modulation of membrane fluidity and VIP receptor / effector system in rat prostatic epithelial cells. Regul. Pept. 33: 287-297.
- Carmena, M. J., Clemente, C., Guijarro, L. G. y Prieto, J. C. (1992)**
The effect of streptozotocin diabetes on the vasoactive intestinal peptide receptor/effector system in membranes from rat ventral prostate. Endocrinology. 131: 1993-1998.

Carriere, R. (1985)

Ultrastructural visualization of intracellular porphyrin in the rat Harderian gland. Anat. Record. 213: 496-504.

Cogburn, L. A., Wilson-Placentra, S. y Letcher, L. R. (1987)

Influence of pinealectomy on plasma and extrapineal melatonin rhythms in young chickens (*Gallus domesticus*). Gen. Comp. Endocrinol. 68: 343-356.

Cohn, J. A. (1987)

Vasoactive intestinal peptide stimulates protein phosphorylation in a colonic epithelium cell line.

Am. J. Physiol. 253: G420-G424.

Couvineau, A., Rouyer-Fessard, C., Fournier, A., ST Pierre, S., Pipkorn, R. y Laburthe, M. (1984)

Structural requirements for VIP interaction with specific receptors in human and rat intestinal membranes: effect of nine partial sequences. Biochem. Biophys. Res. Commun. 121: 493-498.

Couvineau, A. y Laburthe, M. (1985a)

The rat liver vasoactive intestinal polypeptide binding site. Biochem. J. 225: 473-479.

Couvineau, A. y Laburthe, M. (1985b)

The human vasoactive intestinal peptide receptor: molecular identification by covalent cross-linking in colonic epithelium. J. Clin. Endocrinol. Metab. 61:50-55.

Couvineau, A., Rousset, M. y Laburthe, M. (1985)

Molecular identification and structural requirement of vasoactive intestinal peptide (VIP) receptors in the human colon adenocarcinoma cell line, HT29. Biochem. J. 231:139- 143.

Couvineau, A., Gammeltoft, S. y Laburthe, M. (1986a)

Molecular characteristics and peptide specificity of vasoactive intestinal peptide receptors from rat cerebral cortex. J. Neurochem. 47: 1469-1475.

Couvineau, A., Amiranoff, B. y Laburthe, M. (1986b)

Solubilization of the liver vasoactive intestinal peptide receptor. J. Biol. Chem. 261: 14482-14489.

Couvineau, A., Voisin, T. y Laburthe, M. (1990a)

Purification of vasoactive intestinal peptide receptor from porcine liver by a newly designed one-step affinity chromatography. J. Biol. Chem. 265: 13386-13390.

Couvineau, A., Rouyer-Fessard, C., Voisin, T. y Laburthe, M. (1990b)

Functional and immunological evidence for stable association of solubilized vasoactive intestinal peptide receptor and stimulatory guanine-nucleotide-binding protein from rat liver. Eur. J. Biochem. 187: 605-609.

Couvineau, A., Rouyer-Fessard, C., Darmoul, D., Maoret, J. J., Carrero, I., Ogier-Denis, E. y Laburthe, M. (1994)

Human intestinal Vip receptor: cloning and functional expression of two cDNA encoding proteins with different N-terminal domains. Bioch. and Bioph. Res. Comm., Vol. 200, No 2: 769-776.

Crantz, F. R. y Larsen, P. R. (1980)

Rapid thyroxine to 3,5,3', triiodothyronine conversion and nuclear 3,5,3', triiodothyronine binding in rat cerebral cortex and cerebellum. J. Clin. Invest 69: 935-938.

Crowe, R., Light, K., Chilton, C. P. y Burnstock, G. (1986)

Vasoactive intestinal polypeptide-, somatostatin-, and substance P-immunoreactive nerves in the smooth and striated muscle of the intrinsic external urethral sphincter of patients with spinal cord injury. J. Urol. 136: 487.

Cutz, E., Chan, W., Track, N. S., Goth, A. y Said, S.I. (1978)

Release of vasoactive intestinal peptide in mast cells by histamine liberators. Nature 275: 661-663.

Chakder, S. y Rattan, S. (1993)

Involvement of cAMP and cGMP in relaxation of internal anal sphincter by neural stimulation, VIP and NO. Am. J. Physiol. 264: G702-G707.

Chang, T., Roth, F. L., Tai, H. H. y Chey, W. Y. (1979)

Radioimmunoassay of vasoactive intestinal polypeptide. Analytical Biochem. 97: 286-297.

Chelbi-Alix, M. K., Boissard, C., Rosselin, G. y Thang, M. N. (1990)

Le peptide intestinal vasoactif induit la 2'5'oligoadénylate synthétase et l'état antiviral dans les cellules du cancer du colon HT-29. C. R. Acad. Sci. Paris. 310:147-153.

Chelbi-Alix, M. K., Boissard, C., Sripati, C. E., Rosselin, G. y Thang, M. N. (1991)

VIP induces in HT-29 cells 2'5'oligoadénylate synthetase and antiviral state via interferon beta/alpha synthesis. Peptides. 12: 1085-1093.

- Chelbi-Alix, M. K., Brouard, A., Boissard, C., Pelaprat, D., Rostene, W. y Thang, M. N. (1994)**
Induction by vasoactive intestinal peptide of interferon α /B synthesis in glial cells but not in neurons. J. Cell. Physiol. 158: 47-54.
- Chew, I. J., Karen, P., Murphy, D. y Carter, D. A. (1993)**
Osmotic stimuli attenuate vasoactive intestinal peptide gene expression in the rat anterior pituitary gland. Mol. and Cel. End. 92: 9-14.
- Chiba, T., Taminato, T., Kadowaki, S., Seino, Y., Matsukura, S. y Fujita, T. (1980)**
Effects of glucagon, secretin and vasoactive intestinal polypeptide on gastric somatostatin and gastrin release from isolated perfused rat stomach. Gastroenterology. 76: 67-71.
- Christophe, J., Conlon, T. P. y Gardner, J. D. (1976)**
Interaction of porcine vasoactive intestinal peptide with dispersed pancreatic acinar cells from guinea pig. J. Biol. Chem. 251: 4629-4634.
- Christophe, J., Waelbroeck, M., Chatelain, P. y Robberecht, P. (1984)**
Heart receptors for VIP, PHI and secretin are able to activate adenylate cyclase and to mediate inotropic and chronotropic effects. Species variations and physiopathology. Peptides. 5: 341-353.
- Christophe, J., Cauvin, A., Vervisch, E., Buscail, L., Abello, J., Gourlet, P. y Robberecht, P. (1990)**
VIP receptors in human SUP-T1 lymphoblasts. Digestion. 46: 148-155.
- Danek, A., O'Dorisio, M. S., O'Dorisio, T. M. y George, J. M. (1983)**
Specific binding sites for vasoactive intestinal polypeptide on nonadherent peripheral blood lymphocytes. J. Immunol. 131: 1173-1177.
- Dartt, D. A., Baker, A. K., Vaillant, C. y Rose, P. E. (1984)**
Vasoactive intestinal polypeptide stimulation of protein secretion from rat lacrimal gland acini. Amer. J. Physiol. 247: G502-G509.
- De La Fuente, M., Delgado, M., Del Río, M., Martínez, C., Hernanz, A. y Gomariz, R. P. (1993)**
Stimulation by vasoactive intestinal peptide (VIP) of phagocytic function in rat macrophages. Protein kinase C involvement. Regul. Pept. 48: 345-353.
- De La Fuente, M., Delgado, M., Del Río, M., Garrido, E., Leceta, J., Hernanz, A. y Gomariz, R. P. (1994)**
Vasoactive intestinal peptide modulation of adherence and mobility in rat peritoneal lymphocytes and macrophages. Peptides. 15: 1157-1163.
- De Meyts, P. (1976)**
Insulin and growth hormone receptors in human cultured lymphocytes and peripheral blood lymphocytes. Methods in receptor research I. Marcel Dekker, INC, New York, pp. 301-383.
- Del Cacho, E., Gallego, M., Felices, C. y Bascuas, J. A. (1991)**
Myofibroblasts and myoepithelial cells in the chicken Harderian gland. Hist. Histopathol. 6: 303-308.
- Del Cacho, E., Gallego, M., Felices, C. y Bascuas, J. A. (1993)**
Fibronectin synthesis in the Harderian gland of the chicken. Poultry Science. 72: 475-482.
- Denniss, A. R. y Young, J. A. (1978)**
Modification of salivary duct electrolyte transport in rat and rabbit by physalaemin, VIP, GIP and other enterohormone. Pflugers Archiv. 376: 73-80.
- Desbuquois, B. (1974)**
The interaction of vasoactive intestinal polypeptide and secretin with liver-cell membranes. Eur. J. Biochem. 46: 439-450.
- Dickinson, K. E. J., Schachter, M., Miles, C. M. M., Coy, D. H. y Sever, P. S. (1986a)**
Characterization of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) on renal function and plasma renin activity in the conscious rabbit. J. Physiol. 344: 379-388.
- Dickinson, K. E. J., Schachter, M., Miles, C. M. M., Coy, D. H. y Sever, P. S. (1986b)**
Characterization of vasoactive intestinal peptide (VIP) receptors in mammalian lung. Peptides. 7: 791-800.
- Dimaline, R., Peart, W. S. y Unwin, S. J. (1983)**
Effects of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) on renal function and plasma renin activity in the conscious rabbit. J. Physiol. 344: 379-388.
- Dimaline, R., Reeve, J. R., Shively, J. E. y Hawke, D. (1984)**
Isolation and characterization of rat vasoactive intestinal peptide. Peptides 5: 183-187.
- Djeridane, Y. (1992)**
The Harderian gland of desert rodents: a histological and ultrastructural study. J. Anat. 180: 465-480.

- Dodd, J., Kelly, J. S. y Said, S. I. (1979)**
Excitation of CA₁ neurons of the rat hippocampus by the octacosapeptide vasoactive intestinal peptide (VIP). Br. J. Pharmacol. 66: 125.
- Domschke, S., Domschke, W., Bloom, S. R., Mitznegg, P., Lux, G. y Strunz, U. (1978)**
Vasoactive intestinal peptide in man: pharmacokinetics, metabolic and circulatory effects. Gut. 19: 1049-1053.
- Du, B. H., Eng, J., Hulmes, J. D., Chang, M., Pan, Y. C. y Yalow, R. S. (1985)**
Guinea pig has a unique mammalian VIP. Biochem. Biophys. Res. Commun. 128: 1093-1096.
- Dupont, C., Gespach, C., Chenut, B. y Rosselin, G. (1980)**
Regulation by vasoactive intestinal peptide of cyclic AMPc accumulation in gastric epithelial gland: a characteristic of human stomach. FEBS Lett. 113: 25.
- Dupont, C., Broyart, J. P., Broer, Y., Chenut, B., Laburthe, M. y Rosselin, G. (1981)**
Importance of the vasoactive intestinal peptide receptor in the stimulation of cyclic adenosine 3'-5'-monophosphate in gallbladder epithelial cells of man. Comparison with the guinea pig. J. Clin. Invest. 67: 742-752.
- Ebling, F. J., Ebling, E., Randall, V. y Skinner, J. (1975)**
The effects of hypophysectomy and of bovine growth hormone on the responses to testosterone of prostate, preputial, Harderian and lachrymal glands and of brown adipose tissue in the rat. J. Endocrinol. 66: 401-406.
- Eedy, D. J., Shaw, C., Armstrong, E. p., Jonston, C. F. y Buchanan, K. D. (1990)**
VIP and PHM in human eccrine sweat glands: demonstration of innervation, specific binding sites and presence in secretions. Br. J. Dermatol. 123: 65-76.
- El Battari, A., Martin, J. M., Luis, J., Pouzol, O., Secchi, J., Marvaldi, J. y Pichon, J. (1988)**
Solubilization of the active vasoactive intestinal peptide receptor from human colonic adenocarcinoma cells. J. Biol. Chem. 33: 17685-17689.
- Elgavish, A., Pillion, D. J. y Meezan, E. (1989)**
Evidence for vasoactive intestinal peptide receptors in apical membranes from tracheal epithelium. Life Scien. 44: 1037-1042.
- Enzmann, V. y Drössler, K. (1994)**
Immunohistochemical detection of substance P and vasoactive intestinal peptide fibres in the auricular lymph nodes of sensitized guinea pigs and mice. Acta Histochem. 96:15- 18.
- Ercal, N., O'Dorisio, M. S., Vinik, A., O'Dorisio, T. M. y Kadrofske, M. (1988)**
Vasoactive intestinal peptide receptors in human platelet membrane. Ann. NY Acad. Sci. 527: 663-666.
- Eriksson, M., Hökfelt, T., Prosloncec, B. y Uvnäs-Moberg, K. (1988)**
Release of vasoactive intestinal peptide in response to suckling. Ann. NY Acad. Sci. 527: 631-632.
- Ernström, U., Gafvelin, G. y Mutt, V. (1995)**
Rescue of thymocytes from cell death by vasoactive intestinal peptide. Regul. Pept. 57: 99-104.
- Etgen, A. M. y Browing, E. T. (1983)**
Activators of cyclic adenosine 3':5'-monophosphate accumulation in rat hippocampal slices: action of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) in human cerebrospinal fluid. Brain. Res. 124: 581-584.
- Fahrenkrug, J. (1980)**
Vasoactive intestinal polypeptide. Trends Neurosc. 1: 1-2.
- Fahrenkrug, J., Ottesen, B. y Palle, C. (1988)**
Vasoactive intestinal polypeptide and the reproductive system. Ann. NY Acad. Sci. 527: 393-404.
- Fehér, E. y Burnstock, G. (1987)**
Ultrastructural identification of vasoactive intestinal polypeptide and neuropeptide Y-containing nerve fibers in the vas deferents of the guinea pig. J. Auton. Nerv. Syst. 19:235.
- Feliú, J. E., Mojena, M., Silvestre, R. A., Monje, L. y Marco, J. (1983)**
Stimulatory effect of vasoactive intestinal peptide on glycogenolysis and gluconeogenesis in isolated rat hepatocytes: antagonism by insulin. Endocrinology 112: 2120-2127.
- Felten, D. L., Felten, S. Y., Carlson, S. L., Olschowka, J. A. y Livnat, S. (1985)**
Noradrenergic and peptidergic innervation of lymphoid tissue. J. Immunol. 135: 755s-765s.
- Feria-Velasco, A., Melendez, C. y Jaramillo, J. (1983)**
Sex differences in secretion pattern of neonatal rat Harderian gland under various environmental lighting conditions. Comp. Biochem. Physiol. 74B: 709-714.
- Finch, R. J., Sreedharan, S. P. y Goetzl, E. J. (1989)**
High affinity receptors for vasoactive intestinal peptide on human myeloma cells. J. Immunol. 142: 1977-1981.

- Frandsen, E. K. y Mooday, A. J. (1973)**
Lipolytic action of a newly isolated vasoactive intestinal polypeptide. Horm. Metab. Res. 5: 196-199.
- Frandsen, E. K., Krishna, G. A. y Said (1978)**
Vasoactive intestinal polypeptide promotes cyclic adenosine 3'-5'-monophosphate accumulation in guinea pig trachea. Br. J. Pharmac. 62: 367-369.
- Freychet, P. (1976)**
Interaction of polypeptides hormones with cell membrane specific receptors: studies with insulin and glucagon. Diabetologia. 12: 83-105.
- Fry, D. C., Madison, V. S., Bolin, D. R., Greeley, D. N., Toome, V. y Wegrzynski, B. B. (1989)**
Solution structure of an analogue of vasoactive intestinal peptide as determined by two-dimensional NMR and circular dichroism spectroscopies and constrained molecular dynamics. Biochem. 28: 2399-2409.
- Fujii, S., Kobayashi, S., Fujita, T. y Yanaihara, N. (1980)**
VIP-immunoreactive nerves in the pancreas of the snake, *Elaphe quadrivirgata* (boie): another model for insular neurosecretion. Biomed. Res. 1: 180-184.
- Gaginella, T. S. y O'Dorisio, T. M. (1979)**
vasoactive intestinal polypeptide: neuromodulator or intestinal secretion?
Mechanism of intestinal secretion. Alan R. Liss, Inc. 150 Fifth avenue, New York, NY.
- Gagnon A. W., Aiyar, N. y Elshourbagy, N. A. (1994)**
Molecular cloning and functional characterization of a human liver vasoactive intestinal peptide receptor. Cell. Sign. Vol. 6, No 3: 321-333.
- Gajkowska, B. y Viron, A. (1991).**
Ultrastructural evidence for endogenous vasoactive intestinal peptide-like immunoreactivity in neurohypophysis. Neuroendocrinol. Lett. 13: 387-391.
- Galbo, H., Hilsted, J., Fahrenkrug, J. y Schaffalitzky de Muckadell, O. B. (1979)**
Fasting and prolonged exercise on vasoactive intestinal polypeptide in plasma. Acta Physiol. Scand. 105: 374-377.
- Gardiner, J. E., Heliman, K. y Thompson, J. W. (1962)**
The nature of the innervation of the smooth muscle, Harderian gland and blood vessels of the cat's nictitating membrane. J. Physiol. 163: 436-456.
- Gauquelin, G., Gharib, C., Ghaemmaghami, F., Allevard, A., Cherbal, F., Geelen, G., Bouzeghrane, F. y LeGros, J. (1988)**
A day/night rhythm of vasopressin and oxytocin in rat retina, pineal and Harderian gland. Peptides. 9: 289-293.
- Gawler, D., Milligan, G., Spiegel, A. M., Unson, C. G. y Houslay, M. D. (1987)**
Abolition of the expression of inhibitory guanine nucleotide regulatory protein Gi activity in diabetes. Nature. 327: 229-232.
- Georg, B., Wulff, B. S. y Fahrenkrug, J. (1994)**
Characterization of the effects of retinoic acid on vasoactive intestinal polypeptide gene expression in neuroblastoma cells. Endocrinology Vol. 135, No.4: 1455-1459.
- Gespach, C., Hui Bon Hoa, D. y Rosselin, G. (1983)**
Regulation by vasoactive intestinal peptide, histamine, somatostatin-14 and -28 of cyclic adenosine monophosphate levels in gastric glands isolated from the guinea pig fundus or antrum. Endocrinology. 112: 1597-1983.
- Giachetti, A., Goth, A. y Said, S. I. (1978)**
Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) in rabbit platelets and rat mast cells. Fed. Proc. 37: 687-690.
- Giachetti, A. y Said, S. I. (1979)**
Axonal transport of vasoactive intestinal peptide in sciatic nerve. Nature. 281: 574-575.
- Giladi, E., Shani, Y. y Gozes, I. (1990)**
The complete structure of the rat VIP gene. Mol. Brain Res. 7: 261-267.
- Gilman, A. G. (1987)**
G proteins: transducers of receptor-generated signals. Ann. Rev. Biochem. 56: 615-649.
- Goetzl, E. J., Sreedharan, S. P. y Turck, C. W. (1988)**
Structurally distinctive vasoactive intestinal peptides from rat basophilic leukemia cells. J. Biol. Chem. 263: 9083-9086.

- Goldstein, A. L., Low, T. L., McAdoo, M., McClure, J., Thurman, G. B., Rossio, J. L., Lay, C. Y., Chang, D., Wang, S. S., Harvey, C., Ramel, A. H. y Meienhofer, J. (1977)
Thymosin $\alpha 1$: isolation and sequence analysis of an immunologically active thymic polypeptide. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74: 725-729.
- Gomariz, R. P., Lorenzo, M. J., Cacicedo, L., Vicente, A. y Zapata, G. (1990)
Demonstration of immunoreactive-VIP and -somatostatin in rat thymus. Brain Behav. Immun. 4: 151-161.
- Gomariz, R. P., Delgado, M., Naranjo, J. R., Mellström, B., Tormo, A., Mata, F. y Leceta, J. (1993)
VIP gene expression in rat thymus and spleen. Brain Behav. Immun. 7: 271-278.
- Gomariz, R. P., Leceta, J., Garrido, E., Garrido, T. y Delgado, M. (1994)
Vasoactive intestinal peptide (VIP) mRNA expression in rat T and B lymphocytes. Regul. Pept. 50: 177-184.
- Gozes, I., Bodner, M., Shani, Y. y Fridkin, M. (1986)
Structure and expression of the vasoactive intestinal peptide (VIP) gene in a human tumor. Peptides. 7: 1-6.
- Gozes, I., Nakai, H. y Byers, M. (1987)
Sequential expression in the nervous system of the VIP and c-myc genes located on the human chromosomal region 6q24. Somatic. Cell. Mol. Gen. 13: 305-313.
- Gozes, I. y Brenneman, D. E. (1989)
VIP: molecular biology and neurobiological function. Mol. Neurobiol. 3: 201-236.
- Greene, E. C. (1935)
Anatomy of the rat. Amer. Philos. Soc. 27: 1-370.
- Grider, J. R. y Rivier, J. R. (1990)
Vasoactive intestinal peptide (VIP) as transmitter of inhibitory motor neurons of the gut: evidence from the use of selective VIP antagonist and VIP antiserum. J. Phar. Exp. Ther. 253: 738-742.
- Guerrero, J. M., Prieto, J. C., Elorza, F. L., Ramirez, R. y Goberna, R. (1981)
Interaction of vasoactive intestinal peptide with human blood mononuclear cells. Mol. Cell. Endocrinol. 21: 151-160.
- Guerrero, J. M., Prieto, J. C., Calvo, J. R. y Goberna, R. (1984)
Activation of cyclic AMP-dependent protein-kinase by VIP in blood mononuclear cells. Peptides 5: 371-373.
- Guerrero, J. M., Calvo, J. R., Garrido, M. R., Molinero, P., Osuna, C., Jiménez, J. y Goberna, R. (1986)
Vasoactive intestinal peptide (VIP) binding to solubilized material from rat liver plasma membranes. Biosc. Reports. Vol. 6 No 1: 39-43.
- Guerrero, J.M., Puig-domingo, M., Vaughan, G.M. y Reiter, R.J. (1987) Characterization of type II thyroxine 5'-deiodinase activity in rat Harderian gland. Life Scien. 41:1179-1185.
- Guerrero, J.M., Gonzalez-Brito, A., Santana, C. y Reiter, R.J. (1989)
Nocturnal increase of type II thyroxine 5'-deiodinase activity in the Syrian hamster Harderian gland is abolished by light exposure and induced by isoproterenol. Soc. Exp.Biol. Med. 190: 186-189.
- Guerrero, J.M.; Santana, C. y Reiter, R.J. (1990a)
In vivo stimulation of rat pineal type II thyroxine 5'-deiodinase activity by either norepinephrine or isoproterenol. Soc. Exp.Biol. Med. 194: 327-331.
- Guerrero, J.M.; Santana, C. y Reiter, R.J. (1990b)
Type II thyroxine 5'-deiodinase activity in the rat brown adipose tissue, pineal gland, Harderian gland and cerebral cortex: effect of acute cold exposure and lack of relationship to pineal melatonin synthesis. J. Pineal. Res. 9: 159-166.
- Guijarro, L.G.; Couvineau, A., Calvo, J. R. y Laburthe, M. (1989)
Solubilization of active and stable receptors for vasoactive intestinal peptide from rat liver. Regul. Pept. 25: 37-50.
- Guijarro, L.G., Rodriguez-Pena, M.S. y Prieto, J.C. (1991)
Characterization of vasoactive intestinal peptide receptors in rat seminal vesicle. Am. J. Physiol. 260: E286-E291.
- Guillemin, R., Brazeau, P., Bohlen, P., Esch, F., Ling, N. y Webrenberg, W. B. (1982)
Growth hormone-releasing factor from a human pancreatic tumour that caused acromelagy. Science. 218: 585-587.
- Gustafsson, J. A. y Pousette, A. (1975)
Demonstration and partial characterization of cytosol receptors for testosterone. Biochem. 14: 3094-3101.

- Hakanson, R., Sundler, F. y Uddman, R. (1982)**
Distribution and topography of peripheral VIP nerve fibers: functional implications. In: Said, S.I., ed. Vasoactive Intestinal Peptide, New York: Raven. 1982:121-144.
- Hansson, E. y Ronnback, L. (1988)**
Interaction between catecholamines and vasoactive intestinal peptide in cultured astrocytes. Neuropharmacology. 27: 295-300.
- Hartschuh, W., Reinecke, W., Weihe, E. y Yanahara, W. (1984)**
VIP-immunoreactivity in the skin of various mammals. Immunohistochemical, radioimmunological and experimental evidence for a dual localization in cutaneous nerves and Merckel cells. Peptides. 5: 239-245.
- Heinz-Erian, P., Dey, R. D. y Said, S. I. (1985)**
Deficient vasoactive intestinal peptide innervation in sweat glands of cystic fibrosis patients. Science 229: 1407-1409.
- Hernandez, D. E., Jennes, C. y Emerick, S. G. (1987)**
Brain vasoactive intestinal peptide: a potent stimulant of gastric acid secretion. Brain. Res. 420: 129-134.
- Hildebrandt, J. D., Codina, J., Risinger, R. y Birnbaumer, C. (1984)**
Identification of subunit associated with adenylyl cyclase regulatory proteins N_i and N_j . J. Biol. Chem. 259: 2039-2043.
- Hirata, Y., Tomita, M., Takata, S. y Fujita, T. (1985)**
Functional receptors for vasoactive intestinal peptide in cultured vascular smooth muscle cells from rat aorta. Biochem. Biophys. Res. Commun. 132: 1079-1087.
- Hoffman, R. A. (1971)**
Influence of some endocrine glands, hormones and blinding on the histology and porphyrins of the Harderian gland of golden hamsters. Am. J. Anat. 132: 463-478.
- Hoffman, R. A. y Jones, J. W. (1981)**
Concentration of metals in the Harderian glands of male and female hamsters. Comp. Biochem. Biophys. 69A: 153-156.
- Hoffman, R. A., Johnson, L. B. y Reiter, R. J. (1985)**
Harderian gland of golden hamsters: temporal and sexual differences in immunoreactive melatonin. J. Pineal Res. 2: 161-168.
- Hoffman, R. A., Wertz, P. y Habeeb, P. (1989)**
Harderian glands of golden hamsters: morphological and biochemical responses to thyroid hormones. J. Comp. Physiol. B159: 293-299.
- Hoffman, R. A., Habeeb, P. y Buzzell, G. R. (1990)**
Further studies on the regulation of the Harderian glands of golden hamsters by the thyroid gland. J. Comp. Physiol. B160: 269-275.
- Hoh, J. H., Lin, W. L. y Nadakavukaren, M. J. (1984)**
Sexual dimorphism in the Harderian gland proteins of the golden hamster. Comp. Biochem. Physiol. 77 B: 269-275.
- Hökfelt, T., Schultzberg, M., Lundberg, J. M., Fuxe, J., Mutt, V., Fahrenkrug, J. y Said, S. I. (1982)**
Distribution of vasoactive intestinal polypeptide in the central and peripheral nervous systems as revealed by immunocytochemistry. Vasoactive intestinal peptide, Ed. Said, S. I., New York, Raven Press, p. 65.
- Hoshino, M., Yanahara, C., Hong, Y. M., Kishida, S., Katsumaru, Y., Vandermeers, A., Vandermeers-Piret, M. C., Robberecht, P., Christophe, J. y Yanahara, N. (1984)**
Primary structure of helodermin, a VIP-secretin-like peptide isolated from Gila monster venom. FEBS Lett. 178: 233-239.
- Hsu, D. W., Riskind, P. N. y Hedley-Whyte, E. T. (1989)**
Vasoactive intestinal peptide in the human pituitary gland and adenomas. Am. J. Pathol. 135: 329-338.
- Huang, M. y Rorstad, O. P. (1987)**
VIP receptors in mesenteric and coronary arteries: a radioligand binding study. Peptides. 8: 477-485.
- Hueso, C., Carmena, M. J. y Prieto, J. C. (1989)**
Identification of specific binding sites for vasoactive intestinal peptide in rat testis Leydig cells and study of developmental changes. Biochem. Int. 16: 951-958.
- Hugo, J., Krijt, J., Vokurka, M. y Janousek, V. (1987)**
Secretory response to light in rat Harderian gland: possible photoprotective role of Harderian porphyrin. Gen. Physiol. Biophys. 6: 401-404.

- Huhtala, A., Huikuri, K. T., Palkama, A. y Tervo, T. (1977)**
Innervation of the rat Harderian gland by adrenergic and cholinergic nerve fibers. Anat. Rec. 188: 263-272.
- Ichikawa, S., Sreedharan, S. P., Goetzl, E. J. y Owen, R. L. (1994)**
Immunohistochemical localization of peptidergic nerve fibers and neuropeptide receptors in Peyer's patches of the cat ileum. Regul. Pept. 54: 385-395.
- Inoue, Y., Kaku, K., Kaneko, T., Yanaihara, N. y Kanno, T. (1985)**
Vasoactive intestinal peptide binding to specific receptors on rat parotid acinar cells induces amylase secretion accompanied by intracellular accumulation of cyclic adenosine 3'-5'-monophosphate. Endocrinology 116: 686-692.
- Ipp, E., Dobbs, R. E. y Unger, R. H. (1978)**
Vasoactive intestinal peptide stimulates pancreatic somatostatin release. FEBS Lett. 90: 76-78.
- Ishihara, T., Shigemoto, R., Mori, K., Takahasni, K. y Nagata, S. (1992)**
Functional expression and tissue distribution of a novel receptor for vasoactive intestinal polypeptide. Neuron. Vol. 8,: 811-819.
- Itoh, N., Obata, K., Yanaihara, N. y Okamoto, H. (1983)**
Human preprovasoactive intestinal polypeptide contains a novel PHI-27-like peptide, PHM-27. Nature. 304: 547-549.
- Itoh, S. y Yoshikawa, K. (1985)**
Antidipsogenic action of vasoactive intestinal peptide in the rat. Neuropharmacol. 24: 793-795.
- Izzo, R. S., Scipione, R. A., Pellechia, C. y Lokchander, R. S. (1991)**
Binding and internalization of VIP in rat intestinal epithelial cells. Regul. Pept. 33:21-30.
- Jackson, A. H. D., Kenner, G. W., Smith, K. M. y Suckling, C. J. (1976)**
Pyrroles and related compounds. XXXVII. Harderoporphyrin. Tetrahedron. 32: 2757-2762.
- Jin, J. G., Murthy, K. S., Grider, J. R. y Makhlof, G. M. (1993)**
Activation of distinct cAMP-and-cGMP-dependent pathways by relaxant agents in isolated gastric muscle cells. Am. J. Physiol. 264: G470-G477.
- Joborn, H., Larsson, R., Rastad, J., Nygren, P., Akerstrom, G. y Ljunghall, S. (1991)**
Vasoactive intestinal polypeptide stimulates parathyroid hormone release by interaction with cyclic adenosine monophosphate production of bovine parathyroid cells. Acta Endocrinol. 124: 54-59.
- Johnston, J. A., Taub, D. D., Lloyd, A. R., Conlon, K., Oppenheim, J. J. y Kevlin, D. J. (1994)**
Human T lymphocyte chemotaxis and adhesion induced by vasoactive intestinal peptide. J. Immunol. 153: 1762.
- Kaku, K., Inoue, Y., Matsutani, A., Okubo, M., Hatao, K., Kaneko, T. y Yanaihara, N. (1983)**
Receptors for vasoactive intestinal polypeptide on rat dispersed pineal cells. Biomed. Res. 4: 321-328.
- Kameda, Y. (1989)**
Distribution of CGRP-, somatostatin-, galanin-, and substance P-immunoreactive nerve fibers in the chicken carotid body. Cell Tissue Res. 257: 623-629.
- Kaplan, M. M. (1980)**
Thyroxine 5'-monodeiodination in rat anterior pituitary gland homogenate. Endocrinology. 106: 567-576.
- Kaplan, M. M. (1984)**
The role of thyroid hormone deiodination in the regulation of hypothalamo-pituitary function. Neuroendocrinology. 38: 254-260.
- Kaplan, M. M., Pan, C., Gordon, P. R., Lee, J. y Gilchrest, B. A. (1988)**
Human epidermal keratinocytes in culture convert thyroxine to 3,5,3'-triiodothyronine by type II iodothyronine deiodination: a novel endocrine function of the skin. J. Clin. Endocrinol. Metab. 66: 3815-822.
- Kasson, B. G., Lim, P. y Hsueh, J. W. (1986)**
Vasoactive intestinal peptide stimulates androgen biosynthesis by cultured neonatal testicular cells. Mol. Cell. Endocrinol. 48: 21-29.
- Kastin, A. J., Coy, D. H., Schally, A. V. y Meyers, L. A. (1978)**
Activity of VIP, somatostatin and others peptides in the mouse vas deferens assay. Pharmac. Biochem. Behav. 9: 673-676.
- Katada, T., Oinuma, M. y Ui, M. (1986)**
J. Biol. Chem. 261: 5215-5221.

- Keltz, T. N., Straus, E. y Yalow, R. S. (1980)**
Degradation of vasoactive intestinal polypeptide by tissue homogenates.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 92: 669-674.
- Kennedy, G. Y. (1970)**
Harderoporphyryn: A new porphyrin from the Harderian gland of the rat.Comp. Biochem. Physiol. 36: 21-36.
- Kerins, C. y Said, S. I. (1973)**
Hiperglycemic and glycogenolytic effects of vasoactive intestinal polypeptide.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 142: 1014-1017.
- Klarskov, P., Gerstenberg, T. y Hald, T. (1984)**
Vasoactive intestinal polypeptide influence on lower urinary tract smooth muscle from human and pig.
J. Urol. 131: 1000.
- Komisaruk, B. R., Banas, C., Heller, S. B., Whipple, N., Barbato, G. F. y Jordan, F. (1988)**
Analgesia produced by VIP administered directly to the spinal cord in rats.
Ann. NY. Acad. Sci. 527: 650-654.
- Kondo, H. y Yui, R. (1982)**
An electron microscopic study on VIP like-immunoreactive nerve fibers in the celiac ganglion of guinea pig.Brain Res. 237: 227-231.
- Konturek, S. J., Thor, P., Dembiski, A. y Krol, R. (1975)**
VIP: comparison with secretin for potency and spectrum of physiologic action.Gastrointestinal Hormones (Eds. Thompson, J. C. University Texas Press, Austin y Londres) pp. 611-633.
- Korinek, J. K., Toft, D. O., Go, V. L. W. y Dousa, T. P. (1979)**
The differential cellular effects of VIP and glucagon on hepatic glucose release.Gastroenterol. 76: 1175-1180.
- Kosaka, T., Kosaka, K., Tateishi, K., Hamaoka, Y., Yanaihara, H., Wu, J. Y. y Hama, K. (1985)**
GABAergic neurons containing CCK-8-like and/or VIP-like immunoreactivities in the rat hippocampus and dentate gyrus.J. Comp. Neurol. 239: 420-430.
- Krejs, G. J., Frdran, J. S., Bloom, S. R., Fahrenkrug, J., Schaffalitzky De Muckadell, O. B., Fischer, J. E., Humphrey, C. S., O'Dorisio, T. M., Said, S. I., Walsh, J. H. y Shulkes, A. A. (1980)**
Effect of VIP infusion on water and ion transport in the human jejunum.Gastroenterol. 78: 722-727.
- Laburthe, M., Bataille, D. y Rosselin, G. (1977)**
Vasoactive intestinal peptide (VIP): variation of the jejuno-ileal content in developing rat as measured by radio receptor assay.Acta Endocrinol. 84: 588-589.
- Laburthe, M., Rousset, M., Boissard, C., Chevalier, G., Zweibaum, A. y Rosselin, G. (1979a)**
Vasoactive intestinal peptide: a potent stimulator of adenosine 3': 5'-cyclic monophosphate accumulation in gut carcinoma cell lines in culture.Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 75: 2772-2775.
- Laburthe, M., Prieto, J. C., Aminanoff, B., Dupont, C., Hui Bon Hoa, I. y Rosselin, G. (1979b)**
Interaction of vasoactive intestinal peptide with isolated intestinal epithelial cells from rat. 2. Characterization and structural requirements of the stimulatory effect of vasoactive intestinal peptide on production of adenosine 3'-5'-cyclic monophosphate.Eur. J. Biochem. 96: 239-248.
- Laburthe, M., Mangeat, P., Marchis-Mouren, G. y Rosselin, G. (1979c)**
Activation of cyclic AMP-dependent protein kinases by vasoactive intestinal peptide (VIP) in isolated intestinal epithelial cells from rat.Life Sci. 25: 1931-1938.
- Laburthe, M., Boissard, G., Chevalier, G., Zweibaum, A. y Rosselin, G. (1981)**
Peptide receptors in human lung tumor cells in culture: vasoactive intestinal peptide (VIP) and secretin interaction with the Calu-1 and SW-900 cell lines.Regul. Pept. 2: 219-230.
- Laburthe, M., Breant, B. y Rouyer-Fessard, C. (1984)**
Molecular identification of receptors for vasoactive intestinal peptide in rat intestinal epithelium by covalent cross-linking. Eur. J. Biochem. 139:181-187.
- Laburthe, M. (1985)**
Le peptide intestinal vasoactif (VIP): un neuropeptide ubiquitaire membre d'une famille structurale de peptides regulateurs.Biochimie 67: 11-17.
- Laburthe, M., Chenut, B., Rouyer-Fessard, C., Tatemoto, K., Couvineau, A., Servin, A. y Amiranoff, B. (1986)**
Interaction of peptide YY with rat intestinal epithelial plasma membranes: binding of the radioiodinated peptide.Endocrinology. 118, 5: 1910-1917.

- Laburthe, M. y Couvineau, A. (1988)**
Molecular analysis of vasoactive intestinal peptide receptors. A comparison with receptors for VIP-related peptides. Ann. NY Acad. Sci. 527:296-313.
- Lacey, C. B., Elde, R. P. y Seybold, V. (1991)**
Localization of vasoactive intestinal peptide binding sites in the thymus and bursa of Fabricius of the chick. Peptides. 12: 383-381.
- Laemmlli, V.K. (1970)**
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature Lond. 227:680-685.
- Lagunoff, D. (1972)**
Contributions of electron microscopy to the study of mast cells. J. Invest. Derm. 58: 296-311.
- Larsen, J. J., Boeck, V. y Ottesen, B. (1981)**
Effect of vasoactive intestinal polypeptide on cerebral blood flow in the goat. Acta Physiol.Scand. 111: 471-474.
- Larsson, L. I., Fahrenkrug, J., Schaffalitzky de Muckadell, O. B., Sundler, F., Hakanson, R. y Rehfeld, J. F. (1976)**
Localization of vasoactive intestinal peptide (VIP) to central and peripheral neurons. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73: 3197-3200.
- Larsson, L. I., Fahrenkrug, J. y Schaffalitzky de Muckadell, O. B (1977)**
Vasoactive intestinal polypeptide occurs in nerves of the female genitourinary tract. Science. 197: 1374-1375.
- Larsson, L. I., Fahrenkrug, J., Holst, J. J. y Schaffalitzky de Muckadell, O. B (1978)**
Innervation of the pancreas by VIP immunoreactive nerves. Life Scien. 22: 773-780.
- Larsson, O., Detsch, T. y Fredhoan, B. B. (1988)**
VIP and forskolin enhance carbachol-induced K⁺ efflux from rat salivary gland fragments by Ca²⁺-sensitive mechanism. J. Biol. Chem. 266: 11366-11371.
- Le Meuth, V., Farjaudon, N., Bawab, W., Chastre, E., Rosselin, G., Guilloteau, P. y Gespach, C. (1991)**
Characterization of binding sites for VIP-related peptides and activation of adenylate cyclase in developing pancreas. Amer. J. Physiol. 260 (Gastrointes. Liver Physiol. 23): G265-G274.
- Leonard, J. L. y Rosenberg, I. N. (1978)**
Thyroxine 5'-deiodinase activity of rat kidney: observations on activation by thiols and inhibition by propylthiouracil. Endocrinology. 103: 2137-2144.
- Leonard, J. L., Mellen, S. A. y Larsen, P. R. (1982)**
Thyroxine 5'-deiodinase activity in brown adipose tissue. Endocrinology. 112: 1153-1155.
- Leonard, J.L. (1990)**
Identification and structure analysis of iodothyronine deiodinases. The thyroid Gland, M.A. Greer (ed.), New York: Raven Press. 285-305.
- Lin, W. L. y Nadakavukaren, M. J. (1979)**
The androgenic effect on the fine structure of the Harderian gland in the male hamster. Cell Tissue Res. 198: 119-127.
- Lin, W. L. y Nadakavukaren, M. J. (1981)**
Harderian gland lipids of male and female golden hamsters. Comp. Biochem. Physiol. 70B: 627-630.
- Lin, W. L. y Nadakavukaren, M. J. (1982)**
Aminolevulinatase synthase activity in the Harderian glands of male and female golden hamsters (*Mesocricetus auratus*). Comp. Biochem. Physiol. 71B: 539-540.
- Linnoila, R. I., Diagustine, R. P., Hervonen, A. y Miller, R. J. (1980)**
Distribution of (met⁵)- and (leu⁵)-enkephalin-, vasoactive intestinal polypeptide- and substance P-like immunoreactivities in human adrenal glands. Neuroscience. 5:2247-2259.
- Litwin, D. K., Wilson, A. K. y Said, S. I. (1992)**
Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) inhibits rat alveolar macrophage phagocytosis and chemotaxis in vitro. Regul. Pept. 40: 63-74.
- López-González, M. A., Guerrero, J. M. y Lucas, M. (1992)**
Vasoactive intestinal peptide enhances phorbol myristate acetate-induced chemiluminescence in human lymphocytes. Life Scien. 51: 1803-1810.

- López-González, M. A. y Lucas, M. (1994)**
Priming effect of vasoactive intestinal peptide on the respiratory burst of neutrophils non-mediated by plasma membrane receptors. *Experientia*. 50.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J. (1951)**
Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
- Luine, V. N., Rostene, W., Rhodes, J. y McEwen, B. S. (1984)**
Activation of choline acetyltransferase by vasoactive intestinal peptide. *J. Neurochem.* 42: 1131-1134.
- Luis, J., Martin, J. M., El Battari, A., Marvaldi, J. y Pichon, J. (1988)**
The vasoactive intestinal peptide (VIP) receptor: recent data and hypothesis. *Biochimie* 70: 1311-1322.
- Luis, J., Martin, J. M., El Battari, A., Reynier, M., Marvaldi, J. y Pichon, J. (1989)**
A human melanoma-derived cell line (IGR39) with a very high number of vasoactive intestinal peptide (VIP) receptors. 1. Molecular characterization of the binding site. *Eur. J. Biochem.* 180: 429-433.
- Lundberg, J. M., Hokfelt, T., Nilsson, G., Petterson, G., Kewenter, J., Ahlman, H., Edin, R., Dahlstrom, A., Terenius, L. y Said, S. I. (1979)**
Substance P-, VIP-, and enkephalin-like immunoreactivity in the human vagus nerve. *Gastroenterology*. 77: 468-471.
- Lundberg, J. M., Anggard, A. y Fahrenkrug, J. (1981)**
Complementary role of vasoactive intestinal peptide (VIP) and acetylcholine for cat submandibular gland blood flow and secretion. *Acta Physiol. Scand.* 113: 317-327.
- Lutz, E. M., Sheward, W. J., West, K. M., Morrow, J. A., Fink, G. y Harmar, A. J. (1993)**
The VIP receptor: molecular characterization of a cDNA encoding a novel receptor for vasoactive intestinal peptide. *FEBS Lett.* Vol. 334, No 1: 3-8.
- Lygren, I., Revhaug, A., Burhol, P. G., Giercksky, K. E. y Jenssen, T. G. (1984)**
Vasoactive intestinal polypeptide and somatostatin in leukocytes. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 44: 347-351.
- Magistretti, P. J., Morrison, J. H., Shoemaker, W. H., Sapin, V. y Bloom, F. E. (1981)**
Vasoactive intestinal polypeptide induces glycogenolysis in mouse cortical slices: a possible regulator mechanism for the local control of energy metabolism. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 78: 6535-6539.
- Magistretti, P. J., Hof, P. R., Martin, J. L., Dietl, M. y Palacios, J. M. (1988)**
High- and low-affinity binding sites for vasoactive intestinal peptide (VIP) in the rat kidney revealed by light microscopic autoradiography. *Regul. Pept.* 23: 145-152.
- Maimone, D., Cioni, C., Rosa, S., Macchia, G., Aloisi, F. y Annunziata, P. (1993)**
Norepinephrine and vasoactive intestinal peptide induce IL-6 secretion by astrocytes: synergism with IL-1B and TNF α . *J. Neuroimmunol.* 47: 73-82.
- Makhlouf, G. M. y Said, S. I. (1975)**
The effect of vasoactive intestinal peptide (VIP) on digestive and hormonal function. *Gastrointestinal Hormones* (Eds. Thompson, J. C. University Texas Press, Austin y Londres) pp. 699-710.
- Malencik, D. A. y Anderson, S. R. (1983)**
Binding of hormone and neuropeptide by calmodulin. *Biochemistry.* 22: 1995-2001.
- Malm, L., Sundler, F. y Uddman, R. (1980)**
Effect of vasoactive intestinal polypeptide on resistance and capacitance vessels in the nasal mucosa. *Acta Otolaryngol.* 90: 304-308.
- Mao, Y. K., Wang, Y. F. y Daniel, E. E. (1993)**
Distribution and characterization of vasoactive intestinal polypeptide binding in canine lower esophageal sphincter. *Gastroenterology.* 105: 1370-1377.
- Marie, J. C., Hui Bon Hoa, D., Jackson, R., Hejblum, G. y Rosselin (1985)**
The biological relevance of HPLC-purified vasoactive intestinal peptide monoiodinated at tyrosine 10 or tyrosine 22. *Regul. Pept.* 12: 113-123.
- Martin, J. L., Rose, K., Hughes, G. J. y Magistretti, P. J. (1986)**
(Mono (¹²⁵I) iodo-Tyr¹⁰, MetO¹⁷)-Vasoactive intestinal polypeptide: preparation, characterization and use for radioimmunoassay and receptor binding. *J. Biol. Chem.* 261: 5320-5327.
- Mayo, K. E., Cerelli, G. M., Lebo, R. V., Bruce, B. D., Rosenfeld, M. G. y Evans, R. M. (1985)**
Gene encoding human growth hormone-releasing factor precursor: structure, sequence and chromosomal assignment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82: 63-67.
- McFarlin, D. R., Lehn, D. A., Moran, S. M., MacDonald, M. J. y Epstein, M. L. (1995)**
Sequence of a cDNA encoding chicken vasoactive intestinal peptide (VIP). *Gene.* 154: 211-213.

- Menendez-Pelaez, A., Tolivia, D., Rodriguez-Colunga, M. J y Reiter, R. J. (1990)**
Ultrastructure of the blood vessels in the Harderian gland of the hamsters (*Mesocricetus auratus*): existence of sinusoids. J. Morphol. 204: 257-263.
- Menendez-Pelaez, A., Rodriguez, C. y Dominguez, P. (1991)**
5-aminolevulinic synthase mRNA levels in the Harderian gland of the Syrian hamsters: correlation with porphyrin concentrations and regulation by androgens and melatonin. Mol. Cell. Endocrinol. 80: 177-182.
- Menendez-Pelaez, A. y Buzzell, G. R. (1992)**
Harderian gland indoles. Behav. Endoc. Effects. pp. 219-234. Berlin: Springer.
- Milligan, G., Mullaney, I., Unson, C. G., Marshall, L., Spiegel, A. M. y McArdle, H. (1988)**
GTP analogues promote release of the α subunit of the guanine nucleotide binding protein, Gi2, from membranes of rat glioma C6BU1 cells. Biochem. J. 254: 567-574.
- Miyata, A., Arimura, A., Dahl, R. R., Minamino, N., Uehara, A., Jiang, L., Culler, M. y Coy, D. H. (1989)**
Isolation of a novel 38 residue-hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 164: 567-574.
- Molinero, P., Calvo, J. R., Goberna, R. y Guerrero, J.M. (1985)**
The interaction of vasoactive intestinal peptide (VIP) with isolated bovine thyroid plasma membranes. Biochem. Biophys. Res. Commun. 128: 1336-1341.
- Molinero, P. y Guerrero, J.M. (1993)**
Vasoactive intestinal peptide stimulates type II thyroxine 5'-deiodinase and N-acetyltransferase activities in dispersed pineal cells of euthyroid and hypothyroid rats. Neurosci. Lett. 151:130-133.
- Moore, T. C. (1984)**
Modification of lymphocyte traffic by vasoactive neurotransmitter substances. Immunology 52: 511-518.
- Moore, T. C., Spruck, C. H. y Said, S. I. (1988)**
Depression of lymphocyte traffic in sheep by vasoactive intestinal peptide (VIP). Immunology 64: 475-478.
- Morris, J. L., Gibbins, I. L., Furness, J. B., Costa, M. y Murphy, R. (1985)**
Colocalization of NPY, VIP and dynorphin in non nor-adrenergic axon of the guinea pig uterine artery. Neurosci. Lett. 67: 31-37.
- Muller, J. M., El Battari, A., Ah-Kye, E., Luis, J., Ducret, F., Pichon, J. y Marvaldi, J. (1985)**
Internalization of the vasoactive intestinal peptide (VIP) in a human adenocarcinoma cell line (HT29). Eur. J. Biochem. 152: 107-114.
- Muller, J. M., Lolait, S. J., Yu, V. C., Sadee, W. y Waschek, J. A. (1989)**
Functional vasoactive intestinal polypeptide (VIP) receptors in human neuroblastoma subclones that contain VIP precursor mRNA and release VIP-like substances. J. Biol. Chem. 264: 3647-3650.
- Munson, P.J. y Rodbard, D. (1980)**
LIGAND: a versatile computerized approach for characterization of ligand-binding systems. Anal. Biochem. 107: 220-239.
- Muscettola, M. y Grasso, G. (1990)**
Somatostatin and vasoactive intestinal peptide reduce interferon gamma production by human peripheral blood mononuclear cells. Immunobiol. 180: 419-430.
- Musso, G. F., Patthi, S., Ryskamp, T. C., Provow, S., Raiser, E. M. y Velicelebi, G. (1988)**
Development of helix-based vasoactive intestinal peptide analogues: identification of residues required for receptor interaction. Biochemistry. 28: 8174-8181.
- Mutt, V. (1988)**
Vasoactive intestinal polypeptide and related peptides-isolation and chemistry. Ann. NY. Acad. Sci. 527: 1-19.
- Nakamura, Y., Chopra, I.J. y Solomon, D.H. (1977)**
Preparation of high-specific-activity radioactive iodothyronines and their analogues. J.Nucl. Med. 18: 1112-1115.
- Nguyen, T. D., Williams, J. y Gray, G. M. (1986)**
Vip receptor on liver plasma membranes: characterization as a glycoprotein. Biochemistry 25: 361-368.
- Ngunen, T. D. y Kaiser, L. M. (1990)**
Vasoactive intestinal peptide receptor on liver plasma membranes: solubilization and cross-linking. Peptides. 11: 1255-1261.
- Nielsen, F. C., Gammeltoft, S., Westermark, B. y Fahrenkrug, J. (1990)**
High affinity receptors for vasoactive intestinal peptide on a human glioma cell line. Peptides. 11: 1225-1231.

Nilsson, A. (1974)

Isolation amino acid composition and terminal amino acid residues of the vasoactive octacosapeptide from chicken intestine. Partial purification of chicken secretin. FEBS Lett. 47: 284-289.

Nishizawa, M., Hayakawa, Y., Yanihara, N. y Okamoto, H. (1985)

Nucleotide sequence divergence and functional constraint in VIP precursor mRNA evolution between human and rat. FEBS Lett. 183: 55-59.

Noda, Y., Rodríguez-Sierra, J., Liu, J., Landers, D., Mori, A. y Paul, S. (1994)

Partitioning of vasoactive intestinal polypeptide into lipid bilayers. Biochem. Biophys. Acta. 1191: 324-330.

Nohr, D. y Weihe, E. (1991)

The neuroimmune link in the bronchus-associated lymphoid tissue (BALT) of cat and rat: peptides and neural markers. Brain Behav. Immun. 5: 84-101.

Nordlind, K., Bondesson, L., Agerberth, B. y Mutt, V. (1992)

Protecting effects of vasoactive intestinal polypeptide on lymphocytes against metal toxicity.

Immunopharm. Immunotox. 14: 323-330.

Norwell, J. F. y Clabough, J. W. (1972)

Adrenergic and cholinergic innervation of the hamster Harderian gland. Science. 178: 1102-1103.

Obata, K. I., Itoh, N., Okamoto, H., Yanaihara, N. y Suzuki, T. (1981)

Identification and processing of biosynthetic precursors to vasoactive intestinal polypeptide in human neuroblastoma cells. FEBS. Lett. 136: 123-126.

Oda, P., Gown, A. M., Van Der Berg, J. S. y Stern, R. (1990)

Instability of the myofibroblast phenotype in culture. Exp. Mol. Pathol. 52: 221-234.

O'Donnell, M., Garippa, R. J., O'Neill, N. C., Bolin, D. R. y Cottrell, J. M. (1991)

Structure-activity studies of vasoactive intestinal peptide. J. Biol. Chem. 266: 6389-6392.

O'Dorisio, M. S., O'Dorisio, T. M. y Balcerzak, S. P. (1980)

Vip as a biochemical marker for polymorphonuclear leukocytes. J. Lab. Clin. Med. 96: 666-672.

O'Dorisio, M. S., Wood, C. L., Wenger, G. D. y Vassalo, L. M. (1985a)

Cyclic AMP-dependent protein kinase in Molt 4b lymphoblasts: identification by photoaffinity labeling and activation in intact cells by vasoactive intestinal peptide (VIP) and peptide histidine isoleucine (PHI).

J. Immunol. 135: 4078-4085.

O'Dorisio, M. S., Wood, C. L. y O'Dorisio, T. M. (1985b)

Vasoactive intestinal peptide and neuropeptide modulation of the immune response. J. Immunol. 135: 792-796.

O'Dorisio, M. S., Vasiloff, J., Campolito, L. B. y Bresnahan, J. C. (1988)

Characterization of the vasoactive intestinal peptide receptor in rat frontal cortex.

Neurosc. Res. Comm. 2: 19-28.

O'Dorisio, M. S. y Campolito, L. B. (1989)

Comparison of vasoactive intestinal peptide-mediated protein phosphorylation in human lymphoblasts and colonic epithelial cells. Mol. Immunol. 26: 583-589.

O'Dorisio, M. S., Shannon, B. T., Fleshman, D. J. y Campolito, L. B. (1989)

Identification of high affinity receptors for vasoactive intestinal peptide on human lymphocytes of B cell lineage. J. Immunol. 142: 3533-3536.

Oettling, G., Bruchelt, G., Lohmann, F., Tenfel, M., Nicthammer, D., Treuner, S. y Drew, V. (1990)

Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) induces calcium mobilization in the human neuroblastoma cell line SK-N-SK. Cancer Lett. 50: 203-207.

Oliva, D., Nicosia, S., Spada, A. y Giannattasio, G. L. (1982)

VIP stimulates ACTH release and adenylate cyclase in human ACTH-secreting pituitary adenomas.

Eur. J. Pharmacol. 83: 101-105.

Ollerenshaw, S., Jarvis, D., Woolcock, A., Sullivan, C. y Scheibner, T. (1989)

Absence of immunoreactive vasoactive intestinal polypeptide in tissue from the lung of patients with asthma.

N. Engl. J. Med. 320: 1244-1248.

Osuna, C., Rubio, A., Goberna, R. y Guerrero, J.M. (1990)

Ontogeny of type II 5'-deiodinase, N-acetyltransferase, and hydroxyindole-o-methyltransferase activities in the rat harderian gland. Life Sci. 46: 1945-1951.

Osuna, C., Jimenez, J., Reiter, R.J., Rubio, A. y Guerrero, J.M. (1992)

Adrenergic regulation of type II 5'-deiodinase circadian rhythm in rat harderian gland. Amer. J. Physiol. (Endocrinol. Metab. 26): E884-E889.

- Ottaway, C. A. (1984)**
In vitro alteration of receptors for vasoactive intestinal peptide changes the in vivo localization of mouse T cells. J. Exp. Med. 160: 1054-1069.
- Ottaway, C. A. (1987)**
Selective effect of VIP on the mitogen response of murine T cells. Immunology. 62: 291-297.
- Ottaway, C. A., Lewis, D. L. y Asa, S. L. (1987)**
vasoactive intestinal peptide-containing nerves in Peyer's patches. Brain Behav. Immunol. 1: 148-158.
- Ottesen, B., Fahrenfrug, J., Wagner, G., Ulrichsen, H., Einer-Jensen, N., Carter, A. M., Larsen, J. J. y Stolberg, B. (1980)**
Effects of VIP in the female genital tract. Endocrinol. Japon. 1: 71-78.
- Ottesen, B., Stau-Olsen, P., Gammeltoft, S. y Fahrenkrug (1982)**
Receptors for vasoactive intestinal polypeptide on crude smooth muscle membranes from porcine uterus. Endocrinology. 110: 2037-2043.
- Ottesen, B., Pedersen, B., Nielsen, J., Dalgaard, D. y Fahrenkrug (1986)**
Effect of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) on steroidogenesis in women. Regul. Pept. 16: 299-304.
- Patthi, S., Simerson, S. y Veliçelebi, G. (1988)**
Solubilization of rat lung vasoactive intestinal peptide receptors in the active state. J. Biol. Chem. Vol. 263, No 36: 19363-19369.
- Paul, S. y Said, S. I. (1987)**
Characterization of receptors for vasoactive intestinal peptide solubilized from the lung. J. Biol. Chem. 262: 158-162.
- Payne, A. P. (1977)**
Pheromonal effects of Harderian gland homogenates on aggressive behaviour in the hamster. J. Endocrinol. 73: 191-192.
- Payne, A. P., McGadey, J., Moore, M. R. y Thompson, G. G. (1977)**
Androgenic control of the Harderian gland in the male golden hamster. J. Endocrinol. 75: 73-82.
- Payne, A. P., McGadey, J., Johnston, H. S., Moore, M. R. y Thompson, G. G. (1982)**
Mast cells in the hamster Harderian gland: sex differences, hormonal control and relationship to porphyrin. J. Anat. 135: 451-461.
- Payne, A. P., Spike, R. C. y Moore, M. R. (1992)**
Gonadal hormones, structure, and porphyrin synthesis in the rodent Harderian gland. Behav. Endoc. Effects. pp. 141-154. Berlin: Springer.
- Payne, A. P. (1994)**
The Harderian gland: a tercentennial review. J. Anat. 185: 1-49.
- Peters, A. (1990)**
The axon terminals of vasoactive intestinal polypeptide (VIP)-containing bipolar cells in rat visual cortex. J. Neurocytol. 19: 672-685.
- Piotrowsky, W. y Foreman, J. C. (1985)**
On the actions of substance P, somatostatin and vasoactive intestinal peptide on rat peritoneal mast cells and in human skin. Arch. Pharmacol. 331: 364-368.
- Polak, J. M. y Bloom, S. R. (1983)**
Regulatory peptides: key factors in the control of bodily functions. Br. Med. J. 286: 1461-1466.
- Porter, J. P. y Ganong, W. F. (1988)**
Vasoactive intestinal peptide and renin secretion. Ann. NY Acad. Sci. 527: 465-477.
- Pozo, D., Segura, J. J., Guerrero, J. M. y Calvo, J. R. (1994)**
Peptide T from human immunodeficiency virus does not interact with VIP receptor-effector system in immunocompetent cells of rat and mouse. Biosc. Reports. 14.
- Pozo, D., Guerrero, J. M. y Calvo, J. R. (1995)**
Homologous regulation of vasoactive intestinal peptide (VIP) receptors on rat peritoneal macrophages. Peptides. 16: 313-318.
- Prieto, J. C., Laburthe, M. y Rosselin, G. (1979)**
Interaction of vasoactive intestinal peptide with isolated intestinal epithelial cells from rat. I. Characterization, quantitative aspects and structural requirements of binding sites. Eur. J. Biochem. 96: 229-239.

- Prieto, J. C., Guerrero, J. M., De Miguel, C. y Goberna, R. (1981)**
Interaction of vasoactive intestinal peptide with a cell line (HeLa) derived from human carcinoma of the cervix: binding to specific sites and stimulation of adenylate cyclase. Mol. Cell. Biochem. 97: 167-176.
- Prieto, J. C. (1982)**
Inhibitory effect of somatostatin on basal and VIP-stimulated cyclic AMP production and cyclic AMP-dependent protein kinase activity in HeLa cells. FEBS Lett. 144: 173-176.
- Prieto, J. C. y Carmena, M. J. (1983)**
Receptors for vasoactive intestinal peptide on isolated epithelial cells of rat ventral prostate. Biochem. Biophys. Acta. 763: 408-413.
- Provow, S. y Veliçelebi, G. (1987)**
Characterization and solubilization of vasoactive intestinal peptide receptors from rat lung membranes. Endocrinology. Vol. 120 No 6: 2442-2449.
- Puig-Domingo, M., Guerrero, J. M., Reiter, R. J., Peinado, M. A., Menendez-Pelaez, A. y Santana, C. (1988)**
Androgenic control of immunoreactive somatostatin in the Harderian gland of the syrian hamsters. J. Reprod. Fert 82: 753-759.
- Puig-Domingo, M., Guerrero, J. M., Menendez-Pelaez, A. y Reiter, R. J. (1989)**
Melatonin specifically stimulates type-II thyroxine 5'-deiodination in brown adipose tissue of syrian hamsters. J. Endoc. 122: 553-556.
- Raiteri, M., Marchi, M. y Paudice, P. (1987)**
Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) potentiates the muscarinic stimulation of phosphoinositide turnover in rat cerebral cortex. Eur. J. Pharmacol. 133: 127-128.
- Ramirez-Cardenas, R., Prieto, J. C., Guerrero, J. M. y Goberna, R. (1981)**
Guanyl nucleotide regulation of vasoactive intestinal peptide interaction with rat liver membranes. Rev. Esp. Fisiol. 37: 9-16.
- Rattan, S., Said, S. I. y Goyal, R. K. (1977)**
Effect of VIP on the lower esophageal sphincter pressure. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 155: 40-43.
- Reiter, R.J., Richardson, B.A., Matthews, S.A., Lane, J. y Ferguson, B.N. (1983).**
Rhythms in immunoreactive melatonin in retina and Harderian glands of rats: persistence after pinealectomy. Life Scien. 32:1229-1236.
- Riou, F., Cespuoglio, R. y Jouvot, M. (1982)**
Endogenous peptides and sleep in the rat: III. The hypnogenic properties of VIP. Neuropeptides. 2: 265-277.
- Robberecht, P., De Neef, P., Lammens, M., Deschodt-Lanckman, M. y Christophe, J. (1978)**
Specific binding of vasoactive intestinal peptide to brain membranes from guinea pig. Eur. J. Biochem. 90: 147-154.
- Robberecht, P., Chatelain, P., De Neef, P., Camus, J. C., Waelbroeck, M. y Christophe, J. (1981)**
Presence of vasoactive intestinal peptide receptors coupled to adenylate cyclase in rat lung membranes. Biochim. Biophys. Acta. 678: 76-82.
- Robberecht, P., Waelbroeck, M., Noyer, M., Chatelain, P., De Neef, P., Konig, W. y Christophe, J. (1982a)**
Characterization of secretin and vasoactive intestinal peptide receptors in rat pancreatic plasma membranes using the native peptides, secretin-(7-27) and five secretin analogues. Digestion. 23: 201-210.
- Robberecht, P., Chatelain, P., Waelbroeck, M. y Christophe, J. (1982b)**
Heterogeneity of VIP-recognizing binding sites in rat tissues.
In: Said, S.I., ed. Vasoactive Intestinal Peptide, New York: Raven:323-332.
- Robberecht, P., Waelbroeck, M., Dehay, J. P., Winand, J., Vandermeers, A., Vandermeers-Piret, M. C. y Christophe, J. (1984)**
Evidence that helodermin, a newly extracted peptide from Gila monster venom, is a member of the secretin/VIP/PHI family of peptides with an original patterns of biological properties. FEBS Lett. 166: 277-282.
- Robinson, R. M., Blakeney, E. W. y Mattico, W. L. (1982)**
Rapid induces conformational changes in glucagon, secretina and vasoactive intestinal peptide. Biopolymers. 21: 1217-1228.
- Rodbell, M. (1980)**
The role of hormone receptor and GTP-regulatory proteins in membrane traduction. Nature. 284: 17-22.

- Rodriguez-Pena, M. S., Guijarro, L. G. y Prieto, J. G. (1991)**
Adenyl cyclase stimulation by VIP in rat seminal vesicle membranes. Peptides. 12: 821-824.
- Rola-Pleszczynski, M., Bolduc, D. y St-Pierre, S. (1985)**
The effects of vasoactive intestinal peptide on human natural killer cell function. J. Immunol. 135: 2569-2573.
- Romualdi, P., Lesa, G., Cox, B. M. y Ferri, S. (1990)**
Distribution and characterization of VIP-related peptides in the rat spinal cord. Neuropeptides. 16: 219-225.
- Rosselin, G. (1986)**
The receptors of the VIP family peptide (VIP, secretin, GRF, PHI, PHM, GIP, glucagon, and oxyntomodulin). Specificities and identity. Peptides. 7: 89-100.
- Rossiter, A., Guelrud, M., Souney, P. F., Mendoza, S., Rossiter, G. y Gelrud, D. (1991)**
High vasoactive intestinal polypeptide plasma levels in patients with Barrett's esophagus. Scand. J. Gastroenterol. 26: 572-576.
- Rostene, W.H. (1984)**
Neurobiological and neuroendocrine functions of the vasoactive intestinal peptide (VIP). Prog. Neurobiol. (Oxf.) 22:103-129.
- Rouyer-Fessard, A., Augeron, C., Grasset, E., Maoret, J. J., Laboisie, C. L. y Laburthe, M. (1989)**
VIP receptors and control of short circuit current in the human intestinal clonal cell line Cl.19A. Experientia. 45(1989): 1102-1105.
- Rubio, A., Osuna, C. y Guerrero, J. M. (1991a)**
 β - and α -adrenergic mechanisms are involved in regulation of rat pineal type II thyroxine 5'-deiodinase activity during development. Endocrinology. 128: 1661-1667.
- Rubio, A., Guerrero, J. M., Gonzalez, A., Lopez-Gonzalez, M. A. y Osuna, C. (1991b)**
 β - and α -adrenergic receptors are involved in regulating type II thyroxine 5'-deiodinase activity in the rat Harderian gland. Life Scien. 49: 1523-1530.
- Ruskell, G. L. (1971)**
The distribution of autonomic postganglionic nerve fibers to the lacrimal gland in monkeys. J. Anat. 109: 229-242.
- Ryan, J. y Cohen, G. (1977)**
Effect of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) on basal and cholecystokinin-induced gallbladder pressure. Gastroenterology 73: 870-874.
- Sacerdote, P., Ruff, M. R. y Pert, C. B. (1987)**
Vasoactive intestinal peptide 1-12: a ligand for the CD₄ (T₄)/human immunodeficiency virus receptor. J. Neurosci. Res. 18: 102-107.
- Said, S.I. y Mutt, V. (1970)**
Polypeptide with broad biological activity: Isolation from small intestine. Science 169: 1217-1218.
- Said, S.I. y Mutt, V. (1972)**
Isolation from porcine-intestinal wall of a vasoactive octacosapeptide related to secretin and to glucagon. Eur. J. Biochem. 28:199-204.
- Said, S.I. y Makhlof, G. M. (1974)**
Vasoactive intestinal polypeptide: spectrum of biological activity. Endocrinology of the gut (Eds. Chey, W. Y., Brooks, F. P., Thorofare, N. J., C. B.) pp. 88-102.
- Said, S. I. y Rosenberg, R. N. (1976)**
Vasoactive intestinal polypeptide: abundant immunoreactivity in neural cell lines and normal nervous tissue. Science 192: 907-908.
- Said, S. I. (1982)**
Vasoactive peptides in the lung, with special reference to vasoactive intestinal peptide. Experimental Lung Res. 3: 343-348.
- Said, S.I. (1986)**
Vasoactive intestinal peptide. J. Endocrinol. Invest. 9:191-200.
- Said, S.I. (1991)**
Vasoactive intestinal polypeptide. Biologic role in health and disease. Trends Endocrinol. Metab. 2: 107-112.
- Sakai, T. (1981)**
The mammalian Harderian gland: morphology, biochemistry, function and phylogeny. Arch. Histol. Jpn. 44: 299-333.

- Samson, W. K., Said, S. I. y McCann, S. M. (1979)
Radioimmunologic localization of vasoactive intestinal polypeptide in hypothalamic and extrahypothalamic sites in the rat brain. Neuroscience. 12: 265-269.
- Sánchez, V., Goberna, R. y Calvo, J. R. (1991)
Glycogenolytic effect of vasoactive intestinal peptide in the rat in vivo. Experientia 47: 625-626.
- Sarrieau, A., Laburthe, M. y Rosselin, G. (1983)
Intestinal VIP receptors: differential effect of trypsin on the high and low affinity binding sites. Mol. Cel. Endocrinol. 31: 301-313.
- Sarrieau, A., Boige, N. y Laburthe, M. (1985)
Role of phospholipids in the binding activity of vasoactive intestinal peptide receptors. Experientia 41: 631-633.
- Scatchard, G. (1949)
The attractions of proteins for small molecules and ions. Ann. NY Acad. Sci. 51:660-672.
- Scholar, E. y Paul, S. (1991)
Stimulation of tumor cell growth by vasoactive intestinal peptide. Cancer. 67: 1561-1564.
- Schramm, U. (1980)
Lymphoid cells in the Harderian gland of birds. An electron microscopical study. Cell Tissue Res. 205: 85-94.
- Schulte-bockholt, A., Fink, J. G., Meier, D. A., Otterson, M. F., Telford, G. L., Hopp, K. y Koch, T. R. (1995)
Expression of mRNA for vasoactive intestinal peptide in normal human colon and during inflammation. Mol. and Cel. Bioq. 142: 1-7.
- Schwartz, C. J., Kimberg, D. V., Sheerin, H. E., Field, M. y Said, S. I. (1974)
VIP stimulation of adenylate cyclase and active electrolyte secretion in intestinal mucosa. J. Clin. Invest. 54: 536-540.
- Segura, J.J., Guerrero, J.M., Goberna, R. y Calvo, J.R. (1991)
Characterization of functional receptors for vasoactive intestinal peptide (VIP) in rat peritoneal macrophages. Regul. Pept. 33: 133-143.
- Segura, J.J., Guerrero, J.M., Goberna, R. y Calvo, J.R. (1992a)
Stimulatory effect of vasoactive intestinal peptide (VIP) on cyclic AMP production in rat peritoneal macrophages. Regul. Pept. 37: 195-203.
- Segura, J.J., Guerrero, J.M., Goberna, R. y Calvo, J.R. (1992b)
Guanine nucleotide regulation of VIP binding to rat peritoneal macrophage membranes. Peptides. 13 :953-955.
- Segura, J. J., Guerrero, J. M., López-González, M. A. y Calvo, J. R. (1993)
Vasoactive intestinal peptide (VIP) inhibits substrate adherence capacity of rat peritoneal macrophages by a mechanism that involves cAMP. Cell Adhesion Comm. 1: 213-221.
- Shaffer, M. M., Carney, D. N., Korman, L. Y., Lebovic, G. S. y Moody, T. W. (1987)
High affinity binding of VIP to human lung cancer cell lines. Peptides. 8: 1101-1106.
- Shebalin, M., Said, S. I. y Makhlof, G. M. (1977)
Stimulation of insulin and glucagon secretion by vasoactive intestinal peptide. Am. J. Physiol. 232: E197-E200.
- Sheward, W., J., Lutz, E. M. y Harmar, A. J. (1995)
The distribution of vasoactive intestinal peptide receptor messenger RNA in the rat brain and pituitary gland as assessed by in situ hybridization. Neuroscience. Vol. 67, No 2 :409-418.
- Shimatsu, A., Kato, Y., Matsushita, N., Katakami, H., Yanaihara, N. y Imura, H. (1982)
Effects of glucagon, neurotensin and vasoactive intestinal polypeptide on somatostatin released from perfused rat hypothalamus. Endocrinology. 110: 2113-2117.
- Shiotani, Y., Tamano, M., Shiosaka, S., Emson, P. C., Hillyard, C. J., Girgis, S. y Macintyre, I. (1986)
Distributions and origins of substance P (SP)-, calcitonin generelated peptide (CGRP)-, vasoactive intestinal polypeptide (VIP)- and neuropeptide Y (NPY)-containing nerve fibers in the pineal gland of gerbils. Neurosci. Lett. 70: 187-192.
- Shirama, K., Kikuyama, S., Takeo, Y., Shimizu, K. y Maekawa, K. (1982)
Development of Harderian gland during metamorphosis in anurans. Anat. Rec. 202: 371-378.
- Shirama, K., Kohda, M., Kohda, M. y Hokano, M. (1987)
Effects of lighting conditions and of hormone replacement on the level of porphyrins in the rat Harderian gland. J. Endoc. Invest. 10: 79-82.

- Shirama, K., Harada, T., Kohda, M. y Hokano, M. (1988)**
Fine structure of melanocytes and macrophages in the Harderian gland of the mouse. Acta Anat. 131: 192-199.
- Shreeve, S.M., Deluca, A.W., Diehl, N.L. y Kermode, J.C. (1992)**
Molecular properties of the vasoactive intestinal peptide receptor in aorta and other tissues. Peptides. 13: 919-926.
- Sibony, P. A., Walcott, B., McKeon, C. y Jakobiec, F. A. (1988)**
Vasoactive intestinal polypeptide and the innervation of the human lacrimal gland. Arch. Ophthalmol. 106: 1085-1088.
- Simonneau, V., Ouichou, A. y Pèvet, P. (1990)**
Vasoactive intestinal peptide stimulates melatonin release from perfused pineal glands of rats. J. Neural Transm. (GenSect). 79: 69-79.
- Slonaker, J. R. (1918)**
A physiological study of the anatomy of the eye and its accessory parts of the english sparrow (*Passer domesticus*). J. Morphol. 31: 351-459.
- Smitherman, T. C., Sakio, H., Geumei, A. M., Yoshida, T., Oyamada, M. y Said, S. I. (1982)**
Coronary vasodilatador action of VIP. Vasoactive intestinal peptide, Ed. Said, S. I., New York, Raven Press, pp. 169-176.
- Spiegel, A. M., (1989)**
Receptor-effector coupling by G-proteins. TEM. nov/dec : 72-76.
- Spike, R. C., Johnston, H. S., McGadey, J., Moore, M. R., Thompson, G. G. y Payne, A. P. (1985)**
Quantitative studies on the effects of hormones on structure and porphyrin biosynthesis in the Harderian gland of the female golden hamster. I. The effects of ovariectomy and androgen administration. J. Anat. 142: 59-72.
- Spike, R. C., Payne, A. P. y Moore, M. R. (1988)**
The effects of age on the structure and porphyrin synthesis of the Harderian gland of the female golden hamster. J. Anat. 160: 157-166.
- Sreedharan, S. P., Patel, D. R., Huang, J. X. y Goetzl, E. J. (1993)**
Cloning and functional expression of a human neuroendocrine vasoactive intestinal peptide receptor. Bioch. and Bioph. Comm. Vol. 193, No 2: 546-557.
- Stanisz, A. M., Befus, B. y Bienenstock, J. (1986)**
Differential effects of vasoactive intestinal peptide, substance P and somatostatin on immunoglobulin synthesis and proliferations by lymphocytes from Peyer's patches, mesenteric lymph nodes and spleen. J. Immunol. 136: 152-156.
- Staub-Olsen, P., Ottesen, B., Bartels, P. D., Nielsen, M. H., Gammeltoft, S. y Fahrenkrug, J. (1982)**
Receptors for vasoactive intestinal polypeptide on isolated synaptosomes from rat cerebral cortex. Heterogeneity of binding and desensitization of receptors. J. Neurochem. 39: 1242-1251.
- Sternweis, D. C. y Robishaw, J. D. (1984)**
Isolation of two proteins with high affinity for guanine nucleotides from membranes of bovine brain. J. Biol. Chem. 259: 13806-13813.
- Stjernquist, M., Hakanson, R., Leander, S., Owman, C., Sundler, F. y Uddman, R. (1983)**
Immunohistochemical localization of substance P, vasoactive intestinal polypeptide and gastrin-releasing peptide in the vas deferens and seminal vesicle, and the effect of these and eight other neuropeptides on resting tension and neurally evoked contractile activity. Regul. Pept. 7: 67-86.
- Strum, J. M. y Shear, C. R. (1982)**
Harderian glands in mice: fluorescence, peroxidase activity and fine structure. Tissue Cell. 14: 135-148.
- Sun, C. Y. y Nadakavukaren, M. J. (1980)**
Effect of testosterone on the female hamster Harderian gland pigmentation and ultrastructure. Cell. Tissue. Res. 207: 511-517.
- Sundler, F., Alumets, J., Hakanson, R., Ingemansson, S., Fahrenkrug, J. y Schaffalitzky de Muckadell, O. B (1977)**
VIP innervation of the gallbladder. Gastroenterol. 72: 1375-1377.
- Sundler, F., Alumets, J., Fahrenkrug, J., Hakanson, R. y Schaffalitzky de Muckadell, O. B (1979)**
Cellular localization and ontogeny of immunoreactive VIP in the chicken gut. Cell. Tissue. Res. 196: 193-201.

- Suzuki, Y., McMaster, D., Huang, M., Lederis, K. y Rorstad, O. P. (1985)**
Characterization of functional receptors for vasoactive intestinal peptide in bovine cerebral arteries. J. Neurochem. 45: 890-899.
- Svoboda, M., De Neef, P., Tastenoy, M. y Christophe, J. (1988)**
Molecular characteristics and evidence for internalization of vasoactive intestinal peptide (VIP) receptors in the tumoral rat-pancreatic acinar cell line AR 4-2J. Eur. J. Biochem. 176: 707-713.
- Svoboda, M., Tastenoy, M., Rampelbergh, J. V., Gossens, J., F., De Neef, P., Waelbroeck, M. y Robberecht, P. (1994)**
Molecular cloning and functional characterization of a human VIP receptor from SUP-T1 lymphoblasts. Biochem. and Bioph. Res. Comm. 5: 1617-1624.
- Swedlund, A. P. y Rosenzweig, S. A. (1990)**
Characterization of vasoactive intestinal peptide receptors in retina. Exp. Eye Res. 51: 317-323.
- Tanaka, K., Murakami, M. y Greer, M.A. (1986)**
Type-II thyroxine 5'-deiodinase in the rat pineal gland. Biochem. Biophys. Res. Commun. 137: 863-868.
- Tang, W. J. y Gilman, A. G. (1992)**
Adenylyl cyclases. Cell. 70: 869-872.
- Tatemoto, K. y Mutt, V. (1981)**
Isolation and characterization of the intestinal peptide porcine PHI (PHI-27), a new member of the glucagon-secretin family. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 6603-6607.
- Tatsuno, I., Yada, T., Vigh, S., Hidaka, H. y Arimura, A. (1992)**
Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and vasoactive intestinal peptide increase cytosolic free calcium concentration in cultures rat hippocampal neurons. Endocrinology. 131: 73-81.
- Taussig, R. y Gilman, A. G. (1995)**
Mammalian membrane-bound adenylyl cyclases. J. Biol. Chem. 270: 1-4.
- Taylor, D. P. y Pert, C. B. (1979)**
Vasoactive intestinal polypeptide: specific binding to rat brain membranes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 660-664.
- Taylor, A. W., Streilein, J. W. y Cousins, S. W. (1994)**
Immunoreactive vasoactive intestinal peptide contributes to the immunosuppressive activity of normal aqueous humor. J. Immunol. 153: 1080.
- Thiessen, D. D., Clancy, A. y Goodwin, M. (1976)**
Harderian gland pheromone in the Mongolian gerbil, *Meriones unguiculatus*. J. Chem. Ecol. 25: 231-238.
- Thiessen, D. D. y Kittrell, E. M. W. (1980)**
The Harderian gland and thermoregulation in the gerbil (*Meriones unguiculatus*). Physiol. Behav. 24: 417-424.
- Thiessen, D. D. y Harriman, A. E. (1986)**
Harderian gland exudates in the male *Meriones unguiculatus* regulate female proceptive behavior, aggression and investigation. J. Comp. Physiol. 100: 85-87.
- Thorndyke, M. C., Riddell, J. H., Thwaites, D. T. y Dimaline, R. (1989)**
Vasoactive Intestinal Polypeptide and its relatives: biochemistry, distribution and functions. Biol. Bull. 177: 183-186.
- Thulin, L., Nyberg, B., Tyden, G. y Sonnenfeld, T. (1984)**
Circulatory effects of VIP in anaesthetized man. Peptides. 5: 319-323.
- Tseng, J. y O'Dorisio, M. S. (1989)**
Mechanism of vasoactive intestinal peptide (VIP)-mediated immunoregulation. In.: Neuroimmune networks: Physiology and diseases. Alan R. L.(ed.), New York, pp 105-111.
- Tsukara, S. y Jacobowitz, D.M. (1987)**
Peptidergic innervation of the rat Harderian gland. Histochemistry 87:233-236.
- Tsukara, S., Fink, J. S., Mandel, G. y Goodman, R. H. (1987)**
Identification of a region in the human vasoactive intestinal polypeptide gene responsible for regulation by cyclic AMP. J. Biol. Chem. 262: 8743-8747.
- Tsukara, T., Fukushima, H., Takebe, H. y Nakai, Y. (1995)**
Vasoactive intestinal peptide gene expression in the rat pheochromocytoma cell line PC12. Mol. and Cell. End. 107: 231-239.

- Tsuto, T., Okamura, H., Fukui, K., Obata, H. L., Terubayashi, H., Iwai, N., Majima, S., Yanaihara, N. y Ibata, Y. (1982)**
A immunohistochemical investigation of vasoactive intestinal polypeptide in the colon of patients with Hirschsprung's disease. Neurosci. Lett. 34: 57-62.
- Tsutsumi, A., Iwata, K., Ogawa, K. y Matura, K. (1966)**
Histochemical and electron microscopic observations on the Harderian gland of the albino rat. Archiv. Histol. Japon. 27: 553-567.
- Uddman, R., Alumets, J., Edvinsson, L., Hakanson, R. y Sundler, F. (1978a)**
Occurrence and distribution of VIP nerves in the nasal mucosa and tracheobronchial wall. Acta Otolaryngol. 86: 445-448.
- Uddman, R., Alumets, J., Edvinsson, L., Hakanson, R. y Sundler, F. (1978b)**
Peptidergic (VIP) innervation of the esophagus. Gastroenterol. 75: 5-8.
- Uddman, R., Fahrenkrug, J., Malm, M., Alumets, J., Hakanson, R. y Sundler, F. (1980)**
Neuronal VIP in salivary glands: distribution and release. Acta Physiol. Scand. 110: 31-38.
- Ulrich, R., Yuwiler, A., Gelier, E. y Wetterberg, L. (1974)**
Effects of sex hormones and environmental lighting on rat Harderian gland porphyrin. J. Endocrinol. 63: 99-102.
- Van Doorn, J., Roelfsema, F. y Van Der Heide, D. (1986)**
Conversion of thyroxine to 3,5,3'-triiodothyronine in several rat tissues in vivo: the effect of hypothyroidism. Acta Endoc. 113: 59-64.
- Vaughan, M. K., Chenoweth, P. C., Sabry, J., Chambers, J. P. y Reiter, R. J. (1988)**
Lysosomal enzymes in the rat Harderian gland are altered by either bromocriptine treatment or hypophysectomy and hormone replacement therapy. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 187: 469-473.
- Vaughan, M. K., Vaughan, G. M., Chenoweth, P. C., Menendez-Pelaez, A., Kumar, P. y Chambers, J. P. (1991)**
Harderian gland porphyrin, lysosomal, ATPase and type II 5'-deiodinase rhythms in Sprague-Dawley and Fischer-344 rats kept under long or short photoperiod conditions. Int.J. Biochem. 23: 919-924.
- Venecek, J., Pavlik, A. y Illnerova, H. (1987)**
Hypothalamic melatonin receptor sites revealed by autoradiography. Brain Res. 435: 359-362.
- Venerable, J. H. y Grafflin, A. L. (1940)**
Gross anatomy of the orbital glands in the albino rat. J. Mammal. 21: 66-71.
- Vijayan, M. V., Samson, W. K., Said, S. I. y McCann, S. M. (1979)**
Vasoactive intestinal peptide: evidence for a hypothalamic site of action to release growth hormone, luteinizing hormone and prolactin in conscious ovariectomized rats. Endocrinology. 104: 53-64.
- Vilchis, F., Hernandez, A. y Perez-Palacios, G. (1987)**
Hormone regulation of the rodent Harderian gland binding properties of the androgen receptor in the male golden hamster. J. Endocrinol. 112: 3-8.
- Vilchis, F. y Perez-Palacios, G. (1989)**
Steroid hormone receptors and the sexual phenotype of the Harderian gland in hamsters. J. Endocrinol. 121: 149-159.
- Vilchis, F., Chavez Cerbon, M. A. y Perez-Palacios, G. (1992)**
The Harderian gland as a target for steroid hormone action: role and characteristics of intracellular receptors. Behav. Endoc. Effects. pp. 297-316. Berlin: Springer.
- Visser, T. J., Fekkes, D., Docter, R. y Hennemann, G. (1978)**
Sequential deiodination of thyroxine in rat liver homogenate. Biochem. J. 174: 221-229.
- Visser, T. J., Kaplan, M. M., Leonard, J. L. y Larsen, P. R. (1983)**
Evidence for two pathways of iodothyronine 5'-deiodination in rat pituitary that differ in kinetics, propylthiouracil sensitivity, and response to hypothyroidism. J. Clin. Invest. 71: 992-1002.
- Vivien-Roels, B., Pevet, P., Dubois, P., Arendt, J. y Brown, G. M. (1981)**
Immunohistochemical evidence for the presence of melatonin in the pineal gland, the retina and the Harderian gland. Cell Tissue Res. 217: 105-115.
- Wahle, P. y Meyer, G. (1989)**
Early postnatal development of vasoactive intestinal polypeptide-and peptide histidine isoleucine immunoreactive structures in the cat visual cortex. J. Comp. Neurol. 282: 215-248.

- Waldman, D. B., Gardner, J. D., Zfass, A. M. y Makhlof, G. (1977)**
Effect of vasoactive intestinal peptide, secretin and related peptides on rat colonic transport and adenylate cyclase activity. Gastroenterol. 73: 518-523.
- Wallengren, J., Ekman, R. y Sundler, F. (1987)**
Occurrence and distribution of neuropeptides in human skin. An immunocytochemical and immunochemical study on normal skin and blister fluid from inflamed skin. Acta Derm. Venereol. (Stockholm). 67: 185-192.
- Wang, S. C., Du, B. H., Eng, J., Chang, H., Hulmes, J. D., Pan, Y. C. y Yalow, R. S. (1985)**
Purification of dog VIP from a single animal. Life Scien. 37: 979-983.
- Wanke, I. E. y Rorstad, O. P. (1990)**
Receptors for vasoactive intestinal peptide in rat anterior pituitary glands: localization of binding to lactotropes. Endocrinology. 126: 1981-1988.
- Watanabe, M. (1980)**
An autoradiographic, biochemical and morphological study of the Harderian gland of the mouse. J. Morphol. 163: 349-366.
- Weihe, E., Hartschuh, W. y Reinecke, M. (1981)**
Peptidergic (neurotensin, VIP) innervation of the skin. Acta Anat. III: 461.
- Weinstock, J. V. (1991)**
Production of neuropeptides by inflammatory cells within the granulomas of murine Schistosomiasis mansoni. Eur. J. Clin. Invest. 131: 381-390.
- Westendorf, J. M., Philips, M. A. y Schonbrunn, A. (1983)**
Vasoactive intestinal peptide stimulates hormone release from corticotropic cells in culture. Endocrinology. 112: 550-554.
- Wetterberg, L., Geller, E. y Yuwiler, A. (1970)**
Harderian gland: an extraretinal photoreceptor influencing the pineal gland in neonatal rats? Science. 167: 884-885.
- Wetterberg, L. (1972)**
Increase of Harderian gland porphyrin content in castrated male hamsters dependent on light and visual function. Life Scien. 11: 541-546.
- Wiik, P., Opstad, P. K. y Boyum, A. (1985)**
Binding of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) by human blood monocytes: demonstration of specific binding sites. Regul. Pept. 12: 145-153.
- Wiik, P. (1988)**
Homologous regulation of adenylate cyclase-coupled receptors for vasoactive intestinal peptide (VIP) on human mononuclear leucocytes. Regul. Pept. 20: 323-333.
- Wiik, P. (1989)**
Vasoactive intestinal peptide inhibits the respiratory burst in human monocytes by a cyclic AMP-mediated mechanism. Regul. Pept. 25: 187-197.
- Williams, L. T. y Lefkowitz, R.J. (1977)**
J. Biol. Chem. 252: 7207-7213.
- Wood, C. L. y O'Dorisio, M. S. (1985)**
Covalent cross-linking of vasoactive intestinal peptide to its receptors on intact human lymphoblasts. J. Biol. Chem. 260: 1243-1247.
- Wood, C. L., O'Dorisio, M. S., Vassallo, L. M., Malarkey, W. B. y O'Dorisio, T. M. (1985)**
Vasoactive intestinal peptide effects on GH₃ pituitary tumor cells: high affinity binding, affinity labeling, and adenylate cyclase stimulation. Regul. Pept. 12: 237-248.
- Wooding, F. B. P. (1980)**
Lipid droplet secretion by the rabbit Harderian gland. J. Ultrast. Res. 71: 68-78.
- Zentel, H. J. y Weihe, E. (1991)**
The neuro-B cell link of peptidergic innervation in the Bursa Fabricii. Brain Behav. Immun. 5: 132-147.
- Zhilinskaya, I. N., Brodskii, L. I., Alekseenko, L. V. y Kiselev, O. I. (1991)**
Detection of sequences in the structure of influenza virus proteins similar to vasoactive intestinal peptide. Bull. Exp. Biol. Med. 111: 470-473.

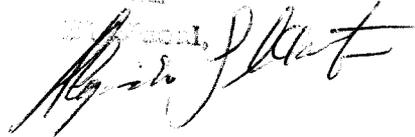
M.^a ISABEL CARABALLO MAURI
MECANISMOS Y ACCIONES DEL PEPTIDO
INTESTINAL VASOACTIVO (VIP) EN GLANDULA
HARDERIANA DE RATA

Apto con Lander

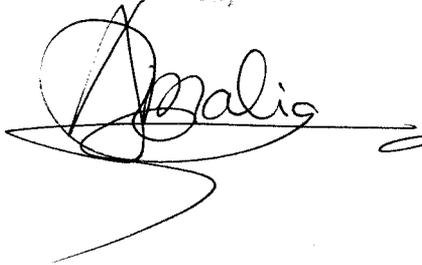
20 Junio 1997



F. ~~Castro~~



C. Ofunwa



M.^a Isabel Caraballo Mauri



UNIVERSIDAD DE SEVILLA



600672021