

R.4.983

T.D.
6/40



UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE MEDICINA

"ACCION DEL PEPTIDO INTESTINAL VASOACTIVO A TRAVES DE
SU RECEPTOR SOBRE LA ACTIVIDAD ADENILCICLASA Y
PROTEINQUINASA EN CELULAS MONONUCLEARES SANGUINEAS
HUMANAS".

por

Juan Miguel Guerrero Montávez

Tesis presentada para optar
al grado de Doctor por la
Facultad de Medicina de
Sevilla.

1981.

"ACCION DEL PEPTIDO INTESTINAL VASOACTIVO A TRAVES DE
SU RECEPTOR SOBRE LA ACTIVIDAD ADENILCICLASA Y
PROTEINQUINASA EN CELULAS MONONUCLEARES SANGUINEAS
HUMANAS".

Juan Miguel Guerrero Montávez

El Director del Trabajo:

R. Goberna Ortiz

Catedrático-Director del
Departamento de Bioquímica
de la Facultad de Medicina
de la Universidad de Sevilla.

El Co-Director del trabajo:

J.C. Prieto Villapún

Adjunto numerario de la
Cátedra de Bioquímica de
la Facultad de Medicina
de Alcalá de Henares.

Trabajo presentado para
optar al grado de Doctor
Universidad de Sevilla
Facultad de Medicina



CATEDRA DE BIOQUIMICA
FACULTAD DE MEDICINA

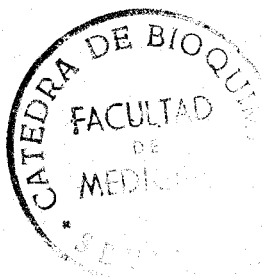
SEVILLA-9

PROF. RAIMUNDO GOBERNA

D. RAIMUNDO GOBERNA ORTIZ, Catedrático de
Bioquímica de la Facultad de Medicina de
la Universidad de Sevilla

CERTIFICA: que el trabajo titulado "Acción del péptido
intestinal vasoactivo a través de su
receptor sobre la actividad adenilciclase y
proteínquinasa en células mononucleares
sanguíneas humanas", ha sido realizado en
este Departamento por Juan Miguel Guerrero
Montávez bajo mi dirección y la co-dirección
del Dr. Juan Carlos Prieto Villapún.

Sevilla, 25 de Agosto de 1981



R. Goberna

Prof. Dr. R. Goberna

AGRADECIMIENTOS

Al Prof. Goberna y al Dr. Prieto que con su estímulo, colaboración y orientación han hecho posible el planteamiento y culminación de este trabajo.

A todo el Servicio de Inmunología del Hospital Universitario encabezados por el Prof. Malagón y el Dr. Elorza.

A Andrés Galdames y J.R. Calvo, internos de la Cátedra, por su eficaz colaboración y dedicación.

A M.T. Herrera, junto con la cual comencé a aprender el manejo del laboratorio.

Al resto de mis compañeros de la Cátedra por su ayuda en todo momento.

A Elena

INDICE

INTRODUCCION	1
1. El péptido intestinal vasoactivo	3
1.1. Estructura química	3
1.2. Síntesis y distribución	4
1.3. Acciones biológicas	16
a) Aparato digestivo	17
b) Sistema nervioso central	20
c) Aparato genitourinario	21
d) Aparato respiratorio	22
e) Músculo esquelético	22
f) Secreción endocrina	23
g) Metabolismo	24
1.4. Mecanismo de acción	25
a) Receptores para VIP	27
b) Activación del sistema adenil ciclasa	29
c) Activación de quinasas	31
d) Papel regulador de los guanil nucleótidos	32
1.5. El VIP como neurotransmisor	38
2. Células mononucleares sanguíneas	43
2.1. Concepto y clasificación	43
2.2. Linfocitos	44
a) Propiedades	44
b) Subpoblaciones	46
c) Marcadores de linfocitos B y T	47
d) Receptores para hormonas peptídicas ...	48
e) AMPc y linfocitos	49
2.3. Monocitos	53
a) Receptores para hormonas peptídicas ...	54
3. Objetivos	55

MATERIAL Y METODOS

1. Diseño experimental	58
2. Preparaciones celulares	60
2.1. Células mononucleares sanguíneas	60
2.2. Linfocitos T.....	63
2.3. Células mononucleares con baja contami- nación de monocitos	64
2.4. Monocitos	65
2.5. Hematíes	65
2.6. Técnicas de identificación celular	66
a) Formación de rosetas	66
b) Inmunofluorescencia directa	67
c) Esterasas no específicas	67
3. Unión del ^{125}I -VIP a su receptor específico de membranas	70
3.1. Marcaje de VIP con ^{125}I	70
3.2. Aislamiento de VIP porcino	74
3.3. Unión del VIP a sus receptores específicos de membrana en células mononucleares	77
a) Reactivos	77
b) Método general	78
c) Cinética de asociación	79
d) Efecto de la concentración celular	80
e) Degradación del ^{125}I -VIP	80
f) Efecto del pH	80
g) Cinética de disociación	81
h) Estequiometría de la unión VIP- receptor	81
i) Especificidad del receptor para VIP	82

4.	Determinación de la actividad adenil ciclasa ...	83
4.1.	Producción de AMPc	83
	a) Reactivos	83
	b) Método general	84
	c) Efecto del tiempo y la temperatura	85
	d) Efecto del IBMX	86
	e) Efecto de la concentración celular	86
	f) Efecto del pH	86
	g) Ensayos tipo dosis-efecto	86
	h) Especificidad	87
4.2.	Determinación cuantitativa de AMPc	88
	a) Reactivos	88
	b) Preparación de la curva standard	90
	c) Método	91
4.3.	Obtención de proteína quinasa	93
	a) Preparación de la columna DEAE de celulosa	93
	b) Preparación de extracto de músculo	94
	c) Cromatografía	95
5.	Determinación de la actividad de proteína quinasa	96
5.1.	Incubación de las células mononucleares sanguíneas	97
	a) Reactivos	97
	b) Método	97
	c) Efecto del tiempo y la IBMX	98
	d) Ensayos tipo dosis-efecto	98
	e) Especificidad	99
5.2.	Determinación de la actividad enzimática...	99
	a) Reactivos	99
	b) Método	100

RESULTADOS

1. Unión de ^{125}I -VIP a células mononucleares	104
1.1. Efecto de la concentración celular	104
1.2. Cinética de asociación	109
1.3. Degradación de receptores	113
1.4. Efecto del pH	115
1.5. Cinética de disociación	117
1.6. Estudio estequiométrico	119
1.7. Especificidad	123
2. Producción de AMPc en células mononucleares por acción del VIP	125
2.1. Efecto de la concentración celular	126
2.2. Efecto del tiempo y la temperatura	128
2.3. Efecto del pH	133
2.4. Efecto de la concentración de VIP	135
2.5. Especificidad	138
3. Activación de proteína quinasa dependiente de AMPc por el VIP	140
3.1. Efecto del tiempo	140
3.2. Efecto de la concentración del péptido	143
3.3. Especificidad	146
4. Estudio con subpoblaciones de mononucleares	148
4.1. Hematíes humanos	149
4.2. Linfocitos T	153
4.3. Población empobrecida en monocitos	156
4.4. Población enriquecida en monocitos	160

DISCUSION	162
CONCLUSIONES	182
BIBLIOGRAFIA	186

ABREVIATURAS

- ADP: adenosín difosfato
- A.e.: actividad específica
- AMPc: 3',5' adenosín monofosfato cíclico
- ATP: adenosín trifosfato
- BSA: albúmina sérica bovina
- Ci: curio
- cpm: cuentas por minuto
- DEAE-celulosa: dietilaminoetil celulosa
- DNA: ácido desoxirribonucleico
- EDTA: etilendiaminotetraacetato sódico
- fmol: 1×10^{-15} moles
- GIP: péptido inhibidor gástrico
- GTP: guanosín trifosfato
- IBMX: isobutilmetilxantina
- IFD: inmunofluorescencia directa
- %I: porcentaje de incorporación
- Kd: constante de disociación
- Km: constante de Michaelis
- LH: hormona luteinizante
- pmol: 1×10^{-12} moles
- PHA: fitohemaglutinina
- PRL: prolactina
- rpm: revoluciones por minuto

TB: Tris 50 mM, BSA 2%, pH 7'5

TBB: Tris 50 mM, BSA 2%, bacitracina 2 mg/ml, pH 7'5

TBB/IBMX: Tris 50 mM, BSA 2%, bacitracina 2 mg/ml,
IBMX 0'4 mM, pH 7'5

Tris: trihidroximetil-aminometano

VIP: péptido intestinal vasoactivo

w: peso

INTRODUCCION

Desde el comienzo de la década de los años 70 la investigación acerca del péptido intestinal vasoactivo ha experimentado un incremento considerable en un intento por comprender el papel fisiológico que este juega en la regulación de las diferentes funciones del organismo. En este contexto, el sistema receptor-efector para el péptido ha sido ampliamente estudiado en diversos sistemas celulares de la economía. En la gran mayoría de los casos la existencia de este sistema se acompaña del desarrollo de una acción biológica específica. El presente trabajo, con ayuda de la experiencia acumulada en el estudio de receptores hormonales y del propio péptido intestinal vasoactivo (PRIETO et al, 1979, 1980 y 1981; HERRERA et al, 1981; RAMIREZ-CARDENAS et al, 1981; GUERRERO et al, 1981) pretende caracterizar el sistema receptor-efector para VIP en un modelo humano fácilmente accesible como son las células mononucleares de sangre periférica. Es por ello que parece conveniente introducir el tema haciendo una revisión de los principales conocimientos acerca de los dos protagonistas del trabajo:

1. El péptido intestinal vasoactivo (VIP)
2. Las células mononucleares sanguíneas

1. EL PEPTIDO INTESTINAL VASOACTIVO

1.1. ESTRUCTURA QUIMICA

En el curso de los primeros experimentos conducentes al descubrimiento de la secretina, BAYLISS y STARLING (1902) detectaron la presencia, en los extractos intestinales que utilizaban, de una substancia distinta capaz de producir un descenso de la presión arterial. Fue esta capacidad hipotensora la que permitió, 68 años más tarde, el descubrimiento (SAID y MUTT, 1970) y aislamiento (SAID y MUTT, 1970a) del péptido intestinal vasoactivo (VIP) a partir de duodeno porcino.

En poco tiempo el VIP se caracterizó completamente desde un punto de vista químico. Está compuesto por 28 aminoácidos y fueron los propios descubridores los que llevaron a cabo la tarea de secuenciarlo (SAID y MUTT, 1972; MUTT y SAID, 1974). De ahí a la obtención sintética en el laboratorio sólo hubo un paso (BODANSKY et al, 1974; COY y GARDNER, 1980) que permitió la rápida expansión por todo el mundo de las investigaciones conducentes a determinar sus posibles funciones y mecanismo de acción.

El péptido intestinal vasoactivo se ha obtenido también a partir del tracto gastrointestinal de pollo (NILSSON, 1974 y 1975) y de res bovina (CALQUIST et al, 1979),

siendo este último igual al porcino en cuanto a su secuencia de aminoácidos, mientras que, el de pollo, se diferencia solamente en cuatro aminoácidos próximos al extremo amino terminal (figura 1).

El VIP se encuentra relacionado estructuralmente con otras hormonas gastrointestinales como la secretina (9 aminoácidos en común), el glucagón (5 aminoácidos comunes) y el péptido inhibidor gástrico (3 aminoácidos idénticos). Es por ello que, junto a estos péptidos se le puede encontrar integrado en el grupo II de hormonas gastrointestinales propuesto por PEARSE (1974) (figura 2). De igual manera, la configuración espacial del VIP que han propuesto BODANSKY et al (1974a), en la que un tramo del péptido se encontraría según una disposición helicoidal, se asemeja a aquellas de la secretina y glucagón (figura 3).

1.2. SINTESIS Y DISTRIBUCION

Al principio se consideraba al VIP como una hormona o péptido de acción exclusivamente intestinal y cuya síntesis se realizaba "in situ". Así, en 1974, POLAK, utilizando antisuero específico, demostró la presencia del péptido prácticamente a todo lo largo del tracto intestinal, concluyendo que eran las células del sistema APUD

	1	10
VIP (porcino) (bovino)	His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-	
VIP (pollo)	His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-	
	11	20
VIP (porcino) (bovino)	<u>Thr</u> -Arg- <u>Leu</u> -Arg-Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-	
VIP (pollo)	<u>Ser</u> -Arg- <u>Phe</u> -Arg-Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-	
	21	28
VIP (porcino) (bovino)	Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser- <u>Ile</u> -Leu- <u>Asn</u> -NH ₂	
VIP (pollo)	Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser- <u>Val</u> -Leu- <u>Thr</u> -NH ₂	

Fig. 1 Secuencia de aminoácidos del VIP porcino, bovino y de pollo. Las diferencias se encuentran en las posiciones 11, 13, 26 y 28.

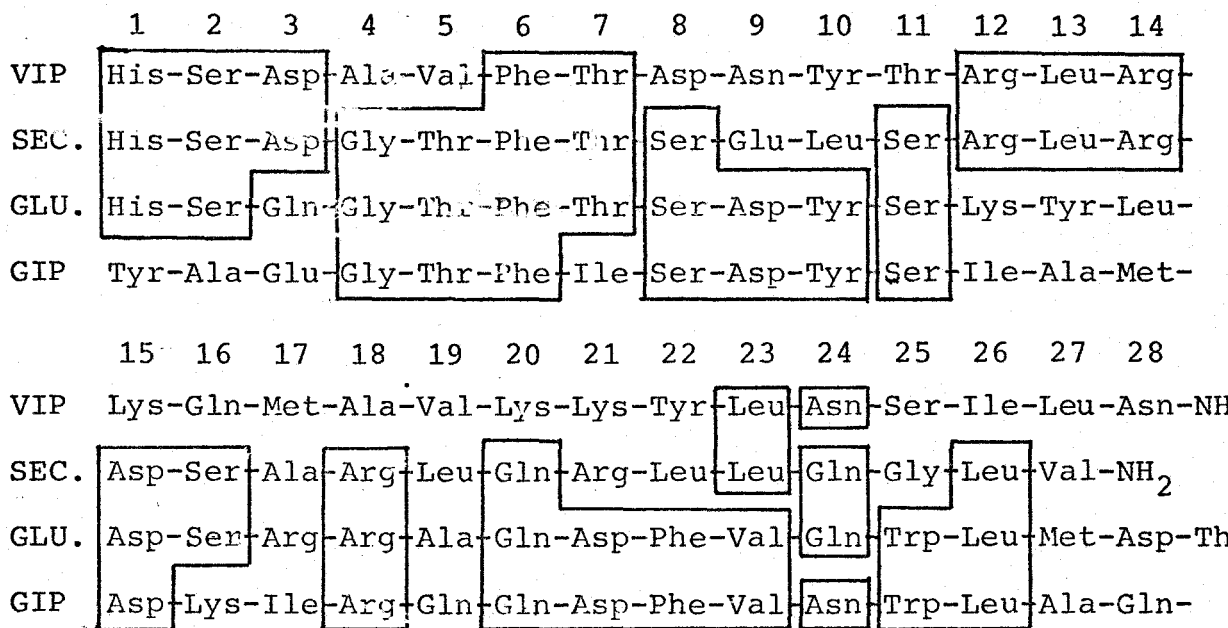


Fig. 2 Secuencia de aminoácidos de VIP, secretina, glucagón y GIP humanos (sólo presentan los primeros 28 aminoácidos del GIP)

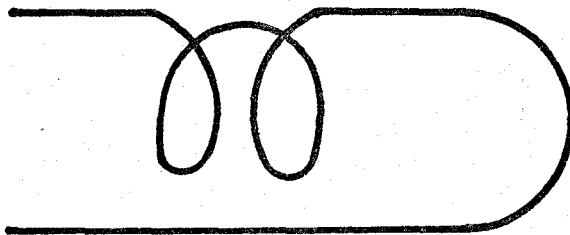


Fig. 3 Modelo propuesto por BODANSKY et al (1974a) para la conformación espacial de la secretina. Estructura muy similar propone el mismo autor para el VIP

(células D según la clasificación de Wiesbaden) las encargadas de su producción. Trabajos similares realizados en intestino (BUFFA et al, 1977) y páncreas (BUFFA et al, 1977) parecían corroborar estos resultados.

Sin embargo, hoy por hoy, la mayor parte de los datos que aparecen en la literatura apuntan a identificar el VIP en terminaciones nerviosas, no solamente en tubo digestivo sino, también, en los más variados sistemas de la economía.

Así pues, a todo lo largo del aparato digestivo se han encontrado abundantes terminaciones "vipérgicas", bien sea a nivel de mucosa, submucosa, musculatura lisa o en la proximidad de vasos sanguíneos (figura 4). Desde glándulas salivales (UDDMAN et al, 1980b), esófago (BESSON et al, 1977; UDDMAN et al, 1978), estómago (LARSSON et al, 1976; BESSON et al, 1977; SUNDLER et al, 1979), intestinos delgado y grueso (LARSSON et al, 1976 y 1979; BESSON et al, 1977; GAGINELLA et al, 1978; DIMALINE y DOCKRAY, 1978; SUNDLER et al, 1979; DIMALINE et al, 1980; COSTA et al, 1980; YANAIHARA et al, 1980; LEANDER et al, 1981; HUTCHINSON et al, 1981) hasta páncreas (LARSSON et al, 1978; SUNDLER et al, 1978; FUJII et al, 1980; NOORDEN y PATENT, 1980) y vesícula biliar (SUNDLER et al, 1977). El origen de estas terminaciones nerviosas se halla en los propios ganglios

VIP inmunoreactivo

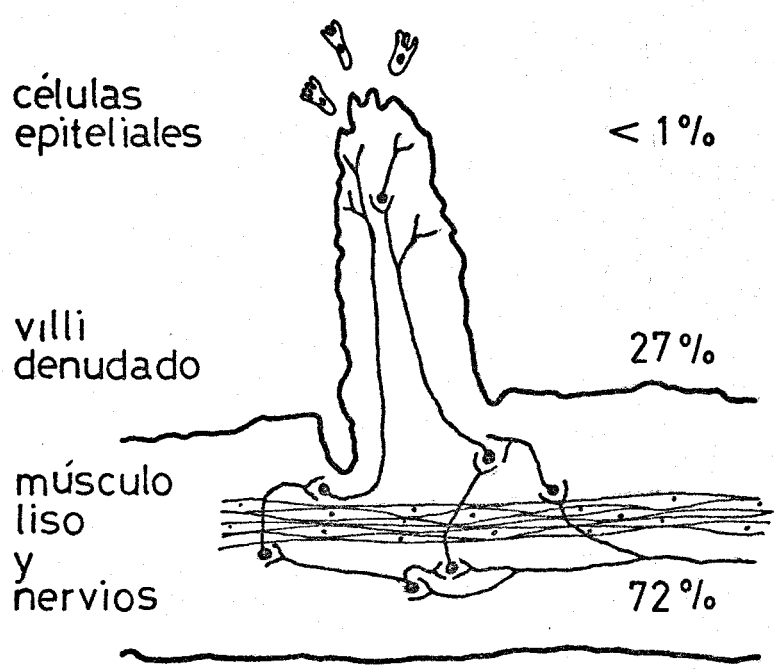


Fig. 4 Distribución del VIP en la pared del tubo digestivo

de los plexos nerviosos gastrointestinales ya que ni la vagotomía ni la simpatectomía modifican la distribución del péptido (LARSSON et al,1976) No obstante, aparte de estas terminaciones nerviosas, existen en la mucosa células endocrinas productoras de VIP o de una substancia que se comporta inmunoreactivamente de forma similar al péptido (LARSSON et al,1979; DIMALINE et al,1980; YANAIHARA et al,1980). Las especies animales estudiadas son muy variadas e incluyen al hombre, cerdo, rata, ratón, perro, cobaya, gato , aves y peces (LARSSON et al,1976 y 1978; UDDMAN et al,1978; SUNDLER et al,1979; COSTA et al,1980).

En el tracto genito-urinario también se encuentran terminaciones nerviosas "vipérgicas", siendo especialmente abundantes a nivel de vejiga, uretra proximal, próstata, vesículas seminales y vasos deferentes en el hombre (VAALASTI et al,1980; ALM et al,1980) y de cérvix uterino a nivel de endometrio y miometrio en la mujer (ALM et al,1980 y 1980a; LARSSON et al,1977; GOODNOUGH et al, 1979; OTTESEN et al,1981). En la gran mayoría de los casos está en estrecha relación con vasos sanguíneos, musculatura lisa de conductos, miometrio y epitelios. Las terminaciones nerviosas dependen de ganglios locales situados en la adventicia que recubre a todas estas estruc-

turas (ALM et al,1977).

La mucosa y submucosa que revisten al tracto respiratorio se encuentran también ampliamente inervadas por terminaciones nerviosas que contienen el péptido, tanto a nivel de vías aéreas superiores (UDDMAN et al, 1978a, 1980 y 1981) como inferiores (UDDMAN et al,1978a; MATSUZAKI et al,1980). Se encuentran preferentemente en la proximidad de los acini de glándulas seromucosas, de vasos sanguíneos y de la musculatura de la pared traqueobronquial. El origen de estas terminaciones se remonta al ganglio pterigopalatino (UDDMAN et al,1980) para la inervación de la mucosa nasal, mientras que para el resto de las vías aéreas depende de ganglios locales distribuidos regularmente en el espesor de la pared traqueobronquial.

De forma similar a los casos anteriores, el músculo esquelético también presenta terminaciones "vipérgicas" que se relacionan preferentemente con la red vascular que irriga al músculo (JARHULT et al,1980).

Recientemente también se han localizado a nivel de la órbita, estructuras periorculares (UDDMAN et al,1980a) y retina (LOREN et al,1980), folículos tiroideos (AHREN et al,1980) y médula adrenal (LINNOILA et al,1980). Por último, a falta del sistema nervioso, otra estructura

la que se ha detectado la presencia de VIP aunque todavía no se hayan descrito sus correspondientes terminaciones nerviosas es la placenta (ATTIA et al, 1976; EBEID et al, 1976b) así como en células libres del tipo de mastocitos (CUTZ et al, 1978; GIACHETTI et al, 1978) y leucocitos polimorfonucleares (O'DORISIO et al, 1980).

Sin embargo, quizás sea el sistema nervioso central el que más se haya estudiado para detectar la presencia de VIP y el que ha revelado resultados más espectaculares (FAHRENKRUG, 1980). Por métodos radioinmunológicos e inmunohistoquímicos, en prácticamente todos los modelos animales antes citados, se ha realizado un estudio sistemático de las diferentes estructuras que forman parte del sistema. Las mayores concentraciones del péptido se localizan en el córtex cerebral y núcleo amigdalino medio (SAMSON et al, 1979; SAID et al, 1976; FUXE et al, 1977; BESSON et al, 1979; LOREN et al, 1979; SIMS et al, 1980). Concentraciones algo menores se localizan en el hipotálamo, área preóptica medial, núcleos peri y paraventriculares, hipocampo (SAMSON et al, 1979; BESSON et al, 1979; SAID et al, 1976) y glándula pineal (BESSON et al, 1979; UDDMAN et al, 1980c). Se detectan niveles en hipófisis (SAMSON et al, 1979; BESSON et al, 1979) acompañando a altas concentraciones del péptido en la circulación portal (SAID y PORTER, 1979), mientras que en cerebro son inapreciables (SAMSON et al, 1979; LOREN et al, 1980).

También se puede identificar en las cercanías de determinadas estructuras vasculares como el plexo coroideo (LINDVALL et al,1978), porción anterior del polígono de Willis y vasos de la piamadre (LARSSON et al,1976a).

A nivel de sistema nervioso periférico el péptido se puede localizar en dos nervios de interés como son el ciático (GIACHETTI y SAID,1979) y el vago (LUNDBERG et al,1979; SAID y ROSENBERG,1976).

El fraccionamiento subcelular de homogenados de las partes del cerebro ricas en VIP muestran que el péptido se concentra preferentemente en la fracción sinaptosomal (terminaciones presinápticas). Esta localización en un sitio tan propicio para que pueda ser acumulado y liberado por estímulos nerviosos guarda estrecha relación con el papel que el VIP pueda jugar como neurotransmisor (GIACHETTI et al,1977; BESSON et al,1979).

Como se puede constatar, la distribución de las terminaciones nerviosas "vipérgicas" es muy amplia. A pesar de todo, hay que hacer notar que estas terminaciones se hallan preferentemente en íntima relación con células epiteliales de función secretora y de transporte (epitelio intestinal, glándulas seromucosas del tracto respiratorio), con musculatura lisa (pared del tubo digestivo, del árbol traqueobronquial y aparato genitourinario) y vasos

sanguíneos (irrigación de los tractos digestivo y respiratorio, musculatura esquelética, sistema nervioso central y aparato genitourinario). Estas localizaciones pueden, "a priori", dar una idea de que las funciones que el péptido intestinal vasoactivo va a cumplir se refieren a la regulación de fenómenos de secreción, del flujo sanguíneo y de la tonicidad de la musculatura lisa. Queda más confuso el hecho de que también se puedan encontrar concentraciones apreciables del péptido en plasma. Se han realizado numerosos radioinmunoensayos para cuantificar su concentración (BLOOM et al, 1973; SAID y FALOONA, 1975; EBEID et al, 1976 y 1978; BURHOL et al, 1978; CHANG et al, 1979) obteniéndose valores en la población normal que oscilan entre 1-5 pM (CHANG et al, 1979; GALBO et al, 1979) y 20-40 pM (BLOOM et al, 1973; SAID y FALOONA, 1975; EBEID et al, 1976). En principio se postuló que la presencia de VIP circulante se debería a un simple fenómeno de rebosamiento a nivel de las terminaciones nerviosas. No obstante, parece que esas concentraciones en plasma podrían elevarse en determinadas condiciones fisiológicas como el ayuno y el ejercicio (GALBO et al, 1979), la acidificación duodenal (BURHOL et al, 1978) y la administración de oxitocina y neostigmina (BITAR et al, 1980), aunque la importancia fisiológica de estos

cambios está aún por dilucidar.

Ocurre algo similar en diversos estados patológicos como enfermedades hepáticas (HUNT et al,1979) o tumores productores de VIP localizados en páncreas, caso del síndrome de Verner-Morrison (VERNER y MORRISON,1958; BLOOM et al,1973; SAID y FALOONA,1975; SHIELD y HAFF,1976) o en otras estructuras como bronquios (SAID y FALOONA,1975) y médula adrenal (SAID y FALOONA,1975; COOPERMAN et al, 1978). También se produce en ganglioneuromas retroperitoneales (FAUSA et al,1973; TRUMP et al,1977; MODLIN et al,1978; HANSEN et al,1980; KAPLAN et al,1980) o mediastínicos (SWIFT et al,1975) y en ganglioneuroblastomas (BLOOM et al,1973; SAID y FALOONA,1975; MITCHELL et al, 1976; RICOUR et al,1977). En estos estados patológicos el incremento de la concentración plasmática de VIP sí tiene un valor desde un punto de vista fisiopatológico ya que suele acompañarse de síndromes diarreicos de difícil tratamiento.

1.3. ACCIONES BIOLÓGICAS

El primer efecto biológico que se le atribuyó al VIP, y por el cual se llegó a conocer su existencia, fue su acción vasodilatadora e hipotensora (SAID y MUTT, 1970). Desde entonces el número de efectos que se le han descrito se ha ampliado considerablemente, sin llegar a saberse todavía de una manera clara cuál es su función principal y cuáles son las circunstancias fisiopatológicas capaces de actuar como reguladores positivos o negativos de su acción.

Como se ha descrito en el apartado anterior, a pesar de la amplia distribución del péptido por toda la economía, este se encuentra especialmente relacionado con glándulas de secreción externa o interna, musculatura lisa y vasos sanguíneos. Va a ser sobre estas estructuras sobre las que actúa fundamentalmente, sin menoscabo de que sea capaz de realizar otras acciones en órganos y tejidos que, en principio, no presentan inervaciones "vipérgicas" como es el caso del hígado y tejido adiposo.

Ahora se pasa a describir ordenada y sistemáticamente los efectos biológicos haciendo hincapié en los aspectos más interesantes.

a) Aparato digestivo

1.-Efecto sobre la musculatura lisa

A nivel esofágico está descrita una acción relajante del VIP sobre la musculatura lisa de la pared (UDDMAN et al,1978) y del esfínter (RATTAN et al,1977; SIEGEL et al,1978; DOMSCHKE et al,1978), pero no en condiciones de reposo, sino tras la contracción producida por carbamilcolina o pentagastrina.

Efectos similares se observan en estómago (KONTUREK et al,1975), intestino (SAID y MAKHLOUF,1974; KACHELOFFER et al,1976) y vesícula biliar (PIPER et al,1970; SAID, 1974; VAGNE y TROITSKOJA,1976; RYAN y COHEN,1977; RYAN y RIAVE,1978) donde, además, el VIP inhibe el efecto estimulante de la contracción que ejerce la colecistoquinina (VAGNE y TROITSKOJA,1976; RYAN y COHEN,1977).

2.- Efecto sobre la función secretora

Quizá sea este efecto el más característico e importante del VIP a nivel del tubo digestivo por sus implicaciones desde un punto de vista fisiopatológico.

En el estómago inhibe la secreción ácida estimulada por pentagastrina (SCHORR et al,1974), ingestión de alimentos (VILLAR et al,1976) o histamina (BARBEZAT y GROSSMAN, 1971). Esta inhibición se acompaña de una reducción del flujo sanguíneo mucoso como se aprecia mediante el acl-

ramiento de aminopirina (KONTUREK et al,1976).

Sin embargo, el VIP estimula de forma dosis-dependiente la secreción intestinal, aumentando el flujo de agua, Na^+ , K^+ y, en especial, de Cl^- hacia la luz del tubo digestivo (BARBEZAT y GROSSMAN,1971; BARBEZAT,1973; SCHWARTZ et al,1974; MAILMAN,1978; WU et al,1979; GUENTER et al,1980; BEUBLER,1980), siendo el efecto más claro a nivel de vevuno que de íleon (BARBEZAT et al,1973). A nivel de la mucosa cólica es también muy ostensible (WALDMAN et al,1977; RACUSEN y BINDER,1977) y tiene especial interés sobre todo en los casos en que el VIP plasmático se encuentra muy elevado (síndrome de Verner-Morrison y otros tumores) ya que explica la presencia de diarreas intratables (BLOOM et al,1973; SEIF et al,1975; SAID y FALOONA,1975; SHIELD et al,1976; COOPERMAN et al, 1978; MODLIN et al,1978a; HANSEN et al,1980).

Con respecto al páncreas la inyección intravenosa de VIP provoca un aumento de volumen de la secreción exocrina con un incremento en la concentración de bicarbonato (SAID y MUTT,1972; KONTUREK et al,1975 y 1976; DIMALINE y DOCKRAY,1979). Este efecto es dosis-dependiente obteniéndose un máximo de respuesta del orden de un 20% al que se obtiene utilizando secretina (DOCKRAY,1973; KONTUREK et al,1975 y 1975a; TOURNUT et al,1977; DOMSCHKE et al,1977). Los resultados se han obtenido utilizando

utilizando mamíferos en los que la secretina es el factor humoral más importante que controla la secreción del páncreas exocrino. Hay que hacer notar que esto no ocurre así en las aves, en la que el VIP es más potente que la secretina para estimular la secreción de jugo pancreático (DOCKRAY, 1973 y 1975; DIMALINE y DOCKRAY, 1979).

Por otro lado, la secreción enzimática no parece modificarse por efecto del VIP en el gato y en el perro (KONTUREK et al, 1975; ROBBERECHT et al, 1977), pero sí en el cobaya y la rata (ROBBERECHT et al, 1977) donde se estimula la secreción de amilasa y lipasa.

Sobre la vesícula biliar el VIP también es capaz de producir un efecto inversor del flujo de absorción, de forma que provoca un aumento de la secreción de agua y electrolitos (KONTUREK et al, 1975; MAKHLOUF y SAID, 1975; MAKHLOUF et al, 1978; JANSSON et al, 1978).

3.- Efecto sobre el flujo sanguíneo

El VIP es un potente vasodilatador de la circulación mesentérica, siendo este uno de los primeros efectos que se conocieron del péptido (SAID y MUTT, 1970a y b) y que ha sido confirmado posteriormente (THULIN y OLSSON, 1973; KACHELOFFER et al, 1974; MAILMAM, 1978; EKLUND et al, 1979). Este efecto es debido a la acción relajante que ejerce sobre la musculatura lisa de la pared vascular.

Un efecto muy similar se ha descrito también para los vasos sanguíneos que irrigan las glándulas salivales (SHIMIZU y TAIRA, 1978).

b) Sistema nervioso central

Es tal vez en el sistema nervioso central donde sea más difícil sistematizar los efectos biológicos del VIP. Por un lado parece estar relacionado con la regulación local del flujo sanguíneo, ya que el efecto relajante y vasodilatador se vuelve a repetir en este sistema (LARSSON et al, 1976a; LINDVALL et al, 1978). Por otro lado parece ejercer cierta función reguladora sobre la liberación de otras sustancias también localizadas en el sistema nervioso central. Así, el VIP inhibe la liberación de somatostatina existente en el hipotálamo medio basal, mientras que no la altera en el hipotálamo anterior, amígdala y córtex (EPELBAUN et al, 1979). Por el contrario, está descrito que estimula la liberación de hormona luteinizante (LH), hormona del crecimiento (GH) y prolactina (PRL) (VIJAYAN et al, 1979). Este fenómeno podría deberse a la acción directa del VIP liberado de neurohipófisis y que se encuentra en concentraciones especialmente elevadas en la sangre del sistema portal hipofisiario (SAID y PORTER, 1979). Efectivamente, el VIP estimula "in vitro" la liberación

de prolactina en estirpes celulares de hipófisis de rata mantenidas en cultivo (GOURDJI et al, 1979; ENJALBERT et al, 1980). En el caso de la hormona del crecimiento no se ha podido obtener ningún resultado similar por lo que se sugiere que el aumento en su liberación provocado por VIP "in vivo" se deba, indirectamente, a la inhibición que previamente ejerce sobre la liberación de somatostatina (hormona que regula negativamente a la GH) (EPELBAUM et al, 1979). Para explicar el mecanismo de la liberación de hormona luteinizante se postula que el VIP provocaría la liberación de LH-RH y que sería esta la que, en última instancia, disparase la liberación de LH (BAMSON et al, 1979).

Poco más puede decirse del papel que el VIP juega en el sistema nervioso. Como puede apreciarse, lo que se conoce de su función a este nivel parece exiguo y confuso en relación con la amplia distribución del péptido en este sistema. No obstante, es presumible que en poco tiempo se vayan desvelando otras acciones que, junto con las ya descritas, den una estructura más coherente a la función biológica del VIP en el sistema nervioso central.

c) Aparato genito-urinario

En el sistema genito-urinario de la mujer se han descrito dos acciones claras del VIP. Por un lado el aumento del

flujo sanguíneo del miometrio (OTTESEN et al,1980) y, por otro, un efecto relajante tanto sobre los esfínteres (WALLES et al,1980) como sobre la masa muscular del miometrio (OTTESEN et al,1980, 1980a y 1981). Además, de una forma indirecta, se ha estudiado el efecto del VIP sobre las células epiteliales del endometrio. Para ello se ha utilizado células en cultivo de una estirpe maligna de carcinoma de cérvix (HeLa) en la que el VIP estimula la producción de AMPc (PRIETO et al,1981). En el hombre, el único efecto comprobado consiste en la contracción de los vasos deferentes (KASTIN et al,1978).

d) Aparato respiratorio

Hasta el momento sólo se conoce que el VIP produce aumento del flujo vascular que irriga la mucosa nasal (MALM et al,1980) y relajación de la musculatura lisa de la pared traqueobronquial (SAID et al,1974; MATSUZAKI et al, 1980).

e) Músculo esquelético

A nivel de la musculatura esquelética, las terminaciones "vipérgicas" se relacionan sobre todo con los vasos que la irrigan, produciendo potente acción dilatadora que permite un aumento del flujo vascular (JARHULT et al,1980). No obstante, se ha descrito una activación de la adenil-

ciclasa de músculo cardíaco por VIP (CHATELAIN et al, 1980 y 1980a), por lo que parece que, a este nivel, el péptido puede jugar un papel singular todavía no muy claro.

f) Secreción endocrina

A nivel de los islotes de Langerhans es bien conocido que el VIP estimula la secreción de insulina y glucagón (SCHEBALIN et al, 1974 y 1977; MAKHLOUF y SAID, 1975; BLOOM e IVERSEN, 1976; KANETO et al, 1977; OHNEDA et al, 1977; JENSEN et al, 1978; ARILLA et al, 1981). Sólo en presencia de glucosa a concentraciones fisiológicas puede potenciarse la secreción de insulina (SCHEBALIN et al, 1977; JENSEN et al, 1978; ARILLA et al, 1981) mientras que la secreción de glucagón se potencia a concentraciones relativamente bajas de glucosa (JENSEN et al, 1978). Recientemente se ha descrito también un efecto estimulante de la secreción de somatostatina por el islote (IPP et al, 1978).

A nivel de corteza de las glándulas suprarrenales parece que el péptido estimula la producción de 20 α -dihidroprogesterona al igual que la ACTH. Esto sólo se ha constatado, por el momento, en cultivos de una línea adrenal como la Y-1 (MORERA et al, 1979).

Mucho más recientemente se ha podido comprobar el efecto estimulador sobre la secreción de hormonas tiroideas (AH-

REN et al,1980).

Estos efectos junto con el papel que el VIP juega en la síntesis y liberación de determinados neuropéptidos (prolactina, etc.) conforman, por el momento, el espectro de acciones del péptido sobre el sistema endocrino.

g) Metabolismo

Es precisamente a nivel de dos órganos o tejidos en los que hasta el momento no se han descrito terminaciones "vipérgicas", como son hígado y tejido adiposo, donde se han descrito dos efectos metabólicos claros del VIP según una actividad similar a la del glucagón. Por un lado estimula la glucogenolisis en hígado (KERINS y SAID,1973) con una potencia del 20-30% la del glucagón, provocando hiperglucemia. Por otro, estimula la lipolisis en adipocitos de rata (DESBUQUOIS et al,1973; FRANSEN y MOODY,1973; SAITO et al,1978).

La glucolisis la puede también estimular en células en cultivo (HT-29) de carcinoma de colon (ROUSSET et al,1981).

En resumen, las acciones biológicas del VIP son muy variadas y cada día más numerosas. Es pues necesario, aunque hoy por hoy parece lejano, establecer un orden de prioridades con respecto al valor fisiológico y real de cada uno de estos fenómenos, así como llegar a integrarlos según un modelo funcional coherente.

1.4. MECANISMO DE ACCION

Se podría definir el mecanismo de acción de una hormona a la forma particular en que interacciona con una determinada célula diana sobre la que induce una serie de cambios metabólicos (activación de enzimas) que van a dar como resultado final un efecto biológico. En este sentido, hasta lo que se conoce, para el VIP se pueden diferenciar tres etapas:

- a) Interacción del péptido con receptores específicos situados en la membrana plasmática de la célula diana.
- b) Activación de un sistema adenilciclasa que se encuentra acoplado funcionalmente al receptor.
- c) Activación de un sistema de quinasas que depende de la presencia de AMPc.

Además de estas tres etapas, expuestas según los esquemas clásicos del mecanismo de acción hormonal (figura 5), hay que valorar el papel que los guanilnucleótidos juegan en este proceso utilizando como referencia el modelo propuesto por RODBELL (1980) para el glucagón y que puede hacerse extensivo en gran medida para el VIP.

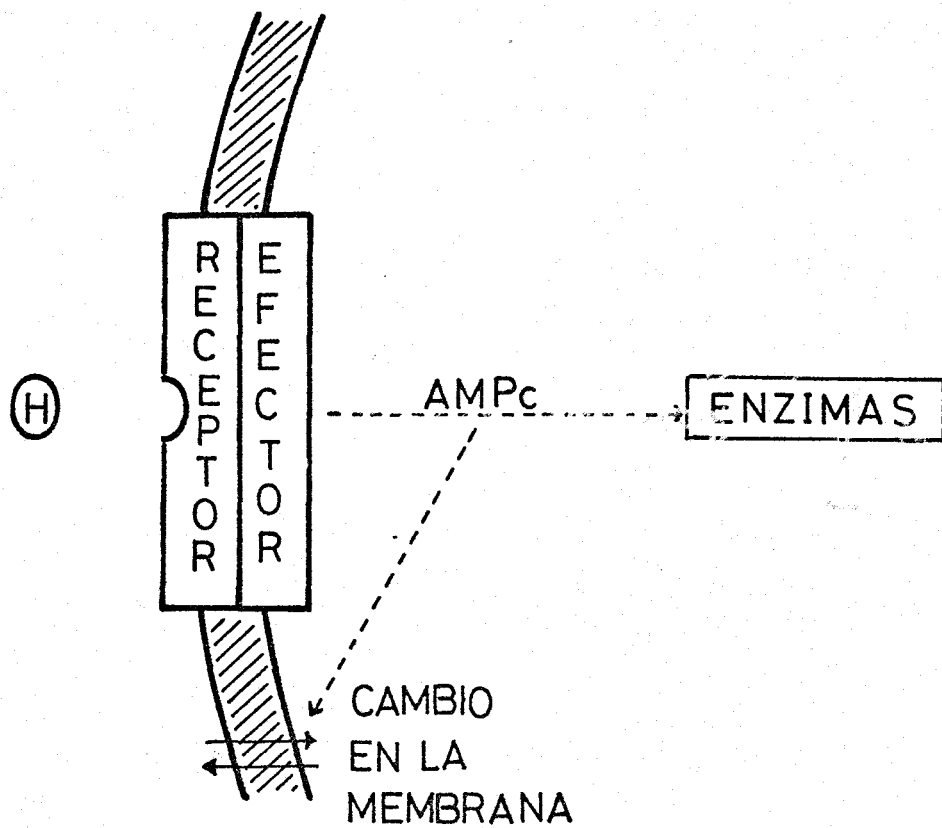


Fig.5 Esquema general de acción de hormonas polipeptídicas (FREYCHET, 1976).

a) Receptores para VIP

Como otras hormonas peptídicas, el VIP se une a receptores situados en la membrana plasmática de las células diana. Esta interacción hormona-receptor cumple las propiedades descritas por FREYCHET (1976) en cuanto a afinidad, reversibilidad, saturabilidad, especificidad y acoplamiento a un efecto biológico.

El número de estirpes celulares en los que se ha caracterizado este receptor es muy amplio, utilizando como modelo experimental membranas plasmáticas purificadas o células intactas. Así se han estudiado a todo lo largo del epitelio del tubo digestivo (PRIETO et al, 1979; LABURTHE et al, 1977 y 1979; AMIRANOFF et al, 1980; BINDER et al, 1980; BROYART et al, 1981), hígado (DESBUQUOIS et al, 1974; BATAILLE et al, 1974, 1975 y 1977; GUERRERO et al, 1981), páncreas exocrino (CHRISTOPHE et al, 1976; GARDNER et al, 1977), epitelio de la vesícula biliar (DUPONT et al, 1981) y tejido adiposo (BATAILLE et al, 1974 y 1975).

También se han caracterizado en membranas cerebrales de áreas conocidas por ser ricas en el péptido, incluyendo corteza cerebral, hipotálamo, hipocampo, cuerpo estriado y tálamo (TAYLOR y PERT, 1979; ROBBERECHT et al, 1978 y 1979; BATAILLE et al, 1979), en células de una línea adrenal (Y-1) de ratón (MORERA et al, 1979) y en células tumorales

cultivadas de carcinoma de cérvix uterino (HeLa) (PRIETO et al,1981) y de colon (HT-29 y HRT-18) (LABURTHE et al, 1978).

Salvo en contadas ocasiones (TAYLOR y PERT,1979; BINDER et al,1980; DESBUQUOIS et al,1974) siempre se describe para todas las estirpes celulares estudiadas la existencia de dos tipos de receptores para VIP en la membrana celular. Uno es de alta afinidad (Kd 0'5-4.0 nM) y otro de baja afinidad (Kd 50-200 nM) (CHRISTOPHE et al,1976; GARDNER et al,1977; ROBBERECHT et al,1978 y 1979; PRIETO et al,1979 y 1981; AMIRANOFF et al,1980; BROYART et al, 1981; GUERRERO et al,1981). Como se verá más adelante, posiblemente sólo los receptores de alta afinidad estarían acoplados al sistema adenilciclase.

Debido a la analogía estructural del VIP con la secretina, el primero puede unirse también al receptor de secretina y, a la inversa, la secretina al receptor de VIP, aunque con una afinidad del orden de 100 veces menor que cuando se une cada hormona a su receptor específico (CHRISTOPHE et al,1976; GARDNER et al,1977; PRIETO et al, 1979 y 1981; GUERRERO et al,1981).

También es de interés valorar en el estudio de receptores si estos se modifican, bien en su número, bien en cuanto a su afinidad, en determinadas condiciones fisiopatoló-

gicas. Aparentemente los receptores de VIP en la rata van aumentando progresivamente desde el nacimiento hasta estabilizarse a las dos semanas de edad (ROBBERECHT et al,1979). A partir de ahí no se ha encontrado circunstancia alguna que los modifique aunque se ha buscado algún estado fisiológico propicio como es el ayuno (PRIETO et al,1980). Incluso en líneas tumorales en cultivo (HT-29) los receptores permanecen con las mismas características estequiométricas (LABURTHE et al,1978 y 1980).

b) Activación del sistema adenil ciclasa

El acoplamiento del VIP a su receptor activa el complejo enzimático de la adenil ciclasa, de forma que se produce un aumento de la concentración intracelular de AMPc. El AMPc se puede considerar, por lo tanto, como el segundo mensajero de este sistema peptidérgico.

El aumento de AMPc por acción del VIP está descrito en muchos sistemas celulares, incluso en algunos para los que no se han caracterizado todavía los receptores. Así podemos citar el epitelio del tubo digestivo (SCHWARTZ et al,1974; LABURTHE et al,1977 y 1979a; WALDMAN et al, 1977; AMIRANOFF et al,1978; SIMON y KATHER,1978; DUPONT et al,1980 y 1980a; BEUBLER et al,1980) y las fibras mus-

culares lisas del yeyuno-íleon (COHEN et al,1980), hígado (DESBUQUOIS et al,1973; BATAILLE et al,1974; RAMIREZ-CARDENAS et al,1981), tejido adiposo (BATAILLE et al, 1974; DESBUQUOIS et al,1973), células acinares pancreáticas (GARDNER et al,1974; ROBBERECHT et al,1976), epitelio de vesícula biliar (DUPONT et al,1981), musculatura lisa de la tráquea (FRANDSEN et al,1978), músculo cardíaco (CHATELAIN et al 1979,1980 y 1980a), retina (SCHORDERET et al,1981), sistema nervioso central (DESCHODT-LANCKMAN et al,1977; BATAILLE et al,1979; CALKER et al, 1980; KANEKO et al,1980) y líneas celulares en cultivo de carcinomas de colon (LABURTHE et al,1978 y 1980) y de cérvix uterino (PRIETO et al,1981).

En la mayor parte de los casos estudiados el efecto del VIP es dosis-dependiente, obteniéndose la mitad de la estimulación máxima (K_m) a una concentración del péptido entre 0'2 y 5'0 nM, según las estirpes celulares. Estos valores son muy similares a los de la constante de disociación (K_d) de los receptores de alta afinidad para las mismas células por lo que se postula que sólo estos receptores están acoplados al sistema adenil ciclasa y por consiguiente son capaces de continuar la cascada de reacciones que culmina con el efecto biológico (LABURTHE et al,1979a; PRIETO et al,1981; RAMIREZ-CARDENAS et al,1981).

c) Activación de quinasas

El AMPc producido bajo el estímulo del péptido intestinal vasoactivo es capaz de activar a determinadas proteínas quinasas que presumiblemente catalizarán la fosforilización de otras proteínas intracelulares.

La caracterización de estas proteínas quinasas se ha llevado a cabo, hasta el momento, en células aisladas de epitelio intestinal de rata (LABURTHE et al, 1979b) y en las líneas tumorales en cultivo (HT-29 y HRT-18) que derivan de carcinomas de colon y recto (LABURTHE et al, 1979b; MANGEAT et al, 1981).

El rango de concentraciones de VIP que provoca esta activación (K_m 0'1-1 nM) es en todos los casos similar a la que permite la producción de AMPc (K_m 0'2-5'0 nM) y a la constante de disociación de los receptores de alta afinidad (K_d 0'5-4'0 nM). Esto parece indicar que ciertamente las tres etapas están acopladas en cadena según el postulado clásico para el mecanismo de acción general de hormonas peptídicas.

Tanto la continuidad de esta cadena, como de otras posibles vías alternativas, que permita enlazar la unión del péptido al receptor con su efecto biológico final permanece todavía en la obscuridad, de forma similar a lo que ocurre con otras hormonas peptídicas.

d) Acoplamiento receptor-efector.

Ya en 1971 RODBELL et al. observaron la implicación de los guanil nucleótidos (fundamentalmente GTP) en el acoplamiento de receptores hormonales con la adenilato ciclasa, utilizando un sistema de glucagón y membranas plasmáticas aisladas de hígado de rata. Después de una serie numerosa de trabajos sobre este tema, se ha podido llegar a la conclusión (ABRAMOWITZ et al., 1979; RODBELL, 1980) de que existen proteínas reguladoras en la membrana celular que se unen específicamente a GTP y dan lugar al acoplamiento entre los receptores y la adenilato ciclasa, originándose una estimulación (glucagón, ACTH, catecolaminas vía receptores β -adrenérgicos, etc.) o una inhibición (catecolaminas vía receptores α -adrenérgicos, opiáceos, agentes colinérgicos vía receptores muscarínicos, etc.) de la producción de AMPc.

En la cara externa de la membrana está localizado el receptor (R) que se une específicamente a hormonas o neurotransmisores. En la cara interna de la membrana está la unidad catalítica (C) y el componente regulador (N), conteniendo este último un sitio de unión para el GTP (fig. 6). Se han logrado distinguir funcionalmente dos tipos de proteínas reguladoras N: unas que actúan activando la adenilato ciclasa (Ns) y otras que la inhiben (Ni), siempre con intervención del GTP. Cada tipo parece estar unida a clases separadas de receptores

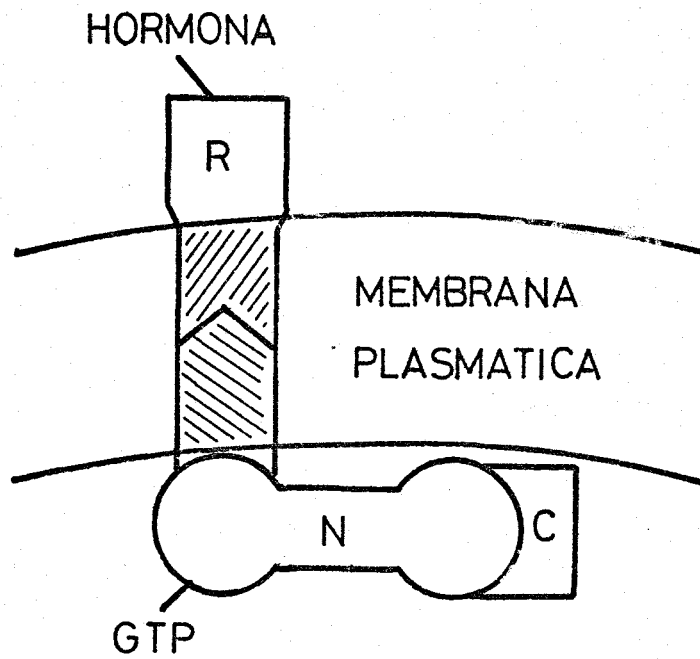


Fig. 6 Esquema del modelo del sistema receptor-efector propuesto por RODBELL (1980).

para hormonas y neurotransmisores.

En estado de reposo, los receptores de membranas (R) se encontrarían formando complejos oligómeros con dichas proteínas GTP-dependientes (N), impidiendo a éstas que se unieran a GTP; al unirse la hormona a su receptor se provocaría una disociación del oligómero en monómeros, lo que permitiría la unión del GTP a las citadas proteínas reguladoras, que interaccionarían posteriormente con la adenil ciclase (C) para quedar formado el holoenzima activo (fig. 7). Dependiendo del tipo de proteína reguladora unida a C, el holoenzima dará lugar a un aumento o disminución de la producción de AMPc.

Previamente a la hipótesis de conjunto planteada por RODBELL (1980), existía confusión en la literatura en cuanto a la posibilidad de que hubiera dos tipos de subunidades reguladoras N, ambas dependientes de GTP, una (N_1) unida al receptor y la otra (N_2) a la adenilato ciclase.

La existencia de estas dos unidades, N_1 y N_2 , se postuló a partir de estudios sobre preparaciones de membranas solubilizadas con detergentes, con posterior separación por filtración del complejo hormona-receptor y del enzima (WELTON et al. 1977). Ambas formas separadas (receptor y enzima) permanecían sensibles a los efectos de los guanil-nucleótidos, lo que parece indicar que el

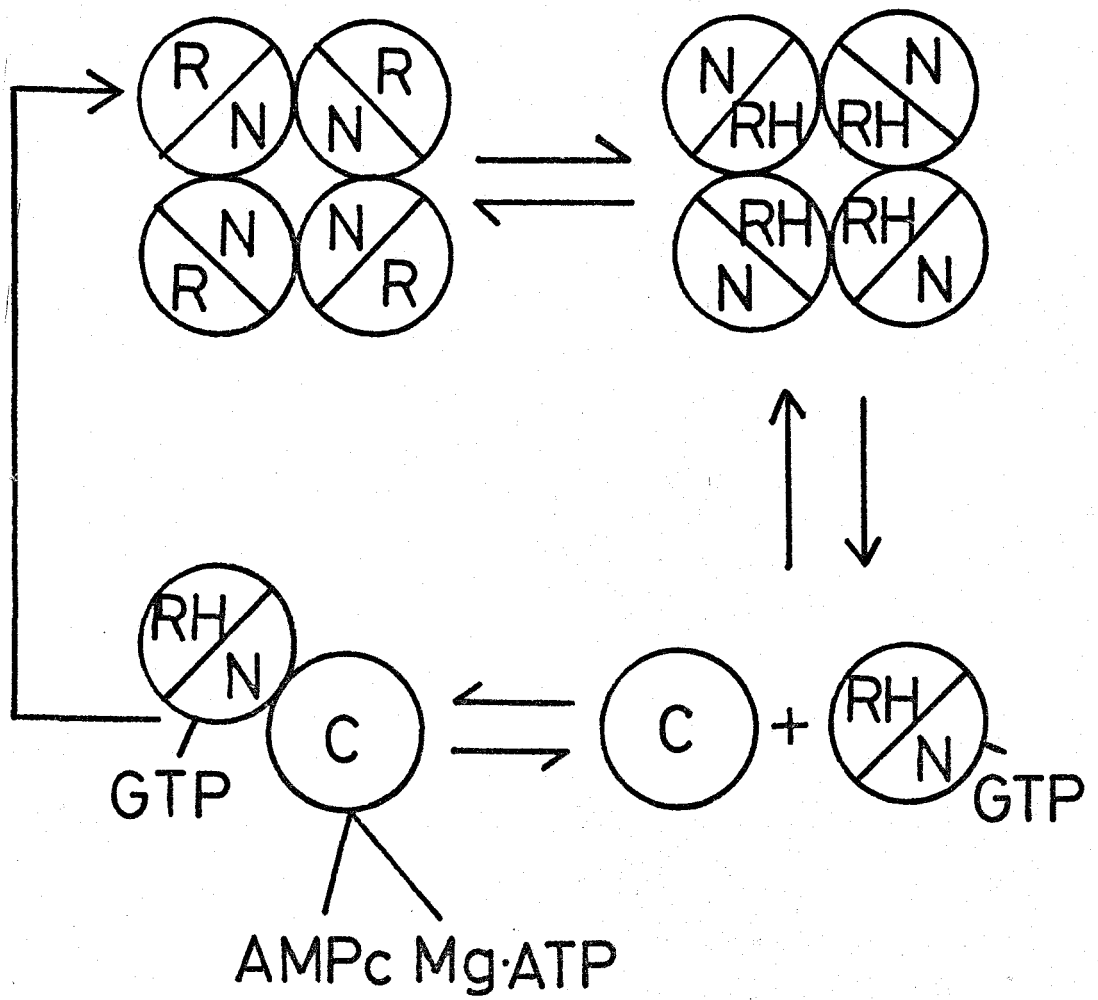


Fig. 7 Fases de la interacción hormona-receptor-efector según RODBELL (1980).

receptor estaría asociado a un regulador N_1 distinto del unido a la unidad catalítica N_2 .

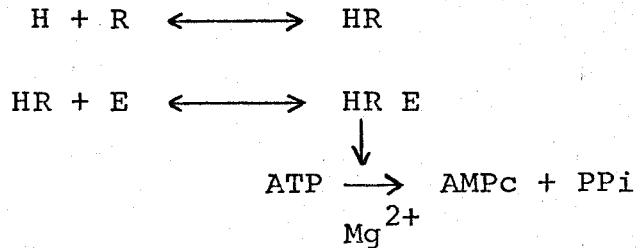
Otros trabajos (LAD et al. 1977) han demostrado diferencias en las propiedades funcionales de N_1 y N_2 . Estas son las siguientes:

- 1.- Las afinidades aparentes de los análogos del GTP para N_1 eran mucho mas bajas que para N_2 .
- 2.- Los quelantes inhiben la acción de los guanil nucleótidos en N_2 pero no en N_1 .
- 3.- La fosfolipasa C suprime la acción del GTP sobre N_2 pero no sobre N_1 .

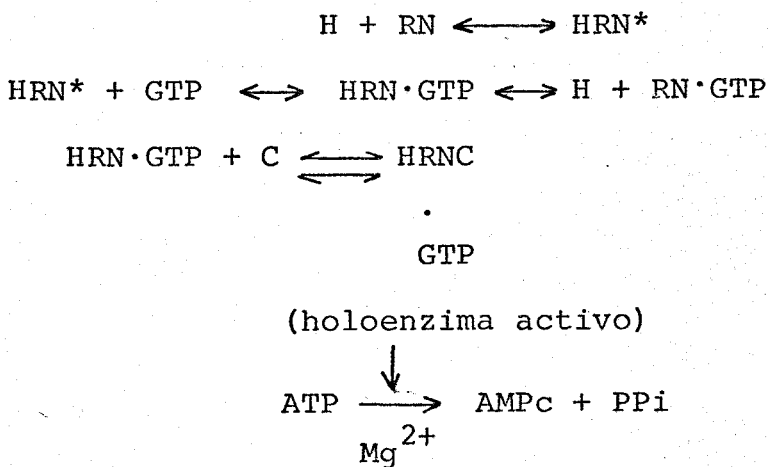
Estos descubrimientos indican diferencias estructurales en los sitios de unión del GTP, pero no prueban que N_1 y N_2 sean proteínas diferentes. Por ejemplo, es posible que N_1 y N_2 sean proteínas idénticas que presentan propiedades funcionales y estructurales diferentes cuando se unen a receptor y enzima respectivamente. Las diferencias podrían explicarse proponiendo la existencia de formas heterogéneas de N asociadas con los restantes componentes del sistema (RN, NC, RNC) que tuvieran diferentes propiedades en cuanto a la afinidad y acción de los guanil nucleótidos.

El modelo clásico de mecanismo de acción hormonal aceptado durante años propone que la hormona (H) se une a su receptor específico (R) formándose el complejo

hormona-receptor (HR), siendo éste el responsable de la activación de la adenil ciclasa (E) con la consiguiente producción de AMPc:



Sin embargo, el modelo general, propuesto por RODBELL, de las acciones de hormonas y GTP sobre efectores tales como adenil ciclasa (u otros) se puede esquematizar del siguiente modo:



donde la unión de la hormona al receptor da lugar a la activación de N a una forma N* capaz de unirse a GTP, con la formación de un complejo HRN·GTP que se acopla con C para formar el holoenzima activo. Debido a efectos heterotrópicos negativos del GTP, disminuye la afinidad del receptor hacia la hormona cuando N se une al GTP.

Aunque para el receptor-efector de VIP no se ha caracterizado la subunidad N, sin embargo, si se ha podido comprobar que el GTP fundamentalmente, potencia la acción del VIP como estimulante de la producción de AMPc así como su efecto heterotrópico negativo sobre el receptor, disminuyendo su afinidad hacia el péptido (AMIRANOFF et al., 1980a; RAMIREZ-CARDENAS et al., 1981).

1.5. EL VIP COMO NEUROTRANSMISOR.

El patrón de distribución y de liberación del VIP sugiere que no es una hormona en el sentido clásico de BAYLISS y STARLING (1904) sino que actúa como un agente paracrino o un modulador de la actividad neuronal intrínseca. La idea de que un péptido pueda actuar como neurotransmisor no es nueva. Ya en el año 1931, VON EULER y GADDUN identificaron un péptido activo fisiológicamente, la sustancia P, en sistema nervioso central y periférico. Posteriormente se han encontrado otros también activos como la angiotensina II, TRH, LHRH, oxitocina, ACTH, somatostatina, etc. (BARKER, 1976; HORFELT et al., 1978).

Ahora bien, para establecer el papel neurotransmisor o neuromodulador del VIP, éste debe satisfacer una serie de requisitos presentes en todos los neurotransmisores. La evidencia experimental demuestra que los cumple

en gran medida (SAID et al, 1980; GAGINELLA y O'DORISIO, 1979; FAHRENKRUG, 1980). Son los siguientes:

a) Distribución selectiva en el sistema nervioso

Como se ha expuesto en los capítulos anteriores, la distribución del péptido intestinal vasoactivo en el organismo se restringe básicamente al sistema nervioso central o terminaciones nerviosas en la periferia. En el sistema nervioso central se localiza preferentemente en unas zonas bien delimitadas (corteza cerebral, núcleos del hipotálamo, etc.) mientras que, periféricamente, se encuentra en terminaciones nerviosas y plexos que inervan al tubo digestivo, páncreas, vesícula biliar, sistema urogenital, árbol traqueobronquial, etc., así como en ganglios simpáticos y nervios vago y ciático.

b) Acumulación en la terminación presináptica

El fraccionamiento subcelular de homogenados de corteza cerebral, hipotálamo y cuerpo estriado de rata demuestra que el VIP se concentra fundamentalmente en la fracción rica en sinaptosomas (GIACHTTI et al, 1977; BESSON et al, 1979).

c) Transporte axonal

Recientemente se ha demostrado que el VIP se acumula en el nervio ciático de forma proximal a la ligadura que

se efectúe sobre él (GIACHETTI y SAID, 1979). El aumento continuaba progresando hasta 72 horas después de la ligadura.

d) Liberación por estímulos fisiológicos

1. La despolarización conseguida con K^+ (55 nM), en presencia de Ca^{2+} , provoca la liberación del VIP de sinaptosomas (GIACHETTI et al, 1977)

2. El péptido es también liberado por estimulación eléctrica del nervio vago (FAHRENKRUG et al, 1978), distensión del "fundus" gástrico (CHAYVIALLE et al, 1980), estimulación mecánica de la mucosa intestinal y por infusiones de agentes colinérgicos (BITAR et al, 1980) y oxitocina (BITAR et al, 1980).

3. Además está el interesante hecho de que la concentración de VIP en la sangre portal hipofisiaria es considerablemente mayor que la sangre periférica (SAID y PORTER, 1979), lo cual induce a pensar que el hipotálamo libera el péptido a dicha circulación.

e) Efecto sobre el cerebro y la función neuroendocrina

1. Excitación de neuronas en la corteza cerebral de la rata (PHILLIS et al, 1978).

2. Despertar de perros anestesiados monitorizados con electroencefalograma (SAID et al, 1980).

3. Estimulación dosis-dependiente de la actividad adenil ciclasa en la glándula pineal (ROBBERECHT et al, 1978;

KANEKO et al,1980).

4. Estimulación de la actividad adenil ciclasa de homogenados de corteza cerebral, hipotálamo, hipocampo y corteza cerebelar (DESDOCHT-LANCKMAN et al,1977; BATAILLE et al,1979; KANEKO et al,1980).

5. Liberación de prolactina por la hipófisis (GOURDJI et al,1979; VIJAYAN et al,1979; ENJALBERT et al,1980).

6. Aumento del flujo sanguíneo en la materia gris cerebral (HEISTAD et al,1980).

7. A grandes dosis, inyectado en el sistema ventricular, produce hipertermia (CLARK et al,1978).

f) Presencia de receptores específicos en membranas de cerebro

El VIP se une específicamente y con alta afinidad a receptores de membrana cerebrales (TAYLOR y PERT,1979; ROBBERECHT et al,1978 y 1979; BATAILLE et al,1979). Generalmente hay una buena correlación entre la distribución del receptor y la localización del péptido.

g) Degradación

El VIP una vez liberado es degradado con una velocidad directamente proporcional a su concentración. Eso sugiere la existencia de un sistema enzimático que lo degrada específicamente (FAHRENKRUG, 1980).

h) Antagonistas

Quizás la única propiedad que le falta por cumplir al VIP para ser un verdadero neurotransmisor sea el que se encuentre un antagonista fisiológico. No obstante, aunque no está definitivamente comprobado, pudiera ser la somatostatina la que cumpla esa función (FAHRENKRUG, 1980).

En resumen, por todo lo expuesto parece bastante probable la hipótesis de que el VIP sea un neurotransmisor tanto en sistema nervioso central como periférico. Pero todavía queda mucho trabajo experimental que lo confirme y, sobre todo, que le de un sentido coherente a lo que quizás sea el aspecto más importante del problema: el papel fisiológico que el péptido juega en la economía.

2. CELULAS MONONUCLEARES SANGUINEAS

2.1. CONCEPTO Y CLASIFICACION

Frente al concepto de eritrocito, hematíe o glóbulo rojo, que es el elemento forme de la sangre encargado del transporte de oxígeno y anhídrido carbónico, y que es de color rojo debido a su contenido en hemoglobina, se opone el concepto de leucocito o glóbulo blanco. Bajo esta denominación se engloba una gran cantidad de tipos celulares con diferente significación fisiológica, aunque de una forma u otra, orientada hacia la defensa del organismo contra un agente externo físico, químico o biológico que penetre al interior del mismo.

Los leucocitos se dividen atendiendo a sus peculiaridades citomorfológicas en:

1) Polimorfos nucleares: Comprende tres tipos fundamentales que son los neutrófilos, basófilos y eosinófilos. Tienen su origen en la médula ósea y su función fundamental consiste en acudir a zonas donde se produce una reacción inflamatoria (quimiotaxis). Mediante el proceso de fagocitosis, de una forma muy inespecífica, elimina al agente causal de la inflamación.

2) Mononucleares: Comprende dos estirpes celulares distintas pero que tienen propiedades citomorfológicas afi-

nes.

a. Linfocitos: Que tienen su origen en ganglios linfáticos, bazo, timo, placas de Peyer, etc., y están encargados de una forma de defensa del organismo mucho más específica como es la inmunidad.

b. Monocitos: Tienen su origen en médula ósea y su actividad principal es de tipo fagocitario.

2.2. LINFOCITOS

El linfocito es definido por los hematólogos como una célula redonda (7-12 μ de diámetro) con escaso citoplasma. El núcleo es redondo, algunas veces mellado, con la cromatina dispuesta en burdos gránulos y sin que se aprecie el nucleolo. Existen muchos tipos de linfocitos en cuanto a tamaño, funciones, propiedades citoquímicas, metabólicas, capacidad de migración, vida media, potencial inmunológico, etc. Pero es muy difícil hacer una clasificación clara de los mismos, ya que un mismo linfocito puede modificar tanto su tamaño como su actividad metabólica y el resto de las características antes mencionadas.

a) Propiedades

1. Capacidad de migración: Una gran cantidad de linfocitos está continuamente circulando entre médula ósea,

bazo, nódulos linfoides, placas de Peyer, etc., utilizando como vías la circulación sanguínea y linfática. Después de la inyección intravenosa de linfocitos marcados con timidina tritiada, GOWANS y KNIGHT (1964) encontraron en ratas que, 24 horas después, prácticamente todos los nódulos linfoides contenían células marcadas. Se encontraban en la zona media y parte profunda de la corteza sin penetrar en los centros germinales. En el bazo, la localización de los linfocitos marcados era alrededor de la arteriola central. No se encontraron en timo de ratas adultas pero sí en recién nacidas. También se encontraron en placas de Peyer y médula ósea. Otras experiencias similares las llevaron a cabo HALL y MORRIS (1965) en nódulos linfoides poplíteos intactos de oveja. Cuando los nódulos se perfundían con timidina tritiada en forma continua se podía demostrar que, estando el nódulo sin estimular, no más del 4% de los linfocitos que salían por el conducto eferente estaban producidos en el nódulo. Eso quiere decir que el 96% restante son células que van circulando de un nódulo a otro. Por todo esto se pudo afirmar que los linfocitos viajan de unos nódulos a otros, permanecen un tiempo en ellos y continúan circulando. Ahora se sabe que la mayoría de la población recirculante está compuesta por linfocitos

derivados del timo (T) (LING y KAY, 1975). Los linfocitos no-T también recirculan pero su modelo de migración todavía no está bien definido.

2. Vida media: Es tan difícil mantener linfocitos vivos "in vitro" que parece sorprendente que estos tengan una vida media tan larga en el organismo. Utilizando también timidina tritiada como marcador, se ha podido conocer la vida media aproximada de los linfocitos. Hay que decir que en este caso son muy variadas las posibilidades. Mientras que por término medio los linfocitos tienen una vida media de 2-3 meses (LITTLE et al, 1962), hay linfocitos de vida más corta (1-2 semanas) y, otros, que pueden durar incluso años (KOSTER y MAC GREGOR, 1970).

b) Subpoblaciones

Los linfocitos se dividen fundamentalmente en dos tipos celulares:

1. Linfocitos B: que derivan de la "bursa" de Fabricio en las aves y que tienen la capacidad de transformarse en células plasmáticas después de un estímulo antigénico y producir posteriormente anticuerpos. En los mamíferos derivan de un precursor en la médula ósea que migra a tejidos linfoides periféricos sin pasar a través del timo.

2. Linfocitos T: Son linfocitos timo-dependientes. No tienen la capacidad de transformarse en células productoras de anticuerpos, sino que están especializadas en lo que se denomina inmunidad celular. Posiblemente derivan de una célula precursora de la médula ósea que posteriormente migra al timo donde madura y se transforma sufriendo un rápido proceso de división celular, quedando convertido en una célula pequeña que va a desarrollar su actividad en la inmunidad celular y, al mismo tiempo, por un mecanismo todavía desconocido, permite o facilita que las células B sean capaces de producir anticuerpos. Esto quiere decir que es necesaria la presencia de linfocitos T para que pueda expresarse la inmunidad humoral (MILLER et al, 1971; CLAMAN et al, 1972).

c) Marcadores de linfocitos B y T

Desde que se conoce la existencia de los dos tipos de linfocitos se han buscado muchos medios para permitir diferenciar a unos de los otros. Así pues, los linfocitos B tienen altas concentraciones de inmunoglobulinas en la superficie externa de su membrana, pudiendo ser detectadas con fluoresceína conjugada con un anticuerpo anti-inmunoglobulina, haciéndolos fácilmente distinguibles de los linfocitos T. (LING y RAY, 1975). Otros mar-

cadorees específicos para las células B son el antígeno MBLA de linfocito de ratón y un receptor para el complejo antígeno-anticuerpo-complemento (EDEN et al,1971).

Los linfocitos T se pueden también diferenciar fácilmente debido a la capacidad que tienen de formar rosetas con hematíes de carnero (JONDAL et al,1972). Además hay en la superficie celular antígenos como el θ (RAFF y CANTOR, 1971) también específicos para las células T. Los linfocitos T humanos han sido también clasificados en distintas subpoblaciones atendiendo a la presencia en su superficie de receptores para IgM (células T_{μ}), IgG Fc (células T_{γ}), IgA (células T_{α}) (MORETTA et al,1978; LUM et al,1979; GUPTA et al,1979). Todos ellos tienen distintas características morfológicas, contenido en RNA, respuesta a mitógenos, migración y propiedades inmunoregulatoras y citotóxicas.

Por último, hay determinadas células que carecen tanto de marcadores para T y para B (STOBO et al,1973) cuyo significado fisioinmunológico todavía no es conocido.

d) Receptores para hormonas peptídicas

El primer intento de caracterizar receptores para hormonas peptídicas en linfocitos fue llevado a cabo con insulina (GAVIN et al,1972). Sin embargo, posteriormente, se comprobó que el receptor se encontraba exclusivamente en monocitos (SCHWARTZ et al,1975).

Desde entonces, los intentos de encontrar receptores en linfocitos circulantes ha fracasado. Sin embargo, en líneas en cultivo de células linfoides tumorales sí se han encontrado receptores para insulina (GAVIN et al, 1973), hormona del crecimiento (LESNIAK et al, 1974), somatomedina (ROSENFELD et al, 1980) y calcitonina (MARX et al, 1974).

Sólo en el presente año, BHATHENA et al (1981) han caracterizado el receptor de somatostatina en linfocitos circulantes. Este dato es de interés para el presente trabajo ya que la somatostatina, al igual que el VIP, se ha aislado en sistema nervioso, y su función en la circulación general todavía no está clara.

En general, estos resultados describen un fenómeno aislado ya que el papel fisiológico de estos receptores en los linfocitos es desconocido, a menos que se consiga relacionar con su capacidad de alterar los niveles de AMPc u otro nucleótido, y de la importancia que esta alteración tenga en el metabolismo linfocitario.

e) AMPC y linfocitos

La acción de algunas, pero no todas, hormonas peptídicas en sus células diana está mediada por un "segundo mensajero", el AMPc (ROBINSON et al, 1968). Este componente se sintetiza a partir de ATP por el enzima adenil cicla-

sa, localizado en la membrana plasmática. La degradación de AMPc a AMP está catalizada por una fosfodiesterasa localizada, al menos en linfocitos, en la membrana nuclear (COULSON y KENNEDY, 1971).

Muchos han investigado el papel que el AMPc juega en la activación linfocítica y en su proliferación celular. Utilizando AMPc, dibutiril AMPc, teofilina y otros agentes que aumentan las concentraciones intracelulares de AMPc (isoproterenol, catecolaminas, etc.) se ha comprobado que el nucleótido tiene un efecto inhibitor sobre la estimulación linfocítica por PHA (fitohemaglutinina), no ejerciendo ningún efecto sobre linfocitos en reposo (SMITH et al, 1971; HIRSCHHORN et al, 1970). Esta inhibición no parece ser específica para el AMPc sino que se extiende también a AMP, ADP, ATP y adenosina (SMITH et al, 1971a).

Sin embargo, la actividad adenil ciclasa en linfocitos estimulados por PHA está aumentada al principio (SMITH et al, 1971; KRISHNARAJ y TALWAR, 1973), aunque otros autores defienden que está inhibida (MAKMAN, 1971) o que no la afecta (NOVOGRODSKY y KATCHALSKY, 1970).

La conclusión que quizás se puede extraer de estos datos es que si el AMPc estimula la activación linfocitaria, no lo hace "per se", sino que requiere la presencia de

otros factores hasta ahora no conocidos.

Más recientemente la controversia ha continuado ya que BOYNTON y WHITFIELD (1979) defienden que el Ca^{2+} y el AMPc producen un fuerte aumento de la actividad mitótica en linfoblastos tímicos, mientras que FOKER et al (1979) concluyen que el AMPc se puede comportar como un regulador positivo o negativo de la mitosis. Al comienzo de la estimulación se produciría un aumento rápido y breve de los niveles de AMPc (fase G_0-G_1). Posteriormente se produciría una nueva elevación de AMPc intracelular (fase G_1-S) de duración algo mayor y que podría acompañarse de una fosforilización de proteínas que permitiría la progresión de la mitosis. Durante la síntesis de DNA (fase S) el AMPc estaría disminuido de nuevo. Así pues, el nucleótido puede actuar permitiendo en determinados momentos el proceso mitótico pero, cuando aumenta su concentración en un momento no conveniente para la célula, por el contrario, podría comportarse como un potente inhibidor. (figura 8).

Sobre otro tipo de actividad inmunitaria, el AMPc es capaz de inhibir la citolisis y la liberación de factores humorales (interferón) en el linfocito T y la sensibilización frente a un antígeno en células plasmáticas (BOURNE et al, 1974).

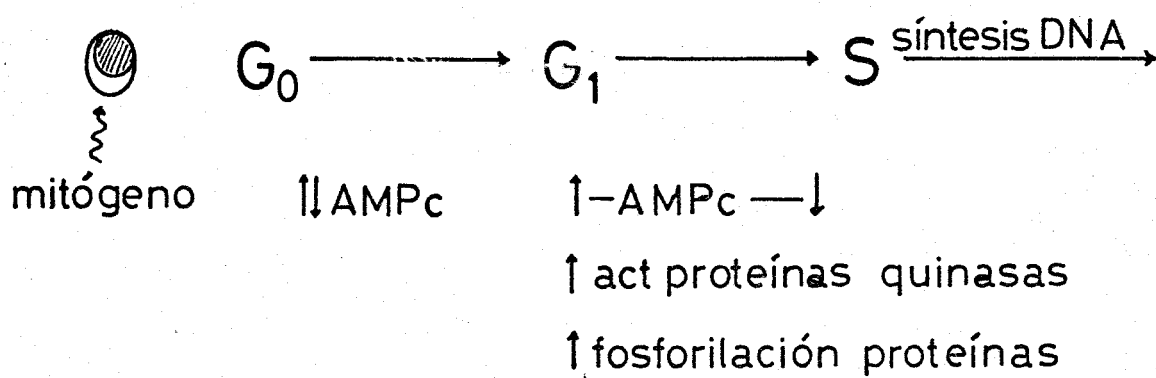


Fig. 8 Oscilaciones de los niveles intracelulares de AMPc durante las diferentes fases de la mitosis (FOKER et al, 1979)

2.3. MONOCITOS

Son células grandes mononucleares que se producen en la médula ósea, pasan a la circulación general y, por último, a los tejidos, donde sufren una serie de transformaciones por las que aumentan considerablemente su tamaño y se convierten en macrófagos. Los monocitos están encargados fundamentalmente de un sistema defensivo bastante inespecífico como es la fagocitosis.

La población monocítica no es homogénea sino que está formada por células metabólicas, físicas y funcionalmente diferentes (WALKER, 1976). De hecho, incluso se ha hecho un intento de división en cuanto a su tamaño (ARENSEN et al, 1980) coincidiendo que los mayores (M_3) tienen una capacidad migratoria (quimiotaxis) muy superior a la de los más pequeños (M_1 y M_2).

La identificación de los monocitos en extensiones sanguíneas o de mononucleares es difícil, debido a la gran variedad de tamaños y formas que pueden adoptar, del mismo modo que los linfocitos. Es por ello que se requieren técnicas citoquímicas que aprovechen la actividad enzimática específica de los lisosomas. De esta forma se utiliza la técnica de las esterasas no específicas. Al mismo tiempo suelen emigrar con los linfocitos en las técnicas más utilizadas para su aislamiento (BOYUM et al, 1968) como la utilización de un gradiente de ficoll.

Existen, sin embargo, varios métodos para purificarlos atendiendo a su capacidad de adherencia al vidrio o superficie plástica (ARENSEN et al,1980; BHATHENA et al, 1981) o su densidad (elutriación) (BHATHENA et al,1981; WEINER y SHAH,1980).

a) Receptores para hormonas peptídicas

Hasta el momento se han descrito receptores para tres hormonas peptídicas en el monocito. En primer lugar el receptor de insulina (SCHWARTZ et al,1975) que se ha utilizado ampliamente en el hombre debido a su accesibilidad, al estar alterado en diversos estados patológicos como la obesidad (BAR et al,1976; OLEFSKY, 1976). También está descrito el receptor para glucagón (GOLDS-TEIN et al, 1975; BHATHENA et al,1981) y para somatostatina (BHATHENA et al,1981). Aunque la unión de la hormona al receptor es el primer paso de la acción hormonal, lo bien cierto es que en estos casos descritos todavía no se conoce el significado fisiológico de estas hormonas en el monocito.

3. OBJETIVOS

El péptido intestinal vasoactivo (VIP) está considerado como un neuratransmisor de acción local. Es por esto que al VIP que se encuentra circulando libremente por el plasma, no se le ha dado más valor que el de ser un res-
to que ha "rebosado" del espacio sináptico.

Por otro lado, el mecanismo de acción del péptido sólo se ha estudiado en diversas especies animales, siendo muy difícil extender su estudio al hombre debido a la complejidad que representa la obtención del material de trabajo.

Con estas ideas básicas, se plantea el objetivo del presente trabajo desde una doble vertiente:

1. Estudiar un modelo celular no inervado capaz de reconocer al péptido y dar de, este modo, una posible explicación fisiológica a la presencia de VIP circulante en plasma
2. Utilizar, al mismo tiempo, un modelo celular humano y que sea de muy fácil acceso.

Para ello se utiliza como modelo células mononucleares

de sangre periférica humana. El medio de estudiar el mecanismo de acción del VIP es a través de una batería de experiencias que incluye:

- a) Estudio del receptor de membrana
- b) Activación del sistema adenil ciclasa
- c) Activación de proteínas quinasas

MATERIAL Y METODOS

1. DISEÑO EXPERIMENTAL

En el presente trabajo se realizan dos grandes grupos de experiencias orientadas a dos objetivos diferentes:

1. Caracterización del sistema receptor-efector para VIP en células mononucleares sanguíneas humanas. Esta población celular incluye a linfocitos B y T así como a monocitos.

La caracterización del sistema receptor-efector se lleva a cabo a tres niveles diferentes:

- a. Caracterización cinética y estequiométrica de la unión del VIP a su receptor de membrana.
- b. Estudio de la activación del sistema adenil ciclasa por acción del péptido.
- c. Activación final de una proteína quinasa dependiente de AMPc.

2. Diferenciar cuál es la estirpe celular (linfocitos B, T o monocitos) responsable de la presencia del complejo receptor efector para VIP.

La diferenciación de la estirpe celular se lleva a cabo testando en preparaciones purificadas de cada uno de los componentes la presencia de receptores y la activación del sistema adenil ciclasa.

Esquema de trabajo

Primera fase

Modelo celular....Células mononucleares sanguíneas

Objetivo.....Caracterizar el sistema receptor-efector para VIP

Método.....Estudio a nivel de receptor
Estudio a nivel adenil ciclasa
Estudio a nivel proteína quinasa

Segunda fase

Modelo celular....Linfocitos T
Linfocitos B
Monocitos
Contaminantes (hematíes)

Objetivo.....Identificación del responsable de la existencia del complejo receptor-efector

Método.....Testar la existencia de receptores
Testar la activación del sistema adenil ciclasa

2. PREPARACIONES CELULARES

Las diferentes preparaciones celulares utilizadas en este trabajo son:

1. Células mononucleares de sangre periférica humana
2. Linfocitos T purificados
3. Células mononucleares con baja contaminación de monocitos
4. Hematíes

Seguidamente se pasará a describir el método de aislamiento utilizado para obtener cada población celular. Al final del capítulo, además, se hará una descripción detallada de las técnicas de identificación de cada una de las estirpes estudiadas.

2.1. CELULAS MONONUCLEARES SANGUINEAS

El proceso de aislamiento se llevó a cabo según la técnica descrita por BOYUM (1968) con ligeras modificaciones.

a) Reactivos

- Sangre venosa obtenida de donantes adultos voluntarios
- Tubos desechables de plástico con heparina lítica
- Solución salina fisiológica (ClNa 0'9%)

- Ficoll (d=1077 g/l): 90 g de Ficoll 400 (Pharmacia Fine Chemicals) se disuelven en 1 l de agua bidestilada. Se ajusta la solución a una densidad de 1077 g/l añadiendo Plenigraf (Juste S.A.). El Plenigraf es una solución que contiene diatrizatos sódico (19'2%), de meglumina (9'1%) y cálcico (1'36%).

- Azul de tripan (1% en agua)

b) Método

Se extraen 10 ml de sangre venosa de un donante y se colocan en un tubo heparinizado. Se agita suavemente para conseguir una buena anticoagulación de la sangre. Al volumen de sangre se le añade un volumen igual de ClNa 0'9% y se agita suavemente. De esta preparación se toman 6 ml y se pasan a un tubo que contiene 3 ml de la solución de Ficoll, teniendo cuidado de que no se mezclen. Se centrifuga a 1000xg durante 20 min y se recoge la interfase celular (banda blanquecina) con una pipeta Pasteur, depositándola en un tubo cónico de vidrio. Se lava 3 veces con ClNa 0'9% centrifugando 5 min a 800 xg. Tras el último lavado, se resuspende el precipitado en ClNa 0'9% y se cuentan las células en una cámara de Malassez.

A una alícuota de la preparación celular (50 μ l) se le

añade 100 μ l de la solución de azul de tripan y 350 μ l de solución salina con albúmina al 1'5%. Después de 2 ó 3 min se observa la preparación al microscopio para determinar la viabilidad celular. Las células viables no permiten que el tripan penetre en su interior mientras que las no viables se colorean intensamente de azul. En todas las preparaciones celulares utilizadas la viabilidad fue siempre superior al 90%.

Con la preparación de mononucleares se realiza la caracterización completa de los receptores para VIP, de la activación del sistema adenil ciclasa y de la activación de las proteínas quinasas.

Mediante la formación de rosetas con hematíes de carnero, la inmunofluorescencia directa (IFD) y una técnica histoquímica de esterasas no específicas se pudo conocer la composición en linfocitos B, T y monocitos de las preparaciones celulares. Los resultados obtenidos, muy similares en todas las preparaciones, muestran los siguientes porcentajes con respecto a las subpoblaciones:

Linfocitos T.....	60%
Linfocitos B.....	25%
Monocitos.....	15%

Estos resultados son similares a los obtenidos por BOYUM (1968).

2.2. LINFOCITOS T

La purificación de linfocitos T se realiza mediante la formación de rosetas con hematíes de carnero.

a) Reactivos

- Preparación de mononucleares (1.5×10^6 cel/ml)
- AET (2-amino ethylisothio-uronium bromide hydrobromide, Sigma): 1 g en 25 ml de agua, ajustando el pH a 9 con NaOH 5N.
- Medio de cultivo RPMI-1640
- Hematíes de carnero: Lavar la preparación de hematíes 3 veces con ClNa 0'9% (800xg, 5 min) hasta que el sobrenadante quede transparente. Añadir 3 ml de suspensión de hematíes a cada 25 ml de la solución de AET. Incubar 15 min a 37°C agitando cada 5 min. Centrifugar 5 min a 2500xg y lavar con ClNa 0'9% hasta que el sobrenadante quede claro. Reconstituir con medio RPMI hasta 20 ml.

b) Método

Se mezclan en cantidades equivolumétricas los linfocitos con la preparación de hematíes. Incubar 15 min a 37°C, centrifugar a 1000xg 5 min y el precipitado se resuspende en 6 ml de medio RPMI y se deja reposar 2 h en hielo.

Lavar 2 veces con salino y terminar resuspendiéndolo en 6 ml. Pasarlo a un tubo que contiene 3 ml de solución de Ficoll y centrifugar 10 min a 2500xg. En el precipitado se encuentran los hematíes, que han arrastrado a los linfocitos T. Mediante choques hipotónicos se eliminan los hematíes, y la concentración de linfocitos se ajusta con ClNa 0'9% hasta la deseada para su uso.

2.3. CELULAS MONONUCLEARES CON BAJA CONTAMINACION DE MONOCITOS

Según la técnica de ARENSON et al (1980) con ligeras modificaciones.

Se parte de una preparación de células mononucleares aisladas según el método antes descrito. Las células se resuspenden en medio RPMI-1640 de forma que queden a una concentración de $2-4 \times 10^6$ cel/ml. 5 ml de esta suspensión se pasan a una placa Petri y se incuban 60 min a 37°C. Después de este tiempo se retira el volumen líquido y se coloca en un tubo cónico. La placa se lava ligeramente con medio RPMI-1640 y el volumen líquido se reúne con el anterior. Centrifugar a 800xg 5 min y el precipitado se lava 2 veces con ClNa 0'9%. Las células se cuentan y se preparan para su uso. La viabilidad fue siempre superior al 85%.

Durante el proceso descrito, los monocitos se han quedado adheridos a la superficie de la placa. De esta for-

ma, la preparación obtenida contiene menos de 2% de monocitos (esterasas no específicas) siendo casi en su totalidad linfocitos T (80%) y linfocitos B (18%).

2.4. MONOCITOS

En la técnica anteriormente descrita, los monocitos se quedan adheridos a la superficie de la placa Petri. De ésta, se pueden separar sencillamente haciendo un barrido cuidadoso con una teta de goma y con unos 3 ml de ClNa 0'9%. Las células así separadas se centrifugan 5 min a 800xg y se lavan dos veces más con ClNa 0'9%. Se cuenta su número y se prepara a la concentración deseada para su uso. La viabilidad de las células fue siempre superior al 75%, conteniendo la preparación monocitos (50%), linfocitos T (45%) y linfocitos B (5%).

2.5. HEMATIES

La preparación de hematíes se obtiene a partir del precipitado de la centrifugación del gradiente de Ficoll. Tras la centrifugación, la interfase blanquecina contiene las células mononucleares, mientras que en el fondo aparecen los hematíes con polimorfos nucleares. El precipitado se resuspende y se lava dos veces con salino fisiológico, dejándolo a la concentración necesaria para las experiencias a realizar.

2.6. TECNICAS DE IDENTIFICACION CELULAR

La identificación de cada tipo celular se puede hacer con microscopía óptica simple y con una tinción del tipo Giemsa. No obstante, los datos morfológicos que de este tipo de técnicas se obtiene son muy equívocos en cuanto a poder identificar a un monocito y a un linfocito. Así, aunque los monocitos suelen ser grandes y con el núcleo hendido (en forma de tres), esto no siempre aparece así. A veces un monocito es pequeño y un linfocito es muy grande siendo complicada su diferenciación.

Es por ello que es necesario utilizar otro tipo de técnicas que atiendan propiedades citoquímicas más específicas para cada estirpe. Los linfocitos T se pueden identificar mediante la formación de rosetas con hematíes de carnero; para los linfocitos B se utiliza la inmunofluorescencia directa (IFD); y para los monocitos, el método de esterasas no específicas.

a) Formación de rosetas

La formación de rosetas ha sido descrita anteriormente. Para utilizar la técnica como método de calcular la proporción de linfocitos T de una preparación celular, la única diferencia es que, después de la incubación de los hematíes y mononucleares en hielo, directamente se pasa a su lectura en el microscopio.

b) Inmunofluorescencia directa (IFD)

Se basa en la propiedad de los linfocitos B de tener inmunoglobulinas en la superficie de la membrana.

Reactivos:

- Preparación de mononucleares (2×10^6 cel/ml)
- Fluoresceína marcada con anti-IgA-M-G
- ClNa 0'9%

Método:

Resuspender la ampolla con fluoresceína en 150 μ l de agua. Pasar 50 μ l a un tubo cónico con 150 μ l de agua y este se le añaden 200 μ l de la preparación de mononucleares. Incubar 45 min a 4°C con agitación. Centrifugar 5 min a 1500 rpm y eliminar el sobrenadante.

Lavar con ClNa 0'9%. Hacer una extensión en portaobjetos y mirar al microscopio.

c) Esterasas no específicas (naftol AS-D acetato)

El fundamento teórico consiste en que el monocito contiene una esterasa capaz de hidrolizar el compuesto naftol AS-D acetato. Se libera naftol, el cual se acopla a una sal de diazonium de forma que aparece un precipitado fuertemente coloreado cerca del sitio donde tiene lugar la actividad enzimática.

Reactivos:

- Tampón fosfato (Na_2HPO_4) 0'15 M, pH 7'5
- Fijador: Se prepara añadiendo a un vaso de precipitado los siguientes reactivos

Na_2HPO_420 mg
 KH_2PO_4100 mg
 H_2O30 ml
 Acetona.....45 ml
 Formaldehído 37%...25 ml

Conservar a 4°C hasta su uso.

- Substrato: Se prepara añadiendo por este orden a un tubo de ensayo

Naftol AS-D acetato (Sigma)...16 mg
 Acetona.....3 ml
 Propilenglicol.....2 ml

- Colorante "Fast Blue BB Salt" (Sigma)

Método:

Extender una preparación celular en un portaobjetos.
 Fijar la preparación durante 30 s a 4°C. Lavar con tres cambios de agua destilada agitando suavemente las preparaciones y secar al aire.
 La mezcla de incubación consta de 100 ml de tampón fosfato, 5 ml de la preparación de substrato y 200 mg de

Fast Blue BB Salt. Agitar fuertemente durante 5 min y filtrar a través de papel Whatman 1.

La solución se pasa a un frasco de coplin. Se coloca la preparación celular fijada y se incuba durante 70 min a temperatura ambiente. Lavar con agua corriente y contrañir con hematoxilina Mayer durante 10 min. Lavar de nuevo y secar al aire. Leer en aceite de inmersión.

Interpretación:

Los monocitos aparecen con unos gránulos azul intenso en el núcleo y citoplasma, mientras que en el resto de células, estos gránulos no aparecen.

33. UNION DE ^{125}I -VIP A SU RECEPTOR ESPECIFICO DE MEMBRANA

3.1. MARCAJE DE VIP CON ^{125}I (LABURTHE et al, 1977)

Reactivos

- VIP: 0'5 mg de VIP porcino (lote n°1008, Peninsula Laboratories, code 7161) se disuelven en 0'5 ml de HCl 0'005 N, quedando a una concentración de $3 \times 10^{-4}\text{M}$.

Después de agitar durante 60 min se reparte en alícuotas del siguiente modo:

12 alícuotas de 5 μl que se utilizan para los sucesivos marcajes.

6 alícuotas de 50 μl como "stock" de VIP a $3 \times 10^{-4}\text{M}$.

125 μl de la solución del péptido más 3'625 ml de Tris 50 mM, BSA 2%, pH 7'5 hacen que el VIP quede a una concentración de 10^{-5}M .

Se reparte en alícuotas de 50 μl .

Todas estas fracciones se congelan a -20°C hasta su uso.

- Tampón fosfato 0'3M, pH 7'5: 2'04 g de KPO_4H_2 se disuelven en 40 ml de agua bidestilada y desionizada. Se ajusta el pH con NaOH 1 N y se enrasa a 50 ml.

- ^{125}I Na (AMERSHAM IMS 30): con una actividad de 100 mCi/ml, preparado en NaOH, pH 7-11, libre de reductores y 99'6% de pureza radioquímica.

- Cloramina T (1 mg/ml): 25 mg de cloramina T ($C_7H_7ClNaO_2S \cdot 3H_2O$, Merck) se disuelven en 10 ml del tampón fosfato antes descrito. Se prepara 10-15 min antes del marcaje y se mantiene en la oscuridad hasta su uso. Se utiliza en el marcaje como oxidante débil.
- Metabisulfito sódico (2mg/ml): 25 mg de metabisulfito sódico ($Na_2S_2O_5$, Merck) se disuelven en 5 ml de tampón fosfato. El metabisulfito se utiliza como reductor para detener la reacción de oxidación desencadenada por la cloramina T.
- Tris 50 mM, BSA 2%, pH 7'5 (TB).
- Tris 50 mM, BSA 2%, bacitracina 2 mg/ml, pH 7'5 (TBB).
- Acido/alcohol: Mezcla al 50% (v/v) de ácido acético 1 N con etanol absoluto. Preparar 50 ml y conservar a 4°C.
- Talco: Desleír un comprimido de 50 mg en 0'5 ml de agua destilada.

Marcaje

El marcaje se realiza a temperatura ambiente en un tubo de plástico que contiene ya 5 μ l de VIP (5 μ g). Con micropipeta se añade a este tubo:

- 20 μ l de tampón fosfato
- 15 μ l de ^{125}I Na (1'5 mCi)
- 5 μ l de la solución de cloramina T

Agitar 30 segundos exactos. Añadir 5 μ l de la solución de metabisulfito sódico y agitar. A continuación añadir 400 μ l de TBB y agitar. Tomar una alícuota de 5 μ l de la mezcla de marcaje y pasarlos a un tubo que contiene 5 ml de TB. Estos últimos se utilizarán para determinar el porcentaje de incorporación del ^{125}I al péptido.

Purificación

A la mezcla de marcaje se le añade 0'1 ml de la suspensión de talco. Agitar y centrifugar 10 min a 3,000 rpm (Beckman TJ-6). Aspirar el sobrenadante que contiene iodo libre. Añadir 1 ml de la mezcla acético/etanol al sedimento de talco. Agitar y volver a centrifugar 10 min a 3,000 rpm. El sobrenadante, que contiene el ^{125}I -VIP, se reparte en alícuotas de 50 μ l y se conserva a -20°C hasta su uso.

Antes de utilizar la hormona marcada se vuelve a purificar añadiendo 350 μ l de TB y 100 μ l de la suspensión de talco procesando de idéntica manera a la descrita.

Cálculo del porcentaje de incorporación

Tomar 400 μ l de la mezcla de marcaje diluida en 5 ml de TB y añadirle 100 μ l de la suspensión de talco. Agitar y centrifugar 10 min a 3,000 rpm. Contar la radiactivi-

dad del precipitado y del sobrenadante y calcular la el porcentaje de radiactividad del primero con respecto a la radiactividad total:

$$\%I = \frac{\text{cpm ppdo.}}{\text{cpm ppdo.} + \text{cpm sbte.}} \times 100$$

En los marcajes realizados (n=7) el porcentaje de incorporación alcanza un valor medio de 79.1 ± 2.4 .

Actividad específica

La actividad específica del ^{125}I -VIP, o cantidad de radiactividad (μCi) incorporada por μg de péptido durante el marcaje, se calcula aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{A.e.} = \frac{\mu\text{Ci } ^{125}\text{I} \times \%I}{\mu\text{g VIP} \times 100}$$

En los marcajes realizados (n=7) la actividad específica alcanza un valor medio de $236 \pm 5 \mu\text{Ci } ^{125}\text{I}/\mu\text{g VIP}$.

3.2. AISLAMIENTO DE VIP PORCINO

Según el método de LABURTHE et al (1977a) con algunas modificaciones.

a- Pesar 1 Kg de intestino delgado de cerdo y lavar su interior con agua a presión. Trocear con tijeras y hervir durante unos 10 min. Triturar con tijeras o picadora.

b- Homogenizar con un sistema de aspas (1 Kg de tejido en 4 l de ácido acético 0'5 M). Sonicar durante 10 s y centrifugar a 3,000 rpm durante 1 h. Eliminar la capa de grasa superior con una espátula, tomar el sobrenadante y filtrarlo a través de papel Whatman 541 dos veces. Ajustar el pH del filtrado a 7'5 con NH_4OH .

c- Añadir 80 g de talco y agitar. Centrifugar 20 min a 3,000 rpm. Desechar el sobrenadante y resuspender el precipitado en 2,400 ml de ácido acético 1 N/ etanol absoluto al 50% (v/v). Centrifugar 50 min a 3,000 rpm. Congelar el sobrenadante y liofilizar. En este paso se obtuvo 1'64 g de material liofilizado.

d- Reconstituir en 15 ml de ácido acético 0'2 M. Centrifugar 10 min a 4,000 rpm. Tomar el sobrenadante y hacerlo pasar a través de una columna de Sephadex-G 25 (2'4x60 cm) eluyendo con ácido acético 0'2 M y calibran-

do con ^{125}I -VIP (500,000 cpm). Recoger 120 alícuotas de 2 ml y contar la radiactividad (fig. 9). Unir las fracciones correspondientes al pico de radiactividad y liofilizarlas. En este paso se obtuvo 32 mg de material liofilizado.

e- Parte del liofilizado se resuspende en TB a diversas diluciones y se determina la concentración de VIP testando la capacidad de desplazar ^{125}I -VIP de su unión a receptores de membrana plasmática de hígado de rata (GUERRERO et al, 1981).

f- Una vez determinada su concentración, este VIP parcialmente purificado se utiliza en las experiencias de unión ^{125}I -VIP-receptor para que, añadiéndolo al medio de incubación (10^{-5}M final), se pueda calcular la unión inespecífica.

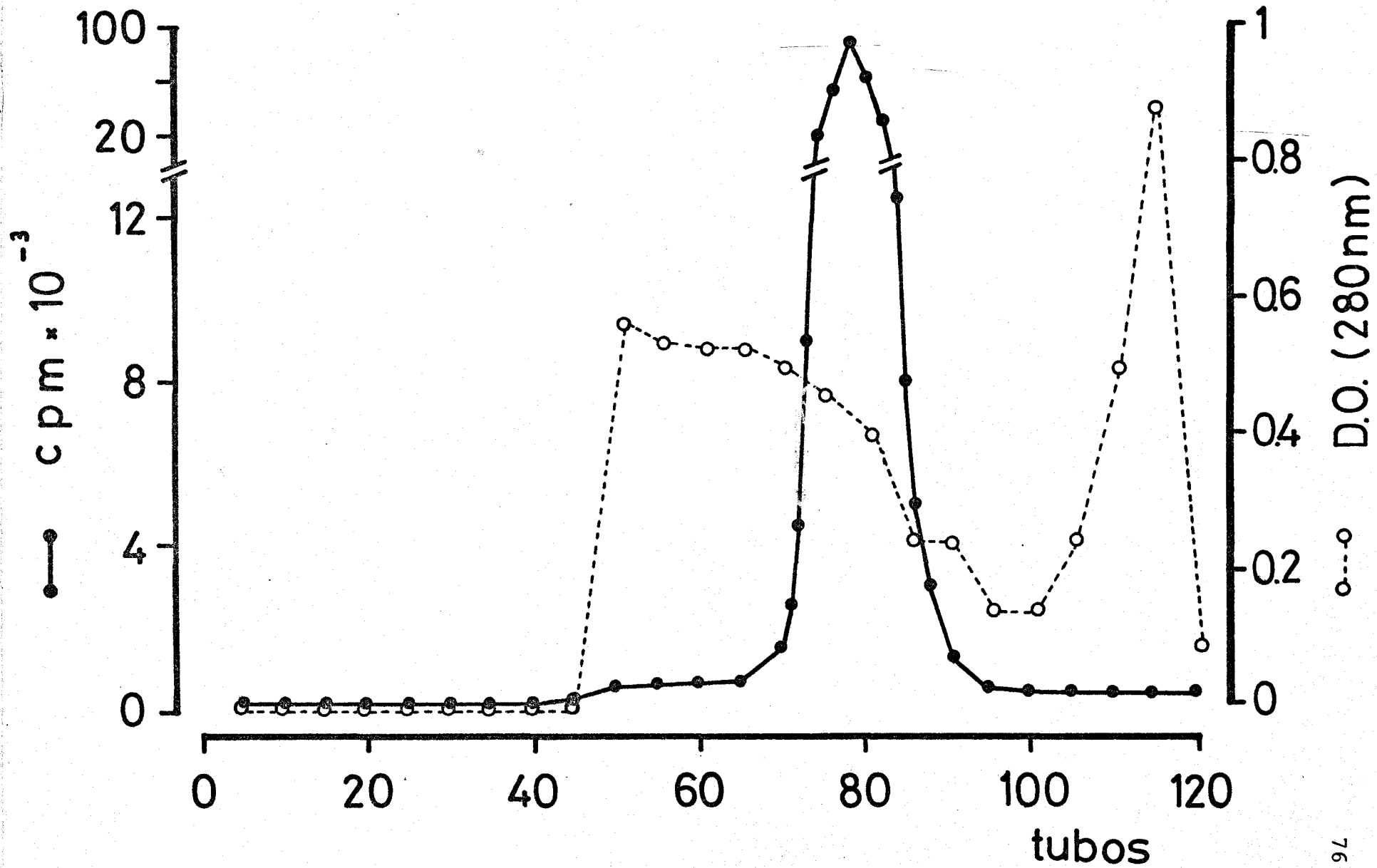


Fig. 9 Patrón de elución cromatográfico del VIP a través de Sephadex-G 25

3.3. UNION DEL VIP A SUS RECEPTORES ESPECIFICOS DE MEMBRANA EN CELULAS MONONUCLEARES

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 35 mM, pH 7'5, sacarosa 10%(w/w).
- VIP frío: Una alícuota de VIP del "stock" a concentración 10^{-5} M se diluye en TB y se utiliza en las experiencias de dosis-efecto de forma que en el medio de incubación alcance concentraciones finales entre 10^{-11} y 10^{-7} M.
- 125 I-VIP: Una alícuota de VIP marcado se repurifica con talco y se diluye en TB de forma que en el medio de incubación quede a una concentración final de 45 pM (75 pg de VIP en 500 μ l de volumen de incubación).
- VIP para la unión no específica: Una alícuota de VIP porcino parcialmente purificado se diluye en TB de forma que quede a una concentración final en el volumen de incubación de 10^{-5} M. Con esto se puede calcular la unión inespecífica o unión del VIP marcado a células mononucleares en presencia de una concentración de VIP frío que teóricamente desplazaría totalmente al VIP marcado de su unión al receptor específico. El valor así obtenido se resta al de la unión total para obtener

el enlace específico.

- Preparación celular: Cualquiera de los diversos tipos de preparaciones celulares se prepara en ClNa 0'9% de forma que en el medio de incubación quede a una concentración final de $1'5 \times 10^6$ cel./ml. Se utilizan células mononucleares sanguíneas humanas, poblaciones enriquecidas en linfocitos B y T y poblaciones empobrecidas en monocitos, además de hematíes humanos.

b) Método general

Se realiza la incubación en tubos de plástico (3 ml) en un volumen final de 500 μ l. Se añade por este orden:

- 250 μ l de TBB
- 50 μ l de TB, de VIP frío o VIP para la unión inespecífica.
- 50 μ l de 125 I-VIP

La reacción se inicia añadiendo 150 μ l de la preparación celular. De esta forma en el volumen final de incubación los diversos reactivos aparecen con las siguientes concentraciones:

- Tris 35 mM, ph 7'5
- BSA 1'5%
- Bacitracina 1mg/ml
- ClNa 50 mM
- 125 I-VIP 45 pM

- Cuando es necesario, VIP frío (10^{-11} - 10^{-7} M)
o VIP para la unión inespecífica (10^{-5} M).

Se incubaba a 15 ó 30°C y por períodos de tiempo entre 5 min y 3 h. En las condiciones óptimas se incubaba a 15°C durante 90 min. Se detiene la reacción tomando alícuotas de 200 μ l del medio y pasándolas a tubos de microfuga que contienen 200 μ l de TB frío. Se centrifuga 5 min (microfuga Beckman-B), se aspira el sobrenadante y se lava con sacarosa al 10% el precipitado. Se corta el fondo del tubo y se cuenta la radiactividad.

Todas las experiencias realizadas se acompañan de tubos de actividad total (alícuotas de 200 μ l del volumen de incubación que se cuentan sin centrifugar) y de tubos para la unión inespecífica en cada variable de las condiciones del ensayo. Los resultados se expresan como el porcentaje de 125 I-VIP unido específicamente (%B esp. = %B total - %B inesp.) con respecto a la radiactividad total.

c) Cinética de asociación

Con las condiciones básicas previamente descritas se estudia la interacción VIP-receptor a 15 y 30°C durante períodos de tiempo que oscilan entre 5 min y 3 h, para determinar la velocidad de asociación, tiempo al que se alcanza el equilibrio y la estabilidad de la unión.

d) Efecto de la concentración celular

Se realizan incubaciones con diferentes concentraciones de células mononucleares sanguíneas humanas en un rango de $0'5 - 8 \times 10^6$ cel/ml.

e) Degradación del $^{125}\text{I-VIP}$

Se estudia la degradación del $^{125}\text{I-VIP}$ durante la incubación, en relación al tiempo y la temperatura del ensayo, así como a diferentes concentraciones de células mononucleares.

Se determina midiendo la capacidad del $^{125}\text{I-VIP}$ que queda en el sobrenadante de la incubación de unirse a membranas hepáticas de rata parcialmente purificadas (NEVILLE, 1968). Para ello, una alícuota del sobrenadante (250 μl) se incuba con 50 μl de membranas hepáticas (50 μg) y 200 μl de TB durante 30 min a 30°C . Las membranas con el $^{125}\text{I-VIP}$ se separan por microcentrifugación y se cuenta la radiactividad del precipitado. Los valores se comparan con los obtenidos al incubar $^{125}\text{I-VIP}$ en las mismas condiciones experimentales pero en ausencia de células.

f) Efecto del pH

Se realizan incubaciones ajustando el tampón de incubación a un pH final entre 6'5 y 9, para determinar cuál es el óptimo en la interacción del VIP con las células mononucleares sanguíneas.

g) Cinética de disociación

Para estudiar la disociación del complejo hormona-receptor en células mononucleares sanguíneas se lleva a cabo una incubación a 15°C durante 90 min en las condiciones "standard". Posteriormente se añade a todos los tubos 50 μ l de VIP (10^{-5} M final) y se prosigue la incubación tomando alícuotas de 200 μ l a los 0, 5, 15, 30, 60, 90, 120 y 180 min. Estas alícuotas se centrifugan en microfuga según método ya descrito. Los resultados se expresan como porcentaje de unión específica con respecto al tiempo 0, después de añadir VIP.

h) Estequiometría de la unión VIP-receptor

Para estudiar la estequiometría de la unión VIP-receptor se realizan incubaciones en las condiciones "standard", en presencia de VIP marcado y concentraciones crecientes de VIP frío (10^{-11} - 10^{-7} M). Este tipo de ensayo se lleva a cabo tanto en células mononucleares, como en poblaciones enriquecidas de linfocitos B o T, además de con mononucleares empobrecidos de monocitos y hematíes humanos y de carnero.

El procesamiento de los resultados obtenidos según el análisis de SCATCHARD (1949) permite diferenciar los distintos tipos de receptores existentes así como estimar su afinidad y número.

i) Especificidad del receptor para VIP

Para estudiar la especificidad del receptor de VIP en células mononucleares, se realizan incubaciones de las células en presencia de VIP marcado y diversas concentraciones de secretina (10^{-9} - 10^{-7} M), somatostatina (10^{-8} - 10^{-7} M), glucagón (10^{-7} M) e insulina (10^{-7}). Así se puede comprobar si existe algún tipo de competición entre el 125 I-VIP y los péptidos descritos en cuanto a su unión al receptor. Los resultados se expresan como porcentaje de unión específica con respecto al valor obtenido en ausencia de los péptidos fríos.

4. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ADENIL CICLASA

La determinación de la actividad adenil ciclasa se realiza en dos etapas:

* Producción de AMPc por acción de la estimulación de la adenil ciclasa por VIP.

* Determinación cuantitativa del AMPc producido por una técnica de proteína enlazante.

4.1. PRODUCCION DE AMPc

a) Reactivos

- TBB/IBMX: Tris 50mM, BSA 2%, bacitracina 2 mg/ml, isobutil-metil-xantina 0'4 mM, pH 7'5.
- TB: Tris 50 mM, BSA 2%, pH 7'5.
- *VIP: Una alícuota de VIP del "stock" a concentración 10^{-5} M se diluye en TB de forma que quede en el ensayo a una concentración final de 10^{-8} M. En las experiencias de dosis-efecto las concentraciones del péptido cubren un rango entre 10^{-11} y 10^{-7} M.
- Metanol
- Preparación celular: Cualquiera de las diferentes poblaciones celulares utilizadas se prepara en ClNa 0'9% de forma que en el medio de incubación quede a una

concentración final de 0.5×10^6 cél./ml. Se utilizan células mononucleares sanguíneas, poblaciones enriquecidas en linfocitos B o T y otras empobrecidas en monocitos, además de hematíes humanos y de carnero.

b) Método general

Se realiza la incubación en tubos de plástico (3 ml) en un volumen final de 500 μ l. Se añade por este orden:

- 250 μ l de TBB/IBMX
- 50 μ l de TB
- 50 μ l de VIP (10^{-7} M) para estudiar la producción de AMPc en presencia del péptido ó 50 μ l de TB, como basal, para determinar la producción de AMPc en ausencia de VIP.

La reacción se inicia añadiendo 150 μ l de la preparación celular. De esta forma en el volumen final de incubación los diversos reactivos aparecen con las siguientes concentraciones:

- Tris 10 mM, pH 7.5
- BSA 1.5%
- Bacitracina 1 mg/ml (inhibe la degradación del VIP).
- IBMX 0.2 mM (inhibidor de fosfodiesterasa)
- ClNa 50 mM

- VIP, 10^{-8} M o ausente, bien se trate de estudiar la producción de AMPc estimulada por el péptido o en condiciones basales. En las experiencias de dosis-efecto el VIP está presente a diferentes concentraciones entre 10^{-11} y 10^{-7} M.

Se incubaba a 15 ó 30°C por períodos de tiempo entre 5 y 90 min. Se detiene la reacción añadiendo 2'5 ml de metanol, que precipita la fracción proteica, y se centrifuga 10 min a 3,000 rpm. Alícuotas de 400 μ l del sobrenadante se pasan a tubos de vidrio (2 ml) en los que se deja evaporar el metanol (60°C), quedando la fracción soluble, con el AMPc producido, adherida a la pared del tubo. En este residuo se determina posteriormente el AMPc existente. En todos los ensayos realizados, y para cada variable experimental, la incubación tiene lugar tanto en presencia como en ausencia de VIP a fin de determinar los valores basales de AMPc y compararlos con los obtenidos al estimular el sistema adenilato ciclasa con el péptido.

c) Efecto del tiempo y la temperatura

Con las condiciones básicas previamente descritas se estudia la producción de AMPc estimulada por VIP a 15 y 30°C durante períodos de tiempo que oscilan entre 5 y 30 min. La preparación celular utilizada son las células mononucleares sanguíneas.

d) Efecto del IBMX

El IBMX inhibe la actividad fosfodiesterásica impidiendo que el AMPc producido durante la incubación sea degradado. Se realiza una incubación de las células mononucleares sanguíneas a 15°C, durante períodos de tiempo entre 5 y 90 min en presencia y ausencia de IBMX para comprobar que el VIP en ausencia del inhibidor puede también estimular la producción de AMPc.

e) Efecto de la concentración celular

Se realizan incubaciones con diferentes concentraciones de células mononucleares sanguíneas humanas en un rango de $0.25-6 \times 10^6$ cél./ml.

f) Efecto del pH

Se realizan incubaciones ajustando el pH del medio de incubación a diferentes valores entre 6.5 y 9.0. De esta forma se determina cuál es el valor óptimo de pH para que el VIP estimule el sistema adenilato ciclasa.

g) Ensayos tipo dosis-efecto

Se realizan incubaciones en las condiciones previamente descritas (15°C y 45 min) en ausencia y presencia de concentraciones crecientes de VIP (10^{-11} - 10^{-7} M). Este tipo de ensayo se lleva a cabo con células mononucleares,

poblaciones enriquecidas en linfocitos B o T, poblaciones empobrecidas en monocitos y con hematíes humanos y de carnero. Con estas experiencias se puede calcular la concentración de VIP a la que la producción de AMPc es máxima así como la que consigue la mitad del efecto máximo (Km).

h) Especificidad

Para estudiar en las células mononucleares si la estimulación de la producción de AMPc es específica para el VIP se realizan incubaciones de las células en presencia de diversas concentraciones de secretina (10^{-9} - 10^{-7} M), somatostatina (10^{-8} - 10^{-7} M), glucagón (10^{-7} M) e insulina (10^{-7} M).

4.2. DETERMINACION CUANTITATIVA DE AMPc

La determinación cuantitativa de AMPc se realiza por una técnica de proteína enlazante basada en la descrita por GILMAN (1970) y con las modificaciones introducidas por SOBRINO et al (1979). Este método recibe el nombre de "proteína enlazante" por referencia a la proteína quinasa, dependiente de AMPc, o bien "radioanálisis a saturación" por las condiciones en que transcurre la reacción. La reacción consiste en una competición entre el AMPc no radiactivo y el ^3H -AMPc por enlazar la subunidad reguladora (R) de la proteína quinasa. Es una reacción a saturación, lo que quiere decir que la concentración de la proteína quinasa es inferior a la necesaria para enlazar el AMPc total presente en la reacción.

La separación del complejo proteína quinasa-AMPc se realiza utilizando carbón activo según la técnica de BROWN y EKINS (1971).

a) Reactivos

- Tampón fosfato (KH_2PO_4) 0'2 M, pH 6'5 (TP 0'2)
- Tampón fosfato (KH_2PO_4) 0'05 M, pH 6'5 (TP 0'05)
- AMPc: Se parte de una preparación comercial monohidratada (3',5' adenosín monofosfato cíclico. H_2O , Boheringer). Se disolvió en un tampón fosfato potásico 0'005 M, pH 6'5 hasta que quedó a una concentración de 100 pmol/ml

ml que se reparte en alícuotas y se conserva a -20°C hasta su uso. En cada ensayo se utiliza una alícuota para preparar diluciones de AMPc que se utilicen en la curva standard según el siguiente esquema:

500 μl (100 pmol/ml)	+ 500 μl TP 0'2 M	= <u>50 pmol/ml</u>
500 μl (50 pmol/ml)	+ 500 μl TP 0'2 M	= <u>25 pmol/ml</u>
500 μl (25 pmol/ml)	+ 750 μl TP 0'2 M	= <u>10 pmol/ml</u>
250 μl (10 pmol/ml)	+ 250 μl TP 0'2 M	= <u>5 pmol/ml</u>
200 μl (10 pmol/ml)	+ 600 μl TP 0'2 M	= <u>2'5pmol/ml</u>
100 μl (10 pmol/ml)	+ 900 μl TP 0'2 M	= <u>1 pmol/ml</u>
300 μl (1 pmol/ml)	+ 300 μl TP 0'2 M	= <u>0'5pmol/ml</u>

- ^3H -AMPc: Comercialmente suministrado como (2'8- ^3H)-3'-5'-adenosín monofosfato (sal amónica) en solución de alcohol etílico (50:50). Se diluye en TP 0'05 para obtener una concentración final aproximada de 0'1 pmol/ μl . Se reparte en alícuotas de 0'5 ml y se congelan a -20°C hasta su uso. En el ensayo se descongela una alícuota y se diluye de nuevo en TP 0'05 hasta que en 40 μl haya 1 pmol de ^3H -AMPc.
- Proteína quinasa dependiente de AMPc, aislada de músculo de conejo y diluida 1/12 en TP 0'05 que contiene, además:

Teofilina 8 mM: Inhibidor de una posible fosfodiesterasa del AMPc, que pudiera encontrarse en la preparación de la proteína o en las muestras.

Mercaptoetanol 6 mM: actúa como reductor de los enlaces disulfuro de la proteína quinasa.

EDTA 5 mM: quelante de Mg^{2+} .

Albúmina sérica bovina (BSA)

- Carbón 2'6%, BSA 2% preparado en TP 0'05 M.

b) Preparación de la curva standard

En un vaso de precipitado se añaden por este orden:

- TBB/IBMX.....1 ml
- TB.....0'4 ml
- ClNa 0'9%.....0'6 ml
- Metanol.....10 ml

Centrifugar 5 min a 3000 rpm y tomar alícuotas de 0'4 ml del sobrenadante y pasarlos a tubos de vidrio. Evaporar (60-70°C) y utilizar estos tubos para la curva standard de AMPc frío.

c) Método

Añadir a los tubos de vidrio problema 100 μ l de TP 0'2 M, mientras que a los preparados especialmente para la curva standard se le añaden 100 μ l de las diferentes diluciones de AMPc frío (50-0'5 pmol/ml). Se incluye, además, un tubo al que sólo se añade 100 μ l de TP 0'2 M sin AMPc frío (cero) y otro al que se añade 100 μ l de TP 0'2 M y no se añade proteína quinasa (blanco).

Agitar los tubos y dejar 30 min a temperatura ambiente hasta conseguir una perfecta redisolución del residuo del evaporado. Añadir 40 μ l de la solución de proteína quinasa a todos los tubos excepto al blanco. Incubar 60 min a 4°C y añadir 40 μ l de la preparación de ^3H -AMPc. Incubar 90 min a 4°C. Añadir 150 μ l de la suspensión de carbón 2'6%, BSA 2%; agitar y centrifugar 15 min a 3000 rpm. Se toman alícuotas de 150 μ l del sobrenadante y se pasan a viales con líquido de centelleo (5 ml) y se cuenta la radioactividad en contador β .

En la figura 10 se representa una curva standard del método explicado en la que en la abscisa están los pmoles de AMPc por tubo, y en la ordenada, el porcentaje de unión del ^3H -AMPc a la proteína quinasa con respecto a la radioactividad total.

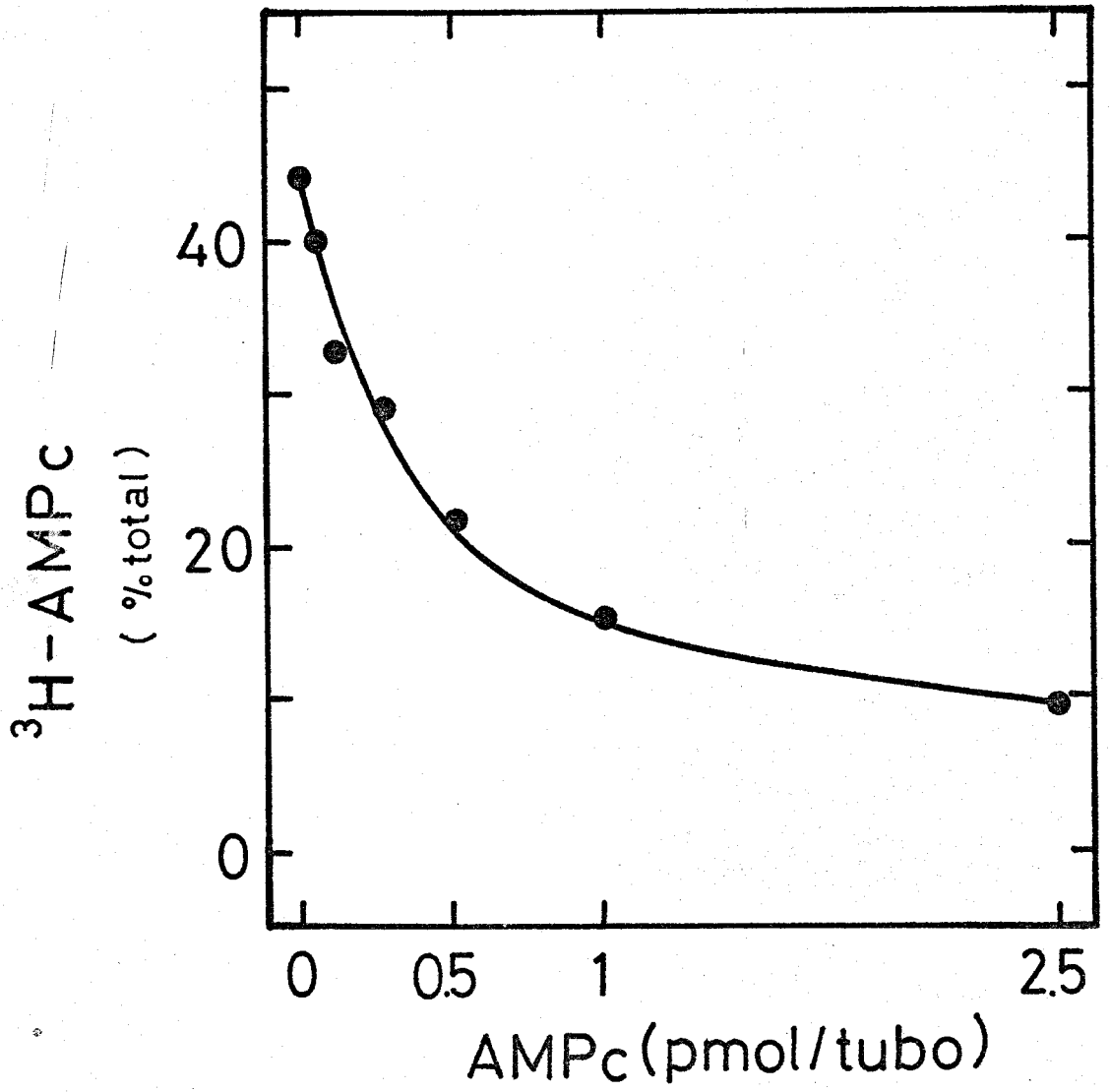


Fig. 10 Curva standard de AMPC

4.3. OBTENCION DE PROTEINA QUINASA

a) Preparación de la columna de DEAE-celulosa

1. Pesar, al menos, 100 g de DEAE-celulosa. Añadir 5 volúmenes de NaOH 0'5 N y agitar durante 15 min. Dejar reposar y aspirar el sobrenadante alcalino en el que se encuentran partículas coloidales.
2. Lavar la resina con agua bidestilada todas las veces que sea preciso hasta que el pH descienda a la neutralidad. Se puede utilizar para el lavado un kitasato.
3. Resuspender la resina en tampón Tris-ClH 5 mM, EDTA 2 mM, pH 7'5. Agitar durante 15 min a temperatura ambiente y decantar o aspirar el sobrenadante. Esta operación se realiza 2 veces. Comprobar que pH final es de 7'5.
4. Verter la resina sobre una columna (2 cm de diámetro) a la que previamente se ha colocado lana de vidrio para evitar que el DEAE-celulosa se escape. Llenar hasta 10 cm de altura con el tampón para que el empaquetamiento de las partículas sea homogéneo.
5. Lavar la columna con 200 ml de tampón. Seguidamente aspirar el volumen líquido que se encuentra sobre la resina y añadir 1 ml de una solución de BSA 2% (preparada en el tampón) para saturar el vidrio de la columna e impedir que se adhiera al mismo la proteína quinasa. Dejar que empape la resina y pasarle más tampón. Guardar la columna en cámara fría hasta su uso.

b) preparación de extracto de músculo

1. Desangrar 2 conejos (2-3 kg). Cortar los músculos de extremidades y dorso. Trocear con tijeras y triturar con un homogenizador comercial. Todas las operaciones deben realizarse en cámara fría. Resuspender el triturado en 2'5 volúmenes de una solución EDTA 4 mM, pH 7. Agitar 15 min y filtrar a través de gasa para eliminar grandes acúmulos.
2. Centrifugar el filtrado a 10,000xg durante 30 min. Recoger el sobrenadante y desechar el precipitado. El sobrenadante se lleva a pH 6'1 por adición de ácido acético. Se forma lentamente un precipitado (fosforilasa quinasa b y glucógeno sistetasa) el cual se separa por centrifugación a 10,000xg durante 30 min.
3. Se recoge el sobrenadante y se le ajusta el pH a 5'5 por adición de ácido acético. Centrifugar a 10,000xg durante 30 min.
4. El sobrenadante se ajusta a pH 6'8 por adición de una solución tampón de $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 1 M, pH 7'2. Conseguido esto, se añade sulfato amónico (32'5 g/100 ml). Se agita durante 2 h y se centrifuga durante 60 min a 10,000xg.
5. Desechar el sobrenadante y resuspender el precipitado en el menor volumen posible de tampón Tris-ClH 5 mM, pH 7'5 y se dializa durante 48 h en 20 volúmenes del mismo,

con 4 ó 5 cambios de tampón durante ese tiempo.

6. La solución proteica se centrifuga a 40,000xg durante 1 h, desenchándose el precipitado y sometiendo el sobrenadante a la cromatografía.

c) Cromatografía en DEAE-celulosa

1. Aspirar el volumen líquido que se encuentra por encima de la resina. Añadir cuidadosamente la solución proteica; esperar a que penetre y lavar con tampón Tris-ClH 5 mM, pH 7'5.

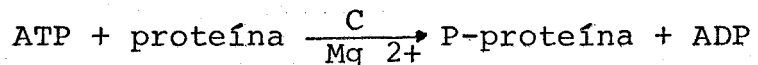
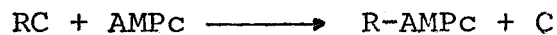
2. Conectar un gradiente continuo de Tris-ClH desde 5 mM hasta 500 mM. Para ello se preparan 500 ml de Tris-ClH 5 mM, pH 7'5 y 500 ml de Tris-ClH 1000 mM, pH 7'5 que se colocan en un sistema de vasos comunicantes, de tal forma que se conecta a la columna el vaso de menor concentración.

3. Recoger en colector de fracciones alícuotas de 10 ml hasta que pase toda la solución tampón. Tomar alícuotas de 20 μ l de cada tubo para determinar la capacidad enlazante de ^3H -AMPc. Se mezclan todos los tubos de mayor actividad y se reparte el volumen resultante en alícuotas que se conservan a -20°C hasta su uso.

5. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE PROTEINA QUINASA

Tras caracterizar la unión del VIP a sus receptores específicos y estudiar el acoplamiento del complejo hormona-receptor al sistema adenil ciclasa, se puede pasar a comprobar si el siguiente eslabón de la cadena se encuentra presente. Este es una proteína quinasa dependiente de AMPc.

El mecanismo de activación de la proteína quinasa fue propuesto por BROSTROM et al (1971). La proteína inactiva (RC) se compone de una subunidad reguladora (R) y una subunidad catalítica (C). El enlace del AMPc a la subunidad reguladora produce la separación de la subunidad catalítica activa, que cataliza la fosforilación de proteínas.



La técnica utilizada para medir la actividad de la proteína se basa precisamente en la capacidad que tiene de catalizar la transferencia del grupo γ -fosfato de un ATP (marcado en posición γ con ^{32}P) a una proteína (histona) en presencia de Mg^{2+} .

La descripción de la técnica se puede dividir en dos fases :

1. Incubación de las células mononucleares
2. Determinación de la actividad de la proteína quinasa.

5.1. INCUBACION DE LAS CELULAS MONONUCLEARES SANGUINEAS

a) Reactivos

- TBB/IBMX: Tris-ClH 50 mM, BSA 2%, bacitracina 2 mg/ml, IBMX 0'4 mM, pH 7'5

- TB/Mg: Tris-ClH 50 mM, BSA 2%, Mg 50 mM, pH 7'5

- Tris/Tritón: Tris-ClH 35 mM, pH 7'5, Tritón X-100 0'4%, teofilina 20 mM

- VIP: Una alícuota del "stock" se diluye en TB hasta una concentración tal que luego en el ensayo quede a 10^{-8} M. En las experiencias dosis-efecto se cubre un rango de concentraciones de 10^{-11} - 10^{-7} M.

- Preparación celular: En este tipo de experiencias sólo se ha utilizado células mononucleares sanguíneas humanas. Estas se preparan en ClNa 0'9% de forma que en el ensayo estén a una concentración final de 2×10^6 células por ml.

b) Método

En tubos de microfuga (1'5 ml) se añade por este orden:

- 125 μ l de TBB/IBMX
- 25 μ l de TB/Mg
- 25 μ l de VIP o TB según se quiera estimulación o basales
- 75 μ l de células mononucleares sanguíneas

De esta forma los reactivos quedan en el volumen final de incubación a las siguientes concentraciones:

- Tris-ClH 35 mM, pH 7'5
- BSA 1'5%
- bacitracina 1 mg/ml
- IBMX 0'2 mM
- Mg 5 mM
- VIP 10^{-8} M ó 0 en las basales
- células mononucleares, 2×10^6 cel/ml
- ClNa 50 mM

Se incuba 45 min a 15°C. La reacción se detiene añadiendo 100 μ l de Tris/Tritón. Sonicar 5 s y centrifugar en microfuga 5 min. El sobrenadante se utiliza para determinar la actividad de la proteína quinasa.

c) Efecto del tiempo y del IBMX

Se realizan incubaciones a 15°C durante períodos de tiempo entre 2'5 y 60 min, en presencia de IBMX y VIP, sólo con VIP, sólo con IBMX y sin ninguno de los dos componentes.

d) Ensayos tipo dosis-efecto

Se realizan incubaciones a 15°C durante 45 min en ausencia y presencia de concentraciones crecientes de VIP (10^{-11} - 10^{-7} M final).

e) Especificidad

Se realizan incubaciones en presencia de secretina (10^{-9} - 10^{-7} M), insulina (10^{-8} M) y glucagón (10^{-8} M).

5.2. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA

a) Reactivos

- Tampón fosfato (KH_2PO_4), 25 mM, pH 6'8. Se utiliza para preparar los siguientes reactivos:

Histona K^+ (histona de timo de ternera, tipo II A- Sigma), 15'6 mg/ml

AMPc (A-3:5-MP ciclico. H_2O , Boehringer), 88 μM

FNa, 400 mM

- ATP- ^{32}P : Se prepara añadiendo a 250 μl de ATP frío 2'5 mM en acetato magnésico (20 mM), 25 μl de ATP- ^{32}P (5'- $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ -adenosín trifosfato, Amersham) y 225 μl de agua. De esta forma el trazador queda a una concentración de 1 mM. Esta preparación se congela hasta su uso.

- Filtros Whatman (2'5 cm 6F/C)

- Acido tricloroacético 10% (TCA)

- Etanol absoluto

- Eter sulfúrico saturado con agua

- Líquido de centelleo (Merit)

b) Método

Hay que preparar 4 tipo diferentes de tubos:

1. Problemas: - 50 μ l de histona
- 10 μ l de agua
- 5 μ l de FNa
- 10 μ l de ATP-³²P
- 40 μ l de los sobrenadantes
2. Tubos con AMPc frío que activan completamente a la proteína quinasa: Igual que el anterior, añadiendo 10 μ l de AMPc en vez de agua.
3. Tubos blanco: Sirven para determinar la incorporación de ³²P a la histona en ausencia de proteína quinasa. Igual al primero, pero añadiendo 40 μ l de agua en vez de sobrenadante.
4. Actividad total: Tubos que se procesan de la misma manera que el primero, hasta el momento de la separación en papel Whatman. Mientras que los del apartado 1,2 y 3 se separan en el filtro, los de actividad total se pasan directamente al vial con líquido de centelleo.

Incubar 10 min a 30°C. Pipetar 100 μ l de la mezcla a filtros Whatman. Precipitar en TCA 10% (15 min) y lavar dos veces más (5 + 5 min). Lavar con etanol (5 min) y con

éter saturado con agua (5 min). Dejar secar los filtros y contar la radioactividad en viales con 5 ml de líquido de centelleo.

A los valores obtenidos se les resta el blanco y, después, se expresan como el cociente $-AMPC/+AMPC$.

RESULTADOS

Las experiencias llevadas a cabo para caracterizar el sistema receptor-efector para VIP en las células mononucleares sanguíneas humanas siguen un orden muy preciso que se puede se puede dividir en 4 etapas:

1. Caracterización de la interacción del ^{125}I -VIP con el receptor de membrana.
2. Caracterización de la producción de AMPc en la célula por efecto del VIP.
3. Caracterización de actividad proteína quinasa dependiente de AMPc.
4. Estudio de la interacción del ^{125}I -VIP al receptor y de la producción de AMPc en las diversas subpoblaciones de células mononucleares: Linfocitos B, linfocitos T, monocitos y contaminación de hematíes.

1. UNION DE 125 I-VIP A CELULAS MONONUCLEARES

Utilizando como trazador 125 I-VIP y como modelo celular células mononucleares sanguíneas humanas se realizan diversas experiencias de unión del péptido al receptor para determinar las condiciones idóneas de esta interacción y, posteriormente, determinar los parámetros cinéticos y estequiométricos específicos:

1. Efecto de la concentración celular
2. Cinética de asociación
3. Degradación de receptores
4. Efecto del pH
5. Cinética de disociación
6. Estudio estequiométrico
7. Especificidad

1.1. EFEECTO DE LA CONCENTRACION CELULAR

Se realizan incubaciones del trazador (45 pM) con diferentes concentraciones celulares en un rango de $0.5 - 8 \times 10^6$ cel/ml, a 15°C y durante 90 min. Estas condiciones experimentales se toman de trabajos previos de la literatura para otros modelos de receptores de VIP (PRIETO et al, 1979 y 1981; GUERRERO et al, 1981).

Al terminar la incubación se centrifugan las muestras, se cuenta la radioactividad del precipitado y el sobrenadante se utiliza para determinar la degradación del $^{125}\text{I-VIP}$ a cada concentración celular (ver material y métodos).

En la figura 11 y tabla 1 se muestra que la unión específica de $^{125}\text{I-VIP}$ a las células es proporcional a la concentración de estas hasta 2×10^6 cel/ml, perdiéndose dicha proporcionalidad a concentraciones mayores. Asimismo, la degradación del péptido depende también de la concentración celular siendo superior al 40% por encima de 2×10^6 cel/ml (figura 12 y tabla 2).

Es por ello que para las siguientes experiencias se toman 1.5×10^6 cel/ml en la que la unión específica está en el rango de proporcionalidad y es lo suficientemente alta como para poder trabajar con los valores obtenidos. Además, la degradación del péptido se mantiene en unos valores de un 30% aproximadamente.

Tabla 1

Porcentaje de ^{125}I -VIP unido específicamente a células mononucleares sanguíneas en función de la concentración celular (\bar{X} de triplicados).

Concentración celular ($\times 10^6$ cel/ml)	0'5	1'0	1'5	2'0	4'0	8'0
% ^{125}I -VIP unido	2'6	3'0	4'6	5'2	8'0	8'9

Tabla 2

^{125}I -VIP degradado en función de la concentración celular, expresado como porcentaje de VIP indemne con respecto a un control en ausencia de células (\bar{X} de triplicados).

Concentración celular ($\times 10^6$ cel/ml)	0'5	1'0	1'5	2'0	4'0	8'0
%VIP indemne	100	76	65	60	39	41

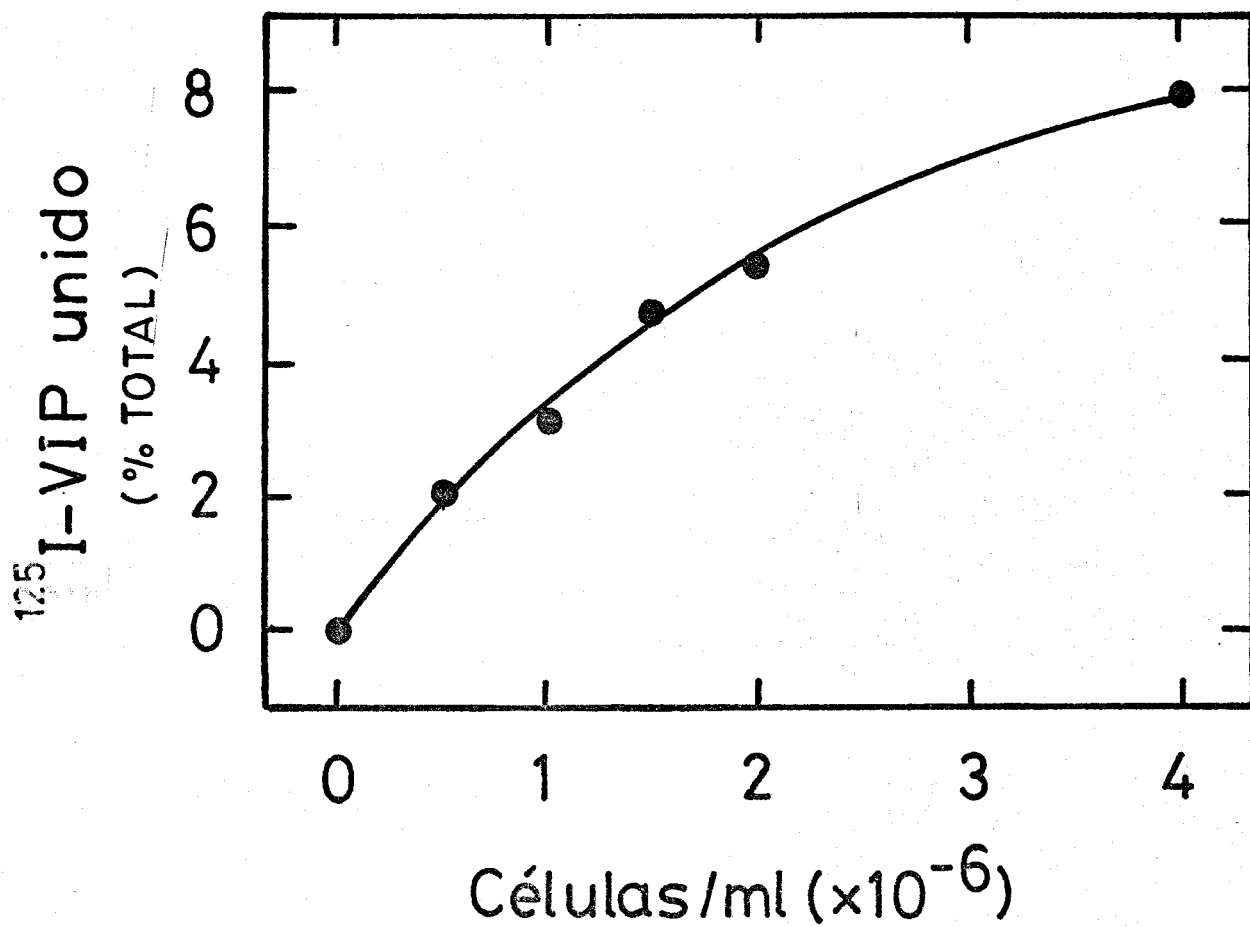


Fig.11 Porcentaje de unión específica de ^{125}I -VIP en función de la concentración celular.

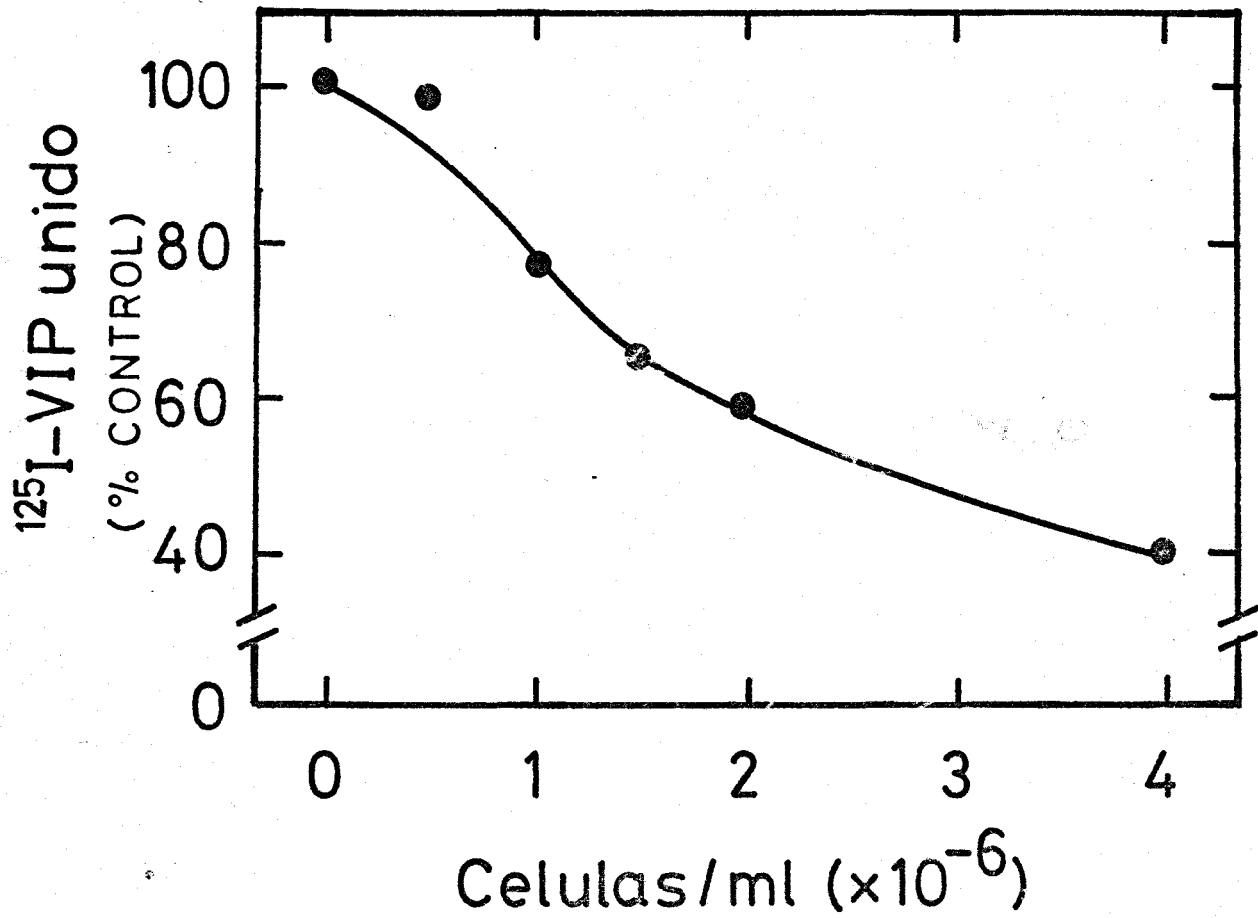


Fig. 12 Porcentaje de ^{125}I -VIP indemne después de su incubación con diferentes concentraciones de células.

1.2. CINETICA DE ASOCIACION

Con una concentración celular de 1.5×10^6 cel/ml, se estudia la unión del péptido al receptor en función del tiempo y la temperatura. En la figura 13 se observa como a 15 y 30°C el porcentaje de unión específica aumenta conforme transcurre el tiempo de incubación. Se alcanza un estado de equilibrio aparente a 60 min para 15°C, mientras que a 30°C lo que se obtiene es un pico de unión máxima a los 30 min para que luego esta descienda rápidamente (tabla 3).

Estudiando la degradación del péptido en función del tiempo y temperatura (figura 14) puede observarse que esta es mucho mayor a 30 que a 15°C. Esta degradación tan alta a 30°C puede explicar el hecho de que no se consiga obtener una unión estable del VIP al receptor, ya que el péptido desaparece rápidamente del medio de incubación (tabla 4). A 15°C la degradación es sensiblemente menor, por lo que para el resto de las experiencias se utilizará siempre esta temperatura y un tiempo de incubación de 90 min.

Tabla 3

Porcentaje de ^{125}I -VIP unido específicamente a células mononucleares sanguíneas en función del tiempo y temperatura de incubación (\bar{X} de dos experiencias por triplicado).

% VIP unido	tiempo (min)						
	5	15	30	60	90	120	180
15°C	2'2	3'6	4'6	5'9	6'3	6'1	5'6
30°C	3'8	5'7	6'1	6'3	5'6	3'5	1'7

Tabla 4

^{125}I -VIP degradado en función del tiempo y temperatura expresado, como porcentaje de VIP indemne con respecto a un control en ausencia de células. (\bar{X} de triplicados).

% VIP indemne	tiempo (min)						
	5	15	30	60	90	120	180
15°C	100	100	90	70	65	58	45
30°C	-	81	73	49	29	21	12

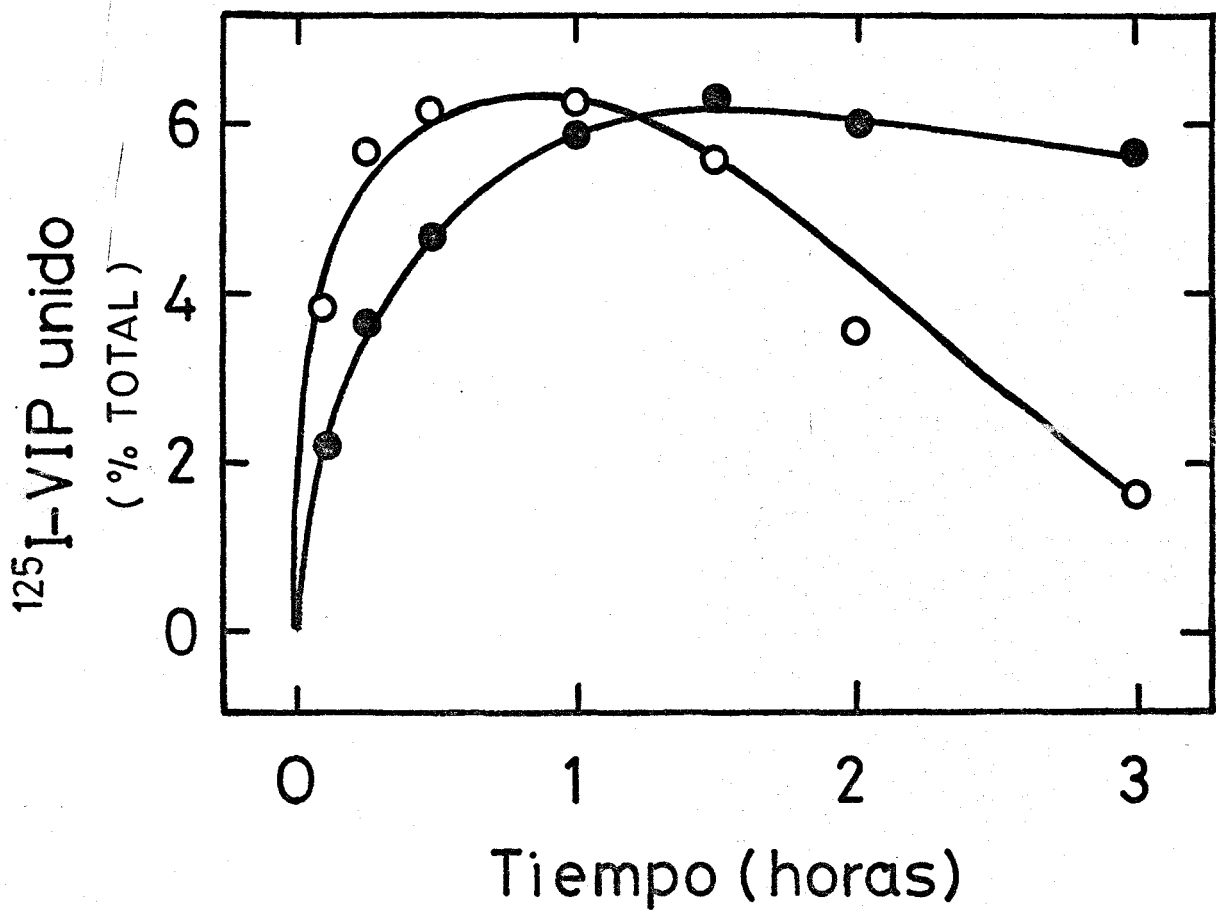


Fig. 13 Porcentaje de ^{125}I -VIP unido específicamente a células mononucleares en función del tiempo y la temperatura (15°C, ●—●; 30°C, ○—○).

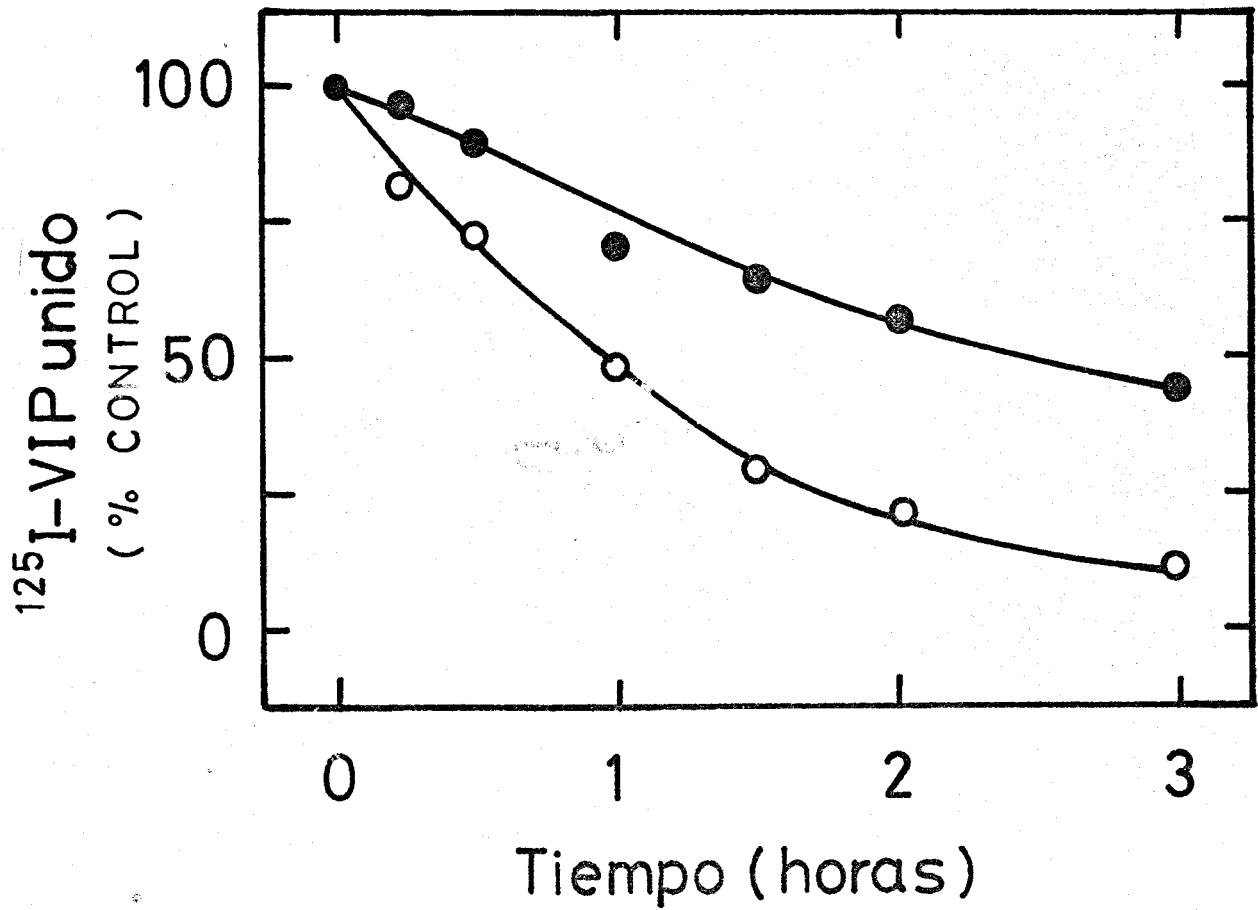


Fig.14 Porcentaje de VIP indemne después de su incubación a diferentes tiempos y temperaturas (15°C, ●—●; 30°C, ○—○).

1.3. DEGRADACION DE RECEPTORES

Otra variable que hay que valorar es la degradación de los receptores durante la incubación. Realizando preincubaciones de las células en ausencia del trazador, se muestra en la figura 15 que con una de preincubación apenas se afectan los receptores, aumentando algo la degradación a los 90min y mucho mas tras 120 min.

No obstante, a los 90 min, que es el tiempo seleccionado para realizar las siguientes experiencias, la degradación es inferior al 20%. (tabla 5)

Tabla 5

VIP unido a células mononucleares sanguíneas tras diferentes periodos de preincubación sin trazador, expresado como porcentaje de unión máxima en ausencia de preincubación (\bar{X} de triplicados).

	tiempo de preincubación (min)				
	0	30	60	90	120
^{125}I -VIP unido (% del máximo)	100	100	95	82	62

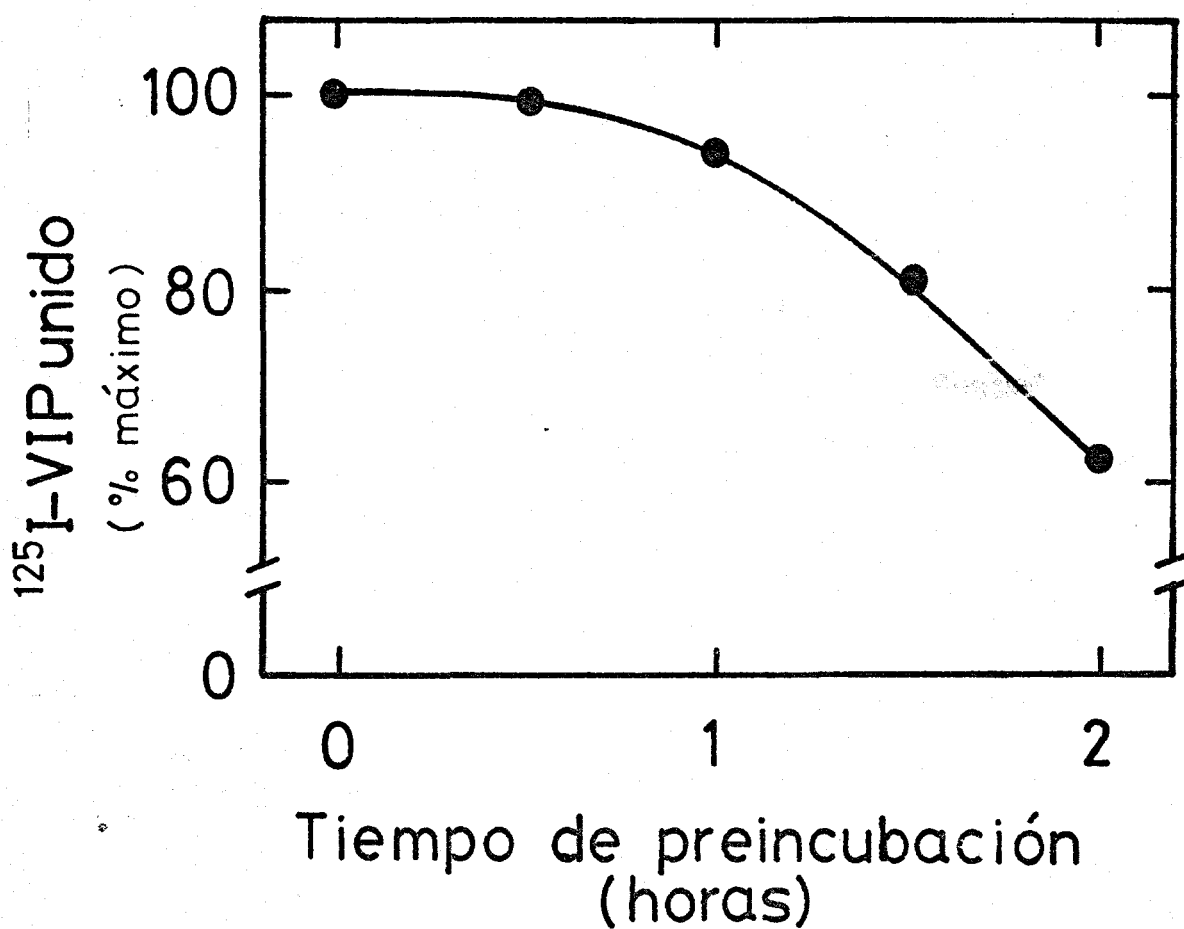


Fig. 15 ^{125}I -VIP unido a células tras diversos periodos de preincubación sin trazador, expresado como porcentaje de la unión a tiempo 0 de preincubación.

1.4. EFFECTO DEL pH

La figura 16 representa el efecto que ejerce el pH del medio de incubación sobre la unión del VIP al receptor (tabla 6). El pH en el que se obtiene un porcentaje mayor de unión específica es 7'5, mientras que por debajo de 7 y por encima de 8 la unión disminuye drásticamente.

Tabla 6

^{125}I -VIP unido específicamente a células mononucleares sanguíneas en función del pH, expresado como porcentaje de la unión máxima (\bar{X} de triplicado).

	pH					
	6'5	7'0	7'5	8'0	8'5	9'0
^{125}I -VIP unido (% del máximo)	48	88	100	53	37	29

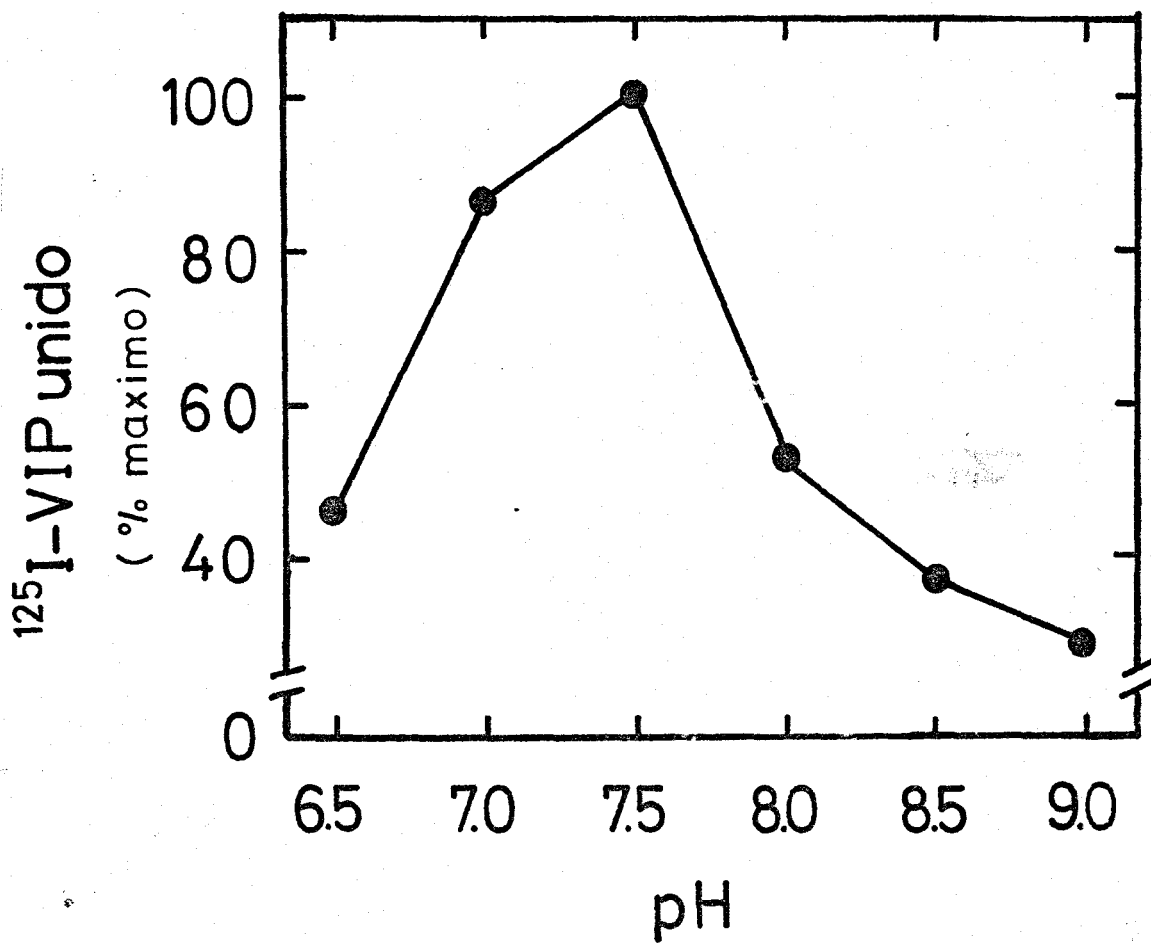


Fig. 16 ^{125}I -VIP unido a células a diferentes pH, expresado como porcentaje de la unión máxima.

1.5. CINETICA DE DISOCIACION

La unión del ^{125}I -VIP a sus receptores de células mononucleares sanguíneas es un proceso reversible como se comprueba en la figura 17, en la que se ha inducido la separación del complejo trazador-receptor mediante la adición de un exceso de VIP frío ($1 \mu\text{M}$).

El perfil de la curva de disociación corresponde a una cinética de segundo orden, indicando la presencia de dos receptores de diferente afinidad. El de alta afinidad tiene un tiempo de disociación medio de 90 min y el de baja afinidad de 20 min (tabla 7).

Tabla 7

^{125}I -VIP unido específicamente a células mononucleares sanguíneas en función del tiempo, tras añadir al complejo trazador-receptor un exceso de VIP frío ($1 \mu\text{M}$). Los valores se expresan como porcentaje de la unión inicial (\bar{X} de triplicados).

	tiempo (min)					
	0	5	15	30	60	90
^{125}I -VIP unido (% del inicial)	100	85	80	69	55	43

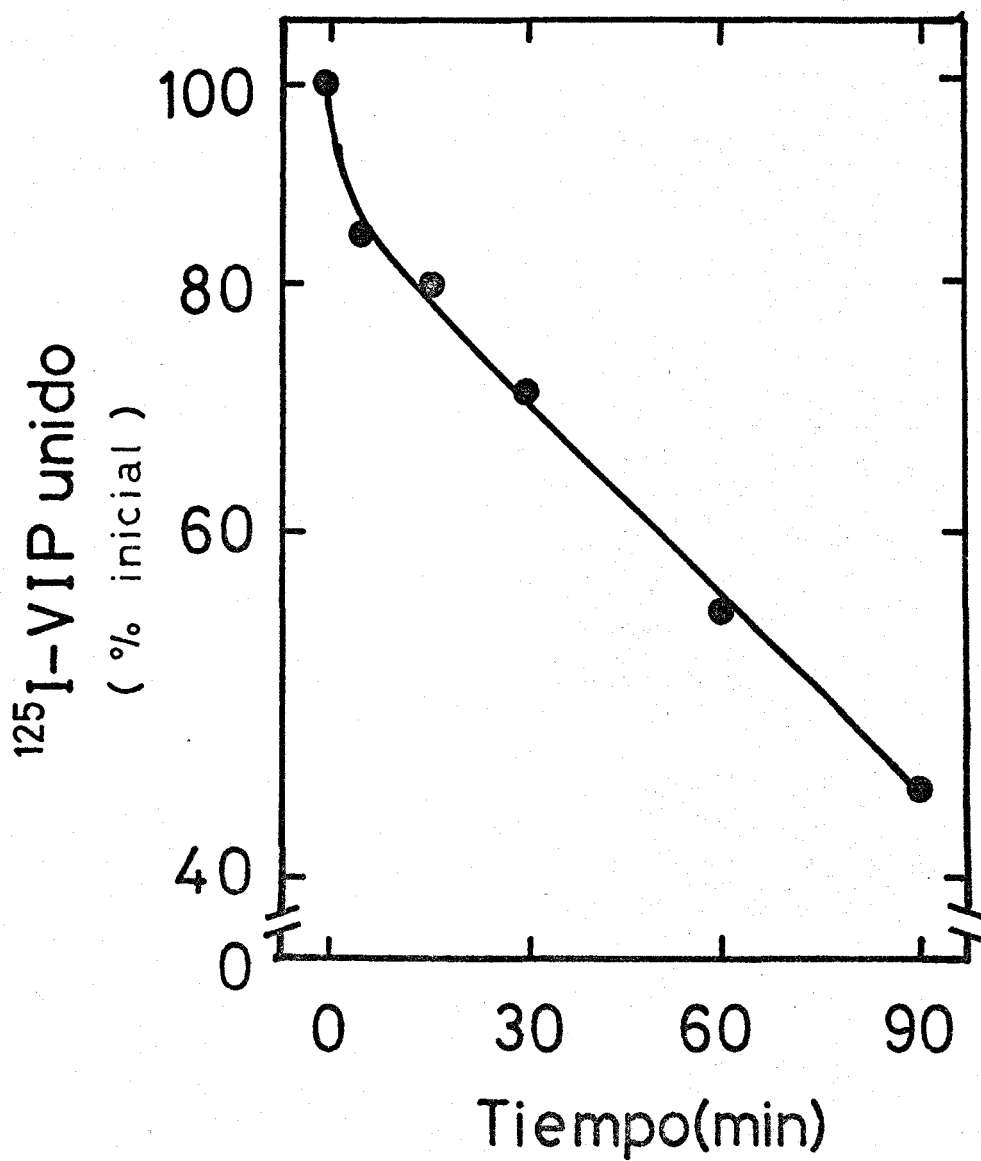


Fig.17 Cinética de disociación del complejo hormona-receptor tras la adición de una alta concentración de VIP frío ($1 \mu\text{M}$).

1.6. ESTUDIO ESTEQUIOMETRICO

Para estudiar la estequiometría de la unión VIP-receptor se incuban las células con ^{125}I -VIP (45 pM) y concentraciones crecientes de VIP frío (10^{-11} - 10^{-7} M). En la figura 18 puede observarse como concentraciones crecientes de VIP frío van desplazando al trazador que se encuentra unido a los receptores (tabla 8). De esta gráfica puede obtenerse la afinidad global aparente de los receptores, que es la concentración de VIP frío capaz de inhibir al 50% la unión del trazador a la membrana. Este valor es de 0.4×10^{-9} M. Se encuentra una disminución significativa de la unión a concentración tan baja como 3×10^{-11} M.

En la figura 19 se representan los resultados anteriores según el método de SCATCHARD (1949), obteniéndose una curva de concavidad superior. Esto sugiere la existencia de dos poblaciones de receptores, una de alta afinidad ($K_d = 0.24 \times 10^{-9}$ M) y una baja capacidad de unión (8 fmol/ 10^6 cél.) y, otra, de baja afinidad ($K_d = 8 \times 10^{-8}$ M) y alta capacidad de unión (800 fmol/ 10^6 cél.). De esta forma los receptores de alta y baja afinidad representan respectivamente un 1 y 99% del total (tabla 9).

Tabla 8

Porcentaje de ^{125}I -VIP unido específicamente a células mononucleares sanguíneas en ausencia y presencia de concentraciones crecientes de VIP frío ($\bar{X} \pm \text{ESM}$, $n = 5$).

<u>VIP (M)</u>	<u>% ^{125}I-VIP unido</u>
0	4'79 \pm 0'64
10^{-11}	4'19 \pm 0'36
3×10^{-11}	3'63 \pm 0'34
10^{-10}	3'04 \pm 0'41
10^{-9}	2'02 \pm 0'40
10^{-8}	1'31 \pm 0'40
10^{-7}	0'85 \pm 0'22

Tabla 9

Constante de disociación (Kd) y capacidad de unión del receptor de VIP en células mononucleares sanguíneas.

	<u>Kd (nM)</u>	<u>fmol/10^6 cél.</u>
Global	0'40	808
Alta afinidad	0'24	8
Baja afinidad	80'00	800

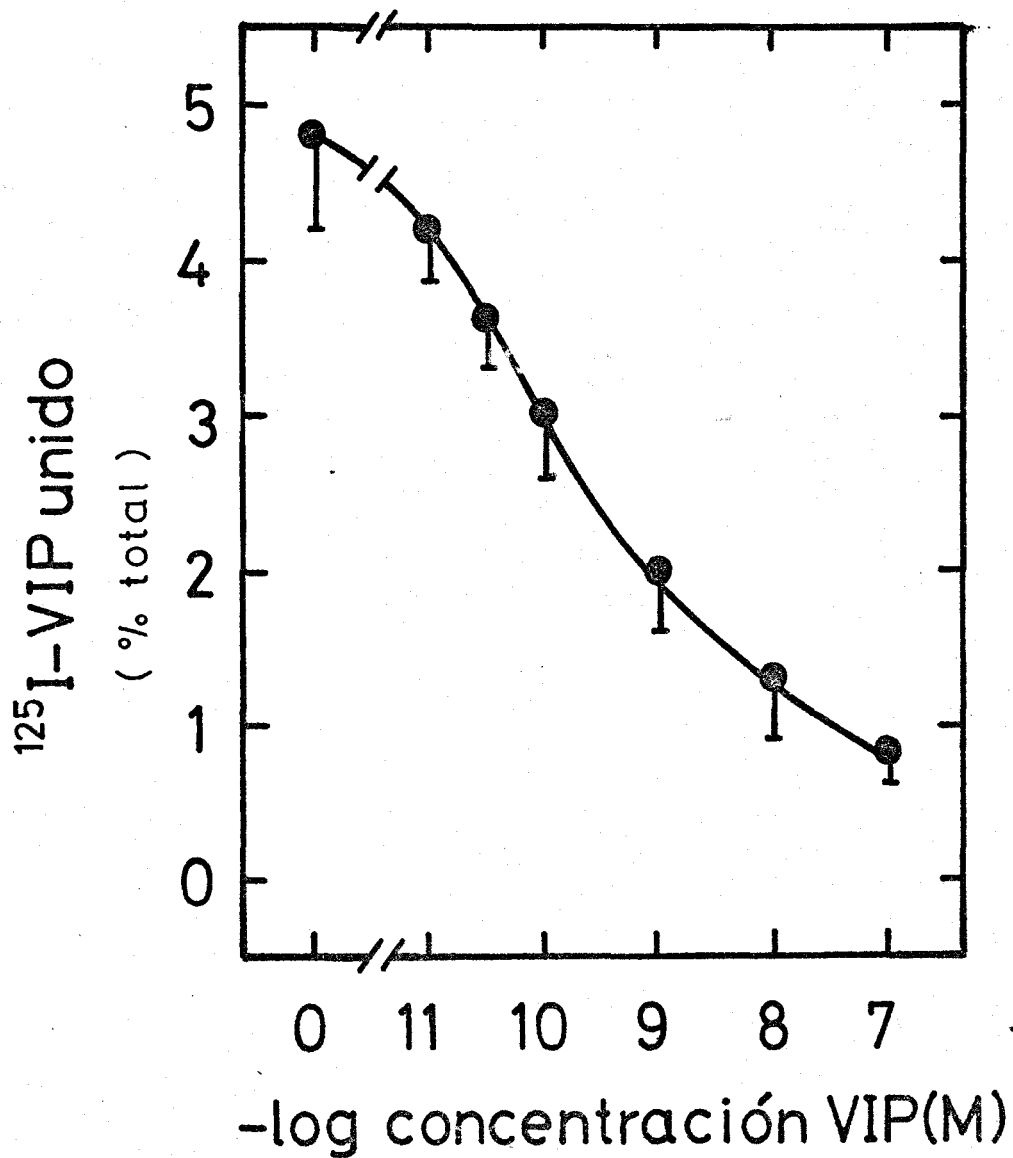


Fig.18 Unión específica de $^{125}\text{I-VIP}$ a células mononucleares sanguíneas en ausencia y presencia de concentraciones crecientes de VIP frío.

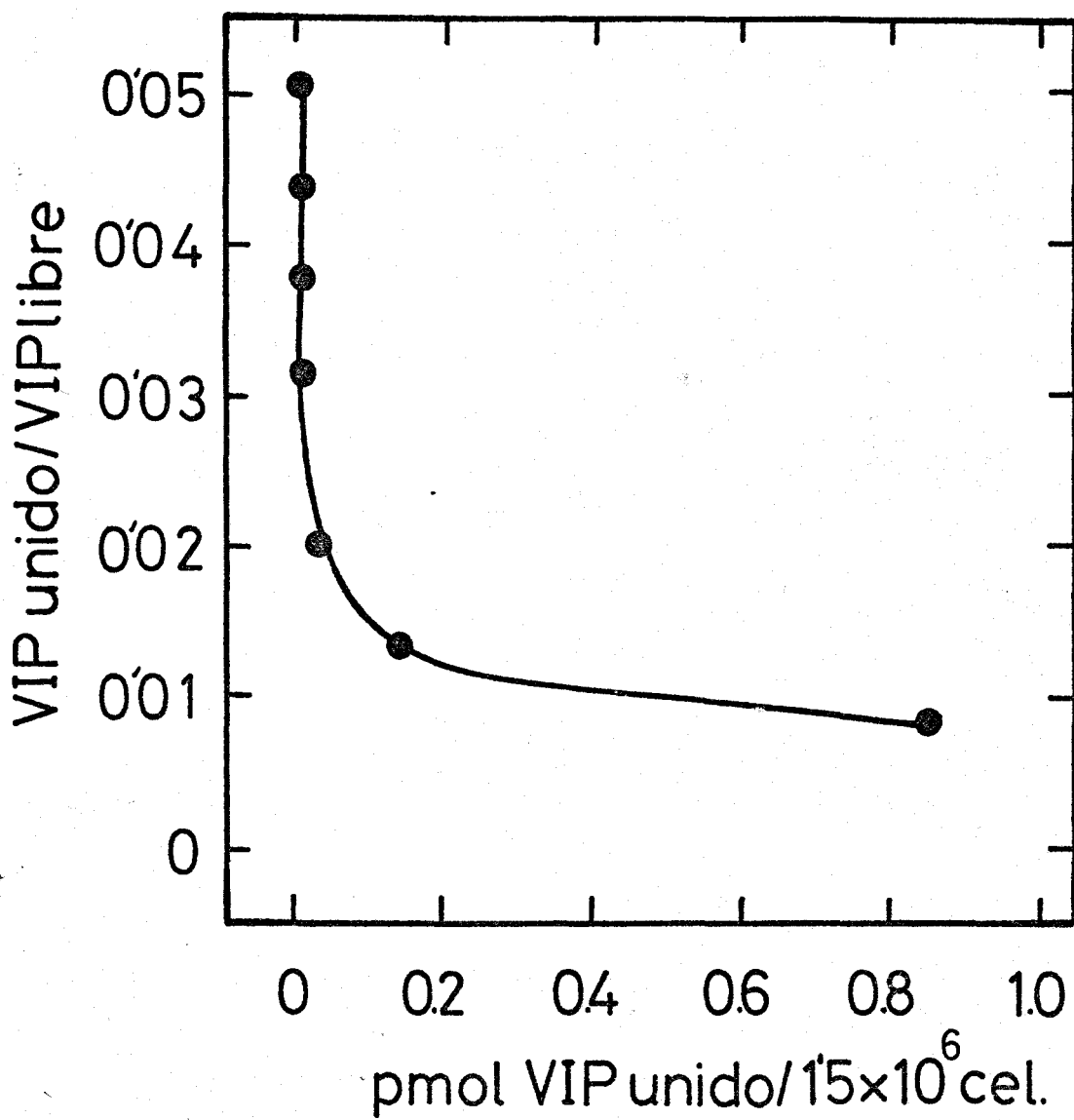


Fig. 19 Representación de SCATCHARD (1949).

1.7. ESPECIFICIDAD

Para determinar si el receptor del VIP es específico para este péptido, se realizan incubaciones del trazador con las células mononucleares sanguíneas en ausencia y presencia de concentraciones crecientes de otros péptidos como son la secretina, glucagón, insulina y somatostatina.

En la figura 20 se observa que sólo la secretina es capaz de desplazar al trazador de su unión al receptor, aunque con una afinidad 400 veces menor a la del VIP nativo. La somatostatina, glucagón e insulina son prácticamente inactivos a concentraciones tan altas como 10^{-7} M (tabla 10).

Tabla 10

125 I-VIP unido específicamente a células mononucleares sanguíneas en presencia de VIP nativo, secretina, somatostatina, glucagón e insulina. Los resultados se expresan como porcentaje de la unión máxima en ausencia de péptidos fríos (\bar{X} de triplicados).

	0	10^{-11}	3×10^{-11}	10^{-10}	10^{-9}	3×10^{-9}	10^{-8}	10^{-7}
VIP	100	96	88	85	46	-	33	28
Secretina	100	-	-	-	91	81	79	57
Glucagón	100	-	-	-	-	-	-	100
Insulina	100	-	-	-	-	-	-	100
Somatostat.100	100	-	-	-	-	-	90	87

Péptidos fríos (M)

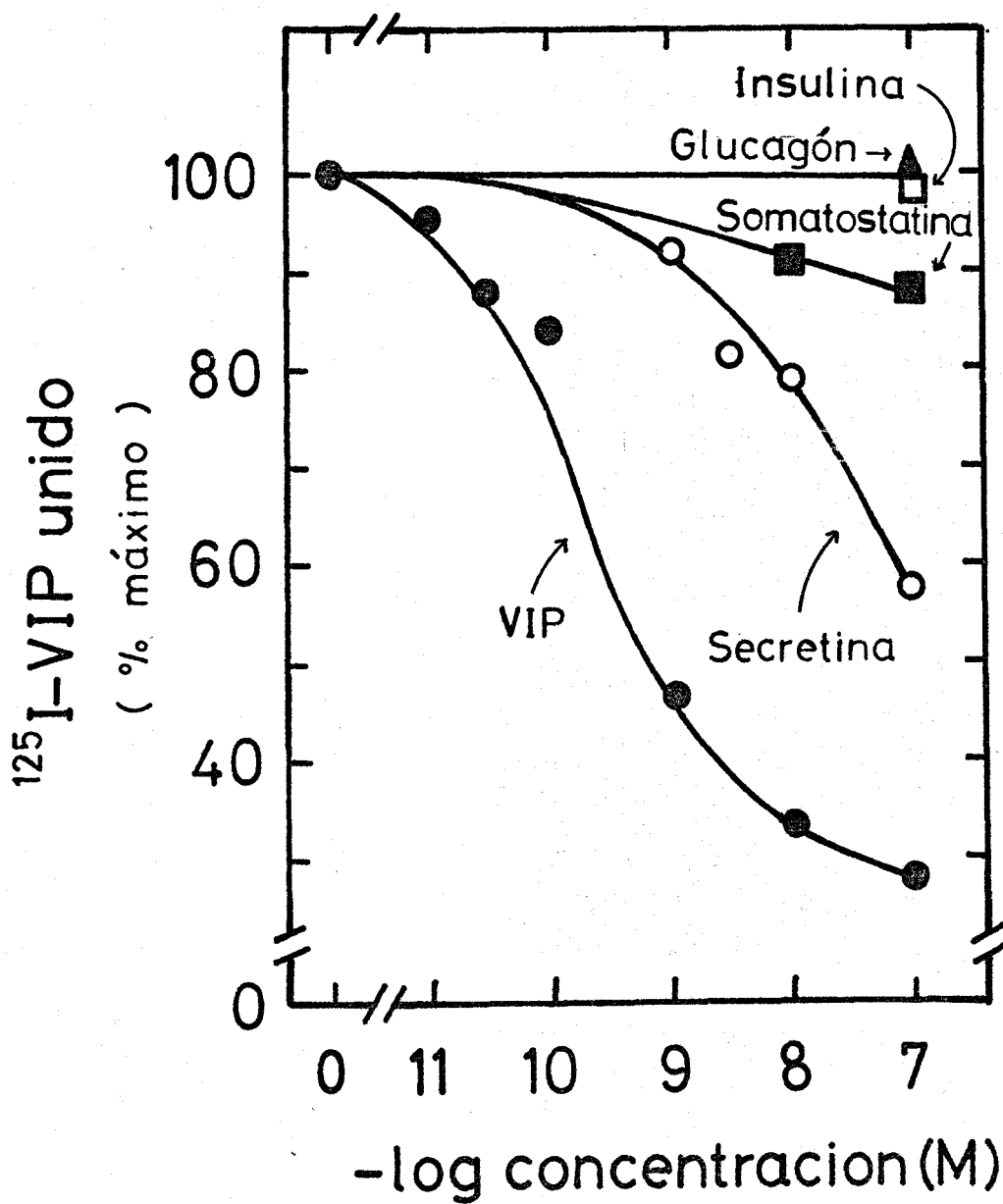


Fig. 20 Unión específica de ^{125}I -VIP a células mononucleares en presencia de diferentes péptidos.

2. PRODUCCION DE AMPc EN CELULAS MONONUCLEARES POR ACCION DEL VIP

Después de caracterizar la interacción del VIP con sus receptores específicos de membrana, el siguiente paso consiste en encontrar el segundo mensajero o efector que traduce la información que el péptido contiene. En el presente trabajo se estudia el AMPc como efector de la acción del VIP en células mononucleares sanguíneas, de forma similar a lo que le ocurre al VIP en otros sistemas celulares (LABURTHE et al, 1979a; PRIETO et al, 1981). Se estudia la producción de AMPc en las siguientes condiciones:

1. Efecto de la concentración celular
2. Efecto del tiempo y la temperatura
3. Efecto del pH
4. Efecto de la concentración de VIP
5. Especificidad

2.1. EFEECTO DE LA CONCENTRACION CELULAR

En primer lugar se determina el AMPc producido a diferentes concentraciones de células mononucleares sanguíneas en ausencia (basal) y presencia (estimulación) de VIP nativo (10^{-8} M). La incubación se realiza a 15°C y durante 45 min. En la figura 21 se observa que la producción de AMPc es proporcional a las concentraciones celulares estudiadas tanto en condiciones basales como con VIP. Para las siguientes experiencias se utiliza la concentración celular de 0.5×10^6 cel/ml en la cual los valores obtenidos de AMPc son perfectamente medibles (tabla 11).

Tabla 11

AMPc producido a diferentes concentraciones de células mononucleares sanguíneas en condiciones basales y en presencia de VIP (10^{-8} M). (\bar{x} de triplicados).

<u>células (10^6/ml)</u>	<u>AMPc (pmol/ml)</u>	
	<u>basal</u>	<u>VIP (10^{-8} M)</u>
0'25	0'12	2'0
0'5	1'6	7'7
1'0	5'0	15
1'5	9'25	26
3'0	17	48
6'0	35	95

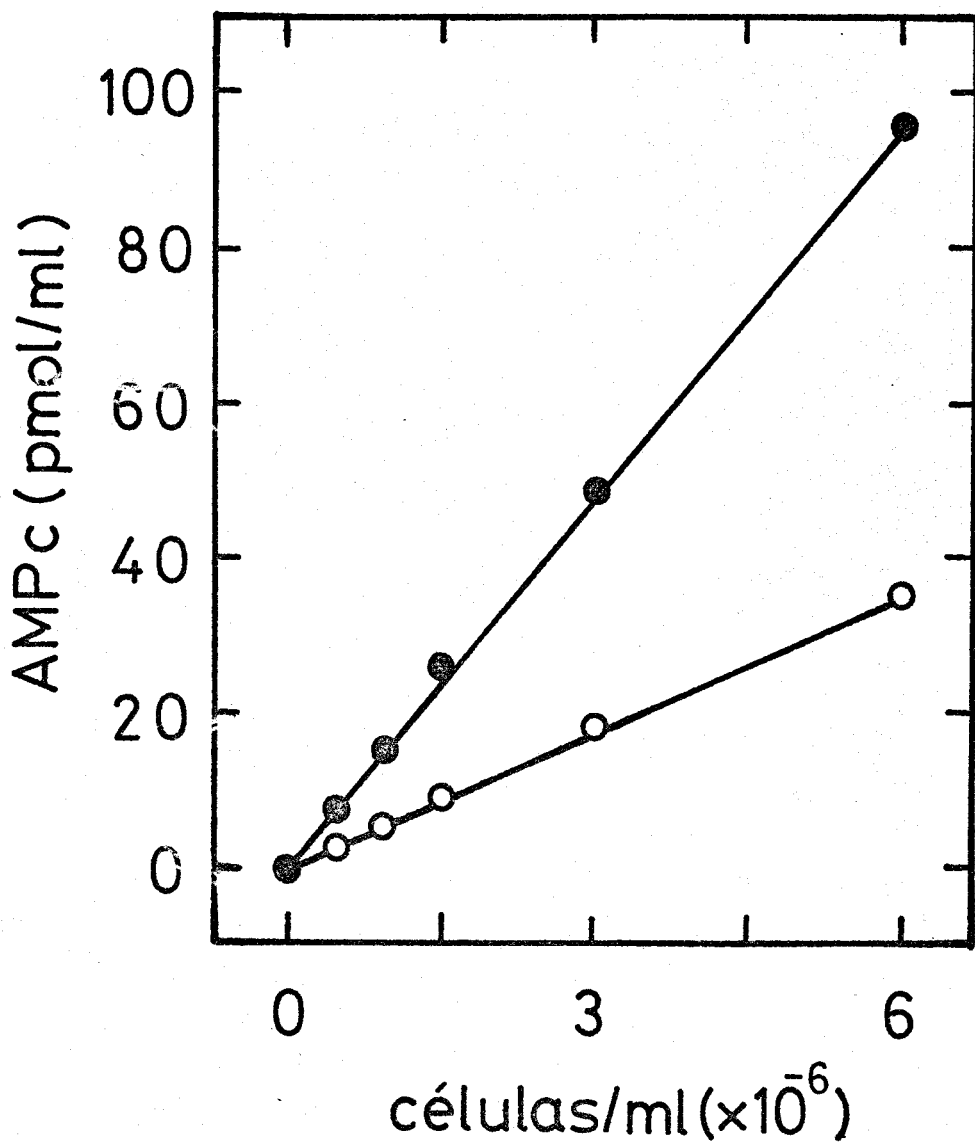


Fig. 21 Efecto de la concentración celular sobre la producción de AMPc en condiciones basales (O—O) y con VIP (10^{-8} M) (\bullet — \bullet).

2.2. EFEECTO DEL TIEMPO Y LA TEMPERATURA

En la figura 22 se representa la producción de AMPc en células mononucleares sanguíneas a dos temperaturas (15 y 30°C) y diferentes tiempos de incubación, siempre en condiciones basales y con VIP (10^{-8} M) (tabla 12). Los valores basales a 15 y 30°C son muy similares (4-6 pmol AMPc/ 10^6 cel) y permanecen constantes durante todo el período de incubación. En presencia de VIP, a 15°C la producción de AMPc aumenta rápidamente alcanzando un máximo a los 30 min de incubación, manteniéndose constante a partir de entonces en un hipotético equilibrio entre la producción de AMPc y la actividad fosfodiesterásica celular. A 30°C, sin embargo, la producción por VIP de AMPc alcanza un pico máximo a los 15 min y después disminuye rápidamente, quizás debido a una intensa actividad fosfodiesterásica junto con la fuerte degradación del péptido descrita anteriormente. Hay que recordar (ver métodos) que en todas estas experiencias se encuentra presente un inhibidor de fosfodiesterasa (IBMX 0'2 mM). En la figura 23 se muestra la producción de AMPc basal y estimulada por VIP (10^{-8} M) a 15°C en presencia y ausencia de IBMX. En ausencia del inhibidor el VIP es capaz de estimular la producción AMPc, si bien la actividad fosfodiesterásica, no inhibida, acelera la desaparición del nucleótido. (tabla 13) .

Tabla 12

producción de AMPc (pmol/10⁶ cel) en células mononucleares sanguíneas a 15 y 30°C, en función del tiempo y en condiciones basales y de estimulación con VIP (10⁻⁸ M). (\bar{X} de triplicados).

tiempo (min)	AMPc (pmol/10 ⁶ cel)			
	15°C		30°C	
	basal	VIP (10 ⁻⁸ M)	basal	VIP (10 ⁻⁸ M)
0	3'6	-	1'2	-
5	4'2	12	5'8	22'8
10	3'0	21'5	5'0	18'6
20	4'5	27'6	6'6	13'8
30	3'6	22'8	6'0	12'6
45	4'8	23'4	6'6	10'2
60	4'8	23'4	8'4	9'6
90	4'2	20'4	6'6	9'0

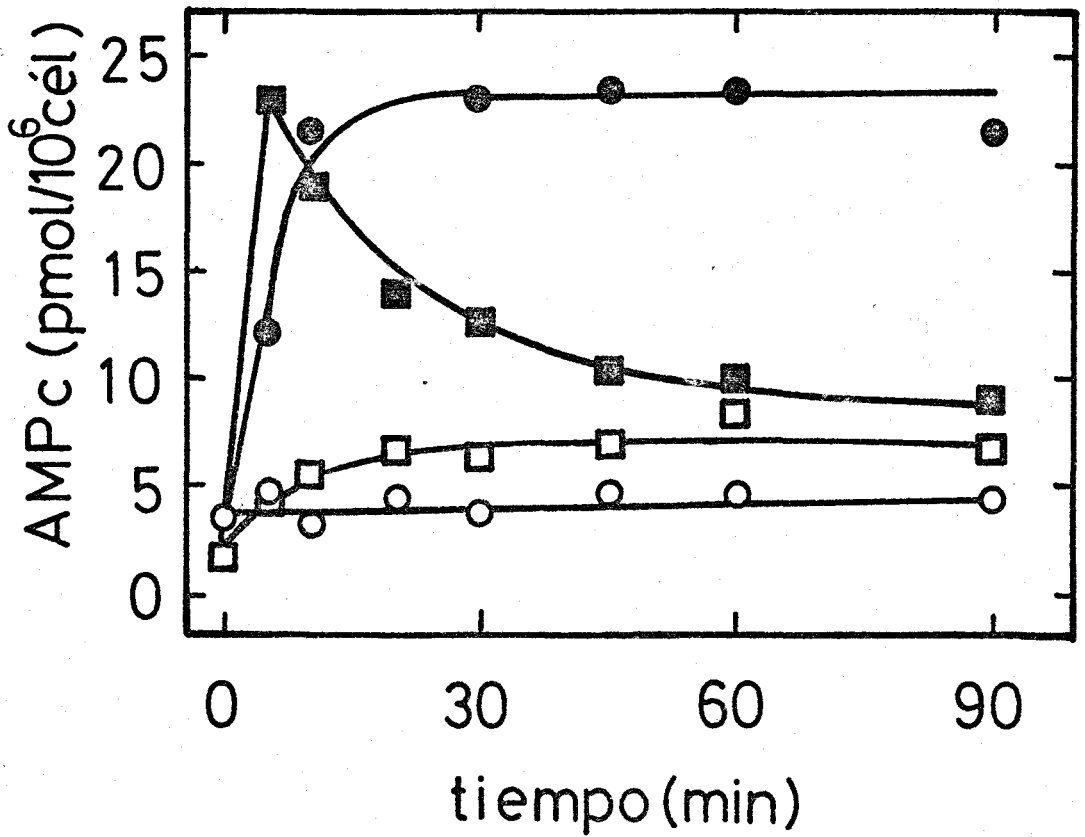


Fig. 22 Producción de AMPc en células mononucleares sanguíneas en función del tiempo, en condiciones basales (○—○, 15°C; □—□, 30°C) y en presencia de VIP (10^{-8} M) (●—●, 15°C; ■—■, 30°C).

Tabla 13

Producción de AMPc (pmol/10⁶ cel) a 15°C, en función del tiempo, en condiciones basales y con VIP (10⁻⁸M), en presencia y ausencia de IBMX (\bar{X} de triplicados).

tiempo (min)	AMPc (pmol/10 ⁶ cel)			
	-IBMX		+IBMX	
	basal	VIP (10 ⁻⁸ M)	basal	VIP (10 ⁻⁸ M)
0	5'2	-	3'6	-
5	5'0	11'5	-	12'0
10	7'0	20'5	3'0	21'5
30	4'8	22'5	4'8	23'0
45	4'5	18'0	4'8	23'4
60	5'5	16'0	5'0	23'4
90	5'0	15'0	4'2	20'4

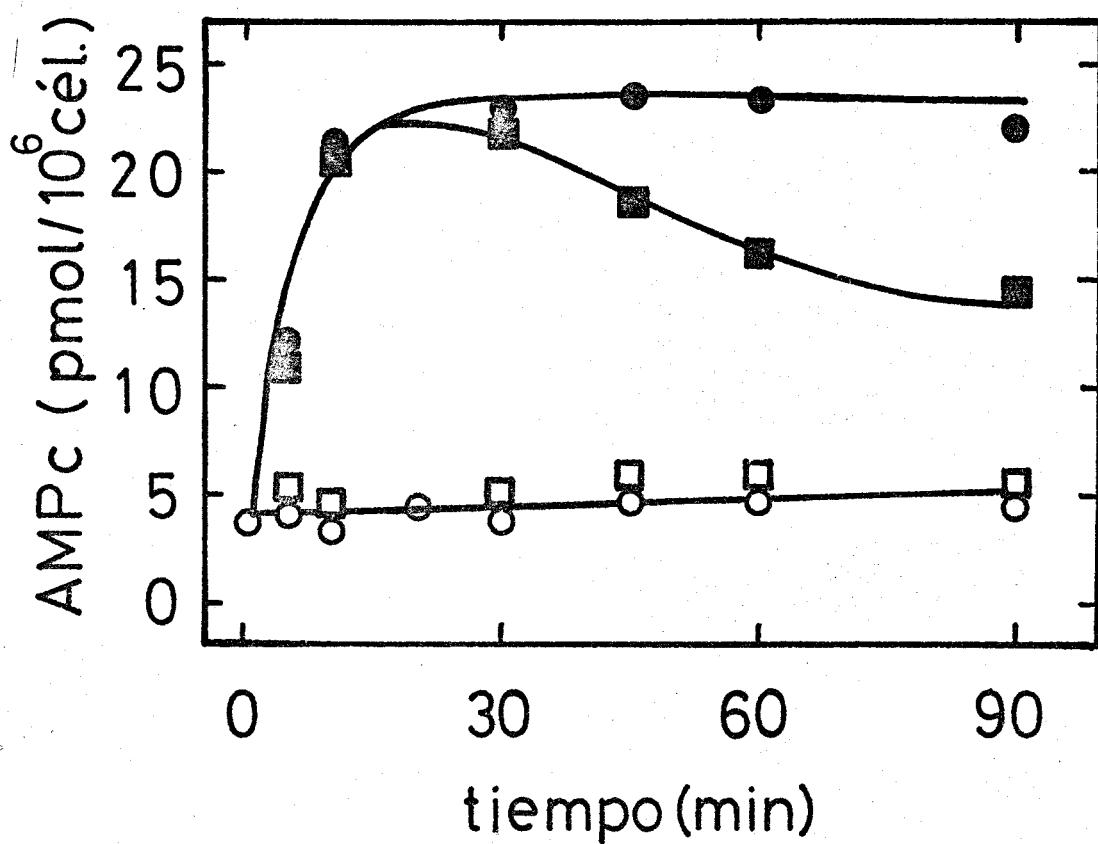


Fig. 23 Producción de AMPc en células mononucleares sanguíneas en presencia (○—○, basal; ●—●, VIP 10⁻⁸M) y ausencia (□—□, basal; ■—■, VIP 10⁻⁸M) de IBMX.

2.3. EFECTO DEL pH

En la figura 24 se muestra el efecto de diferentes pH del medio de incubación sobre la diferencia entre la producción de AMPc por VIP ($10^{-8}M$) y la basal (tabla 14). Como puede observarse, entre pH 7'0 y 7'5 se encuentra el valor óptimo para conseguir la activación del sistema adenil ciclasa. El pH por encima y por debajo de estos valores hacen disminuir drásticamente la capacidad de estimulación del VIP.

Tabla 14

Producción de AMPc en células mononucleares sanguíneas por efecto del VIP, expresado como porcentaje sobre la estimulación máxima (AMPc total - AMPc basal), a diferentes pH (\bar{X} de triplicados).

pH	6'5	7'0	7'5	8'0	8'5	9'0
AMPc (% est.máxima)	25	100	91	41	27	18

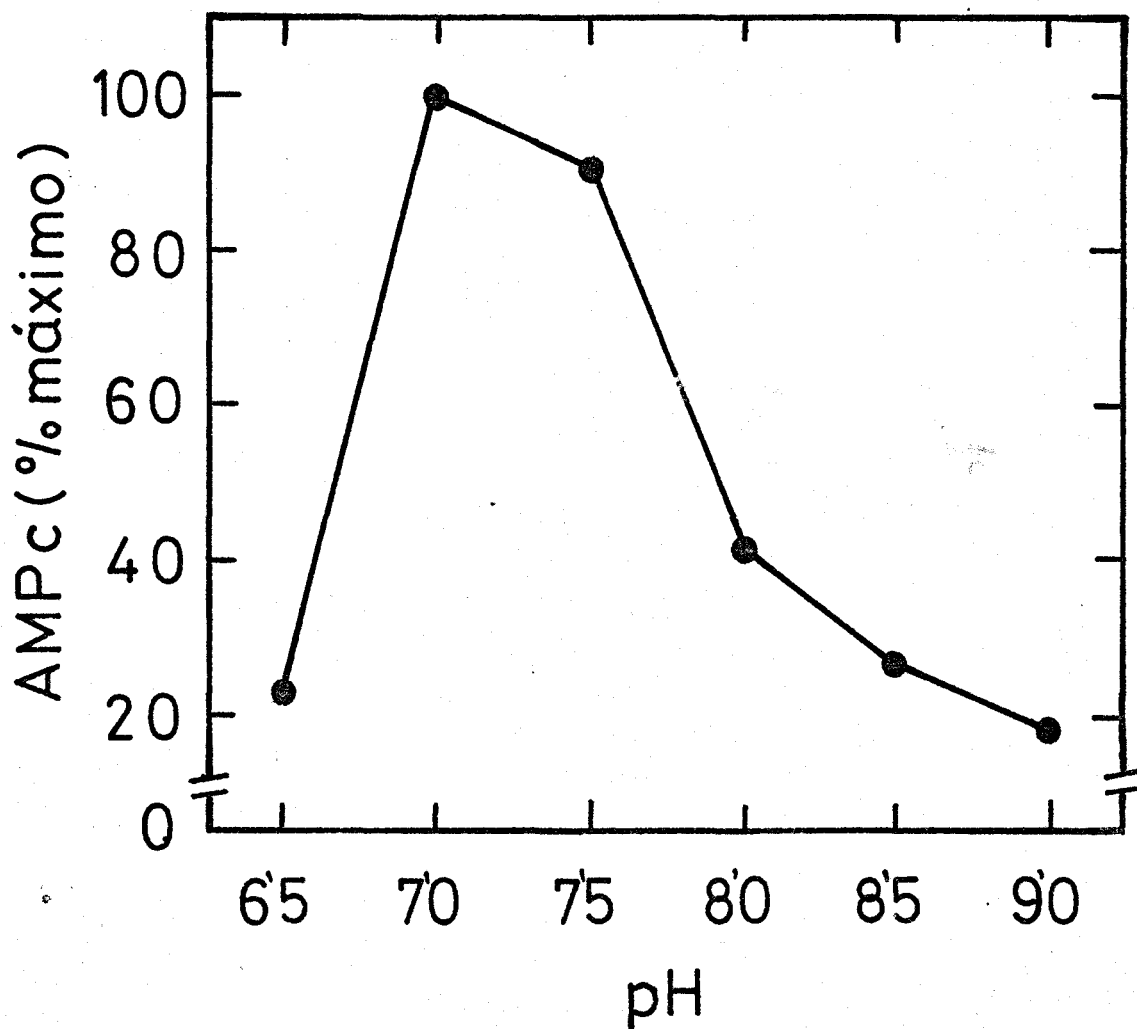


Fig. 24 Efecto del pH sobre la estimulación de la producción de AMPc por VIP en células mononucleares sanguíneas.

2.4. EFFECTO DE LA CONCENTRACION DE VIP

En la figura 25 se representa el efecto de concentraciones crecientes de VIP sobre la producción de AMPc en células mononucleares sanguíneas.

La producción de AMPc se estimula, por encima de la basal con una concentración de VIP tan baja como 3×10^{-11} M (tabla 15). Conforme aumenta la concentración, aumenta el AMPc producido hasta llegar a un máximo a 10^{-9} M VIP, no incrementándose a concentraciones superiores. Con la máxima estimulación se obtienen unos valores 4 veces superiores a los basales. El 50% de la estimulación máxima (K_m) se obtuvo a 10^{-10} M de VIP; este valor concuerda con la constante de disociación (K_d) para los receptores de alta afinidad ($K_d = 0.24$ nM), que indicaría que sólo este receptor es el que estaría acoplado al sistema adenil ciclasa, mientras que los de baja afinidad serían receptores mudos en cuanto a la producción de AMPc.

Tabla 15

AMPC producido (pmol/10⁶ cel) en células mononucleares sanguíneas en ausencia y presencia de concentraciones crecientes de VIP ($\bar{X} \pm \text{ESM}$, n=7).

VIP (M)	AMPC (pmol/10 ⁶ cel)
0	5'6 \pm 2'0
10 ⁻¹¹	7'8 \pm 2'4
3 x 10 ⁻¹¹	9'3 \pm 2'7
10 ⁻¹⁰	15'6 \pm 3'7
10 ⁻⁹	24'5 \pm 3'7
10 ⁻⁸	22'6 \pm 3'5
10 ⁻⁷	22'1 \pm 4'1

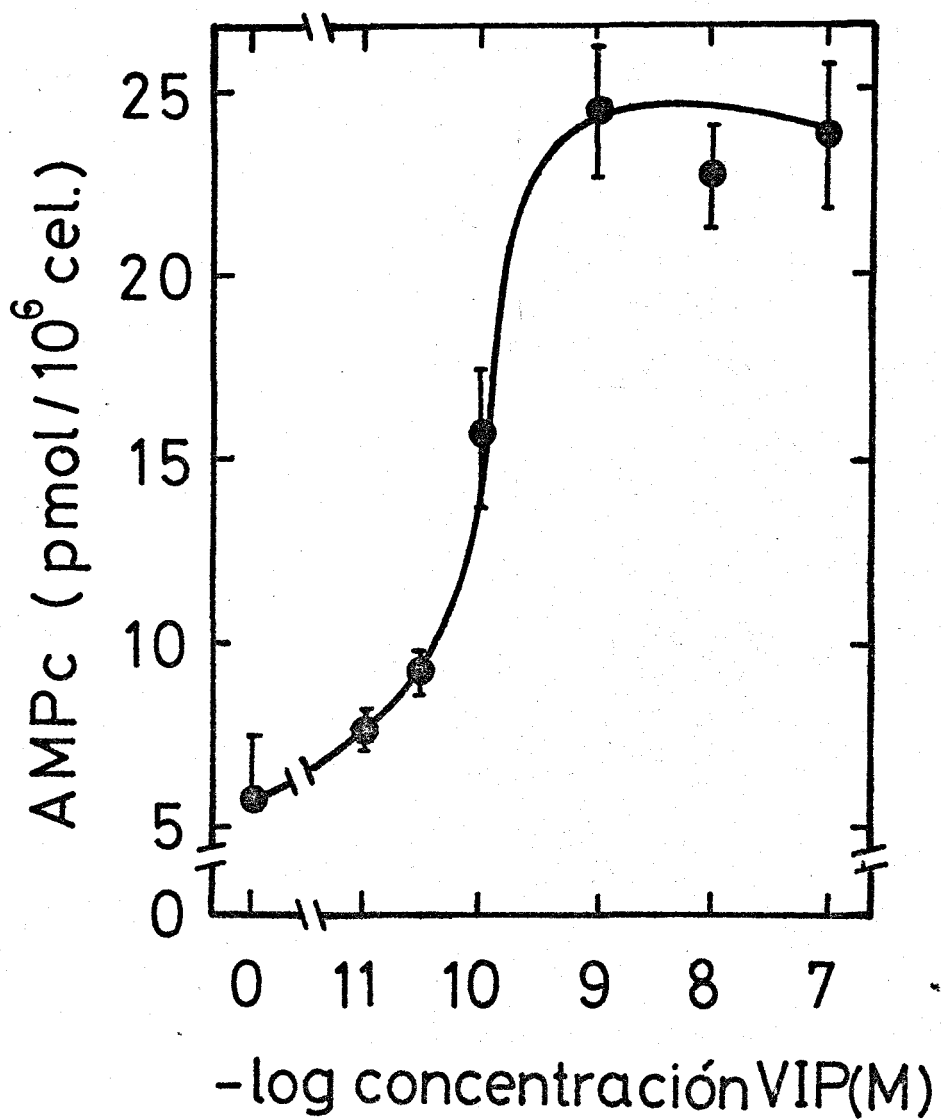


Fig. 25 Efecto de concentraciones crecientes de VIP sobre la producción de AMPc en células mononucleares sanguíneas.

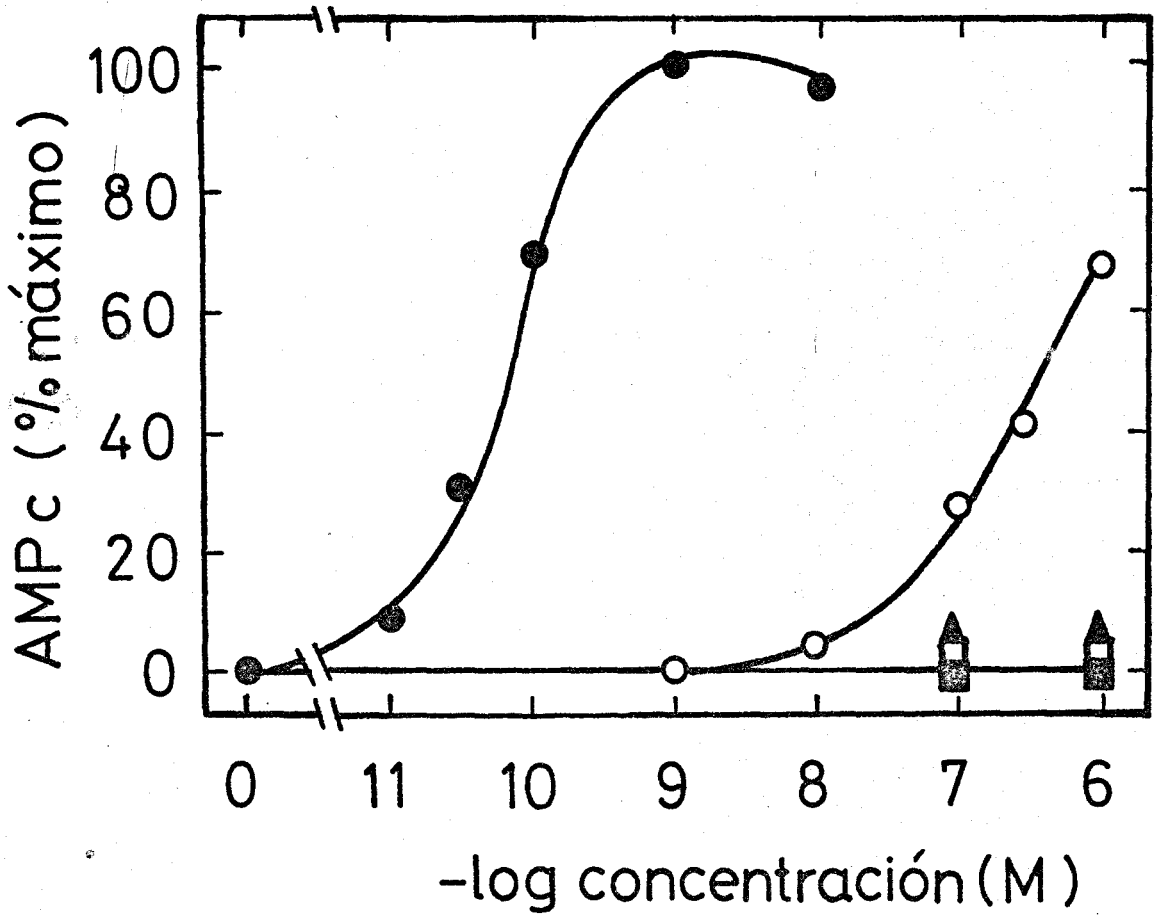


Fig. 26 Efecto del VIP (●—●), secretina (○—○), glucagón (▲—▲), insulina (□—□) y somatostatina (■—■) sobre la producción de AMPc en células mononucleares sanguíneas.

3. ACTIVACION DE PROTEINA QUINASA DEPENDIENTE DE AMPc

Después de la producción de AMPc, éste posiblemente active una proteína quinasa que, a su vez, cataliza la fosforilización de proteínas intracelulares y de alguna manera, poner en marcha el efecto biológico correspondiente a la interacción del péptido con la célula.

En el presente trabajo se esboza la activación por VIP de una proteína quinasa dependiente de AMPc, para lo que se realizan las siguientes experiencias:

1. Efecto del tiempo
2. Efecto de la concentración del péptido
3. Especificidad

3.1. EFEECTO DEL TIEMPO

En la figura 27 se representa la activación de la proteína quinasa en función del tiempo de una incubación a 15°C (2×10^6 cel/ml). Los resultados se expresan según el cociente -AMPc/+AMPc.

La experiencia se realiza en presencia de VIP (10^{-8} M) y IBMX (0'2 mM), sólo con VIP (10^{-8} M), sólo con IBMX (0'2 mM) y sin ninguno de los dos compuestos (tabla 17).

Como puede observarse, el cociente -AMPc/+AMPc permanece constante durante toda la incubación en condiciones basales (0'20-0'24). Cuando la incubación se realiza con VIP y con IBMX, a los 5 min ya se produce un incremento

del cociente, alcanzando el máximo a los 15 min (0'72) y manteniéndose estable por lo menos hasta 45 min. Cuando la incubación se realiza sólo con VIP o sólo con IBMX el aumento del cociente es sensiblemente menor.

Tabla 17

Activación de proteína quinasa en células mononucleares sanguíneas en función del tiempo. Los resultados se expresan como el cociente -AMPC/+AMPC en condiciones basales, en presencia sólo de IBMX (0'2 mM), sólo de VIP (10^{-8} M) o de VIP más IBMX (\bar{X} de triplicados).

tiempo (min)	<u>-AMPC/+AMPC</u>			
	basal	IBMX	VIP	VIP+IBMX
2'5	0'22	0'50	0'23	0'54
5	0'25	0'50	0'30	0'63
15	0'24	0'58	0'32	0'72
30	0'21	0'56	0'33	0'70
45	0'20	0'54	0'34	0'68
60	0'23	0'56	0'36	0'69

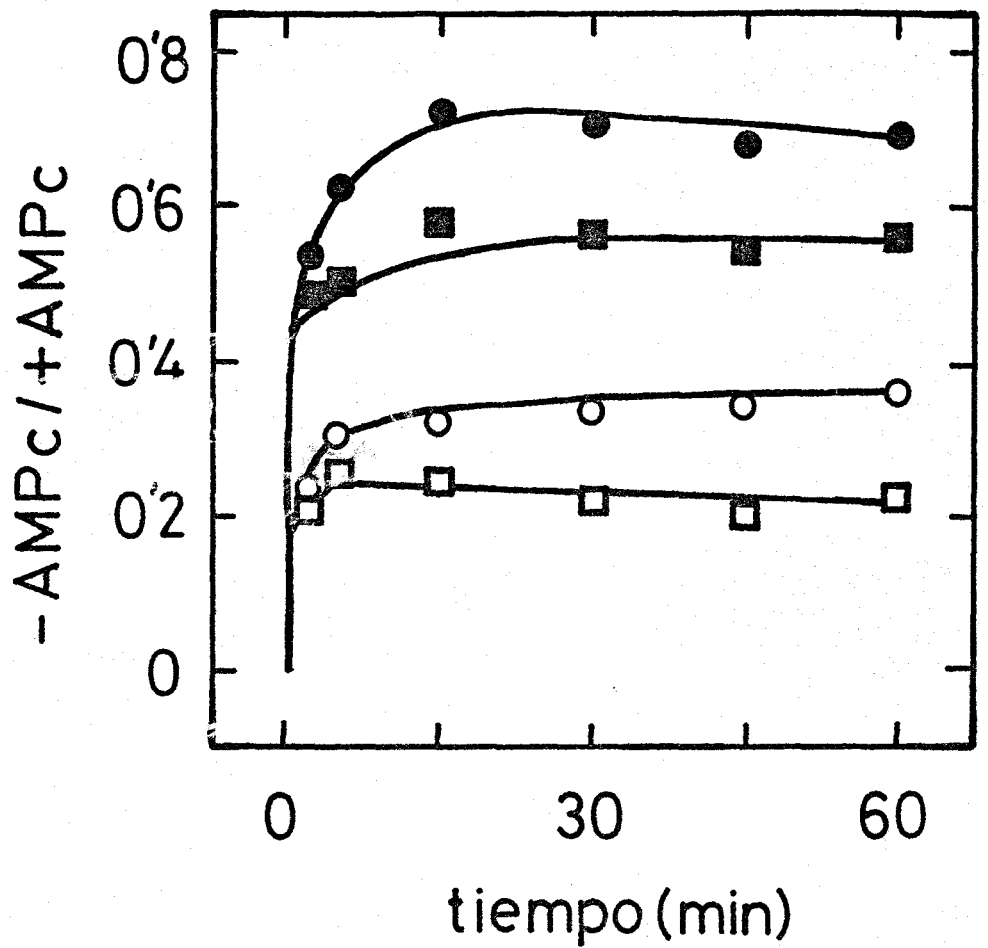


Fig. 27 Actividad de proteína quinasa en células mononucleares sanguíneas en función del tiempo y en condiciones basales (□—□), sólo con VIP (10^{-8} M) (○—○), sólo con IBMX (0.2 mM) (■—■) y con VIP más IBMX (●—●).

3.2. EFFECTO DE LA CONCENTRACION DE VIP

De la misma forma que hemos descrito en casos anteriores, la activación de la proteína quinasa es dependiente de la concentración de VIP. La activación se produce con concentraciones del péptido tan bajas como $3 \times 10^{-11} \text{M}$, alcanzándose una actividad máxima a 10^{-9}M (tabla 18). El 50% de la activación máxima (Km) se consigue a $0.6 \times 10^{-10} \text{M}$ lo que es un valor del mismo orden al obtenido para la activación de la adenil ciclasa y la kd de los receptores de alta afinidad. Es por lo tanto presumible que estas tres etapas están imbricadas según la secuencia descrita para este proceso en otros sistemas hormonales. (figura 28).

Hay que resaltar que no se consigue una activación total de la proteína quinasa ya que el cociente no llega a la unidad. Quizás el "pool" de AMPc producido por VIP tenga una "canalización" específica y sectorial hacia una proteína quinasa, no pudiendo activar a la existente en otros sectores de la célula.

Las actividades específicas de la proteína quinasa en unidades (1U = 1 μmol de Pi incorporado a histonas por min). son:

- basal..... $20.9 \mu\text{U}/10^6 \text{cel}$
- VIP (10^{-9}M)..... $39.3 \mu\text{U}/10^6 \text{cel}$
- AMPc exógeno..... $61.2 \mu\text{U}/10^6 \text{cel}$

Tabla 18

Activación de la proteína quinasa por efecto de concentraciones crecientes de VIP. Los resultados se expresan según el cociente -AMPC/+AMPC ($\bar{X} \pm$ ESM, n=3).

<u>VIP (M)</u>	<u>-AMPC/+AMPC</u>
0	0'32 \pm 0'02
10^{-11}	0'32 \pm 0'01
3×10^{-11}	0'41 \pm 0'04
10^{-10}	0'50 \pm 0'02
10^{-9}	0'60 \pm 0'01
10^{-8}	0'57 \pm 0'02
10^{-7}	0'57 \pm 0'04

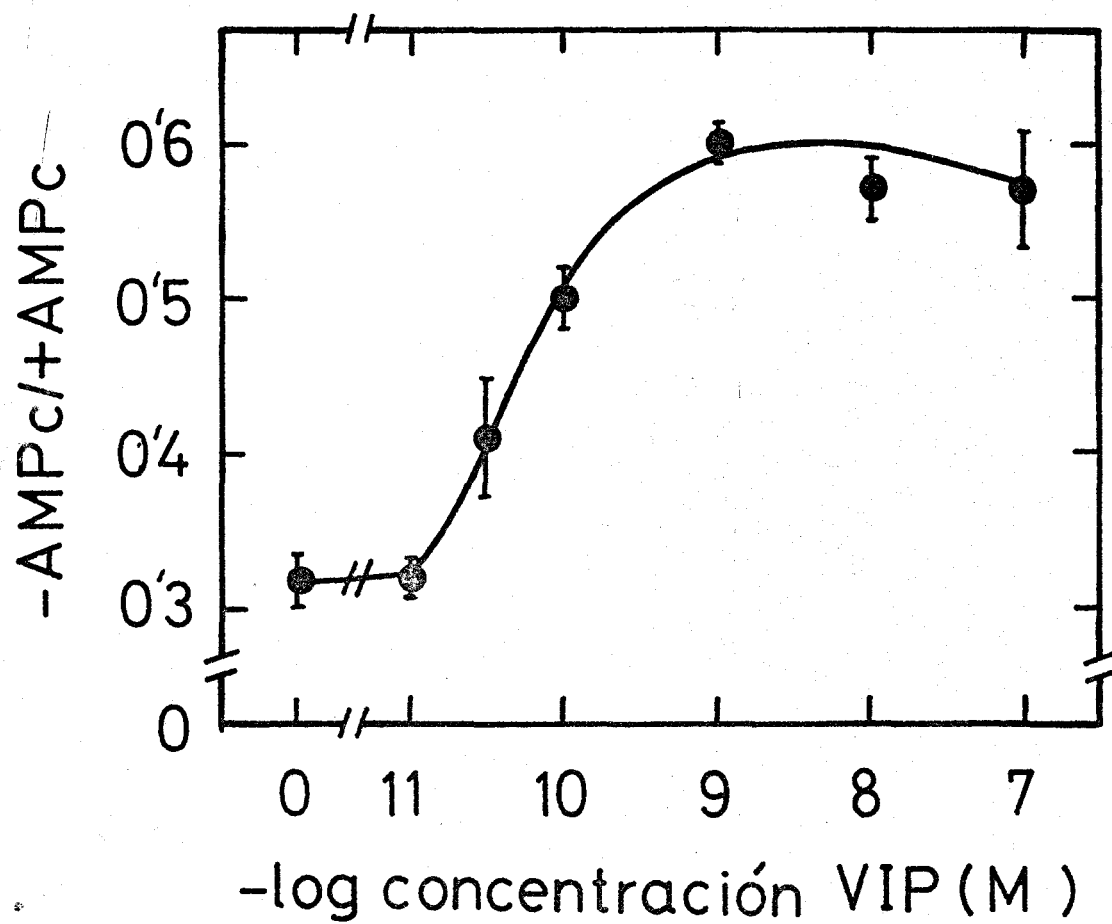


Fig. 28 Actividad de la proteína quinasa en células mononucleares sanguíneas en presencia de concentraciones crecientes de VIP.

3.3. ESPECIFICIDAD

a fin de estudiar la especificidad del VIP en la activación de la proteína quinasa se realizan experiencias en presencia de secretina, glucagón e insulina. La secretina era capaz de producir una activación en el rango 10^{-9} - 10^{-7} M, pero con una potencia 150 veces menor que el VIP nativo, alcanzando la mitad de la estimulación máxima a 10^{-8} M. El glucagón y la insulina no tuvieron apenas efecto a concentraciones tan altas como 10^{-6} M (tabla 19) (figura 29).

Tabla 19

Activación de proteína quinasa en células mononucleares sanguíneas por VIP(V), secretina(S), glucagón(G) e insulina(I), expresado según el cociente $-AMPC/+AMPC$ (\bar{X} de triplicados)

	péptidos (M)									
	0	10^{-11}	3×10^{-11}	10^{-10}	10^{-9}	3×10^{-9}	10^{-8}	3×10^{-8}	10^{-7}	10^{-6}
V	0'32	0'32	0'41	0'50	0'60	-	0'57	-	0'57	-
S	0'32	-	-	-	0'37	0'39	0'48	0'57	0'60	-
G	0'32	-	-	-	-	-	0'40	-	-	0'40
I	0'32	-	-	-	-	-	0'40	-	-	0'42

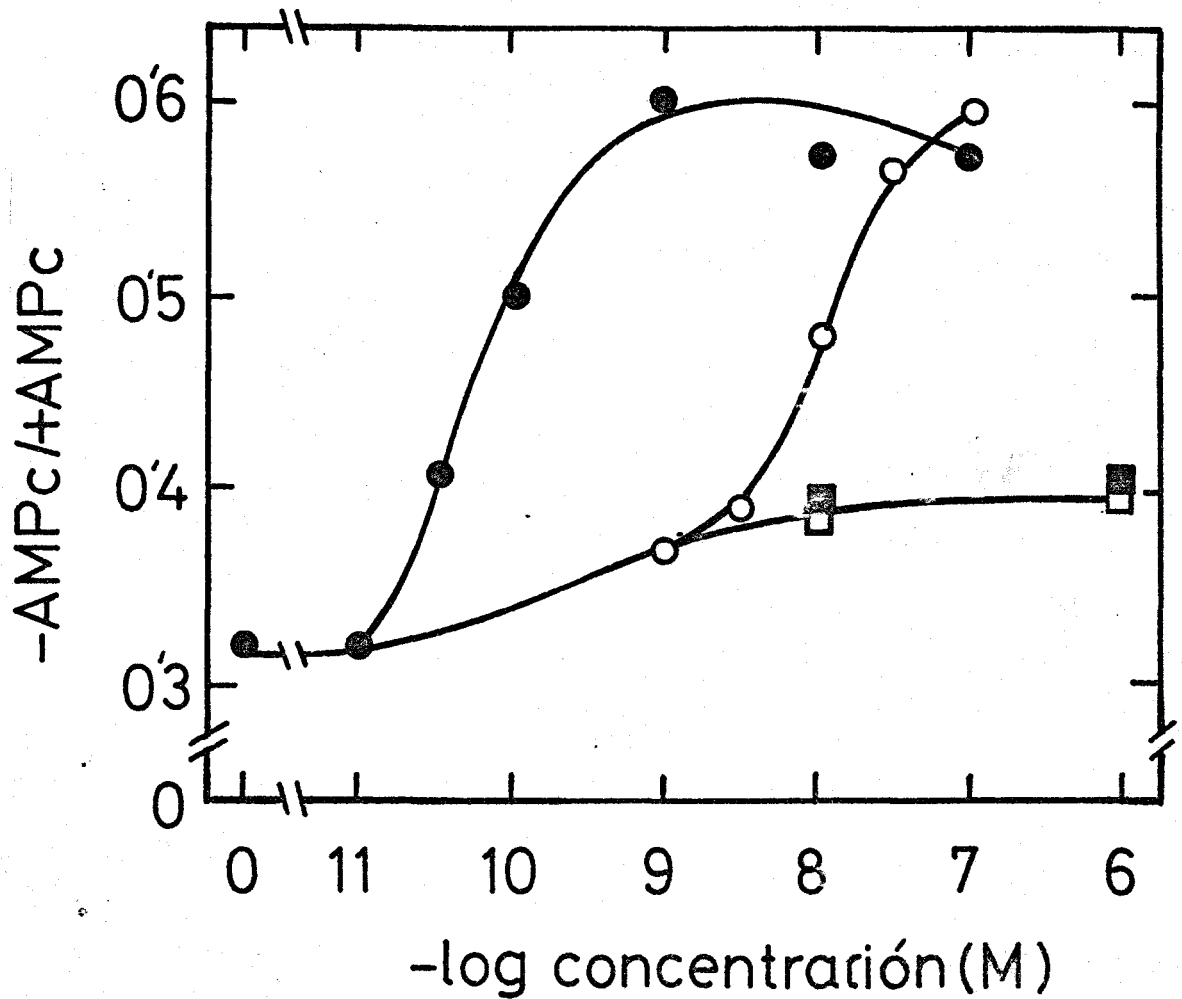


Fig. 29 Activación de la proteína quinasa en células mononucleares sanguíneas en presencia de VIP (●—●), secretina (○—○), glucagón (■—■) e insulina (□—□).

4. ESTUDIO CON SUBPOBLACIONES DE MONONUCLEARES

Después de la caracterización completa y seriada de la interacción VIP-receptor, su acoplamiento a un sistema de ciclasas que produce AMPc y, por último, la activación de una proteína quinasa, se plantea el problema de la peculiaridad del modelo celular utilizado.

La preparación celular con la que se han realizado las experiencias anteriores se compone fundamentalmente de los siguientes tipos celulares:

Linfocitos T.....60%

Linfocitos B.....25%

Monocitos.....15%

Además, la preparación contiene una cantidad variable de hematíes. Es por ello, que el siguiente paso del trabajo consiste en purificar cada una de estas líneas celulares y comprobar en cual de ellas se cumple las características hasta ahora descritas para la interacción VIP-célula.

Ahora bien, sea cual sea la subpoblación o subpoblaciones que sean responsables de estas características, las propiedades cinéticas y estequimétricas, las condiciones de pH, temperatura, etc., no van cambiar con respecto a las expuestas anteriormente. Por eso, en cada subpoblación, lo único interesante consiste en saber si se encuentra presente el complejo receptor-efector

y eso se averigua realizando dos experiencias básicas:

- a) Desplazamiento del ^{125}I -VIP por el péptido nativo.
- b) Determinar la producción de AMPc en presencia de concentraciones crecientes de VIP nativo.

y eso es precisamente lo que se lleva a cabo a continuación.

4.1. HEMATIES HUMANOS

En primer lugar se realizan experiencias de unión del trazador y producción de AMPc en hematíes (5×10^6 cel/ml) para descartar que sea esta contaminación celular la responsable del efecto del VIP. Como se puede observar en las figuras 30 y 31 los hematíes no unen ^{125}I -VIP ni se produce AMPc en presencia del péptido. (tabla 20)

Desde un punto de vista técnico los valores obtenidos tanto en las experiencias de unión como en las de producción de AMPc, no eran significativamente diferentes a la unión inespecífica, en el primer caso, ni superiores al límite inferior de detección de AMPc en el segundo.

Tabla 20

Unión específica de ^{125}I -VIP y producción de AMPc por el
el péptido intestinal vasoactivo (VIP) en hematíes huma-
nos (5×10^6 cel/ml).

^{125}I -VIP unido específicamente (n=4)...N.S.

AMPc producido (n=2)..... N.S.

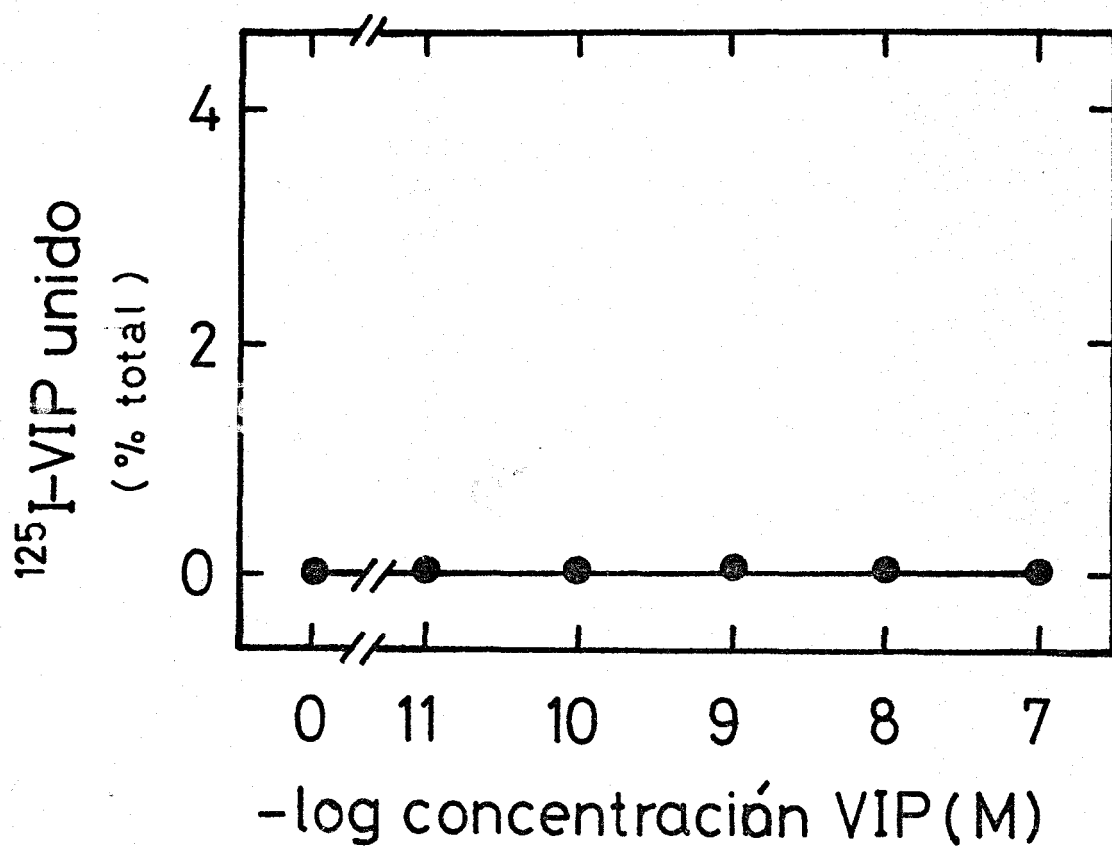


Fig. 30 Unión específica de ^{125}I -VIP a hematíes humanos (5×10^6 cel/ml) en presencia de concentraciones crecientes de VIP nativo.

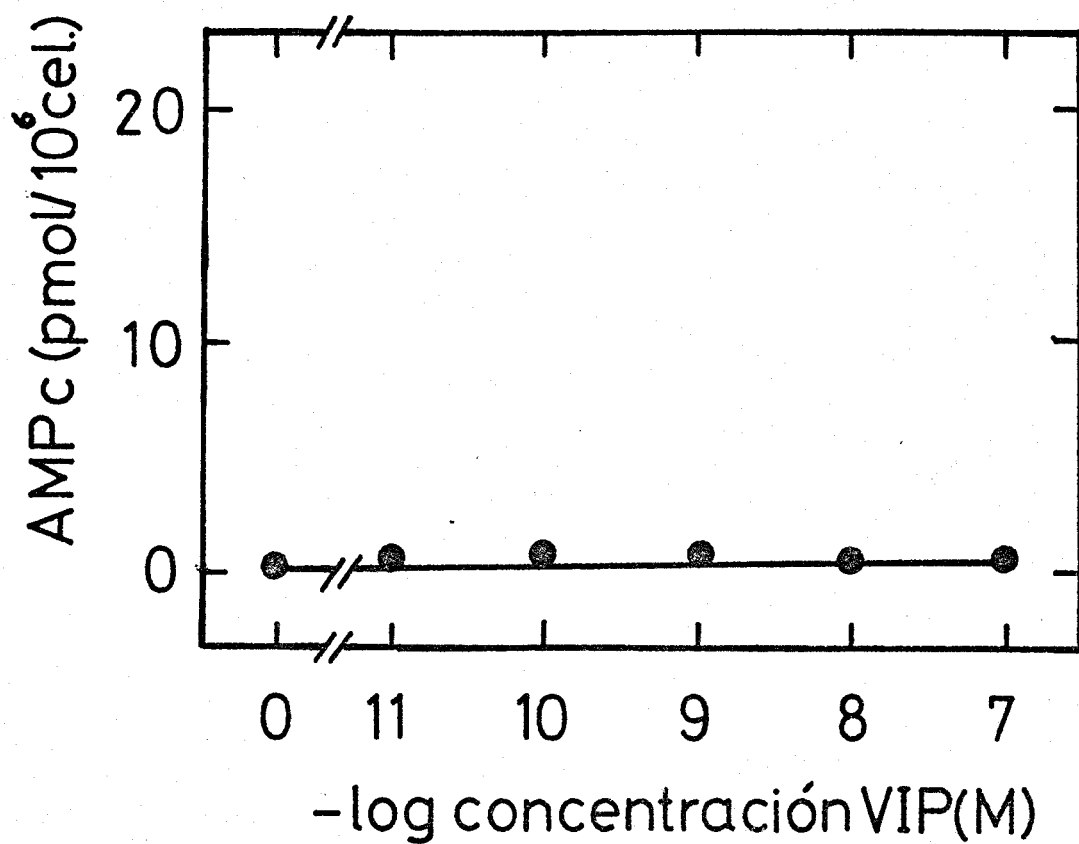


Fig. 31 Producción de AMPc en hematíes humanos (5×10^6 cel/ml) en presencia de concentraciones crecientes de VIP nativo

4.2. LINFOCITOS T

La purificación de linfocitos T es relativamente sencilla y, además, bastante eficiente. Mediante la formación de rosetas con hematíes de carnero se pueden obtener poblaciones muy purificadas (98% de linfocitos T). En las figuras 32 y 33 puede observarse como tampoco los linfocitos T unen $^{125}\text{I-VIP}$ ni producen un efecto sensible sobre la estimulación de la producción de AMPc en presencia del péptido nativo (tabla 21).

Tabla 21

a) Unión de $^{125}\text{I-VIP}$ a linfocitos T (1.5×10^6 cel/ml) en presencia y ausencia de concentraciones crecientes de VIP nativo

- Resultado no significativo para $n=3$

b) Producción de AMPc en linfocitos (0.5×10^6 cel/ml) en ausencia y presencia de concentraciones crecientes de VIP nativo ($\bar{X} \pm \text{ESM}$, $n=3$)

	VIP (M)					
	0	10^{-11}	10^{-10}	10^{-9}	10^{-8}	10^{-7}
AMPc (pmol/ 10^6 cel)	1'3	1'6	1'7	2'6	2'5	2'4
	$\pm 0'2$	$\pm 0'9$	$\pm 0'4$	$\pm 0'8$	$\pm 0'8$	$\pm 0'9$

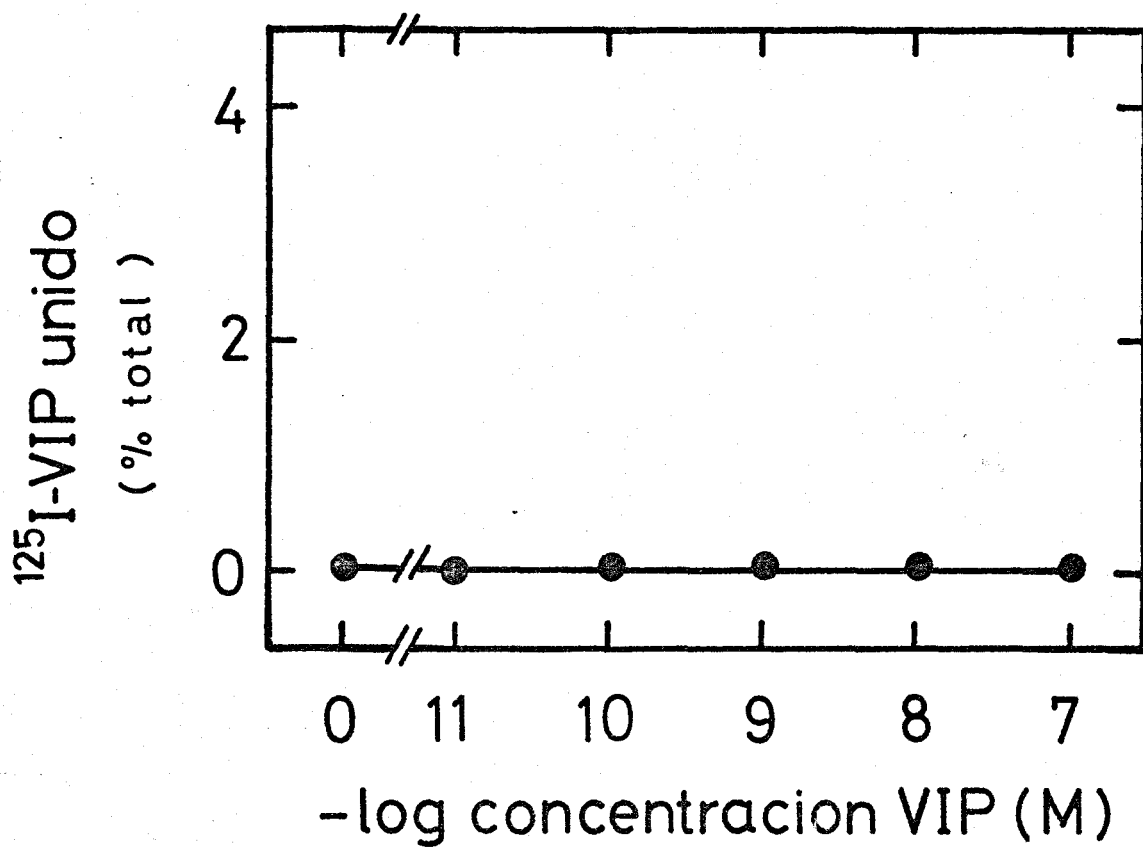


Fig. 32 Unión de ^{125}I -VIP a linfocitos T (1.5×10^6 cel/ml) en ausencia y presencia de concentraciones crecientes de VIP nativo.

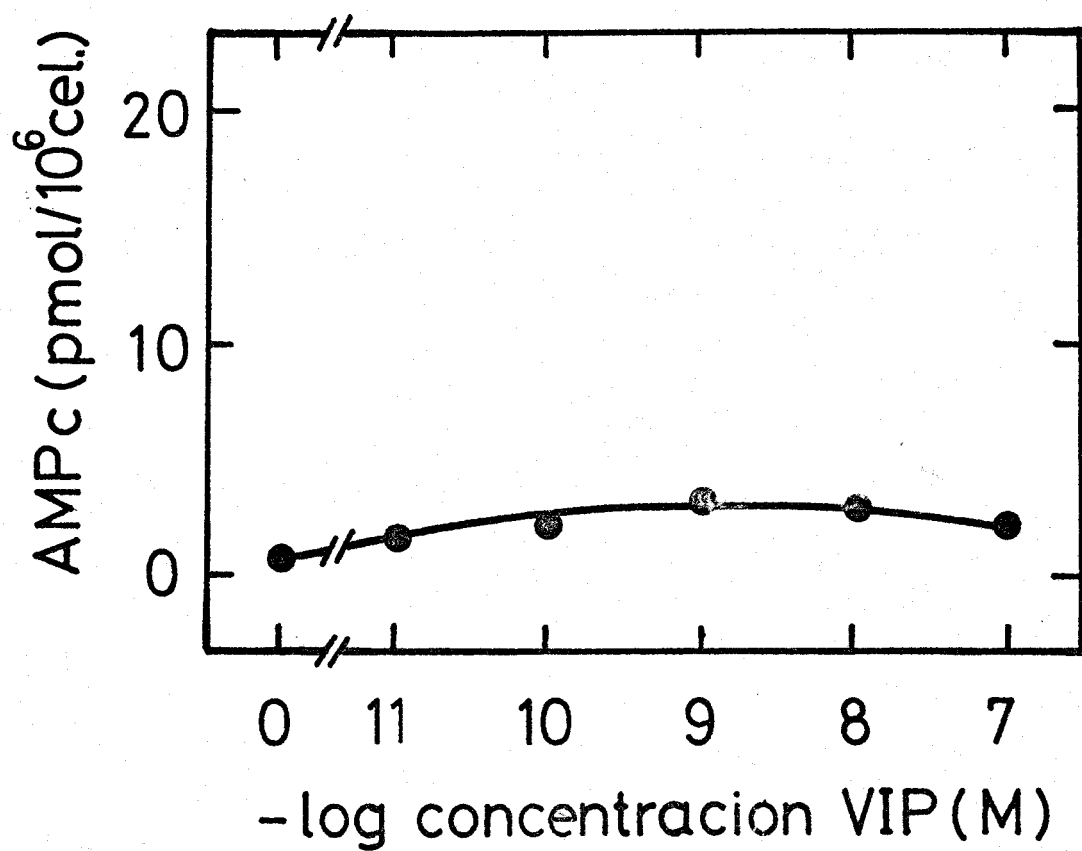


Fig. 33 Producción de AMPc en linfocitos T (0.5×10^6 cel/ml) en ausencia y presencia de concentraciones crecientes de VIP nativo.

4.3. POBLACION EMPOBRECIDA DE MONOCITOS

Después de haber conseguido una población pura de linfocitos T, el problema se presenta al intentar conseguir poblaciones muy purificadas de linfocitos B y de monocitos. Una solución indirecta se encontró al conseguir eliminar los monocitos de una preparación completa de mononucleares incubando esta en una placa Petri a 37°C durante 30 min. Los monocitos se quedan adheridos a la placa de forma que al recuperar la preparación lo único que queda son linfocitos T (inactivos) y linfocitos B. La contaminación con monocitos fue siempre inferior al 2% en todas las preparaciones utilizadas. En la figura 34 puede observarse como la preparación empobrecida de monocitos es capaz de unir específicamente $^{125}\text{I-VIP}$ según un patrón similar a la preparación mononuclear completa. La constante de disociación global es del orden de $0.9 \times 10^{-9}\text{M}$ de VIP (tabla 22).

En la figura 35 se representa la producción de AMPc en presencia de VIP, la cual muestra también un patrón similar al obtenido en la preparación de mononucleares. El 50% de la estimulación máxima se obtiene a $0.9 \times 10^{-10}\text{M}$ de VIP, y ya se produce estimulación a concentraciones tan bajas como $3 \times 10^{-11}\text{M}$ (tabla 23).

De estos resultados se infiere que los linfocitos B, por exclusión, contienen el complejo receptor-efector para VIP.

Tabla 22

Unión específica de ^{125}I -VIP a preparaciones pobres de monocitos (1.5×10^6 cel) en ausencia y presencia de concentraciones crecientes de VIP nativo ($\bar{X} \pm \text{ESM}$, $n=3$).

	VIP nativo (M)						
	0	10^{-11}	3×10^{-11}	10^{-10}	10^{-9}	10^{-8}	10^{-7}
^{125}I -VIP unido	3'2	2'8	2'5	2'1	1'8	1'4	0'5
(% del total)	$\pm 0'3$	$\pm 0'2$	$\pm 0'8$	$\pm 0'1$	$\pm 0'1$	$\pm 0'1$	$\pm 0'1$

Tabla 23

Producción de AMPC en preparaciones pobres de monocitos (0.5×10^6 cel/ml) en ausencia y presencia de concentraciones crecientes de VIP nativo ($\bar{X} \pm \text{ESM}$, $n=4$).

	VIP (M)						
	0	10^{-11}	3×10^{-11}	10^{-10}	10^{-9}	10^{-8}	10^{-7}
AMPC producido	2'3	2'4	5'8	9'6	12'1	15'7	14'7
(pmol/ 10^6 cel)	$\pm 0'8$	$\pm 0'5$	$\pm 0'5$	$\pm 0'8$	$\pm 1'1$	$\pm 2'7$	$\pm 1'6$

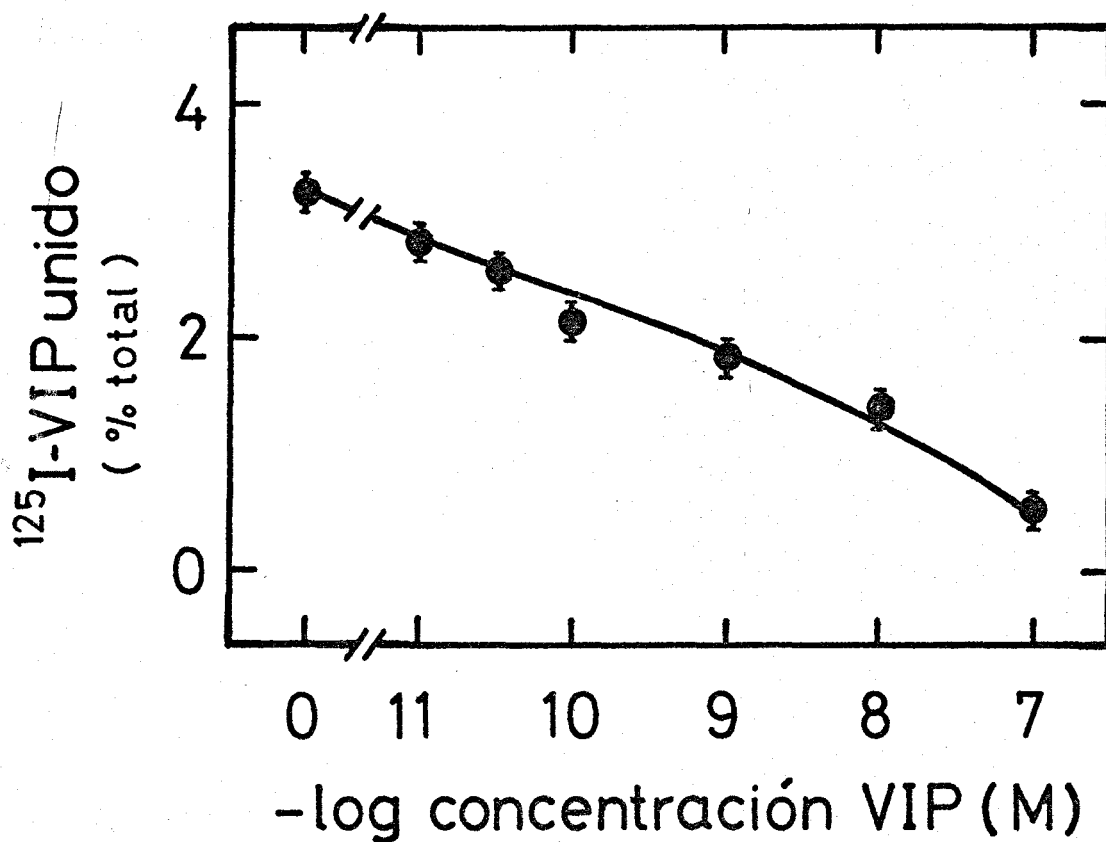


Fig.34 Unión específica de ^{125}I -VIP a células mononucleares empobrecidas de monocitos (1.5×10^6 cel/ml) en ausencia y presencia de concentraciones crecientes de VIP.

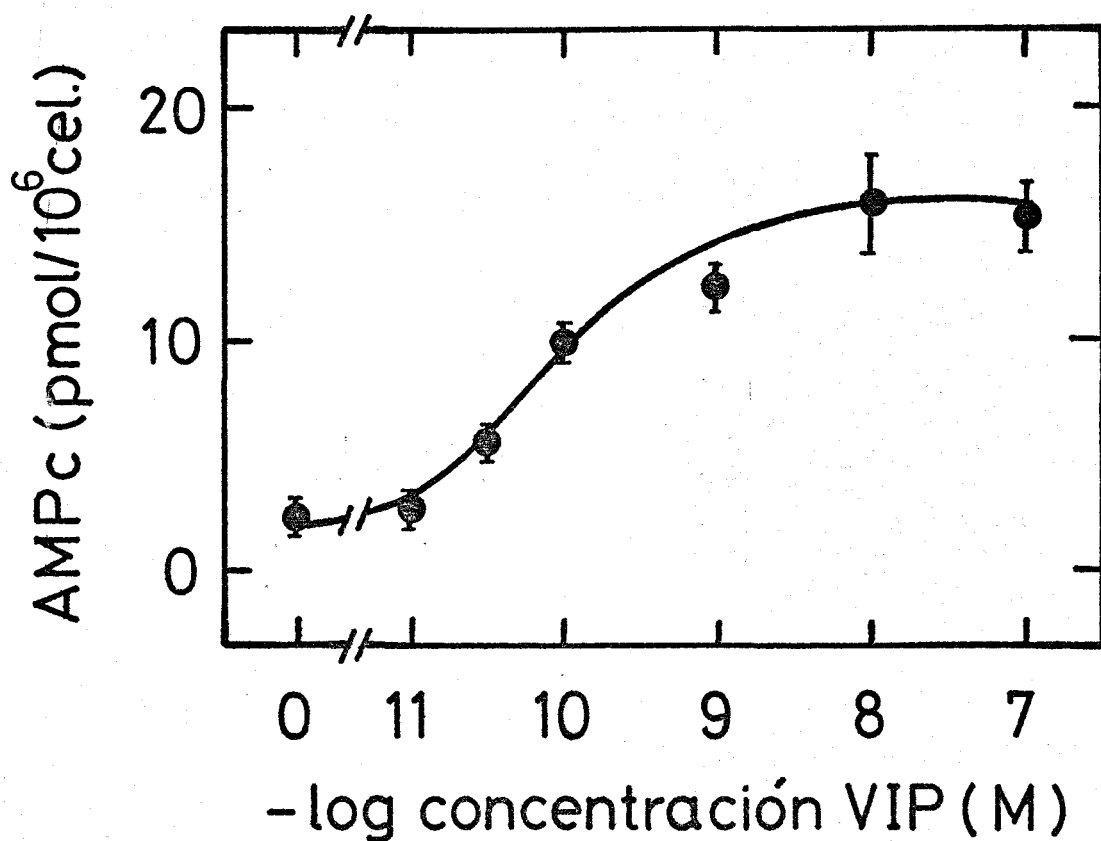


Fig. 35 AMPc producido en preparaciones celulares empobrecidas de monocitos (0.5×10^6 cel/ml) en ausencia y presencia de concentraciones crecientes de VIP nativo.

4.4. POBLACION ENRIQUECIDA DE MONOCITOS

Por el método de purificación de monocitos se puede obtener una población bastante enriquecida de los mismos (mayor del 50%), siendo el resto linfocitos T (40%) y algunos linfocitos B (menos del 5%).

No obstante, la cantidad total celular obtenida es tan baja, que no se pueden realizar experiencias completas de dosis-efecto, tanto de receptores como de AMPc. Por eso, para el estudio de receptores, sólo se ha calculado la unión total y la inespecífica, no dando valores significativos de unión específica (n=3). En los estudios de producción de AMPc, sólo se ha calculado el valor basal y la máxima estimulación por VIP (10^{-8} M), no obteniéndose estimulación en su producción en todos los casos estudiados (n=4) (tabla 24).

Tabla 24

Unión específica de 125 I-VIP y producción de AMPc por el péptido en poblaciones enriquecidas de monocitos

125 I-VIP unido (n=3)No significativo
(% del total)	

AMPC producido (n=4)	para VIP 0.M = $3'5 \pm 0'3$
(pmol/ 10^6 cel)	para VIP 10^{-8} M = $2'8 \pm 0'4$

De todo este apartado se puede concluir que el complejo efector-receptor para VIP parece encontrarse exclusivamente en los linfocitos B, mientras que en los linfocitos T, monocitos y hematíes no se detecta su presencia. En la discusión se abundará más en este resultado y en las posibles implicaciones fisiológicas que de él puedan derivarse.

DISCUSION

En el presente trabajo se describe, por vez primera, el sistema receptor-efector para el péptido intestinal vasoactivo (VIP) en un modelo celular humano de fácil acceso como son las células mononucleares de sangre periférica. El desarrollo de los experimentos pasa necesariamente por comenzar el trabajo con esta población celular tan heterogénea, ya que se compone de linfocitos T, linfocitos B y monocitos, para luego estudiar detenidamente cada subpoblación en particular.

A nivel de las células mononucleares la caracterización del sistema receptor-efector se llevó a cabo en tres etapas y a tres niveles diferentes:

1. Nivel de receptor
2. Nivel de adenil ciclasa
3. Nivel de proteína quinasa

Receptores para VIP se han caracterizado en una gran variedad de órganos compactos de diversas especies animales (PRIETO et al, 1979 y 1981; LABURTHE et al, 1977, 1978 y 1970; GUERRERO et al, 1981; GARDNER et al, 1977; DUPONT et al, 1981; BATAILLE et al, 1974 y 1975; TAYLOR y PERT, 1979; ROBBERECHT et al, 1978 y 1979; MORERA et al, 1979). Los modelos celulares humanos no han sido utiliza-

dos previamente debido a la dificultad que entraña la toma de muestras. Sólo a nivel de líneas celulares en cultivo de carcinomas de colon (LABURTHE et al, 1978) y de cervix uterino (PRIETO et al, 1981) hay estudios previos.

El estudio completo de los receptores incluye la verificación de una serie de propiedades que debe cumplir en su unión al péptido (FREYCHET, 1976). En este sentido, la unión del VIP a las células mononucleares es proporcional a la concentración celular en un rango entre $0.25-2 \times 10^6$ células por ml, perdiéndose la proporcionalidad a concentraciones mayores (figura 11 y tabla 1). La unión, además, es un proceso que depende del tiempo y la temperatura, siendo la velocidad de asociación mayor a 30 que a 15°C; sin embargo, sólo a 15°C se obtiene un equilibrio estable lo suficientemente duradero como para permitir llevar a cabo otro tipo de experiencias. La degradación del péptido a 30°C es considerablemente mayor que a 15°C (figuras 12 y 14). lo cual explicaría, en parte, el hecho de que no se pueda conseguir una unión estable a la temperatura superior. Esta fuerte degradación por un sistema celular ocurre también en otros, como los enterocitos (PRIETO et al, 1979), membranas hepáticas (GUERRERO et al, 1981), células acinares

pancreáticas (CHRISTOPHE et al,1976) y en homogenados de hígado, riñón y cerebro (KELTZ et al,1980). Sin embargo, las células HeLa de carcinoma de cervix uterino no degradan apenas el VIP ni a 15 ni a 30°C (PRIETO et al, 1981). En el presente trabajo se realizan las experiencias de receptores a 15°C por las razones antes expuestas y, además, para poder comparar los datos obtenidos con otros previos en que se utilizan condiciones similares (PRIETO et al,1979 y 1981; GUERRERO et al,1981).

La unión del VIP al receptor se realiza en condiciones óptimas a pH 7'5 (figura 16 y tabla 6) y la degradación de los receptores no sobrepasa de un 20% después de 90 min de incubación (figura 15 y tabla 5).

La unión del VIP al receptor es un proceso reversible y sigue una cinética de segundo orden, lo que indica la existencia de dos poblaciones de receptores, una de alta afinidad (tiempo medio de disociación = 90 min) y otra de baja afinidad (tiempo de semidisociación = 20 min) (figura 17 y tabla 7). Estos resultados son similares a los obtenidos en epitelio intestinal (PRIETO et al,1979; BROYART et al,1981), páncreas (CHRISTOPHE et al,1976; GARDNER et al,1977), hígado (DESBUQUOIS, 1974; GUERRERO et al,1981) y carcinoma de cervix uterino (PRIETO et al,1981).

En los estudios estequiométricos el VIP nativo compete con el trazado ($^{125}\text{I-VIP}$) a concentraciones tan bajas como $3 \times 10^{-11}\text{M}$, obteniéndose una constante de disociación global de $0'4 \times 10^{-9}\text{M}$ (figura 18 y tabla 8). La representación de Scatchard (figura 19) permite confirmar la existencia de dos poblaciones de receptores, una de alta afinidad ($0'24 \times 10^{-9}\text{M}$) y baja capacidad de unión ($8 \text{ fmol}/10^6 \text{ cel}$) y, otra, de baja afinidad ($80 \times 10^{-9}\text{M}$) y mayor capacidad de unión ($800 \text{ fmol}/10^6 \text{ cel}$) (tabla 9). La existencia de dos poblaciones de receptores también esta descrita en enterocitos y colonocitos (PRIETO et al, 1979; AMIRANOFF et al, 1980; BROYART et al, 1981), células acinares pancreáticas (CHRISTOPHE et al, 1976; GARDNER et al, 1977), membranas hepáticas (GUERREIRO et al, 1981) y membranas de cerebro (ROBBERECHT et al, 1978 y 1980). Sin embargo, en algunos casos estos dos receptores no se han encontrado (DESBUQUOIS, 1974; TAYLOR y PERT, 1979; BINDER et al, 1980).

Hay que hacer notar que los parámetros obtenidos de la representación de Scatchard en cuanto a constantes de disociación son sensiblemente menores a los obtenidos en otros modelos celulares (Tabla 25), lo que indica que el receptor de VIP en las células mononucleares podría reconocer concentraciones menores del péptido,

Tabla 25

Constantes de disociación de los receptores de VIP en diversas estirpes celulares.

	Kd ($\times 10^{-9}$ M)		
	<u>Kd global</u>	<u>Kd alta af.</u>	<u>Kd baja af.</u>
<u>Aparato digestivo</u>			
PRIETO et al, 1979.....	3'1	1'6	74
AMIRANOFF et al, 1980.....	3'0	0'3	150
BINDER et al, 1980.....	10'0	-	-
BROYART et al, 1981.....	2'0	1'4	46
<u>Hígado</u>			
BATAILLE et al, 1974.....	2'2	-	-
DESBUQUOIS, 1974.....	0'2	-	-
GUERRERO et al, 1981.....	0'5	0'4	170
<u>Páncreas exocrino</u>			
CHRISTOPHE et al, 1976.....	1'0	7'4	82
GARDNER et al, 1977.....	1'0	0'7	80
<u>Sistema nervioso central</u>			
ROBBERECHT et al, 1978.....	-	3'6	285
TAYLOR y PERT, 1979.....	-	1'0	-
<u>Líneas tumorales en cultivo</u>			
LABURTHE et al, 1978.....	2'0	-	-
MORERA et al, 1979.....	2'0	-	-
PRIETO et al, 1981.....	6'0	2'4	100
CELULAS MONONUCLEARES.....	0'4	0'2	80

del orden a las que se encuentran en plasma (20-40 pM). Curiosamente los valores son similares a los obtenidos en hígado, lo cual tiene su interés debido a que en este órgano no se han descrito terminaciones "vipérgicas". De esta forma el receptor de VIP en hígado también tiene que reconocer al péptido circulante.

En cuanto a la especificidad, sólo la secretina es capaz de desplazar al ^{125}I -VIP aunque con una afinidad 400 veces menor. Esto está descrito ampliamente en otros sistemas celulares (CHRISTOPHE et al, 1976; GARDNER et al, 1977; PRIETO et al, 1979 y 1981; GUERRERO et al, 1981; AMIRANOFF et al, 1980; BINDER et al, 1980; BROYART et al, 1981). La insulina, glucagón y somatostatina no produjeron ningún efecto (figura 20 y tabla 10).

A un nivel posterior, el VIP es también capaz de estimular el sistema adenil ciclasa de las células mononucleares. Esto ha sido descrito igualmente en otros modelos celulares (DESBUQUOIS et al, 1973; SCHWARTZ et al, 1974; BATAILLE et al, 1974 y 1979; ROBBERECHT et al, 1976; LABURTHE et al, 1977, 1978, 1979a y 1980; WALDMAN et al, 1977; DESCHODT-LANCKMAN et al, 1977; AMIRANOFF et al, 1978; SIMON y KATER, 1978; FRANDSEN et al, 1978; CHATELAIN et al, 1979, 1980 y 1980a; DUPONT et al, 1980, 1980a y 1981; BEUBLER et al, 1980; COHEN et al, 1980; CALKER et al, 1980; RAMIREZ-CARDE-

NAS et al,1981; SCHORDERET et al,1981; PRIETO et al,1981).

La producción de AMPc por VIP depende de la concentración celular (figura 21 y tabla 11) en el rango estudiado. Depende también del tiempo y la temperatura de incubación; así, a 30°C la producción de AMPc es más rápida que a 15°C, pero decae rápidamente debido, quizás, a la degradación del péptido y la actividad de las fosfodiesterasas (figura 22 y tabla 12). A 15°C, sin embargo, la producción de AMPc alcanza una meseta en la que existe un equilibrio entre síntesis y degradación por fosfodiesterasas. Es por ello que el resto de las experiencias se realicen a 15°C. En ausencia de IBMX el VIP también estimula la producción de AMPc, pero la actividad de las fosfodiesterasas impide que se alcance un nivel estable (figura 23 y tabla 13). El pH óptimo para la activación de la ciclasa está en el rango de 7'0 - 7'5 (figura 24 y tabla 14).

El efecto del VIP también es dependiente de su concentración. Así, desde 3×10^{-11} M del péptido se produce un aumento significativo en la producción de AMPc sobre los niveles basales, y a medida que se va aumentando, la estimulación es mayor hasta alcanzar un máximo a 10^{-9} M (4 veces sobre la basal). El 50% de estimulación (K_m) se consigue a $0'1 \times 10^{-9}$ M de VIP (figura 25 y tabla 15).

Hay que destacar que la K_m tiene un valor similar al de la constante de disociación de los receptores de alta afinidad ($0.2 \times 10^{-9} M$). Esto indica que sólo son estos receptores los que se encuentran acoplados al sistema adenil ciclasa, mientras que los de baja afinidad serían "mudos". Este planteamiento concuerda con el mantenido por LABURTHE et al (1979a), PRIETO et al (1981) y RAMIREZ-CARDENAS et al (1981).

Igual que en el caso de los receptores, la K_m de activación de la adenil ciclasa por VIP tiene un valor sensiblemente inferior al obtenido en otros modelos celulares (tabla 26), corroborando la gran sensibilidad del sistema receptor-efector para ponerse en marcha con muy bajas concentraciones del péptido.

En cuanto a la especificidad, aparte del VIP, sólo la secretina es capaz de estimular la producción de AMPc con una potencia 7000 veces menor, y a través del mismo receptor que el de VIP, ya que la adición de VIP ($10^{-8} M$) y secretina ($10^{-7} M$) no tienen efecto aditivo. Este resultado es del mismo orden al obtenido en otros modelos celulares (ROBBERECHT et al, 1976; LABURTHE et al, 1979a; DUPONT et al, 1980; PRIETO et al, 1981). El hecho de que la secretina sólo es 400 veces menos potente que el VIP nativo para inhibir la acción de ^{125}I -VIP, induce a pen-

Tabla 26

Constantes de Michaelis (Km) para la activación del sistema adenil ciclasa por VIP en diferentes modelos celulares.

<u>Aparato digestivo</u>	<u>Km (nM)</u>
AMIRANOFF et al, 1978.....	4'1
DUPONT et al, 1979.....	1'2
LABURTHE et al, 1979a.....	2'3
BEUBLER, 1980.....	1'2
DUPONT et al, 1980.....	0'3
<u>Hígado</u>	
DESBUQUOIS et al, 1973.....	0'2
BATAILLE et al, 1974.....	0'25
RAMIREZ-CARDENAS et al, 1981.....	0'3
<u>Tejido adiposo</u>	
DESBUQUOIS et al, 1973.....	1'0
BATAILLE et al, 1974.....	2'5
KATHER y SIMON, 1979.....	400'0
<u>Células acinares pancreáticas</u>	
ROBBERECHT et al, 1976.....	0'4
GARDNER et al, 1977.....	0'3
<u>Epitelio vesícula biliar</u>	
DUPONT et al, 1981.....	0'2
<u>Líneas en cultivo</u>	
LABURTHE et al, 1978.....	0'3
PRIETO et al, 1981.....	1'0
<u>Sistema nervioso central</u>	
DESDOCHDT-LANCKMAN et al, 1977.....	500'0
KANEKO et al, 1980.....	30'0
<hr/>	
CELULAS MONONUCLEARES.....	0'1
<hr/>	

sar que la gran mayoría de los complejos secretina-receptor formados son incapaces de activar el sistema de ciclasas, (figura 26, tabla 16).

La activación de proteínas quinasas por acción de VIP está muy escasamente descrita en la literatura. Sólo existen datos referentes a células del epitelio intestinal de la rata (LABURTHE et al, 1979b) y líneas celulares en cultivo de adenocarcinomas de colon y recto (MANGEAT et al, 1981; MARVALDI et al, 1979).

En el presente trabajo, el VIP activa a proteínas quinasas de las células mononucleares, alcanzando un máximo de actividad a los 5 min de comenzado el ensayo y manteniéndose constante durante, al menos, 45 min. (figura 27 y tabla 17). En ausencia de IBMX el VIP también es capaz de producir activación aunque menor en presencia del inhibidor de fosfodiesterasa (figura 27).

La activación depende de la concentración del péptido, alcanzándose el máximo a 10^{-9} M de VIP. El 50% de la activación máxima se consigue a 0.06×10^{-9} M. Este valor es muy similar a la K_m de actividad de la adenil ciclasa con lo cual puede inferirse que existe un acoplamiento total desde la unión del VIP al receptor, pasando por la activación de la adenil ciclasa, y terminando en la activación de las quinasas. (figuras 28 y 29; tablas 18 y 19)

Caracterizado ya este triple nivel de interacción VIP-efector, el siguiente paso consiste en averiguar cuál es la subpoblación celular responsable de este fenómeno. para ello se obtienen poblaciones purificadas de cada uno de los componentes.

Para empezar, los eritrocitos contaminantes de la preparación no ligan ^{125}I -VIP así como su adenil ciclasa no es activable por el péptido (figura 30 y 31).

Poblaciones muy puras en linfocitos T (98%) tampoco ligan el trazador ni producen AMPc (figura 32 y tabla 21).

Sin embargo, una preparación de mononucleares de la que se han eliminado los monocitos sí ligan ^{125}I -VIP y producen AMPc con unos patrones muy similares a los obtenidos con la población de mononucleares al completo.

(figura 34 y tabla 22). Para terminar, las poblaciones ricas en monocitos y pobres en linfocitos B tampoco ligan ^{125}I -VIP ni producen AMPc por acción del péptido.

La conclusión de este rompecabezas es que sólo los linfocitos B son los responsables de la presencia del sistema receptor-efector para VIP. (tabla 24)

Hasta la fecha, los receptores descritos para hormonas peptídicas en células mononucleares son escasos. Receptores para insulina (SCHWARTZ et al, 1975), glucagón (GOLDSTEIN et al, 1975; BHATHENA et al, 1981) se encuentran presentes sólo en monocitos. Mientras que para somatosta-

tina se han descrito tanto en monocitos como en linfocitos (BHATHENA et al,1981).

En líneas de cultivo de células tumorales linfoides se han descrito, además, receptores para hormona del crecimiento (LESNIAK et al,1974), insulina (GAVIN et al,1973), somatostatina (ROSENFELD et al,1980) y calcitonina (MARX et al,1974).

Esta es por lo tanto la primera vez que se describe un receptor para una hormona peptídica que es específico de los linfocitos B, excluyendo tanto a linfocitos T como a monocitos.

Ahora bien, ¿qué interés tienen estos resultados desde el punto de vista fisiológico y experimental?. La respuesta se puede enfocar desde varios puntos de vista:

a) En primer lugar se describe un sistema receptor-efector muy sensible al VIP en un tipo celular que se encuentra libre en la sangre, sin ninguna clase de inervación. Esto no basta para afirmar que el péptido juega un papel fisiológico en el metabolismo del linfocito, ni permite vislumbrar cuál podría ser ese papel. Sin embargo, varios datos apuntan a que sí sea más que probable esta posibilidad:

- El complejo VIP-receptor está acoplado al sistema adenil ciclasa y a la activación de proteínas quinasas, lo cual permite en principio confirmar que, al menos, de una forma farmacológica el péptido es capaz de desencadenar el comienzo de una cascada de reacciones ampliamente descrita para otras hormonas peptídicas y para el VIP en otros modelos celulares en los que existe una clara función biológica.

- La sensibilidad del complejo receptor-efector para VIP es muy alta. Como puede observarse en las tablas 25 y 26, las constantes de disociación de la interacción ^{125}I -VIP-receptor y las constantes de Michaelis (Km) para la producción de AMPc son ostensiblemente inferiores a las correspondientes a otros modelos celulares inervados. Sólo en el tejido hepático (DESBUQUOIS et al, 1973; BATAILLE et al, 1974; RAMIREZ-CARDENAS et al, 1981; GUERRERO et al, 1981) los valores obtenidos son similares. Esto es interesante ya que tanto el tejido hepático como las células mononucleares no tienen terminaciones "vipérgicas", sino que reconocen al péptido circulante, cuya concentración en plasma (0'02-0'04 nM) debe ser inferior a la que presumiblemente se encuentre en el espacio sináptico. Hay que recordar, además, que

concentraciones tan bajas de VIP como 0'03 nM son capaces de inhibir significativamente la unión del trazador al receptor, y de estimular, también significativamente, la producción de AMPc (figuras 18 y 25).

Por lo tanto, el sistema receptor-efector para VIP en células mononucleares sanguíneas es capaz de reconocer concentraciones fisiológicas, y no farmacológicas, del péptido.

b) En segundo lugar, el hecho de que el sistema receptor-efector se encuentre en el linfocito B hace plantear cuál es la posible función del péptido a ese nivel. Lo primero que se ocurre es que debería estar íntimamente relacionada con la producción de AMPc, y del papel que este juega en el metabolismo del linfocito.

Hasta el momento, la mayoría de los autores concuerdan en que tanto el AMPc, como otros agentes que aumentan las concentraciones intracelulares del nucleótido (dibutiril AMPc, teofilina, isoproterenol, catacolaminas, etc.) inhiben la estimulación sobre la proliferación celular que ejerce la fitohemaglutinina (PHA) y otros mitógenos, no produciendo efecto alguno sobre linfocitos en reposo (HIRSCHHORN et al, 1970; SMITH et al, 1971).

Esta inhibición, además, no parece ser específica para el AMPc sino que se extiende también a AMP, ADP y ATP (SMITH et al, 1971a).

Esto contradice el hecho de que la adenil ciclasa en linfocitos estimulados por PHA está muy activada al principio (SMITH et al, 1971; KRISHNARAJ y TALWAR, 1973) de la estimulación.

Intentando compaginar estos dos hechos contradictorios, FOKER et al (1979) propone que el AMPc se puede comportar como un regulador positivo o negativo de la mitosis. Al comienzo de la estimulación por un mitógeno se produciría un aumento rápido y breve de los niveles de AMPc (fase G_0-G_1), mientras que posteriormente (fase G_1-S) se produciría otra elevación sostenida de los niveles del nucleótido que se acompaña de la fosforilización de proteínas que permiten la progresión de la mitosis. Durante la síntesis de DNA (fase S) el AMPc disminuiría nuevamente (figura 8).

Así pues, el nucleótido puede actuar permitiendo en determinados momentos el proceso mitótico; pero cuando aumenta su concentración en un momento no conveniente para la célula, por el contrario, puede comportarse como un potente inhibidor.

Tal vez el VIP intervenga de alguna manera en este proceso de estimulación de la proliferación y diferenciación celular actuando como un regulador positivo o negativo, dependiendo de si incrementa la producción de AMPc en un momento conveniente o no a la célula.

Por lo tanto, es en esta dirección hacia donde habría que apuntar en primer lugar a fin de encontrar el papel fisiológico concreto del péptido en este sistema celular.

Para hacer más complejo el panorama, en 1980, O'DORISIO et al han encontrado VIP en células polimorfonucleares, y sugieren que este se podría liberar en las zonas inflamadas para incrementar el flujo sanguíneo local. Con los resultados del presente trabajo quizás se podría insinuar algo más, como es que fuese este VIP liberado por polimorfonucleares el que interviniese en la interacción con el receptor localizado en el linfocito B. Sin embargo, la realidad o fantasía de estas posibilidades tiene que comprobarse todavía, teniéndose que dilucidar un efecto biológico claro en el linfocito.

c) En tercer lugar, la presencia del sistema receptor efector exclusivamente en el linfocito B parece indicar que el receptor de VIP es un marcador específico para

dichos linfocitos. Como se ha visto anteriormente, los niveles de AMPc en las células mononucleares varían considerablemente dependiendo del estado metabólico de la célula, de la fase de la mitosis, etc. Por eso, aunque está descrito que los niveles de AMPc en los linfocitos B son del orden de 6 veces superiores a los que se encuentran en los linfocitos T (MENDELSON y NORDBERG, 1979), no se puede utilizar este nucleótido como marcador debido a las fluctuaciones antes descritas y a las considerables modificaciones que se observan en el caso de leucemias linfocíticas (MENDELSON y NORDBERG, 1979).

Sin embargo, puede que estas fluctuaciones no ocurran con el receptor. Normalmente los receptores para hormonas peptídicas permanecen constantes sin tener en cuenta el estado metabólico de la célula. Sólo se modifican en respuesta a variaciones crónicas de la concentración plasmática del peptido correspondiente (OLEFSKY, 1976). Aún más, para el caso del VIP, los estudios realizados con líneas tumorales en cultivo de carcinomas de cuello uterino (PRIETO et al, 1981) y de colon y recto (LABURTHE et al, 1978 y 1980) demuestran que la interacción con el receptor conserva las propiedades cinéticas y estequiométricas de las células no tumorales.

Es por ello que podría ser de interés el profundizar en la posibilidad de que este receptor pueda ser un marcador específico para el linfocito B. Los presentes resultados así parecen insinuarlo, quedando sólo por comprobar si existe una correlación entre la concentración de linfocitos B de una preparación de mononucleares y la capacidad de unir el péptido marcado, así como que esta correlación se mantenga en diferentes condiciones de "stress" para el organismo (infecciones, leucemias, etc.).

d) Por último, el hecho de conseguir un modelo de receptor-efector para VIP en una célula humana tan accesible permitirá en el futuro estudiar sus características en diversos estados patológicos. Así por ejemplo, los receptores de insulina se han estudiado en el caso de la obesidad (OLEFSKY et al, 1976), en la que debido al hiperinsulinismo existente, y por un mecanismo todavía no bien conocido, se produce una disminución de los receptores que conlleva a una resistencia periférica a la acción de la hormona.

De igual forma, en determinados procesos patológicos como el síndrome de Verner-Morrison y la cirrosis, los niveles plasmáticos de VIP están muy elevados (BLOOM

et al,1973; SAID y FALOONA,1975; HUNT et al,1979) sobre los normales debido a la producción excesiva por un tumor en el primer caso, o a una disminución en la degradación en el segundo caso. En estas circunstancias, la utilización de un modelo celular tan fácilmente accesible, puede permitir estudiar las posibles modificaciones del receptor de VIP, así como su posible implicación en la fisiopatología de estos dos procesos.

CONCLUSIONES

1. La unión del ^{125}I -VIP a células mononucleares de sangre periférica humana depende de la concentración celular, temperatura, tiempo y pH de incubación. En el presente trabajo las condiciones óptimas de incubación se consiguen a 15°C , pH 7'5 y concentración celular de $1'5 \times 10^6$ cél/ml, en las que la degradación del trazador y del receptor se minimizan, consiguiendo una unión estable y duradera.
2. La unión del trazador al receptor es reversible, teniendo lugar la disociación según una cinética de segundo orden, que indica la existencia de las poblaciones de receptores, que tienen respectivamente 20 y 90 min de tiempo de media disociación.
3. El VIP nativo compite con el trazador a concentraciones del mismo orden de las fisiológicas ($3 \times 10^{-11}\text{M}$), siendo la constante de disociación global de $0'4 \times 10^{-9}\text{M}$ VIP. La representación de Scatchard permite distinguir dos tipos de receptores: uno de alta afinidad ($K_d = 0'14 \times 10^{-9}\text{M}$) y baja capacidad de unión ($8\text{ fmol}/10^6\text{ cel}$) y, otro, de baja afinidad ($80 \times 10^{-9}\text{M}$) y mayor capacidad de unión ($800\text{ fmol}/10^6\text{ cel}$).
4. El receptor de VIP es específico para él. De otros péptidos utilizados solo la secretina compite con el trazador, pero con una afinidad 400 veces menor.

5. El VIP también estimula la producción de AMPc en células mononucleares, proporcionalmente a la concentración celular y dependiendo del tiempo, temperatura y pH de incubación. En el presente trabajo las condiciones óptimas se consiguen a una concentración celular de $0'5 \times 10^6$ cel/ml, a 15°C y pH 7'5, en las que se consigue una producción de AMPc estable y duradera.
6. La producción de AMPc depende de la concentración de VIP. Se produce un aumento significativo sobre los niveles basales a concentraciones de VIP tan bajas como 3×10^{-11} M. La activación máxima se produce a 10^{-9} M de un péptido, y el 50% de activación se consigue a $0'1 \times 10^{-9}$ M.
7. La producción de AMPc a través del receptor de VIP es específica para este péptido. Sólo la secretina podía aumentar la producción de AMPc pero con una potencia 7.000 veces menor.
8. El VIP produce una activación de proteínas quinasas en células mononucleares que depende del tiempo de incubación, obteniéndose una actividad máxima a los 15 min.
9. La activación de proteínas quinasas depende de la concentración del péptido, obteniéndose una activación significativa a concentración tan baja como 3×10^{-11} M. La máxima activación se consigue a 10^{-9} M, y el 50% a $0'06 \times 10^{-9}$ M.

10. En el estudio de las diferentes subpoblaciones celulares presentes en la preparación de mononucleares, sólo los enriquecidos en linfocitos B ligaban ^{125}I -VIP y aumentaban la producción de AMPc en presencia del péptido. Las preparaciones enriquecidas en linfocitos T, monocitos y los hematíes eran completamente incapaces de realizar ninguna de las dos posibilidades.
11. En resumen, existe un sistema receptor efector que reconoce concentraciones plasmáticas fisiológicas de VIP en una de las estirpes celulares de la preparación de mononucleares sanguíneas, como son los linfocitos B.

BIBLIOGRAFIA

ABRAMOWITZ, J., IYENGAR, R. y BIRBAUMER, L. (1979) Guanyl nucleotides regulation of hormonally-responsive adenyl cyclases Mol.Cell.Endo., 16, 129-146.

AHREN, B., ALUMETS, J., ERICSSON, M., FAHRENKRUG, J., FAHRENKRUG, L., HAKANSON, R., HEDNER, P., LOREN, I., MELANDER, A., RERUP, C. y SUNDLER, F. (1980) VIP occurs in intrathyroidal nerves and stimulates thyroid hormone secretion Nature, 287, 343-345.

ALM, P., ALUMETS, J., HAKANSON, R. y SUNDLER, F. (1977) Peptidergic (VIP) nerves in the genito-urinary tract Neuroscience, 2, 751-754.

ALM, P., ALUMETS, J., HAKANSON, R., OWMAN, C.H., SJOBERG, N.O., SUNDLER, F. y WALLE, B. (1980) Origin and distribution of VIP (vasoactive intestinal polypeptide) nerves in the genito-urinary tract Cell Tissue Res., 205, 337-347.

ALM, P., ALUMETS, J., HAKANSON, R., HELM, G., OWMAN, C.H., SJOBERG, N.O. y SUNDLER, F. (1980a) Vasoactive intestinal polypeptide nerves in the human female genital tract Am.J.Obst.Gynecol., 136, 349-351.

AMIRANOFF, B., LABURTHE, M., DUPONT, C. y ROSSELIN, G. (1978) Characterization of a vasoactive intestinal peptide-sensitive adenylate cyclase in rat intestinal epithelial cell membranes Biochem.Biophys.Acta, 544, 474-481.

AMIRANOFF, B., LABURTHE, M. y ROSSELIN, G. (1980) Characterization of specific binding sites for vasoactive intestinal peptide in rat intestinal epithelial cell membranes Biochem.Biophys.Acta, 627, 215-224.

AMIRANOFF, B., LABURTHE, M. y ROSSELIN, G. (1980a) Potentiation by guanine nucleotides of the VIP-induced adenylate cyclase stimulation in intestinal epithelial cell membranes Life Sci., 26, 1905-1911.

ARENSON, E.B.Jr., EPSTEIN, M.B. y SEEGER, R.C. (1980) Volumetric and functional heterogeneity of human monocytes J.Clin.Invest., 65, 613-618.

ARILLA, E., PRIETO, J.C., LOPEZ, J.M. y GOBERNA, R. (1981) Somatostatin action on insulin secretion induced by chicken and porcine vasoactive intestinal peptide in the perfused rat pancreas Horm.Metab.Res., 13, 314-317.

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.

BAR, R.S., GORDON, P., ROTH, J., KAHN, C.R. y DE MEYTZ, P.O. (1976) Fluctuations in the affinity and concentration of insulin receptors of circulating monocytes of obese patients J.Clin.Invest., 58, 1123-1135.

BARBEZAT, G.O. y GROSSMAN, M.I. (1971) Intestinal secretion: stimulation by peptides Science, 174, 422-424.

BARBEZAT, G.O. (1973) Stimulation of intestinal secretion by polypeptides hormones Scand.J.Gastro., 8, 3-21.

BARKER, J.L. (1976) Peptides: roles in neuronal excitability Physiol.Rev., 56, 435-452.

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.

BATAILLE,D., ROSSELIN,G. y FREYCHET,P. (1975) Interactions of glucagon, gut glucagon, vasoactive intestinal polypeptide and secretin with their membrane receptors Israel J.Med.Sci., 7, 687-692.

BATAILLE,D., BESSON,J. BASTARD,C., LABURTHE,M. y ROSSELIN,G. (1977) Specificity in hormone-receptor interaction: studies with insulin, glucagon and vasoactive intestinal peptide (VIP) en "First International Symposium on Hormonal Receptors in Digestive Tract Physiology" (Eds. Bonfils et al) Elsevier/North Holland Biomedical Press, pp 113-125.

BATAILLE,D., PEILLON.F., BESSON,J. y ROSSELIN,G. (1979) Vasoactive intestinal peptide (VIP): recepteurs spécifiques et activation de l'adenylate cyclase dans une tumeur hypophysaire humaine á prolactine C.R.Acad.Sc. Paris, 288, D1315-D1317.

BAYLISS,W.M. y STARLING,E.H. (1902) The mechanism of pancreatic secretion J.Physiol.,London, 28, 325-353.

BAYLISS,W.M. y STARLING,E.H. (1904) The chemical regulation of the secretory process Proc.R.Soc.B., 73, 310-322.

BESSON, J., DUPONT, C., LABURTHE, M., BATAILLE, D. y ROSSELLIN, G. (1977) Distribution du peptide intestinal vasoactive (VIP), chez le rat. Dosage par radioimmunologie et par radiorecepteurs Ann.Endo., 38, 145-146.

BESSON, J., ROTSZTEJN, W., LABURTHE, M., EPELBAUM, J., BEAUDET, A., KORDON, C. y ROSSELIN, G. (1979) Vasoactive intestinal peptide (VIP): brain distribution, subcellular localization and effect of deafferentation of the hypothalamus in male rats Brain Res., 165, 79-85.

BEUBLER, E. (1980) Influence of vasoactive intestinal polypeptide on net water flux on cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate formation in the rat jejunum Arch.Pharmacol., 313, 243-247.

BHATHENA, S.J., LOUIE, J., SCHECHTER, G.P., REDMAN, R.S., WAHL, L. y RECENT, L. (1981) Identification of human mononuclear leukocytes bearing receptors for somatostatin and glucagon Diabetes, 30, 127-131.

BINDER, H.J., LEMO, G.F. y GARDNER, J.D. (1980) Receptors for vasoactive intestinal peptide and secretin on small intestinal epithelial cells Am.J.Physiol., 238, G190-G196.

BITAR, K.N., SAID, S.I., WEIR, G.C., SAFFOURI, B. y MAKHLOUF, G.M. (1980) Neural release of vasoactive intestinal peptide from the gut Gastroenterology, 79, 1288-1294.

BLOOM, S.R., POLAK, J.M. y PEARSE, A.G.E. (1973) Vasoactive intestinal peptide and water-diarrhoea syndrome Lancet, 2, 14-16.

BLOOM, S.R. e IVERSEN, J. (1976) Gut hormones and the alpha cell Metabolism, 25, 1457-1458.

BODANSKY, 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.

BODANSKY, M., BODANSKY, A., KLAUSNER, Y.S. y SAID, S.I. (1974a) A preferred conformation in the vasoactive intestinal peptide (VIP). Mononuclear architecture of gastrointestinal hormones Bio.Chem., 3, 133-140.

BOURNE, H.R., LICHTENSTEIN, L.M., MELMON, K.L., HENNEY, C.S., WEINSTEIN, Y. y SHEARER, G.M. (1974) Modulation of inflammation and immunity by cyclic AMP Science, 184, 19-28.

BOYNTON, A.L. y WHITFIELD, F. (1979) The calcium-induced, cyclic AMP-dependent initiation of DNA synthesis in thymic lymphoblasts and T51B liver cells en "The Molecular Basis of Immune Function" (Ed., Kaplan, J.G.) Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam, pp 75-86.

BOYUM, A. (1968) Separation of leukocytes from blood and bone marrow IV. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood Scand.J.Clin.Lab.Invest., 21, 51-76.

BROSTROM, C.O., CORBIN, J.D., KING, C.A. y KREBS, E.G. (1971) Interaction of the subunits of adenosine-3',5'-monophosphate-dependent protein kinase of muscle Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A., 68, 2444-2458.

- BROWN, B.L. y EKINS, R.P. (1971) A saturation assay for cyclic adenosine monophosphate Clin.Sci., 38, 27-35.
- BROYART, J.P., DUPONT, C., LABURTHE, M. y ROSSELIN, G. (1981) Characterization of vasoactive intestinal peptide receptors in human colonic epithelial cells J.Clin.Endo. Metab., 52, 715-721.
- BUFFA, R., CAPELLA, C., SOLCIA, E., FRIGERIO, B. y SAID, S.I. (1977) Vasoactive intestinal peptide (VIP) cells in the pancreas and gastrointestinal mucosa. An immunohistochemical and ultrastructural study Histochem., 50, 217-228.
- BURHOL, P.G., LYGREN, I. y WALDUM, H.L. (1978) Radioimmunoassay of vasoactive intestinal polypeptide in plasma Scand.J.Gastroent., 13, 807-813.
- CALKER, D.V., MULLER, M. y HAMPRECHT, B. (1980) Regulation by secretin, vasoactive intestinal peptide and somatostatin of cyclic AMP accumulation in cultured brain cells Proc.Nat.Acad.Sci.U.S.A., 77, 6907-6911.
- CARLQUIST, M., MUTT, V. y JORNVALL, H. (1979) Isolation and characterization of bovine vasoactive intestinal peptide (VIP) FEBS Lett., 108, 457-460.
- CHANG, T., ROTH, F.L., TAI, H.H. y CHEY, W.Y. (1979) Radioimmunoassay of vasoactive intestinal polypeptide Analytical Biochem., 97, 286-297.
- CHATELAIN, P., DESCHODT-LANCKMAN, M., DE NEEF, P., CHRISTOPHE, J. y ROBBERECHT, P. (1979) Effect of secretin, glucagon and vasoactive intestinal peptide on the hormone-sensitive rat cardiac adenylate cyclase Arch.Int. Physiol.Biochim., 87, 783-784.

CHATELAIN,P., ROBBERECHT,P., DE NEEF,P., DESCHODT-LANCKMAN,M., KONIG,W. y CHRISTOPHE,J. (1980) Secretin and VIP-stimulated adenylate cyclase from rat heart. I. General properties and structural requeriments for enzyme activation Pflugers Arch., 389, 21-27.

CHATELAIN,P., ROBBERECHT,P., DE NEEF,P., CAMUS,J.C., HEUSE,D. y CHRISTOPHE,J. (1980a) Secretin and VIP-stimulated adenylate cyclase from rat heart. II. Impairment in spontaneus hypertension Pflugers Arch., 389, 29-35.

CHAYVIALLE,J.A., MIYATA,M., RAYFORD,P.L. y THOMPSON,J.C. (1980) Release of vasoactive intestinal peptide by distension of the proximal stomach in dogs Gut, 21, 745-749.

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.

CLAMAN,H.N. (1972) Corticoids and lymphoid cells New England J.Med., 287, 388-391.

CLARK,W.G., LIPTON,J.M. y SAID,S.I. (1978) Hyperthermic responses to vasoactive intestinal polypeptide (VIP) injected into the third cerebral ventricle of cats Neuropharmacology, 17, 883-885.

COHEN,M.L. y LANDRY,A.S. (1980) Vasoactive intestinal polypeptide: increased tono, enhancement of acetylcholine release and stimulation of adenylate cyclase in intestinal smooth muscle Life Sci., 26, 811-822.

COOPERMAN, A.M., DESANTIS, D., WINKELMAN, E., FARMER, R., EVERSMA, J. y SAID, S.I. (1978) Watery diarrhea syndrome: two unusual cases and further evidence that VIP is a humoral mediator Ann.Surg., 187, 325-328.

COSTA, M., FURNESS, J.B., BUFFA, R. y SAID, S.I. (1980) Distribution of enteric nerve cell bodies and axons showing immunoreactivity for vasoactive intestinal polypeptide in the guinea-pig intestine Neurosci., 5, 587-596.

COULSON, A.S. y KENNEDY, L.A. (1971) Lymphocyte membrane enzymes. II. Cyclic 3',5' adenosine monophosphate located on unstimulated human small lymphocyte nuclear membranes Blood, 38, 485-491.

COY, D.H. y GARDNER, J. (1980) Solid-phase synthesis of porcine vasoactive intestinal peptide Int.J.Peptide Protein Res., 15, 73-78.

CUTZ, E., CHANG, W., TRACK, N.S., GOTH, A. y SAID, S.I. (1978) Release of vasoactive intestinal polypeptide in mast cells by histamine liberators Nature, 275, 661-662.

DESBUQUOIS, B., LAUDAT, M.H. y LAUDAT, P. (1973) Vasoactive intestinal polypeptide and glucagon: stimulation of adenylate cyclase activity via distinct receptors in liver and fat cell membranes Biochem.Biophys.Res.Commun., 53, 1187-1194.

DESBUQUOIS, B. (1974) The interaction of vasoactive intestinal polypeptide and secretin with liver-cell membranes Eur.J.Biochem., 46, 439-450.

- DESCHODT-LANCKMAN, M., ROBBERECHT, P. y CHRISTOPHE, J. (1977) Characterization of VIP-sensitive adenylate cyclase in guinea pig brain FEBS Lett., 83, 76-80.
- DIMALINE, R. y DOCKRAY, G.J. (1978) Multiple immunoreactive forms of vasoactive intestinal peptide in human colonic mucosa Gastroenterology, 75, 387-392.
- DIMALINE, R. y DOCKRAY, G.J. (1979) Potent stimulation of the avian exocrine pancreas by porcine and chicken vasoactive intestinal peptide J. Physiol., 294, 153-163.
- DIMALINE, R., VAILLANT, C. y DOCKRAY, G.J. (1980) The use of region-specific antibodies in the characterization and localization of vasoactive intestinal polypeptide-like substances in the rat gastrointestinal tract Regul. Peptides, 1, 1-16.
- DOCKRAY, G.J. (1973) Vasoactive intestinal peptide: secretin-like action on the avian pancreas Experientia, 29, 1510-1511.
- DOCKRAY, G.J. (1975) Comparison of the actions of porcine secretin and extracts of chicken duodenum on pancreatic exocrine secretion in the cat and turkey J. Physiol., 244, 625-627.
- DOMSCHKE, S., DOMSCHKE, W., ROSCH, W., KONTUREK, S.J., SPRUGEL, W., MITZNEGG, P., WUNSCH, E. y DEMLING, M. (1977) Vasoactive intestinal peptide: a secretin-like partial agonist in man Gastroenterology, 73, 478-480.

DOMSCHKE,W., LUX,G., DOMSCHKE,S., STRUNZ,U., BLOOM,S.R. y WUNSCH,E. (1978) Effects of vasoactive intestinal peptide on resting and pentagastrin-stimulated lower esophageal sphincter pressure Gastroenterology, 75, 9-12.

DUPONT,C., GESPACH,C., CHENUT,B. y ROSSELIN,G. (1980) Regulation by vasoactive intestinal peptide of cyclic AMP accumulation in gastric epithelial glands FEBS Lett., 113, 25-28.

DUPONT,C., LABURTHE,M., BROYART,J.P., BATAILLE,D. y ROSSELIN,G. (1980a) Cyclic AMP production in isolated colonic epithelial crypts: a highly sensitive model for the evaluation of vasoactive intestinal peptide action in human intestine Eur.J.Clin.Invest., 10, 67-76.

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 gall bladder epithelial cells of man J.Clin.Invest., 67, 742-752.

EBEID,A.M., MURRAY,P.D., HIRSA,H., WESDORP,R.I.C. y FISCHER,J.E. (1976) Radioimmunoassay of vasoactive intestinal peptide J.Surg.Res., 20, 355-360.

EBEID,A.M., MURRAY,P.D. y FISCHER,J.E. (1978) Vasoactive intestinal peptide and the water diarrhoea syndrome Ann.Surg., 187, 411-416.

EBEID,A.M., ATTIA,R., MURRAY,P. y FISCHER,J.E. (1976) The placenta as a possible source of gut peptides hormones Gastroenterology, 70, A-99.

EDEN,A., BIANCO,C. y NUSSENZWEIG,V. (1971) A population of lymphocytes bearing a membrane receptor for antigen-antibody-complement complexes II. Specific isolation Cell.Immunol., 2, 658-667.

EKLUND,S., JODAL,M., LUNDGREN,O. y SJOQVIST,A. (1979) Effects of vasoactive intestinal polypeptide on blood flow, motility and fluid transport in the gastrointestinal tract of the cat Acta Physiol.Scand., 105, 461-468.

ENJALBERT,A., ARANCIBIA,S., RUBERG,M., PRIAM,M., BLUET-PAJOT,M.T., ROTSZTEJN,W.H. y KORDON,C. (1980) Stimulation of "in vitro" prolactin release by vasoactive intestinal peptide Neuroendocrinol, 31, 200-204.

EPELBAUM,J., TAPIA-ARANCIBIA,L., BESSON,J., ROTSZTEJN,W.H. y KORDON,C. (1979) Vasoactive intestinal peptide inhibits release of somatostatin from hypothalamus in vitro Eur.J.Pharmacol., 58, 493-495.

EULER,U.S. y GADDUM,J.H. (1931) An unidentified depressor substance in certain tissue extracts J.Physiol.London, 72, 74-87.

FAHRENKRUG,J., GALBO,H., HOLST,J.J. y SCHAFFALITZKY DE MUCKADELL,O.B. (1978) Influence of the autonomic nervous system on the release of vasoactive intestinal polypeptide from the porcine gastrointestinal tract J.Physiol., 280, 405-422.

FAHRENKRUG,J. (1979) Vasoactive intestinal polypeptide: measurement, distribution and putative neurotransmitter function Digestion, 19, 149-169.

- FAHRENKRUG, J. (1980) Vasoactive intestinal polypeptide
Trends Neurosci., Enero, 1-2.
- FAUSA, O., FRETHEIM, B., ELGJO, K., SEMB, L.S. y GJONE, E.
(1973) Intractable watery diarrhoea, hypokalemia and
acolorhydria associated with non-pancreatic retroperi-
toneal neurogeneus tumour containing vasoactive intes-
tinal peptide (VIP) Scand.J.Gastroen., 8, 713-717.
- FOKER, J.E., MALKINSON, A.M., SHEPPARD, J.R. y WANG, T.
(1979) Studies of cyclic AMP metabolism in prolife-
rating lymphocytes, en "The Molecular Basis of Immune
Action" (Ed. Kaplan, J.G.) Elsevier/North Holland Bio-
medical Press, Amsterdam, pp 57-74.
- FRANSEN, E.K. y MOODY, A.J. (1973) Lipolytic action of
a newly isolated vasoactive intestinal polypeptide
Horm.Metab.Res., 5, 196-199.
- FRANSEN, E.K., KRISHNA, G.A. y SAID, S.I. (1978) Vasoacti-
ve intestinal polypeptide promotes cyclic adenosine
3',5'-monophosphate accumulation in guinea pig trachea
Br.J.Pharmacol., 62, 367-369.
- FREYCHET, P. (1976) Interaction of polypeptide hormones
with cell membrane specific receptors: studies with
insulin and glucagon Diabetologia, 12, 83-105.
- 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.

FUXE, K., HOKFELT, T., SAID, S.I. y MUTT, V. (1977) Sasoactive intestinal polypeptide and the nervous system: Immunohistochemical evidence for localization in central and peripheral neurons, particularly intracortical neurons of the cerebral cortex Neurosci.Lett., 5, 241-246.

GAGINELLA, T.S., MEKHJIAN, H.S. y O'DORISIO, T.M. (1978) Vasoactive intestinal peptide: quantification by radioimmunoassay in isolated cells, mucosa and muscle of hamster intestine Gastroenterol., 74, 718-721.

GAGINELLA, T.S. y O'DORISIO, T.M. (1979) Vasoactive intestinal polypeptide: neuromodulator of intestinal secretion? en "Mechanisms of Intestinal Secretion" (Ed. Alan, R.) Liss Inc., New York, pp 231-247.

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.

GARDNER, J.D., CHRISTOPHE, J., ROBBERECHT, P. y CONLON, T.P. (1977) Membrane receptors for VIP and secretin in pancreatic acinar cells en "First International Symposium on Hormonal Receptors in Digestive Tract Physiology" (Bonfils et al, eds.) Elsevier/North Holland Biomedical Press, pp 227-235.

GAVIN III, J.R., ROTH, J., JEN, P. y FREYCHET, P. (1972) Insulin receptors in human circulating cells and fibroblasts Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., 69, 747-751.

- GAVIN III, J.R., GORDEN, P., ROTH, J., ARCHER, J.A. y BUELL, D.N. (1973) Characteristics of the human lymphocyte insulin receptor J.Biol.Chem., 248, 2202-2211.
- GIACHETTI, A., SAID, S.I., REYNOLDS, R.C. y KONIGES, F.C. (1977) Vasoactive intestinal polypeptide in brain: localization in and release from isolated nerve terminals Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., 74, 3124-3128.
- GIACHETTI, A., GOTH, A. y SAID, S.I. (1978) Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) in rabbit platelets and rat mast cells Fed.Proc., 37, 657.
- GIACHETTI, A. y SAID, S.I. (1979) Axonal transport of vasoactive intestinal peptide in sciatic nerve Nature, 281, 574-575.
- GILMAN, A.C. (1970) A protein binding assay for adenosine 3'5'-cyclic monophosphate Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., 67, 305-312.
- GOLDSTEIN, S., BLECHER, M., BINDER, R., PERRINO, P.V. y RECAN, L. (1975) Hormone receptor 5. Binding of glucagon and insulin to human circulating mononuclear cells in diabetes mellitus Endocr.Res.Comm., 2, 367-376.
- GOODNOUGH, J.E., O'DORISIO, T.M., FRIEDMAN, C.I. y KIM, M.H. (1979) Vasoactive intestinal polypeptide in tissues of the human female reproductive tract Amer.J.Obst.Gynecol., 134, 579-580.
- GOURDJI, D., BATAILLE, D., VAUCLIN, N., GROUSELLE, D., ROSSELLIN, G. y TIXIER-VIDAL, A. (1979) Vasoactive intestinal peptide (VIP) stimulates prolactin (Prl) release and cAMP production in a rat pituitary cell line (GAH/B6). Additive effects of VIP and TRH on Prl release FEBS Lett., 104, 165-168.

GOWANS, J.L. y KNIGHT, E.J. (1964) The route of recirculation of lymphocytes in the rat Proc. Roy. Soc. Lond., B159, 257-261.

GUERRERO, J.M., PRIETO, J.C., RAMIREZ-CARDENAS, R., CALVO, J.R. y GOBERNA, R. (1981) Properties of vasoactive intestinal peptide-receptor interaction in rat liver membranes Rev. Esp. Fisiol., 37, 1-8.

GUPTA, S., PLATSOUCAS, G., SCHULOF, R. y GOOD, R.A. (1979) Receptors for IgA on subpopulation of human T and B lymphocytes Cell. Immunol., 45, 469-472.

HALL, J. y MORRIS, B. (1965) The origin of the cells in the efferent lymph from a single lymph node J. Exptl. Med., 121, 901-905.

HANSEN, L.P., LUND, H.T., FAHRENKRUG, J. y SOGAARD, H. (1980) Vasoactive intestinal polypeptide (VIP)-producing ganglioneuroma in a child with chronic diarrhea Acta Paediatr. Scand., 69, 419-429.

HEISTAD, D.D., MARCUS, M.L., SAID, S.I. y GROSS, P.M. (1980) Effect of acetylcholine and vasoactive intestinal peptide on cerebral blood flow Am. J. Physiol., 239, H73-H80.

HERRERA, M.T., PRIETO, J.C., GUERRERO, J.M. y GOBERNA, R. (1981) Effects of fasting and refeeding on insulin binding to liver plasma membranes and hepatocytes from normal rats Horm. Metab. Res., 13 (en prensa).

HIRSCHHORN, R., GROSSMAN, J. y WEISSMAN, G. (1970) Effect of cAMP and theophylline on lymphocytes transformation Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 133, 1361-1367.

HOKFELT, T., ELDE, R., JOHANSON, O., LJUNGAHL, A., SCHULZBERG, M., FUXE, K., GOLDSTEIN, M., NILSSON, G., PERNOW, B., TERENIUS, L., GANTEN, D., JEFFLOATE, S.L., REHFELD, J. y SAID, S.I. (1978) Distribution of peptide-containing neurons en "Psychopharmacology: a generation of progress"

(Eds. Lipton, M.A., Di Mascio, A. y Killam, K.F.) New York, Raven Press, pp 39-66.

HUNT, S., VAAMONDE, C.A., RATTASSI, T., BERIAN, G. SAID, S.I. y PAPPER, S. (1979) Circulating levels of vasoactive intestinal polypeptide in liver disease Arch.Int.Med., 139, 994-996.

HUTCHINSON, J.B., DIMALINE, R. y DOCKRAY, G.J. (1981) Neuropeptides in the gut: quantification and characterization of cholecystinin octapeptide-bombesin- and vasoactive intestinal polypeptide- like immunoreactivities in the myenteric plexus of the guinea pig small intestine Peptides, 2, 23-30.

IPP, E., DOBBS, R.E. y UNGER, R.H. (1978) Vasoactive intestinal peptide stimulates pancreatic somatostatin release FEBS Lett., 90, 76-78.

JANSSON, R., STEEN, G. y SUANVIK, J. (1978) Effects of intravenous vasoactive intestinal peptide (VIP) on gallbladder function in the cat Gastroenterol., 75, 47-50.

JARHULT, J., HELLSTRAND, P. y SUNDLER, F. (1980) Immunohistochemical localization and vascular effects of vasoactive intestinal polypeptide in skeletal muscle of cat Cell. Tissue Res., 207, 55-64.

JENSEN, S.L., FAHRENKRUG, J., HOLST, J.J., NIELSEN, O.V. y SCHAFFALITZKY DE MUCKADELL, O.B. (1978) Secretory effects of VIP on isolated perfused porcine pancreas Am.J.Physiol., 235, E387-E391.

JONDAL, M., HOLM, G. y WIGZELL, H. (1972) Surface markers on human T and B lymphocytes. I. A large population of lymphocytes forming non-immune rosettes with sheep red cells J.Exptl.Med., 136, 207-212.

KACHELOFFER, J., ELOY, M.R., POUSSE, A. HOHMATTER, D. y GRENIER, J.F. (1974) Mesenteric vasomotor effects of vasoactive intestinal polypeptide study on isolated canine jejunal loops Pfluger Arch., 352, 175-176.

KACHELOFFER, J., MENDEL, C., DAUCHEL, J., HOHMATTER, D. y GRENIER, J.F. (1976) The effects of VIP on intestinal motility. Study on ex vivo perfused isolated canine jejunal loops Am.J.Dig.Dis., 21, 957-962.

KANEKO, T., CHENG, P., OKA, H., ODA, P., YANAIHARA, N. y YANAIHARA, G. (1980) Vasoactive intestinal polypeptide stimulates adenylate cyclase and serotonin N-acetyltransferase activities in rat pineal "in vitro" Biomed.Res., 1, 84-87.

KANETO, A., KANETO, T., KAJINUMA, H. y KOSAKA, K. (1977) Effect of vasoactive intestinal polypeptide infused intrapancreatically on glucagon and insulin secretion Metabolism, 26, 781-786.

KAPLAN, S.J., HOLBROOK, C.F., MCDANIEL, H.G., BUNTAIN, W.L. y CRIST, W.M. (1980) Vasoactive intestinal peptide secreting tumors of childhood Am.J.Dis.Child., 134, 21-24.

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.

- KELTZ, T.N., STRAUS, E., YALOW, R.S. y BERSON, S.A. (1980) Degradation of vasoactive intestinal polypeptide by tissue homogenates Biochem. Biophys. Res. Commun., 92, 669-674.
- KERINS, C. y SAID, S.I. (1973) Hyperglycemic and glycogenolytic effects of vasoactive intestinal polypeptide Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 143, 1014-1017.
- KONTUREK, S.J., THOR, P., DEMBISKI, A. y KROL, R. (1975) Vasoactive intestinal polypeptide: comparison with secretin for potency and spectrum of physiologic action en "Gastrointestinal Hormones" (Ed. Thompson, J.C.) University Texas Press, Austin and Londres, pp 611-633.
- KONTUREK, S.J., THOR, P., DEMBISKI, A. y KROL, R. (1975) Comparison of secretin and vasoactive intestinal peptide on pancreatic secretion in dogs Gastroenterol., 68, 1527-1535.
- KONTUREK, S.J., BEMBINSKI, A., THOR, P. y KROL, R. (1976) Comparison of vasoactive intestinal peptide (VIP) and secretin in gastric secretion and mucosal blood flow Pfluger Arch., 361, 175-181.
- KOSTER, F. y MACGREGOR, D.D. (1970) Rat thoracic duct lymphocytes: types that participate in inflammation Science, 167, 1137-1139.
- KREJS, G.J., FORDTRAN, J.S., BLOOM, S.R., FAHRENKRUG, J., SCHAFFALITZKY DE MUCKADELL, O.B., FISCHER, J.E., HUMPHREY, C.S., O'DORISIO, T.M. y SAID, S.I., WALSH, J.H. y HULKES, A.A. (1980) Effect of VIP infusion on water and ion transport in the human jejunum Gastroenterol., 78, 722-727.

KRISHNARAJ,R. y TALWAR,G. (1973) Role of cAMP in mitogen induced transformation of human peripheral lymphocytes J.Immunol., 111, 1010-1014.

LABURTHE,M., BESSON,J., HUI BON HOA,D. y ROSSALIN,G. (1977) Recepteurs du peptide intestinal vasoactif (VIP) dans les enterocytes: liaison specifique et stimulation de l'AMP cyclique C.R.Acad.Sc.Paris, 284, D2139-D2142.

LABURTHE,M., BATAILLE,D. y ROSSELIN,G. (1977a) Vasoactive intestinal peptide (VIP): variation of the jejunum-ileal content in the developing rat as measured by radioreceptor assasy Acta Endocrinol., 84, 588-599.

LABURTHE,M., ROUSSET,M., BOISSARD,C., CHEVALIER,G., ZWEIBAUM,A. y ROSSELIN,G. (1978) Vasoactive intestinal peptide: a potent stimulator of adenosine 3':5' cyclic monophosphate accumulation in gut carcinoma cell lines in culture Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., 75, 2772-2775.

LABURTHE,M., PRIETO,J.C., AMIRANOFF,B., DUPONT,C., BRO-YART,J., HUI BON HOA,D., BROER,Y. y ROSSELIN,G. (1979) VIP recptors in intestinal epithelial cells: Distribution throughout the intestinal tract en "Hormone receptors in digestion and nutrition" (Eds. Rosselin,G., Fromageot,P. y Bonfils,S.) Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam, pp 241-254.

LABURTHE,M., PRIETO,J.C., AMIRANOFF,B., DUPONT,C., HUI BON HOA,D. y ROSSELIN,G. (1979a) Interaction of vasoactive intestinal peptide with isolated intestinal epithelial cells from rat: 2. Characterization and estructural requerimenta of the stimulatory effect of vasoactive intestinal peptide on production of adenosine 3'.5'-monophosphate Eur.J.Biochem., 96, 239-248.

LABURTHE, M., MANGEAT, P., MARCHIS-MOUREN, G. y ROSSELIN, G. (1979b) 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., ROUSSET, M., CHEVALIER, G., BOISSARD, C., DUPONT, C., ZWEIBAUM, A. y ROSSELIN (1980) Vasoactive intestinal peptide control of cyclic adenosine 3':5'-monophosphate levels in seven human colorectal adenocarcinoma cell lines in culture Cancer Res., 40, 2529-2533.

LAD, P.M., WELTON, A.F. y RODBELL, M. (1977) Evidence for distinct guanine nucleotide sites in the regulation of the glucagon receptors and of adenylate cyclase activity J.Biol.Chem., 252, 5942-5946.

LARSSON, L.I., FAHRENKRUG, J., SCHAFFALITZKY DE MUCKADELL, O.B., SUNDLER, F., HAKANSON, R. y REHFELD, J.F. (1976) Localization of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) to central and peripheral neurons Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A., 73, 3197-3200.

LARSSON, L.I., EDVINSON, L., FAHRENKRUG, J., HAKANSON, R., OWMAN, C.H., SCHAFFALITZKY DE MUCKADELL, O.B. y SUNDLER, F. (1976a) Immunohistochemical localization of a vasodilatory polypeptide (VIP) in cerebrovascular nerves Brain Res., 113, 400-404.

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) Inervation of the páncreas by vasoactive intestinal polypeptide (VIP) immunoreactive nerves Life Sci., 22, 773-780.

LARSSON, L.I., POLAK, J.M., BUFFA, R., SUNDLER, F. y SOLCIA, E. (1979) On the immunocytochemical localization of the vasoactive intestinal polypeptide J.Histochem.Cytochem., 23, 936-938.

LEANDER, S., HAKANSON, R. y SUNDLER, F. (1981) Nerves containing substance P, vasoactive intestinal polipeptide, enkephalin or somatostatin in the guinea pig taenia coli Cell.Tiss.Res., 215, 21-39.

LESNIAK, M.A., GORDEN, P., ROTH, J. y GAVIN III, Jr. (1974) Binding of 125 I-human growth hormone to specific receptors in human cultured lymphocytes J.Biol.Chem., 249, 1661-1665.

LINDVALL, M., ALUMETS, J., EDVINSON, L., FAHRENKRUG, J., HAKANSON, R., HANKO, J., OWMAN, C.H., SCHAFFALITZKY DE MUCKADELL y SUNDLER, F. (1978) Peptidergic (VIP) nerves in the mammalian choroid plexus Neurosci.Lett., 9, 77-82.

LING, N.R. y KAY, J.E. (1975) The properties of lymphocytes from various lymphoid tissues en "Lymphocyte stimulation" (Eds. Ling, N.R. y Kay, J.E.) North Holland Publishing Company, Amsterdam, pp 9-24.

LINNOILA, R.I., DIAGUSTINE, R.P., HERVONEN, A. y MILLER, R.J. (1980) Distribution of (Met) 5 - and (Leu) 5 - enkephalin- , vasoactive intestinal polypeptide- and substance P-like immunoreactivities in human adrenal glands Neurosci., 5, 2247-2259.

- LITTLE, J.R., BRECHER, G., BRADLEY, T.R. y ROSE, S. (1962) Determination of lymphocyte turnover by continuous infusion of ^3H -thymidine Blood, 19, 236-242.
- LOREN, I., EMSON, P.C., FAHRENKRUG, J., BJORKLUND, A., ALUMETS, J., HAKANSOHN, R. y SUNDLER, F. (1979) Distribution of vasoactive intestinal polypeptide in the rat and mouse brain Neurosci., 4, 1953-1976.
- LOREN, I., TORNQVIST, K. y ALUMETS, J. (1980) VIP (vasoactive intestinal polypeptide) immunoreactive neurons in the retina of the rat Cell.Tiss.Res., 210, 167-170.
- LUM, L.G., MUCHMORE, A.V., KAREN, D., KECKER, J., KOSKI, I., STROBER, W. y BLAESE, R.M. (1979) A receptor for IgA on human T lymphocytes J.Immunol., 122, 65-72.
- LUNDBERG, J.M., HOKFELT, T., NILSSON, G., PETERSSON, 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 Gastroenterol., 77, 468-471.
- LYNCH, E.M., WHARTON, J., BRYANT, M.G., BLOOM, S.R., POLAK, J.M. y ELDER, M.G. (1980) The differential distribution of vasoactive intestinal polypeptide in the normal human female genital tract Histochem., 67, 169-178.
- MAILMAN, D. (1978) Effects of vasoactive intestinal polypeptide on intestinal absorption and blood flow J.Physiol., 279, 121-132.

MAKHLOUF, G.M. y SAID, S.I. (1975) The effects of vasoactive intestinal peptide (VIP) on digestive and hormone function en "Gastrointestinal Hormones" (Ed. Thompson, J.C.) Austin, Texas University Press, pp 599-610.

MAKHLOUF, G.M., YAU, W.M., ZFASS, A.M., SAID, S.I. y BODANSKY, M. (1978) Comparative effects of synthetic and natural vasoactive intestinal peptide on pancreatic and biliary secretion and on glucose and insulin blood levels in the dog Scand.J.Gastroent., 13, 759-765.

MAKMAN, M.H. (1971) Properties of adenylate cyclase of lymphoid cells Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., 68, 885-891.

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.

MANGEAT, P., MARVALDI, J., AHMED, O. y MARCHIS-MOUREN, G. (1981) Parallel activation of cyclic AMP phosphodiesterase and cyclic AMP-dependent protein kinase in two human gut adenocarcinoma cells (HT29) and (HRT-18) in culture by vasoactive intestinal peptide (VIP) and other effectors activating the cyclic AMP system Reg.Peptides, 1, 397-414.

MARVALDI, J., MANGEAT, P., AHMED, D., COEROLI, C y MARCHIS-MOUREN, G. (1979) Activation of cyclic AMP-dependent protein kinases in human gut adenocarcinoma (HT-29) cells in culture Biochim.Biophys.Acta, 588, 12-19.

- MARX, S.J., AURBACH, G.D., GAVIN III, Jr. y BUELL, D.W. (1974). Calcitonin receptors on cultured human lymphocytes. J.Biol.Chem. 249, 6812-6816.
- MATSUZAKI, Y., HAMASAKI, Y. y SAID, S.I. (1980). Vasoactive intestinal peptide: a possible transmitter of non adrenergic relaxation of guinea pig airways. Science, 210, 1252-1253.
- MENDELSON, J. y NORDBERG, J. (1979). Adenylate cyclase en normal and leukemic human lymphocytes, en "Cell Biology and Immunology of leukocyte function", Academic Press Inc. pp 143-147.
- MILLER, J.F., BASTEN, A., SPRENT, J. y CHEERS, C. (1971). Interaction between lymphocytes in immune responses. Cell. Immunol., 2, 469-477.
- MITCHELL, G.H., SINATRA, F.R., GRANT, F.W., GRIFFIN, R. y SUNSHINE, P. (1976). Intractable watery diarrhea, ganglioneuroblastoma and vasoactive intestinal peptide. J.Pediatr., 89, 593-595.
- MODLIN, I.M., BLOOM, S.R., BARNES, A. y WELBOURN, P.B. (1978). Cure of intractable watery diarrhea by excision of a VIP-oma. Br.J.Sug., 65, 234-236.
- MODLIN, I.M., BLOOM, S.R., y MITCHELL, S.J. (1978a). Experimental evidence for vasoactive intestinal peptide as the cause of the watery diarrhea syndrome. Gastroenterol., 75, 1051-1054.
- MORERA, A.M., CATHIARD, A.M., LABURTHE, M. y SAEZ, J.M. (1979). Interaction of vasoactive intestinal peptide (VIP) with a mouse adrenal cell line (Y-1): specific binding and biological effects. Biochem.Biophys.Res.Commun., 90, 78-85.

- MORETTA, L., FERRARINI, M. y CJOPER, M.T. (1978) Characterization of human T cells subpopulations as defined by specific receptors for immunoglobulin Cont.Tep.Immunobiol., 34, 10-16.
- MUTT, V. y SAID, S.I. (1974) Structure of the porcine vasoactive intestinal octacosapeptide. The amino acid sequence. Use of kallikrein in its determination Eur.J.Biochem., 42, 581-589.
- NEVILLE, D.M.Jr. (1968) Isolation of an organ specific protein antigen from cell surface membrane of rat liver Biochim.Biophys.Acta, 154, 540-552.
- 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.
- NILSSON, A. (1975) Structure of the vasoactive intestinal octacosapeptide from chicken intestine. The amino acid sequence. FEBS Lett., 60, 322-326.
- NOORDEN, S.V. y PATENT, G.J. (1980) Vasoactive intestinal polypeptide-like immunoreactivity in nerves of pancreatic islet of the teleost fish, *gillichthys mirabilis* Cell.Tiss.Res., 212, 139-146.
- NOVOGRODSKY, A. y KATCHALSKI, E. (1970) Effect of PHA and prostaglandins on cAMP synthesis in rat lymph node lymphocytes Biochim.Biophys.Acta, 215, 291-301.

O'DORISIO, M.S., O'DORISIO, T.M., CATALAND, S. y BALCERZAK, S.P. (1980) Vasoactive intestinal polypeptide as a biochemical marker for polymorphonuclear leukocytes J.Lab.Clin.Med., 96, 666-672.

OHNEDA, A., ISHII, S., HORIGOME, K., CHIBA, M., SAKAI, T., KAY, I., WATANABE, K. y YAMAGATA, S. (1977) Effect of intrapancreatic administration of vasoactive intestinal paptide upon the release of insulin and glucagon in dogs Horm.Metab.Res., 9, 447-452.

OLEFSKY, J.M. (1976) Decreased insulin binding to adipocytes and circulating monocytes in obesity J.Clin.Invest. 57, 1165-1172.

OTTESEN, B., WAGNER, G. y FAHRENKRUG, J. (1980) Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) inhibits prostaglandin= $F_{2\alpha}$ -induced activity of the rabbit myometrium Prostaglandins 19, 427-435.

OTTESEN, B., FAHRENKRUG, J., WAGNER, G., ULRICHSEN, H., EINER-JENSEN, N., CARTER, A.M., LARSEN, J.J. y STOLBERG, B. (1980a) Effects of VIP in the female genital tract Endocrinol.Japon., 1, 71-78.

OTTESEN, B., LARSEN, J.J., FAHRENKRUG, J., STJERNQUIST, M. y SUNDLER, F. (1981) Distribution and motor effect of VIP in female genital tract Am.J.Physiol., 240, E32-E36.

PEARSE, A.G.E. (1974) The gut as an endocrine organ Brit.J.Hosp.Med., 11, 697-707.

PHILLIS, J.W., KIRKPATRICK, J.R. y SAID, S.I. (1978) Vasoactive intestinal polypeptide excitation of central neurons Can.J.Physiol.Pharmacol., 56, 337-340.

PIPER, P.J., SAID, S.I. y VANE, J.R. (1970) Effects on smooth muscle preparation of unidentified vasoactive peptides from intestine and lung Nature, 225, 1144-1146.

POLAK, J.M., PEARSE, A.G.E., GARAUD, J.C. y BLOOM, S.R. (1974) Cellular localization of a vasoactive intestinal peptide in the mammalian and avian gastrointestinal tract Gut, 15, 720-724.

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. y GOBERNA, R. (1980) No effects of starvation on vasoactive intestinal peptide (VIP) receptors in intestinal epithelial cells Horm. Metab.Res. 12, 223-224.

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., (en prensa).

RACUSEN, L.C. y BINDER, H.J. (1977) Alteration of large intestinal electrolyte transport by vasoactive intestinal polypeptide in the rat Gastroenterol., 73, 790-796.

- RAFF, M.C. y CANTOR, H. (1971) Subpopulation of thymus cells and thymus-derived lymphocytes en "Progress in Immunology" , Academy Press, New York, pp 83-104.
- 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 vasoactive intestinal polypeptide (VIP) on the lower esophageal sphincter pressure. Proc.Soc.Exp.Biol.Med., 155, 40-43.
- RICOUR, C., DUHAMEL, J.F., LESEC, G. y SCHWEISGUTH, O. (1977) Diarrhée cholériforme dans un cas de ganglioneuroblastome Arch.Franc.Ped., 34, 552-555.
- ROBBERECHT, P., CONLON, T.P. y GARDNER, J.D. (1976) Interaction of porcine vasoactive intestinal peptide with dispersed pancreatic acinar cells from the guinea pig. Structural requirements for effects of vasoactive intestinal peptide and secretin on cellular adenosine 3'5'-monophosphate J.Biol.Chem., 251, 4635-4639.
- ROBBERECHT, P., DE NEEF, P., LAMMENS, M., DESCHODT-LANCKMAN, M. y CHRISTOPHE, J.P. (1978) Specific binding of vasoactive intestinal peptide to brain membranes from guinea pig Eur.J.Biochem., 90, 147-154.
- ROBBERECHT, P., DESCHODT-LANCKMAN, M., DE NEEF, P. y CHRISTOPHE, J.P. (1979) Vasoactive intestinal peptide: levels and functional receptors in rat brain before and after weaning Life Sci., 25, 1001-1008.

- RODBELL, M., KRANS, H.M.J., POHL, S.L. y BIRNBAUMER, L. (1971) The glucagon sensitive adenylyl cyclase system in plasma membranes of rat liver III. Binding of glucagon. Method of assay and specificity J.Biol.Chem., 246, 1861-1871.
- RODBELL, M. (1980) The role of hormone receptor and GTP-regulatory proteins in membrane transduction Nature, 284, 17-22.
- ROSENFELD, R.G. y HINTZ, R.L. (1980) Characterization of specific receptors for somatomedin C (SM-C) on cultured human lymphocytes: evidence that SM-C modulates homologous receptor concentration Endo., 107, 1841-1848.
- ROUSSET, M., LABURTHE, M., CHEVALIER, G., BOISSARD, C., ROSSELIN, G. y ZWEIBAUM, A. (1981) Vasoactive intestinal peptide (VIP) control of glycogenolysis in the human colon carcinoma cell line HT-29 in culture FEBS Lett., 126, 38-40.
- RYAN, J.P. y COHEN, S. (1977) Effect of vasoactive intestinal polypeptide on basal and cholecystokinin induced gallbladder pressure Gastroenterol., 73, 870-872.
- RYAN, J.P. y RYAVE, S. (1978) Effect of vasoactive intestinal polypeptide on gallbladder smooth muscle in vitro Am.J.Physiol., 234, E44-E46.
- SAID, S.I. y MUTT, V. (1970) Potent peripheral and splanchnic vasodilator peptide from normal gut Nature, 225, 863-864.

SAID, S.I. y MUTT, V. (1970a) Polypeptide with broad biological activity Science, 169, 1217-1218.

SAID, S.I. y MUTT, V. (1972) Isolation from porcine-intestinal wall of a vasoactive octacosapeptido related to secretin and to glucagon Eur.J.Biochem., 28, 199-204.

SAID, S.I. (1974) Smooth muscle relaxant activity of vasoactive intestinal polypeptide. IV Internatinal Symposium on Endocrinology, Londres, pp 297-301.

SAID, S.I. y MAKHLOUF, G.M. (1974) Vasoactive intestinal polypeptide: spectrum of biological activity en "Endocrinology of the Gut" (Eds. Chey, W.Y., Brooks, F.P., Thorofare, N.J. y Slack, C.B.), pp 88-102.

SAID, S.I., KITAMURA, S., YOSHIDA, T., PRESKITT, J. y HOLDEN, L.D. (1974) Humoral control of airways Am.N.Y.Acad. Sci., 221, 103-114.

SAID, S.I. y FALOONA, G.R. (1975) Elevated plasma and tissue levels of vasoactive intestinal polypeptide in the watery-diarrhea syndrome due to pancreatic, bronchogenic and other tumors N.Engl.J.Med., 293, 155-160.

SAID, S.I. y ROSENBERG, R.N. (1976) Vasoactive intestinal polypeptide abundant immunoreactivity in neural cells lines and normal neurons tissue Science, 192, 907-908.

SAID, S.I. y GIACHETTI, A. (1977) Vasoactive intestinal polypeptide: distribution in normal tissues and preliminary report on its subcellular localization in brain First International Symposium on Hormonal Receptors in Digestive Tract Physiology, INSERN symposium n°3 (Eds. Bonfils et al) pp 417-423.

SAID,S.I. y MUTT,V. (1977) Relationship of spasmogenic and smooth muscle relaxant peptides from normal lung to other vasoactive compounds Nature, 265, 84-86.

SAID,S.I. y PORTER,J.C. (1979) Vasoactive intestinal polypeptide release into hypophyseal portal blood Life Sci., 24, 227-230.

SAID,S.I., GIACHETTI,A. y NICOSIA,S. (1980) VIP: possible functions as a neural peptide en "Neural Peptides and Neuronal Communications" (Eds. Costa,E. y Trabuchi,M) Raven Press, New York, pp 75-82.

SAITO,Y, MATSUOKA,N., SHIRAI,K., YAMAMOTO,M., KUMAGAI,A. y YANAIHARA,N. (1978) Effects of adrenergic blocking agents on lipolysis and adenylate cyclase activity induced by vasoactive intestinal polypeptide (VIP) Endocrinol.Japon., 25, 403-405.

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 Neurosci., 12, 265-269.

SCATCHARD,G, (1949) The attractions of proteins for small molecules and ions Ann.Ny.Acad.Sci., 51, 660-672.

SCHEBALIN,M., BROOKS,A.M., SAID,S.I. y MAKHLOUF,G.M. (1974) The insulinotropic effect of vasoactive intestinal peptide (VIP): direct evidence from in vitro studies Gastroenterol., 66, 72(resumen).

- SCHEBALIN, M., SAID, S.I., MAKHLOUF, G.M. (1977) Stimulation of insulin and glucagon secretion by vasoactive intestinal peptide. Am.J.Physiol., 232, E197-E200.
- SCHORR, B.A., SAID, S.I. y MAKHLOUF, G.M. (1974) Inhibition of gastric secretion by synthetic vasointestinal peptide (VIP) Clin.Res., 22, 23 (resumen).
- SCHORDERET, M., SOVILLA, J. y MAGISTRETTI, P.J. (1981) VIP- and Glucagon- induced formation of cyclic AMP in intact retinae "in vitro" Eur.J.Pharmacol., 71, 131-134.
- SCHWARTZ, C.J., KIMBERG, D.V., SHEERIN, H.E., FIELD, M. y SAID, S.I. (1974) Vasoactive intestinal peptide stimulation of adenylate cyclase and active electrolyte secretion in intestinal mucosa J.Clin.Invest., 54, 536-544.
- SCHWARTZ, C.J., BIANCO, A.R., HARDWERGER, B.S. y KAHN, R.C. (1975) Demonstration that monocytes rather than lymphocytes are the insulin binding cells in preparation of human peripheral blood mononuclear leukocytes: implications for studies of insulin resistance in man Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., 72, 474-478.
- SEIF, F.J., SADOWSKY, P., HENI, R., FISCHER, R., BLOOM, S.R. y POLAK, J.M. (1975) The vasoactive intestinal polypeptide in Verner-Morrison syndrome Dt.Med.Wschr., 100, 399-405.
- SHIELD, C.F. y HAFF, R.C. (1976) The VIPoma: further confirmation of VIP as the hormonal agent in the WDHA syndrome Am.J.Surg., 132, 784-786.

SHIMIZU, T. y TAIRA, N. (1979) Assessment of the effects of vasoactive intestinal peptide (VIP) on blood flow through and salivation of the dog salivary gland in comparison with those of secretin, glucagon and acetylcholine Br.J.Pharmacol., 65, 683-687.

SIEGEL, S.R., BROWN, F.L., CASTELL, D.O., JOHNSON, L.F. y SAID, S.I. (1978) Effects of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) on the lower oesophageal sphincter in awake baboons: comparison with glucagon and secretin Gastroenterol., 74, 1094 (resumen)

SIMON, B. y KATHER, H. (1978) Activation of human adenylate cyclase in the upper gastrointestinal tract by vasoactive intestinal polypeptide Gastroenterol., 74, 722-725.

SIMS, K.B., HOFFMAN, D.L., SAID, S.I. y ZIMMERMAN, E.A. (1980) Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) in mouse and rat brain: an immunocytochemical study Brain Res., 186, 165-183.

SMITH, J.W., STEINER, A.L., NEWBERRY, W.M. y PARKER, C.W. (1971) Cyclic AMP in human lymphocytes. Alterations after PHA stimulation J.Clin.Invest., 50, 432-441.

SMITH, J.W., STEINER, A.L. y PARKER, C.W. (1971a) Human lymphocyte metabolism. Effects of cyclic and non cyclic nucleotides on stimulation by PHA J.Clin.Invest., 50, 442-448.

SOBRINO, F., PINTADO, E., PRIETO, J.C., RUIZ, G. y GOBERNA, R. (1979) Plasma-cAMP concentration in fasting rats Horm. Metab.Res., 11, 183-184.

STOBO, J.D., ROSENTHAL, A.S. y PAUL, W.E. (1973) Functional heterogeneity of immune lymphoid cells. V. Lymphocytes lacking detectable surface θ and immunoglobulin determinants J.Exptl.Med., 138, 71-79.

SUNDLER, F., ALUMETS, J., HAKANSON, R., INGEMANSSON, S., FAHRENKRUG, J. y SCHAFFALITZKY DE MUCKADEL, O.B. (1977) VIP innervation of the gallbladder Gastroenterol., 72, 1375-1377.

SUNDLER, F., ALUMETS, J., HAKANSON, R., FAHRENKRUG, J. y SCHAFFALITZKY DE MUCKADELL, O.B. (1978) Peptidergic (VIP) nerves in the pancreas Histochem., 55, 173-176.

SUNDLER, F., ALUMETS, J., FAHRENKRUG, J., HAKANSON, R. y SCHAFFALITZKY DE MUCKADEL, O.B. (1979) Cellular localization and ontogeny of immunoreactive vasoactive intestinal polypeptide (VIP) in the chicken gut Cell.Tissue Res., 196, 193-201.

SWIFT, P.G.F., BLOOM, S.R. y HARRIS, F. (1975) Watery diarrhea and ganglioneuroma with secretion of vasoactive intestinal peptide Arch.Dis.Child., 50, 896-899.

TAYLOR, D.P. y PERT, C.B. (1979) Vasoactive intestinal polypeptide specific binding to rat brain membranes Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., 76, 660-664.

THULIN, L. y OLSSON, P. (1973) Effects of intestinal peptide mixture G2 and vasoactive intestinal peptide (VIP) on splanchnic circulation in the dog Acta Chir.Scand., 139, 691-697.

- TOURNUT,R., ESTIVAL,A., VAYSSE,N., PASCAL,J.P. y RIBET, A. (1977) Vasoactive intestinal peptide interaction with secretin on isolated rat pancreas Irish J.Med.Sci., 146, 20-21 (resumen)
- TRUMP,D.L., LIVINGSTON,J.N. y BAYLIN,S.B. (1977) Watery diarrhea syndrome in an adult with ganglioneuroma-pheochromocytoma Cancer, 40, 1526-1527.
- UDDMAN,R., ALUMETS,J., EDVINSSON,L., HAKANSON,R. y SUNDLER,F. (1978) Peptidergic (VIP) innervation of the esophagus Gastroenterol., 75, 5-8.
- UDDMAN,R., ALUMETS,J., DENSERT,O., 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., MALM,R. y SUNDLER,F. (1980) The origin of vasoactive untestinal polypeptide (VIP) nerves in the feline nasal mucosa Acta Otolaryngol., 89, 152-156.
- UDDMAN,R., ALUMETS,J., EHINGER,B., HAKANSON,R., LOREN,I. y SUNDLER,F. (1980a) Vasoactive intestinal peptide nerves in ocular and orbital structures of the cat Invest.Ophtalm.Vis.Sci., 19, 878-886.
- UDDMAN,R., FAHRENKRUG,J., MALM,M., ALUMETS,J., HAKANSON,R. y SUNDLER,F. (1980b) Neuronal VIP in salivary glands: distribution and release Acta Physiol.Scand., 110, 31-38.
- UDDMAN,R., ALUMETS,J., HAKANSON,R., LOREN,I. y SUNDLER,F. (1980C) Vasoactive intestinal peptide (VIP) occurs in nerves of the pineal gland Experientia, 36, 1119-1120.

- UDDMAN,R., MALM,M., FAHRENKRUG,J. y SUNDLER,F. (1981) VIP increased in nasal blood during stimulation of the vidian nerve Acta Otolaryngol., 91, 135-138.
- VAALASTI,A., LINNOILA,I. y HERVONEN,A. (1980) Immunohistochemical demonstration of VIP, (Met)⁵- and (Leu)⁵-enkephalin immunoreactive nerve fibres in the human prostate and seminal vesicles Histochem., 66, 89-98.
- VAGNE,M. y TROITSKOJA,V. (1976) Effect of secretin, glucagon and VIP on gallbladder contraction Digestion, 14, 62-67.
- VERNER,J.V. y MORRISON,A.B. (1958) Islet cell tumor and a syndrome of refractory watery diarrhea and hypokaliemia Am.J.Med., 25, 374-380.
- VIJAYAN,E., 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 Endo., 104, 53-64.
- VILLAR,H.V., FENDER,H.R., RAYFORD,P.L., BLOOM,S.R., RAMUS, N.I. y THOMPSON,J.C. (1976) Suppression of gastrin release and gastric secretion by gastric inhibitory polypeptide (GIP) and vasoactive intestinal polypeptide (VIP) Ann.Surg., 184, 97-102.
- WALDMAN,D.B., GARDNER,J.D., ZFASS,A.M. y MAKHLOUF,G.M. (1977) Effect of vasoactive intestinal peptide, secretin and related peptides on rat colonic transport and adenylate cyclase activity Gastroenterol., 73, 518-523.

WALKER, W.S. (1976) Functional heterogeneity of macrophages. en "Immunobiology of the Macrophage" (Ed. Nelson, D.S.) Academic Press, Inc., New York, pp. 91-110.

WALLES, B., HAKANSON, R., HELM, G., OWMAN, C., SJOBERG, N.O. y SUNDLER, F. (1980) Relaxation of human female genital sphincters by the neuropeptide vasoactive intestinal polypeptide Am.J.Obst.Gynecol., 138, 337-338.

WEINER, R.S. y SHAH, V.O. (1980) Purification of human monocytes: isolation and collection of large number of peripheral blood monocytes J.Immunol.Methods, 36, 89-97.

WELTON, A.F., LAD, P.M., NEWBY, A.C., YAMAMURA, H., NICOSIA, S. y RODBELL, M. (1977) Solubilization and separation of the glucagon receptor and adenylate cyclase in guanine nucleotide-sensitive state J.Biol.Chem., 252, 5947-5950.

WU, Z.C., O'DORISIO, T.M., CATALAND, S., MEKHJIAN, H.S. y GAGINELLA, T.S. (1979) Effects of pancreatic polypeptide and vasoactive intestinal polypeptide on rat ileal and colonic water and electrolyte transport in vivo Digest.Dis.Sci., 24, 625-630.

YANAIHARA, C., SAKAGAMI, M., MOCHIZUKI, T., SATO, H., YANAIHARA, N., IWANAGA, T., FUJII, S. y FUJITA, T. (1980) Immunoreactive VIP (vasoactive intestinal polypeptide) in canine intestinal mucosa and muscle Biomed.Res., 1, 449-455.