

R.32.786

M/271

UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
FACULTAD DE MEDICINA

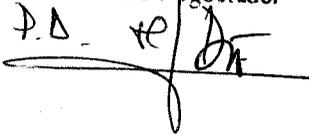
T.D.  
M/271

UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
NEGOCIADO DE TESIS

Queda registrado este Título de Doctor al  
folio 129 número 203 del libro  
correspondiente.

Sevilla, 03 AGU. 2000

El Jefe del Negociado.

P.D. 

**“CARACTERIZACIÓN Y FARMACOLOGÍA DEL SISTEMA RECEPTOR-  
EFECTOR PARA EL PEPTIDO INTESTINAL VASOACTIVO (VIP) EN  
MACROFAGOS PERITONEALES DE RATON”.**

**TESIS DOCTORAL**

**Manuel Montilla de la Torre**

**Sevilla, 2000**

DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA MEDICA Y BIOLOGIA MOLECULAR.  
FACULTAD DE MEDICINA. UNIVERSIDAD DE SEVILLA.

**“CARACTERIZACIÓN Y FARMACOLOGIA DEL SISTEMA RECEPTOR-  
EFECTOR PARA EL PEPTIDO INTESTINAL VASOACTIVO (VIP) EN  
MACROFAGOS PERITONEALES DE RATON”.**

por

**Manuel Montilla de la Torre**

Tesis presentada para optar al  
grado de Doctor.  
Sevilla, 2000.

DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA MEDICA  
Y BIOLOGIA MOLECULAR.  
FACULTAD DE MEDICINA. UNIVERSIDAD DE SEVILLA.

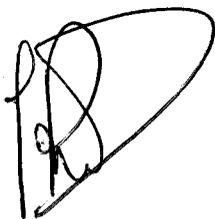
**“CARACTERIZACION Y FARMACOLOGIA DEL SISTEMA RECEPTOR-  
EFECTOR PARA EL PEPTIDO INTESTINAL VASOACTIVO (VIP) EN  
MACROFAGOS PERITONEALES DE RATON ”.**

**Autor:**



Manuel Montilla de la Torre

**Director:**



Juan Ramón Calvo Gutiérrez

Trabajo presentado para optar al grado de

Doctor.

Sevilla, 2000.



DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA MEDICA Y  
BIOLOGIA MOLECULAR  
AVDA. SANCHEZ PIZJUAN, 4  
41009 - SEVILLA

D. JUAN RAMON CALVO GUTIERREZ, Profesor Titular del Departamento de Bioquímica Médica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla,

CERTIFICA:

Que el trabajo titulado “ Caracterización y farmacología del sistema receptor-efector para el péptido intestinal vasoactivo (VIP) en macrófagos peritoneales de ratón”, ha sido realizado en este Departamento por D. Manuel Montilla de la Torre, bajo la dirección del Dr. D. Juan Ramón Calvo Gutiérrez y cumple con todos los requisitos necesarios para su presentación como Tesis Doctoral.

Sevilla, Junio de 2000

Fdo: Prof. Dr. J.R. Calvo Gutiérrez.



DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA MEDICA Y  
BIOLOGIA MOLECULAR

AVDA. SANCHEZ PIZJUAN, 4  
41009 - SEVILLA

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

CERTIFICA:

Que el trabajo titulado “ Caracterización y farmacología del sistema receptor-efector para el péptido intestinal vasoactivo (VIP) en macrófagos peritoneales de ratón”, ha sido realizado en este Departamento por D. Manuel Montilla de la Torre, bajo la dirección del Dr. D. Juan Ramón Calvo Gutiérrez y cumple con todos los requisitos necesarios para su presentación como Tesis Doctoral.

Sevilla, Junio de 2000

*C. Osuna*

Fdo: Prof. Dra. Carmen Osuna Fernández

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

Expression of VIP receptors in mouse peritoneal macrophages: Functional and molecular characterization.

J.R. Calvo, M.L. Montilla, J.M. Guerrero, J.J. Segura.

Journal of Neuroimmunology, 1994, 50: 85-93.

Characterization of VIP receptor-effector system antagonists in rat and mouse peritoneal macrophages.

D. Pozo, M.L. Montilla, J.M. Guerrero, J.R. Calvo.

European Journal Pharmacology, 1997, 321: 379-386.

## **AGRADECIMIENTOS**

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

Al Dr. J.R. Calvo, por la amistad que me ha brindado y por su constante apoyo y orientación en la realización de este trabajo.

Al Dr. J.M. Guerrero por su apoyo y colaboración en este trabajo.

A los Dres. D. Pozo y J.J. Segura, por la ayuda prestada en el inicio de estas investigaciones.

Al resto de Doctores y compañeros del Departamento, por la amistad y el estímulo que me han brindado a lo largo de estos años.

A Manuela, Araceli y David.

**INDICE.**

<b><u>INTRODUCCION</u></b>	1
<b>1. PÉPTIDO INTESTINAL VASOACTIVO.</b>	4
1.1. ESTRUCTURA QUÍMICA.	4
1.1.1. Estructura de la proteína y del gen del VIP.	4
1.1.2. Péptidos relacionados con el VIP.	7
1.2. DISTRIBUCIÓN Y ACCIONES BIOLÓGICAS.	10
1.2.1. Localización general del VIP.	10
1.2.2. Biosíntesis y degradación del VIP.	14
1.2.3. Acciones biológicas del VIP.	16
1.2.4. Fisiopatología del VIP.	22
1.3. MECANISMO DE ACCIÓN.	23
1.3.1. Receptores para VIP.	23
1.3.1.1. EL receptor VPAC <sub>1</sub> .	25
1.3.1.2. El receptor VPAC <sub>2</sub> .	27
1.3.2. Proteína reguladora fijadora de nucleótidos de guanina (proteína G).	28
1.3.3. Activación de la adenilato ciclasa.	31
1.3.4. Proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA).	33
1.3.5. Regulación del sistema receptor-efector del VIP.	35
1.3.5.1. Regulación homóloga del sistema receptor-efector para VIP.	35
1.3.5.2. Regulación heteróloga del sistema receptor-efector para VIP.	36
1.3.5.3. Otros factores que regulan el sistema receptor-efector para VIP.	36
1.4. VIP y SISTEMA INMUNE.	37
1.4.1. Relación entre los sistemas neuroendocrino e inmune.	37
1.4.1.1. Mediadores inmunes en el sistema neuroendocrino.	40
1.4.1.2. Hormonas y neuropéptidos en el sistema inmune.	42
1.4.2. Localización del VIP en el sistema inmune.	48
1.4.3. Receptores para VIP en células del sistema inmune.	50
1.4.4. Efectos del VIP sobre las células del sistema inmune.	53
1.4.4.1. Efectos del VIP en células fagocíticas.	55
1.4.4.2. Efectos del VIP en linfocitos.	56
1.4.4.3. Efectos del VIP en células citotóxicas.	58
1.4.5. Perfil farmacológico del VIP en células del sistema inmune.	58

<b>2. EL MACRÓFAGO.</b>	60
2.1. MORFOLOGÍA Y CARACTERÍSTICAS HISTOQUÍMICAS.	62
2.2. CINÉTICA CELULAR.	64
2.3. PROTEÍNAS DE MEMBRANA.	67
2.4. PRODUCTOS DE SECRECIÓN.	75
2.5. BIOQUÍMICA Y FUNCIÓN DEL MACRÓFAGO.	82
2.5.1. Bioquímica del macrófago.	82
2.5.2. Funciones del macrófago.	83
2.6. ESTADOS DE DIFERENCIACIÓN Y ACTIVACIÓN DEL MACRÓFAGO.	85
 <b><u>OBJETIVOS.</u></b>	 89
 <b><u>MATERIAL Y MÉTODO</u></b>	 90
<b>1. MATERIALES.</b>	91
1.1. REACTIVOS.	91
1.2. APARATOS.	91
1.3. ANIMALES.	92
<b>2. MÉTODOS.</b>	92
2.1. OBTENCIÓN DE MACRÓFAGOS PERITONEALES DE RATÓN.	92
2.1.1. Reactivos.	92
2.1.2. Método.	93
2.2. ESTUDIO DE VIABILIDAD CELULAR Y CONTAJE.	93
2.2.1. Reactivos.	93
2.2.2. Método.	94
2.3. IDENTIFICACIÓN CELULAR Y RECUENTO DIFERENCIAL.	94
2.3.1. Reactivos.	94
2.3.2. Método	95
2.4. OBTENCIÓN DE MEMBRANAS DE MACRÓFAGOS.	96
2.4.1. Reactivos.	96
2.4.2. Método.	97
2.5. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS.	97
2.6. UNIÓN DEL <sup>125</sup> I-VIP A SUS RECEPTORES ESPECÍFICOS.	97

2.6.1. Marcaje del VIP con $^{125}\text{I}$ .	97
2.6.1.1. Reactivos.	98
2.6.1.2. Método.	98
2.6.1.3. Purificación del VIP marcado.	99
2.6.1.4. Cálculo de porcentaje de incorporación.	99
2.6.1.5. Cálculo de actividad específica.	100
2.6.2. Unión del $^{125}\text{I}$ -VIP a sus receptores en macrófagos peritoneales de ratón.	100
2.6.2.1. Reactivos.	100
2.6.2.2. Método general: dosis-efecto.	101
2.6.2.3. Cinética de asociación.	102
2.6.2.4. Concentración celular.	102
2.6.2.5. Degradación de $^{125}\text{I}$ -VIP.	102
2.6.2.6. Cinética de disociación.	103
2.6.2.7. Saturación.	104
2.6.2.8. Especificidad.	104
2.6.2.9. Degradación del receptor.	104
2.7. PRODUCCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE AMPc.	105
2.7.1. Efecto del VIP sobre la producción de AMPc por los macrófagos peritoneales de ratón.	105
2.7.1.1. Reactivos.	105
2.7.1.2. Método general: dosis-efecto.	105
2.7.1.3. Efecto del tiempo y de la temperatura.	106
2.7.1.4. Efecto de la concentración celular.	106
2.7.1.5. Efecto del IBMX.	106
2.7.1.6. Especificidad.	107
2.7.2. Producción de AMPc en macrófagos peritoneales de ratón: efecto de los antagonistas del VIP ( $[4\text{-Cl-D-Phe}^6, \text{Leu}^{17}]\text{VIP}$ y $[\text{Ac-Tyr}^1, \text{D-Phe}^2]\text{GRF}_{1-29}\text{-NH}_2$ ) y de diferentes agentes farmacológicos.	107
2.7.2.1. Reactivos.	107
2.7.2.2. Método.	107
2.7.3. Determinación cuantitativa de AMPc.	108
2.7.3.1. Reactivos.	108
2.7.3.2. Método.	109

2.8. DETERMINACIÓN DE LA MASA MOLECULAR RELATIVA DEL RECEPTOR DEL VIP MEDIANTE LA TÉCNICA DE CROSS-LINKING.	110
2.8.1. Cross-Linking del $^{125}\text{I}$ -VIP a las membranas de macrófagos peritoneales de ratón.	110
2.8.1.1. Reactivos.	110
2.8.1.2. Método.	110
2.8.2. SDS-PAGE y autoradiografía.	111
2.8.2.1. Reactivos.	111
2.8.2.2. Método.	111
2.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	112
<b><u>RESULTADOS</u></b>	113
<b>1. UNIÓN DEL <math>^{125}\text{I}</math>-VIP A SUS RECEPTORES EN MACRÓFAGOS PERITONEALES DE RATÓN.</b>	114
1.1. EFECTO DEL TIEMPO Y DE LA TEMPERATURA.	114
1.2. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN CELULAR.	114
1.3. EFECTO DE LA PREINCUBACIÓN DE LAS CÉLULAS Y DEL pH DEL MEDIO DE INCUBACIÓN.	118
1.4. CINÉTICA DE DISOCIACIÓN.	118
1.5. ESTUDIO ESTEQUIOMÉTRICO: DOSIS-EFECTO DE VIP.	121
1.6. ESPECIFICIDAD.	125
1.7. EFECTO DE LOS ANTAGONISTAS DEL VIP ( [4-CI-D-Phe <sup>6</sup> , Leu <sup>17</sup> ] VIP Y [Ac-Tyr <sup>1</sup> ,D-Phe <sup>2</sup> ] GRF <sub>1-29</sub> -NH <sub>2</sub> ) SOBRE LA UNIÓN ESPECÍFICA DEL VIP A LOS MACRÓFAGOS PERITONEALES DE RATÓN.	125
<b>2. EFECTO DEL VIP SOBRE LA PRODUCCIÓN DE AMPc EN MACRÓFAGOS PERITONEALES DE RATÓN.</b>	130
2.1. EFECTO DE CONCENTRACIONES CRECIENTES DE VIP SOBRE LA PRODUCCIÓN DE AMPc EN MACRÓFAGOS PERITONEALES DE RATÓN.	130

2.2. EFECTO DE DIFERENTES PÉPTIDOS SOBRE LA PRODUCCIÓN DE AMPc EN MACRÓFAGOS PERITONEALES DE RATÓN: ESPECIFICIDAD.	130
2.3. EFECTO DE LOS ANTAGONISTAS DEL VIP [4-Cl-D-Phe <sup>6</sup> ,Leu <sup>17</sup> ] VIP Y [Ac-Tyr <sup>1</sup> ,D-Phe <sup>2</sup> ] GRF <sub>1-29</sub> -NH <sub>2</sub> SOBRE LA PRODUCCIÓN DE AMPc EN MACRÓFAGOS PERITONEALES DE RATÓN.	133
2.4. EFECTO DE LOS ANTAGONISTAS DEL VIP [4-Cl-D-Phe <sup>6</sup> ,Leu <sup>17</sup> ] VIP Y [Ac-Tyr <sup>1</sup> ,D-Phe <sup>2</sup> ] GRF <sub>1-29</sub> -NH <sub>2</sub> SOBRE LA PRODUCCIÓN DE AMPc ESTIMULADA POR EL VIP EN MACRÓFAGOS PERITONEALES DE RATÓN.	133
2.5. EFECTO DE DIFERENTES AGENTES FARMACOLÓGICOS SOBRE EL EFECTO INHIBITORIO DE LOS ANTAGONISTAS DEL VIP [4-Cl-D-Phe <sup>6</sup> ,Leu <sup>17</sup> ] VIP Y [Ac-Tyr <sup>1</sup> ,D-Phe <sup>2</sup> ] GRF <sub>1-29</sub> -NH <sub>2</sub> SOBRE LA PRODUCCIÓN DE AMPc ESTIMULADA POR EL VIP EN MACRÓFAGOS PERITONEALES DE RATÓN.	138
<b>3. DETERMINACIÓN DE LA MASA MOLECULAR RELATIVA DEL RECEPTOR DE VIP MEDIANTE LA TÉCNICA DE CROSS-LINKING EN MACRÓFAGOS PERITONEALES DE RATÓN Y EFECTO DE LOS ANTAGONISTAS [4-Cl-D-Phe<sup>6</sup>,Leu<sup>17</sup>]VIP Y [Ac-Tyr<sup>1</sup>,D-Phe<sup>2</sup>]GRF<sub>1-29</sub>-NH<sub>2</sub>.</b>	140
3.1. DETERMINACIÓN DE LA MASA MOLECULAR DEL RECEPTOR DE VIP.	140
3.2. EFECTO DE LOS ANTAGONISTAS DEL VIP ([4-Cl-D-Phe <sup>6</sup> ,Leu <sup>17</sup> ] VIP Y [Ac-Tyr <sup>1</sup> ,D-Phe <sup>2</sup> ] GRF <sub>1-29</sub> -NH <sub>2</sub> ) EN LOS ESTUDIOS DE CROSS-LINKING DE <sup>125</sup> I-VIP A MEMBRANAS DE MACRÓFAGOS PERITONEALES DE RATÓN.	140
<b><u>DISCUSIÓN</u></b>	143
1. INTERACCIÓN DEL VIP CON MACRÓFAGOS PERITONEALES DE RATÓN.	144
2. EFECTO DEL VIP SOBRE LA PRODUCCIÓN DE AMPc EN MACRÓFAGOS PERITONEALES DE RATÓN.	154
3. INTERACCIÓN DE LOS ANTAGONISTAS DEL VIP [4-Cl-D-Phe <sup>6</sup> ,Leu <sup>17</sup> ]VIP	

Y [Ac-Tyr <sup>1</sup> , D-Phe <sup>2</sup> ]GRF <sub>1-29</sub> -NH <sub>2</sub> CON MACRÓFAGOS PERITONEALES DE RATÓN.	159
<b><u>CONCLUSIONES</u></b>	162
<b><u>BIBLIOGRAFÍA</u></b>	165

**ABREVIATURAS**

<b>Ac</b>	Anticuerpo
<b>AC</b>	Adenilato ciclasa
<b>ACTH</b>	Hormona corticotropa
<b>ADNc</b>	Acido desoxirribonucleico complementario
<b>ADP</b>	Difosfato de adenosina
<b>AMPc</b>	Monofosfato de adenosina ciclico
<b>APC</b>	Célula presentadora de antígeno
<b>ARNm</b>	Acido ribonucleico mensajero
<b>ATP</b>	Trifosfato de adenosina
<b>BSA</b>	Albúmina sérica bovina
<b>°C</b>	Grado Celsius
<b>CCK</b>	Colecistoquinina
<b>CFU-G/M</b>	Unidad formadora de colonias de granulocito/monocito
<b>CFU-S</b>	Célula madre hematopoyética pluripotencial
<b>CGRP</b>	Péptido relacionado con el gen de la calcitonina
<b>Ci</b>	Curio
<b>CMH</b>	Complejo mayor de histocompatibilidad
<b>Con-A</b>	Concavalina
<b>Cpm</b>	Cuentas por minuto
<b>CRH</b>	Hormona liberadora de coticotropina
<b>CSF</b>	Factor estimulante de colonias
<b>DTSP</b>	Succinimidil propionato
<b>ED<sub>50</sub></b>	Dosis efectiva semimáxima
<b>EDTA</b>	Etilen-diamino-tetraacetato sódico
<b>et al.</b>	y colaboradores
<b>Fig.</b>	Figura
<b>FSH</b>	Hormona estimuladora del folículo
<b>GABA</b>	Acido gamma amino butírico
<b>G-CSF</b>	Factor estimulador de colonias de granulocitos
<b>GDP</b>	Guanosina 5'-difosfato
<b>GH</b>	Hormona del crecimiento

<b>GHRH</b>	Hormona liberadora de la hormona del crecimiento
<b>Gi</b>	Proteína G inhibidora
<b>GIP</b>	Péptido inhibidor gástrico
<b>GM-CSF</b>	Factor estimulador de colonia de granulocitos/macrófagos
<b>GMPc</b>	Monofosfato de guanosina cíclico
<b>GnRH</b>	Hormona liberadora de gonadotropina
<b>Gpp(NH)p</b>	5'-guanililimidodifosfato
<b>GRFh</b>	Factor liberador de hormona del crecimiento humano
<b>GRFr</b>	Factor liberador de hormona del crecimiento de rata
<b>GRP</b>	Péptido liberador de gastrina
<b>Gs</b>	Proteína G estimuladora
<b>GTP</b>	Guanosina 5'-trifosfato
<b>HEPES</b>	N-(2-hidroxi-etil)piperazina-N'-(ácido 2-hidroxi-propanosulfónico)
<b>HETEs</b>	Ácido hidroxi-eicosatetraenoico
<b>HLA</b>	Antígeno de leucocitos humanos
<b>IBMX</b>	3-isobutil-1-metilxantina
<b>IC<sub>50</sub></b>	Concentración inhibitoria semimáxima
<b>ICAM</b>	Molécula intracelular de adhesión
<b>IFN-</b>	Interferon-
<b>Ig-</b>	Inmunoglobulina-
<b>IL-</b>	Interleucina
<b>KDa</b>	KiloDalton
<b>K<sub>d</sub></b>	Constante de disociación
<b>K<sub>i</sub></b>	Constante de inhibición
<b>LFA</b>	Antígeno funcional de linfocitos
<b>LH</b>	Hormona luteinizante
<b>LHRH</b>	Hormona liberadora de hormona luteinizante
<b>Log</b>	Logaritmo
<b>LPS</b>	Lipopolisacárido bacteriano
<b>M</b>	Molar
<b>MAF</b>	Factor activador del macrófago
<b>M-CSF</b>	Factor estimulador de colonias de monocitos y macrófagos
<b>MDP</b>	Muramil dipéptido

<b>MIF</b>	Factor inhibidor de la migración
<b>Min</b>	Minuto
<b>Mr</b>	Masa molecular relativa
<b>NADPH</b>	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida y adenina
<b>NK</b>	Células asesinas naturales
<b>NO</b>	Oxido nítrico
<b>NOS</b>	Sintasa del óxido nítrico
<b>NPY</b>	Neuropéptido Y
<b>p</b>	Peso
<b>PACAP</b>	Polipéptido activador de la adenilato ciclasa pituitaria
<b>PBL</b>	Linfocitos de sangre periférica
<b>PGE</b>	Prostaglandina E
<b>PHA</b>	Fitohemaglutinina
<b>PHI</b>	Péptido histidina isoleucina
<b>PHM</b>	Péptido histidina metionina
<b>PKA</b>	Proteína quinasa dependiente de AMPc
<b>PKC</b>	Proteína quinasa C
<b>PLC</b>	Fosfolipasa C
<b>PMN</b>	Neutrófilo polimorfonuclear
<b>PMSF</b>	Fenilmetilsulfonilfluoruro
<b>POMC</b>	Propiomelanocortina
<b>PTH</b>	Hormona paratiroidea
<b>RIA</b>	Radioinmunoanálisis
<b>RT-PCR</b>	Transcripción inversa-reacción en cadena de la polimerasa
<b>s</b>	Segundo
<b>SDS</b>	Dodecil sodio sulfato
<b>SEM</b>	Error estándar de la media
<b>SP</b>	Sustancia P
<b>TB</b>	Tampón Tris 50 mM, BSA 2% (p/v), pH 7'5
<b>TBB</b>	Tampón Tris, BSA 2% (p/v), bacitracina 2 mg/ml, pH 7'5
<b>TCR</b>	Receptor de células T
<b>TDM</b>	Trehalosa dimicolato
<b>TGF</b>	Factor de crecimiento transformante

<b>TLCK</b>	N $\alpha$ -p-tosil-L-lisina clorometilcetona
<b>TNF</b>	Factor de necrosis tumoral
<b>Tris</b>	Trihidroximetilaminometano
<b>TSH</b>	Hormona estimulante del tiroides
<b>v</b>	Volumen
<b>VCAM</b>	Molécula de adhesión celular vascular
<b>VIH</b>	Virus de la inmunodeficiencia humana
<b>VIP</b>	Péptido intestinal vasoactivo

**INTRODUCCION.**

La primera evidencia de la existencia del péptido intestinal vasoactivo (VIP) se remonta a 1967, fecha en la que SAMI SAID, descubre en extractos acuosos de pulmón actividad vasoactiva, vasodilatadora e hipotensiva (SAID y MUTT, 1969). SAID trata de aislar la sustancia vasoactiva y utiliza para ello extractos intestinales que habían evidenciado igualmente actividad vasodilatadora (SAID y MUTT, 1970).

Estos hechos dieron lugar al aislamiento y purificación del VIP a partir del intestino delgado del cerdo (SAID y MUTT, 1972), lo que supuso el inicio de una extensa investigación para comprender y explicar el papel fisiológico jugado por el VIP. Se detectó inmunoreactividad para VIP en varias regiones del aparato digestivo, pensando entonces, que pudiera ser una hormona gastrointestinal y/o un péptido de acción local o paracrina (POLAK, 1974). Posteriormente, el descubrimiento de VIP en determinadas zonas del sistema nervioso central (SNC) como los cuerpos, axones y dendritas neuronales (GIACHETTI et al., 1977), su hallazgo en terminaciones presinápticas (JOHANSSON y LUNDERG, 1981) y su abundancia en córtex cerebral, amígdala, núcleo estriado, núcleo supraquiasmático, ganglios simpáticos nervio vago, nervio ciático y en otras localizaciones del sistema nervioso central y periférico (LARSSON et al., 1976; HOKFELT et al., 1982) hicieron que comenzara a verse el VIP como un neuropéptido con funciones neuromoduladoras o neurotransmisoras (GOYAL et al., 1980; ROSSELIN et al., 1982); punto de vista que fue confirmado por la caracterización de receptores para VIP en numerosas zonas del SNC (ROBBERECHT et al., 1978; STAUN-OLSEN et al., 1982).

Pronto se descubrieron también receptores para VIP en diversas células del sistema inmune. Se hallaron receptores en células mononucleares sanguíneas humanas (GUERRERO et al., 1981; OTTAWAY et al., 1983; DANEK et al., 1983), en monocitos humanos (WIJK et al., 1985), en células linfoides humanas y de rata (CALVO et al., 1986 a y 1986b) y en diferentes líneas celulares de estirpe linfoblástica (BEED et al., 1983; ROBBERECHT et al., 1988b). Observándose, que el VIP influye en la fisiología de los linfocitos T (OTTAWAY, 1984), en la síntesis de inmunoglobulinas (STANISZ et al., 1986) o en la función de las células NK (ROLA-PLESZCZYNSKI et al., 1985). A partir de aquí, el VIP empieza a ser considerado como un péptido modulador de la función inmune dentro de un eje neuroinmunoendocrino (FANTINI et al., 1985).

De igual modo que se avanza en el esclarecimiento del papel fisiológico del VIP, se profundiza en el estudio del macrófago y su función en la respuesta inmune. Se verifica, que es preciso que el macrófago procese previamente a los antígenos para después presentarlos a los linfocitos (TREVES et al., 1976), y de igual modo se observa que los macrófagos,

secretan unas sustancias que modulan la respuesta inmune y que se denominan monocinas. Al mismo tiempo se caracterizan en monocitos circulantes y en células presursoras de los macrófagos tisulares, receptores para diferentes neuropéptidos y hormonas: insulina y glucagón (BLECHER y GOLDSTEIN,1977), parathormona (PERRY et al., 1984), neurotensina y sustancia P (BAR-SHAVIT y GOLDMAN, 1986), receptores que pueden intervenir en la regulación de determinadas funciones del macrófago.

Teniendo en cuenta el papel modulador del VIP en el eje neuroinmunoendocrino (TSENG y O'DORISIO, 1989), así como la función que ejerce el macrófago en el inicio y desarrollo de la respuesta inmune, y una vez conocida la existencia de receptores para VIP en macrófagos peritoneales de rata (SEGURA et al., 1991), planteamos la hipótesis de que el macrófago de ratón también expresara receptores específicos para el VIP, a través de los cuales, dicho péptido pudiera modular alguna de sus funciones.

## 1. EL PÉPTIDO INTESTINAL VASOACTIVO.

### 1.1. ESTRUCTURA QUÍMICA.

Estructuralmente, el VIP es un péptido de naturaleza básica constituido por 28 aminoácidos que forman una única cadena de peso molecular 3.326 dalton, con una histidina en el extremo N-terminal, fundamental en su función, y una asparagina amidada en el extremo C-terminal. Fue aislado en 1970 por SAID y MUTT a partir de intestino delgado porcino, siendo secuenciado por sus propios descubridores en 1974.

#### 1.1.1. Estructura de la proteína y del gen del VIP.

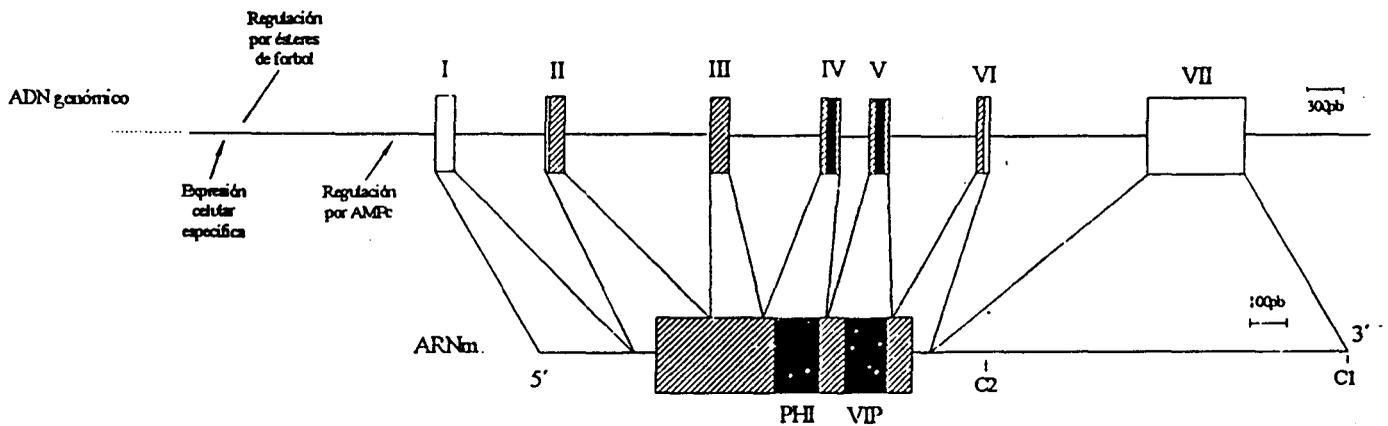
Cuando se sintetizó el péptido (BODANSZKY et al., 1974), se observó que ninguna secuencia parcial del mismo, muestra la potencia y eficacia exhibida por el péptido completo (COUVINEAU et al., 1984). Los fragmentos VIP<sub>1-6</sub>, VIP<sub>18-28</sub>, VIP<sub>15-28</sub>, VIP<sub>14-28</sub> y VIP<sub>7-28</sub>, mostraban siempre menor potencia que el octacosapéptido completo, incrementándose ésta al aumentar el número de aminoácidos. Se ha observado por estudios de estructura-función, que algunos de los aminoácidos de la secuencia son muy importantes en la unión del péptido a sus receptores y la posterior respuesta biológica. Así, por ejemplo, la eliminación de la His N-terminal de la molécula VIP<sub>2-28</sub>, disminuye la afinidad del VIP por su receptor unas 100 veces, aunque aún mantiene la capacidad de estimular la actividad adenilato ciclasa (COUVINEAU et al., 1984; BESSON, 1988), comportándose como un agonista completo en humanos y parcial en rata. Fragmentos menores de VIP se unen a los receptores con una actividad muy baja (COUVINEAU et al., 1984) llegando a comportarse en algunos tejidos como antagonistas (VIP<sub>10-28</sub> en intestino de cobaya) (GRIDER y RIVIER., 1990). Análogos del VIP modificados en el extremo N-terminal, muestran menor afinidad por los receptores que el VIP nativo, observándose de igual modo, una menor estimulación de la adenilato ciclasa. También, se ha observado la importancia de seis de los residuos aminoacídicos, Asp<sup>3</sup>, Phe<sup>6</sup>, Thr<sup>7</sup>, Tyr<sup>10</sup>, Tyr<sup>22</sup> y Leu<sup>23</sup>, para la actividad biológica del péptido (O'DONNELL et al., 1991). Estos resultados ponen de manifiesto que la conformación que adopta el neuropéptido es responsable de la alta afinidad del mismo hacia su receptor, y determinante de su actividad biológica.

El análisis de la secuencia de ADN complementario (ADNc) del precursor del VIP revela que el ARNm del péptido también codifica para PHM en humanos y PHI en ratas

(NISHIZAWA et al., 1985). Este gen se encuentra localizado en el cromosoma 6 humano (GOZES et al., 1987a, 1987b) y su estructura primaria fue determinada por TSUKADA et al. en 1985. Tiene 8837 pares de bases, y está constituido por 7 exones, de los cuales el 1 y el 7 codifican regiones de RNAm que no serán traducidas, el exón 2 codifica el péptido señal, el exón 3 codifica el extremo N-terminal de la proteína precursora, el exón 4 codifica el PHM/PHI, el exón 5 codifica para el VIP y el exón 6 codifica para el extremo N-terminal del precursor (Fig. 1). Su expresión parece regulada por señales neuronales y endocrinas (TSUKADA et al., 1987) llevándose a cabo principalmente en células de origen nervioso. El gen del VIP de humanos, rata y ratón es casi idéntico en organización (LAMPERTI et al., 1991). Como era de esperar, los exones 4 y 5, que codifican para los propios neuropéptidos, son las regiones más conservadas del gen, con un máximo de homología del 87% en el exón del VIP, en cambio los exones de las secuencias que no traducen, muestran una extraordinaria divergencia.

El descubrimiento de que las secuencias del VIP y PHM/PHI se encuentran en el mismo gen y el mismo ARNm, hacía suponer que ambos péptidos coexistían en el mismo tejido. Sin embargo, no siempre se encuentra VIP y PHI en la misma célula, pudiendo existir, por ejemplo, neuronas que contienen específicamente VIP y no PHI o viceversa (HOKFELT et al., 1982), aunque en otras ocasiones, si se ha encontrado secreción de ambos péptidos, como es el caso de los tumores pancreáticos tipo VIPoma (BLOOM et al., 1983), o de los neuroblastomas (ITOH et al., 1983). Estos hechos hacen pensar, en la existencia de un procesamiento alternativo del precursor del ARN nuclear (FAHRENKRUG et al., 1985; GOZES et al., 1989a). Estudios de hibridación *in situ* (CARD et al., 1988; GOZES et al., 1989b; BALDINO et al., 1989) han demostrado que todas las células del cerebro que sintetizan ARNm para VIP, también contienen ARNm para PHI/PHM. Por lo que la posible regulación diferencial de estos dos péptidos podría producirse a nivel de procesamiento proteico.

Otros péptidos de la familia del VIP son codificados por genes que muestran una arquitectura similar, como es el caso del gen del glucagón (BELL et al., 1983), el gen del GHRH (MAYO et al., 1985) y el gen del PACAP (KIMURA et al., 1990). Esta similitud sugiere que los genes de la familia del VIP provienen de un gen ancestral común a partir del cual han evolucionado. No obstante, los aspectos diferenciales más importantes que se observan en todos los péptidos de la familia, pueden haber sido el resultado de un complicado patrón de evolución que combina duplicación de exones, acoplada a duplicación génica (BELL, 1986).



**Fig. 1.- Organización y transcripción del gen del VIP de roedores.** Los números romanos (I-VII) representan los exones, donde las zonas rayadas indican porciones de los exones que codifican para el polipéptido precursor, y las áreas en negro corresponden a las secuencias que codifican para PHI y VIP. C1 y C2 representan los posibles sitios de corte y poliadenilación que producen los dos mensajeros (1000pb y 1700pb) observados por hibridación "Northern".

Para comprender la regulación de las actividades del VIP, es preciso el esclarecimiento de los mecanismos que controlan y gobiernan su producción. Un primer mecanismo en la regulación de la expresión del gen del VIP se produce a nivel de la estructura génica, ya que el gen del VIP puede sufrir una reorganización del ADN, que puede alterar su expresión y su actividad biológica. Un punto de regulación adicional son los mecanismos de control a nivel transcripcional. Desde este nivel se han descrito factores que modulan a nivel génico la producción de VIP: el AMPc y los ésteres de forbol (activadores de la proteína quinasa C y de los niveles de calcio). Se ha estudiado como el AMPc induce un incremento sustancial en la inmunoreactividad para el VIP en células de neuroblastoma humano, que es regulado a nivel transcripcional (HAYAKAWA et al., 1984). La transcripción de ARNm de prepro-VIP/PHM en núcleos aislados se observó solamente en células inducidas con AMPc. Estos datos sugieren un efecto del AMPc en la transcripción génica del VIP (HAYAKAWA et al., 1984).

También se ha observado que un incremento en la actividad de la proteína quinasa C (PKC) inducida por ésteres de forbol, puede inducir la síntesis de VIP en células cromafines de glándula adrenal (PRUSS et al., 1985), siendo este efecto específico para el VIP.

Por último, se ha comprobado que existe una implicación del calcio en la regulación de la producción de VIP (WASCHEK y EIDEN, 1988).

En presencia de AMPc y ésteres de forbol, se produce un aumento de los niveles de ARNm VIP/PHM varias veces superior al que se produce con cada uno de los factores por separado. Por lo que se deduce que existe un efecto sinérgico en la estimulación de la expresión génica del VIP/PHM por parte de AMPc y ésteres de forbol a través de dos mecanismos independientes. Estos hechos hacen pensar, que una gran variedad de factores que activan proteínas quinasa dependientes de AMPc, o PKC pueden afectar la transcripción génica del VIP.

### **1.1.2. Péptidos relacionados con el VIP.**

Comparando la estructura química del VIP con la de otros neuropéptidos y hormonas gastrointestinales, se observan importantes analogías. Su secuencia aminoacídica posee una alta homología estructural con la de los neuropéptidos que se agrupan dentro de una misma familia, y entre los que se encuentran la secretina (27 aminoácidos, 9 en común), el glucagón (29 aminoácidos, 6 en común), el péptido inhibidor gástrico o GIP (43 aminoácidos, 4 en común), el péptido con histidina N-terminal e isoleucina amida C-terminal o PHI (27

aminoácidos, 13 en común) aislado del cerdo por TATEMOTO y MUTT en 1981, y su homólogo humano el péptido con histidina N-terminal y metionina amida C-terminal o PHM (27 aminoácidos, 12 en común), aislado por ITOH et al en 1983, el factor liberador de hormona de crecimiento en rata, GRFr (43 aminoácidos, 12 en común), o en humano, GRFh (44 aminoácidos, 9 en común), la helodermina (35 aminoácidos, 15 en común), aislada a partir del veneno del *Heloderma suspectum* (HOSHINO et al., 1984) y el polipéptido activador de la adenilato ciclasa pituitaria o PACAP (38 aminoácidos, 19 en común). También poseen analogías estructurales con el VIP la  $\alpha_1$ -timosina, aislada a partir de extractos tímicos (GOLDSTEIN et al., 1977), la helospectina, y a la urotensina I (Fig. 2).

La homología estructural de los péptidos de la familia del VIP, no está restringida a una única región, como ocurre con los péptidos de otras familias estructurales (gastrina-CCK, bombesina, etc.), sino que se extiende a lo largo de toda la molécula. Se ha comprobado por estudios de estructura/actividad que el extremo N-terminal de estos péptidos juega un papel fundamental en su actividad biológica, siendo esta zona de la molécula donde se producen las mayores homologías. Sin embargo, las sustituciones en el extremo C-terminal afectan en menor medida a su actividad biológica, aunque es necesario para que interactúen con los receptores de alta afinidad.

Péptido	Secuencia de aminoácidos	% homología Con VIP
VIP	His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln Met Ala Val Lys Lys Thy Leu Asn Ser Ile Leu Asn-NH <sub>2</sub>	100
PACAP 38	<b>His Ser Asp</b> Gly Ile <b>Phe Thr Asp Ser Tyr Ser Arg Tyr Arg Lys</b> <b>Gln Met Ala Val Lys Lys Thy Leu</b> Ala Ala Val Leu Gly Lys Arg Tyr Lys Gln Arg Val Lys Asn Lys-NH <sub>2</sub>	68
PACAP 27	<b>His Ser Asp</b> Gly Ile <b>Phe Thr Asp Ser Tyr Ser Arg Tyr Arg Lys</b> <b>Gln Met Ala Val Lys Lys Thy Leu</b> Ala Ala Val Leu-NH <sub>2</sub>	68
PHI	<b>His</b> Ala Asp Gly <b>Val Phe Thr</b> Ser Asp Phe Ser <b>Arg Leu Leu</b> Gly <b>Gln</b> Leu Ser Ala <b>Lys Lys Tyr Leu</b> Glu <b>Ser</b> Leu Ile-NH <sub>2</sub>	48
PHM	<b>His</b> Ala Asp Gly <b>Val Phe Tyr</b> Ser Asp Phe Ser Lys <b>Leu Leu</b> Gly <b>Gln</b> Leu Ser Ala <b>Lys Lys Tyr Leu</b> Glu <b>Ser</b> Leu Met-NH <sub>2</sub>	44
Helodermina	<b>His Ser Asp Ala Ile Phe Thr</b> Glu Glu <b>Tyr Ser Lys Leu Leu Ala</b> Lys Leu <b>Ala Leu Gln Lys Tyr Leu Ala Ser Ile Leu</b> Gly Ser Arg Arg Ser Pro Pro Pro Ser-NH <sub>2</sub>	43
Helospectina	<b>His Ser Asp Ala Thr Phe Thr</b> Ala Glu <b>Tyr Ser Lys Leu Leu Ala</b> Lys Leu <b>Ala Leu Gln Lys Tyr Leu</b> Glu <b>Ser Ile Leu</b> Gly Ser Ser Ser Ser Pro Arg Pro Ser Ser-NH <sub>2</sub>	40
Secretina	<b>His Ser Asp</b> Gly Thr <b>Phe Thr</b> Ser Glu Leu Ser <b>Arg Leu Arg</b> Asp Ser Ala Arg Leu Gln Arg Leu <b>Leu</b> Gln Gly Leu Val-NH <sub>2</sub>	33
GHRH	Tyr Ala <b>Asp Ala Ile Phe Thr</b> Asn Ser <b>Tyr Arg Lys Val Leu Gly</b> <b>Gln</b> Leu Ser Ala Arg <b>Lys Leu Leu</b> Gln Asp Ile Met Ser Arg Gln Gln Gly Glu Arg Asn Gln Glu Gln Gly Ala Arg Val Arg Leu	20
Glucagón	<b>His Ser</b> Gln Gly Thr <b>Phe Thr</b> Ser Asp <b>Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp</b> Ser Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met <b>Asn Thr</b> NH <sub>2</sub>	17
GIP	Tyr Ala Glu Gly Thr <b>Phe</b> Ile Ser Asp <b>Tyr Ser Ile Ala Met Asp Lys</b> Ile Arg Gln Gln Asp Phe Val <b>Asn</b> Trp Leu <b>Leu</b> Ala Gln Lys Lys Lys Lys Ser Asp Trp Lys His Asn Ile Thr Gln-NH <sub>2</sub>	10

Fig. 2.- Secuencia de aminoácidos del VIP y de los miembros más importantes de la denominada "familia del VIP". Los aminoácidos idénticos a los del VIP aparecen en negrita. Se expresa el porcentaje de homología que existe con respecto a la secuencia del VIP.

## 1.2. DISTRIBUCIÓN Y ACCIONES BIOLÓGICAS.

Después del aislamiento del VIP a partir de duodeno de cerdo, se ha encontrado VIP inmunorreactivo en casi todo el organismo, con un amplio espectro de acciones biológicas. Así, en la actualidad existen numerosos argumentos para considerarlo como un neuropéptido con funciones neurotransmisoras y neuromoduladoras (SAID, 1986).

### 1.2.1. Localización general del VIP.

En los primeros estudios se describieron fibras nerviosas inmunorreactivas para VIP a todo lo largo del tracto gastrointestinal (Tabla I), sobre todo a nivel de las zonas de esfínteres, capa muscular del colon, páncreas, ganglios parasimpáticos, observándose terminaciones VIPérgicas a nivel de todas las capas de la pared intestinal y especialmente alrededor de los vasos sanguíneos. Las fibras nerviosas extrínsecas parecen no intervenir en la secreción de VIP, ya que su eliminación no produce cambios en su concentración y secreción.

También se han descrito terminaciones nerviosas VIPérgicas en otros aparatos de nuestra economía (Tabla II). En el aparato genitourinario, están muy relacionados con los vasos sanguíneos y la musculatura lisa de los conductos y dependen de los ganglios locales situados en la adventicia (ALM et al., 1977). En el aparato respiratorio, se encuentran en la proximidad de los acinis de glándulas seromucosas, vasos sanguíneos y musculatura de la pared traqueobronquial. En la piel y anejos, las terminaciones inmunorreactivas para VIP se localizan, alrededor de las glándulas sudoríparas ecrinas (EEDY et al., 1990). También se ha encontrado inmunoreactividad para VIP, en placenta, en médula adrenal y en el sistema cardiovascular (GOZES y BRENNEMAN, 1989). En diferentes modelos animales, se ha realizado un estudio sistemático de casi todo el sistema nervioso (Tabla III). Apareciendo el VIP con máxima concentración en el córtex desde donde parten proyecciones hacia todo el sistema nervioso central. También se detecta altas concentraciones de VIP en hipotálamo (núcleo supraquiasmático), amígdala, hipocampo, núcleo estriado, núcleo accumbens, bulbo olfatorio, así como en torno a los plexos coroideos y a nivel del sistema hipotálamo-hipofisario (SAID y PORTER, 1979), dato a favor de un papel del VIP en la secreción hormonal hipofisaria. En el individuo sano se ha observado que existe VIP circulante en plasma, probablemente debido a un fenómeno de rebosamiento a nivel de las terminaciones nerviosas, aunque en determinadas situaciones fisiológicas como el ayuno o el ejercicio, los niveles plasmáticos de VIP pueden incrementarse.

**TABLA I**

**Localización de terminaciones nerviosas inmunorreactivas para el VIP en el tracto gastrointestinal.**

<b>Localización</b>	<b>Autores</b>	<b>Año</b>
Músculo liso gástrico	LARSSON et al.	1976
Intestino delgado	LARSSON et al.	1976
Vesícula biliar	SUNDLER et al.	1977
Esfínter esofágico inferior	RATTAN et al.	1977
Páncreas	LARSSON et al.	1978
Pared esofágica	UDDMAN et al.	1978b
Plexos mientérico y submucoso	ALUMET et al.	1979
Glándula parótida	WHARTON et al.	1979
Intestino grueso	SUNDLER et al.	1979
Glándulas salivares	UDDMAN et al.	1980b
Glándula submandibular	LUNDBERG et al.	1980

**TABLA II**

**Localización de terminaciones nerviosas inmunorreactivas para VIP en aparato genito-urinario, aparato respiratorio, piel y anejos.**

Localización	Autores	Año
Vías urinarias	SUNDLER et al.	1977
Corteza renal	BARAJAS et al.	1983
Vesículas seminales	VAALASTI et al.	1980
Próstata	VAALASTI et al.	1980
Tejido eréctil del pene	POLAK et al.	1981
Estroma testicular	HAKANSON et al.	1982
Vasos deferentes	STJERNQUIST et al.	1983
Cérvix uterino	LARSSON et al.	1977
Trompas de Falopio	ALM et al.	1980
Miometrio	OTTESEN et al.	1981
Ovario	AHMED et al.	1986
Vías aéreas	UDDMAN et al.	1978a
Parénquima pulmonar	SAID	1982
Glándulas sudoríporas	WEIHE et al.	1981
Folículo piloso	HARTSCHUH et al.	1984
Glándulas sebáceas	HARTSCHUH et al.	1984
Piel axilar	WALLENGREN et al.	1987

**TABLA III**

**Localización de terminaciones nerviosas inmunorreactivas para VIP en Sistema Nervioso.**

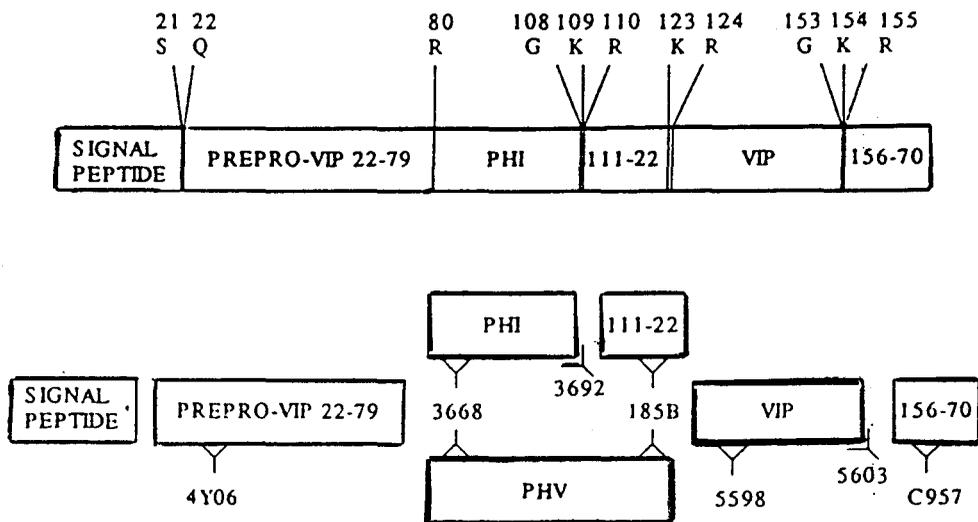
Localización	Autores	Año
Córtex cerebral	SAID y ROSENBERG	1976
Nervio vago	SAID y ROSENBERG	1976
Neurohipófisis	VAN NOORDEN	1979
Hipotálamo	SAMSON et al.	1979
Núcleo amigdalino	BESSON et al.	1979
Nervio ciático	GIACHETTI y SAID	1979
Retina	LOREN et al.	1980
Glándula pineal	UDDMAN et al.	1980a
Ganglio celíaco	KONDO y YUI	1982
Médula espinal (asta posterior y Ganglio raíces dorsales)	ANAND et al.	1983
Terminales nerviosas de fibras preganglionares en ganglios simpáticos	DALSGAARD et al.	1983
Hipotálamo (N. Paraventricular)	MEZEY et al.	1985
Hipófisis anterior	ARNOUT et al.	1986
Núcleo central de la amígdala	BAEK et al.	1988
Neurohipófisis	GAJKOWSKA y VIRON	1991

El VIP es cosintetizado con el PHI/PHM y por ello son generalmente liberados juntos; además coexiste con acetilcolina, así como con otros neurotransmisores entre los que se encuentran la noradrenalina, NPY, CCK, péptidos opiáceos y ácido  $\gamma$ -amino butírico. Recientemente se ha puesto de manifiesto la localización del VIP con la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) en aparato digestivo y urogenital (FURNESS et al., 1992; JÜNEMANN et al., 1993; SMET et al., 1994), participando ambos neuromoduladores en la regulación de la relajación del músculo liso. También se ha detectado inmunorreactividad para VIP en órganos del sistema inmune central y periférico, generalmente asociado a NPY, sustancia P o CGRP (FELTEN y FELTEN, 1991). Por último, se ha descrito que el hígado y el músculo esquelético son órganos en los que no existe producción de VIP.

### 1.2.2. Biosíntesis y degradación del VIP.

Los péptidos con actividad biológica se sintetizan mayoritariamente como precursores proteicos de mayor peso molecular, posteriormente son transformados por un procesamiento proteolítico postraducciona l en diferentes péptidos biológicamente activos y en las respectivas secuencias de separación (ANDREWS et al., 1989). En este sentido, el ARNm que codifica para el VIP de humanos y de roedores traduce un precursor proteico de 170 aminoácidos (prepro-VIP) (Fig. 3), que contiene un péptido señal (prepro-VIP<sub>1-21</sub>) que desaparece en el proceso de biosíntesis, y cinco dominios funcionales: el péptido del extremo N-terminal (prepro-VIP<sub>22-79</sub>), el péptido histidina isoleucina (PHI) o el péptido histidina metionina (PHM), un péptido de enlace (prepro-VIP<sub>111-122</sub>), el VIP, y el péptido del extremo C-terminal (prepro-VIP<sub>156-170</sub>) (ITOTH et al., 1983; NISHIZAWA et al., 1985). Aunque VIP y PHM/PHI coexisten en el mismo precursor, la relación de expresión de los péptidos derivados del prepro-VIP no siempre es equimolar, lo que hace pensar en la presencia de diferentes rutas durante el procesamiento postraducciona l, transporte y secreción de los péptidos, así como que el procesamiento del prepro VIP puede ser específico de tejido, como ya ha sido sugerido en diversos estudios de intestino y cerebro (FAHRENKRUG y EMSON, 1989). De esta forma, las concentraciones de los péptidos derivados del prepro-VIP encontradas en los diferentes tejidos, pueden dar una valiosa información sobre su importancia fisiológica.

El VIP circulante tiene una vida media corta (tres minutos) y es rápidamente degradado en el hígado (MISBIN et al., 1982; KABEMURA et al., 1992) y también en menor medida en el riñón, cerebro y pulmón (HVIDSTEN et al., 1989). El VIP es degradado enzimáticamente



**Fig. 3.-** Representación esquemática de la estructura del precursor del VIP de rata, con los sitios de corte proteolítico y los productos procesados. Se representan los sitios de reconocimiento de los distintos productos procesados por parte de varios anticuerpos

por peptidasas asociadas a la superficie de las células dianas (NAU et al., 1987; KOBAYASI et al., 1994) o secretadas por otros tipos celulares (CAUGHEY et al., 1988; FRANCONI et al., 1989). Se han descrito endopeptidasas neutras y del tipo de la tripsina específicas para VIP en células linfoides humanas tanto de la línea T como de la B (GOETZL et al., 1989). También se ha evidenciado estudiando los receptores del VIP con radioligandos, que se produce una degradación parcial del péptido en incubaciones con linfocitos (FINCH et al., 1989). Además, se ha descrito, la existencia de autoanticuerpos naturales que hidrolizan selectivamente al VIP (PAUL et al., 1991)

### 1.2.3. Acciones biológicas del VIP.

La extensa distribución del VIP en diferentes órganos, tanto en humanos como en animales, se correlaciona con el amplio abanico de efectos fisiológicos que muestra este neuropéptido. Los factores que catalogan al VIP como un péptido regulador son su presencia en estructuras claves, como vasos sanguíneos, musculatura lisa y glándulas exocrinas y endocrinas, el gran número de sitios de unión y su coexistencia con otros neurotransmisores.

La primera acción biológica descrita que dio nombre al péptido, fue su efecto relajante a nivel de la musculatura lisa de los vasos de la circulación mesentérica con la consiguiente vasodilatación e incremento del flujo sanguíneo (SAID y MUTT, 1970). Este mismo efecto ha sido descrito a nivel de la arteria pulmonar (HAMASAKI et al., 1983), a nivel de la mucosa nasal (MALM et al., 1980), en el flujo vascular cerebral (LARSEN et al., 1981) y a nivel de las arterias coronarias (SMITHERMAN et al., 1982). También se ha observado, que el VIP produce la relajación del músculo liso en otras localizaciones, como en bronquios (FRANDSEN et al., 1978), esófago (RATTAN et al., 1977) e intestino (SAID et al., 1974).

El otro efecto biológico característico del VIP es la estimulación de la secreción de agua, iones y macromoléculas, acción que ejerce principalmente a nivel del epitelio intestinal (RACUSEN y BINDER 1977; DAVIS et al., 1981; AINSWORTH et al., 1993), en glándulas lacrimales y salivares (DARTT et al., 1984; EKSTRÖM y TOBIN, 1990), a nivel renal (ROSA et al., 1985; EDWARDS, 1988) y en vesícula biliar (NYBERG et al., 1992). Se han descrito también efectos metabólicos del VIP en algunos órganos, así se ha podido observar estimulación de la glucogenolisis en la corteza cerebral (MAGISTRETTI et al., 1990) y en el hígado (WOOD y BLUM, 1982; SAITO et al., 1992), y acción lipolítica en el tejido adiposo (FRANDSEN y MOODAY, 1973). Otros autores han demostrado que la inyección intravenosa de VIP produce hiperglucemia en el perro (KERINS y SAID, 1973) y en el

hombre (DOMSCHKE et al., 1978) y tiene un efecto glucogenolítico en la rata (SANCHEZ et al., 1991). Estos hechos, junto con el aumento de los niveles plasmáticos del VIP durante el ayuno y el ejercicio, han hecho pensar en su posible papel como movilizador energético (SANCHEZ et al., 1991).

Además de todas las acciones biológicas ya mencionadas, se ha comprobado que el VIP produce otras muchas a nivel de los aparatos digestivo (Tabla IV), respiratorio, cardiovascular y genitourinario (Tabla V), sistema neuroendocrino (Tabla VI) y sistema inmune (Tabla VII).

En la actualidad existe un gran interés por el efecto que ha demostrado el VIP en la proliferación celular. Los efectos observados dependen de varios factores, tales como el tipo de célula, la concentración de neuropéptido y las condiciones experimentales utilizadas. El mayor número de estudios del efecto del VIP sobre la proliferación celular se han llevado a cabo utilizando líneas tumorales de muy distinto origen, donde se ha observado que su comportamiento depende: del tipo de receptores que expresen en su superficie, del sistema de transducción de señal al que esté acoplado el receptor y de la capacidad de la célula para producir el propio neuropéptido como factor autocrino. Así por ejemplo, el VIP produce una inhibición de la proliferación celular en clones de cáncer de pulmón humano de células pequeñas (MARUNO y SAID, 1993), y en clones de carcinoma gástrico y de colon humanos (HOOSEIN et al., 1989; KIM et al., 1991), mediante un aumento de los niveles de AMPc. Por otro lado, se ha descrito que el VIP estimula la proliferación celular en otras líneas de células tumorales como en el cáncer de pulmón humano de células pequeñas (BEPLER et al., 1988; MOODY et al., 1993), en el adenocarcinoma de pulmón humano y en células de Lewis de cáncer de pulmón de ratón (SCHOLAR y PAUL, 1991), entre otros.

Diferentes evidencias sugieren que el VIP podría actuar como modulador de la diferenciación y supervivencia neuronal durante el desarrollo del sistema nervioso. Así, se ha encontrado inmunoreactividad para VIP en cultivos de médula espinal (BRENNEMAN y FOSTER, 1987) y anticuerpos contra VIP producen una muerte celular durante el desarrollo, lo que sugiere la importancia de este péptido en la supervivencia neuronal (BRENNEMAN y EIDEN, 1986). Han sido descritas otras acciones biológicas del VIP sobre el desarrollo neuronal, de las cuales podríamos destacar las siguientes: previene la muerte neuronal provocada por la proteína gp 120 de la envuelta del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH); estimula la proliferación de la astrogliá y la liberación de sustancias neurotróficas (BRENNEMAN et al., 1992); y estimula la mitosis, el crecimiento de neuritas, la diferenciación y la supervivencia de neuroblastos y de células de neuroblastoma en cultivo a través de la elevación de los niveles intracelulares de AMPc (PINCUS et al., 1990a, 1990b).

**TABLA IV****Acciones biológicas del VIP en aparato digestivo.**

<b>Acción biológica</b>	<b>Autor</b>	<b>Año</b>
Estimulación secreción intestinal	BARBEZAT y GROSS	1971
Estimula secreción exocrina pancreática	SAID y MUT	1972
Relajación de la musculatura lisa intestinal	SAID y MAKHLOUF	1974
Inhibición de la secreción ácida gástrica	SCHORR et al.	1974
Relajación musculatura lisa gástrica	KONTUREK et al.	1975
Inhibición de la absorción intestinal	MAKHLOUF y SAID	1975
Estimulación de la secreción biliar.	KONTUREK et al.	1975
Relajación esfínter esofágico inferior	RATTAN et al.	1977
Relajación de la vesícula biliar	RYAN y COHEN	1977
Regulación del flujo sanguíneo intestinal	FAHRENKRUG	1979
Inhibición de la liberación de gastrina	CHIBA et al.	1980
Estímulo de la secreción de pepsinógeno.	DUPONT et al.	1980a
Intercambio agua y electrolitos mucosa instestino	DUPONT et al.	1980b
Estimulación de la secreción salivar.	LUNDBERG et al.	1981
Inhibición del reflejo peristáltico en colon	GRIDER et al	1986
Estímulo de la secreción ácida gástrica	HERNANDEZ et al.	1987
Descenso del consumo glucosa por el enterocito	VIDAL et al.	1988

**TABLA V****Acciones biológicas del VIP en aparato cardiovascular, respiratorio y genitourinario.**

<b>Acciones biológicas</b>	<b>Autor</b>	<b>Año</b>
Efecto inotrópico y cronotrópico positivo	SAID et al.	1972
Vasodilatador coronario y sistémico	ROBBERECHT et al.	1985
Incrementa la ventilación pulmonar	SAID y MUTT	1970
Broncodilatación	SAID y MUTT	1977
Relajación de los anillos traqueobronquiales	FRANDSEN et al.	1978
Estimula la secreción bronquial	SAID	1986
Estimula la secreción mucosa	SHIMURA et al.	1988
Disminución de la filtración glomerular	DIMALINE et al.	1983
Relajación muscular vías urinarias	KLARSKOV et al.	1984
Aumento de la secreción renal de Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> y Cl <sup>-</sup>	ROSA et al.	1985
Regulación de la secreción de protones	EDWARDS	1988
Aumenta la liberación de renina	POTER y GANONG	1988
Relajación del miometrio	OTTESEN et al.	1980
Estimula la esteroidogénesis en ovario	DAVOREN et al.	1985
Maduración folicular	CARLSSON et al.	1987
Relajación de la arteria uterina	MORRIS y MURPHY	1989
Vasoconstricción de los vasos deferentes	KASTIN et al.	1978
Estimula la secreción en la vesícula seminal	STJERNQUIST et al.	1983
Erección del pene	WILLIS et al.	1981
Estímula la síntesis de andrógenos en testículo	KASSON et al.	1986

**TABLA VI****Acciones biológicas del VIP a nivel del sistema neuroendocrino.**

<b>Acción biológica</b>	<b>Autor</b>	<b>Año</b>
Acción hipertérmica	CLARK et al.	1978
Inhibe la secreción hipotalámica de somatostatina	EPELBAUM et al.	1979
Estimula la secreción de prolactina	VIJAYAN et al.	1979
Estimula la secreción de LH	VIJAYAN et al.	1979
Estimula la secreción de GH	VIJAYAN et al.	1979
Estimula la liberación de GnRH	SAMSON et al.	1981
Estimula la secreción de ACTH	OLIVA et al.	1982
Acción hipnogénica	RIOU et al.	1982
Estimula secreción de serotonina en N. Supraquias.	HERY et al.	1984
Acción antidipsogénica	ITOH et al.	1985
Acción analgésica	KOMISARUK et al.	1988
Estimula liberación de oxitocina	BARDRUM et al.	1988
Modificación del sistema GABAérgico	DUVILANSKI et al.	1990
Estimula síntesis y liberación de melatonina	SIMONNEAU et al.	1990
Factor trófico y mitógeno neuronal	PINCUS et al.	1990
Estimula la secreción de insulina	SHEBALIN et al.	1977
Estimula la secreción de glucagón	SHEBALIN et al.	1977
Estimula la secreción pancreática de somatostatina	IPP et al.	1978
Estimula la secreción de hormonas tiroideas	AHREN et al.	1980
Estimula la secreción de corticosteroides	WESTENDORF et al.	1983
Estimula la secreción de renina	PORTER et al.	1983
Estimula la secreción de catecolaminas	MISBAHUDDIN et al.	1988
Estimula la liberación de PTH	JOBORN et al.	1991

**TABLA VII****Acciones biológicas del VIP en el sistema inmune.**

Acción biológica	Autor	Año
Inhibe la migración de linfocitos T <sub>4</sub> in vivo	MOORE	1984
Inhibe la citotoxicidad de las células NK	ROLA-PLESZCYNKY	1985
Estimula la liberación de histamina en mastocitos	PIOTROWSKY et al.	1985
Inhibe la síntesis de ADN en linfocitos	STANISZ et al.	1986
Inhibe la producción de IgA e IgM	STANISZ et al.	1986
Inhibe la producción de IL-2	OTTAWAY	1987
Inhibe el tráfico de linfocitos	MOORE et al.	1988
Inhibe el estallido respiratorio en monocitos	WIIK	1989a
Inhibe la producción de IFN- $\gamma$	MUSCETTOLA et al.	1990
Inhibe la secreción IFN $\alpha$ y $\beta$ en células HT29	CHELBI-ALIX et al.	1990
Aumento de IL-6 en adenohipófisis	SPANGELO et al.	1990
Estimula la producción de IL-5	WEINSTOCK	1991
Estimula la producción de IL-6 en astrocitos	MAIMONE et al.	1993
Inhibe la adherencia en macrófagos peritoneales	SEGURA et al.	1993
Estimula la fagocitosis en macrófagos peritoneales	DE LA FUENTE et al.	1993
Estimula la motilidad en macrófagos peritoneales	DE LA FUENTE et al.	1994
Inductor de la quimiotaxis y adherencia en linfo. T	JOHNSTON et al.	1994
Inhibe producción de IL-2 e IL-4 en timocitos	XIN et al.	1994
Inhibe producción de IL-10 en linfo. T murinos	MARTÍNEZ et al.	1996
Inhibe apoptosis inducida por gluco. en timocitos	DELGADO et al.	1996d
Estimula producción de IL-6 en macrófagos perit.	DELGADO et al.	1997
Inhibe producción de IL-6 estimulada por LPS en macrófagos peritoneales	MARTÍNEZ et al.	1997

Por último, se ha visto que el tratamiento de neonatos con un antagonista del VIP provoca un retraso en la aparición de comportamientos motores complejos (HILL et al., 1991), por lo que parece evidente la importancia que tiene la regulación de la síntesis del VIP no sólo para mantener la actividad del cerebro, sino también para obtener la homeostasis y la supervivencia celular.

#### 1.2.4. Fisiopatología del VIP.

El péptido intestinal vasoactivo se ha visto implicado en determinados procesos patológicos entre los que podemos destacar: 1) Síndrome de Verner-Morrison o cólera pancreático, que se caracteriza por la asociación de diarrea acuosa, hipocaliemia y aclorhidria con niveles elevados de VIP circulante producidos por determinados tumores endocrinos (VIPomas), localizados preferentemente en los islotes pancreáticos (VERNER y MORRISON, 1958; BLOOM et al., 1973); 2) en la enfermedad de Hirschsprung y en la achalasia esofágica, se ha encontrado una disminución de las concentraciones tisulares de VIP y una deficiencia de las terminaciones nerviosas VIPérgicas en los segmentos agangliónicos (TSUTO et al., 1982; AGGESTRUP et al., 1983); 3) se ha descrito una deficiente innervación VIPérgica de las glándulas sudoríparas (HEINZ-ERIAN et al., 1985), así como autoanticuerpos frente al VIP en la fibrosis quística (PAUL et al., 1985); 4) los niveles de VIP en LCR están disminuidos en la depresión atípica, demencia multiinfarto y tras el infarto cerebral reciente (SAID, 1986); 5) en pacientes asmáticos, se ha observado alteración de la innervación VIPérgica en aparato respiratorio (OLLERENSHAW et al., 1989) y presencia de autoanticuerpos frente al VIP (PAUL et al., 1989); 6) en pacientes con enfermedad de Crohn, se ha encontrado un incremento importante de la innervación VIPérgica en las regiones del aparato digestivo afectadas por la enfermedad, hecho que no ocurre en la colitis ulcerosa (POLAK y BLOOM, 1983); 7) se ha querido implicar al VIP como posible agente regulador de la unión del VIH a sus células diana en el SNC, sobre todo desde que se observó la gran homología existente entre las secuencias del VIP y el péptido T (parte de la proteína de la cubierta del VIH) y que además, determinados fragmentos del VIP (VIP<sub>1-12</sub>) pueden ser ligandos del receptor del VIH en los linfocitos CD4 (SACERDOTE et al., 1987).

### 1.3. MECANISMO DE ACCIÓN.

El VIP ejerce sus acciones biológicas a través de vías similares a las utilizadas por otros neuropéptidos y hormonas de naturaleza peptídica. Así, una vez liberado, el VIP interacciona con receptores específicos situados en la membrana plasmática de la célula diana en donde, a través de proteínas transductoras (proteínas  $G_s$ ), el complejo VIP-receptor activa a la adenilato ciclasa, incrementando los niveles de un segundo mensajero intracelular, el AMPc, el cual activa a una proteína quinasa que será la responsable última de los efectos producidos por el péptido (LABURTHE, 1985; SAID, 1986; CALVO et al., 1989).

#### 1.3.1. Receptores para VIP.

Las acciones biológicas del VIP dependen de la interacción del péptido con receptores específicos situados en la membrana plasmática de las células dianas. Los receptores han sido caracterizados en numerosos tejidos y especies utilizando como trazador VIP marcado radiactivamente con  $^{125}\text{I}$  (Tabla VIII). Generalmente, se describen dos poblaciones de receptores (LUIS et al., 1988): una de alta afinidad y baja capacidad de unión ( $K_d = 0.2-1 \text{ nM}$ ; 5.000-60.000 sitios/célula), y otra de baja afinidad y alta capacidad de unión ( $K_d = 10-80 \text{ nM}$ ;  $10^5-10^6$  sitios/célula). No obstante, en algunos sistemas sólo se ha descrito una población de receptores (O'DORISIO et al., 1988; AMENTA et al., 1989), siendo en estos casos la afinidad y la capacidad de unión similares a la de los receptores de alta afinidad. En la actualidad, estos sitios de unión de VIP han sido denominados como receptor  $\text{VPAC}_1$ . Por otra parte, en membranas de hígado de rata se ha descrito un receptor con alta afinidad para el VIP al que se unía de manera específica el péptido helodermina (ROBBERECHT et al., 1984), el cual, mediante estudios moleculares, se ha demostrado que se trata de otro receptor distinto, al que se le ha denominado receptor  $\text{VPAC}_2$ .

Mediante el empleo de técnicas autorradiográficas, se ha comprobado que los receptores que unen VIP con alta afinidad presentes en pulmón, cerebro, hígado e intestino presentan diferente sensibilidad a los guanilnucleósidos, de tal forma que los  $\text{VPAC}_1$  son sensibles a GTP, y los  $\text{VPAC}_2$  no son sensibles a GTP (HILL et al., 1994; HARMAR y LUZT, 1994).

El receptor para VIP es el de más baja especificidad entre los receptores para péptidos de la familia "VIP- secretina -glucagón" (LUIS et al., 1988), ya que es capaz de unir a todos ellos salvo al GIP y al glucagón.

**TABLA VIII****Receptores para el VIP en diversos tejidos y líneas celulares.**

Tipo celular	N	K <sub>d</sub> ↑	K <sub>d</sub> ↓	Sitios/cél ↑	sitios/cél ↓	Autor	Año
Páncreas cobaya	2	0'74	82	8900	135000	CHRISTOPHE	1976
Enterocito de rata	2	1'60	74	140000	1100000	PRIETO	1979
Ves. biliar humana	2	1'30	16	62000	510000	DUPONT	1981
Cáncer pulmón h.	2	0'34	61	27600	1062000	LABURTHE	1981
Cáncer cérvix h.	2	2'40	100	150000	4900000	PRIETO	1981
Útero porcino	2	0'40	10	-----	-----	OTTESEN	1982
Córtex de ratón	2	2'90	76	-----	-----	STAUN-OLSEN	1982
Parótida de rata	2	6'40	150	41000	420000	INOUE	1985
Aorta de rata	2	8'00	40	60000	140000	HIRATA	1985
Tiroides bovino	2	13'00	480	-----	-----	MOLINERO	1985
Cáncer pulmón h.	2	0'80	66	-----	-----	SHAFFER	1987
A. Mesentérica rata	2	0'22	14	-----	-----	HUANG	1987
GH <sub>4</sub> C <sub>1</sub> de rata	2	2'20	180	9033	331210	BJORO	1987
Córtex de rata	1	5'50	---	-----	-----	O'DORISIO	1988
Cél. Leydig de rata	2	1'70	43	-----	-----	HUESO	1989
Melanoma IGR39	2	0'66	5	540000	13000000	LUIS	1989
V. seminal de rata	2	0'54	44	-----	-----	GUIJARRO	1991

K<sub>d</sub>: constante de disociación (nM); N: poblaciones de receptores; ↑: alta afinidad; ↓: baja afinidad.

### 1.3.1.1. El receptor VPAC<sub>1</sub>.

Los primeros resultados sobre la estructura molecular del receptor de VIP, fueron obtenidos utilizando la técnica de formación de puentes covalentes (cross-linking) entre el péptido radiomarcado y su receptor por medio de un reactivo (cross-linker), con posterior solubilización en SDS (dodecil sulfato sódico), electroforesis de las proteínas en gel de poliacrilamida y autoradiografía.

El peso molecular de las proteínas que unen VIP varía con la especie, tipo celular o preparaciones empleadas, oscilando entre 46 KDa en cerebro de rata (COUVINEAU et al., 1986 a) y 73 KDa en intestino de rata (LABURTHE et al., 1984). Esta heterogeneidad molecular es debida al diferente grado de glicosilación de la proteína (LUIS et al., 1988; FABRE et al., 1993), aunque no puede descartarse ni la posibilidad de proteólisis del receptor, ni la existencia de receptores estructuralmente distintos (ROBBERECHT et al., 1990).

Mediante estudios de unión con radioligandos y técnicas autorradiográficas, se ha descrito numerosos órganos donde se localiza el VPAC<sub>1</sub> (Tabla IX). Además, por medio del análisis por RT-PCR e hibridación "in situ", se ha determinado la distribución tisular del ARNm del VPAC<sub>1</sub>, encontrándose principalmente en pulmón, intestino delgado y grueso, hígado, determinadas áreas del SNC y en numerosas líneas celulares humanas, de rata y ratón.

La determinación de la estructura primaria del receptor es fundamental para entender las bases moleculares de su función. Dado que se trata de grandes proteínas, no se puede obtener su secuencia de aminoácidos por técnicas de secuenciación convencionales y sólo ha sido posible determinarla mediante la utilización de técnicas de biología molecular, clonando y secuenciando el ADNc y deduciendo a partir de éste la secuencia de aminoácidos. De este modo, se ha demostrado que el VPAC<sub>1</sub> pertenece a la familia de receptores acoplados a proteínas G, que se caracterizan por estar constituidos por una única cadena polipeptídica que posee siete segmentos transmembrana de 20-25 aminoácidos de longitud conectados por 3 bucles extracelulares y 3 bucles intracelulares que se alternan, un dominio extracelular (extremo N-terminal) y un dominio intracelular (extremo C-terminal). Los miembros de esta familia de receptores poseen un alto grado de homología en su secuencia primaria y atendiendo al grado de similitud se clasifican en subfamilias de receptores (STRADER et al., 1994). El receptor para VIP es una glicoproteína de membrana, habiéndose comprobado que una de las causas que condiciona su heterogeneidad reside en la parte glucídica (FABRE et al., 1993).

**TABLA IX****Distribución tisular de los receptores VPAC<sub>1</sub>.**

<b>Tejido</b>	<b>Autores</b>	<b>Año</b>
Hígado	COUVINEAU y LABURTE SHIVERS et al.	1985 1991
Páncreas	BISSONETTE et al. RAUFMAN et al.	1984 1991
Intestino grueso y delgado	PRIETO et al. SADAYI et al.	1981 1988
Vasos sanguíneos	AMENTA et al.	1991
Pulmón	PAUL y SAID ROBBERECHT et al. SHIVERS et al.	1987 1988a 1991
Corteza adrenal y tiroides	MOLINERO et al. MAGISTRETTI et al.	1985 1988
Glándulas salivares	TÖRNWALL et al.	1994
Tracto digestivo	LABURTHE et al.	1994
Retina	NILSSON et al.	1994
SNC (corteza, hipocampo, Hipófisis, hipotálamo, bulbo Olfativo, médula espinal)	MAGISTRETTI et al. WANKE y ROSTAD HILL et al. ISHIHARA et al. USDIN et al.	1983 1990 1991 1992 1994

Mediante el análisis de la secuencia de los receptores clonados, se ha puesto de manifiesto que en el extremo N-terminal de todos ellos hay residuos muy conservados de Cys, lo que apoya la importancia de los puentes disulfuro en la funcionalidad del receptor de VIP (OTTAWAY, 1992c) y sitios potenciales de glicosilación, lo que avala su naturaleza glicoprotéica. Mediante el clonaje de los ADNc que codifican las secuencias de los receptores para VIP, podremos disponer de herramientas que nos ayuden a estudiar su distribución, regulación, estructura y funcionalidad. Así, en estudios de estructura-función llevados a cabo con el receptor humano de VIP, se ha observado que residuos muy conservados en el extremo N-terminal pueden ser esenciales para que se una el péptido (COUVINEAU et al., 1994). Por otra parte, es importante comentar que se han obtenido anticuerpos específicos contra el receptor del VIP (GOETZL et al., 1994).

La unión del VIP a su receptor transmite una señal al interior de la célula, que activa a la proteína efectora adenilato ciclasa a través de una proteína G ( $G_s$ ), lo que da lugar a un aumento en la concentración intracelular de AMPc, que actúa como segundo mensajero estimulando la actividad de la proteína quinasa A (PKA). Sin embargo, algunos subtipos de receptor estimulan también la producción de inosítoles fosfato y la movilización intracelular de calcio, mediante el acoplamiento del receptor con el enzima efectora fosfolipasa C (PLC) a través de proteínas G del tipo  $G_q$  (SREEDHARAN et al., 1994). También hay trabajos en los que se describe que el VIP puede activar a la proteína quinasa C (PKC), tal y como se ha visto en núcleos de esplenocitos de rata y en astrocitos corticales (ZORN y RUSSELL, 1990; OLAH et al., 1994).

Recientemente, se ha observado que en el músculo liso gastrointestinal el  $VPAC_1$  se encuentra acoplado mediante la proteína  $Gi_{1,2}$  a la óxido nítrico sintasa dependiente de calcio/calmodulina que se encuentra localizada en la membrana plasmática celular (MURTHY y MAKLOUF, 1994).

### 1.3.1.2. El receptor $VPAC_2$ .

Los estudios en la línea celular linfoblástica de origen inmune SUP-T1, describen un nuevo tipo de receptor para VIP que muestra una mayor afinidad por la helodermina que por el VIP (helodermin-preferring receptor) y que está acoplado al sistema efector de la adenilato ciclasa (ROBBERECHT et al., 1988b y 1989a).

El  $VPAC_2$  fue clonado y secuenciado por LUTZ et al. (1993) y se observó que pertenecía a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G. Está constituido por 437

aminoácidos y posee un 51% de identidad con el VPAC<sub>1</sub>. La baja homología existente entre este receptor y el VPAC<sub>1</sub>, así como la potencia relativa de los agonistas, sugiere que es diferente del receptor clásico del VIP (VPAC<sub>1</sub>).

Recientemente se ha identificado diversas moléculas con propiedades agonistas que son capaces de discriminar al VPAC<sub>1</sub> del VPAC<sub>2</sub>, lo que ayuda a la identificación de la presencia del VPAC<sub>2</sub> (VERTONGEN et al., 1997; GOURLET et al., 1997a; GOURLET et al., 1997b). De igual modo, ciertos antagonistas del VIP, como los análogos del VIP y del GRF, [4-Cl-D-Phe<sup>6</sup>,Leu<sup>17</sup>]VIP y [Ac-Tyr<sup>1</sup>,D-Phe<sup>2</sup>]GRF<sub>1-29</sub>-NH<sub>2</sub>, distinguen entre el VPAC<sub>1</sub> y el VPAC<sub>2</sub>, de tal forma que sólo son capaces de bloquear la unión del VIP al VPAC<sub>1</sub>, no teniendo ningún efecto en la unión del VIP al VPAC<sub>2</sub> (USDIN et al., 1994).

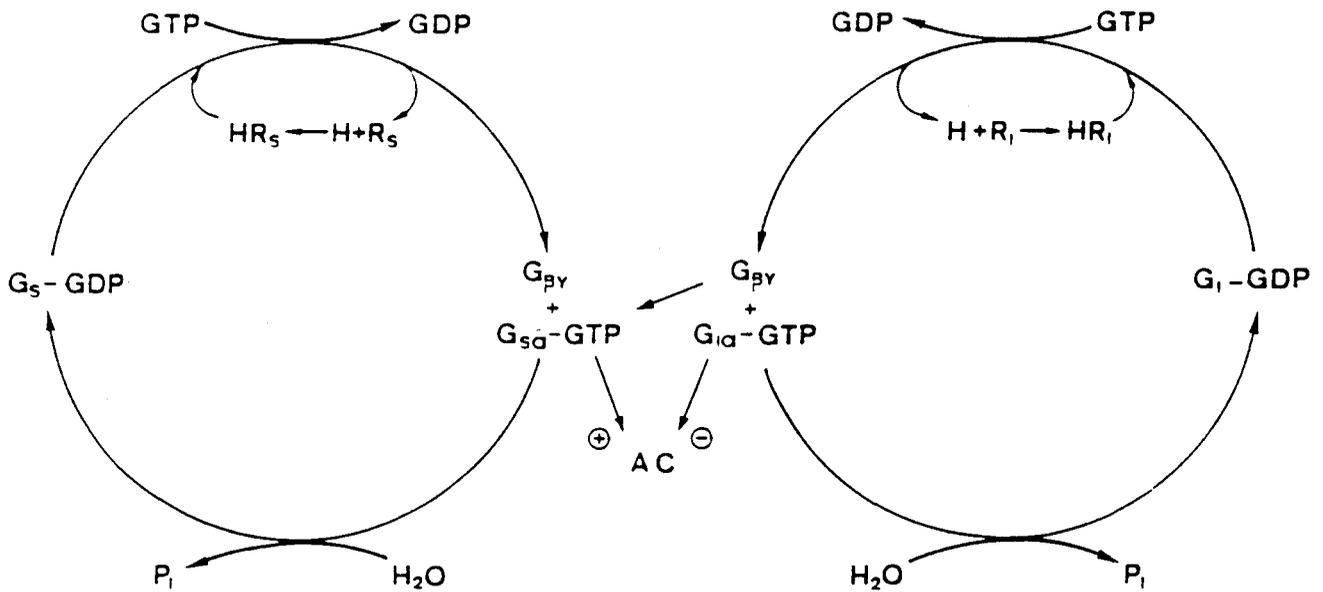
Se ha detectado expresión del VPAC<sub>2</sub> en el SNC, en áreas asociadas a una función neuroendocrina como tálamo, hipocampo, hipófisis anterior, bulbo olfatorio y núcleo supraquiasmático (LUTZ et al., 1993; USDIN et al., 1994). También se ha descrito este tipo de receptor en tejidos periféricos como estómago, intestino, pulmón, sistema cardiovascular, músculo esquelético, células parenquimatosas de testículo y ovario, bazo, islotes pancreáticos, corteza adrenal y timo (USDIN et al., 1994), casi siempre en células diferentes a las que expresan VPAC<sub>1</sub>.

En cuanto a los mecanismos de transducción de señal, mayoritariamente se observa que existe un acoplamiento del VPAC<sub>2</sub> al sistema de la adenilato ciclasa, aumentando los niveles intracelulares de AMPc (LUTZ et al., 1993; USDIN et al., 1994). Sin embargo, también se ha descrito que, además de inducir la acumulación de AMPc intracelular, el VPAC<sub>2</sub> está acoplado a un canal de cloro activado por calcio, lo que hace pensar en un posible acoplamiento al sistema de la fosfolipasa C (INAGAKI et al., 1994).

### **1.3.2. Proteína reguladora fijadora de nucleótidos de guanina (proteína G).**

La interacción del VIP con su receptor específico no estimula directamente la adenilato ciclasa, sino que el receptor activado estimula a una proteína reguladora (proteína G), la cual transmite la señal de excitación a la adenilato ciclasa. Este proceso de transducción de señal tiene lugar en la membrana plasmática (Fig.4).

Las proteínas G pertenecen a la superfamilia de las GTPasas fijadoras de nucleótidos de guanina (fundamentalmente GTP) (BOURNE et al., 1990), diferenciándose de los otros miembros de la superfamilia por su acción transductora en el acoplamiento receptor-efector,



**Fig. 4.- Mecanismo por el que las proteínas G estimulan ( $G_s$ ) o inhiben ( $G_i$ ) la actividad de la adenilato ciclasa (AC).** La interacción de un péptido u hormona (H) con su receptor ( $R_s$  o  $R_i$ ) cataliza el intercambio de GDP por GTP, liberándose los complejos activos  $G_{s\alpha}$ -GTP (estimulador) o  $G_{i\alpha}$ -GTP (inhibidor), iniciándose el ciclo. La hidrólisis del GTP por la actividad GTPásica intrínseca de la subunidad  $G_\alpha$  de la proteína G cierra el ciclo. Según la hipótesis de KATADA (1986), el complejo  $G_{\beta\gamma}$  proveniente de  $G_i$  también interviene en la inhibición de la adenilato ciclasa, al unirse a  $G_{s\alpha}$  y devolverla a su forma inactiva. Tomado de GILMAN, 1987).

por su estructura heterotrimérica (SPIEGEL., 1989), y porque están preferentemente asociadas a la membrana plasmática, aunque también han sido encontradas en el aparato de Golgi y en vesículas endocíticas. Existen dos tipos de proteínas G implicadas en el sistema generador de AMPc, una estimuladora, la proteína  $G_s$ , que es la que interviene en el caso del VIP, glucagón, TSH, PTH y agonistas  $\beta$ -adrenérgicos, y otra inhibidora, la proteína  $G_i$ , que interviene como transductora de la somatostatina, bombesina y de los agonistas  $D_2$ -dopaminérgicos (SPIEGEL, 1989). Tanto la  $G_s$  como la  $G_i$  son estructuralmente proteínas heterotriméricas y están constituidas por tres subunidades:

- a) Una subunidad  $\alpha$  de peso molecular entre 45-52 KDa, con una secuencia aminoacídica bastante conservada y que define los diferentes tipos de proteínas G. Fija los nucleótidos de guanina (unión dependiente de  $Mg^{2+}$ ) y posee actividad GTPasa intrínseca.
- b) Una subunidad  $\beta$  de peso molecular 35 KDa, de la que se han encontrado e identificado por clonación dos tipos distintos (GAWLER et al., 1987).
- c) Una subunidad  $\gamma$  con un peso molecular de 8 KDa y fuertemente asociada a la subunidad  $\beta$  (MILLIGAN, 1988), teniendo ambas propiedades reguladoras y de anclaje a la membrana.

Tanto la proteína  $G_s$  como la  $G_i$  pueden encontrarse en dos estados funcionales: activo e inactivo. En su estado inactivo, las proteínas G son trímeros  $G_{\alpha\beta\gamma}$  cuya subunidad  $G_\alpha$  está unida a una molécula de GDP dando el complejo  $\alpha$ -GDP. El estado activo se produce cuando la subunidad  $\alpha$ -GDP intercambia en presencia de  $Mg^{2+}$  la molécula de GDP por otra de GTP, dando lugar al complejo activo  $\alpha$ -GTP. El mecanismo de acción de las proteínas  $G_s$  es idéntico para todos sus agonistas. Así, en el caso del VIP, al interaccionar el agonista con su receptor específico, el complejo VIP-receptor da lugar a un cambio conformacional sobre la proteína  $G_s$  que hace que ésta pase de su estado inactivo al activo, intercambiando en presencia de  $Mg^{2+}$  una molécula de GDP por otra de GTP. Este cambio de nucleótido produce dos consecuencias: 1ª) la disociación del trímero en un dímero  $\beta\gamma$  y un complejo activo  $\alpha$ -GTP, que es el que activa a la adenilato ciclasa, y 2ª) la disminución de la afinidad del receptor por el VIP (SPIEGEL, 1989), lo cual hace que el incremento de la tasa de disociación del péptido en presencia de GTP proporcione una evidencia indirecta de la participación de una proteína G en su mecanismo efector (LABURTHE et al., 1984; COUVINEAU et al., 1986 a; CALVO et al., 1990). La actividad del complejo  $\alpha$ -GTP termina con la hidrólisis del GTP a GDP gracias a la actividad GTPásica intrínseca de la subunidad  $\alpha$ , siendo este un

mecanismo autoregulator del sistema (GILMAN, 1987). El complejo resultante  $\alpha$ -GDP se une de nuevo al dímero  $\beta\gamma$ , constituyéndose de nuevo el trímero inactivo.

En el caso de las proteínas  $G_i$ , la secuencia de acontecimientos es la misma, con la diferencia de que el complejo formado por la subunidad  $\alpha$  de la proteína  $G_i$  y el GTP ( $G_{i\alpha}$ -GTP) inhibe a la adenilato ciclasa. KATADA et al., 1986, proponen que el dímero  $\beta\gamma$  proveniente de  $G_i$ , posee un efecto inhibitorio sobre la actividad adenilato ciclasa al interactuar con la subunidad  $\alpha$  de la  $G_s$ , anulando de este modo su efecto.

Diversos estudios han observado que los substratos de ciertas toxinas bacterianas (colérica y pertúsica), interfieren en el papel de estas proteínas en la correcta transducción de la señal a través de la membrana plasmática al introducir un grupo ADP-ribosa en la subunidad  $\alpha$ . Así, la toxina colérica inhibe la actividad GTPásica intrínseca de la subunidad  $\alpha_s$ , lo que da lugar al mantenimiento de esta subunidad en su forma activa, con la consiguiente estimulación mantenida de la adenilato ciclasa incluso en ausencia de señal externa.

Hoy se sabe, gracias a diferentes trabajos (BOKOCH et al., 1984; HILDEBRANT et al., 1984; GILMAN, 1987), que las proteínas G se encargan del acoplamiento receptor-efector no sólo en el sistema de generación de AMPc, sino también en otros mecanismos efectores de acción hormonal, tales y como el sistema GMPc-fosfodiesterasa ( $G_t$ ), la apertura de canales de calcio ( $G_s$ ) y la estimulación de la fosfolipasa C ( $G_q$ ) (BOURNE et al., 1990).

### 1.3.3. Activación de la adenilato ciclasa.

La adenilato ciclasa (AC) es una proteína intrínseca de la membrana celular, muy sensible al calor y a la desnaturalización, que cataliza la reacción de formación del AMPc a partir del ATP en presencia de  $Mn^{2+}$  o  $Mg^{2+}$  al ser estimulada por las proteínas  $G_s$ . Es un tetrámero de unos 120-150 KDa de peso molecular y su activación o inhibición se inicia cuando el ligando se une a su receptor. Esta unión, da lugar a un cambio conformacional en la molécula receptora que favorece su interacción con la proteína G ( $G_i$  o  $G_s$ ), la cual se activa e intercambia su GDP por GTP, se disocia del receptor e interactúa con la AC, estimulándola o inhibiéndola (según se trate de  $G_s$  o  $G_i$ ).

El efecto estimulador del VIP sobre la producción de AMPc o sobre la actividad de la adenilato ciclasa ha sido observado tanto en células aisladas como en membranas (Tabla X). En la mayoría de los casos el efecto del VIP es dosis-dependiente, obteniéndose la mitad de la

**TABLA X**

**Tejidos y líneas celulares en los que se ha evidenciado que el VIP estimula la producción de AMPc.**

<b>Célula / Especie</b>	<b>ED<sub>50</sub> (nM)</b>	<b>Autores</b>	<b>Año</b>
Membranas hepáticas de rata	0'25	BATAILLE et al.	1974
Membranas de adipocitos de rata	2'50	BATAILLE et al.	1974
Membranas de enterocitos de rata	4'10	AMIRANOFF et al.	1980
Células tumorales HT29 humanas	0'30	LABURTHE et al.	1978
Enterocito de rata	2'30	LABURTHE et al.	1979a
Vesícula biliar humana	0'20	DUPONT et al.	1981
Células tumorales HeLa humanas	1'00	PRIETO et al.	1981
Células mononucleares humanas	0'10	GUERRERO et al.	1981
Próstata ventral de rata	1'40	CARMENA y PRIETO	1983
Linfoblastos T Molt 4b	5'00	BEED et al.	1983
Células acinares de parótida de rata	10'00	INOUE et al.	1985
Membranas de tiroides bovino	5'00	MOLINERO et al.	1985
Linfocitos humanos (T, B y NK)	0'06	CALVO et al.	1986a
Leucocitos mononucleares humanos	0'36	WIJK	1988a
Células Cl. 19A humanas	0'07	ROUYER-FESSARD	1989
Linfocitos T8 NS8	30'00	ROBBERECHT et al.	1989b
Vesícula seminal de rata	3'00	RODRÍGUEZ-P et al.	1991
Células T de ratón	1'62	BOUDARD et al.	1991
Macrófagos peritoneales de rata	1'20	SEGURA y CALVO	1992
Macrófagos peritoneales de ratón	1'00	CALVO et al.	1994

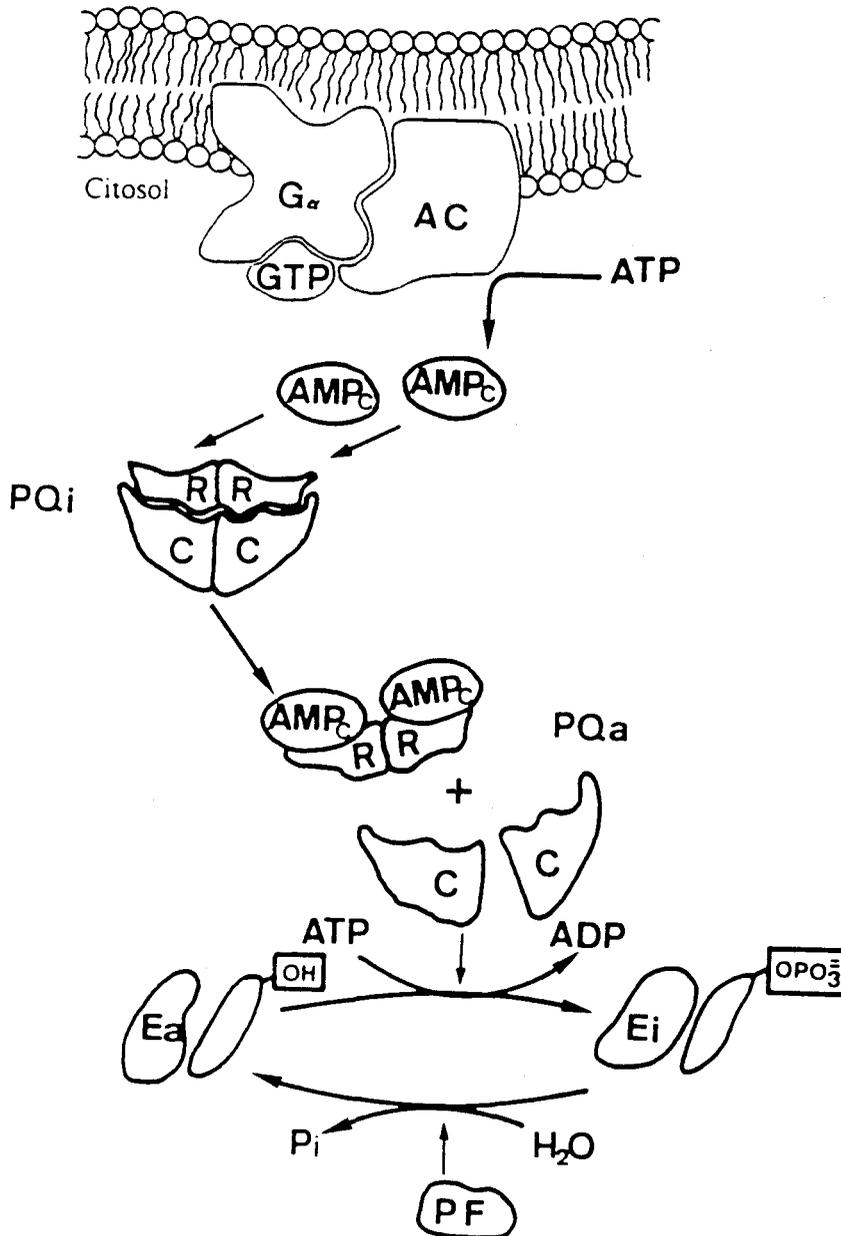
estimulación máxima ( $ED_{50}$ ) con concentraciones de péptido de 0'05 a 5 nM , siendo estas concentraciones muy similares a los valores de la constante de disociación ( $K_d$ ) de los receptores de VIP de alta afinidad.

#### 1.3.4. Proteína quinasa dependiente del AMPc (PKA).

La respuesta de cómo influye el AMPc sobre tantos procesos celulares, surgió de los estudios del control del metabolismo del glucógeno. Edwin Krebs y Donald Walsh descubrieron que en el músculo esquelético el AMPc activa una proteína quinasa (PKA). De hecho, muchos de los efectos del AMPc en las células eucarióticas se producen por activación de la PKA, la cual se activa por AMPc a concentraciones del orden de  $10^{-8}$  M.

La proteína quinasa dependiente del AMPc es un tetrámero formado por dos subunidades reguladoras, de diferente peso molecular, y dos subunidades catalíticas iguales y con la misma capacidad para interactuar con las subunidades reguladoras. En el caso del VIP, el AMPc producido en respuesta al péptido, interactúa con las subunidades reguladoras de la PKA. Esta interacción produce un cambio conformacional en las subunidades reguladoras, lo que da lugar a la separación de las subunidades catalíticas que, una vez libres, transfieren grupos fosforilos sobre grupos hidroxilos de restos específicos de serina o treonina de determinadas proteínas blanco intracelulares, modificando así su actividad biológica y siendo estas proteínas diana las que, en último termino, regulan los procesos fisiológicos (LABURTHE et al., 1979c; GUERRERO et al., 1984; COHN, 1987). En todas las fosforilaciones catalizadas por la PKA, se utiliza como dador de radicales fosfato al complejo ATP-Mg<sup>++</sup>. Por otra parte, para regular estos procesos de fosforilación catalizados por la PKA, existen unos enzimas denominados proteínas fosfatasas. Las proteínas fosfatasas son enzimas que hidrolizan el enlace fosfoéster formado por la PKA en las proteínas blanco, regulando de esta forma la actividad de las proteínas blanco al devolverlas a su primitivo estado funcional (Fig. 5).

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



**Fig. 5.- Activación de la proteína quinasa:** Cuando el AMPc se une a las subunidades reguladoras (R) de la proteína quinasa inactiva (PQi), se produce el paso a su forma activa (PQa), lo que da lugar a la liberación de las subunidades catalíticas (C) que fosforilan al enzima blanco activo (Ea) convirtiéndolo en su forma inactiva (Ei). La proteína fosfatasa puede volver a activar el enzima, hidrolizando el enlace fosfoéster que anteriormente se había formado.

### 1.3.5. Regulación del sistema receptor-efector del VIP.

La regulación de la activación del sistema de la adenilato ciclasa sensible a hormonas, se lleva a cabo en un primer momento mediante una reversión casi instantánea de la acción hormonal al producirse la hidrólisis del GTP unido a la proteína  $G_s$ , lo que da lugar al cese de la actividad de la adenilato ciclasa. Sin embargo, conocemos otras formas de regulación que requieren un tiempo mayor y que se han denominado con el término de desensibilización, adaptación o "down-regulation". Este concepto, hace referencia a la pérdida del efecto (estimulador o inhibidor) de una hormona después de haber sido utilizada en tratamientos previos, y conlleva una desensibilización homóloga u hormono-específica y otra heteróloga o no hormono-específica (HERTEL y PERKINS, 1984). El proceso de desensibilización involucra diversos mecanismos, tales y como la fosforilación del receptor y el secuestro o disminución de los receptores presentes en la superficie de la célula.

En el caso del VIP, se ha descrito tanto la regulación homóloga como heteróloga de su sistema receptor-efector.

#### 1.3.5.1. Regulación homóloga del sistema receptor-efector para el VIP.

El número de receptores funcionales para el VIP en la superficie celular no es constante, permitiendo a la célula responder óptimamente a pequeños cambios en los niveles de VIP. Así, la continua exposición de una célula al VIP, da lugar a una reducción en el número de sus receptores, por lo que la célula se desensibiliza. Esta desensibilización se relaciona con la internación del propio receptor y su consiguiente desaparición de la superficie celular (ROSSELIN et al., 1988).

La regulación del sistema receptor-efector para el VIP ha sido estudiada profundamente en las células HT-29 (LUIS et al., 1986), donde se considera que, tras la formación del complejo VIP-receptor, éste se internaría en vesículas endosómicas de corta vida media y se desacoplaría del sistema de la adenilato ciclasa. Esta internación de los receptores en los endosomas ocurre a muy corto plazo, y ocasiona un descenso reversible de los sitios de unión para VIP, ya que los receptores intactos son reciclados a la superficie celular.

En otros casos, se ha demostrado la degradación de parte de los complejos ligando-receptor en compartimentos lisosomales, lo que podría dar lugar a una desensibilización a

largo plazo que requeriría la biosíntesis y el procesamiento de nuevos receptores de VIP en la superficie celular (BOISSARD et al., 1986).

La regulación homóloga del receptor de VIP ha sido demostrada en linfocitos mononucleares humanos (WIJK et al., 1988a), linfocitos de ratón (OTTAWAY, 1992), macrófagos peritoneales de rata (POZO et al., 1995) y en células linfoblásticas SUP-T1 (ROBBERECHT et al., 1989c) y BL/VL<sub>3</sub> (ABELLO et al., 1989).

Por último, tratamientos crónicos con VIP inducen una desensibilización al péptido en algunas líneas celulares (HOHMANN y TASHJIAN, 1984; GESPACH et al., 1984) y en diferentes modelos biológicos y fisiológicos (STAUN-OLSEN et al., 1982; KAKU et al., 1985).

### **1.3.5.2. Regulación heteróloga del sistema receptor-efector para el VIP.**

El fenómeno según el cual, tras la exposición de células a agonistas específicos de diversos tipos de receptores, se produce una respuesta reducida a estimulaciones posteriores del agonista, está bien documentado. Cuando esta atenuación a ulteriores respuestas para una hormona o una droga no es específica de agonista, se denomina desensibilización heteróloga.

Así, algunas hormonas y neurotransmisores que actúan sobre receptores acoplados a la adenilato ciclasa mediante proteínas G, pueden regular heterológamente al sistema receptor-efector para el VIP. Otros agentes capaces de producir este tipo de regulación heteróloga son los ésteres de forbol (activadores de la PKC), tal y como ha sido demostrado en células epiteliales de próstata de rata (ESCUADERO et al., 1987) y en células HT-29 (BOZOU et al., 1987).

En el caso de las células del sistema inmune, esta regulación heteróloga del sistema receptor-efector para el VIP ha sido demostrada en leucocitos mononucleares humanos (WIJK et al., 1988b; WIJK, 1991) y en la línea celular BL/VL<sub>3</sub> (ABELLO et al., 1989).

### **1.3.5.3. Otros factores que regulan el sistema receptor-efector para el VIP.**

Otro tipo de regulación del sistema receptor-efector para el VIP ha sido descrito en páncreas de roedores (COLLEN et al., 1982), en donde se ha demostrado la capacidad del calcio intracelular para amplificar la acción del AMPc sobre procesos secretores de enzimas. Así, secretagogos que producen la movilización intracelular del calcio (CCK o bombesina), amplifican la acción del VIP sobre la secreción de enzimas pancreáticas.

Por otra parte, también ha sido demostrado como el ácido retinóico regula el sistema receptor-efector para el VIP en determinadas líneas celulares de neuroblastoma humano (WASCHEK et al., 1997).

#### **1.4. VIP Y SISTEMA INMUNE.**

Existen numerosos estudios que ponen en evidencia la relación entre el VIP y el sistema inmune (OTTAWAY, 1988; TSENG y O'DORISIO, 1989), habiéndose propuesto al VIP como uno de los péptidos más importantes en la regulación del eje neuroinmunoendocrino (O'DORISIO et al., 1985b). Los hechos que conducen a la elaboración de esta hipótesis son básicamente de tres tipos: 1º) el hallazgo de terminaciones VIPérgicas en los órganos primarios y secundarios del sistema inmune, en relación íntima con las células inmunes (ZENTEL y WEIHE, 1991), 2º) la caracterización de receptores para VIP en células que participan en la respuesta inmune (OTTAWAY et al., 1990; CALVO et al., 1986a, 1986b, 1994a; SEGURA et al., 1992) y 3º) la constatación de diferentes efectos del VIP sobre la función de determinadas células inmunes (DE LA FUENTE et al., 1994; SEGURA et al., 1993; DELGADO et al., 1998).

##### **1.4.1. Relación entre los sistemas neuroendocrino e inmune.**

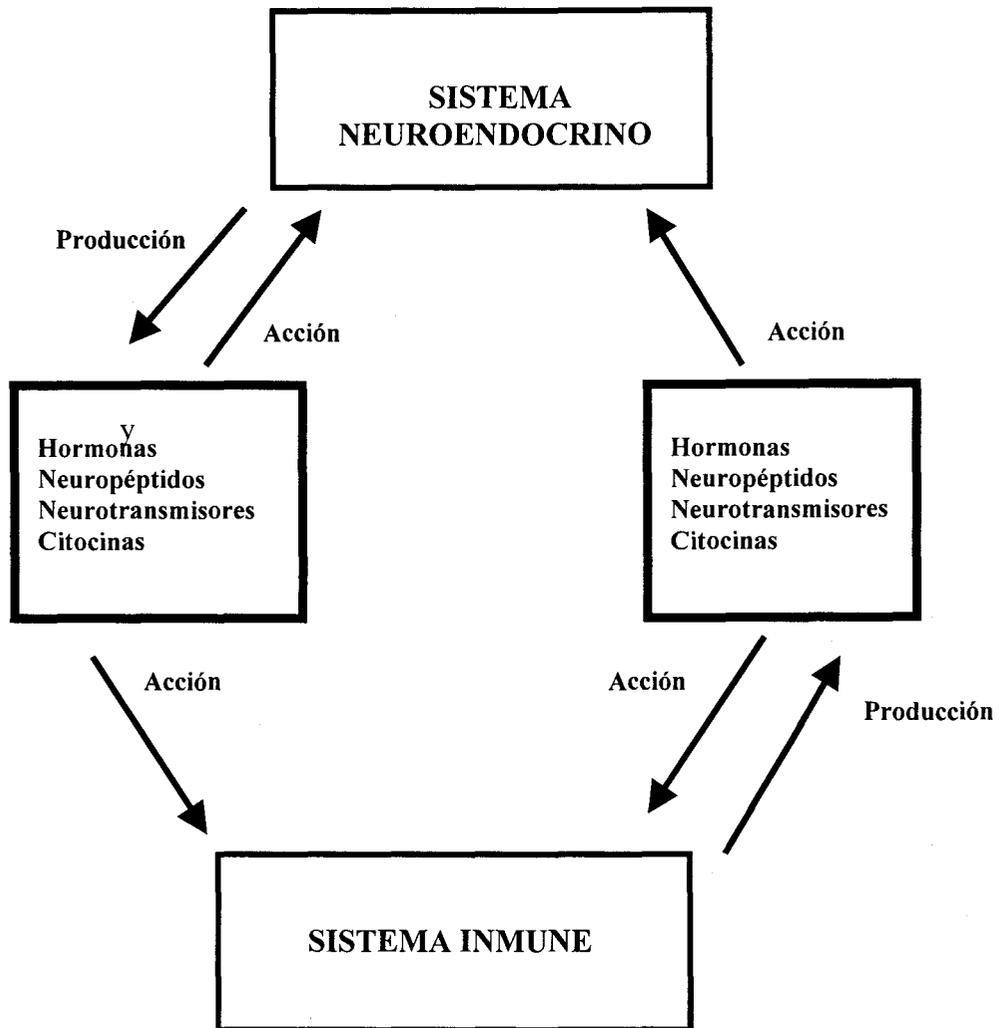
Los sistemas neuroendocrino e inmune han sido considerados como dos complejos autónomos que funcionaban para mantener la homeostasis corporal y el adecuado equilibrio entre el medio interno y el externo. Sin embargo en los últimos 20 años, numerosas evidencias han confirmado la existencia de una estrecha relación entre los sistemas neuroendocrino e inmune (PAYAN et al., 1986; MORLEY et al., 1987; DUNN, 1988; GOETZL et al., 1990). Así, hormonas y neuropéptidos producidos por el sistema neuroendocrino modifican la actividad de las células del sistema inmune (Fig. 6), a la vez que estas hormonas y neuropéptidos pueden ser producidos y secretados por células del sistema inmune y actuar en el sistema neuroendocrino (BLALOCK, 1989).

Ya en el año 1898 el investigador italiano CALZOLARI observó que la castración en conejos producía un aumento significativo de la masa del timo en estos animales, de este modo evidenció un efecto de las hormonas endocrinas sobre órganos del sistema inmune. Este hecho fue confirmado en 1940 por CHIODI, que encontró que el efecto de la castración en el timo, podía ser revertido por la administración de esteroides gonadales. Posteriormente, se

han desarrollado numerosos estudios destinados a demostrar que la supresión de la actividad hormonal, produce cambios evidentes en la morfología del tejido linfoide y en la actividad del sistema inmune, sugiriendo que las hormonas pueden estar implicadas en la regulación de la respuesta inmune (COMSA et al., 1982; BERCI y NAGY, 1987). También se ha encontrado en determinadas áreas de órganos linfoides primarios y secundarios, inervación noradrenérgica y peptidérgica, lo que ha establecido las uniones necesarias para la modulación neuronal de la respuesta inmune (BULLOCH, 1985; FELTEN et al., 1985, 1987, 1992; FELTEN y FELTEN, 1991).

Del mismo modo, existen evidencias experimentales que demuestran el efecto recíproco, es decir, que los productos secretados por las células inmunes pueden modular algunos mecanismos neuroendocrinos. Así, se ha observado como los sobrenadantes de cultivos de linfocitos estimulados con mitógenos e inyectados en animales normales, provocan un aumento en los niveles de ACTH y glucocorticoides (BESEDOVSKI et al., 1981). Posteriormente BESEDOVSKI et al (1983) demostraron que estos sobrenadantes disminuyen el contenido de noradrenalina del hipotálamo. Asimismo, la IL-1 parece ser responsable de los cambios que se producen en los niveles de glucocorticoides en ciertas infecciones de origen vírico (BESEDOVSKI et al., 1986). También se ha demostrado que la IL-6, el TNF $\alpha$  y el INF $\gamma$  estimulan el eje pituitario-adrenal (SHARP et al., 1989).

Todas estas experiencias ponen de manifiesto, la existencia de una comunicación bidireccional entre el sistema inmune y el neuroendocrino, la cual viene mediada por la producción por parte de los dos sistemas de moléculas señal (hormonas, citocinas, interleucinas, neuropéptidos y neurotransmisores) y sus receptores específicos, que son a menudo compartidos por ambos sistemas (BLALOCK, 1992, 1994 a, 1994b).



**Fig. 6.-** Esquema de las interconexiones reguladoras entre los sistemas neuroendocrino e inmune.

#### 1.4.1.1. Mediadores inmunes en el sistema neuroendocrino.

Células del sistema neuroendocrino, como la microglía, pueden producir y secretar mediadores característicos del sistema inmune como las citocinas. Estas son polipéptidos o glucoproteínas con un peso molecular menor de 30 kDa, aunque algunas pueden formar oligómeros de mayor peso molecular. Presentan una serie de características funcionales comunes (Tabla XI), se producen en la fase efectora de la inmunidad y sirven para regular la respuesta inmune. Las citocinas incluyen a factores de crecimiento (factores estimuladores de colonias o CSF), a las interleucinas (IL), a los interferones (IFN), a los factores de necrosis tumoral (TNF), y a varios factores con actividad estimuladora o inhibidora para los macrófagos. Las citocinas suelen tener una vida media muy corta (de minutos a pocas horas), están presentes en pequeñísimas concentraciones en suero o tejidos y actúan sobre receptores de membrana específicos a concentraciones del orden de picomolar ( $10^{-12}$  molar) de forma endocrina, paracrina, o autocrina. En general, las citocinas no se almacenan como moléculas preformadas, y su síntesis se inicia por una nueva transcripción genética. Esta activación suele ser transitoria y los ARNm que codifican las citocinas suelen ser inestables, lo que asegura que la síntesis de citocinas sea transitoria y se produzca en respuesta a estímulos externos concretos.

La activación de las células del sistema inmunitario está regulada en gran parte por la producción ordenada de una gran cantidad de citocinas que controlan la activación de los genes y la expresión de las moléculas de la superficie celular. Muchas citocinas tienen funciones similares, y es importante que exista una considerable redundancia en las capacidades de las citocinas para que el sistema inmunitario funcione normalmente. Además, muchos tipos celulares diferentes tienen receptores para la misma citocina, dando lugar al concepto de “red de citocinas” donde diferentes tipos de células secretan diferentes citocinas capaces de unirse y estimular a múltiples tipos de células.

La primera evidencia de que sustancias producidas por los linfocitos actuaban sobre el sistema neuroendocrino se obtuvo al comprobar que la timectomía neonatal en ratones, provocaba una marcada degranulación de las células somatotropas de la hipófisis (BESEDOVSKY et al., 1975). En la actualidad es de gran interés el estudio de los efectos de varios de estos factores inmunorreguladores, tales como IL-1, IL-2, IL-6, IFN- $\gamma$ , y TNF, así como de sus receptores, en el sistema neuroendocrino.

**TABLA XI****Características comunes de las citocinas.**

1. Secreción transitoria: la secreción de citocinas es un suceso breve y limitado. En general no se almacenan en la célula.
2. Radio de acción corto, siendo su modo de acción autocrino o paracrino.
3. Actuación a través de receptores específicos.
4. Producción por diversos tipos celulares.
5. Solapamiento: diferentes citocinas con los mismos efectos.
6. Cascada de citocinas: un tipo de citocina influye sobre la síntesis de otra, pudiendo alterar la producción de otras citocinas.
7. Sinergismo/Antagonismo: la presencia de varias citocinas puede variar la respuesta de forma cualitativa.
8. Pleiotropismo: una citocina tiene múltiple dianas y acciones.
9. Cada tipo celular presenta receptores para múltiples citocinas.
10. Transmodulación a través del receptor: la unión de una citocina a su receptor altera la expresión de receptores tanto para la propia citocina como para otras.

En principio se observó que al estimular el sistema inmune con estos factores reguladores, se producía numerosos efectos sobre la secreción de hormonas neuroendocrinas, observándose un patrón común, como el incremento en la secreción de ACTH y la inhibición de la liberación de TSH, mientras que el comportamiento para otras hormonas, como prolactina, GH y LH, no era tan uniforme (WEIGENT y BLALOCK, 1995). El efecto mejor caracterizado es la capacidad de la IL-1 de estimular el eje hipotálamo-pituitario-adrenal, mientras que, en general, se puede decir que la IL-6, el  $TNF\alpha$  y el  $INF\gamma$  inhiben el eje hipotálamo-pituitario-adrenal (VAN DER POLL et al., 1993).

Recientemente se sugirió una producción local por parte del sistema neuroendocrino de citocinas, habiéndose comprobado este hecho para el caso de la IL-1 e IL-6 (VANKELECOM et al., 1989; KOENING et al., 1990). Así, se demostró que células endocrinas productoras de TSH de la hipófisis anterior presentaban inmunoreactividad en gránulos citoplásmicos y ARNm para IL-1 $\beta$  (KOENING et al., 1990). Este descubrimiento sugirió la posibilidad de que IL-1 $\beta$  estuviera implicada en la regulación autocrina/paracrina de la hipófisis durante el proceso infeccioso, pudiendo jugar un papel importante en la secreción de TSH (KOENING et al., 1990).

Seguramente, la citocina mejor estudiada de origen inmune producida por estructuras endocrinas sea la IL-6. Así, se ha observado que las células de la pituitaria anterior, tanto en ratón como en rata, secretan IL-6 de manera espontánea (SPANGELO et al., 1991), pudiéndose aumentar su producción por LPS, ésteres de forbol, IL-1 $\beta$ ,  $TNF\alpha$ , VIP,  $IFN\gamma$  y prostaglandina E<sub>2</sub> (SCHOBITZ et al., 1993), e interviniendo en el proceso rutas de transducción dependientes (TATSUNO et al., 1991) e independientes (SPANGELO et al., 1991b) de AMPc. Además, otros investigadores han evidenciado como la liberación de IL-6 es inhibida por los glucocorticoides (SARLIS et al., 1993). Por otra parte, algunos autores han demostrado que en estado basal la pituitaria anterior y posterior liberan gran cantidad de IL-6 biológicamente activa, habiéndose descrito recientemente que las células del lóbulo neurointermedio de la pituitaria también pueden secretar IL-6, y que tanto el LPS como la IL-1 $\beta$  estimulan su producción, siendo este efecto anulado por la vasopresina y la oxitocina.

#### **1.4.1.2. Hormonas y neuropéptidos en el sistema inmune.**

También el sistema inmunitario, es capaz de producir hormonas y neuropéptidos que actúan como inmunomoduladores. La primera vez que se observó que células del sistema

inmunitario podían producir un péptido restringido hasta esa fecha a la glándula hipofisaria, fue el descubrimiento en 1981 de que linfocitos infectados por el virus de la enfermedad de Newcastle producían una proteína que compartía antigeneicidad y actividad biológica con la ACTH (SMITH y BLALOCK, 1981). A partir de ese momento, se ha podido confirmar la capacidad que tienen los linfocitos humanos y de ratón de producir ARNm del precursor de la ACTH, la proopiomelanocortina (POMC) y péptidos relacionados con ella (BLALOCK, 1992, 1994a, 1994b). Además, se ha demostrado una homología completa entre la ACTH de la hipófisis y la de leucocitos, al haberse observado que las secuencias de aminoácidos y de nucleótidos de la ACTH de bazo y de hipófisis son idénticas (SMITH et al., 1990). Por otra parte, diversos autores han identificado ARNm de la POMC en macrófagos esplénicos (LOLAIT et al., 1986), en timo de ratón (LACAZE-MASMONTEIL et al., 1987), y en linfocitos de sangre periférica humana estimulados con fitohemaglutinina (PHA) (OATES et al., 1988).

Poco después de estos hallazgos, se observó que estimulando PBLs humanos con mitógenos de células T se incrementaba al inmunofluorescencia específica de la subunidad  $\beta$  de TSH o tirotropina (SMITH et al., 1993). Este estudio describía la síntesis de novo de TSH de linfocitos con una estructura similar a la TSH hipofisaria. Detectándose también, ARNm para la TSH en linfocitos humanos y murinos (KRUGER et al., 1989), así como en líneas de células T (PEELE et al., 1993). Después de la TSH, se identificaron en células inmunes otras dos hormonas localizadas hasta ese momento en la hipófisis, como son la LH y la FSH. Del mismo modo, en 1986, los trabajos de HIESTAND et al. demostraron que los linfocitos podían producir GH y prolactina al observar que linfocitos activados contenían ARNm de estas dos hormonas. A partir de estos trabajos, otros investigadores han establecido mas claramente que los linfocitos humanos y de rata producen ARNm de prolactina similar a la de la hipófisis (PELLEGRINI et al., 1992; O'NEAL et al., 1992). Por último, se ha descrito en numerosos estudios la producción de GH por parte de linfocitos humanos y de roedores, así como de determinadas líneas celulares (HIESTAND et al., 1986; KAO et al., 1989; VARMA et al., 1993), sugiriéndose que la GH producida por los linfocitos puede funcionar fundamentalmente de una forma autocrina/paracrina, puesto que los niveles de GH producidos por las células inmunes son muy bajos (KAO et al., 1992).

Dado que las células del sistema inmunitario producen y secretan hormonas neuroendocrinas y que las hormonas liberadoras hipotalámicas tienen efectos sobre el sistema inmune, se pensó que las células que componen este sistema podrían producir estos factores de liberación. El primer trabajo en este sentido, demostró la presencia de ARNm e

inmunoreactividad para CRH en PBLs humanos sin estimular y en neutrófilos (STEPHANOU et al., 1990). Otro factor liberador hipotalámico identificado como producto de células del sistema inmune, fue la GHRH (WEIGENT y BLALOCK, 1990), al observarse que el ARNm de GHRH de los linfocitos poseía el mismo tamaño que el de la hormona hipotalámica y que el factor sintetizado de novo por los linfocitos, podía unirse al receptor de GHRH de la hipófisis e incrementar la síntesis del ARNm de GH en linfocitos y en células hipofisarias.

Gracias a los distintos trabajos ya mencionados, se ha puesto de manifiesto que células del sistema inmune son capaces de producir mediadores propios del sistema neuroendocrino como son las hormonas, las cuales a su vez modulan distintas funciones del sistema inmunitario. Esta modulación viene determinada por la presencia en las células linfoides de receptores específicos que tienen características estructurales semejantes a los receptores hallados en los órganos neuroendocrinos (Tabla XII). Así, se han identificado receptores de alta afinidad para ACTH en linfocitos T y B de rata (CLARKE y BOST, 1989), receptores para TSH en neutrófilos, monocitos y linfocitos B (HARBOUR et al., 1990), receptores para LH en linfocitos T, receptores para prolactina en linfocitos humanos y de ratón (DARDENNE et al., 1994) y receptores para GH en células del timo, bazo, PBLs de rata, humanos y ratón (GALA, 1991; ARGETSINGER et al., 1993). También se han identificado receptores para CRH en macrófagos y linfocitos B de bazo (DE SOUZA, 1993) y para GHRH en timocitos y linfocitos esplénicos (BLALOCK, 1994b). Del mismo modo, han sido identificados receptores para andrógenos y estrógenos en fracciones citosólicas del timo y en el epitelio tímico (PEARCE et al., 1981; GROSSMAN, 1985) y finalmente se han descritos receptores para los glucocorticoides en linfocitos T, B, macrófagos, timocitos y células reticuloepiteliales del timo (SMITH et al., 1977; WERB et al., 1978; CUPPS y FAUCI, 1982).

Los neuropéptidos, que también juegan un papel importante en la mediación de los efectos del sistema neuroendocrino en el sistema inmunitario, no sólo son producidos por las células neuroendocrinas, sino que varios tipos celulares del sistema inmune son capaces de producir idénticos factores, actuando de una forma paracrina en la regulación de la actividad de las células inflamatorias y de otros elementos tisulares.

Para establecer las relaciones entre ambos sistemas, es preciso definir en primer lugar las relaciones anatómicas entre las células inmunológicas del timo, bazo y ganglios linfáticos y las terminaciones nerviosas que contienen a estos neuropéptidos. En la actualidad, está demostrado que el sistema nervioso periférico autónomo inerva directamente el tejido parenquimatoso del timo, bazo, ganglios linfáticos, apéndice, médula ósea y otros tejidos linfoides, proporcionando una importante base anatómica de relación entre el sistema

**TABLA XII**

**Células del sistema inmune que poseen receptores para determinadas hormonas neuroendocrinas.**

<b>Tipo celular</b>	<b>Receptor</b>	<b>Autores</b>	<b>Año</b>
Células T y B de bazo de rata	ACTH	CLARKE y BOST JOHNSON et al	1989 1992
Células de bazo	$\beta$ -endorfina	CARR	1991
Neutrófilos, monocitos y céls B	Tirotropina	HABAUD et al. HARBOUR et al	1977 1990
Células T y B de ratón y humano	Prolactina	ALI et al. GALA y SHEVACH KROWN et al.	1991 1993 1994
Timo, bazo, PBLs de rata, ratón y humano	GH	ROUPAS et al. GALA ARGETSINGER et al.	1989 1991 1993
Bazo de rata y PBLs humanos	GHRH	GUARCELLO et al	1991
PBLs humanos	CRH	BURNTON et al.	1992
Líneas celulares T	TRH	HARBOUR et al.	1990
Timocitos de rata	LHRH	BLALOCK y COSTA	1990
Linfocitos T y B, macrófagos, Timocitos	Glucocorticoides	SMITH et al. WERB et al. CUPPS y FAUCI	1977 1978 1982
Epitelio tímico	Andrógenos Estrógenos	PEARCE et al. GROSSMAN	1981 1985

nervioso y el sistema inmunitario (FELTEN et al., 1985). Así, varios investigadores han encontrado que diversos neuropéptidos como sustancia P (SP), péptido relacionado con el gen de calcitonina (CGRP), péptido intestinal vasoactivo (VIP), somatostatina y neuropéptido Y, están presentes en la inervación autónoma de los órganos linfoides y son liberados en respuesta a estímulos específicos (HERMANSON et al., 1987). En este sentido, se han identificado en el timo de rata fibras nerviosas que contienen SP, CGRP, VIP y neuropéptido Y (WEIHE et al., 1991). Por otra parte, se ha encontrado a lo largo de la arteria central de la pulpa blanca del bazo inmunoreactividad para neuropéptido Y, met-enkefalina y colecistocinina (CCK) (FELTEN et al., 1985). Del mismo modo, se ha observado que el tejido linfoide asociado a mucosas del aparato digestivo y de pulmón, está inervado por fibras nerviosas que contienen SP, CGRP y VIP, y que son las zonas ricas en células T y macrófagos las que están más abundantemente inervadas (FELTEN y FELTEN, 1991; WEIHE et al., 1991).

No sólo los neuropéptidos son liberados a partir de las terminaciones nerviosas de los órganos linfoides, sino que también son sintetizados por parte de las células linfoides y no linfoides del sistema inmune (Tabla XIII). Así, se ha visto como la sustancia P es producida por eosinófilos humanos (ALIAKBARI et al., 1987) y por macrófagos (PASCUAL y BOST, 1990) y como existe inmunoreactividad positiva para somatostatina en gránulos citoplásmicos de macrófagos de ratones infectados por schistosomiasis (WEINSTOCK et al., 1990) y en células epiteliales y neuroendocrinas del timo de rata (GOMARIZ et al., 1990).

Respecto al neuropéptido Y, se ha observado que puede ser sintetizado y secretado por megacariocitos y plaquetas de rata y ratón (ERICSSON et al., 1987; MYERS et al., 1988). Por último, se ha descrito la presencia de bombesina en células de la línea monocito-macrófago de humanos.

Las actividades inmunorreguladoras in vivo de estos péptidos están influidas por un gran número de condiciones, entre las cuales podemos mencionar la concentración y distribución de endopeptidasas tisulares específicas que se hallen en el microambiente en el que el neuropéptido es liberado, la distribución de las fibras nerviosas de estos neuropéptidos en el órgano linfoide, así como la concentración que alcanza el neuropéptido en la proximidad de las células efectoras (FELTEN y FELTEN, 1991), siendo un criterio adicional el hecho de que las células inmunocompetentes expresan receptores específicos para estos neuropéptidos. Además, los neuropéptidos pueden actuar sobre las células endoteliales, fibroblastos y otras células del tejido conectivo, alterando el microambiente en el que tiene lugar la respuesta inmune. Por último, los neuropéptidos son también capaces de alterar el flujo sanguíneo de

**TABLA XIII****Producción de neuropéptidos en células del sistema inmunitario.**

<b>Neuropéptido</b>	<b>Tipo celular</b>	<b>Autor</b>	<b>Año</b>
Sustancia P	Eosinófilos de granulomas murinos. Eosinófilos humanos. Macrófagos.	WEINSTOCK y BOROS ALIAKBARI et al. PASCUAL y BOST	1981 1987 1990
Somatostatina	Células cebadas, basófilos, fagocitos mononucleares. Macrófagos de granulomas murinos. Células epiteliales y neuroendocrinas De timo de rata.	LYGREN et al. GOETZL et al. WEINSTOCK et al. GOMARIZ et al.	1984 1985 1990 1990
Neuropéptido Y	Megacariocitos y plaquetas de rata y ratón.	ERICSSON et al. MYERS et al.	1987 1988
Bombesina	Monocitos y macrófagos humanos.	MELONI et al.	1992

determinados tejidos por sus propiedades vasoactivas, con la consiguiente modificación del movimiento de linfocitos, granulocitos y monocitos (BARANIUK et al., 1989).

#### 1.4.2. Localización del VIP en el sistema inmune.

Diversos estudios han evidenciado la presencia de VIP en células relacionadas con el sistema inmune (Tabla XIV). La primera evidencia de que las células del sistema inmune podían producir VIP, fue la identificación de inmunorreactividad para VIP en células cebadas de peritoneo de rata mediante técnicas de radioinmunoensayo (CUTZ et al., 1978). Posteriormente, mediante estudios inmunohistoquímicos de secciones de pulmón e intestino de rata y ratón, así como en células peritoneales de rata, se identificaron células cebadas fuertemente positivas para VIP. La caracterización molecular indica que el VIP contenido en las líneas celulares de células cebadas difiere estructuralmente del VIP<sub>1-28</sub>, correspondiendo en una alta proporción a la forma truncada del mismo.

La evidencia de la producción de VIP en células leucémicas de rata, ha sido demostrada por la identificación de su ARN por amplificación con RT-PCR (WERSHIL et al., 1993). Así mismo, se ha visto como los eosinófilos de ratón y de humano pueden producir VIP (ALIAKBARI et al., 1987; WEINSTOCK y BLUM, 1990).

La presencia de VIP en leucocitos mononucleares fue descrita por primera vez en células mononucleares de sangre periférica humana y porcina (LYGREN et al., 1984). Por otra parte, se ha demostrado la producción de VIP en los linfocitos de órganos linfoides centrales y periféricos. Estudios inmunohistoquímicos en secciones histológicas de timo, bazo y ganglio linfático de rata y ratón, demostraron la presencia de células linfoides fuertemente positivas, que constituía la mayoría de la inmunorreactividad para el VIP en estos órganos (GOMARIZ et al., 1990, 1992), localizándose, en la corteza profunda y médula del timo, en la vaina linfoide periarteriolar de la pulpa blanca del bazo, así como en las zonas interfoliculares T- dependientes y en la corteza profunda de los ganglios linfáticos. El número de linfocitos positivos para VIP, es mayor en los órganos linfoides periféricos que en el timo (LECETA et al., 1994). El análisis por citometría de flujo de linfocitos marcados con anticuerpos anti-VIP y anticuerpos que definen distintos marcadores de superficie, indicaron que tanto los linfocitos B como los linfocitos T contienen VIP en los órganos linfoides periféricos, y en estos últimos, el VIP se localizó tanto en los subtipos de T colaboradores como en los T supresores (LECETA et al., 1994). Del mismo modo, otros autores también han evidenciado como linfocitos tímicos y peritoneales serían capaces de sintetizar VIP, como

**TABLA XIV****Localización tisular de VIP inmunorreactivo en el sistema inmune.**

<b>Localización</b>	<b>Autor</b>	<b>Año</b>
Células cebadas de peritoneo de rata	CUTZ et al.	1978
Leucocitos PMN	O'DORISIO et al.	1980
Leucocitos mononucleares humanos y Porcinos	LYGREN et al.	1984
Eosinófilos de ratón y de humano	ALIAKBARI et al. WEINSTOCK y BLUM	1987 1990
Timo de rata y ratón	GOMARIZ et al.	1990
Bazo y ganglio linfático	GOMARIZ et al.	1992
Células leucémicas de rata	WERSHIL et al.	1993
Linfocitos T y B en órganos linfoides Periféricos	LECETA et al.	1994

lo demuestra el hecho de la existencia de transcritos específicos para el mismo (GOMARIZ et al., 1994b; DELGADO et al., 1996 y DELGADO et al., 1996b).

### 1.4.3. Receptores para VIP en células del sistema inmune.

Utilizando diversas técnicas, se han caracterizado receptores específicos para VIP en diferentes células o líneas celulares implicadas en la respuesta inmune tanto de humano como de roedores (Tabla XV). Además, se ha constatado que dichos receptores están acoplados a la adenilato ciclasa.

El primer trabajo que caracterizó receptores para VIP en células mononucleares sanguíneas humanas, fue el realizado por GUERRERO et al. en 1981, el cual encontró dos poblaciones de receptores: una de alta afinidad ( $K_d = 2.4 \times 10^{-10}$  M) y baja capacidad de unión (8 fmoles/ $10^6$  células) y otra de baja afinidad ( $K_d = 8.0 \times 10^{-8}$  M) y alta capacidad de unión (800 fmoles/ $10^6$  células). Al mismo tiempo, este grupo observó que el VIP incrementaba la producción de AMPc en células mononucleares sanguíneas humanas (GUERRERO et al., 1981).

Otros grupos han identificado receptores de VIP en PBLs humanos (DANEK et al., 1983; OTTAWAY et al., 1983; CALVO et al., 1986 a), en monocitos humanos (WIJK et al., 1985), linfocitos de rata y ratón (OTTAWAY y GREENBERG, 1984; CALVO et al., 1986b), macrófagos alveolares de rata (SAKAKIBARA et al., 1994) y en macrófagos peritoneales de rata y ratón (SEGURA et al., 1991; CALVO et al., 1994a). En todos estos trabajos, la unión del VIP a las células cumplió con los criterios bioquímicos para un receptor: dependencia del tiempo, temperatura, pH, concentración celular, así como reversibilidad, saturabilidad y especificidad farmacológica. Tras el análisis de los datos estequiométricos por el método de Scatchard, se obtuvieron generalmente dos clases de sitios de unión para el VIP, uno con alta afinidad ( $K_d = 0.1-1.1$  nM) y otro con baja afinidad ( $K_d = 25-250$  nM). Sin embargo, en otros trabajos, sólo se observó un sitio de unión para el VIP con una afinidad de  $0.2-0.47$  nM, que se corresponden con las  $K_d$  de los sitios de unión para el VIP de alta afinidad. Por otra parte, se piensa que solamente los receptores de alta afinidad están acoplados funcionalmente al sistema adenilato ciclasa, tanto en el sistema inmune como en el resto de los sistemas estudiados (CARMENA y PRIETO, 1983; CALVO y GUERRERO, 1993).

Por otra parte, se ha demostrado la presencia de receptores para VIP en varias líneas celulares humanas, tales como linfoblastos Molt 4b (BEED et al., 1983), la línea celular humana pre-B Nalm 6, en la que se ha descrito una única población de receptores con una

TABLA XV

## Receptores para VIP en células del sistema inmune.

Tipo celular	K <sub>d</sub> ↑	K <sub>d</sub> ↓	Sitios/cél ↑	sitios/cél ↓	Autor	Año
Monocito humano	0'24	80	4800	48000	GUERRERO et al.	1981
Monocito humano	0'24	---	2000	----	OTTAWAY et al.	1983
Monocito humano	0'25	---	9600	----	WIJK et al.	1985
Linfocito humano	0'47	---	1700	----	DANEK et al.	1983
Linfocito de ratón (GL)	0'22	---	2150	----	OTTAWAY et al.	1984
Linfocito de ratón (B)	0'22	---	880	----	OTTAWAY et al.	1984
Linfocito de ratón (PP)	0'24	---	490	----	OTTAWAY et al.	1984
Linfocito de rata	0'05	142	1566	183000	CALVO et al.	1986b
Esplenocito de rata	0'10	255	2770	1755000	CALVO et al.	1986b
Mieloma humano	7'60	---	41207	----	FINCH et al.	1989
Linfocito B humano	9'10	---	----	----	O'DORISIO et al.	1989b
Célula NK humana	0'39	---	2409	----	OTTAWAY et al.	1990
CD4 <sup>+</sup> humano	0'25	---	2530	----	OTTAWAY et al.	1990
CD8 <sup>+</sup> humano	0'42	---	2288	----	OTTAWAY et al.	1990
Linfocito humano	0'11	---	927	----	ROBERTS et al.	1991
Macróf. Peritoneal rata	1'10	71	6600	250000	SEGURA et al.	1991
Macróf. Peritoneal ratón	1'05	66	11400	423000	CALVO et al.	1994
Macrófagos alveolares	0'20	---	1190	----	SAKAKIBARA et al.	1994

K<sub>d</sub>: constante de disociación; ↑: alta afinidad; ↓: baja afinidad; GL: ganglios linfáticos; B: bazo; PP: Placas de Peyer

$K_d = 12.6$  nM, en membranas de células plasmáticas de la línea Dakiki, en la que también se encontró un solo tipo de receptor con una  $K_d = 9.1$  nM (O'DORISIO et al., 1989), en células de mieloma U266, donde se encontró un solo receptor con una  $K_d = 7.6$  nM y en células de la línea Jurkat, derivada de una leucemia humana de células T, en la se encontró un solo tipo de receptor con una  $K_d = 5.2$  nM (FINCH et al., 1989). En estas líneas celulares, los receptores de VIP expresados por ellas poseen una afinidad y una capacidad de unión que son mayores que las descritas para los linfocitos circulante humanos de individuos sanos.

Actualmente, también se han caracterizado receptores para VIP en las subpoblaciones linfoides más importantes, como son las células T cooperadoras ( $CD4^+$ ), las células T supresoras/citotóxicas ( $CD8^+$ ), las células B y los linfocitos grandes granulares ( $CD16^+$ ).

Una observación digna de interés fue que el VIP se unía al antígeno CD4 de los linfocitos humanos, compitiendo por ello con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH-1) (RUFF et al., 1987). Este hecho se atribuyó a la semejanza estructural que existe entre el péptido de la envoltura glicoprotéica del VIH-1 (péptido T), que es la secuencia por la que se une a la molécula CD4, y la secuencia de aminoácidos 4-11 del VIP. Posteriormente, ha habido resultados contradictorios a este respecto y otros autores no han encontrado interacción entre el péptido T y el receptor de VIP (NGUYEN, 1988; POZO et al., 1995)

En cuanto a la transducción de señal del VIP en células del sistema inmune, cabe decir que se ha visto que el VIP incrementa la producción de AMPc y estimula la proteína quinasa dependiente de AMPc. Así, se ha observado la estimulación de la producción de AMPc por el VIP en linfocitos humanos (GUERRERO et al., 1981; OTTAWAY et al., 1983; CALVO et al., 1986a), monocitos humanos (WIJK, 1988a), macrófagos alveolares de rata (SAKAKIBARA et al., 1994), y en macrófagos peritoneales de rata y ratón (SEGURA et al., 1992a; CALVO et al., 1994b). Por otra parte, también se ha observado que el VIP estimula la actividad adenilato ciclasa en membranas de linfocitos humanos (O'DORISIO et al., 1981), en varias líneas celulares humanas, tal y como los linfocitos T Molt 4b (BEED et al., 1983) y en varias líneas celulares de ratón (ROBBERECHT et al 1989b).

La producción de AMPc estimulada por el VIP activa posteriormente a la proteína quinasa dependiente de AMPc. Así, se ha visto que el VIP estimula la PKA en PBLs (GUERRERO, et al., 1984) y en linfocitos Molt 4b (O'DORISIO et al., 1985).

Dentro del mecanismo de acción del VIP en las células del sistema inmune, se ha comprobado que los nucleótidos de guanina regulan la unión del VIP a sus receptores en membranas de macrófagos peritoneales de rata (SEGURA et al., 1992b), sugiriendo un acoplamiento de los receptores de VIP a proteínas G. Otro hecho comprobado es que el VIP y

el análogo del GTP, Gpp(NH)p, actúan sinérgicamente en el proceso de estimulación de la adenilato ciclasa en membranas de linfocitos humanos y en linfoblastos Molt 4b (O'DORISIO et al., 1981, 1985b), lo que sugiere que el VIP interactúa con un receptor acoplado a la adenilato ciclasa utilizando como intermediario en el proceso de activación a una proteína  $G_s$ . Hasta ahora, todos los receptores para VIP en células del sistema inmune a los que hemos hecho referencia son receptores de membrana, sin embargo, existe la posibilidad de que el VIP también interaccione con receptores situados en el núcleo celular y active una proteína quinasa C nuclear, tal y como ha sido demostrado en esplenocitos de rata (ZORN y RUSSELL, 1990).

ROBBERECHT et al. (1988b) caracterizaron el receptor de VIP en linfoblastos de la línea celular SUP-T1, derivada de un linfoma infantil de células T, y observaron la existencia de un nuevo tipo de receptor específico de VIP (VPAC<sub>2</sub>), el cual mostraba más afinidad por la helodermina ( $K_d = 3$  nM), que es un péptido de la familia del VIP, que por éste último. Además, comprobaron que la unión del VIP al receptor de la línea celular SUP-T1 da lugar a un aumento en los niveles de AMPc intracelulares por acoplamiento al sistema de la adenilato ciclasa (ROBBERECHT et al., 1989a). Por otra parte, también observaron que la unión y la estimulación de la producción de AMPc por parte del VIP esta sometida a un mecanismo de regulación homóloga (ROBBERECHT et al., 1989c). Por último, es interesante comentar que este tipo de receptor de VIP ha sido descrito en la línea humana de monocito-macrófago THP-1 (GESPACH et al., 1989) y en un linfoma de células T murinas (ABELLO et al., 1989a).

#### **1.4.4. Efectos del VIP sobre las células del sistema inmune.**

Se ha descrito anteriormente la existencia de fibras VIPérgicas en diferentes órganos linfoides, también se ha comprobado que el VIP puede ser producido por ciertas células inmunes y que existen receptores para VIP en estas células (CALVO et al., 1986a, 1986b, 1994a; OTTAWAY et al., 1990). Así pues, podemos sugerir que el VIP es un neuropéptido con propiedades inmunorreguladoras, que posee numerosos efectos sobre el funcionamiento de las células implicadas en la respuesta inmunitaria y que estos efectos parecen estar mediados por el AMPc (TSENG y O'DORISIO, 1989).

Seguidamente se describen algunos de los efectos del VIP sobre las funciones de las principales clases de células que intervienen tanto en la inmunidad natural (macrófagos, neutrófilos y células citotóxicas o células NK), como en la inmunidad específica (linfocitos T y linfocitos B) (Tabla XVI).

**TABLA XVI****Modulación de la función de las células inmunes por el VIP.**

<b>Función inmune</b>	<b>Efecto</b>	<b>Autor</b>	<b>Año</b>
Proliferación de linfocitos con Con-A	Inhibición	OTTAWAY et al.	1984
Migración de los linfocitos T4 "in vivo"	Inhibición	MOORE et al.	1984
Migración de los linfocitos T4 "in vitro"	Inhibición	OTTAWAY	1984
Liberación de histamina por mastocitos	Estimulación	PIOTROWISKI et al.	1985
Citotoxicidad de las células NK	Inhibición	ROLA-P et al.	1985
Síntesis de ADN	Inhibición	STANISZ et al.	1986
Producción de IgA en placas de Peyer	Inhibición	STANISZ et al.	1986
Producción de IgM en placas de Peyer	Estimulación	STANISZ et al.	1986
Producción de IL-2	Inhibición	OTTAWAY	1987a
Estallido respiratorio en monocitos	Inhibición	WIJK	1989a
Proliferación de linfocitos con Con-A	Estimulación	PEURIERE et al.	1990
Producción de IL-5	Estimulación	WEINSTOCK	1991
Producción de IgM en mononucleares h.	Inhibición	ADELMAN et al.	1991
Quimiotaxis macrófagos alveolares rata	Inhibición	LITWIN et al.	1992
Adherencia a sustrato macrófago perit. rata	Inhibición	SEGURA et al.	1993
Producción de IL-2 en céls T CD4 <sup>+</sup>	Inhibición	SUN y GANEA	1993
Adherencia linfo. h. a moléculas de integrina	Estimulación	JOHNSTON et al.	1994
Producción de IL-4 en timocitos	Inhibición	XIN et al.	1994
Producción IgA en lámina propia intestinal	Estimulación	BOIRIVANT et al.	1994

#### 1.4.4.1. Efectos del VIP en células fagocíticas.

Se ha descrito que el VIP inhibe la adherencia a sustrato de los macrófagos peritoneales de rata mediante un mecanismo en el que está implicado el AMPc (SEGURA et al., 1993), sin embargo, ha sido demostrado que estimula la adhesión de linfocitos T humanos a moléculas de integrinas (ICAM y VCAM) y proteínas de la matriz extracelular (JOHNSTON et al., 1994), así como la agregación homotípica de líneas celulares B humanas mediante un incremento de la interacción entre LFA-1 y la integrina ICAM-1 (ROBICHON et al., 1993).

Otros autores, han descrito un efecto opuesto del VIP sobre la migración de los leucocitos polimorfonucleares dependiendo de la concentración del péptido (BONDESSON et al., 1991). Por otra parte, LITWIN et al. (1992) han descrito un efecto inhibitor del VIP en la quimiotaxis de macrófagos alveolares de rata. Por último y en relación a la capacidad quimioatrayente, se ha observado como el VIP y el péptido T (octapéptido similar al extremo N-terminal del VIP), inducen la quimiotaxis de monocitos humanos (SACERDOTE et al., 1987; RUFF et al., 1987).

Varias evidencias en diferentes modelos experimentales, sugieren que el VIP puede modular la distribución de los linfocitos en los tejidos. Así, se ha observado que la infusión de VIP in vivo en los vasos linfáticos aferentes de los ganglios linfáticos poplíteos de cordero, conlleva una disminución de la salida, tanto de linfocitos pequeños circulantes como de linfoblastos, por el vaso linfático eferente, con una acción selectiva sobre los linfocitos T colaboradores (MOORE et al., 1988). Esta inhibición de la capacidad migratoria de los linfocitos puede estar asociada con un aumento en la producción de AMPc (MOORE y LACHMAN, 1982; MOORE, 1984). En este sentido, estudios realizados in vitro incubando linfocitos T de ratón en presencia de VIP, han demostrado que se produce un descenso (50%) en la densidad de los receptores para VIP expresados en estas células, y que una vez inyectados los linfocitos en la circulación del ratón, se produjo una fuerte inhibición dosis-dependiente de la colonización de las placas de Peyer y de los ganglios mesentéricos por los linfocitos pretratados con VIP (OTTAWAY, 1984, 1985). Otros trabajos demuestran que el VIP suprime la función fagocítica de partículas inertes en macrófagos peritoneales y alveolares, implicando un aumento en la concentración intracelular de AMPc (LITWIN et al., 1992; ICHINOSE et al., 1994). Sin embargo, JOHNSTON et al. (1994) demuestran que el VIP estimula de forma significativa la capacidad quimioatrayente in vitro de los linfocitos T humanos tanto CD4<sup>+</sup> como CD8<sup>+</sup>.

Por otra parte, ha sido descrito que el VIP inhibe el estallido respiratorio en monocitos humanos activados con zymosan a través de un mecanismo AMPc- dependiente (WIJK, 1989a). Por último, se ha descrito que el VIP induce de forma dosis-dependiente la secreción de histamina por mastocitos peritoneales de rata (PIOTROWSKI y FOREMAN, 1985).

#### **1.4.4.2. Efectos del VIP en linfocitos.**

El primer efecto del VIP descrito sobre células del sistema inmunitario, hacia referencia a la acción de este neuropéptido sobre la respuesta proliferativa de los linfocitos. Así, tras la adición de VIP a cultivos de linfocitos de órganos linfoides secundarios, se observó una clara inhibición dosis-dependiente de la proliferación de los linfocitos T inducida por concavalina A (Con A) y fitohemaglutinina (PHA) (OTTAWAY y GREENBERG, 1984). Con posterioridad, otros autores han obtenido resultados similares en células mononucleares circulantes (OTTAWAY et al., 1983), en linfocitos de bazo, ganglios linfáticos y placas de Peyer (STANISZ et al., 1986), en cultivos de células T de bazo murino (BOUDARD y BASTIDE, 1991) y en la línea linfoblástica humana Molt-4b (O'DORISIO et al., 1985a; TANG et al., 1992). También se ha observado una disminución en la síntesis de ADN en células mononucleares o en linfocitos obtenidos de bazo, timo, ganglios linfáticos, placas de Peyer y PBLs de ratón, cuando se cultivaron en presencia de VIP, al igual que una disminución de la incorporación de timidina triada en linfocitos de bazo y placas de Peyer estimulados con concavalina A en presencia de VIP (STANISZ et al., 1986; YIANGOU et al., 1990). Autores como PEURIERE et al.(1990), han demostrado que el efecto regulador del VIP sobre la respuesta proliferativa a la ConA en linfocitos de bazo de conejo, parece ser dependiente del tiempo y bimodal. De esta forma, cuando el VIP es añadido al cultivo a la vez que el mitógeno, se produce una inhibición de la respuesta proliferativa, mientras que cuando los esplenocitos se incubaron durante más de seis horas en presencia de VIP, el efecto fue estimulador. Sin embargo, otros autores (ROBERTS et al.,1991) no han encontrado efecto alguno del VIP sobre la proliferación de linfocitos humanos de sangre periférica inducida por Con A.

La actividad inmunomoduladora del VIP puede estar mediada por los efectos que ejerce sobre la producción de citocinas. Así, la hipótesis de trabajo formulada por OTTAWAY y GREENBERG fue que la unión del VIP a su receptor en los linfocitos T cooperadores, daba lugar a una disminución en la producción de IL-2, lo que impedía una respuesta normal a los mitógenos. Posteriormente, esta hipótesis ha sido apoyada por la constatación de que este

neuropéptido inhibe la producción de IL-2 en células T CD4<sup>+</sup> de bazo estimuladas con mitógenos y activadas a través del receptor específico de antígeno de células T (TCR) (BOUDARD y BASTIDE, 1991; GANEA y SUN, 1993) y en timocitos murinos estimulados a través del complejo TCR/CD3 (XIN et al., 1994). Además, el VIP tiene un efecto inhibitorio en la producción de IL-4 por parte de timocitos y células de bazo murino activados vía TCR/CD3, con el condicionante de que este efecto no está mediado directamente por el VIP, sino que parece ser una consecuencia de la inhibición de la producción de IL-2 (SUN y GANEA, 1993; XIN et al., 1994).

También se ha observado como el VIP actúa a nivel de otras citocinas. Así, se ha descrito que este péptido estimula la producción de IL-5 en linfocitos activados de ratones infectados con schistosomiasis (MATHEW et al., 1992), al igual que en linfocitos T de la mucosa intestinal de ratones sanos (WEINSTOCK, 1991). Además, tiene unos efectos inhibitorios sobre la producción de IFN- $\gamma$  en células mononucleares de sangre periférica humana estimuladas in vitro con enterotoxina, siendo esta inhibición dosis-dependiente (MUSCETTOLA y GRASSO, 1990).

Se ha demostrado también un efecto modulador del VIP en la producción de inmunoglobulinas en diferentes tipos celulares cultivados in vitro. Parece que esta acción moduladora es isotipo-específica y con unos efectos órganos específicos. Así, se ha descrito que en cultivos estimulados con concavalina A, el VIP produce un aumento en la secreción de IgA en linfocitos de los ganglios linfáticos mesentéricos y del bazo, mientras que incrementa la síntesis de IgM y disminuye la de IgA en las placas de Peyer (STANISZ et al., 1986). En humanos, el VIP incrementa la producción de IgA y disminuye la de IgG en cultivos de células mononucleares de lámina propia intestinal (BOIRIVANT et al., 1994), inhibe la producción de IgG en leucocitos mononucleares circulantes (ADELMAN et al., 1991) y estimula la síntesis de IgM en linfocitos circulantes (ANNIBALE et al., 1990). En células B de amígdalas, el VIP incrementa la secreción de IgA sin afectar a la de IgG o IgM (ISHIOKA et al., 1992). Otros autores (KIMATA et al., 1993) describen que el VIP inhibe la producción de IgE en células mononucleares de amígdalas, sin afectar la producción de otras inmunoglobulinas, en paciente atópicos. Todos estos efectos, que demuestran la capacidad que tiene el VIP de modular la producción de inmunoglobulinas en tejidos y leucocitos mononucleares de sangre, parecen estar mediados por la acción del neuropéptido en los subtipos de linfocitos T reguladores, ya que sólo un número pequeño de células B periféricas tienen receptores para VIP (OTTAWAY et al., 1990) y el efecto modulador del VIP sobre al

síntesis de Ig parece depender de la presencia en el cultivo de linfocitos T y monocitos (OTTAWAY et al., 1987; ADELMAN et al., 1991; KIMATA et al., 1993).

#### 1.4.4.3. Efectos del VIP en células citotóxicas.

También se ha visto involucrado el VIP en la regulación de la actividad citotóxica de las células NK. Así por ejemplo, se describe como el VIP inhibe la función efectora de estas células cuando está presente en el medio de incubación, y sin embargo, se produce un incremento de esta actividad cuando se preincuban las células NK en presencia de VIP (ROLA-PLESZCZYNSKI et al., 1985). La hipótesis que proponen los autores es que un aumento transitorio de la concentración de AMPc ejercería un efecto estimulador sobre la capacidad citotóxica, en cambio, un incremento persistente tendría el efecto contrario. Esta acción del VIP sobre la capacidad citotóxica natural se ha descrito en células NK de sangre humana (ROLA-PLESZCZYNSKI et al., 1985; SIRIANNI et al., 1992) y de bazo, ganglios linfáticos mesentéricos y células mononucleares de sangre periférica de ratón (YIANGOU et al., 1990).

#### 1.4.5. Perfil farmacológico del VIP en células del sistema inmune.

El análisis farmacológico de los receptores de VIP en células del sistema inmune permite el estudio de la heterogeneidad de dichos receptores, así como la posibilidad de asignar funciones biológicas específicas para este neuropéptido. Pero la capacidad para valorar la importancia del VIP en diferentes procesos inmunológicos, ha estado limitada por la ausencia de potentes antagonistas específicos, ya que para entender mejor su papel fisiológico es preciso disponer de antagonistas que puedan revertir el efecto del VIP cuando actúa sobre sus receptores específicos. En este sentido, han sido descritos diversos antagonistas del receptor del VIP, entre los que cabe mencionar el análogo del GRF [Ac-Tyr<sup>1</sup>,D-Phe<sup>2</sup>]GRF-(1-29)-NH<sub>2</sub>, el cual resulta de la sustitución de un aminoácido en la región N-terminal por un D-isomero y de la modificación del residuo tirosina N-terminal (WAELEBROECK et al., 1985; LABURTHE et al., 1986), el análogo del VIP [4 Cl-D-Phe<sup>6</sup>,Leu<sup>17</sup>] VIP (PANDOL et al., 1986), el fragmento C-terminal del VIP [VIP (10-28)] (BISSONETTE et al., 1984), análogos quiméricos como la neurotensina (6-11)-VIP(7-28)

(GOZES et al., 1991) y más recientemente el VIP(6-28)-PACAP(28-38) (FISHBEIN et al., 1994).

Diversos estudios han sido llevados a cabo con los antagonistas arriba mencionados. Así, el [4-Cl-D-Phe<sup>6</sup>,Leu<sup>17</sup>]VIP ha sido descrito como antagonista específico del receptor de VIP en páncreas de rata (PANDOL et al., 1986), vesícula seminal (RODRIGUEZ-PENA et al., 1991), intestino (GRIDER y RIVIER, 1990; ESPAT et al., 1995) y tejido cardíaco de perro (HILL et al., 1995). De igual modo, la molécula análoga al GRF [Ac-Tyr<sup>1</sup>,D-Phe<sup>2</sup>]GRF<sub>1-29</sub>-NH<sub>2</sub> muestra un eficaz comportamiento como antagonista específico del receptor del VIP en páncreas de rata (WAELEBROECK et al., 1985), intestino (LABURTHE et al., 1986) vesícula seminal (RODRÍGUEZ-PENA et al., 1991), médula espinal de rata (XU y WIESEMFELD-HALLIN, 1991) y en colon de gato (BLANK et al., 1990). Finalmente, la neurotensina (6-11)-VIP(7-28) ha sido descrita como un potente antagonista del receptor del VIP en sistema nervioso central de rata (GOZES et al., 1991; LILLING et al., 1995).

Con respecto a los efectos que ejercen estos antagonistas del receptor del VIP en células del sistema inmune, existe poca información disponible. Sin embargo, se conoce que el [4Cl-D-Phe<sup>6</sup>,Leu<sup>17</sup>]VIP revierte el efecto inhibitorio del VIP sobre la actividad natural killer en células humanas (SIRIANNI et al., 1992), reduce el efecto del VIP sobre la producción de AMPc y la proliferación estimulada por ConA en linfocitos murinos (OTTAWAY et al., 1992), así como también inhibe la capacidad de adherencia al sustrato en macrófagos peritoneales de rata (SEGURA et al., 1993).

## 2. EL MACRÓFAGO.

El sistema inmune comprende un conjunto de células y factores solubles que se han desarrollado en los seres vivos partiendo de la necesidad que tienen de protegerse frente a todo aquello que le es extraño. Se halla compuesto por los órganos linfoides, primarios y secundarios, y por los linfocitos y células del sistema mononuclear fagocítico que se encuentran circulando por el organismo.

El sistema mononuclear fagocítico consta de células ampliamente distribuidas derivadas de una extirpe pluripotencial común que se encuentran principalmente en la médula ósea aunque aparece también en otros tejidos (VAN FURTH y COHN, 1968). Las células fagocíticas que forman este sistema están involucradas en numerosas e importantes funciones, básicamente la fagocitosis y la presentación antigénica. Tras su maduración y posterior activación, adquieren diferentes formas morfológicas: granulocitos, células epitelioides, células gigantes, células de la microglía, células de Kupffer, monocitos, macrófagos y osteoclastos (Tabla XVII).

La primera línea de defensa frente a la infección está representada por las células fagocíticas a través de un proceso que en conjunto se conoce como fagocitosis, mediante el cual estas células tratan de ingerir y eliminar los microorganismos infectantes. Desde los estudios de METCHNIKOFF en 1893 sobre las propiedades de los fagocitos, ha sido patente la importancia del sistema fagocítico mononuclear en los mecanismos de defensa del huésped.

ASCHOFF designó en 1924 a estas células como integrantes del sistema retículo endotelial, pero estudios recientes sobre la morfología, citoquímica, marcadores de superficie y propiedades celulares in vivo e in vitro, han conducido a la definición de un sistema celular conocido ahora como sistema fagocítico mononuclear. Los fagocitos mononucleares comprenden los monocitos de la sangre periférica circulantes, sus células precursoras en la médula en la médula ósea y los macrófagos hísticos.

Los monocitos-macrófagos se originan en la médula ósea y derivan de la línea mieloide gránulo-monocítica. Están ampliamente distribuidos por el organismo dando lugar a una gran heterogeneidad tanto estructural como funcional. Particularmente están presentes en médula ósea, sangre periférica, tejidos (hígado, pulmones, tejido conectivo, nódulos linfáticos, timo, hueso, riñones, tejido linfoide asociado a mucosas, tracto gastrointestinal, tracto genitourinario, sistema endocrino, sistema nervioso central y piel), cavidades serosas (pleural y peritoneal) y en tejidos inflamatorios

**TABLA XVII****Células de la línea celular de monocitos – macrófagos.**

<b>Tejido</b>	<b>Denominación del tipo celular</b>
Sangre	Monocitos
Médula ósea	Monocitos, monoblastos, promonocitos
Tejido sólido	Macrófagos residentes ( histiocitos)
Piel	Células de Langerhans
Hígado	Células de Kupffer
Pulmón	Macrófagos alveolares
Hueso	Osteoclastos
Membrana sinovial	Células sinoviales tipo A
Sistema nervioso central	Microglia
Cavidad pleural	Macrófagos pleurales
Cavidad peritoneal	Macrófagos peritoneales
Exudado inflamatorio crónico	Macrófagos del exudado
Granuloma	Células epiteliodes, células gigantes multinucleadas

## 2.1. MORFOLOGÍA Y CARACTERÍSTICAS HISTOQUÍMICAS.

El monocito de la sangre periférica es una célula móvil, de tamaño mediano o grande, capaz de diferenciarse en macrófago libre, más grande, que se encuentra característicamente en los lugares de inflamación y en los líquidos peritoneal, pleural y sinovial. En la circulación, el monocito se encuentra marginado a lo largo de las paredes vasculares y muestra una tendencia a adherirse a las superficies. El monocito responde a la inflamación y a los estímulos quimiotácticos mediante una diapédesis activa a través de la pared del vaso hacia el foco inflamatorio, donde puede diferenciarse en forma de macrófago libre de mayor tamaño, con superior capacidad fagocítica y un contenido aumentado en enzimas hidrolíticas.

En las extensiones de sangre periférica teñidas, el monocito tienen un diámetro de 12-15  $\mu$  y representa de 3%-8% de los leucocitos circulantes. Su núcleo es voluminoso, generalmente situado de forma excéntrica, suele ser arriñonado pero puede ser redondo o irregular. El citoplasma es difuso y está repleto de pequeños lisosomas que al microscopio óptico le confieren el típico aspecto en "vidrio mate" (Fig. 7).

A medida que el monocito empieza su evolución a macrófago, la célula aumenta en tamaño, así como en cantidad de enzimas hidrolíticas del interior de los lisosomas. Al mismo tiempo, el tamaño y el número de sus mitocondrias aumenta, como lo hace también su metabolismo energético, el complejo de Golgi que concentra los lisosomas aumenta en tamaño y complejidad de sus vesículas.

Cuando el monocito se diferencia en macrófago, agranda su citoplasma, alcanzando un diámetro de 25-50  $\mu$ m. Tiene un núcleo arriñonado o fusiforme excéntricamente situado, con uno o dos nucléolos y una cromatina nuclear finamente dispersa de forma laxa que tiende a aglutinarse en el interior del núcleo. En el citoplasma, se observan algunas mitocondrias, cuyo número y tamaño varía con la actividad fagocítica y metabólica de la célula; también se aprecia un complejo de Golgi amplio, bien desarrollado, en localización yuxtannuclear, así como una cantidad variable de ribosomas libres y retículo endoplásmico rugoso. El rasgo más constante y característico de los macrófagos son los lisosomas, los cuales son abundantes en los macrófagos en reposo, viéndose su número muy reducido en las células que están fagocitando activamente. Posteriormente, los lisosomas son regenerados por el aparato de Golgi. El citoplasma de los macrófagos posee también cierta cantidad de fagosomas y de cuerpos residuales. El material residual puede ser expulsado del interior del macrófago por exocitosis, pudiendo permanecer secuestrado en el interior de los tejidos, o bien, volver a la circulación para ser excretado o reutilizado en los procesos biosintéticos. Las células en



Fig. 7.- Vista del monocito al microscopio electrónico: L: lisosomas; G: aparato de Golgi; M: mitocondrias; P: pseudópodos.

actividad fagocitaria poseen proyecciones citoplasmáticas irregulares o pseudópodos que participan en el movimiento ameboide y en la fagocitosis (Fig. 8).

Por lo que se refiere a sus características histoquímicas, el macrófago produce una serie de enzimas que se han utilizado para su identificación. Así, podemos mencionar la esterasa inespecífica citoplasmática, la peroxidasa (ausente en los macrófagos peritoneales residentes), la 5'-nucleotidasa (ausente en macrófagos activados), la aminopeptidasa y la fosfodiesterasa alcalina I, estas dos últimas aumentadas en los macrófagos activados.

## 2.2. CINÉTICA CELULAR.

El monocito de la sangre es una fase intermedia de una estirpe celular, cuya forma identificable más joven en la médula ósea es el promonocito y su forma más madura en el tejido es el macrófago. Las células de esta línea forman el sistema mononuclear fagocítico.

El término sistema mononuclear fagocítico se aplica hoy día al grupo de células que se había calificado antes como sistema reticuloendotelial. El concepto de un sistema de células fagocíticas especializado, ampliamente diseminado por todo el cuerpo, fue primeramente planteado por METCHNIKOFF a principios de siglo. Posteriormente, los morfólogos observaron que ciertas células captaban los pigmentos que se administraban por vía intravenosa. ASCHOFF identificó a estas células como macrófagos en el tejido conectivo, microglía en el sistema nervioso central, células endoteliales en los sinusoides vasculares, y células reticulares en los órganos linfoides, y sugirió que estos tipos celulares diferentes actuaban en la defensa del huésped fagocitando a invasores extraños como los microorganismos y los agrupó dentro del sistema reticuloendotelial (SRE).

Las células fagocíticas se originan en la médula ósea y son el resultado final de una secuencia de hechos de maduración y diferenciación celular bien caracterizados (Fig. 9). Todas ellas derivan de una sola célula madre mieloide conocida como CFU-G/M (unidad formadora de colonias granulocito/monocito), procedente, a su vez, de una célula madre hematopoyética pluripotencial (CFU-S). La célula mieloide CFU-G/M, presente en un 90-95% en la médula ósea, se diferencia posteriormente hacia las dos líneas progenitoras de células fagocíticas: granulocitos y células fagocíticas mononucleares (monocitos-macrófagos). La proliferación de CFU-G/M y su diferenciación hacia la producción de la serie granulocítica y monocítica, están reguladas al menos por dos factores de estimulación colonial de naturaleza glucoprotéica: el GM-CSF, que es un factor multilínea hematopoyético que aumenta la producción de granulocitos y monocitos-macrófagos, y el M-CSF, que

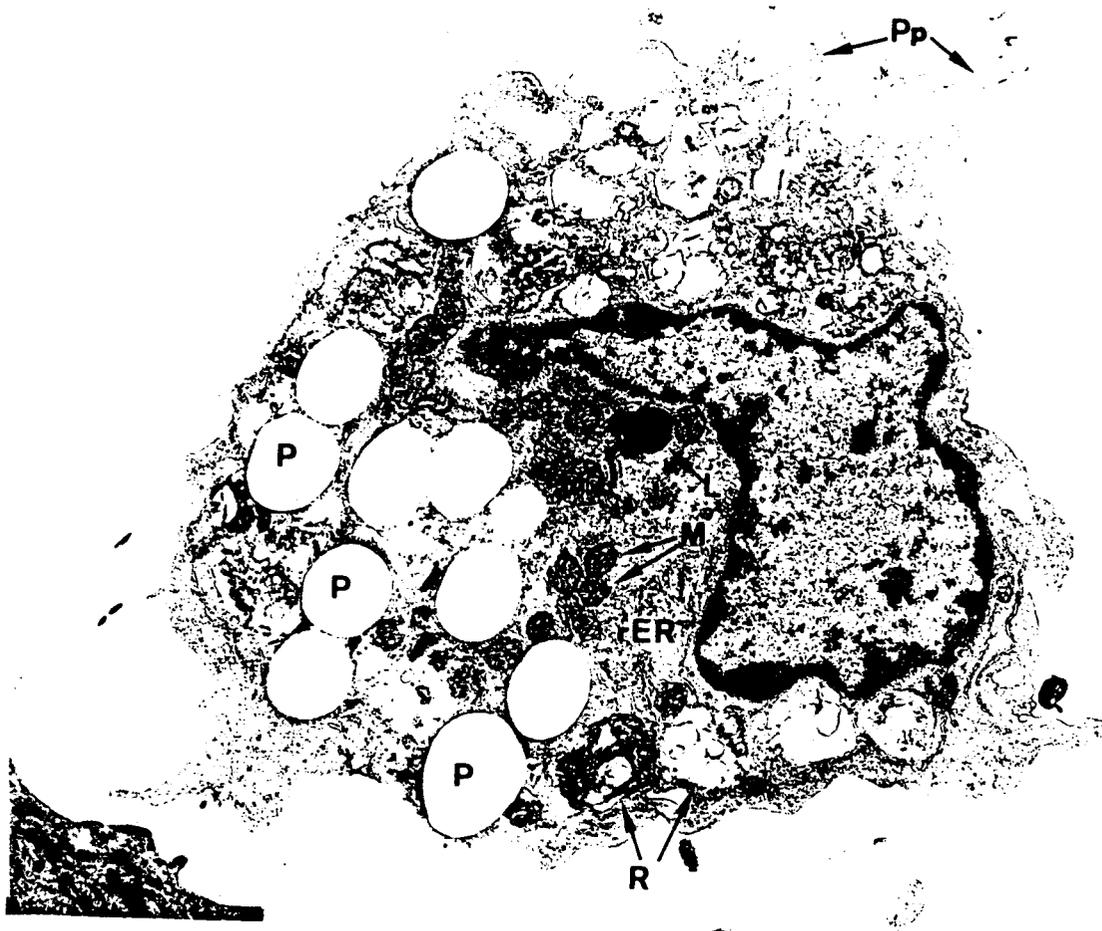


Fig. 8.- Macrófago activado obtenido del peritoneo de una rata inyectada previamente con partículas de látex intraperitonealmente. **P**: partículas fagocitadas; **M**: mitocondrias; **rER**: retículo endoplasmático rugoso; **L**: Lisosomas; **R**: cuerpos residuales; **Pp**: pseudópodos.

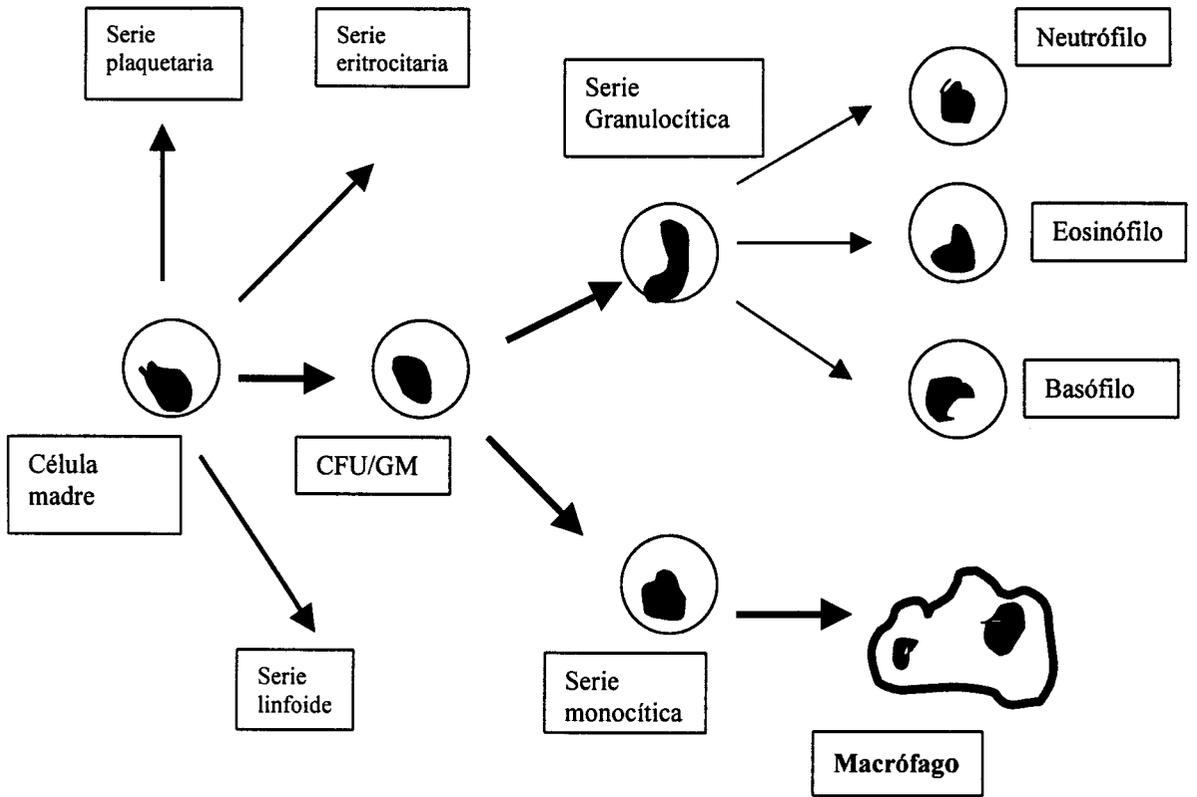


Fig. 9.- Esquema de diferenciación de las células del sistema mononuclear-fagocítico

estimula la supervivencia, la proliferación, la diferenciación y la función de los fagocitos mononucleares. Las células del sistema mononuclear fagocítico salen de la médula como monocitos, y van a localizarse en los diferentes tejidos donde adoptan las características y el nombre de macrófagos hísticos. Estos se caracterizan por un mayor tamaño, un metabolismo más activo y un sistema lisosómico y una actividad fagocítica mucho más desarrollada (TERRITO y CLINE, 1975). Sufren diferentes grados de diferenciación y especialización, en función del tejido donde se hallan y los estímulos recibidos, así hablamos de macrófagos residentes, inflamatorios y activados (ADAMS y HAMILTON, 1984). En circunstancias ordinarias, los macrófagos hísticos no vuelven a entrar en el torrente circulatorio. Sin embargo, en determinados procesos se han observado macrófagos en la sangre.

### 2.3. PROTEÍNAS DE MEMBRANA.

El macrófago presenta en su superficie diversas moléculas o proteínas de membrana (GORDON et al., 1988; PÉREZ et al., 1990) que actúan como receptores para otros tantos ligandos y que están relacionadas con sus diversas capacidades funcionales (Tabla XVIII).

Esta extensa enumeración de receptores de superficie da una idea de la complejidad de la regulación y la función de dichas células en la respuesta inmune.

#### 1) Moléculas relacionadas con la diferenciación y activación del sistema monocito-macrófago.

El descubrimiento de la metodología de los cultivos celulares en medios semisólidos, permitió conocer la importancia que tenían ciertos factores solubles en la regulación del sistema hematopoyético en general. Cuando se definieron sus características, se les llamó factores estimulantes de colonias (CSF). Dependiendo de la progenie a la que daban lugar las colonias, se les denominó factor estimulante de colonias granulomonocíticas (GM-CSF), granulocíticas (G-CSF), etc. (METCALF, 1989). Así, se ha podido observar que existen receptores para estos factores estimulantes de colonias en los macrófagos, siendo fundamentales para su proliferación y diferenciación. También existen receptores para la IL-2 (CD 25), ausentes en el macrófago residente, siendo su expresión inducida por el IFN $\gamma$ ; receptores para la transferrina (CD 71), muy numerosos, que estimulan el crecimiento celular (PEREZ et al., 1990) y receptores para el interferón  $\gamma$ , que es secretado por los linfocitos T CD4<sup>+</sup> proinflamatorios y que es la principal citocina activadora de los macrófagos.

TABLA XVIII

## Receptores de superficie de los fagocitos mononucleares.

Receptores Fc	IgG: FcGRI(CD64), FcGRII (CDw32), FcγRIII (CD16), IgA IgE: FcεRIIβ (CD23).
Receptores para complemento	C3b reconocido por el CR1 (CD35), C3d reconocido por CR2 (CD21), C3bi reconocido por CR3 (CD11b/CD18), C5a, C1q.
Receptores para citocinas	MIF, MAF, LIF, CF, MFF, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IFNα, IFNβ, IFNγ, GM-CSF, M-CSF/CSF-1.
Receptores para péptidos y pequeñas moléculas.	HI, H2, 5HT, 1, 2,5-Dihidroxi vitamina D3, encefalinas/endorfinas, sustancia P, Arg-vasopresina.
Receptores para hormonas y otros Mediadores	Insulina, glucocorticoides, angiotensina, calcitonina, hormona paratiroidea, histamina, adrenalina, somatomedinas.
Receptores para la transferrina (CD71) y lactoferrina (LTF)	
Receptores para lipoproteínas	Lipoproteínas aniónicas de baja densidad, PGE <sub>2</sub> , LTB <sub>4</sub> , LTC <sub>4</sub> , LTD <sub>4</sub> , PAG, apolipoproteína B y E.
Receptores para coagulantes y anticoagulantes	Fibrinógeno/fibrina, Factor VII, α1-antitrombina, heparina.
Receptores para la fibronectina	
Receptores de laminina	
Receptores para residuos de manosa	
Receptores para productos finales Glucosilados (AGEs)	

## 2) Moléculas que modulan la respuesta inmune.

Las respuestas inmunitarias contra antígenos proteicos requieren el procesamiento y la presentación inicial del antígeno a las células T por parte de las células accesorias presentadoras de antígeno (APC). La razón de este requerimiento es que las células T reconocen sólo antígenos extraños cuando estos se fragmentan primero en péptidos cortos que luego se presentan en relación con proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) en las superficies celulares. El CMH es una región de genes muy polimorfos cuyos productos se expresan en la superficie de varias células. Las proteínas codificadas por el CMH, a las que se le denomina habitualmente “moléculas del CMH” o “antígenos del CMH”, son los principales determinantes del transplante de injertos. Existen dos tipos diferentes de productos genéticos del CMH, llamados moléculas de clase I y clase II y cualquier célula T reconoce a un antígeno extraño unido a una sola molécula de clase I o clase II del CMH.

La región D del CMH codifica la expresión de los antígenos de histocompatibilidad de la clase II (HLA de clase II). Se han identificado varias series de HLA de clase II (HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP), siendo su función principal servir como elementos de restricción para los linfocitos T cooperadores que sólo son capaces de reconocer a los antígenos asociados a moléculas HLA de clase II. Los macrófagos expresan estos antígenos y lo hacen en un porcentaje muy variable. Así, los macrófagos esplénicos y peritoneales de ratón sólo lo expresan en un 10-50% (GORDON et al., 1988), frente al 80% de positividad en el cobaya (CLERICI et al., 1984). La expresión de estos antígenos es modulada por determinados factores medioambientales que rodean al macrófago. Así, hay determinados factores solubles que incrementan la expresión de HLA de clase II (IFN $\gamma$ , IL-4, TNF y el CSF-GM), mientras que otros la disminuyen (LPS, los corticoides, las prostaglandinas, la serotonina, el AMPc y la alfa-fetoproteína) (PÉREZ et al., 1990).

## 3) Moléculas que participan en la quimiotaxis.

La quimiotaxis es una reacción celular por la cual la dirección de la locomoción de la célula fagocítica está determinada por sustancias químicas del medio conocidas como citotaxinas o quimioattractantes. Las sustancias quimiotácticas de mayor importancia fisiológica son tres:

- a) Factores bacterianos: Ciertas bacterias generan N-formil péptidos con actividad citotóxica para neutrófilos y monocitos. Así, se ha observado en el macrófago receptores para péptidos N-formilados.
- b) Factores derivados del sistema del complemento: El complemento es un sistema de proteínas conectadas a nivel funcional que interactúan entre sí de forma muy controlada para proporcionar mucha de las funciones efectoras de la inmunidad humoral y de la inflamación. Este sistema complejo, del que en la actualidad se conocen más de 25 proteínas, actúa principalmente de tres formas. La primera función es originar la lisis de células, bacterias y virus recubiertos. La segunda, es mediar el proceso de opsonización. La tercera función es la generación de fragmentos peptídicos que regulan las características de las respuestas inflamatoria e inmunitaria. Determinados fragmentos de componentes del complemento tienen receptores específicos en la superficie celular. Entre estos receptores se incluyen CR1, CR2 y CR3, que interactúan con grandes fragmentos derivados de C3 o C4, y los receptores para los péptidos quimiotácticos C3a y C5a. El receptor de C5a (C5aR, CD88) es un miembro de la familia de receptores con siete dominios transmembrana acoplados a proteínas G (GERARD et al.,1994). Su interacción con el factor C5a, formado durante la activación del complemento, dispara la quimiotaxis de los macrófagos, los cuales poseen receptores para dicho factor.
- c) Leucotrienos: El metabolismo del ácido araquidónico vía ciclooxigenasa lleva a la liberación de prostaglandinas y tromboxanos, mientras que la vía lipooxigenasa genera ácido hidroxi-eicosatetranoico (HETEs) y leucotrienos. Algunas prostaglandinas influyen en la quimiotaxis de neutrófilos y el tromboxano A puede aumentar la adherencia de estas células. Sin embargo, HETEs y el leucotrieno B<sub>4</sub>, son los mediadores más importantes en la inflamación, influyendo en gran número de funciones de los macrófagos, como la quimiotaxis y la expresión de receptores (GOEZT, 1980).

#### 4) Moléculas relacionadas con la fagocitosis y la capacidad citotóxica celular.

Llegadas las células fagocíticas al lugar de inflamación, deben reconocer como extrañas y nocivas al organismo a las partículas infectantes y discernir muy selectivamente aquello que debe ser ingerido. Los macrófagos fagocitan partículas extrañas potencialmente patógenos, como microorganismos, macromoléculas y tejidos propios lesionados o muertos. El reconocimiento de forma inespecífica de las sustancias extrañas y de tejidos lesionados puede implicar a determinados receptores para fosfolípidos y azúcares. Así, se ha evidenciado

receptores para el  $\beta$ -glucano que se unen a moléculas de oligosacáridos (manosa-fucosa) presentes en la cubierta de determinados microorganismos como el bacilo Tuberculoso, la Leishmania o el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH-1); receptores para el factor C3b, que producido en la activación del complemento, tiene actividad de anafilotoxina al unirse a los antígenos y facilitar su fagocitosis; receptores para fracción Fc de la inmunoglobulinas de la clase IgG (sobre todo de las subclases IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>3</sub>), implicados tanto en la fagocitosis por opsonización, proceso en el cual la IgG se une por una parte al antígeno específico y por otra a la célula fagocítica, como en la actividad citotóxica dependiente de anticuerpo.

##### 5) Moléculas relacionadas con las propiedades de migración/adhesión.

La recirculación, migración y adhesión de las células del sistema fagocítico, están gobernadas por receptores de membrana presentes en los leucocitos, en las células endoteliales y en células residentes de los tejidos. Estos receptores se pueden clasificar en varias familias que incluyen: inmunoglobulinas, selectinas e integrinas.

a) Inmunoglobulinas: Los miembros de esta familia contienen estructuras del tipo inmunoglobulina, y comprenden un gran número de moléculas cruciales para la respuesta inmune. Seguidamente se mencionan brevemente algunas de estas moléculas:

La proteína CD2, también llamada LFA-2 o receptor de los hematíes de carnero, es expresada por timocitos, linfocitos T maduros y células NK. Actúa como una molécula de adhesión intercelular, siendo el principal ligando humano del CD2 otra molécula con una estructura similar llamada antígeno asociado a la función del leucocito-3 (LFA-3).

ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, son moléculas estructuralmente relacionadas que interaccionan con integrinas  $\beta$ 2. ICAM-1 tiene una amplia distribución tisular y es expresada en células hematopoyéticas y no hematopoyéticas. ICAM-2 tiene un patrón de expresión más restringido, encontrándose en células endoteliales vasculares y en linfocitos en reposo. ICAM-3 es el principal miembro de la familia ICAM y es expresada por linfocitos en reposo, por neutrófilos, monocitos y por algunas células endoteliales en tumores.

VCAM-1 se expresa en células endoteliales activadas, macrófagos, células dendríticas y fibroblastos. Se une a algunas integrinas (VLA-1 y  $\alpha_4\beta_7$ ) y está implicada en la activación de los linfocitos por las células presentadoras de antígenos y en la migración linfocitaria.

PECAM-1 es expresada por células endoteliales, plaquetas, granulocitos y monocitos. En estos últimos se ha descrito que las propiedades adhesivas del PECAM-1 pueden ser reguladas por TGF- $\beta$ 1.

b) Selectinas: Las selectinas son una familia de receptores de adhesión que se encuentran en plaquetas, células endoteliales y leucocitos. Se conocen tres tipos de selectinas que presentan una distribución celular distinta: selectina E (endotelio), selectina P (plaquetas y endotelio) y selectina L (leucocitos).

La selectina L fue descrita por primera vez por GALLATIN, WEISSMAN y BUTCHER en 1983 como un receptor de homing (migración selectiva) para el linfocito. Participa en la entrada de linfocitos y fagocitos en los sitios de inflamación.

La selectina P es un receptor para neutrófilos y macrófagos. En la superficie de la célula endotelial, la selectina P inicia la fase más temprana de reclutamiento leucocitario a los sitios de inflamación. La expresión de la selectina P en plaquetas activadas es importante en el reclutamiento de los leucocitos a los trombos. Se ha encontrado que plaquetas activadas inducen la producción de anión superóxido por neutrófilos y monocitos a través de las interacciones de la selectina P, siendo esta producción inhibida por anticuerpos contra selectina P.

La selectina E es un receptor endotelial inducible que está implicado en la adhesión de neutrófilos, monocitos y subpoblaciones de células T en los tejidos inflamados, pero no en tejidos sanos. La expresión de selectina E en células endoteliales está regulada transcripcionalmente por las citocinas inflamatorias IL-1 o TNF- $\alpha$ , por neuropéptidos, así como por lipopolisacárido bacteriano. La inducción de la expresión de selectina E en células endoteliales puede ser bloqueada mediante incubación de las células con TGF- $\beta$  o IL-4.

c) Integrinas: La adhesión específica de unas células a otras o a la matriz extracelular es un componente básico de la migración y del reconocimiento celular y subyace a muchos procesos biológicos, incluidos la embriogénesis, la reparación de los tejidos y las respuestas inflamatorias e inmunitarias. La superfamilia de las integrinas consta de unas 30 proteínas con estructuras homólogas, que promueven las interacciones célula-célula o célula-matriz. Todas las integrinas son proteínas de la superficie celular heterodiméricas compuestas de dos cadenas polipeptídicas,  $\alpha$  y  $\beta$ , unidas por enlaces no covalentes. La cadena  $\alpha$  tiene entre 120 y 200 kDa, y la cadena  $\beta$  entre 90 y 100 kDa. El extremo N terminal de cada cadena forma una cabeza globular que contribuye a la unión entre la cadena y el ligando. Las cabezas globulares de las subunidades  $\alpha$  contienen dominios unidos por cationes divalentes, los cuales son

esenciales para la función del receptor de la integrina. Se conocen 16 subunidades  $\alpha$  y 8 subunidades  $\beta$  y se han identificado como mínimo 21 heterodímeros distintos. La población leucocitaria puede expresar 13 integrinas distintas del repertorio existente y 6 de ellas, pertenecientes a las subunidades  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  y  $\beta_7$ , son importantes en la interacción leucocito-endotelio. Entre las integrinas implicadas en interacciones leucocito-endotelio durante la adhesión y migración transendotelial, podemos destacar:

Mac-1, que es expresada por monocitos, macrófagos, granulocitos, células NK y subpoblaciones de linfocitos T y reconoce específicamente como ligandos a ICAM-1, fibrinógeno, C3bi, factor X, y factor B.

LFA-1 es la integrina expresada por todos los leucocitos y que se une a ICAM-1, ICAM-2 e ICAM-3. Desempeña un papel importante en la adhesión de los linfocitos a otras células, como las células accesorias y el endotelio vascular.

El receptor de adhesión leucocitaria p150,95 es expresado por monocitos, macrófagos, granulocitos y linfocitos T y B activados. Se une a fibrinógeno y a C3bi y se desconoce su ligando a células endoteliales.

VLA-4 es expresada en monocitos, linfocitos, timocitos, eosinófilos y precursores eritroides. En linfocitos es el receptor más importante para VCAM-1 y fibronectina.

Una característica general de las integrinas es su capacidad de ser moduladas funcionalmente por la activación fisiológica de la célula en que se expresan. Esta modulación funcional comprende cambios en la especificidad del ligando o, más a menudo, en la afinidad.

#### 6) Moléculas que intervienen en la regulación neuroinmuno-endocrina.

Distintos trabajos experimentales han puesto de manifiesto la presencia en las células del sistema mononuclear fagocítico de receptores específicos para neuropéptidos y hormonas, con características estructurales similares a los receptores encontrados en los tejidos neuroendocrinos (Tabla XIX). La expresión de estos receptores es variable, dependiendo de los factores que modulan la expresión de las moléculas HLA de clase II, así como del estado de activación del macrófago (GORDON et al., 1988).

TABLA XIX

Receptores para neuropéptidos y hormonas en células del sistema mononuclear fagocítico (SMF).

Célula del S.M.F.	Horm/Neurop.	Autor	Año
Mononucleares circulantes	Insulina	BLECHER y GOLDSTEIN	1977
Mononucleares circulantes	Glucagón	BLECHER y GOLDSTEIN	1977
Mononucleares circulantes	Somatomedina	ROSENFELD et al.	1979
Mononucleares circulantes	Somatostatina	BATHENA et al.	1981
Macrófagos hepáticos	GH	KOVER y MOORE	1984
Macrófagos peritoneales	$\beta$ -adrenérgico	ABRASS et al.	1985
Mononucleares circulantes	PTH	PERRY et al.	1984
Macrófagos alveolares	Bombesina	WIEDERMANN et al.	1986
Mononucleares circulantes	Sustancia P	BAR-SHAVIT y GOLDMAN	1986
Mononucleares circulantes	Neurotensina	BAR-SHAVIT y GOLDMAN	1986
Macrófagos alveolares	Cortisol	SHARMA et al.	1988
Monocitos circulantes	CCK-33	SACERDOTE et al.	1991
Macrófagos peritoneales de rata	VIP	SEGURA et al.	1991
Macrófagos peritoneales de ratón	VIP	CALVO et al.	1994

## 2.4. PRODUCTOS DE SECRECIÓN.

Los macrófagos tienen una importante capacidad secretora que fue demostrada primeramente por WEISSMAN, et al., 1971 y ALLISON, et al., 1975. Posteriormente, se ha confirmado la secreción por parte del macrófago de numerosas sustancias biológicamente activas (SELJELID, 1993), con una diversidad mayor que cualquier otra célula del sistema inmunitario. Hasta el momento, se han identificado más de 100 productos secretorios de los macrófagos (Tabla XX). Algunos de estos productos se pueden secretar individualmente como respuesta a estímulos específicos, mientras que otros son liberados en combinación como parte de una respuesta más generalizada. Algunos productos como la lisozima, los componentes del complemento y el peróxido de hidrógeno, tienen actividad antimicrobiana. Otros como las elastasas y las colagenasas, actúan licuando la matriz extracelular. Los macrófagos también secretan múltiples citocinas que influyen sobre el crecimiento y las actividades de otros tipos celulares. Estas citocinas incluyen factores estimulantes de colonias, factores de crecimiento de fibroblastos, prostaglandinas y péptidos quimiotrayentes (quimiocinas). A continuación se describen brevemente algunos de los más significativos:

### 1) Factor de necrosis tumoral $\alpha$ (TNF $\alpha$ ) (BEUTLER y CERAMI, 1989; VASSALLI, 1992).

Es una proteína que existe en una forma libre y también como molécula de membrana. Es producido por células T activadas, mastocitos y macrófagos tras la estimulación por endotoxinas bacterianas, factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF), IFN- $\gamma$  o IL-2. El TNF $\alpha$  fue descrito como factor tóxico para algunas células en cultivo, y es el causante de necrosis hemorrágica de tumores in vivo. En la actualidad se sabe que el TNF $\alpha$  es el principal mediador de la respuesta inmune frente a bacterias gramnegativas y que el estímulo más potente para su producción son los lipopolisacáridos bacterianos (LPS).

El TNF $\alpha$  ejerce numerosos efectos in vivo muy dependientes de su concentración. En concentraciones bajas actúa localmente como un mediador paracrino y provoca un aumento de la adhesividad de las células endoteliales de los vasos, activación leucocitaria y estimulación de la producción de IL-1, IL-6 e IL-8 en los fagocitos mononucleares. También coestimula la activación de linfocitos T y B. Cuando las cantidades de TNF $\alpha$  son mayores, éste actúa de modo endocrino y provoca acciones sistémicas. Así, estimula la producción de reactantes de fase aguda por el hígado y la producción de IL-1 e IL-6 en células del endotelio

**TABLA XX****Productos de secreción de los macrófagos.**

<b>Enzimas</b>	Lisozima Hidrolasas ácidas (proteasas, nucleasas, fosfatasas, lipasas, etc) Elastasa Colagenasa Activador del plasminógeno Enzima convertidora de angiotensina
<b>Mediadores</b>	Interferones (IFN alfa, IFN beta) Factores estimulantes de colonias (GM-CSF, G-CSF y otros) Interleucinas (IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12) Quimiocinas Factor de necrosis tumoral alfa Factor activador de plaquetas Factores angiogénesis Óxido nítrico Derivados del araquidonato (prostaglandinas, leucotrienos)
<b>Componentes del Complemento</b>	C1 a C9 Properdina Factores B, D, I, H.
<b>Factores de coagulación</b>	Factores V, VII, IX, X Protrombina Tromboplastina
<b>Especies reactivas de Oxígeno</b>	Peróxido de hidrógeno Anión superóxido Radicales hidróxilo
<b>Diversos</b>	Glutación Nucleósidos (adenosina, timidina, guanosina, etc)

vascular, activa el sistema de coagulación, induce fiebre y contribuye a la inducción del estado caquéctico. En la sepsis por bacterias gramnegativas se producen grandes cantidades de  $\text{TNF}\alpha$ , las cuales provocan coagulación intravascular diseminada (LENTZ et al., 1991), deprimen la contractilidad del miocardio y relajan el tono del músculo liso vascular contribuyendo a la disminución de la presión sanguínea.

Sobre los monocitos, el  $\text{TNF}\alpha$  induce un aumento de la expresión de moléculas de clase I del MHC y liberación de IL-1. Sobre las células T activadas (los linfocitos T en reposo carecen de receptores para el  $\text{TNF}\alpha$ ), incrementa el número de receptores para la IL-2. En presencia de esta última, el  $\text{TNF}\alpha$  incrementa la expresión de receptores para IL-2 en células NK y LAK, así como su capacidad citotóxica.

## 2) Interleucina 1 (IL-1).

Es la iniciadora principal de la cascada de citocinas que puede conducir a la activación linfocitaria e incluso a la respuesta inflamatoria (DINARELLO y MIER, 1987). Ejerce una amplia gama de efectos (activación de linfocitos T y B, macrófagos y neutrófilos, estimulación de la producción de IL-6, IL-8, e IL-2, adhesión de neutrófilos y monocitos a células endoteliales, etc.), en una extensa variedad de células. Las diferentes actividades de la IL-1 son el resultado de los efectos de dos proteínas diferentes ( $\text{IL-1}\alpha$  e  $\text{IL-1}\beta$ ) (DINARELLO y WOLF, 1993). A pesar de tener menos de un 30% de homología en su secuencia aminoacídica, ambas moléculas se unen a dos receptores muy similares entre sí (IL-1RI e IL-1RII) y tienen similares actividades biológicas (COOK et al., 1995). La IL-1 es segregada por muchos tipos de células tras su estimulación por diferentes señales activadoras. Los monocitos y los macrófagos secretan IL-1 en respuesta a productos bacterianos tales como endotoxinas, inmunocomplejos, fragmentos moleculares de degradación del complemento, en particular C5a, y citocinas como el M-CSF, el  $\text{TNF}\alpha$  y el  $\text{IFN}\gamma$ .

La IL-1 en bajas concentraciones tiene funciones inmunorreguladoras a nivel local, actuando como estímulo para la activación de células T, aumentando la proliferación de linfocitos CD4 y la diferenciación de células B. Además, induce el aumento de su propia síntesis y la producción de otras citocinas como IL-6 e IL-8 por monocitos y células endoteliales, IL-6 por fibroblastos o IL-2 por células T.

En concentraciones mayores, la IL-1 ejerce acción endocrina y provoca, a nivel sistémico, algunos de los efectos que produce el  $\text{TNF}\alpha$  (fiebre, síntesis de proteínas de fase

aguda y caquexia). Por otro lado, tiene efectos diferentes a los del  $\text{TNF}\alpha$ , ya que no incrementa la expresión de moléculas del MHC, ni inhibe el crecimiento de las células hematopoyéticas de médula ósea, sino que potencia las acciones de los CSF. Por último, la acción de IL-1 es más potente que la del  $\text{TNF}\alpha$  como coestimulador de las respuestas de los linfocitos T.

Recientemente han sido aislados de orina humana inhibidores naturales de la IL-1 (SECKINGER et al., 1987). Por otra parte, también se ha descrito anticuerpos naturales contra IL-1 así como contra  $\text{TNF}\alpha$  (SVENSON et al., 1989).

### 3) Interleucina 6 (IL-6).

Es una citocina producida en grandes cantidades por el macrófago. Originariamente llamada interferón  $\beta_2$ , ha sido estudiada principalmente por su efectos como factor de crecimiento sobre varios tipos de células (VAN DAMME et al., 1987), especialmente células B. De forma similar a la IL-1 y al TNF, induce fiebre y la síntesis de proteínas de fase aguda por el hígado (GAULDIE et al., 1987).

Además del macrófago, esta glucoproteína es producida por diversos tipos celulares tras su activación por virus, IL-1 o  $\text{TNF}\alpha$ . El receptor de IL-6, CD126, está presente en células T en fase quiescente y su expresión no aumenta tras la estimulación antigénica (HIRANO, 1994). Por el contrario, las células B en reposo carecen de receptores para IL-6, adquiriéndolos después de su activación. La IL-6 favorece la diferenciación de células B humanas y precisa de la IL-2, aunque sea en cantidades mínimas, para ejercer su acción favorecedora de la diferenciación de las células B. La IL-6 también actúa como coestimulador de la activación de las células T y de los timocitos. Por otra parte, también actúa sobre los hepatocitos estimulando la síntesis de diferentes proteínas plasmáticas, como el fibrinógeno, que contribuye a la respuesta inflamatoria de fase aguda.

### 4) Interleucina 10 (IL-10).

Es una citocina de 18 kDa producida por la subpoblación  $T_H2$  de las células cooperadoras  $CD4^+$ , por algunas células B activadas, por células  $T_H1$ , por macrófagos activados y por algunas células no linfocíticas (los queratinocitos). Las dos actividades principales de la IL-10 son inhibir la producción de citocinas (TNF, IL-1, IL-8 e IL-1) por los

macrófagos, e inhibir las funciones accesorias de los macrófagos en la activación de la célula T. Este último efecto se debe a la expresión reducida de moléculas de clase II del CMH y a la expresión reducida de ciertos co-estimuladores. El efecto neto de estas acciones es la inhibición de la inflamación mediada por la célula T (MOORE et al., 1993)

### 5) Factores de crecimiento.

El macrófago produce factores estimuladores de la hematopoyesis, conocidos como factores estimuladores de colonias (CSF). Los CSF son glucoproteínas que intervienen en la proliferación, diferenciación y supervivencia de las diferentes células hematopoyéticas y estimula ciertas funciones de estas células. Los CSF más importantes secretados por el macrófago y con más relevancia en la clínica son:

a) Factor estimulante de colonias de la línea granulocítica (G-CSF). Es una glucoproteína constituida por una cadena de polipéptidos de 177 aminoácidos (HOLLIGSHEAD y GOA, 1991) cuyo gen está localizado en el brazo corto del cromosoma 17. Su función consiste en regular la actividad de los granulocitos neutrófilos. Además de producirlo los macrófagos y monocitos, también es producido por los fibroblastos y células endoteliales de la médula ósea y, en menor proporción, por el hígado y el bazo. Actúa sobre la línea granulocito-monocito, induciendo la producción de neutrófilos maduros. Se estimula indirectamente por la endotoxina, por lo que aumentan sus niveles séricos en las infecciones tanto en pacientes neutropénicos como con leucocitos normales. Desde el punto de vista funcional, aumenta ligeramente la quimiotaxis de los neutrófilos por expresión de los receptores quimiotácticos, induciendo fagocitosis y destrucción bacteriana en los lugares de infección e inflamación (LIESCHKE y BURGESS, 1992).

b) Factor estimulante de colonias granulocito-macrófago (GM-CSF). Es un factor multilínea hematopoyético, que aumenta la producción de granulocitos y monocitos-macrófagos, a diferencia del anterior que sólo tiene una actividad limitada a la línea granulocítica (GRANT y HEEL, 1992). El GM-CSF es una glucoproteína de 22 kDa sintetizada por las células T activadas, por los fagocitos mononucleares activados, por las células endoteliales y por los fibroblastos. El GM-CSF del ratón actúa básicamente en los progenitores de la médula ósea ya comprometidos en el desarrollo a leucocitos. Sin embargo, en los humanos, el GM-CSF también promueve la proliferación de células que todavía no se han comprometido en evolucionar a leucocitos (plaquetas y progenitores de hematíes). El GM-CSF aumenta la expresión de moléculas de adhesión, estimula la actividad antifúngica de

monocitos, la producción de anión superóxido y estimula a las células dendríticas. Además, estimula la presentación de antígenos por los monocitos y macrófagos y aumenta la respuesta de células T a la IL-2.

El GM-CSF no se detecta en la circulación y probablemente actúa localmente en los lugares en que se produce. De este modo, en los tejidos periféricos el GM-CSF producido por las células T y los macrófagos pueden intervenir en la activación de los leucocitos maduros en los lugares donde se produce una respuesta inmunitaria inflamatoria, mientras que los efectos hematopoyéticos pueden estar mediados por el GM-CSF producido por las células T, las células endoteliales y los fibroblastos de la médula ósea.

c) Factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF). El M-CSF, también llamado CSF-1, es sintetizado por los macrófagos, por las células endoteliales y por los fibroblastos. El polipéptido secretado tiene aproximadamente 40 kDa y forma un dímero estable. El M-CSF actúa básicamente sobre aquellos progenitores ya comprometidos en el desarrollo a monocitos que probablemente son más maduros que las células sobre las que actúa el GM-CSF. El M-CSF no se encuentra en sangre circulante y el principal efecto estimulante de colonias puede derivar de la producción local dentro de la cavidad medular.

## 6) Proteínas del complemento.

Los macrófagos de los animales superiores producen los componentes esenciales del sistema del complemento, incluyendo las proteínas reguladoras, las cuales, inhiben la activación del complemento en múltiples pasos (WHALEY, 1980; HETLAND et al., 1986; HETLAND y ESKELAND, 1987). Ha sido demostrado que esta producción de factores del complemento por parte de los macrófagos es funcional y que puede formar complejos de ataque ensamblándose a la membrana celular, así como servir de opsonina.

Dentro de los factores más importantes secretados por el macrófago podemos destacar, el C2, C3, C4 y C5 de la vía clásica y el Factor B y la properdina de la vía alternativa, importantes todos ellos en la respuesta precoz inespecífica contra la infección (ROSENSTREICHT, 1981).

## 7) Factores de coagulación.

En el año 1978, PRYDZ y ALLISON demostraron la secreción de tromboplastina por parte de los monocitos y los macrófagos. La actividad de esta sustancia es estimulada muy

intensamente por pequeñas cantidades de LPS, siendo este fenómeno fundamental en la patogénesis del shock séptico y en la coagulación intravascular diseminada. También ha sido descrita la producción por los macrófagos de otros factores de la coagulación, como el factor X, Xa, VII, V y posiblemente el factor II (OSTERUD et al., 1981; LINDAHL et al., 1982). Los macrófagos poseen actividad protrombinasa en su membrana plasmática (LINDAHL et al., 1989) y de este modo son capaces de generar trombina.

#### 8) Enzimas.

También podemos enumerar como productos de secreción del macrófago numerosas enzimas, fundamentalmente hidrolíticas, bien hidrolasas ácidas, tales y como la catepsina y la hialuronidasa, que son intralisosomales pero que se liberan cuando el macrófago es activado, bien proteasas, como la elastasa, la colagenasa y el factor activador del plasminógeno. La lisozima es otra proteína con actividad enzimática que hidroliza el peptidoglicano de la pared bacteriana.

#### 9) Los interferones de tipo I (IFN tipo I).

En 1957 se descubrió que células expuestas a virus inactivados producen un factor soluble que puede interferir con la replicación viral cuando se aplica a células recientemente infectadas. A este factor soluble se le denominó interferón. Desde entonces, se ha visto que los interferones constituyen una gran familia de proteínas secretoras que tienen en común no sólo su actividad antiviral, sino también la propiedad de modular la respuesta inmunitaria.

Los INF tipo I comprenden dos grupos de proteínas serológicamente diferentes. El primer grupo, denominado genericamente IFN- $\alpha$ , es una familia de aproximadamente 20 polipéptidos estructuralmente relacionados, de unos 18 kDa y cada uno codificado por un gen distinto. La principal fuente celular para la producción del IFN- $\alpha$  es el fagocito mononuclear. El segundo grupo consta de un solo producto genético, una glucoproteína de 20 kDa llamada IFN- $\beta$ . La fuente habitual de aislamiento del IFN- $\beta$  son los fibroblastos cultivados.

Ambos interferones interactúan con un mismo receptor. Sus principales acciones biológicas son la inhibición de la replicación vírica mediante la inducción en las células diana de un estado de resistencia a la infección vírica y la inhibición de la proliferación celular. Los

interferones aumentan el potencial lítico de las células NK y de los monocitos, aumentan la expresión de moléculas de clase I e inhiben la expresión de moléculas de clase II.

## 2.5. BIOQUÍMICA Y FUNCIÓN DEL MACRÓFAGO.

### 2.5.1. Bioquímica del macrófago.

El monocito de la sangre (Fig.7) es una célula que tiene su origen en la médula ósea y que pasa el mayor tiempo de su vida en los tejidos como macrófago. La transformación de monocito en macrófago (Fig.8) está acompañada de cambios en la estructura, composición y metabolismo celular. Después de entrar el monocito en el tejido, aumenta de tamaño y puede alcanzar cinco a diez veces el diámetro celular original. Al aumentar el tamaño, los gránulos densos y otras estructuras citoplasmáticas se vuelven más numerosos. Los gránulos densos son lisosomas que aumentan de número a medida que la célula madura. Junto a estos cambios morfológicos se producen los aumentos esperados en las enzimas lisosómicas, incluida la fosfatasa ácida, la  $\beta$ -glucuronidasa, la captosina, y la lisozima (CLINE, 1970). Así, al diferenciarse el monocito en macrófago, incrementa su arsenal de enzimas hidrolíticas. Este rico surtido de hidrolasas ácidas parece apropiado, para una célula que tiene entre otras funciones, la de la fagocitosis y la lisis de parásitos intracelulares (KAUFMANN, 1995).

La transición desde el monocito al macrófago, está también caracterizada por incrementos en el número de mitocondrias, la actividad de enzimas mitocondriales y el grado de respiración celular. El grado de la oxidación de la glucosa y la producción de ácido láctico, aumentan también con la maduración celular. Con la excepción del macrófago alveolar, los macrófagos son fagocitos incluso en condiciones anaerobias.

Para eliminar a los agentes patógenos, las células del sistema mononuclear fagocítico desarrollan mecanismos destructivos clasificados en oxígeno-independientes (variaciones de pH y activación de enzimas lisosómicas y defensinas que requieren la formación del fagolisosoma) y en oxígeno-dependientes, en los que no es imprescindible la unión del lisosoma al fagosoma. Los principales mecanismos destructivos son el complejo enzimático NADPH oxidasa, la formación del óxido nítrico y las proteínas quinasas activadas por mitógenos.

Las células fagocíticas contienen, entre otros, un complejo sistema enzimático denominado NADPH oxidasa que es el responsable de la producción de especies oxidantes tóxicas (ROI). Este complejo transfiere electrones desde el NADPH al oxígeno ( $O_2$ ),

formando anión superóxido ( $O_2^-$ ) (TSUNAWAKY y NATHAN,1984), el cual, puede dismutar a peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). Así mismo, pueden ser formados otros componentes como radicales hidróxilo ( $OH^\cdot$ ), e iones hipoclorito ( $OCl^-$ ) con gran capacidad bactericida.

Está establecido que los macrófagos sufren también un estallido respiratorio durante la fagocitosis o tras la estimulación con diversos agentes. Sin embargo, la liberación de los aniones antes enumerados es menor de la observada en los neutrófilos. Las bases enzimáticas del estallido respiratorio de los macrófagos son menos conocidas que en los neutrófilos, debido a una mayor complejidad que deriva de las variaciones entre distintas especies y de la localización y el estado de activación de las células.

### 2.5.2. Funciones del macrófago.

Las funciones de los fagocitos mononucleares pueden englobarse en tres aspectos dependiendo del tipo de inmunidad que desarrollen: 1) la inmunidad natural, 2) la inmunidad específica y 3) la respuesta frente a los tumores.

1) Las principales funciones de los macrófagos en la inmunidad natural son las siguientes:

a) Los macrófagos fagocitan partículas extrañas, como los microorganismos, macromoléculas, incluidos los antígenos, e incluso tejidos propios lesionados o muertos. El reconocimiento de forma inespecífica de las sustancias extrañas y de tejidos lesionados puede implicar a receptores para fosfolípidos y azúcares, pero no se conoce el mecanismo exacto (EDWARDS y WATSON, 1995).

La fagocitosis consta de dos etapas bien diferenciadas: primero, la unión entre la célula fagocítica y la partícula que debe ser fagocitada, y después, la ingestión de la misma. La fagocitosis es un proceso activo que precisa energía. Además una ingestión óptima requiere la presencia de iones  $Ca^{++}$  y  $Mg^{++}$ . La mayoría de las bacterias, para ser fagocitadas, deben ser previamente preparadas por medio de un fenómeno conocido como opsonización. Las opsoninas son sustancias que favorecen la unión entre las bacterias y las células fagocíticas y su posterior ingestión. Los factores séricos fundamentales implicados en el fenómeno de opsonización son el complemento y las inmunoglobulinas de la clase IgG. Las sustancias fagocitadas son degradadas dentro de los macrófagos por enzimas lisosomales. Estas células, al ejercer su función, son capaces de producir enzimas (hidrolasas ácidas), especies reactivas de oxígeno, óxido nítrico (NO) y mediadores lipídicos derivados de prostaglandinas. Todos

estos compuestos sirven para matar microorganismos y controlar la diseminación de las infecciones.

b) Los macrófagos son capaces de secretar una gran cantidad de sustancias, que atraen a otras células inflamatorias, especialmente neutrófilos, y son responsables de muchos de los efectos sistémicos de la inflamación. Algunas de estas sustancias parecen estar implicadas en la respuesta de fase aguda y en la regulación de la hematopoyesis.

2) Los fagocitos mononucleares también desarrollan funciones como células accesorias y efectoras en las respuestas inmunitarias. Desempeñan las siguientes funciones en la fase de reconocimiento, activación, efectora y reguladora de la inmunidad específica:

a) Las respuestas inmunitarias esencialmente contra todos los antígenos proteicos, requieren el procesamiento y la presentación inicial del antígeno a las células T por parte de las células presentadoras de antígeno (APC). La razón de este requerimiento es que las células T sólo reconocen antígenos extraños cuando éstos se fragmentan primero en péptidos cortos, que luego se presentan en relación con proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad.

Los macrófagos muestran antígenos extraños sobre su superficie, de tal forma que pueden ser reconocidos por los linfocitos T específicos para el antígeno. Los macrófagos también expresan proteínas que promueven la activación de las células T, de este modo actúan como células accesorias de la activación linfocitaria.

b) En la fase efectora de la respuesta inmunitaria celular, las células T estimuladas por el antígeno secretan citocinas que activan a los macrófagos. Tales macrófagos activados son más eficaces en la realización de sus funciones fagocítica, degradativa y citolítica que los no estimulados, y por ello destruyen con mayor eficacia los antígenos fagocitados.

c) En la fase efectora de la respuesta inmunitaria humoral, los antígenos extraños, se cubren u opsonizan por anticuerpos y proteínas del complemento. Debido a que los macrófagos expresan receptores de superficie para la región constante de los anticuerpos y para ciertas proteínas del complemento, se unen y fagocitan con mayor avidez estas partículas opsonizadas.

d) Los macrófagos también desempeñan un papel crucial como reguladores de la respuesta inmune específica, función que desarrollan a través de íntimas interacciones con los linfocitos (ROSENSTREICH, 1981), mediante secreción de proteínas y la generación de fragmentos con carácter inmunogénico, los cuales pueden ser utilizados para la activación o inducción a la muerte programada de los linfocitos T, B y NK (BUTTKE y SANDSTROM, 1994; HANSSON et al., 1996; MUNN et al., 1996)

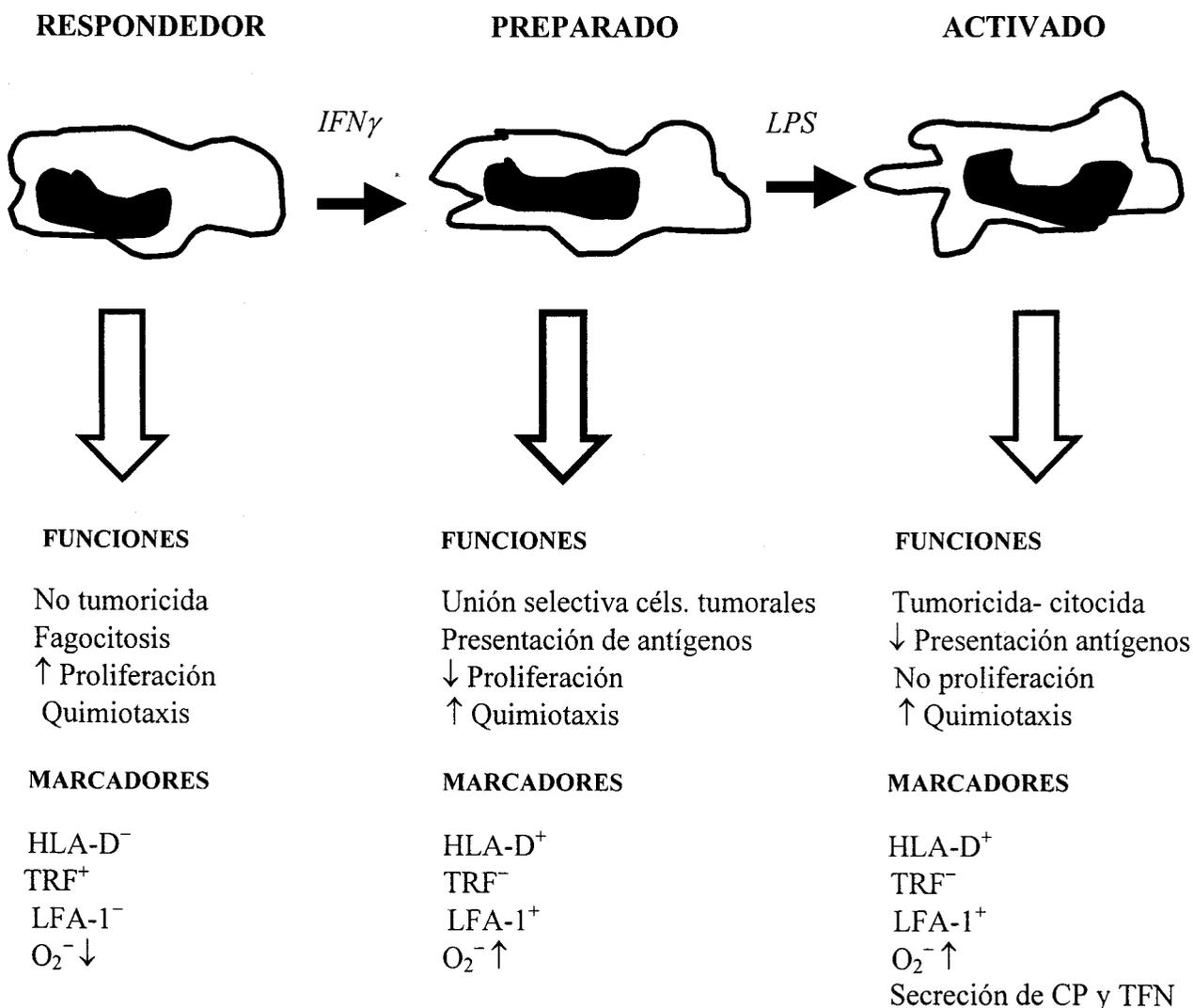
3) Los macrófagos desempeñan un papel importante en la citotoxicidad contra los tumores. Con frecuencia, los macrófagos se encuentran infiltrados en tumores para de esta forma llevar a cabo la defensa del huésped contra las células tumorales, ya sea inhibiendo la división de las células tumorales o contribuyendo a su eliminación. Parece que la forma en que los antígenos tumorales son procesados por las células accesorias y presentados a las células T, es fundamental para el desarrollo de una respuesta inmune frente al tumor. Varios trabajos han demostrado que los macrófagos obtenidos de portadores de tumores presentan una marcada inhibición funcional *in vitro* e *in vivo*, por lo que necesitan ser reactivados con  $\text{IFN}\gamma$  y/o factores activadores de macrófagos (MAF) para recuperar la función tumoricida y de célula accesoria (FERNANDEZ-CRUZ, 1985). Además, los macrófagos activados requieren que el sistema inmune del portador del tumor esté intacto para poder inducir el rechazo tumoral, lo que sugiere que actúan como células accesorias potenciando los mecanismos específicos de inmunidad celular del huésped frente al tumor (FERNANDEZ-CRUZ, 1985).

## 2.6. ESTADOS DE DIFERENCIACIÓN Y ACTIVACIÓN DEL MACRÓFAGO.

Los macrófagos tisulares, son aún células con gran capacidad de diferenciación, pues todavía no han adquirido la suficiente inmunocompetencia que les permite desarrollar sus capacidades funcionales (HAMILTON y ADAMS, 1987). Es conocido que los macrófagos pueden presentarse en tres estados diferentes: 1) residentes, 2) inflamados y 3) activados (Fig.10).

1) Los macrófagos residentes son aquellos obtenidos de animales no tratados previamente con agentes inflamatorios ni inmunógenos. Representan una población celular quiescente, que se asemeja morfológicamente y en competencia fagocítica a los monocitos. Si se produce una estimulación adecuada, se pueden inducir modificaciones importantes en su fisiología y pueden evolucionar a macrófagos inflamados y/o activados (ADAMS y HAMILTON, 1984).

2) Los macrófagos inflamados o estimulados, son aquellos que se obtienen de los sitios de inflamación no mediada inmunológicamente. Cuando surge un estímulo inflamatorio, los macrófagos residentes proliferan y se expanden. Se origina una estimulación metabólica que



**Fig. 10.-** Modelo esquematizado del proceso de activación del macrófago. ↑: incremento; ↓: disminución; HLA-D: antígeno de histocompatibilidad de clase II. LFA-1: antígeno de función linfocitaria -1; TRF: receptor de transferrina; O<sub>2</sub><sup>-</sup>: anión superóxido; CP: proteasa citolítica; TFN: factor de necrosis tumoral. (Tomado de HAMILTON y ADAMS, 1987 Immunology Today).

da lugar a cambios morfológicos y funcionales. Los macrófagos se transforman en células de mayor tamaño, con mayor contenido en hidrolasas ácidas, mayor secreción de proteasas neutras y con un incremento del metabolismo oxidativo, produciéndose gran cantidad de ión superóxido, aunque no de peróxido de hidrógeno (COHN, 1978), alcanzando mayor competencia para la quimiotaxis y la fagocitosis. Los macrófagos inflamados se suelen obtener de la cavidad peritoneal de animales de experimentación, a los que previamente se les ha inyectado intraperitonealmente algún agente inflamatorio no microbiano, como caseína estéril, peptona, aceite mineral o glucógeno.

3) El término macrófago activado fue introducido por MACKANESS (1969) para describir los cambios adaptativos intrínsecos que permiten a estas células expresar su capacidad funcional. La activación de los macrófagos puede definirse como la adquisición de inmunocompetencia para completar una función, que es amplia y compleja. Ésta incluye fenómenos de fagocitosis, de procesamiento y presentación de antígenos, de lisis de parásitos intracelulares (KAUFMANN, 1995), así como la destrucción de células tumorales (FERNANDEZ-CRUZ et al., 1985) y control de la respuesta inmune (BUTTKE y SANDSTROM, 1994).

Este estado de activación de los macrófagos se consigue mediante dos mecanismos inductores diferentes: el primero es la activación debida a productos microbianos, entre los que destacan el muramil dipeptido (MDP), la trehalosa dimicolato (TDM), la endotoxina (LPS) y diversos polímeros de carbohidratos como los  $\beta$ -glucanos. El segundo mecanismo de activación sería el mediado por citocinas. En esta segunda forma destacan los MAF producidos por linfocitos T como consecuencia del reconocimiento antigénico sobre la superficie del macrófago. Además de estos MAF, entre los que destaca el  $\text{IFN}\gamma$  (MARTIN y EDWARDS, 1994), las células  $\text{CD4}^+$  producen otras citocinas, como la IL-2 o el factor inhibidor de la migración macrofágica (MIF), que controlan la proliferación linfocitaria o la presencia de células fagocíticas en el lugar de la activación, respectivamente.

El macrófago activado sufre un gran cambio metabólico que le hace incrementar enormemente la producción de ión superóxido y de peróxido de hidrógeno, a la vez que pierde su capacidad proliferativa. También tienen propiedades bioquímicas diferentes de las células no activadas (KARNOVSKY y LAZDINS, 1978). Así, se ha descrito:

a) Incremento de determinadas actividades enzimáticas, como lactato deshidrogenasa, fosfatasa ácida, catepsina D. Sin embargo, la actividad 5'-nucleotidasa disminuye en un 50% (COOPER et al., 1984).

- b) Cambios en el metabolismo celular, como el aumento del transporte de glucosa, de la producción de lactato, de la oxidación de la glucosa por la vía de las hexosas monofosfatos (STUBBS et al., 1973), de la fructosa 2,6-bisfosfato y de la fosfofructoquinasa-2 (BUSTOS y SOBRINO, 1990).
- c) Aumento de la secreción del activador del plasminógeno (ROSENSTREICHT, 1981), de los antígenos de superficie y de la expresión de receptores (GORDON et al., 1988).
- d) Modificación de las moléculas expresadas en su membrana, apareciendo los antígenos de histocompatibilidad de la clase II (HLA-D) y desapareciendo el receptor de transferrina.

## OBJETIVOS

Varios estudios han implicado al VIP como péptido inmunoregulador y han sido identificados receptores específicos de alta afinidad en diversas células del sistema inmune, entre ellas el macrófago. Dichos receptores han sido caracterizados funcionalmente usando  $^{125}\text{I}$ -VIP como radioligando en experimentos de unión y molecularmente mediante experimentos de "cross-linking" covalente. Se ha evidenciado que la acción del VIP esta mediada por la activación de la adenilato ciclasa, produciéndose un incremento de los niveles intracelulares de AMPc. Diversos trabajos realizados en ratones han demostrado que el VIP modula diferentes funciones de células del sistema inmune de este animal, así como demuestran la existencia de receptores para VIP en linfocitos y en células T de ratón. Sin embargo, no existe evidencia respecto a la presencia de receptores para el VIP en macrófagos murinos.

Por otra parte, han sido descritos diferentes antagonistas para el VIP, y se han realizado estudios para demostrar este efecto antagonista en diferentes órganos de diversos animales. Sin embargo, con respecto a los antagonistas para el VIP en células del sistema inmune, existe muy poca información disponible.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, se pensó realizar este trabajo de investigación, con la intención de comprobar las siguientes hipótesis:

- a) La existencia en los macrófagos peritoneales de ratón de receptores específicos para VIP.
- b) Demostrar que el AMPc es el segundo mensajero del VIP en los macrófagos peritoneales de ratón.
- c) Demostrar el efecto de los antagonistas específicos del VIP en el macrófagos peritoneal de ratón.

Para llevar a cabo los puntos anteriormente enumerados es necesario proponer los siguientes OBJETIVOS FUNDAMENTALES:

- I) Caracterización funcional de los receptores para el VIP en el macrófago peritoneal de ratón.
- II) Caracterización del sistema efector del VIP en el macrófago peritoneal de ratón.
- III) Caracterización molecular de los receptores para el VIP en el macrófago peritoneal de ratón.
- IV) Caracterización del sistema receptor-efector antagonista del VIP en el macrófago peritoneal de ratón.

**MATERIAL Y METODO.**

## 1. MATERIALES.

### 1.1. REACTIVOS.

Todos los reactivos fueron de grado analítico y en su mayor parte fueron suministrados por los siguientes laboratorios:

El VIP sintético de rata, PHI porcino, GRF de rata, octapéptido de colecistoquinina (CCK 26-33), pancreastatina porcina, helodermina, secretina, somatostatina y los antagonistas del VIP (4-Cl-D-Phe<sup>6</sup>, Leu<sup>17</sup>) VIP y (Ac-Tyr<sup>1</sup>, D-Phe<sup>2</sup>)GRF<sub>1-29</sub>-NH<sub>2</sub>, fueron suministrados por Peninsula Laboratories Europe (Merseyside, UK).

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

La leupeptina, fenil-metil-sulfonil-fluorido (PMSF) y N<sub>α</sub>-p-tosil-L-lisina clorometil cetona (TLCK), provenían de Boehringer Mannheim GmbH (Germany).

La bacitracina, albúmina sérica bovina (fracción V), 3-isobutil-1-metil-xantina (IBMX), etilen-diamino-tetraacetato sódico (EDTA), N-(2-hidroxietil)piperacina-N'-(ácido 2-hidroxi-propanosulfónico) (HEPES), Tris (Trihidroximetilaminometano), (-)-isoproterenol y D,L-propranolol, fueron suministrados por Sigma Chemical (St. Louis, MO, USA).

El reactivo de Bradford, los productos químicos para la electroforesis y los estándares de masa molecular, fueron suministrados por Bio Rad Laboratories (Richmond, USA).

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

El <sup>125</sup>INa (IMS 30, 100 mCi/ml) y el kit para radioinmunoanálisis de AMPc (RPA 509) fueron suministrados por Radiochemical Center (Amersham, UK).

La caseína provenía de Difco, Detroit, Michigan, USA.

Eter, ácido acético, metanol y NH<sub>4</sub>OH provenía de Fluka (Buchs, Switzerland).

### 1.2. APARATOS.

Los principales aparatos utilizados han sido los siguientes:

- Las microfugas utilizadas fueron la modelo E<sup>TM</sup> de Beckman y la 2K15 de Sigma.
- Centrífuga Beckman TJ-6.
- Centrífuga Dupont RC5C Giralt.
- Agitador Heidolph REAX 2000.
- Baño Unitronic 320 OR.

- Espectrofotómetro LKB Biochrom Ultrospec II E.
- Contador de radioactividad gamma LKB 1261 Multigamma.
- Congelador  $-80^{\circ}\text{C}$  REVCO ULT-790-7-VBA.
- Estufa P-Selecta Ref. S-381 mod. 381.
- Sonicador MSE.

### 1.3. ANIMALES.

Se usaron ratones Swiss macho, de edades comprendidas entre 6-8 semanas, de aproximadamente 50 gr de peso, nacidos y criados en el animalario de la Facultad de Medicina. Todos los animales recibieron agua y comida (Purina rat chow) ad libitum y fueron mantenidos bajo condiciones constantes de temperatura ( $22^{\circ}\text{C}$ ) y humedad (45%). Así como a un ciclo controlado de luz-oscuridad con 14 horas de luz y 10 de oscuridad.

## 2. MÉTODOS.

### 2.1. OBTENCIÓN DE MACROFAGOS PERITONEALES DE RATÓN.

Para la obtención de los macrófagos peritoneales de ratón seguimos el método utilizado por TSUNAWAKI y NATHAN (1984), introduciendo algunas modificaciones.

#### 2.1.1. Reactivos:

- Solución salina: NaCl 0'9% (p/v) en agua destilada.
- Caseinato sódico al 6% (p/v): en un vaso de precipitado conteniendo 6 g de caseína, añadimos 90 ml de agua destilada y 3 lentejas de NaOH, se agita en caliente hasta que se consiga su completa disolución. Completamos el volumen hasta 100 ml de agua destilada y distribuimos el contenido en recipientes de vidrio para proceder a su esterilización en el autoclave a  $121^{\circ}\text{C}$  y 1 atmósfera de presión durante 20 minutos. Posteriormente el caseinato sódico esterilizado se almacena a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.
- NaCl 0'2% (p/v) en agua destilada.

### 2.1.2. Método:

Los animales eran inyectados intraperitonealmente, cuatro días antes de la recogida de las células peritoneales, con 2 ml de caseinato sódico al 6% estéril, procurando mantener la asepsia necesaria para evitar infecciones. Una vez transcurridos los 4 días, se anestesia al animal con éter, se le decapita y se le desangra. Se le realiza una incisión en la pared abdominal, a través de la cual se introducen 5 ml de solución salina fría y se lava la cavidad peritoneal aplicándole un suave masaje al abdomen del animal. Con una pipeta de 1 ml se recupera la solución que contiene las células peritoneales y se vierte en un tubo cónico de vidrio de 10 ml. Se centrifuga 10 minutos a 600 xg, a 4 °C. Se desecha el sobrenadante y se resuspende el sedimento en 1 ml de NaCl 0'2% frío, se incuba durante 30 segundos a 4 °C con el fin de producir la lisis osmótica de los hematíes contaminantes. Se restaura la osmolaridad con 9 ml de solución salina y se vuelve a centrifugar a 600 xg durante 10 minutos a 4 °C. Se desecha el sobrenadante y se resuspende el sedimento celular en 1 ml de solución salina. Se procede al conteo, comprobación de la viabilidad celular y ajuste a la concentración celular que se desee. Las células que se obtuvieron mediante este proceso se utilizaron inmediatamente para el experimento.

## 2.2. ESTUDIO DE LA VIABILIDAD CELULAR Y CONTAJE.

Una vez que se han obtenido las preparaciones celulares, se procede al estudio de la viabilidad celular. Para llevarlo a cabo se ha utilizado el método de la exclusión del azul de Tripán (HATHWAY et al., 1964), el cual se fundamenta en que las células viables no son penetradas por este colorante, excluyéndolo, en cambio las células no viables si son penetradas por el colorante, apareciendo al microscopio teñidas de azul.

### 2.2.1. Reactivos:

- Azul de Tripán al 1% en solución salina.
- TB: Tris 50 mM, BSA 2% (p/v), pH 7'5.

### 2.2.2 Método:

Se utiliza una alícuota de 50  $\mu\text{l}$  de la suspensión celular que se diluye en 350  $\mu\text{l}$  de TB, posteriormente se añade 100  $\mu\text{l}$  de la solución de azul tripán y se agita suavemente. Se ha producido así una dilución 1:10 de la preparación celular. Tras una incubación de 3 minutos a temperatura ambiente, se toma una alícuota de 20  $\mu\text{l}$  con la que se carga por capilaridad la cámara de Fuchs-Rosenthal y se observa al microscopio a 20x. La extensión celular aparece enmarcada por los cuadrados de la retícula de la cámara. Contamos el número de células, teñidas o no, que hay en 4 cuadrados y se calcula la media de células por cuadrado y el porcentaje de las células que son viables (no teñidas de azul).

El área de cada uno de los cuadrados de la cámara de Fuchs-Rosenthal es de 0'25  $\text{mm}^2$  y, como sabemos que desde el fondo del cuadrado hasta el cubre hay 0'2 mm, el volumen en el que están las células de cada cuadrado que hemos contado será 0'0125  $\mu\text{l}$ , o lo que es lo mismo: 1/ 80.000 ml. Así, para calcular el número de células que hay en 1 ml multiplicamos por 80.000 el número medio de células por cuadrado y el resultado de esta operación lo volvemos a multiplicar por 10, que era el número de veces que previamente habíamos diluido la preparación celular.

### 2.3. IDENTIFICACIÓN CELULAR Y RECUENTO DIFERENCIAL.

La identificación de los tipos celulares que estaban presentes en la suspensión celular obtenida por lavado peritoneal del ratón, se llevó a cabo mediante las técnicas de tinción de Giemsa y Papanicolau, siguiendo los criterios morfológicos de WINTROBE (1974).

#### 2.3.1. Reactivos:

- Solución salina.
- Alcohol etílico al 50% en agua destilada.
- Fijador para citodiagnóstico "Merckofix".
- Alcohol etílico absoluto.
- Alcohol metílico absoluto.
- Xilol.
- Xilol-Etanol (1:1).

- Alcohol etílico en agua destilada al 50%, 70%, 80% y 95% (v/v).
- Solución de Giemsa.
- Hematoxilina de Harris.
- Anaranjado G 6.
- Ácido clorhídrico al 0'25% en agua destilada

### 2.3.2. Método:

Parte de la preparación celular obtenida se diluye 1:1 en alcohol etílico 50% en un tubo cónico de vidrio de 10 ml y se agita suavemente. A continuación se centrifuga durante 10 minutos a 600 xg, se desecha el sobrenadante, se resuspende el sedimento celular en 500 µl de solución salina fría y se realizan dos frotis de la suspensión celular en sendos portaobjetos. Uno de los portas se deja secar a temperatura ambiente, sin fijación previa, para después ser teñido con el colorante de Giemsa y el otro se fija con fijador para citodiagnóstico, se deja secar a temperatura ambiente y se colorea con la tinción de Papanicolau.

Técnica de Papanicolau: El frotis fijado con fijador para citodiagnóstico se introduce sucesivamente durante el tiempo indicado en:

- |                                   |                            |
|-----------------------------------|----------------------------|
| 1- Etanol 80% (30 s)              | 2- Etanol 70% (30 s)       |
| 3- Etanol 50% (30 s)              | 4- Agua destilada (30 s)   |
| 5- Hematoxilina de Harris (4 min) | 6- Agua destilada (30 s)   |
| 7- HCl 0'25 % (sumergir 6 veces)  | 8- Agua corriente (6 min)  |
| 9- Agua destilada (30 s)          | 10- Etanol 50% (30 s)      |
| 11- Etanol 70% (30 s)             | 12- Etanol 80% (30 s)      |
| 13- Etanol 95% (30 s)             | 14- Anaranjado G 6 (90 s)  |
| 15- Etanol 95% (2 min)            | 16- EA 50 (90 s)           |
| 17- Etanol 95% (90 s)             | 18- Etanol absoluto (30 s) |
| 19- Xilol -Etanol (30 s)          | 20- Xilol (30 s)           |

Una vez efectuada la coloración, los frotis se montan en bálsamo de Canadá y son cubiertos por un cubreobjetos. La hematoxilina de Harris tiñe los núcleos en violeta o gris azulado. El anarajando G 6 tiñe el citoplasma de las células eosinófilas de color rosa-anaranjado y el de las células cianófilas de color azul-verdoso.

Técnica de Giemsa: Se lleva a cabo en 5 pasos:

1. Cuando el frotis se ha secado a temperatura ambiente, se fija con metanol durante 3 minutos.
2. A continuación se desecha el metanol escurriendo el porta y se deja secar a temperatura ambiente.
3. Se recubre el frotis seco con Giemsa sin diluir, incubando durante 3 minutos a temperatura ambiente.
4. Se lava el porta con agua.
5. Se seca y se observa al microscopio.

Los macrófagos se observan como células de gran tamaño, con núcleo irregular de color azul y citoplasma azul pálido.

El recuento diferencial de las células peritoneales de ratón proporcionó el siguiente resultado: 92'1% de macrófagos, 5'8% de polinucleares y 2'1% de linfocitos. Siendo despreciable la contaminación eritrocitaria dado el choque hipoosmótico al que habían sido sometidas las células.

## **2.4. OBTENCIÓN DE MEMBRANAS DE MACRÓFAGOS.**

Las membranas de los macrófagos peritoneales de ratón se obtuvieron siguiendo el método de BROMBERG y PICK (1985), introduciendo algunas modificaciones.

### **2.4.1. Reactivos:**

- Solución salina.
- Tampón HEPES 5 mM, pH 7'5 con inhibidores de proteasas:
  - 10 mg/100 ml de bacitracina.
  - 1 mg/100 ml de leupeptina.
  - 1 mg/100 ml de TLCK.
  - 5 mg/100 ml de PMSF, disuelto en etanol.
  - EDTA 1 mM.
  - Tampón HEPES 20 mM, pH 7'5, PMSF 5 mg/100 ml.

### 2.4.2. Método:

Habiendo obtenido los macrófagos peritoneales de los ratones inyectados cuatro días antes con caseinato sódico al 6%, resuspendemos los sedimentos celulares en 10 ml de tampón HEPES 5 mM, pH 7.5, con un cóctel de inhibidores de proteasas para inhibir la gran cantidad de enzimas proteolíticas que se liberan tras la lisis osmótica de los macrófagos. Esta lisis osmótica se realiza mediante una incubación en frío de 15 minutos. Seguidamente, pasamos alícuotas de 3 ml de la suspensión celular a un tubo de plástico de 25 ml, se sonicán en frío 2 x 10 segundos y se vierten en tubos cónicos de vidrio de 10 ml que se centrifugan a 600 xg durante 10 minutos con el fin de eliminar las células que han quedado intactas y los núcleos. Una vez desechados los sedimentos, los sobrenadantes se centrifugan durante 30 minutos a 30.000 xg a 4 °C. Se desechan nuevamente los sobrenadantes y el sedimento obtenido se resuspende en HEPES 20 mM, pH 7.5, con PMSF y se sonica en frío 2 x 10 segundos, repartiéndose en alícuotas de 500 µl en tubos de Eppendorf, los cuales se almacenan a -80 °C.

## 2.5. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS.

La determinación de proteínas se realizó según el método de BRADFORD (1976), utilizando como estándar albúmina sérica bovina (BSA).

Para ello se preparan distintas diluciones patrones de seroalbúmina bovina a concentraciones entre 2 y 25 µg/ml con las que se construye una curva estándar sobre la que se calcula, por interpolación, la concentración de proteínas existente en varias diluciones (1/50, 1/100, 1/500) de la preparación de membranas de macrófagos. Las concentraciones se expresaron como µg de proteínas/ml.

## 2.6. UNIÓN DEL <sup>125</sup>I-VIP A SUS RECEPTORES ESPECÍFICOS.

### 2.6.1. Marcaje del VIP con <sup>125</sup>I.

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

### 2.6.1.1. Reactivos:

- VIP: se disuelven 0'5 mg de VIP porcino en 0'5 ml de HCl 0'005 N, quedando a una concentración de  $3 \times 10^{-4}$  M. Seguidamente, se agita durante 60 minutos y se reparte en fracciones (20 alícuotas de 5  $\mu$ l para su posterior marcaje y 8 alícuotas de 50  $\mu$ l como "stock" de VIP a  $3 \times 10^{-4}$  M). Estas alícuotas se conservan a  $-20$  °C hasta que vayan a ser utilizadas.
- Tampón fosfato (TP) 0'3 M, pH 7'5: disolvemos 2'04 g de  $KPO_4H_2$  en 40 ml de agua destilada, se ajusta el pH con NaOH 1 N y se añade agua destilada hasta 50 ml.
- Cloramina T (1 mg/ml): se disuelven 10 mg de cloramina T ( $C_7H_7ClNaO_2S_3H_2O$ ) en 10 ml del tampón fosfato descrito anteriormente. Se prepara 15 minutos antes del marcaje, lo mantenemos en la oscuridad hasta su utilización. Actúa en el marcaje como oxidante débil.
- Metabisulfito sódico (MbNa) (2 mg/ml): se disuelven 10 mg de metabisulfito sódico ( $Na_2S_2O_5$ ) en 5 ml de tampón fosfato. El metabisulfito sódico actúa como reductor, deteniéndose la reacción de oxidación desencadenada por la cloramina T.
- $^{125}I$ Na con una actividad de 100 mCi  $^{125}I$ /ml (16'5 mCi/ $\mu$ g de yodo), preparado en NaOH, pH 7-11, libre de reductores y 99'6% de pureza radioquímica.
- TB: tampón Tris 50 mM, BSA 2% (p/v), pH 7'5.
- TBB: tampón Tris 50 mM, BSA 2%, bacitracina 2 mg/ml, pH 7'5.
- Ácido acético 1 N al 50% (v/v) con etanol absoluto.
- Ácido acético 0'2 M, BSA 0'5% (p/v), bacitracina 0'03% (p/v).
- Talco: 100 mg/ml, en agua destilada.

### 2.6.1.2. Método:

El marcaje fue realizado a temperatura ambiente, en una campana extractora y con una adecuada radioprotección. La mezcla de marcaje se preparó en un tubo de plástico, en el que pusimos por este orden:

- 20  $\mu$ l de tampón fosfato.
- 5  $\mu$ l de VIP (1 mg/ml).
- 15  $\mu$ l de  $^{125}I$  (1'5 mCi).
- 5  $\mu$ l de solución de cloramina T.

Después de agitar durante 30 segundos exactamente, se añadió 5 µl de solución de metabisulfato sódico y se volvió a agitar. A continuación, se añadió 400 µl de TBB, agitándose nuevamente. Se tomó una alícuota de 5 µl de la mezcla de marcaje y se pasó a un tubo que contenía 5 ml de TB, el cual utilizamos para calcular el grado de incorporación de  $^{125}\text{I}\text{Na}$  al péptido.

#### 2.6.1.3. Purificación del VIP marcado:

El VIP marcado fue purificado por adsorción al talco. Para ello, se añadió a la mezcla de marcaje 0'1 ml de la suspensión de talco. Agitamos y centrifugamos a 2.000 xg, desechamos el sobrenadante, el cual contiene yodo libre y pequeños péptidos. Resuspendimos el sedimento de talco en 1 ml de acético 1 N/etanol y agitamos con fuerza para separar el péptido yodado del talco. A continuación, centrifugamos durante 10 minutos a 2.000 xg, recuperándose el sobrenadante, que contiene el  $^{125}\text{I}$ -VIP puro, lo repartimos en alícuotas de 50 µl que conservamos a - 20 °C hasta el momento de su utilización. Con este método, el  $^{125}\text{I}$ -VIP debe ser purificado de nuevo antes de su uso en el experimento, añadiendo al tubo que contiene el péptido marcado 350 µl de TB y 100 µl de la suspensión de talco, agitándose bien y centrifugando posteriormente durante 10 minutos a 2.000 xg. Desechamos el sobrenadante, que contiene yodo radioactivo libre y fragmentos de péptido. El sedimento, que contiene  $^{125}\text{I}$ -VIP puro, se resuspendió en una 1 ml de la solución de acético/etanol y después de agitar fuertemente, se centrifugó a 2.000 xg durante 10 minutos, recuperándose el sobrenadante en el que se encuentra el  $^{125}\text{I}$ -VIP purificado.

#### 2.6.1.4. Cálculo del porcentaje de incorporación:

Se toma una alícuota de 5 µl de la mezcla de marcaje y se pasa a un tubo que contiene 5 ml de TB, agitándolo a continuación. De este tubo, se toman 100 µl y se añaden a un tubo de plástico que contiene 300 µl de TBB y 100 µl de la suspensión de talco, todo ello por triplicado. Después de agitar fuertemente, se centrifuga 10 minutos a 2.000 xg y se separan los sobrenadantes de los precipitados. En un contador gamma se determinan las cuentas por minuto existentes en el precipitado y en el sobrenadante, y se calcula el porcentaje de radioactividad del precipitado respecto al total:

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

En los marcajes realizados, el porcentaje de incorporación medio fue del 80-85%.

### 2.6.1.5. Cálculo de la actividad específica:

La actividad específica del  $^{125}\text{I}$ -VIP (cantidad de radioactividad, en  $\mu\text{Ci}$ , incorporada por  $\mu\text{g}$  de péptido) se calcula a partir del porcentaje de incorporación, conociendo los  $\text{mCi}$  de  $^{125}\text{I}$  y los  $\mu\text{g}$  de VIP que se han utilizado en el marcaje, mediante la siguiente fórmula:

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

La actividad específica media alcanzada fue de  $250 \mu\text{Ci } ^{125}\text{I} / \mu\text{g VIP}$ , que equivalen a  $832 \text{ Ci/mmol}$ .

### 2.6.2. Unión del $^{125}\text{I}$ -VIP a sus receptores en macrófagos peritoneales de ratón.

En los estudios de dosis-efecto, se ponen en el medio de incubación concentraciones crecientes de VIP frío y una concentración fija de  $^{125}\text{I}$ -VIP, de tal forma que ambos compiten por unirse a sus receptores específicos en la membrana celular. En los demás experimentos se mantienen los mismos presupuestos metodológicos, por lo que sólo se especificaran sus condiciones particulares. A continuación se describen los reactivos y el método utilizado en estos experimentos.

#### 2.6.2.1. Reactivos:

- TB: Tris 50 mM, BSA 2%, pH 7.5.
- TBB: Tris 50 mM, BSA 2%, bacitracina 2 mg/ml, pH 7.5.
- Tris-sacarosa: Tris 50 mM, pH 7.5, sacarosa 10% (p/p).

- VIP frío: añadimos 1450  $\mu\text{l}$  de TB a una alícuota de 50  $\mu\text{l}$  de VIP "stock" ( $3 \times 10^{-4}$  M) con lo que el VIP queda a una concentración de  $10^{-5}$  M. Se agita fuertemente y se reparte en alícuotas de 50  $\mu\text{l}$ , las cuales se utilizarán en los experimentos de dosis-efecto. En alguno de estos experimentos se necesitará preparar mediante diluciones sucesivas con TB, diferentes concentraciones de VIP frío comprendidas entre  $10^{-11}$  y  $10^{-7}$  M. Para la determinación de la unión específica se utiliza VIP frío a una concentración de  $10^{-6}$  M en el medio de incubación (VIPns). Cuando el VIP frío alcanza una concentración tan elevada desplaza por completo al  $^{125}\text{I}$ -VIP de su unión a los receptores específicos, así pues se considera que el VIP que sigue unido a las células o a las membranas no está unido a receptores específicos, representando la unión no específica.

- $^{125}\text{I}$ -VIP: una alícuota de VIP marcado se diluye en TB para alcanzar en el medio de incubación una concentración final de 45 pM, similar a la existente en el plasma.
- Preparación celular: una vez que hemos obtenido los macrófagos peritoneales de ratón, se determina el porcentaje de viabilidad celular y se cuentan las células en una cámara de Fuchs-Rosenthal. A continuación se ajusta la concentración celular con una solución salina a  $5 \times 10^6$  células / ml, de tal forma que en el medio de incubación quede una concentración celular de  $1.5 \times 10^6$  células / ml, la cual se ha definido como óptima a partir de experimentos con diferentes concentraciones celulares.

#### 2.6.2.2. Método general: dosis-efecto.

Para los experimentos se han empleado tubos de plástico de 3 ml, siendo el volumen final de la incubación de 500  $\mu\text{l}$ . Cada punto se ha realizado por triplicado. A cada uno de los tubos se ha añadido por este orden:

- 250  $\mu\text{l}$  de TBB.
- 50  $\mu\text{l}$  de TB, VIP frío o VIPns.
- 50  $\mu\text{l}$  de  $^{125}\text{I}$ -VIP.
- 150  $\mu\text{l}$  de la preparación celular.

Tras incubar durante 90 minutos a 15 °C (condiciones óptimas que se han definido a partir de la cinética de asociación), se detiene la reacción tomando alícuotas de 200  $\mu\text{l}$  y pasándolas a tubos de microfuga que contienen 200  $\mu\text{l}$  de TB frío. Posteriormente se centrifuga en la microfuga a 10.000 xg durante 5 minutos a 4 °C, se aspiran los sobrenadantes

y se lavan los sedimentos celulares dos veces con Tris-sacarosa frío. Por último, se cortan las puntas de los tubos y se cuentan en un contador gamma durante 2 minutos.

En todos los experimentos se toman 3 alícuotas de 200  $\mu$ l de los medios de incubación, que no se centrifugan y que son utilizadas para determinar la actividad total (radioactividad total, en cpm, que había en 200  $\mu$ l del medio de incubación), la cual se toma como referencia para expresar en porcentaje la radioactividad (cpm) que muestran los sedimentos celulares al contarlos, obteniéndose así el porcentaje de unión total, que al restarle la “unión inespecífica (radioactividad en cpm que mostraron las células incubadas en presencia de VIPns), proporciona la unión específica, es decir, el porcentaje de  $^{125}\text{I}$ -VIP unido específicamente:

$$\% \text{ Unión Específica} = \% \text{ Unión Total} - \% \text{ Unión Inespecífica}$$

### 2.6.2.3. Cinética de asociación:

Estudiamos la cinética de la unión del  $^{125}\text{I}$ -VIP a sus receptores en macrófagos peritoneales de ratón a dos temperaturas, 15 °C y 30 °C. Para lo cual, se determinó la unión específica del trazador a los macrófagos en diferentes tiempos de incubación (5, 10, 15, 30, 60, 90 y 120 minutos), para cada una de las temperaturas, con el fin de determinar el tiempo al que se alcanzaba el estado de equilibrio y la estabilidad de la unión, lo que nos permitió observar cuales eran las condiciones óptimas de tiempo y temperatura que deberíamos utilizar en los demás experimentos.

### 2.6.2.4. Concentración celular:

Con el fin de determinar la concentración óptima de células, se estudió la unión específica del  $^{125}\text{I}$ -VIP para diferentes concentraciones celulares (desde  $0.5 \times 10^6$  células/ml hasta  $10 \times 10^6$  células/ml) a 15 °C. Mediante este experimento, se determinó que la concentración celular óptima era de  $1.5 \times 10^6$  células/ml.

### 2.6.2.5. Degradación del $^{125}\text{I}$ -VIP:

Tanto en los experimentos de cinética de asociación como en los de concentración celular, se determinó, para cada tiempo, temperatura y concentración celular, la cantidad que

quedaba indemne de  $^{125}\text{I-VIP}$  en los sobrenadantes de los tubos de microfuga y que refleja la degradación sufrida por el trazador durante la incubación. Para ello se ponen en tubos de 3 ml:

- 200  $\mu\text{l}$  de sobrenadante postmicrofuga.
- 200  $\mu\text{l}$  de TB frío.
- 100  $\mu\text{l}$  de talco.

Se agita bien, se centrifugan a 2.000 xg durante 10 minutos, se separan los precipitados de los sobrenadantes y ambos se cuentan en el contador gamma. El porcentaje de  $^{125}\text{I-VIP}$  indemne se calcula dividiendo las cpm que da el precipitado (donde se encuentra el trazador indemne absorbido al talco) entre la suma de las cpm del precipitado más las del sobrenadante (donde se encuentran los fragmentos degradados del péptido marcado):

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

El porcentaje de  $^{125}\text{I-VIP}$  indemne es muy importante tanto en la valoración de la cinética de asociación como en el efecto de la concentración celular a la hora de elegir las condiciones óptimas de incubación.

#### 2.6.2.6. Cinética de disociación:

Para poder estudiar la disociación del complejo  $^{125}\text{I-VIP-receptor}$ , se realiza una incubación a 15 °C durante 90 minutos en las condiciones descritas anteriormente. Transcurridos los cuales, y una vez alcanzado el estado de equilibrio, se añade al medio de incubación una sobrecarga de VIP frío a una concentración final de  $10^{-7}$  M, para que induzca la disociación del complejo  $^{125}\text{I-VIP-receptor}$ . A continuación, manteniendo la temperatura de incubación a 15 °C, se determina la unión específica del trazador a las células a diferentes tiempos (0, 5, 10, 15, 30, 60, 90 y 120 minutos), expresándola como porcentaje de la unión existente en el tiempo 0, justo al añadir la sobrecarga del VIP frío.

**2.6.2.7. Saturación:**

Las células fueron incubadas durante 90 minutos a 15 °C en presencia de concentraciones crecientes de  $^{125}\text{I-VIP}$ , desde  $25 \times 10^{-12}$  M hasta  $2 \times 10^{-9}$  M, se determinó la unión específica para cada una de las concentraciones del trazador.

**2.6.2.8. Especificidad:**

Para poder determinar si los receptores son o no específicos para VIP, se estudia la unión específica del  $^{125}\text{I-VIP}$  a las células en presencia de péptidos estructuralmente relacionados o no con el VIP.

Relacionados	No relacionados
Helodermina	Insulina
GRFr	Somatostatina
PHI	Pancreastatina
Glucagón	Octapéptido de CCK
Secretina	

El protocolo es similar al de la dosis-efecto con la única variación de que, en lugar de hacer competir al  $^{125}\text{I-VIP}$  con el VIP frío, se le hace competir con estos péptidos a diferentes concentraciones, desde  $10^{-10}$  M hasta  $10^{-6}$  M.

**2.6.2.9. Degradación del receptor:**

Para estudiar la degradación del receptor durante la incubación, se examina el efecto de diferentes periodos de preincubación de las células sobre la unión específica del  $^{125}\text{I-VIP}$ . Para ello, se determina la unión específica del  $^{125}\text{I-VIP}$  a células que han sido preincubadas a 15 °C durante diferentes tiempos: 0, 5, 10, 15, 30, 60, 90 y 120 minutos. La unión específica calculada para cada periodo de preincubación se expresa como porcentaje de la unión específica hallada en células que no han sido previamente incubadas (tiempo 0).

## 2.7. PRODUCCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE AMPc.

Se estudió el efecto del VIP, así como el de diversos agentes farmacológicos sobre la producción de AMPc en los macrófagos peritoneales de ratón.

### 2.7.1. Efecto del VIP sobre la producción de AMPc por los macrófagos peritoneales de ratón.

#### 2.7.1.1. Reactivos:

- TBB/IBMX: Tris 50 mM, BSA 2% (p/v), bacitracina 2 mg/ml, 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) 0'4 mM, pH 7'5.
- TB: Tris 50 mM, BSA 2%, pH 7'5.
- VIP: diluido en TB a concentraciones de  $10^{-11}$  M a  $10^{-6}$  M.
- Metanol asbsoluto.
- Preparación celular: los macrófagos peritoneales de ratón fueron preparados en solución salina a una concentración de  $3'3 \times 10^6$  células / ml.

#### 2.7.1.2. Método general: dosis-efecto.

Se determinó cual era la producción basal de AMPc por parte de los macrófagos, así como la producción estimulada por concentraciones crecientes de VIP. Las incubaciones se realizaron en un volumen final de 500  $\mu$ l. En cada uno de los tubos se pusieron, por este orden:

- 250  $\mu$ l de TBB/IBMX.
- 50  $\mu$ l de TB.
- 50  $\mu$ l de TB (basal) o de VIP (estimulada).
- 150  $\mu$ l de preparación celular.

Las concentraciones de cada uno de los reactivos en el volumen final de incubación fueron las siguientes:

- Tris 35 mM, pH 7'5.
- BSA 1'4 % (p/v).
- Bacitracina 1 mg/ml.

- IBMX 0'2 mM.
- NaCl 50 mM.
- VIP  $10^{-11}$  M a  $10^{-6}$  M, o ausente (basal).
- Células:  $1 \times 10^6$  células/ml.

Incubamos a 15 °C durante 45 minutos (condiciones óptimas). Después, se detiene la reacción añadiendo a cada tubo 2'5 ml de metanol y agitamos, con lo que se produce la precipitación de las proteínas. Centrifugamos 10 minutos a 2.000 xg y se toman alícuotas de 400 µl del sobrenadante las cuales se pasan a tubos de vidrio, estos se dejan evaporar en la estufa a 60 °C hasta que sólo quede el extracto seco de la fracción soluble del sobrenadante, en el que se encuentra el APMc. Los tubos con el extracto seco se conservan a -80 °C hasta la realización del radioinmunoanálisis de AMPc.

#### **2.7.1.3. Efecto del tiempo y de la temperatura:**

Con las condiciones básicas que previamente se han descrito, se estudió la producción de AMPc basal y estimulada por VIP  $10^{-7}$  M a diferentes tiempos (0, 5, 10, 15, 30, 60, 90, y 120 minutos) y a diferentes temperaturas (15 °C y 30 °C). A partir de aquí, se eligieron las condiciones óptimas de tiempo y temperatura a utilizar en posteriores experimentos.

#### **2.7.1.4. Efecto de la concentración celular:**

Se estudió la producción de AMPc, basal y estimulada por VIP  $10^{-7}$  M, para diferentes concentraciones celulares de macrófagos (desde  $0'5 \times 10^6$  células/ml hasta  $8 \times 10^6$  células/ml). Determinándose a partir de este experimento la concentración celular idónea a utilizar.

#### **2.7.1.5. Efecto de la concentración de IBMX:**

Se determinó las producciones de AMPc basal y estimulada por VIP  $10^{-7}$  M en presencia de concentraciones crecientes de IBMX (0, 0'05, 0'1, 0'2, 0'5 y 1 mM). Decidiéndose a partir de este experimento la concentración adecuada de IBMX a utilizar en sucesivos ensayos.

### 2.7.1.6. Especificidad:

Se estudió la producción de AMPc por los macrófagos estimulada por concentraciones crecientes ( $10^{-10}$  M a  $10^{-6}$  M) de diferentes péptidos, relacionados o no estructuralmente con el VIP, para de este modo determinar la especificidad del sistema efector. Se utilizó la misma metodología utilizada en la dosis-efecto de VIP, pero añadiendo al medio de incubación en lugar de VIP, el péptido a estudiar a la concentración deseada. Se han estudiado los efectos del PHI, helodermina, GRFr, secretina, glucagón, insulina, pancreastatina, somatostatina y octapéptido de colecistoquinina.

### 2.7.2. Producción de AMPc en macrófagos peritoneales de ratón: efecto de los antagonistas del VIP ([4-Cl-D-Phe<sup>6</sup>, Leu<sup>17</sup>] VIP y [Ac-Tyr<sup>1</sup>, D-Phe<sup>2</sup>]GRF<sub>1-29</sub>-NH<sub>2</sub>) y de diferentes agentes farmacológicos.

Se estudió la regulación por los dos antagonistas del VIP antes mencionados de la producción de AMPc en macrófagos peritoneales de ratón, así como el efecto de diferentes agentes farmacológicos (isoproterenol, propanolol) sobre dicha producción.

#### 2.7.2.1. Reactivos:

- Los descritos en el apartado 2.7.1.1.
- (4-Cl-D-Phe<sup>6</sup>, Leu<sup>17</sup>) VIP de  $10^{-10}$  M a  $10^{-6}$  M.
- (Ac-Tyr<sup>1</sup>, D-Phe<sup>2</sup>) GRF<sub>1-29</sub>-NH<sub>2</sub> de  $10^{-10}$  M a  $10^{-6}$  M.
- Isoproterenol  $10^{-5}$  M.
- Propanolol  $10^{-5}$  M.

#### 2.7.2.2. Método:

La determinación de los niveles de AMPc se realizó con la misma metodología que ya fue descrita en el apartado 2.7.1.2.

La ED<sub>50</sub> (dosis efectiva semimáxima) representa la concentración de VIP que induce la respuesta semimáxima de la producción de AMPc. El valor de la correspondiente constante de inhibición (Ki) viene determinado por la siguiente ecuación:

$$K_i = \frac{[\text{antagonistas}]}{[ED_{50} (A) / ED_{50}(C)] - 1}$$

donde [antagonistas] es la concentración de antagonistas,  $ED_{50} (A)$  y  $ED_{50}(C)$  es la concentración de VIP que induce la respuesta semimáxima en presencia o ausencia de antagonistas, respectivamente.

### 2.7.3. Determinación cuantitativa de AMPc.

Se llevó a cabo mediante radioinmunoanálisis (RIA), utilizando para ello el kit suministrado por Amersham, capaz de cuantificar concentraciones de AMPc del orden femtomolar. El fundamento del RIA de APMc consiste en la elevada capacidad antigénica del AMPc, lo que posibilita la producción de anticuerpos (Ac) muy específicos frente a él a partir del suero de conejos a los que se les ha inyectado previamente, y en la facilidad con que se puede marcar radioactivamente con  $^{125}\text{I}$ , preparándose en la forma AMPc- $^{125}\text{I}$  (trazador). Cuando a una muestra que contiene una cantidad desconocida de AMPc se le añade una cantidad elevada de AMPc- $^{125}\text{I}$  y, posteriormente, se añade una cantidad limitada de Ac, ambas formas de AMPc compiten por unirse al anticuerpo específico, lo que da lugar a la formación de complejos del tipo Ac-AMPc y Ac-AMPc- $^{125}\text{I}$ , quedando tanto más trazador libre cuanto más AMPc tenga la muestra. Sí, a continuación, hacemos precipitar por centrifugación los complejos formados (Ac-AMPc y Ac-AMPc- $^{125}\text{I}$ ), mediante un anticuerpo anti-inmunoglobulina de conejo (Amerlex-M) unido a polímeros magnetizables, y deseamos el sobrenadante que contiene el trazador libre, la radioactividad que queda en el precipitado corresponderá solamente al complejo Ac-AMPc- $^{125}\text{I}$  y será inversamente proporcional a la cantidad de AMPc que tuviera la muestra.

#### 2.7.3.1. Reactivos:

- Trazador: AMPc- $^{125}\text{I}$ , diluido en tampón acetato 0'05 M, de tal forma que 100  $\mu\text{l}$  corresponden a 27.000 cpm.
- Anticuerpo anti-AMPc obtenido de conejo.
- Tampón de análisis: acetato 0'05 M, pH 5'8.

- AMPc estándar: 1 ml a una concentración de 32 fM.
- Segundo anticuerpo: Amerlex-M, anti-IgG de conejo, obtenido de asno.
- Muestra: obtenida por reconstitución con 200  $\mu$ l de tampón de análisis, del extracto seco descrito en el apartado 2.7.1.2.

### 2.7.3.2. Método:

Preparación de la curva estándar: Se preparan distintas diluciones a partir de AMPc 32 fM (25, 50, 100, 200, 400, 800 y 1600 fmol/tubo). Se prepara un blanco (Bo).

Se procede con el siguiente protocolo (cantidades en  $\mu$ l):

	Total C	Bo	Estándares	Muestras
Tampón	200	100	-----	-----
Estándares	-----	-----	100	-----
Muestras	-----	-----	-----	100
Trazador	100	100	100	100
Anticuerpo	-----	100	100	100

Se agitan todos los tubos y se incuban durante 3 horas a 4 °C. Se detiene la incubación añadiendo 500  $\mu$ l del segundo anticuerpo (Amerlex-M) a cada uno de los tubos, excepto al de cuentas totales (Total C.). Se agitan de nuevo todos los tubos y se incuban a temperatura ambiente durante 10 minutos, tiempo que tarda el segundo anticuerpo en unirse a los complejos antígeno-anticuerpo formados durante la primera incubación. Se centrifugan los tubos a 2.000 xg durante 10 minutos, desechándose los sobrenadantes mediante aspiración en vacío y se cuenta la radioactividad de los precipitados (fracción ligada) durante 2 minutos en un contador gamma. Con los valores que se obtienen en los estándares, se contruye una curva patrón cuyo punto 0 de AMPc viene dado por Bo. La radioactividad ligada (B) encontrada en cada una de las concentraciones estándar y en las muestras se expresa como porcentaje de la radioactividad en Bo. La cantidad de AMPc (fmoles/tubo) en cada una de las muestras, se calcula por interpolación a partir de la curva estándar.

## 2.8. DETERMINACIÓN DE LA MASA MOLECULAR RELATIVA DEL RECEPTOR DE VIP MEDIANTE LA TÉCNICA DE CROSS-LINKING.

Se utilizó esta técnica para identificar a nivel molecular el receptor de VIP en membranas de macrófagos peritoneales de ratón, y también para analizar el efecto que a este nivel tienen los siguientes antagonistas de VIP: (4-Cl-D-Phe<sup>6</sup>, Leu<sup>17</sup>)VIP y (Ac-Tyr<sup>1</sup>,D-Phe<sup>2</sup>)GRF<sub>1-29</sub>-NH<sub>2</sub>.

### 2.8.1. Cross-Linking del <sup>125</sup>I-VIP a las membranas de macrófagos peritoneales de ratón.

#### 2.8.1.1. Reactivos:

- Tampón Hepes 20 mM, pH 7'5.
- Tampón Hepes 20 mM, pH 7'5, BSA 2% (p/v), bacitracina 0'1% (p/v).
- Tampón Hepes 20 mM, pH 7'5, DTSP (ditiobis (succinimidil propionato)) 1mM.
- Tampón Hepes 20 mM, pH 7'5, glicina 60 mM.
- Tris 60 mM-HCl ,pH 8'8, glicerol 10% (v/v), azul bromofenol 0'001%, SDS (dodecil sulfato sódico) 3% (p/v).
- <sup>125</sup>I-VIP 0'3 nM.
- (4-Cl-D-Phe<sup>6</sup>, Leu<sup>17</sup>)VIP 100 nM.
- (Ac-Tyr<sup>1</sup>,D-Phe<sup>2</sup>)GRF<sub>1-29</sub>-NH<sub>2</sub> 100 nM.
- VIP frío 10<sup>-6</sup> M.
- Preparación de membranas a una concentración final de 100 µg / ml.

#### 2.8.1.2. Método:

Las membranas de macrófagos peritoneales de ratón (100 µg/ml) se incubaron durante 60 minutos a 15 °C en 5 ml de tampón Hepes 20 mM, pH 7'5, BSA 2% (p/v), bacitracina 0'1% (p/v) con <sup>125</sup>I-VIP 0'3 nM, añadiéndose (4-Cl-D-Phe<sup>6</sup>, Leu<sup>17</sup>)VIP 100 nM y (Ac-Tyr<sup>1</sup>,D-Phe<sup>2</sup>)GRF<sub>1-29</sub>-NH<sub>2</sub> 100 nM a los experimentos con antagonistas. Para determinar la unión inespecífica, se hizo la misma incubación anterior a la que además se le añadió un exceso de VIP frío a una concentración de 10<sup>-6</sup> M. Después de la incubación, se detiene la reacción añadiendo 25 ml de tampón Hepes 20 mM, pH 7'5, frío y posteriormente se centrifuga a 30.000 xg durante 15 minutos a 4 °C. Se desecha el sobrenadante y el precipitado

se resuspendió en 1 ml de Hepes 20mM , pH 7'5 que contiene DTSP 1mM. La reacción se lleva a cabo durante 15 minutos a una temperatura de 4 °C y se detiene añadiendo 20 µl de Hepes 20 mM, pH 7'5, frío que contiene glicina 60 mM para detener la reacción. Esta mezcla se centrifuga a 4 °C durante 15 minutos a 30.000 xg y el precipitado que resulta, se resuspende en 0'1 ml de Tris 60 mM-HCl, pH 8'8, conteniendo glicerol 10% (v/v), azul de bromofenol 0'001 % y SDS 3 % (p/v), haciéndolo pasar 5 veces consecutivas a través de una aguja de calibre 25. Tras calentar durante 30 minutos a 60 °C, la suspensión se centrifuga durante 15 minutos a 48.000 xg y el sobrenadante se somete a gel de electroforesis SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE).

## 2.8.2. SDS-PAGE y autoradiografía.

### 2.8.2.1. Reactivos:

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

### 2.8.2.2. Método:

Fue realizado según el método de LAEMMLI (1970). Primeramente, se procede al montaje de los geles, añadiendo el gel de poliacrilamida al 12%, esperamos su polimerización y a continuación se añade el gel de poliacrilamida al 5% y se espera de nuevo su polimerización. Una vez que se ha producido ésta, se procede a montar la cubeta. A continuación, se añade la muestra y los marcadores de peso molecular citados en el apartado anterior. Los geles se fijaron en metanol al 43 % (v/v) y ácido acético 1'6 M, y se tiñeron con azul de Coomasie al 0'1% (p/v). A continuación, se destiñeron en la solución de fijación. Los geles fueron secados y expuestos durante un periodo de 8-12 días a - 80 °C en una placa Du Pont Cronex-4 en oscuridad.

## 2.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Cada uno de los experimentos ha sido realizado por triplicado, expresándose los valores como la media  $\pm$  el error estándar de la media (SEM).

El cálculo de las constantes de afinidad (Kd) y de las capacidades de unión de los receptores (Bmax) se ha realizado con los programas EBDA, original de McPHERSON (1983) y LIGAND, original de MUNSON y RODBARD (1980), modificado para microordenadores por McPHERSON (1985), editados ambos por BIOSOFT, P.O. Box 580, Milltown, New Jersey, 08850, USA.

Para calcular los coeficientes de correlación lineal (r), así como para la aplicación del test de la t de Student, ha sido utilizado el programa GraphPAD Instat, versión 1.0, de MOTULSKY (1989), editado por GraphPAD Software, San Diego, California, 92121, USA. Ha sido considerado estadísticamente significativo un valor de  $p < 0.05$ .

**RESULTADOS.**

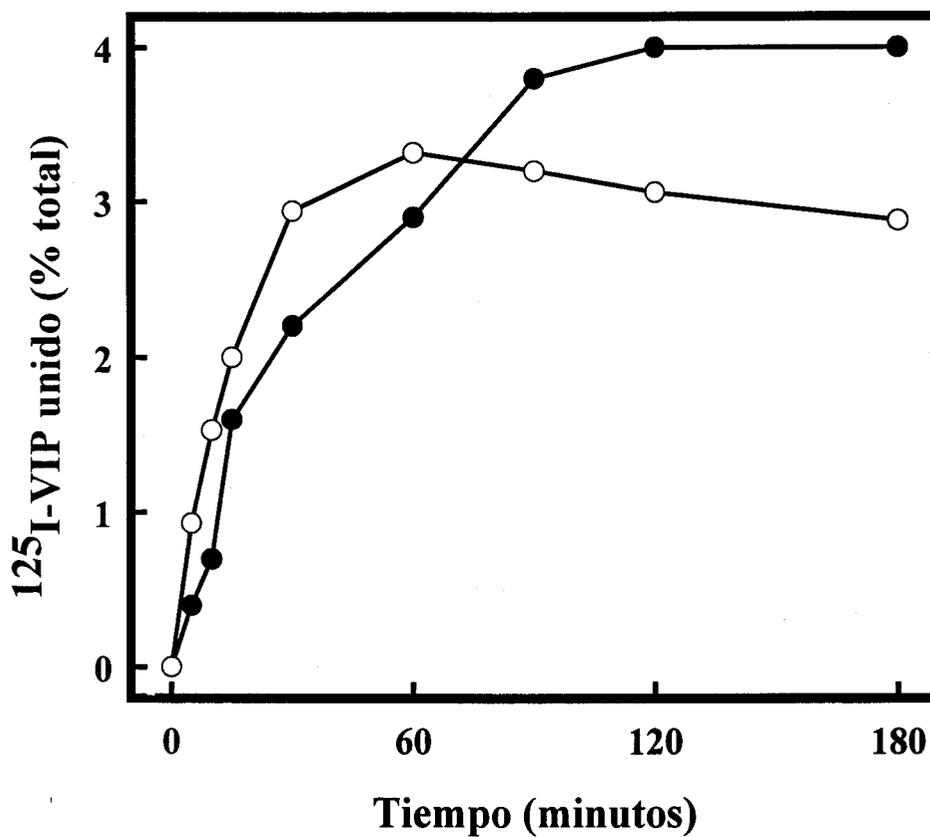
## 1. UNIÓN DEL $^{125}\text{I-VIP}$ A SUS RECEPTORES EN MACRÓFAGOS PERITONEALES DE RATÓN.

### 1.1. EFECTO DEL TIEMPO Y DE LA TEMPERATURA.

La unión específica del  $^{125}\text{I-VIP}$  a macrófagos peritoneales de ratón fue un proceso dependiente del tiempo y de la temperatura (Fig. 11). A 30 °C, la unión específica del trazador a las células fue rápida, obteniéndose la mitad de la unión máxima en los primeros 15 minutos y el máximo a los 60 minutos, descendiendo después lentamente. A 15 °C, se produce una disminución en la velocidad de reacción, alcanzándose la mitad de la unión máxima pasados los 30 minutos, el máximo a los 90 minutos y manteniéndose en estado estacionario hasta los 180 minutos. La unión máxima fue similar a ambas temperaturas. La degradación del  $^{125}\text{I-VIP}$  también fue un proceso dependiente del tiempo y de la temperatura (Fig. 12). La degradación del trazador fue mayor a 30 °C que a 15 °C, especialmente a partir de los 30 minutos, explicando parcialmente la disminución de la unión observada a 30 °C. En base a estos resultados, en los siguientes experimentos la incubación se llevó a cabo a 15 °C durante 90 minutos, para conseguir una máxima unión específica con una mínima degradación del receptor.

### 1.2. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN CELULAR.

La unión específica del  $^{125}\text{I-VIP}$  fue una función lineal ( $r = 0,99$ ) de la concentración celular hasta  $2 \times 10^6$  células/ml (Fig. 13). A mayores concentraciones celulares, la unión observada fue menor de la esperada, debido probablemente, a la relativamente elevada degradación del trazador (Fig. 13). Los experimentos siguientes se realizaron con una concentración celular de  $1,5 \times 10^6$  células/ml, concentración a la que sólo se había degradado un 15% de trazador.



**Fig. 11.- Unión del  $^{125}\text{I}$ -VIP a los macrófagos peritoneales de ratón en función del tiempo y de la temperatura.** Las células ( $1.5 \times 10^6/\text{ml}$ ) fueron incubadas en presencia de  $^{125}\text{I}$ -VIP 45 pM a 15 °C (●) o a 30 °C (○), determinándose la unión específica del péptido marcado para cada uno de los periodos de tiempo identificados. Cada punto es la media de tres experimentos independientes realizados por triplicado.

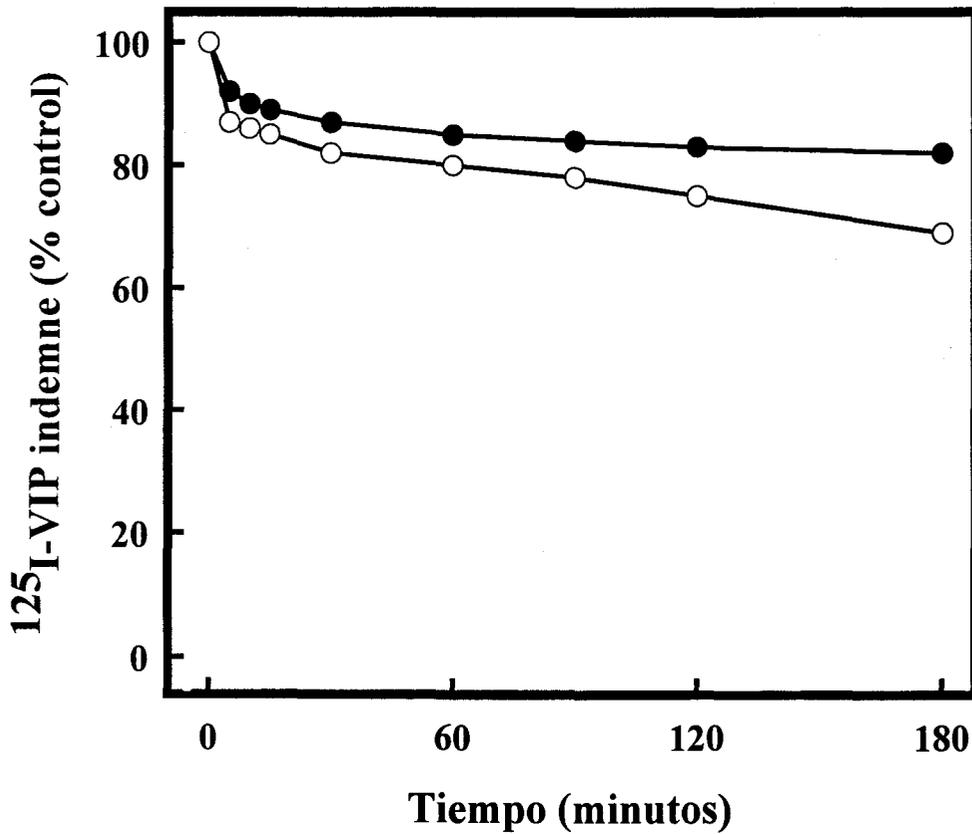


Fig. 12.- Degradación del  $^{125}\text{I-VIP}$  en función del tiempo y de la temperatura. Se incubaron las células ( $1.5 \times 10^6/\text{ml}$ ) en presencia de  $^{125}\text{I-VIP}$  45 pM a 15 °C (●) o a 30 °C (○), determinándose el porcentaje de trazador libre indemne en el medio de incubación para cada uno de los periodos de tiempo indicados. Cada punto es la media de tres experimentos independientes realizados por triplicado.

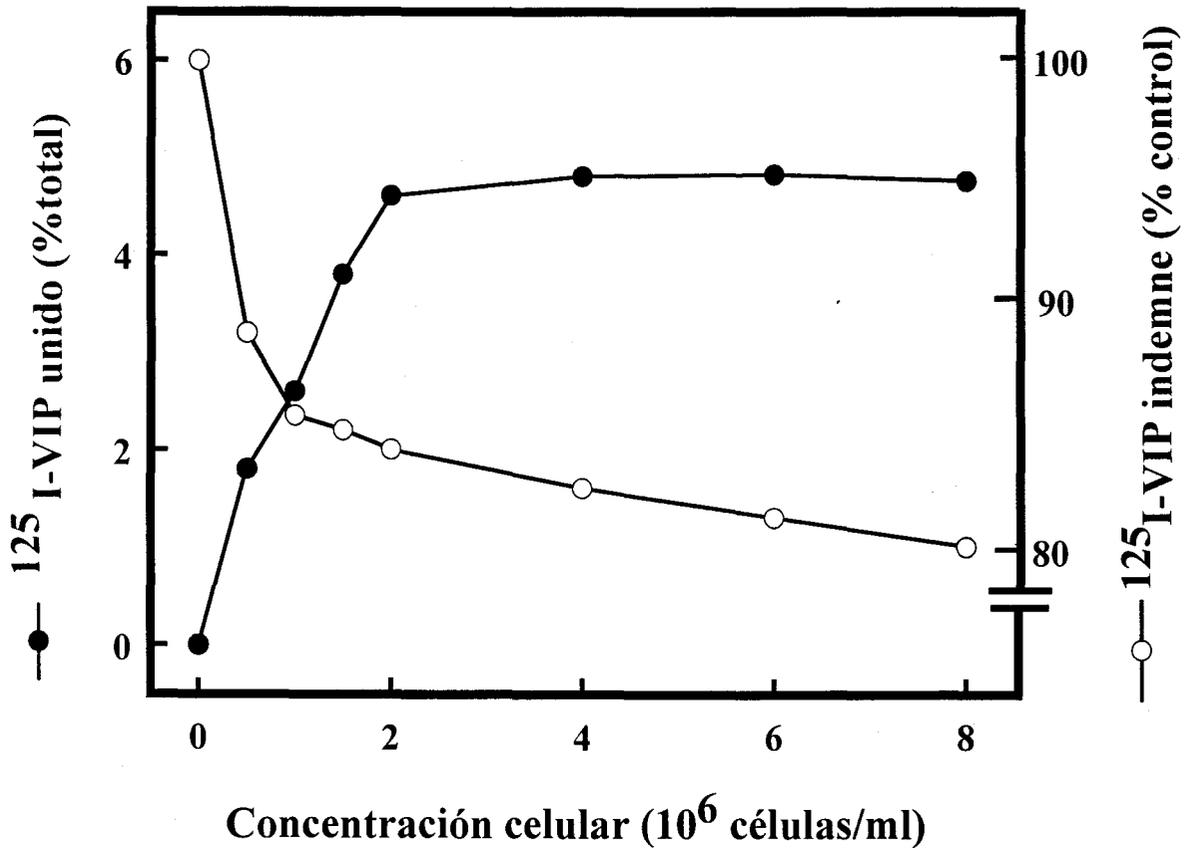


Fig. 13.- Efecto de la concentración celular sobre la unión del <sup>125</sup>I-VIP a los macrófagos peritoneales de ratón. Degradación del <sup>125</sup>I-VIP en función de la concentración celular. Se incubaron concentraciones celulares cada vez mayores (hasta 8 x 10<sup>6</sup> células/ml) durante 90 minutos a 15 °C en presencia de <sup>125</sup>I-VIP 45 pM, determinándose para cada una de ellas la unión específica del trazador (●) y el porcentaje de trazador libre en el medio de incubación (○). Cada punto es la media de tres experimentos independientes realizados por triplicado.

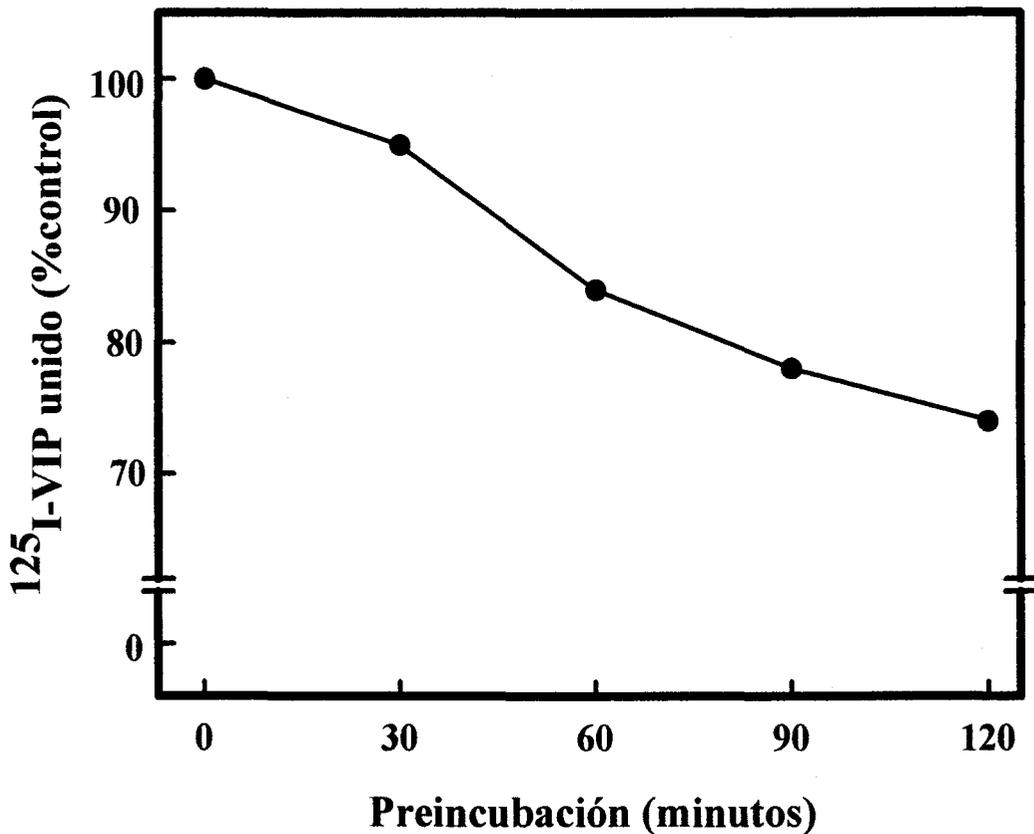
### 1.3. EFECTO DE LA PREINCUBACIÓN DE LAS CÉLULAS Y DEL pH DEL MEDIO DE INCUBACIÓN.

La preincubación de las células en ausencia del péptido marcado da lugar a una disminución progresiva de la unión del  $^{125}\text{I}$ -VIP a los macrófagos de ratón (Fig. 14), como consecuencia, probablemente, de la inactivación de los receptores. Las células preincubadas durante 90 minutos a 15 °C en ausencia de trazador conservaron el 76% de su capacidad de unión al  $^{125}\text{I}$ -VIP.

La unión específica del  $^{125}\text{I}$ -VIP a los macrófagos peritoneales de ratón, también fue un proceso dependiente del pH del medio de incubación. La unión específica se produce en un rango relativamente grande de pH y es máxima a un pH de 7.5.

### 1.4. CINÉTICA DE DISOCIACIÓN.

La unión del  $^{125}\text{I}$ -VIP a sus receptores específicos en macrófagos peritoneales de ratón fue un proceso reversible. Así, la disociación del complejo péptido-receptor se demuestra por la progresiva disminución del trazador unido a los macrófagos peritoneales de ratón en función del tiempo (Fig. 15) cuando, tras alcanzarse el estado de equilibrio con una incubación de 90 minutos a 15 °C, se añadió al medio de incubación una sobrecarga de VIP frío  $10^{-7}$  M. El 45% del VIP marcado se había disociado en los primeros 30 minutos, llegando al 75% a los 120 minutos. Representando gráficamente la unión específica del  $^{125}\text{I}$ -VIP a los macrófagos, en escala logarítmica, frente al tiempo transcurrido tras la sobrecarga de VIP frío, en escala lineal, se observa como la disociación no sigue una cinética de primer orden, pudiéndose desglosar en dos líneas rectas la curva semilogarítmica que la representa, lo que indica la presencia de dos procesos de primer orden: el primero de ellos con una tasa de disociación de  $3.7 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ , corresponde, a una población de receptores de baja afinidad y rápida disociación; mientras que el segundo, con una tasa de disociación de  $2.2 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ , corresponde a una segunda población de receptores de alta afinidad y lenta disociación.



**Fig. 14.- Efecto de la preincubación de las células sobre la unión específica del  $^{125}\text{I-VIP}$  a los macrófagos peritoneales de ratón.** Las células ( $1.5 \times 10^6/\text{ml}$ ) se preincubaron a  $15^\circ\text{C}$  e ausencia del trazador durante los periodos de tiempo indicados. Entonces, se añadió  $^{125}\text{I-VIP}$   $45 \text{ pM}$  y, tras una incubación de 90 minutos a  $15^\circ\text{C}$ , se determinó la unión específica, la cual se expresa como porcentaje de la encontrada en células control que no habían sido preincubadas. Cada punto es la media de tres experimentos realizados por triplicado.

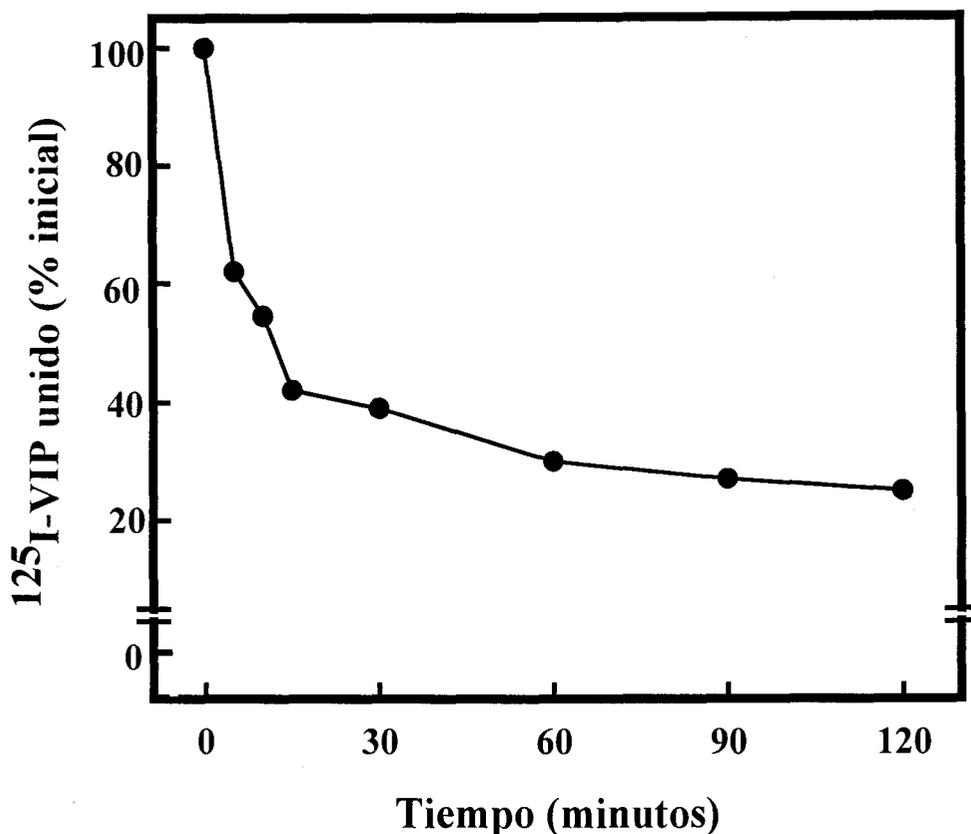


Fig. 15.- Cinética de disociación del complejo  $^{125}\text{I-VIP}$  receptor en los macrófagos peritoneales de ratón. Las células ( $1.5 \times 10^6/\text{ml}$ ) se incubaron antes de la disociación en presencia de  $^{125}\text{I-VIP}$  45 pM durante 90 minutos a 15 °C. Entonces, se les añadió VIP  $10^{-7}$  M, determinándose la unión específica para cada uno de los intervalos de tiempo indicados y expresándola como porcentaje de la existente en el tiempo 0, justo al añadir la sobrecarga de VIP frío. Cada punto es la media de tres experimentos independientes realizados por triplicado.

### 1.5. ESTUDIO ESTEQUIOMÉTRICO: DOSIS-EFECTO DE VIP.

Cuando añadimos al medio de incubación concentraciones crecientes de VIP frío, manteniendo fija la concentración de  $^{125}\text{I}$ -VIP (45 pM), se observa una disminución progresiva de la unión específica, a consecuencia de la inhibición competitiva producida por el VIP al unirse a sus receptores en los macrófagos peritoneales de ratón, con el consiguiente desplazamiento del trazador (Fig. 16).

Con concentraciones bajas de VIP frío ( $10^{-11}$ ), ya se produjo una disminución significativa de la unión específica. La concentración de VIP frío que inhibió en un 50% la unión específica del trazador a los macrófagos peritoneales de ratón ( $\text{IC}_{50}$ ) fue de  $1.6 \pm 0.3$  nM.

Cuando aplicamos el análisis de SCATCHARD (1949) a los resultados de este experimento y representamos gráficamente el resultado (Fig. 17), se obtiene una curva de concavidad superior que puede resolverse en dos líneas rectas, lo que viene a indicar la existencia de dos poblaciones de receptores, confirmándose este hecho al tratar los resultados del análisis de SCATCHARD con el programa de ajuste no lineal LIGAND (MUNSON y RODBARD, 1980), adaptado por Mc PHERSON (1985), obteniéndose el mejor ajuste para el supuesto de dos poblaciones de receptores: una de alta afinidad y baja capacidad de unión y otra de baja afinidad y alta capacidad de unión (Tabla XXI).

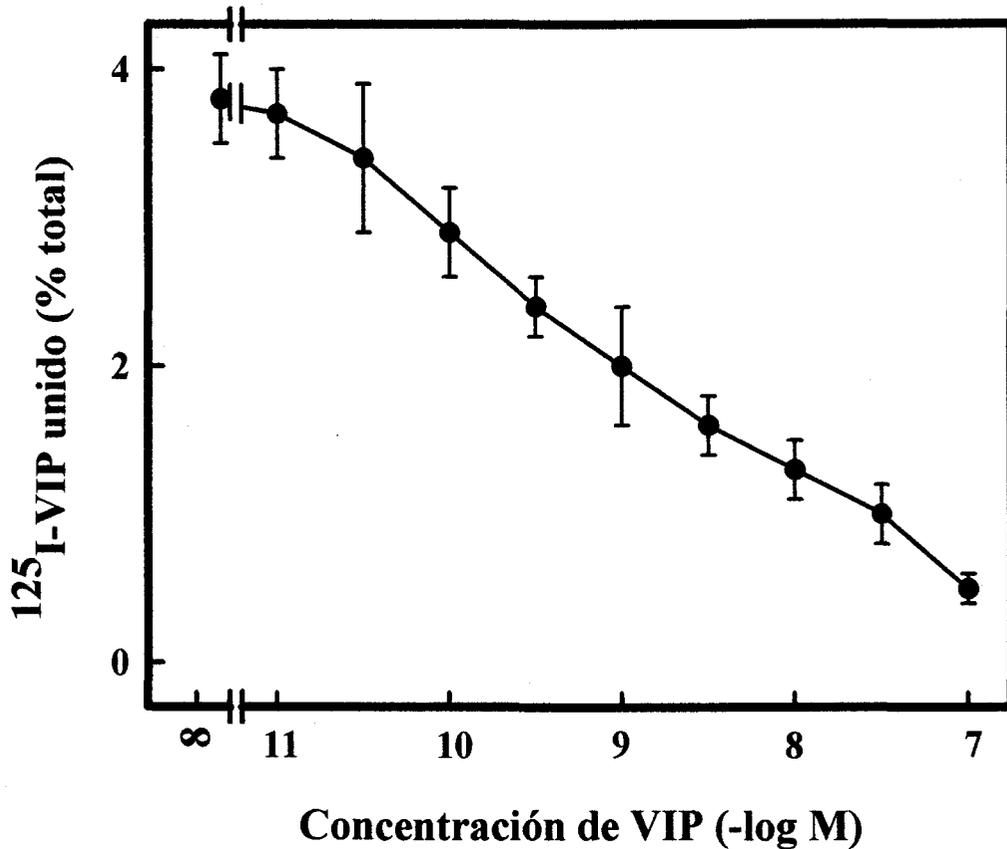


Fig. 16.- Inhibición competitiva por VIP frío de la unión específica del <sup>125</sup>I-VIP a macrófagos peritoneales de ratón. Las células ( $1.5 \times 10^6/\text{ml}$ ) fueron incubadas con <sup>125</sup>I-VIP 45 pM durante 90 minutos a 15 °C en presencia de concentraciones crecientes de VIP frío, determinándose para cada concentración la unión específica del trazador. Cada punto es la media  $\pm$  E.S.M. de catorce experimentos realizados por triplicado.

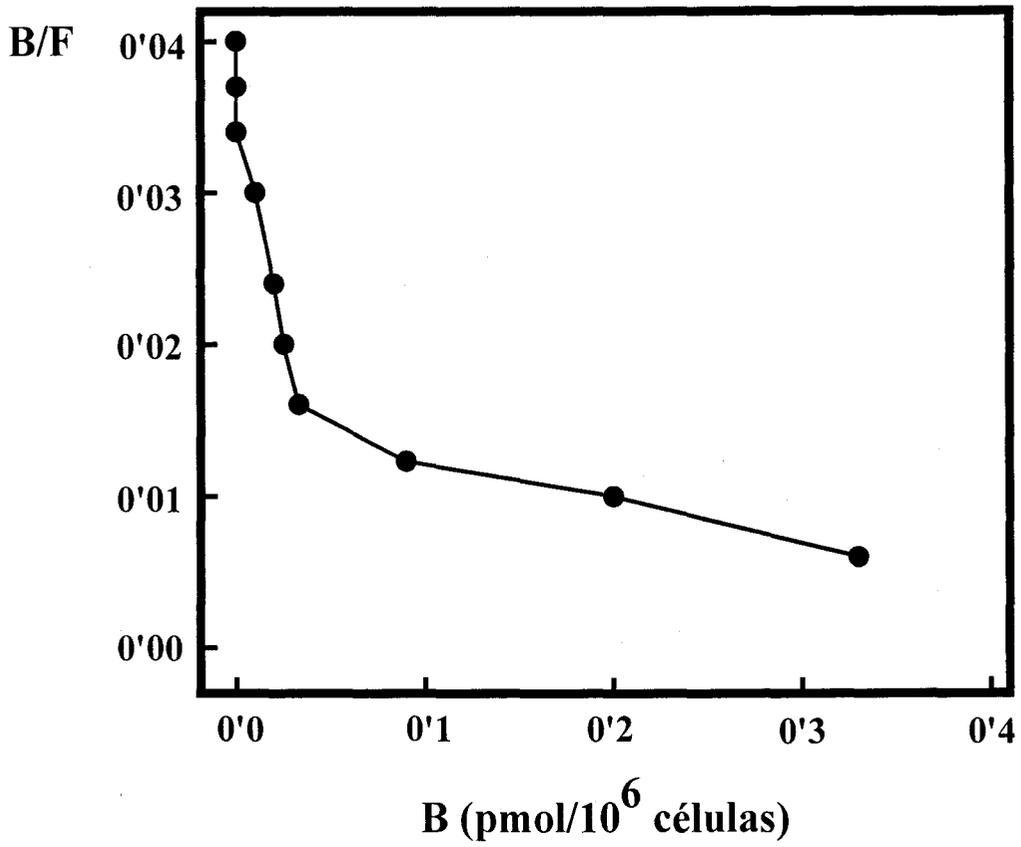


Fig. 17.- Representación del análisis de SCATCHARD (1949) de los mismos datos de la Fig.16. B: VIP unido. F: VIP libre.

**TABLA XXI**

**Constantes de disociación ( $K_d$ ), capacidad de unión (fmol/ $10^6$  células) y número de sitios por célula para los receptores de VIP en macrófagos peritoneales de ratón calculados a partir del análisis de Scatchard del estudio estequiométrico.**

	$K_d$ (nM)	Fmol/ $10^6$ células	Sitios/célula
<b>Alta afinidad</b>	$1'05 \pm 0'2$	$19'2 \pm 2'8$	$11'5 \pm 2'3 \times 10^3$
<b>Baja afinidad</b>	$66'4 \pm 11'0$	$706'6 \pm 172'0$	$4'26 \pm 1'04 \times 10^5$

Mediante el programa "EBDA" (McPHERSON, 1983), se realizó el análisis de SCATCHARD de cada uno de los experimentos de dosis-efecto de VIP en macrófagos peritoneales de ratón y, utilizando el programa de ajuste no-lineal "LIGAND" (MUNSON y RODBARD, 1980) adaptado por McPHERSON (1985), se calcularon la  $K_d$  y la capacidad de unión de los receptores de VIP en macrófagos peritoneales de ratón.. En todo los casos, el mejor ajuste correspondió a un modelo de dos poblaciones de receptores. La  $K_d$  y la capacidad de unión representadas en la tabla son la media  $\pm$  E.S.M de los resultados de los 14 experimentos a que hace referencia la Fig. 16.

## 1.6. ESPECIFICIDAD.

Para investigar la especificidad de los receptores para VIP en los macrófagos peritoneales de ratón, se estudió la capacidad que tenían diferentes péptidos, relacionados o no estructuralmente con el VIP, para inhibir competitivamente la unión del  $^{125}\text{I}$ -VIP a sus receptores (Fig. 18).

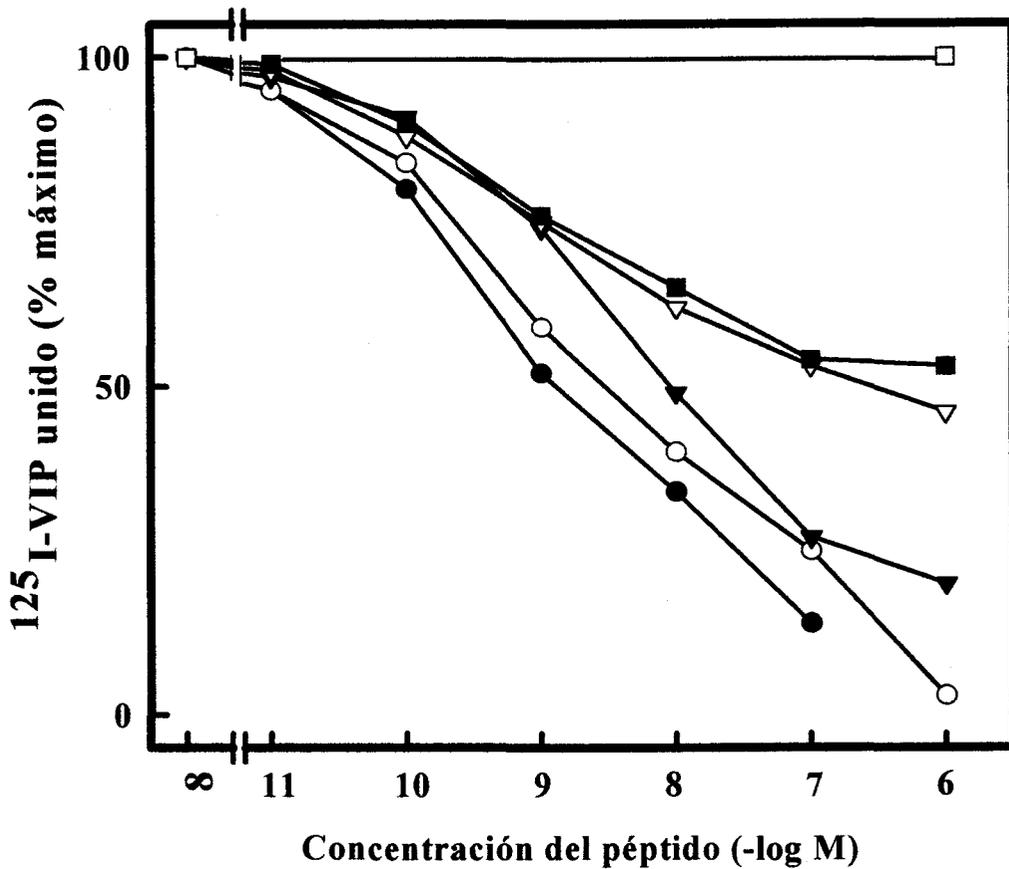
Así se observó como la helodermina inhibió la unión del trazador con una potencia 1'6 veces menor a la del VIP. El factor liberador de hormona de crecimiento de rata (GRFr) inhibió la unión del trazador con una potencia 3'5 veces menor a la del VIP. El péptido histidina amino-terminal isoleucina amida carboxi-terminal (PHI) también desplazó al trazador de su unión a los receptores, pero con más baja potencia (100 veces menor que la del VIP). La secretina, otro péptido relacionado estructuralmente con el VIP, produjo una discreta inhibición de la unión del  $^{125}\text{I}$ -VIP, pero a concentraciones muy elevadas. Los valores de la  $\text{IC}_{50}$  para cada uno de los péptidos son expresados en la tabla XXII.

Por otra parte, también se observó como ni el glucagón, que es un péptido estructuralmente relacionado con el VIP, ni otros péptidos sin relación estructural con él, como la insulina, la somatostatina, la pancreastatina o el octapéptido de la colecistoquinina (CCK 26-33), mostraron efecto alguno sobre la unión del trazador a sus receptores, a concentraciones tan elevadas como  $10^{-6}$  M.

## 1.7. EFECTO DE LOS ANTAGONISTAS DEL VIP: [4-Cl-D-Phe<sup>6</sup>, Leu<sup>17</sup>] VIP y [Ac-Tyr<sup>1</sup>, D-Phe<sup>2</sup>] GRF<sub>1-29</sub>-NH<sub>2</sub>, SOBRE LA UNIÓN ESPECÍFICA DEL VIP A LOS MACRÓFAGOS PERITONEALES DE RATÓN.

Al añadir al medio de incubación concentraciones crecientes de [4-Cl-D-Phe<sup>6</sup>, Leu<sup>17</sup>] VIP y [Ac-Tyr<sup>1</sup>, D-Phe<sup>2</sup>] GRF<sub>1-29</sub>-NH<sub>2</sub>, manteniendo fija la concentración de  $^{125}\text{I}$ -VIP (45 pM), se observó una progresiva disminución de la unión específica con el consiguiente desplazamiento del trazador (Fig. 19).

El péptido [4-Cl-D-Phe<sup>6</sup>, Leu<sup>17</sup>] VIP inhibió la unión del trazador con una potencia 69 veces menor a la del VIP. El péptido [Ac-Tyr<sup>1</sup>, D-Phe<sup>2</sup>] GRF<sub>1-29</sub>-NH<sub>2</sub> también desplazó al trazador de su unión a los receptores, pero con una potencia mas baja que el anterior y que corresponde a 158 veces menor que la del VIP. Los valores de la  $\text{IC}_{50}$  para el VIP y para cada uno de los péptidos vienen recogidos en la tabla XXIII.



**Fig. 18.-** Inhibición competitiva de la unión del  $^{125}\text{I-VIP}$  a los macrófagos peritoneales de ratón por el VIP frío (●), helodermina (○), GRFr (▼), PHI (▽), secretina (■), glucagón, insulina, somatostatina, pancreastatina y octapéptido de colecistoquinina (□). Las condiciones de incubación son idénticas a las del pie de la Fig. 16. La unión específica se expresa como porcentaje de la existente en ausencia de VIP frío (máximo). Cada punto es la media de ocho experimentos realizados por triplicado. Los errores estándar de la media no se expresan para mayor claridad, siendo siempre inferiores al 10% de los valores medios.

**TABLA XXII**

Concentraciones inhibitorias semimáximas ( $IC_{50}$ ) de VIP y de los péptidos que inhibieron la unión del  $^{125}I$ -VIP a sus receptores en macrófagos peritoneales de ratón.

Péptido	$IC_{50}$ (nM)
VIP	$1'6 \pm 0'3$
Helodermina	$2'6 \pm 0'6$
GRFr	$5'3 \pm 1'9$
PHI	$160'0 \pm 21'0$
Secretina	$1000'0 \pm 237'0$

Las  $IC_{50}$  representadas en la tabla son la media  $\pm$  E.S.M. de los resultados de los ocho experimentos a que hace referencia la Fig. 18.

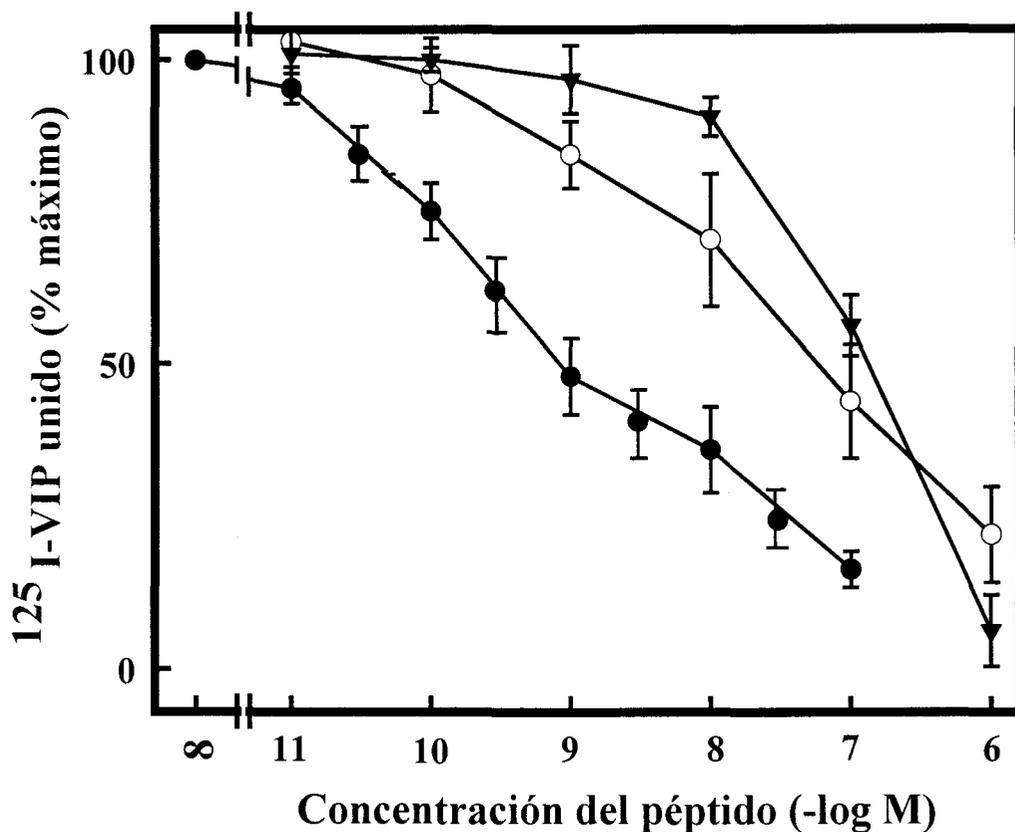


Fig. 19.- Inhibición competitiva de la unión del <sup>125</sup>I-VIP a los macrófagos peritoneales de ratón por los antagonistas [4-Cl-D-Phe<sup>6</sup>,Leu<sup>17</sup>]VIP y [Ac-Tyr<sup>1</sup>,D-Phe<sup>2</sup>]GRF<sub>1-29</sub>-NH<sub>2</sub>. Las células ( $1.5 \times 10^6$  células/ml) se incubaron con <sup>125</sup>I-VIP 45 pM, durante 90 minutos a 15 °C en presencia de concentraciones crecientes de VIP (●), [4-Cl-D-Phe<sup>6</sup>,Leu<sup>17</sup>]VIP (○) y [Ac-Tyr<sup>1</sup>,D-Phe<sup>2</sup>]GRF<sub>1-29</sub>-NH<sub>2</sub> (▼). La unión específica es expresada como el porcentaje de unión máxima, medida en presencia del trazador solo. Cada punto es la media  $\pm$  E.S.M. de cinco experimentos realizados por triplicado.

**TABLA XXIII**

Concentraciones inhibitorias semimáximas ( $IC_{50}$ ) de VIP y de los péptidos [4-Cl-D-Phe<sup>6</sup>,Leu<sup>17</sup>]VIP (VIP-A-1) y [Ac-Tyr<sup>1</sup>,D-Phe<sup>2</sup>]GRF<sub>1-29</sub>-NH<sub>2</sub> (VIP-A-2) que inhibieron la unión del <sup>125</sup>I-VIP a sus receptores en macrófagos peritoneales de ratón.

Péptido	$IC_{50}$ (nM)
VIP	1'580 ± 0'12
VIP-A-1	110'8 ± 10'7
VIP-A-2	251'0 ± 19'2

Las  $IC_{50}$  representadas en la tabla son la media ± E.S.M. de los resultados de los cinco experimentos a que hace referencia la Fig. 19.

## **2. EFECTO DEL VIP SOBRE LA PRODUCCIÓN DE AMPc EN MACRÓFAGOS PERITONEALES DE RATÓN.**

### **2.1. EFECTO DE CONCENTRACIONES CRECIENTES DE VIP SOBRE LA PRODUCCIÓN DE AMPc EN MACRÓFAGOS PERITONEALES DE RATÓN.**

El VIP estimuló la producción de AMPc en macrófagos peritoneales de ratón en forma dosis-dependiente y monofásica (Fig. 20). La respuesta tuvo lugar en un rango de concentraciones de VIP de 0'01-1000 nM. La dosis efectiva semimáxima (ED<sub>50</sub>) fue 1'0± 0'2 nM y la producción máxima de AMPc (3 veces sobre la basal) se obtuvo entre VIP<sup>-7</sup> y VIP<sup>-6</sup> M.

### **2.2. EFECTOS DE DIFERENTES PÉPTIDOS SOBRE LA PRODUCCIÓN DE AMPc EN MACRÓFAGOS PERITONEALES DE RATÓN: ESPECIFICIDAD.**

Para poder determinar la especificidad del efecto estimulador del VIP sobre la producción de AMPc en macrófagos peritoneales de ratón, se estudió el efecto de diferentes péptidos, relacionados o no estructuralmente con el VIP (Fig. 20).

Varios péptidos relacionados estructuralmente con el VIP, como la helodermina, el factor liberador de la hormona del crecimiento de rata (GRFr) y el péptido histidina isoleucina amida (PHI) también estimularon la producción de AMPc, pero con una eficacia inferior a la del VIP. Así, se pudo observar que la potencia con la que la helodermina estimuló la producción de AMPc fue de 3 veces menor que la del VIP, la del GRFr fue de 10 veces menor que la del VIP y la del PHI fue de 158 veces menor que la del VIP. La secretina tuvo solamente un ligero efecto estimulador, siendo su potencia inferior en 1200 veces a la del VIP. Los valores de la dosis efectiva semimáxima (ED<sub>50</sub>) para cada uno de ellos se recogen en la tabla XXIV.

Otros péptidos como la insulina, la pancreastatina, el glucagón, la somatostatina y el octapéptido de la colecistoquinina, no modificaron los niveles basales de AMPc incluso utilizados a concentraciones tan altas como 1µM.

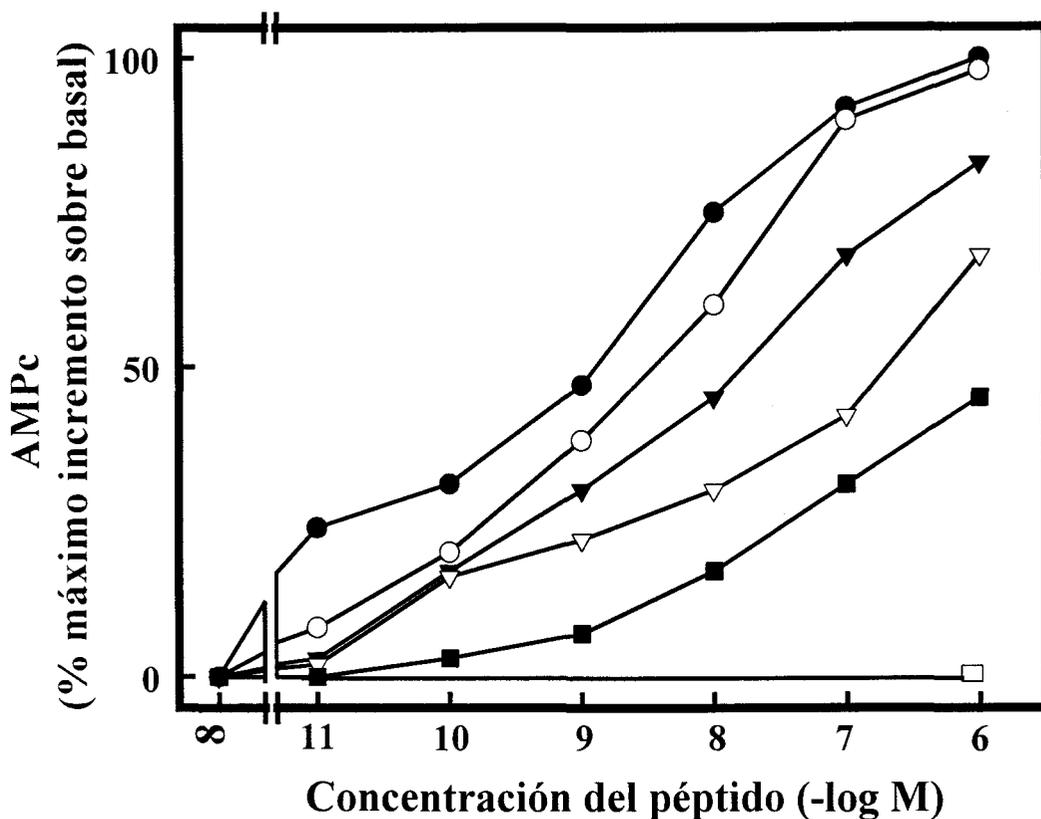


Fig. 20.- Efecto del VIP y otros péptidos sobre la producción de AMPc en macrófagos peritoneales de ratón. Se incubaron  $10^6$  células/ml durante 45 minutos a  $15^\circ C$ , en presencia de concentraciones crecientes de VIP (●), helodermina (○), GRFr (▼), PHI (▽), secretina (■), glucagón, insulina, somatostatina, pancreastatina y octapéptido de la colecistoquinina (□). Los resultados se expresan como porcentaje del máximo incremento de AMPc sobre la basal. Cada punto es la media de cinco experimentos realizados por triplicado. Para mayor claridad los errores estándar de la media no están indicados, siendo siempre inferiores al 10% del valor de la media.

**TABLA XXIV**

**Dosis efectivas semimáximas (ED<sub>50</sub>) para el VIP y otros péptidos en la producción de AMPc en macrófagos peritoneales de ratón.**

<b>Péptido</b>	<b>ED<sub>50</sub> (nM)</b>
VIP	1'0 ± 0'3
Helodermina	3'3 ± 0'6
GRFr	10'0 ± 1'9
PHI	158'0 ± 26
Secretina	1200'0 ± 215

Las ED<sub>50</sub> representadas en la tabla son la media ± E.S.M de los resultados de los cinco experimentos a que hace referencia la Fig. 20.

### **2.3. EFECTO DE LOS ANTAGONISTAS DEL VIP [ 4-Cl-D-Phe<sup>6</sup>, Leu<sup>17</sup>] VIP y [ Ac-Tyr<sup>1</sup>, D-Phe<sup>2</sup>] GRF<sub>1-29</sub>-NH<sub>2</sub> SOBRE LA PRODUCCIÓN DE AMPc EN MACRÓFAGOS PERITONEALES DE RATÓN.**

Para determinar el efecto de estos dos péptidos sobre la producción de AMPc en macrófagos peritoneales de ratón, se añadieron al medio de incubación concentraciones crecientes de ambos péptidos, no observándose ningún estímulo en la producción de AMPc incluso a concentraciones tan altas como 1  $\mu$ M (Fig. 21)

Estos resultados, junto con los efectos que tienen ambos péptidos sobre la unión específica del VIP a los macrófagos peritoneales de ratón, sugieren que pueden tener un efecto antagonista sobre el sistema receptor-efector del VIP en macrófagos peritoneales de ratón.

### **2.4. EFECTO DE LOS ANTAGONISTAS DEL VIP [ 4 - Cl-D-Phe<sup>6</sup>,Leu<sup>17</sup>] VIP y [ Ac-Tyr<sup>1</sup>,D-Phe<sup>2</sup>] GRF<sub>1-29</sub>-NH<sub>2</sub>, SOBRE LA PRODUCCIÓN DE AMPc ESTIMULADA POR EL VIP EN MACRÓFAGOS PERITONEALES DE RATÓN.**

Para determinar las propiedades antagonistas de ambos péptidos sobre el receptor de VIP en macrófagos peritoneales de ratón, se estudió el efecto que ejercían altas concentraciones de los mismos (10  $\mu$ M) sobre la producción de AMPc estimulada por concentraciones crecientes de VIP (0.01-1000 nM). Así, se observó como ambos antagonistas modificaban la ED<sub>50</sub> del VIP y disminuían su efecto máximo (Fig. 22). Las correspondientes ED<sub>50</sub> se muestran en la tabla XXV.

Para estudiar la capacidad de los antagonistas [ 4-Cl-D-Phe<sup>6</sup>, Leu<sup>17</sup>] VIP y [ Ac-Tyr<sup>1</sup>,D-Phe<sup>2</sup>] GRF<sub>1-29</sub>-NH<sub>2</sub> de disminuir la producción de AMPc estimulada por VIP, se añadió al medio de incubación concentraciones crecientes de los mismos (0.01-1000 nM) en presencia de VIP a una concentración de 1 nM (Fig. 23). Las concentraciones de ambos péptidos necesarias para disminuir al 50% el incremento máximo de AMPc son de 30 nM para el [4-Cl-D-Phe<sup>6</sup>,Leu<sup>17</sup>] VIP y de 95 nM para el [ Ac-Tyr<sup>1</sup>,D-Phe<sup>2</sup>] GRF<sub>1-29</sub>-NH<sub>2</sub>.

Las constantes de inhibición (Ki) para los dos antagonistas, se obtuvieron según la fórmula expresada en el apartado 2.7.2.2 de Material y Métodos y se muestran en la tabla XXV.

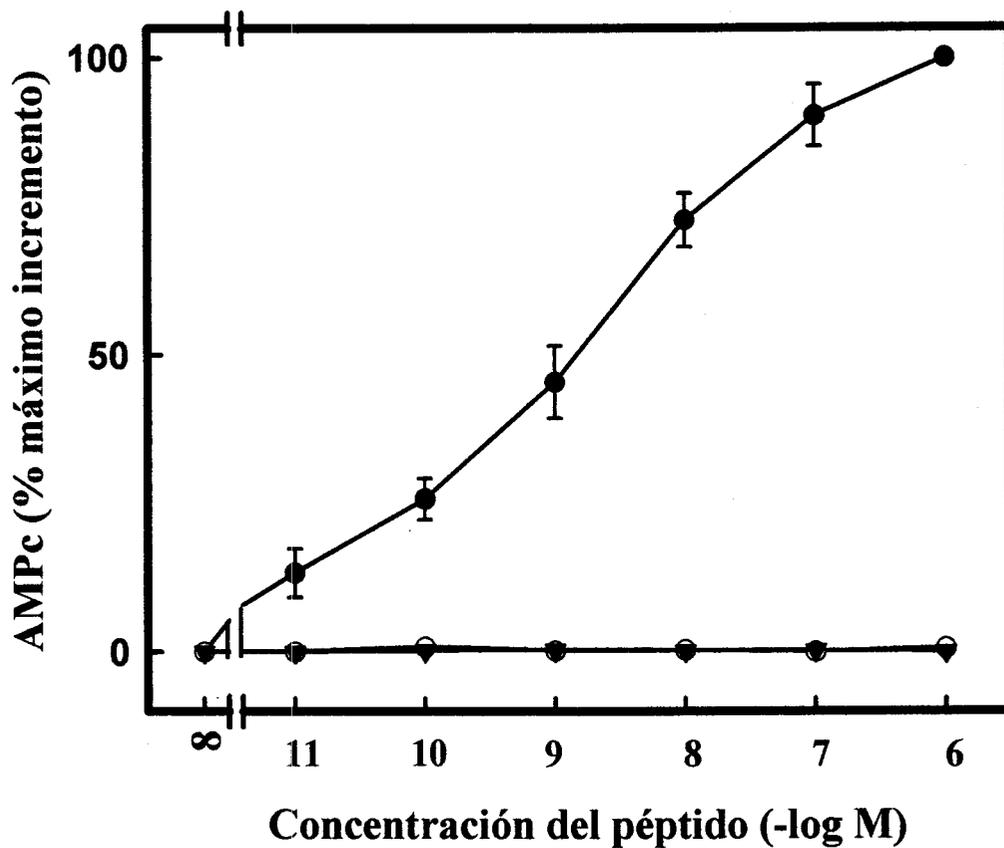


Fig 21.- Efecto del VIP y de los antagonistas [4-Cl-D-Phe<sup>6</sup>,Leu<sup>17</sup>]VIP y [Ac-Tyr<sup>1</sup>,D-Phe<sup>2</sup>]GRF<sub>1-29</sub>-NH<sub>2</sub> sobre la producción de AMPc en macrófagos peritoneales de ratón. Se incubaron 10<sup>6</sup> células/ml durante 45 minutos a 15 °C, en presencia de concentraciones crecientes de VIP (●), [4-Cl-D-Phe<sup>6</sup>,Leu<sup>17</sup>]VIP (○), [Ac-Tyr<sup>1</sup>,D-Phe<sup>2</sup>]GRF<sub>1-29</sub>-NH<sub>2</sub> (▼). Los resultados se expresan como porcentaje del máximo incremento de AMPc sobre la basal. Cada punto es la media ± E.S.M. de cinco experimentos realizados por triplicado.

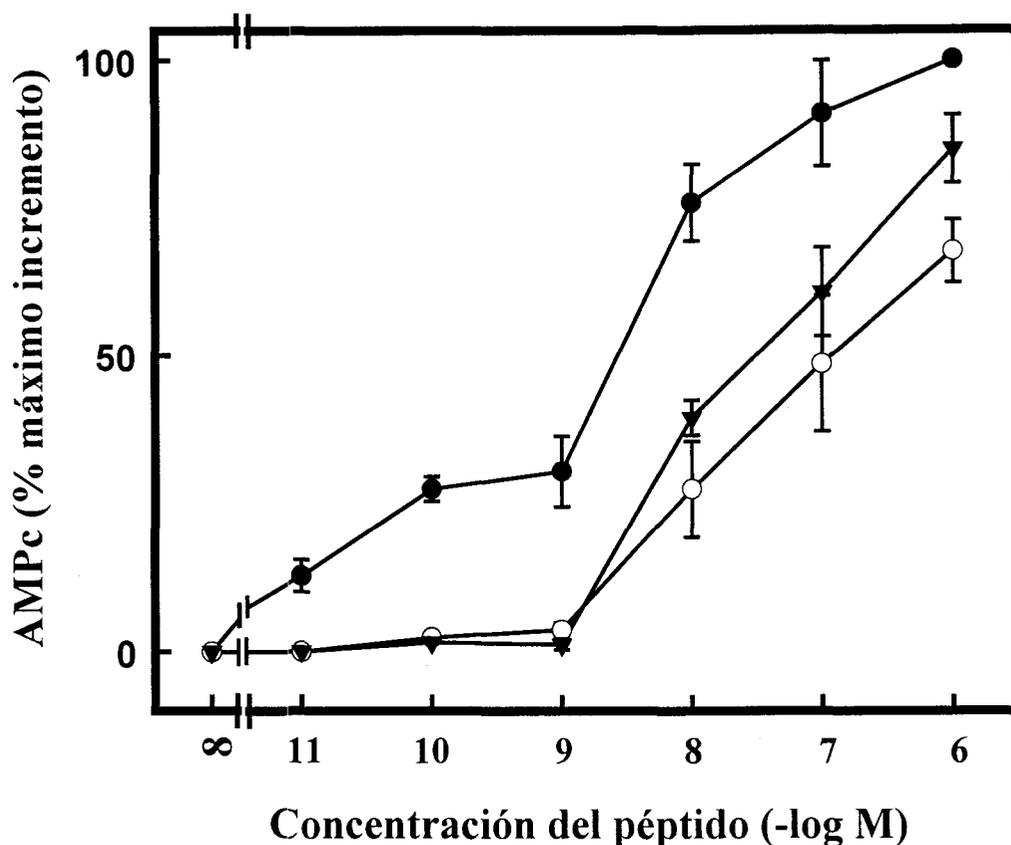


Fig. 22.- Efecto de los antagonistas [4-Cl-D-Phe<sup>6</sup>,Leu<sup>17</sup>]VIP (○) y [Ac-Tyr<sup>1</sup>,D-Phe<sup>2</sup>]GRF<sub>1-29</sub>NH<sub>2</sub> (▼) sobre la producción de AMPc estimulada por concentraciones crecientes de VIP (●) en macrófagos peritoneales de ratón. Se incubaron 10<sup>6</sup> células/ml durante 45 minutos a 15 °C, en presencia de diferentes concentraciones de los péptidos indicados. Los resultados se expresan como porcentaje del máximo incremento de AMPc sobre la basal. Cada punto es la media ± E.S.M. de cinco experimentos realizados por triplicado.

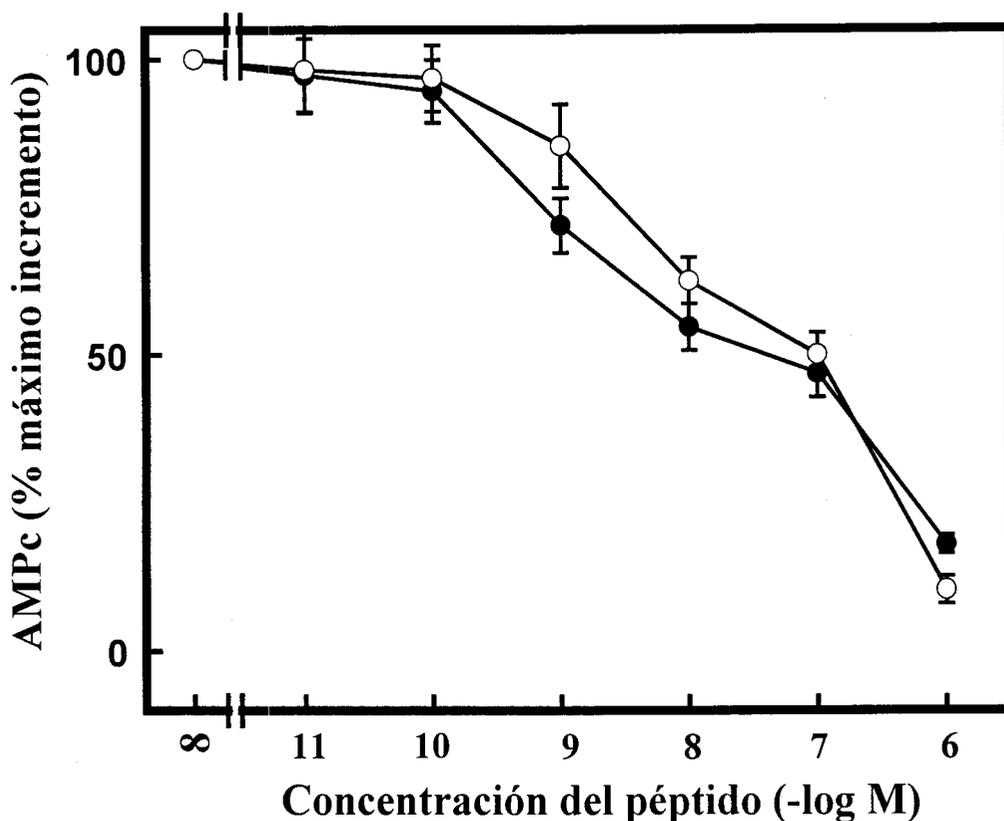


Fig.23.- Efecto de concentraciones crecientes de los antagonistas [4-Cl-D-Phe<sup>6</sup>,Leu<sup>17</sup>]VIP (●) y [Ac-Tyr<sup>1</sup>,D-Phe<sup>2</sup>]GRF<sub>1-29</sub>-NH<sub>2</sub> (○) sobre la producción de AMPc estimulada por una concentración 1nM de VIP en macrófagos peritoneales de ratón. Se incubaron 10<sup>6</sup> células/ml durante 45 minutos a 15 °C, en presencia de VIP 1 nM y de diferentes concentraciones de los péptidos indicados. Los resultados se expresan como porcentaje de la máxima producción de AMPc. Cada punto es la media ± E.S.M. de cinco experimentos realizados por triplicado.

**TABLA XXV**

Dosis efectivas semimáximas ( $ED_{50}$ ) para los péptidos antagonistas del VIP sobre la producción de AMPc estimulada por VIP en macrófagos peritoneales de ratón.

Péptidos	$ED_{50}$ (nM)	$K_i$ (nM)
VIP	$0.90 \pm 0.15$	
VIP-A-1	$44.0 \pm 3.7$	209
VIP-A-2	$17.8 \pm 1.2$	532.5

Los datos representados en la tabla son la media  $\pm$  E.S.M. de los resultados de los cinco experimentos a que hace referencia las Figs. 22 y 23. El valor de  $K_i$  fue calculado de acuerdo con la ecuación que viene especificada en el apartado 2.7.2.2. de Métodos.

VIP-A-1: [4-Cl-D-Phe<sup>6</sup>,Leu<sup>17</sup>]VIP; VIP-A-2: [Ac-Tyr<sup>1</sup>,D-Phe<sup>2</sup>]GRF<sub>1-29</sub>-NH<sub>2</sub>.

## 2.5. EFECTO DE DIFERENTES AGENTES FARMACOLÓGICOS SOBRE EL EFECTO INHIBITORIO DE LOS ANTAGONISTAS DEL VIP [4-Cl-D-Phe<sup>6</sup>,Leu<sup>17</sup>]VIP y [Ac-Tyr<sup>1</sup>, D-Phe<sup>2</sup>]GRF<sub>1-29</sub>-NH<sub>2</sub> SOBRE LA PRODUCCION DE AMPc ESTIMULADA POR EL VIP EN MACRÓFAGOS PERITONEALES DE RATÓN.

Para determinar la especificidad del efecto inhibitorio de ambos péptidos en el sistema receptor-efector del VIP en macrófagos peritoneales de ratón, se estudió el efecto de diferentes fármacos sobre la producción de AMPc.

Así, se comparó el efecto del agonista  $\beta$ -adrenérgico isoproterenol a una concentración de 10  $\mu$ M sobre la producción de AMPc en presencia y en ausencia de concentraciones de 10  $\mu$ M de los antagonistas del VIP [4-Cl-D-Phe<sup>6</sup>,Leu<sup>17</sup>]VIP y [Ac-Tyr<sup>1</sup>,D-Phe<sup>2</sup>]GRF<sub>1-29</sub>-NH<sub>2</sub>. Se observó que ambos antagonistas no inhibían la estimulación que ejerce el isoproterenol sobre la producción de AMPc (Tabla XXVI). También se observó que el efecto sinérgico del VIP (0'1  $\mu$ M) y el isoproterenol (10 $\mu$ M) en la estimulación de la producción de AMPc, es completamente abolido tanto por el [4-Cl-D-Phe<sup>6</sup>,Leu<sup>17</sup>]VIP a una concentración de 10  $\mu$ M, como por el [Ac-Tyr<sup>1</sup>,D-Phe<sup>2</sup>]GRF<sub>1-29</sub>-NH<sub>2</sub> a la misma concentración (Tabla XXVI). Estos resultados vienen a demostrar que ambos antagonistas actúan por la vía específica del receptor de VIP.

La adición al medio de incubación del antagonista  $\beta$ -adrenérgico propanolol (10  $\mu$ M), no afectó a la estimulación de la producción de AMPc por el VIP, ni al papel antagonista del [4-Cl-D-Phe<sup>6</sup>,Leu<sup>17</sup>]VIP y del [Ac-Tyr<sup>1</sup>,D-Phe<sup>2</sup>]GRF<sub>1-29</sub>-NH<sub>2</sub> (Tabla XXVI).

**TABLA XXVI**

Efectos de diferentes agentes farmacológicos sobre el efecto inhibitorio de los antagonistas del VIP sobre la producción de AMPc estimulada por el VIP en macrófagos peritoneales de ratón.

	Acumulación de AMPc (pmol/10 <sup>6</sup> células)
Control	2'1 ± 0'9
Iso	22'12 ± 2'0
Iso + VIP-A-1	21'45 ± 0'8
Iso + VIP-A-2	21'48 ± 2'0
Iso + VIP	31'30 ± 2'9
Iso + VIP + VIP-A-1	25'11 ± 2'5
Iso + VIP + VIP-A-2	26'00 ± 1'3
Prop	3'15 ± 0'5
Prop + VIP	8'42 ± 1'1
Prop + VIP + VIP-A-1	3'42 ± 0'8
Prop + VIP + VIP-A-2	3'15 ± 0'1

Iso: isoproterenol (10 μM); VIP-A-1: [4-Cl-D-Phe<sup>6</sup>,Leu<sup>17</sup>]VIP (10 μM); VIP-A-2: [Ac-Tyr<sup>1</sup>,D-Phe<sup>2</sup>]GRF<sub>1-29</sub>-NH<sub>2</sub> (10 μM); VIP (0'1 μM); Prop: propanolol (10 μM).

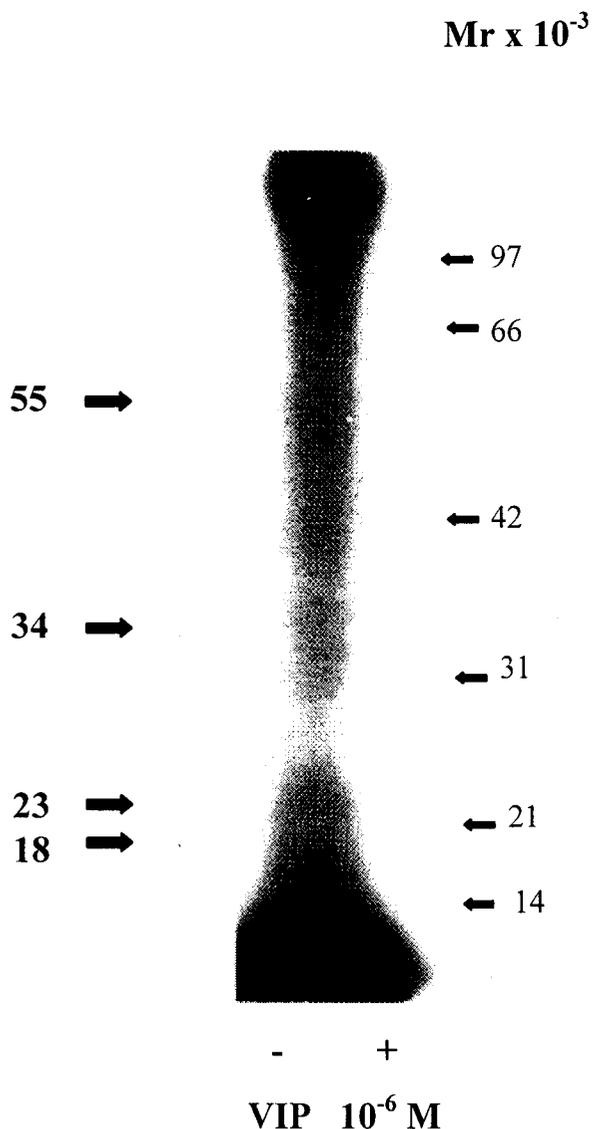
### **3. DETERMINACIÓN DE LA MASA MOLECULAR RELATIVA DEL RECEPTOR DE VIP MEDIANTE LA TÉCNICA DE CROSS-LINKING EN MACRÓFAGOS PERITONEALES DE RATÓN Y EFECTO DE LOS ANTAGONISTAS [4-Cl-D-Phe<sup>6</sup>,Leu<sup>17</sup>] VIP y [Ac-Tyr<sup>1</sup>,D-Phe<sup>2</sup>]GRF<sub>1-29</sub>-NH<sub>2</sub>.**

#### **3.1. DETERMINACIÓN DE LA MASA MOLECULAR RELATIVA DEL RECEPTOR DE VIP.**

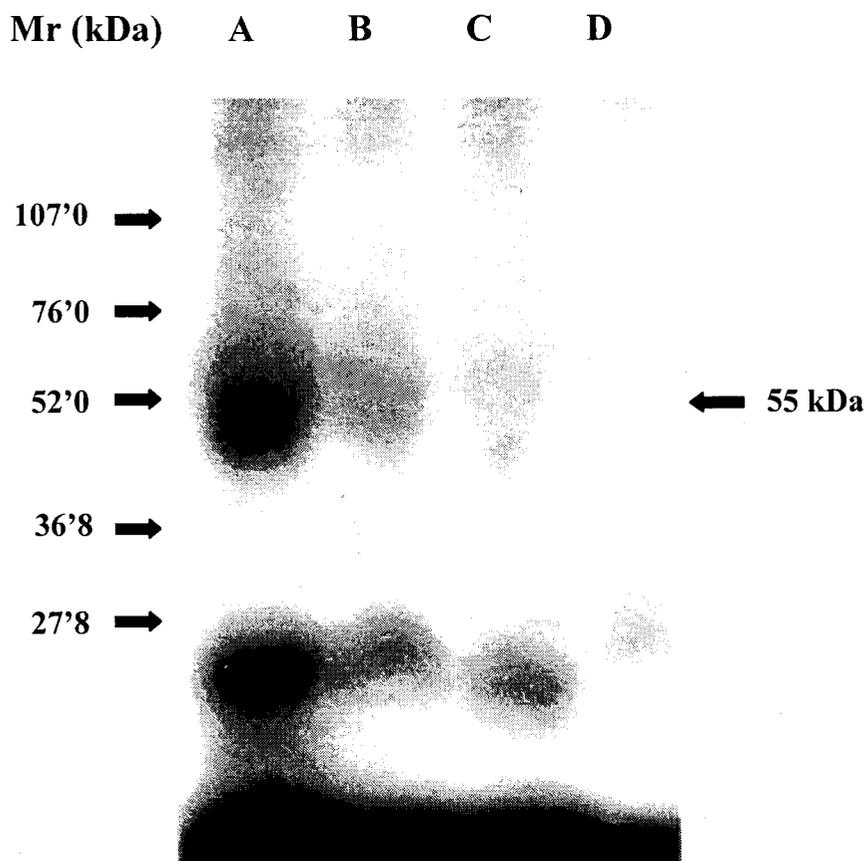
Para identificar a nivel molecular el receptor de VIP en membranas de macrófagos peritoneales de ratón, se realizó un cross-linking seguido de electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) usando proteínas de masa molecular relativa (Mr) conocida. En la autorradiografía (Fig. 24) la banda mayor se identificó con una masa molecular relativa de 55 KDa. Se observaron también otras bandas menores que se correspondían a masas moleculares relativas de 34 KDa, 23 KDa y 18 KDa. Cuando se procedió a realizar el cross-linking en presencia de VIP 1  $\mu$ M, todas estas bandas fueron completamente abolidas.

#### **3.2. EFECTO DE LOS ANTAGONISTAS DEL VIP [4-Cl-D-Phe<sup>6</sup>,Leu<sup>17</sup>] VIP y [Ac-Tyr<sup>1</sup>,D-Phe<sup>2</sup>]GRF<sub>1-29</sub>-NH<sub>2</sub> EN LOS ESTUDIOS DE CROSS-LINKING DEL <sup>125</sup>I-VIP A MEMBRANAS DE MACRÓFAGOS PERITONEALES DE RATÓN.**

Para analizar el efecto de los dos péptidos antagonistas a nivel molecular, se estudió la unión covalente del <sup>125</sup>I-VIP a membranas de macrófagos peritoneales de ratón en ausencia y en presencia de 100nM de [4-Cl-D-Phe<sup>6</sup>,Leu<sup>17</sup>] VIP y de [Ac-Tyr<sup>1</sup>,D-Phe<sup>2</sup>]GRF<sub>1-29</sub>-NH<sub>2</sub>. Se realizó un cross-linking seguido de electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE). La autorradiografía revela (Fig. 25) que la intensidad de la banda que corresponde a una masa molecular relativa de 55 KDa es significativamente menor en presencia de los antagonistas. Cuando el cross-linking se realizó en presencia de VIP 1  $\mu$ M, esta banda fue completamente abolida.



**Fig. 24.- Determinación de la masa molecular relativa de los receptores de VIP en membranas de macrófagos peritoneales de ratón.** Se realizó un cross-linking seguido de electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) usando proteínas de masa molecular relativa (Mr) conocida (ver Material y Método). En la autorradiografía, se observan dos carriles, uno correspondiente a membranas de macrófagos peritoneales de ratón incubadas con <sup>125</sup>I-VIP en ausencia (-) de VIP frío (1 μM) y el otro correspondiente a membranas de macrófagos peritoneales de ratón incubadas con <sup>125</sup>I-VIP en presencia (+) de VIP frío (1 μM). Se indica la masa molecular relativa de las proteínas de referencia (Mr). La autorradiografía, es representativa de cuatro experimentos.



**Fig. 25.- Efecto de los antagonistas del VIP [4-Cl-D-Phe<sup>6</sup>,Leu<sup>17</sup>]VIP y [Ac-Tyr<sup>1</sup>,D-Phe<sup>2</sup>]GRF<sub>1-29</sub>-NH<sub>2</sub> en los estudios de cross-linking del <sup>125</sup>I-VIP a las membranas de macrófagos peritoneales de ratón.** Se realizó un cross-linking seguido de electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) tal y como se especifica en la Fig.24. En la autorradiografía se observan cuatro líneas. La línea A corresponde a membranas de macrófagos peritoneales de ratón incubadas con <sup>125</sup>I-VIP en ausencia de VIP frío (1μM), la línea D corresponde a membranas de macrófagos peritoneales de ratón incubadas con <sup>125</sup>I-VIP en presencia de VIP frío (1μM), la línea B corresponde a membranas de macrófagos peritoneales de ratón incubadas con <sup>125</sup>I-VIP en presencia de [4-Cl-D-Phe<sup>6</sup>,Leu<sup>17</sup>]VIP (100 nM) y la línea C corresponde a membranas de macrófagos peritoneales de ratón incubadas con <sup>125</sup>I-VIP en presencia de [Ac-Tyr<sup>1</sup>,D-Phe<sup>2</sup>]GRF<sub>1-29</sub>-NH<sub>2</sub> (100 nM). Se indica la masa molecular relativa de las proteínas de referencia (Mr). La autorradiografía es representativa de cuatro experimentos.

**DISCUSSION.**

Se ha descrito la existencia de receptores para VIP en distintos tejidos, células y líneas celulares. También se han descrito receptores para VIP en macrófagos peritoneales de rata. Sin embargo, no había sido estudiado el sistema receptor-efector para VIP en macrófagos peritoneales de ratón.

En el presente trabajo se ha caracterizado por primera vez receptores para VIP en macrófagos peritoneales de ratón, población celular implicada en la respuesta inmune. Se ha demostrado que estos receptores son funcionales, puesto que de su interacción con el VIP se sigue un incremento en la producción de AMPc. Además, se ha determinado su correspondiente peso molecular, y se ha demostrado también como los péptidos [4-Cl-D-Phe<sup>6</sup>,Leu<sup>17</sup>]VIP y [Ac-Tyr<sup>1</sup>,D-Phe<sup>2</sup>]GRF<sub>1-29</sub>-NH<sub>2</sub> se comportan como antagonistas de tipo competitivo y específicos del sistema receptor-efector del VIP en macrófagos peritoneales de ratón.

En esta discusión nos referiremos en primer lugar, a la interacción del VIP con los macrófagos peritoneales de ratón y a la caracterización de su peso molecular, en segundo lugar, se discutirá el efecto del VIP sobre la producción de AMPc en los macrófagos y en tercer lugar se abordará la interacción de los antagonistas arriba mencionados con los macrófagos peritoneales de ratón.

## **1. INTERACCIÓN DEL VIP CON LOS MACRÓFAGOS PERITONEALES DE RATÓN.**

La preparación celular utilizada ha sido obtenida siguiendo el método de TSYNAWAKI y NATHAN (1984), utilizado ampliamente en la literatura para la obtención de macrófagos peritoneales (BROMBERG y PICK, 1985; RIST et al., 1990; SEGURA et al., 1991; DE LA FUENTE et al., 1993). La preparación celular contenía un 92'1 de macrófagos, un 5'8% de polinucleares, células que no poseen receptores para el VIP (WIIK et al., 1985), y tan sólo un 2'1% de linfocitos, células en las que si se ha descrito receptores para el VIP (GUERRERO et al., 1981; DANEK et a., 1983; CALVO et al., 1986b). Los macrófagos peritoneales obtenidos no se consideran activados, sino solamente estimulados o inflamatorios, ya que no reúnen los criterios bioquímicos de activación (KARNOVSKY y LAZDINS, 1978), aunque si poseen una capacidad mayor de quimiotaxis y fagocitosis que los macrófagos residentes.

El VIP ha sido marcado con <sup>125</sup>I mediante el método de la cloramina T (LABURTHE et al., 1977), consiguiéndose una actividad específica de 830 Ci/mmol.

Considerando la actividad específica del  $^{125}\text{I}$ -VIP utilizado y, teniendo en cuenta que la máxima actividad específica posible es de 2.200 Ci/mmol cuando todas y cada una de las moléculas de VIP han sido marcadas con una molécula de  $^{125}\text{I}$ , lo que sólo se consigue cuando se utiliza VIP monoiodado purificado mediante HPLC (MARIE et al., 1985; MARTIN et al., 1986), el trazador que se ha utilizado contiene, aproximadamente, 0,39 átomos de  $^{125}\text{I}$  por molécula de VIP, actividad específica que se considera suficiente para la caracterización de receptores (LABURTHE et al., 1986).

Los estudios cinéticos y estequiométricos muestran que la unión del VIP a sus receptores en macrófagos peritoneales de ratón es dependiente del tiempo, de la temperatura y del pH, reversible, saturable y específica, en consonancia con lo que ya ha sido descrito en células mononucleares sanguíneas humanas (GUERRERO et al., 1981; DANEK et al., 1983; CALVO et al., 1986a), monocitos circulantes humanos (WIJK et al., 1985), linfocitos de ratón (OTTAWAY y GRENBORG, 1984), células linfoides de rata (CALVO et al., 1986b), esplenocitos de conejo (PEURIERE et al., 1990), macrófagos peritoneales de rata (SEGURA et al., 1991) y macrófagos alveolares de rata (SAKAKIBARA et al., 1994).

Los experimentos de unión han sido realizados bajo condiciones experimentales óptimas: temperatura de 15 °C, durante 90 minutos de incubación y con una concentración celular de  $1,5 \times 10^6$  células /ml. En las condiciones mencionadas, la degradación del receptor fue tan solo del 25% y la del trazador no superó el 15%.

La unión inespecífica, determinada en presencia de VIP 1  $\mu\text{M}$ , representó entre un 3-4% de la radioactividad total añadida (45% aproximadamente de la unión total). Esta relativamente elevada unión inespecífica se debe probablemente, a la internalización por endocitosis del complejo receptor-trazador, con la consiguiente imposibilidad de desplazamiento del  $^{125}\text{I}$ -VIP intracelular, que pasa a incrementar la radioactividad remanente no desplazable por el VIP 1  $\mu\text{M}$ . Así, también se ha encontrado una tasa elevada de internalización de los receptores de VIP en las células HT29 (BOISSARD et al., 1984), en leucocitos mononucleares humanos (WIJK, 1988) y en linfocitos murinos (OTTAWAY, 1992).

El tiempo empleado en la disociación del complejo receptor-trazador tras la sobrecarga de VIP frío, parece indicar una cinética de disociación que puede desglosarse en dos procesos de primer orden, o que sugiere la presencia de dos poblaciones de receptores, una de baja afinidad y rápida disociación, y otra de alta afinidad y lenta disociación. El mismo tipo de cinética de disociación ha sido

encontrada, e interpretada en este mismo sentido, por otros autores en sistemas VIP-receptor en los que también se describen dos poblaciones de receptores, como en enterocitos (PRIETO et al., 1979), músculo liso de útero (OTTESEN et al., 1982), próstata ventral de rata (PRIETO y CARMENA, 1983), monocitos circulantes humanos (WIJK et al., 1985) y en macrófagos peritoneales de rata (SEGURA et al., 1991, habiendo sido comprobada la ausencia de cooperatividad negativa entre los receptores (PRIETO et al., 1979; PRIETO y CARMENA, 1983).

La unión específica del  $^{125}\text{I}$ -VIP (45 pM) a los macrófagos peritoneales de ratón fue inhibida por concentraciones crecientes de VIP frío (0'01-100 nM), siendo la concentración inhibidora semimáxima ( $\text{IC}_{50}$ ) igual a  $1'6 \pm 0'3$  nM, valor similar al encontrado en otros sistemas VIP-receptor (Tabla XXVII).

La curva de concavidad superior observada en la representación gráfica del análisis de Scatchard (SCATCHARD, 1949) de los resultados del estudio estequiométrico puede interpretarse de varias formas (DE MEYTS, 1976):

- 1) En primer lugar, podría deberse a la existencia de errores técnicos en la separación del péptido unido y libre, hecho este que debe ser descartado, ya que el método utilizado para la separación de ambas formas de péptido está suficientemente acreditado, habiendo sido ampliamente empleado en la literatura (DE MEYTS, 1976; PRIETO et al., 1979; GUERRERO et al., 1981; WOOD et al., 1985; SHAFFER et al., 1987; CALVO et al., 1990; SEGURA et al., 1991; CALVO et al., 1994a).
- 2) Otra explicación de la curva de concavidad superior sería que la afinidad del VIP frío por el receptor sea diferente a la del  $^{125}\text{I}$ -VIP, lo que puede descartarse, ya que se ha comprobado que ambas formas del péptido se unen por igual a los receptores (PRIETO et al., 1979) y estimulan por igual la producción de AMPc (LABURTHE et al., 1978; MARIE et al., 1985).
- 3) Otra posible explicación, sería la existencia de cooperatividad negativa entre los sitios de unión. En este caso, los receptores no tendrían una afinidad fija, sino que la afinidad global de los receptores disminuiría conforme fueran uniéndose al VIP como consecuencia de interacciones receptor-receptor inducidas por el péptido, que desestabilizarían los complejos VIP-receptor previamente formados, incrementándose la tasa de disociación (DE MEYTS, 1976). El hecho de que en ningún sistema VIP-receptor se haya encontrado cooperatividad negativa en la interacción del VIP con sus receptores y que, por el contrario, se haya demostrado la ausencia de la misma en células de próstata ventral de rata (PRIETO y CARMENA, 1983) y en células HeLa de

carcinoma de cérvix humano (PRIETO et al., 1981), nos lleva a descartar esta posibilidad.

Así pues, la interpretación más probable del análisis de SCATCHARD sugiere la existencia de dos poblaciones distintas de receptores, siendo este un resultado similar al obtenido por otros autores en la mayoría de los sistemas VIP-receptor caracterizados (CHRISTOPHE et al., 1976; ROBBERECHT et al., 1978; ROBBERECHT et al., 1982b; PRIETO et al., 1979; AMIRANOFF et al., 1980; PRIETO y CARMENA, 1983; CARMENA y PRIETO, 1985; SAID, 1986; HUESO et al., 1989; WANKE et al., 1990; GUIJARRO et al., 1991; RODRIGUEZ-PENA et al., 1991; CALVO et al., 1990; SEGURA et al., 1991; CARMENA et al., 1992; MAO et al., 1993; CALVO et al., 1994a; CALVO et al., 1994b). Una de la poblaciones de receptores tendría alta afinidad ( $K_d = 1'05 \pm 0'2$  nM) y baja capacidad de unión ( $19'2 \pm 2'8$  fmol VIP/ $10^6$  células), representando el 2'6% de la capacidad de unión total, y otra de baja afinidad ( $K_d = 66'4 \pm 11'0$  nM) y alta capacidad de unión ( $706'6 \pm 172'0$  fmol/ $10^6$  células), resultados similares a los obtenidos por otros autores en diversas poblaciones celulares implicadas en la respuesta inmune (Tabla XXVIII).

Sin embargo, en contraste con nuestros resultados, otros autores han observado una sola población de receptores en células mononucleares sanguíneas humanas (OTTAWAY, 1983), linfocitos T de la línea Molt 4b (BEED et al., 1983), linfocitos humanos no adherentes (DANEK et al., 1983), linfocitos de ratón (OTTAWAY y GREENBERG, 1984), linfocitos T, B y células NK humanas (OTTAWAY et al., 1990), linfocitos intraepiteliales humanos (ROBERTS et al., 1991) y en células T de mucosas de ratón (BLUM et al., 1992). El que estos autores encuentren una sola población de receptores en células mononucleares sanguíneas y en linfocitos podría deberse a varios factores: a) distinta composición iónica del medio de incubación; b) diferencias en los tiempos y temperaturas a los que se realizan las incubaciones; c) utilización de trazadores con actividades específicas diferentes; d) distintas forma de calcular la  $K_d$  y la capacidad de unión, pues unos autores lo hacen a partir del experimento de saturación y otros a partir del estudio estequiométrico, empleando diferentes métodos para la interpretación del análisis de Scatchard: el programa LIGAND de MUNSON y RODBARD (1980), utilizado por LACEY et al., (1991), la ecuación de AKERA y CHENG (1977), utilizada por BEED et al. (1983) y por DANEK et al. (1983), o el programa SCTFIT de DE LEAN et al. (1982), utilizado por FINCH et al. (1989).

**TABLA XXVII**

**Concentración inhibitoria semimáxima (IC<sub>50</sub>) de VIP en diferentes sistemas VIP receptor.**

Célula/especie	IC <sub>50</sub> (nM)	Autores	Año
Enterocitos de rata	3'10	PRIETO et al.	1979
Carcinoma pulmonar humano	1'20	LABURTHE et al.	1981
Carcinoma de cérvix humano	60'00	PRIETO et al.	1981
Membranas de pulmón de rata	5'00	ROBBERECHT et al.	1981
Sinaptosomas de córtex de rata	3'00	STAUN-OLSEN et al.	1982
Células epitel. de próstata de rata	13'00	PRIETO y CARMENA	1983
Células acinares de parótida de rata	20'00	INOUE et al.	1985
Membranas de tiroides bovino	50'00	MOLINERO et al.	1985
Vesícula seminal de rata	1'00	GUIJARRO et al.	1991
Cél. Mononucleares sanguíneas hum.	0'30	GUERRERO et al.	1981
Linfocitos sanguíneos no adherentes	0'50	DANEK et al.	1983
Monocitos sanguíneos humanos	0'40	WIJK et al.	1985
Cél. Mononucleares sanguíneas de rata	1'00	CALVO et al.	1986b
Linfoblastos SUP-T1 humanos	15'00	ROBBERECHT et al.	1988
Macrófagos peritoneales de rata	1'90	SEGURA et al.	1991
Membranas de macrófagos de rata	1'00	SEGURA et al.	1991
Macrófagos alveolares de rata	0'53	SAKAKIBARA et al.	1994
Macrófagos peritoneales de ratón	1'60	Nuestros resultados	1994
Membranas de Glán.Harderiana de rata	1'30	CALVO et al.	1995

**TABLA XXVIII****Receptores para VIP en células inmunes.**

Célula/Especie	N	K <sub>d</sub> ↑	K <sub>d</sub> ↓	C.U. ↑	C.U. ↓	ns	Autor	Año
Cél. Mononucleares hum.	2	0'24	80	4800	48000	1'0	GUERRERO	1981
Cél. Mononucleares hum.	1	0'24	----	2000	----	0'1	OTTAWAY	1983
Cél. Mononucleares rata	2	0'05	142	1566	1183000	1'0	CALVO	1986b
Linfocitos humanos	1	0'47	----	1700	----	0'05	DANEK	1983
Linfocitos humanos	1	0'11	----	927	----	0'1	ROBERTS	1991
Linfocitos T humanos	1	5'20	----	12266	----	0'1	FINCH	1989
Linfocitos T4 humanos	1	0'25	----	2530	----	0'1	OTTAWAY	1990
Linfocitos T8 humanos	1	0'42	----	2288	----	0'1	OTTAWAY	1990
Linfocitos NK humanos	1	0'39	----	2409	----	0'1	OTTAWAY	1990
Linfocitos B humanos	1	0'47	----	603	----	0'1	OTTAWAY	1990
Linfocitos de ratón	1	0'22	----	2150	----	0'1	OTTAWAY	1984
Esplenocitos de rata	2	0'10	255	2770	1755000	1'0	CALVO	1986b
Esplenocitos de conejo	2	0'93	225	2000	280000	1'0	PEURIERE	1990
Timocitos de pollo	2	1'12	89	-----	-----	1'0	LACEY	1991
Bursa de pollo	2	0'46	71	-----	-----	1'0	LACEY	1991
Monocitos humanos	2	0'25	25	9635	108396	1'0	WIJK	1985
Macrófagos de rata	2	1'10	72	6700	252000	1'0	SEGURA	1991
Membrana Macrófagos	2	0'60	275	-----	-----	1'0	SEGURA	1991
Macrófagos alveolar rata	2	0'20	43	1190	51700	1'0	SAKAKIBARA	1994
Macrófagos de ratón	2	1'05	66	11562	426000	1'0	Nuestros result.	1994

K<sub>d</sub>: constante de disociación (nM). C.U.: capacidad de unión (sitios/célula). ↑: alta afinidad. ↓: baja afinidad. N: poblaciones de receptores. ns: concentración de VIP tomada para determinar la unión inespecífica (μM).

Además, es una característica común de los sistemas VIP-receptor en células implicadas en las respuesta inmune, el hallazgo de una sola población de receptores cuando en los estudios estequiométricos se toma para determinar la unión inespecífica una concentración de VIP frío demasiado baja ( $0.1 \mu\text{M}$ ), lo que equivale a disminuir el rango de concentraciones que se analizarán con el método de Scatchard, no dándose opción a que entre en juego el posible receptor de baja afinidad. Cuando esto es así, el análisis de Scatchard de los estudios estequiométricos sólo determina la existencia de una sola población de receptores (OTTAWAY, 1983; BEED et al., 1983; DANEK et al., 1983; OTTAWAY y GREENBERG, 1984; OTTAWAY et al., 1990; y ROBERTS et al., 1991). Sin embargo, cuando en los estudios estequiométricos se toma para determinar la unión inespecífica una concentración de VIP más alta ( $1 \mu\text{M}$ ), el análisis de Scatchard suele determinar la existencia de dos poblaciones de receptores (GUERRERO et al., 1981; WIJK et al., 1985; CALVO et al., 1986b; PEURIERE et al., 1990; SEGURA et al., 1991; LACEY et al., 1991).

Por otra parte, lo realmente importante a nivel funcional es la presencia de receptores de alta afinidad, ya que son los únicos que estarían acoplados a la adenilato ciclasa desencadenando la formación de AMPc (LABURTHE et al., 1979a; GUERRERO et al., 1981; CARMENA y PRIETO, 1983; CALVO et al., 1986a; SEGURA et al., 1992a) y activando la proteína-quinasa dependiente de AMPc (GUERRERO et al., 1984), mientras que los receptores de baja afinidad no producirían la activación de la adenilato ciclasa, de forma similar a lo que ocurre con los receptores  $\beta$ -adrenérgicos de baja afinidad (WILLIAMS y LEFKOWITZ, 1977).

Sin embargo, no podemos descartar que la población de receptores de baja afinidad represente un estado funcional distinto de una única clase de receptor. En este sentido, diversos trabajos (PAUL y SAID, 1987; LABURTHE y COUVINEAU, 1988) han sugerido que la existencia de dos clases de receptores puede ser debida a la modulación de la afinidad de un solo receptor por un componente GTP-regulador, y cada una de las poblaciones de receptores no sería más que un diferente estado de asociación entre un único receptor y una proteína G. El hecho de que el receptor para VIP en membranas de macrófagos sea sensible al GTP, hace que esta posibilidad deba ser tenida en cuenta.

Otra posibilidad sería la existencia de subpoblaciones de macrófagos con diferente grado de expresión del receptor para VIP, o bien con receptores de distinta

afinidad. En este sentido, es preciso recordar que los experimentos se han realizado con macrófagos inflamatorios o "respondedores", estimulados con caseinato sódico, en los que está aumentada la expresión de proteínas de membrana (GORDON et al., 1988).

Por lo que respecta al valor de la  $K_d$  del receptor de alta afinidad ( $1'05 \pm 0'2$  nM), indica que los macrófagos peritoneales de ratón, pueden reconocer concentraciones de VIP del orden nanomolar. De este modo, siendo los macrófagos células que se encuentran en diferentes regiones anatómicas donde se han descrito terminaciones nerviosas liberadoras de VIP (FELTEN et al., 1985; OTTAWAY et al., 1987b; NOHR y WEIHE, 1991) y donde el VIP puede alcanzar concentraciones de orden nanomolar, podrían ser células diana de la acción neuroparacrina del péptido.

La capacidad de unión del receptor de alta afinidad,  $19'2$  fmoles/ $10^6$  células, o lo que es igual, 11.562 sitios/célula, es superior a la encontrada por GUERRERO et al., (1981) y por OTTAWAY et al. (1983) en células mononucleares sanguíneas humanas, (4.800 y 2.000 sitios/célula respectivamente), a la encontrada por WIIK (1985) en monocitos humanos circulantes (9.635 sitios/célula), a la encontrada por CALVO et al. (1986b) en células mononucleares sanguíneas y en esplenocitos de rata (1.566 y 2.770 sitios/célula respectivamente), como también es superior a la encontrada por SEGURA et al. (1991) en macrófagos peritoneales de rata (6.700 sitios/célula). Esta diferencia en el número de receptores podría deberse a variaciones en la expresión del receptor de VIP a lo largo de la diferenciación del monocito-macrófago, como sucede con otras proteínas de membrana de las células del sistema mononuclear fagocítico (ROSENSTREICH, 1981; GORDON et al., 1985).

Los receptores descritos son específicos para VIP, aunque también reconocen a otros péptidos relacionados estructuralmente con él. Se ha estudiado la inhibición de la unión del  $^{125}$ I-VIP a macrófagos peritoneales de ratón producida por diferentes péptidos, encontrándose que la helodermina, GRFr, PHI y secretina inhibieron la unión del trazador a los macrófagos siguiendo el siguiente orden de potencia: VIP > helodermina > GRFr > PHI > secretina. Similares resultados se han obtenido en macrófagos peritoneales de rata (SEGURA et al., 1991) y en otros sistemas VIP-receptor (COUVINEAU et al., 1985b; CHASTRE et al., 1985; DICKINSON et al., 1986; ROUYER-FESSARD et al., 1989; O'DORISIO y CAMPOLITO, 1989a) (Tabla XXIX). Ni el glucagón, miembro de la familia del VIP, ni otros péptidos no relacionados estructuralmente con el VIP, como insulina, pancreastatina, somatostatina y octapéptido de colecistoquinina, inhibieron la unión del trazador a los macrófagos.

**TABLA XXIX**

**Orden de potencia de los péptidos de la familia del VIP en la inhibición de la unión del <sup>125</sup>I-VIP a sus receptores.**

Célula /especie	Orden de potencia	Autor	Año
HT29 humana	VIP > GRFh > PHI > secretina	COUVINEAU	1985b
Pulmón cobaya	VIP > GRFr > PHI > GRFh > secr.	DICKINSON	1986
Córtex rata	VIP > GRFh > PHI	O'DORISIO	1988
SUP-T1 humana	VIP = PHI > secretina > GRF	ROBBERECHT	1988
Intestino humano	VIP > GRFr > GRFh > PHI > secr.	ROUYER-FES.	1989
Linfob. Molt 4b	VIP > GRFh > PHI	O'DORISIO	1989a
Linf. B humano	VIP > GRFh > secretina > PHM	O'DORISIO	1989b
IGR39 humana	VIP > PHM > GRFh > secretina	LUIS	1989
Hipóf. Ant. rata	VIP > PHI > GRFr > GRFh > secr.	WANKE	1990
Carcinoma pulmonar	VIP > GRFr > PHI = helodermina	LEE	1990
Vesícula semin. rata	VIP > heloder. > secretina > GRFr	GUIJARRO	1991
Macrófagos rata	VIP > GRFr > GRFh > PHI > secr.	SEGURA	1991
Mem. Macrófagos	VIP > GRFr > GRFh = PHI > secr.	SEGURA	1991
Macrófagos alveo.	VIP > PHI > helodermina >> secr.	SAKAKIBARA	1994
Rata	VIP > heloder. > GRFr > PHI > secr.	CALVO	1995
Glánd. Harderiana rata	VIP > heloder. > GRFr > PHI > secr.	Nuestros resultados	1994
Macrófagos ratón			

Para determinar la masa molecular del receptor de VIP en membranas de macrófagos peritoneales de ratón, se realizó un cross-linking seguido de una electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) y de una autoradiografía, usando como referencia proteínas de masa molecular conocida. En la autoradiografía, la banda mayor se identificó con una masa molecular aparente de 55 KDa. Se observaron además tres bandas menores que se correspondían con una masa molecular aparente de 34, 23 y 18 KDa. Suponiendo que existe una molécula de VIP unida por proteína, la masa molecular relativa de cada proteína es de 52, 31, 21 y 18 KDa respectivamente. Existen varias hipótesis que pueden explicar la naturaleza de estos complejos  $^{125}\text{I}$ -VIP-proteína:

1) El complejo  $^{125}\text{I}$ -VIP-proteína de 55 KDa, podría ser el receptor de alta afinidad y baja capacidad de unión. Así, el valor de la masa molecular relativa es similar al encontrado en pulmón de rata (DICKINSON et al., 1986), en páncreas de ternero (LE MEUTH et al., 1991), en células epiteliales del plexo coroideo de cerdo (NILSSON et al., 1991), en aorta bovina (SHREEVE et al., 1992) y en macrófagos peritoneales de rata (CALVO et al., 1994a). Además, este valor de la masa molecular relativa también es muy similar a la masa molecular del receptor de VIP solubilizado de intestino de rata (CALVO et al., 1989) y al receptor de VIP purificado de hígado de cerdo (COUVINEAU et al., 1990).

2) El complejo  $^{125}\text{I}$ -VIP-proteína de 34 KDa, podría estar originado a partir del complejo  $^{125}\text{I}$ -VIP-proteína de 55 KDa por rotura proteolítica y desglicosilación de éste. Aunque en el aislamiento de las membranas se han empleado inhibidores de proteasas, existe la posibilidad de que algunas proteasas no se inhiban y sigan activas cuando se utiliza la preparación de membranas. Además, esta escisión podría estar inducida por la unión del ligando, con el consiguiente cambio conformacional del receptor que favorecería la acción de las proteasas (LUIS et al., 1988). Otra posibilidad, es que el complejo  $^{125}\text{I}$ -VIP-proteína de 34 KDa, podría corresponder con el receptor de baja afinidad y alta capacidad de unión. En este contexto, han sido observadas bandas entre 33-36 KDa en enterocitos humanos (COUVINEAU et al., 1985) y de rata (LABURTHE et al., 1984), en páncreas de ternero (LE MEUTH et al., 1991), en macrófagos peritoneales de rata (CALVO et al., 1994a) y en glándula Harderiana de rata (CALVO et al., 1995). Finalmente, las bandas de 23 y 18 KDa podrían representar complejos calmodulina- $^{125}\text{I}$ -VIP, como ha sido observado por STALLWOOD et al. (1992).

En definitiva, se ha demostrado la existencia de receptores específicos para el VIP en macrófagos peritoneales de ratón, lo que hace pensar que el VIP puede modular algunas de las funciones del macrófago y, a través de ella, la respuesta inmune. El VIP, como los demás neuropéptidos y hormonas, produce modificaciones funcionales en las células diana a través de la formación de un segundo mensajero intracelular, que en el caso del VIP, es el AMPc. Así pues, la hipótesis del papel del VIP como inmunomodulador a nivel del macrófago de ratón, sería mucho más firme si se demuestra que los receptores son funcionales. Por ello, se estudió el efecto del VIP sobre la producción de AMPc en macrófagos peritoneales de ratón.

## **2. EFECTO DEL VIP SOBRE LA PRODUCCIÓN DE AMPc EN MACRÓFAGOS PERITONEALES DE RATÓN.**

Los resultados obtenidos muestran, que el VIP estimula la producción de AMPc en los macrófagos peritoneales de ratón. La sensibilidad de la preparación celular a concentraciones de VIP tan bajas como 0'01 nM, y la naturaleza monofásica de la respuesta del AMPc, han sido descritos también en células epiteliales de intestino de rata (LABURTHE et al., 1979a), criptas epiteliales de colon humano (DUPONT et al., 1980), células mononucleares sanguíneas humanas (GUERRERO et al., 1981), próstata ventral de rata (CARMENA y PRIETO, 1983), vesícula seminal de rata (RODRÍGUEZ-PENA et al., 1991) y macrófagos peritoneales de rata (SEGURA et al., 1991). No obstante, en células acinares pancreáticas (ROBBERECHT et al., 1979) y en células epiteliales de vesícula biliar de cobaya (DUPONT et al., 1981), se ha descrito una respuesta bifásica en la producción de AMPc estimulada por el VIP.

La dosis efectiva semimáxima ( $ED_{50}$ ) de VIP en la estimulación de la producción de AMPc fue  $1'0 \pm 0'2$  nM, un valor acorde con la constante de disociación del receptor de VIP de alta afinidad anteriormente descrito ( $K_d = 1'05 \pm 0'2$  nM). Este valor de  $ED_{50}$  es similar a los encontrados en otros sistemas en los que el VIP estimula la producción de AMPc, tales como células derivadas de carcinoma de cérvix humano (PRIETO et al., 1981), próstata ventral de rata (CARMENA y PRIETO, 1983) y en una línea celular derivada de melanoma humano (MARTIN et al., 1989). También es similar a las descritas para el VIP en otras células implicadas en la respuesta inmune, si bien, las  $ED_{50}$  halladas en estos tipos celulares abarcan un rango muy amplio (Tabla XXX).

**TABLA XXX**

**Dosis efectiva semimáxima (ED<sub>50</sub>) para el VIP en la estimulación de la producción de AMPc en preparaciones de células implicadas en la respuesta inmune.**

<b>Célula/Especie</b>	<b>ED<sub>50</sub> (nM)</b>	<b>Autor</b>	<b>Año</b>
Células mononucleares humanas	0'10	GUERRERO et al.	1981
	0'24	OTTAWAY et al.	1983
	0'06	CALVO et al.	1986a
	0'36	WIIK	1988
Linfoblastos T Molt 4b	5'00	BEED et al.	1983
Monocitos humanos	10'00	WIIK	1989a
Linfoblastos SUP-T1	10'00	ROBBERECHT et al.	1989a
Linfocitos T8 NS8	30'00	ROBBERECHT et al.	1989b
Células T de ratón	1'62	BOUDARD et al.	1991
Macrófagos peritoneales de rata	1'20	SEGURA et al.	1991
Macrófagos alveolares de rata	0'23	SAKAKIBARA	1994
Macrófagos peritoneales de ratón	1'00	Nuestros resultados	1994

La correlación entre la unión del VIP a sus receptores específicos y la activación de la adenilato ciclasa en los macrófagos peritoneales de ratón, puede estudiarse comparando los experimentos de estimulación de la producción de AMPc con los experimentos de unión del  $^{125}\text{I}$ -VIP a los macrófagos. De esta comparación puede deducirse que el VIP forma con sus receptores en el macrófago complejos péptido-receptor que unas veces son activos, estando acoplados a la adenilato ciclasa, y otras no. Así, se evidencia como existe un paralelismo entre la cinética de asociación del  $^{125}\text{I}$ -VIP a los macrófagos y la cinética de producción de AMPc estimulada por el VIP (Figuras 16 y 20). También, se observa como los péptidos relacionados estructuralmente con el VIP (helodermina, GRFr, PHI y secretina), muestran la misma potencia relativa tanto en la inhibición de la unión del  $^{125}\text{I}$ -VIP a las células como en la estimulación de la producción de AMPc por éstas (Figuras 18 y 20). Estos hechos concuerdan con los hallados por SEGURA et al., 1991 en macrófagos peritoneales de rata. Este autor evidencia también al comparar ambas cinéticas, de que algunos de los complejos VIP-receptor no están acoplados a la adenilato ciclasa.

Estos resultados sugieren que la estimulación de la producción de AMPc estimulada por el VIP estaría mediada en el macrófago únicamente por receptores de alta afinidad, los únicos que formarían complejos activos acoplados a la adenilato ciclasa (LABURTHE et al., 1979a; GUERRERO et al., 1981; CARMENA y PRIETO, 1983; CLAVO et al., 1986; SEGURA et al., 1991), mientras que la interacción del VIP con los receptores de baja afinidad originaría complejos inactivos, sin activación de la adenilato ciclasa, de forma similar a lo que ocurre con los receptores  $\beta$ -adrenérgicos de baja afinidad (WILLIAMS y LEFKOWITZ, 1977). Esta hipótesis es apoyada por el hecho de que en macrófagos peritoneales de rata, el GTP disminuye de forma significativa la afinidad del VIP por los receptores de alta afinidad, sugiriendo que solamente esta población de receptores está acoplada al sistema de la adenilato ciclasa por medio de una proteína  $G_s$  (SEGURA et al., 1992b).

El sistema productor de AMPc en los macrófagos peritoneales de ratón es específico para el VIP, aunque otros péptidos estructuralmente relacionados con él, también estimularon la producción de AMPc, siendo el orden de potencia el siguiente: VIP > helodermina > GRFr > PHI >> secretina. En concordancia con los resultados de los experimentos de unión, la helodermina y el GRFr fueron más potentes que el PHI en la estimulación de la producción de AMPc. Por el contrario, en otros sistemas se ha encontrado que el PHI es más potente que el GRFr en la estimulación de la producción

de AMPc, como por ejemplo, en vesícula seminal de rata (RODRIGUEZ-PENA et al., 1991). Por último decir, que nuestros resultados concuerdan con los obtenidos en macrófagos peritoneales de rata (SEGURA et al., 1991).

El macrófago tiene un importante papel en muchas funciones inmunes, aunque los mecanismos moleculares involucrados son aún pocos conocidos. Muchos sistemas de respuesta hormonal están regulados a través de cambios en los niveles de AMPc intracelular. Está bien documentado que varias de las funciones del macrófago, incluyendo la secreción de enzima lisosomales (LOWRIE et al., 1985), la fagocitosis (VOGEL et al., 1981), la citotoxicidad celular (SCHULTZ et al., 1978), la quimiotaxis (GALLIN et al., 1978) y la capacidad de adherencia (SEGURA et al., 1993), son afectadas por agentes que aumentan los niveles de AMPc. También, se ha demostrado que el VIP inhibe el estallido respiratorio en monocitos circulantes, los precursores del macrófago tisular, a través de un mecanismo mediado por el AMPc (WIJK, 1989a; WIJK et al., 1989b), que altas concentraciones de VIP inhiben la migración de los monocitos (BONDESSON et al., 1991), y que el AMPc está implicado en la inhibición que produce el VIP en la capacidad de adherencia a substrato en el macrófago peritoneal de rata (SEGURA et al., 1993). Además, en células mononucleares sanguíneas humanas, con un 15% de monocitos, ha sido demostrada la activación por el VIP de una proteína quinasa AMPc-dependiente (GUERRERO et al., 1984), al igual que en los linfocitos Molt 4b (O'DORISISO et al., 1985a), en los que se ha comprobado que el VIP activa una proteína quinasa AMPc-dependiente que produce la fosforilación de una proteína específica. Por otra parte, los efectos producidos por el VIP sobre la funcionalidad de las células inmunes coinciden con los producidos por el AMPc (Tabla XXXI).

En este contexto, los resultados aquí expuestos refuerzan la hipótesis de que el VIP, a través de la modulación de los niveles intracelulares de AMPc, puede jugar un papel importante en la regulación de la funcionalidad del macrófago, apoyando los datos que defienden la función inmunorreguladora del VIP.

**TABLA XXXI**

**Efectos comparativos del VIP y del AMPc sobre la función de las células inmunes.**

Función inmune	VIP	AMPc
Proliferación linfocitaria inducida por Con-A	Inhibición	Inhibición
Proliferación linfocitaria inducida por PHA	Inhibición	Inhibición
Proliferación linfocitaria inducida por LPS	Sin efecto	Sin efecto
Síntesis de DNA	Inhibición	Inhibición
Producción de IgA por las células plasmáticas	Inhibición	Inhibición
Migración de los linfocitos	Inhibición	Inhibición
Migración de los monocitos	Inhibición	Inhibición
Citotoxicidad celular natural (actividad NK)	Inhibición	Inhibición
Producción de interleucina 2 (IL-2)	Inhibición	Inhibición
Producción de interferón gamma (IFN $\gamma$ )	Inhibición	Inhibición
Producción de radicales libres	inhibición	Inhibición

### 3. INTERACCIÓN DE LOS ANTAGONISTAS DEL VIP [4-Cl-D-Phe<sup>6</sup>,Leu<sup>17</sup>]VIP Y [Ac-Tyr<sup>1</sup>,D-Phe<sup>2</sup>]GRF<sub>1-29</sub>-NH<sub>2</sub> CON MACRÓFAGOS PERITONEALES DE RATÓN.

Es un hecho suficientemente conocido, como el residuo histidina N-terminal del VIP juega un importante papel en la interacción de este péptido con su receptor en diferentes tejidos (COUVINEAU et al., 1985; LABURTHE et al., 1986; NAU et al., 1987), y en la posterior activación de la adenilato ciclasa (ROBBERECHT et al., 1984; LABURTHE et al., 1986). De hecho, se ha observado como la potencia del VIP disminuye marcadamente cuando el residuo de histidina es modificado (ROBBERECHT et al., 1984; LABURTHE et al., 1986) o suprimido (COUVINEAU et al., 1985; NAU et al., 1987). También, ha sido demostrado que análogos del GRF en los que ha sido modificada la región N-terminal, pueden actuar como antagonistas del sistema receptor-efector del VIP. En este sentido, se ha descrito el efecto antagonista de un derivado del GRF ([Ac-Tyr<sup>1</sup>,D-Phe<sup>2</sup>]GRF<sub>1-29</sub>-NH<sub>2</sub>) y del péptido [4-Cl-D-Phe<sup>6</sup>-Leu<sup>17</sup>]VIP en el sistema receptor-efector del VIP en diferentes células y tejidos (WAELEBROECK et al., 1985; LABURTHE et al., 1986; COX y CUTHBERT, 1989; BLANK et al., 1990; RODRÍGUEZ-PENA et al., 1991; XU y WIESENFELD-HALLIN, 1991; PANDOL et al., 1986; RODRÍGUEZ-PENA et al., 1991; SIRIANI et al., 1992; OTTAWAY et al., 1992; ESPAT et al., 1995 y HILL et al., 1995).

Los resultados del presente trabajo muestran como los péptidos [Ac-Tyr<sup>1</sup>,D-Phe<sup>2</sup>]GRF<sub>1-29</sub>-NH<sub>2</sub> y [4-Cl-D-Phe<sup>6</sup>,Leu<sup>17</sup>]VIP se unen de forma específica y con baja afinidad a los receptores de VIP presentes en macrófagos peritoneales de ratón siguiendo el siguiente orden: VIP (IC<sub>50</sub> = 1'6 ± 0'3 nM) > [4-Cl-D-Phe<sup>6</sup>-Leu<sup>17</sup>]VIP (IC<sub>50</sub> = 110'8 ± 10'7 nM) > [Ac-Tyr<sup>1</sup>,D-Phe<sup>2</sup>]GRF<sub>1-29</sub>-NH<sub>2</sub> (IC<sub>50</sub> = 251'0 ± 19'2 nM), comportándose ambos péptidos como antagonistas de tipo competitivo y específicos del receptor de VIP en macrófagos peritoneales de ratón (Fig. 19), sin estimular ninguno de los dos la producción de AMPc (Fig. 21). Resultados similares han sido obtenidos en macrófagos peritoneales de rata, aunque en éstos, se aprecia una discreta disminución de la capacidad de unión a los receptores de VIP con ambos péptidos (POZO et al., 1996).

Respecto al antagonista derivado del GRF, [Ac-Tyr<sup>1</sup>,D-Phe<sup>2</sup>]GRF<sub>1-29</sub>-NH<sub>2</sub>, es preciso mencionar, que si bien es posible que pudiera inhibir la producción de AMPc a través de receptores GRF, hasta la fecha dichos receptores no han sido demostrados en

macrófagos peritoneales de ratón. Sin embargo, los monocitos humanos expresan ARNm para el receptor de GH, presentando sitios de unión para la GH marcada (WARWICK-DAVIES et al., 1995). Por consiguiente, serán necesarias posteriores investigaciones para determinar la existencia de receptores específicos del GRF en macrófagos.

Nuestros resultados indican que la acción de los antagonistas [4-Cl-D-Phe<sup>6</sup>,Leu<sup>17</sup>]VIP y [Ac-Tyr<sup>1</sup>,D-Phe<sup>2</sup>]GRF<sub>1-29</sub>-NH<sub>2</sub>, está específicamente mediada a través de los receptores de VIP presentes en el macrófago peritoneal de ratón. Este comportamiento como antagonistas del receptor se confirmó por:

- 1) El desplazamiento hacia la derecha de las curvas dosis-respuestas de acumulación de AMPc estimuladas por VIP en presencia del [4-Cl-D-Phe<sup>6</sup>,Leu<sup>17</sup>]VIP o del [Ac-Tyr<sup>1</sup>,D-Phe<sup>2</sup>]GRF<sub>1-29</sub>-NH<sub>2</sub> (Fig. 22), como también ha sido descrito en intestino (LABURTHE et al., 1986), páncreas (PANDOL et al., 1986), riñón (GRIFFITHS et al., 1989), vesícula seminal (RODRÍGUEZ-PENA et al., 1991) y macrófagos peritoneales de rata (POZO et al., 1996).
- 2) La correlación en la eficacia de ambos péptidos entre los experimentos de competición con <sup>125</sup>I-VIP (Fig. 19) y la correspondiente inhibición de la producción de AMPc (Figura 23).
- 3) La ineficacia por parte tanto del [4-CL-D-Phe<sup>6</sup>,Leu<sup>17</sup>]VIP como del [Ac-Tyr<sup>1</sup>,D-Phe<sup>2</sup>] GRF<sub>1-29</sub>-NH<sub>2</sub> sobre la estimulación de AMPc inducida por el isoproterenol (Tabla XXVI), lo que viene a demostrar la especificidad de la interacción estudiada.

También ha sido demostrado en nuestro estudio el efecto sinérgico del VIP y el isoproterenol en la estimulación de la producción de AMPc en macrófagos peritoneales de ratón. Así, se ha evidenciado que tanto el [4-Cl-D-Phe<sup>6</sup>,Leu<sup>17</sup>]VIP como el [Ac-Tyr<sup>1</sup>,D-Phe<sup>2</sup>]GRF<sub>1-29</sub>-NH<sub>2</sub> bloquean el efecto sinérgico del VIP sobre la estimulación de AMPc inducida por isoproterenol, lo que sugiere un efecto mediado por receptores de VIP. Además, el propanolol, un antagonista β-adrenérgico, no modificó el comportamiento antagonista del [4-Cl-D-Phe<sup>6</sup>,Leu<sup>17</sup>]VIP o del [Ac-Tyr<sup>1</sup>,D-Phe<sup>2</sup>]GRF<sub>1-29</sub>-NH<sub>2</sub>, ni la producción de AMPc estimulada por VIP. Estos datos concuerdan con los resultados obtenidos por otros autores en macrófagos peritoneales de rata (POZO et al., 1996).

Para la caracterización molecular del efecto antagonista de los péptidos [4-Cl-D-Phe<sup>6</sup>,Leu<sup>17</sup>]VIP y [Ac-Tyr<sup>1</sup>,D-Phe<sup>2</sup>]GRF<sub>1-29</sub>-NH<sub>2</sub>, se realizaron experimentos de cross-

linking seguido de una electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) y de una autoradiografía en presencia de ambos péptidos. En la autoradiografía, se identificó una banda mayor con una masa molecular aparente de 55 KDa. Suponiendo que existe una molécula de VIP (3'3 KDa) unida por proteína, la masa molecular relativa de este complejo  $^{125}\text{I}$ -VIP-proteína está en un rango de 50-52 KDa. Así, se evidencia que la formación de complejos entre el  $^{125}\text{I}$ -VIP y sus receptores se ve disminuida en presencia del [4-Cl-D-Phe<sup>6</sup>,Leu<sup>17</sup>]VIP o del [Ac-Tyr<sup>1</sup>,D-Phe<sup>2</sup>]GRF<sub>1-29</sub>-NH<sub>2</sub> en macrófagos peritoneales de ratón. Estos resultados están en concordancia con los datos obtenidos en los experimentos de competición de ambos antagonistas con el VIP, donde los valores de la IC<sub>50</sub> estaban dentro de un rango de 100-300 nM.

En conclusión, los estudios realizados con los péptidos [4-C-D-Phe<sup>6</sup>,Leu<sup>17</sup>]VIP y [Ac-Tyr<sup>1</sup>,D-Phe<sup>2</sup>]GRF<sub>1-29</sub>-NH<sub>2</sub>, muestran que ambos se comportan como antagonistas de tipo competitivo y específicos para el sistema receptor-efector del VIP en macrófagos peritoneales de ratón. Por consiguiente, pueden ser utilizados como herramienta para la mejor comprensión de la función inmunomoduladora del VIP en macrófagos.

Así pues, desde que han sido descritos potentes efectos inmunomoduladores del VIP (DE LA FUENTE et al., 1996; CALVO et al., 1996), el uso de antagonistas específicos puede ser un buen instrumento para dilucidar las propiedades selectivas y específicas del VIP en la función inmune. Por otra parte, la posible aplicación de estas investigaciones en el área de la inmunología clínica (DAVID R. BOLIN et al., 1995) es un hecho interesante e importante desde el punto de vista tanto científico como clínico.

**CONCLUSIONES.**

1ª) Los macrófagos peritoneales de ratón poseen receptores específicos para el péptido intestinal vasoactivo (VIP). La unión del VIP a los macrófagos peritoneales de ratón es un proceso dependiente del tiempo, de la temperatura y de la concentración celular. Además, es reversible, saturable y específico, siendo la  $IC_{50} = 1'60 \pm 0'3$  nM. Mediante análisis de Scatchard, se evidencian dos poblaciones de receptores para el VIP: una de alta afinidad y baja capacidad de unión ( $K_d = 1'05 \pm 0'2$  nM y  $19'2 \pm 2'8$  fmol VIP/ $10^6$  células) y otra de baja afinidad y alta capacidad de unión ( $K_d = 66'4 \pm 11'0$  nM y  $706'6 \pm 172'0$  fmol VIP/ $10^6$  células).

2ª) El estudio molecular de los receptores de VIP en macrófagos peritoneales de ratón se realizó mediante la técnica de cross-linking seguida de electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) y de autorradiografía. Esta técnica reveló bandas específicas de 55, 34, 23 y 18 KDa. Suponiendo que existe una molécula de VIP unida por proteína, la masa molecular relativa de estas proteínas que unen específicamente VIP es de 52, 31, 21 y 18 KDa respectivamente.

3ª) Los receptores para el VIP en macrófagos peritoneales de ratón son específicos para el VIP, aunque también reconocen a varios péptidos relacionados estructuralmente con él, observándose el siguiente orden de potencia: VIP ( $IC_{50} = 1'60 \pm 0'3$  nM) > helodermina ( $IC_{50} = 2'60 \pm 0'6$  nM) > GRFr ( $IC_{50} = 5'30 \pm 1'9$  nM) > PHI ( $IC_{50} = 160'00 \pm 21'0$  nM) >> secretina ( $IC_{50} = 1000'00 \pm 237$  nM). Ni el glucagón, miembro de la familia del VIP, ni otros péptidos sin relación estructural con el VIP, como la somatostatina, insulina, pancreastatina y el octapéptido de colecistoquinina, inhibieron la unión del trazador a los macrófagos peritoneales de ratón.

4ª) El VIP estimula la producción de AMPc en macrófagos peritoneales de ratón, de una forma específica, dosis-dependiente y monofásica, siendo la  $ED_{50} = 1'00 \pm 0'2$  nM).

5ª) El [4-Cl-D-Phe<sup>6</sup>,Leu<sup>17</sup>]VIP y el [Ac-Tyr<sup>1</sup>,D-Phe<sup>2</sup>]GRF<sub>1-29</sub>-NH<sub>2</sub>, actúan como antagonistas de tipo competitivo y específicos sobre el sistema receptor-efector del VIP en macrófagos peritoneales de ratón. Este comportamiento antagonista fue observado al:

a) desplazar ambas moléculas hacia la derecha las curvas de estimulación por VIP de la producción de AMPc, siendo este fenómeno un proceso dosis-dependiente; b) ser coherente el orden de eficacia de ambos péptidos en los experimentos de competición con los correspondientes de inhibición en la producción de AMPc; c) carecer ambos péptidos de efecto antagonista sobre la producción de AMPc estimulada por el agonista  $\beta$ -adrenérgico isoproterenol; d) presentar ambos péptidos un antagonismo sobre el efecto sinérgico del VIP en la producción de AMPc estimulada por el isoproterenol; e) permanecer las propiedades antagonistas de ambos péptidos en presencia del antagonista  $\beta$ -adrenérgico propanolol y f) disminuir ambos péptidos la formación de complejos  $^{125}\text{I}$ -VIP-receptor en experimentos de cross-linking.

**BIBLIOGRAFIA.**

**Abelló, J., Robberecht, P., Damien, C., Tastenoy, M., Hooghe, R. and Christophe, J. (1989).** Identification and properties of  $\beta$ -adrenergic receptors and VIP receptors in murine radiation leukemia virus-induced lymphomas.

Second Forum on Peptides. Eds. A. Aubry. Colloque INSERM. 174, 147-150.

CC

**Abrass, C. K., O'Connor, S. W., Scarpace, P. J. and Abras, I. B., (1985).** Characterization of the  $\beta$ -adrenergic receptor of the rat peritoneal macrophage.

J. Immunol., 135, 1338-1341.

**Adams, D.O. and Hamilton, T. A. (1984).** The cell biology of macrophage activation.

Ann. Rev. Immunol., 2, 283-318.

**Adelman, D.C., Goetzi, E. J. and Hassner, A. (1991).** Unique suppression of human blood mononuclear leukocyte production of IgG prolonged exposure to vasoactive intestinal peptide.

J. Allergy Clin. Immunol. 87, A260.

**Aggestrup, S., Uddman, R., Sundler, F., Fahrenkrug, J., Hakanson, R., Sorensen, H. R. and Hambraeus, G. (1983).** Lack of vasoactive intestinal polypeptide nerves in esophageal achalasia.

Gastroenterology. 84, 924-927.

**Ahmed, C.E., Dees, W.L. and Ojeda, S.R. (1986).** The immature rat ovary is innervated by vasoactive intestinal peptide (VIP)-containing fibers and responds to VIP with steroid secretion.

Endocrinology, 118, 1682-1689.

**Ahren, B., Alumets, J., Ericson, M., Fahrenkrug, J., Fahrenkrug, L., Hakanson, R., Hedner, P., Loren, I., Melander, A., Rerup, C. and Sundler, F. (1980).** VIP occurs in intrathyroidal nerves and stimulates thyroid hormone secretion.

Nature 287: 343.

**Ainsworth, M.A., Fenger, C., Svendsen, P. and Schaffalitzky De Muckadell, O.B. (1993).** Effect of stimulation of mucosal  $\text{HCO}_3^-$  secretion on acid-induced injury to porcine duodenal mucosa.

Scand. J. Gastroenterol. 28, 1091-1097.

**Akera, T. and Cheng, V.K. (1977).** A simple method for the determination of the affinity and binding site concentration in receptor binding studies.

Biochem. Biophys. Acta, 470, 412-423.

**Ali, S., Pellegrini, I. and Kelly, P.A. (1991).** A prolactin-dependent immune cell line (Nb2) expresses a mutant form of prolactin receptor.

J. Biol. Chem. 266, 20110-20117.

**Aliakbari, B., Sreedharan, S.P., Turck, C.W., Goetzi, E.J. (1987).** Selective localization of vasoactive intestinal peptide and substance P in human eosinophils.

Biochem. Biophys. Res. Commun 148, 1440-1445.

**Alm, P., Alumets, J., Hakanson, R. and Sundler, F. (1977).** Peptidergic (VIP) nerves in the genito-urinary tract.

Neuroscience, 2, 751-754.

**Alm, P., Alumets, J., Hakanson, R., Owman, CH., Sjöberg, N.O., Sundler, F. and Walles, B. (1980).** Origin and distribution of VIP nerves in the genito-urinary tract.

Cell Tissue Res. 205, 337-341.

**Alumets, J., Fahrenkrug, J., Hakanson, R., Schaffalitzky, de Muchakadell, O., Sundler, F. and Uddman, R. (1979).** A rich nerve supply is characteristic of sphincters. *Nature (Lond.)* 280, 155-156.

**Allison, A.C. and Davies, P. (1975).** Increased biochemical and biological activities of mononuclear phagocytes exposed to various stimuli, with special reference to secretion of lysosomal enzymes.  
In: VAN FURTH R. ed. *Mononuclear phagocytes*. Oxford: Blackwell Sci. Publ. Pp. 487-506.

**Amenta, F., Cavallotti, C., Collier, W. L., Ferrante, F., Geppetti, P. and Ricci, A. (1989).** Autoradiographic localization of vasoactive intestinal polypeptide receptors in the rat mesenteric vascular tree.  
*Regul. Pept.* 26, 9-17.

**Amenta, F., Cavallotti, C., De Michele, M., De Vincentis, G., Rossodivita, A. and Rossodivita, I. (1991).** Vasoactive intestinal polypeptide receptors in rat cerebral vessels: an autoradiographic study.  
*J. Autom. Pharmacol.* 11, 285-293.

**Amiranoff, B., Laburthe, M., and Rossellin, G. (1980).** Characterization of specific binding sites for vasoactive intestinal peptide in rat intestinal epithelial cell membranes.  
*Biochim. Biophys. Acta*, 627, 215-224.

**Anand, P., Gibson, S.J., McGregor, G.P., Blank, M.A., Ghatei, M.A., Bacarese-Hamilton, A.J., Polak, J.M. and Bloom, S.R., (1983).** A VIP-containing system concentrated in the lumbosacral region of human spinal cord.  
*Nature*, 305, 143-145.

**Annibale, B., Fais, S., Boirivant, M., Delle Fave, G. and Pallone, F. (1990).** Effects of high in vivo levels of vasoactive intestinal polypeptide on function of circulating lymphocytes in humans.  
*Gastroenterology* 98, 1693-1698.

**Argetsinger, L.S., Campbell, G.S. and Yang, X. (1993).** Identification of JAK2 as a growth hormone receptor-associated tyrosine kinase.  
*Cell*. 74, 237-244.

**Arnout, M.A., Garthwaite, T.L. Martinson, D.R. and Hagen, T.C. (1986).** Vasoactive intestinal polypeptide is synthesized in anterior pituitary tissue.  
*Endocrinology*. 119, 2052-2056.

**Baek, S.Y., Yamano, M., Shiotani, Y. and Tohyama, M. (1988).** Distribution and origin of vasoactive intestinal polypeptide-like immunoreactive fibers in the central amygdaloid nucleus of the rat: an immunocytochemical analysis.  
*Peptides*, 9, 661-668.

**Baldino, F., Fitzpatrick-McElligon, S., Gozes, I. and Card, J.P. (1989).** Localization of VIP and PHI-27 messenger RNA in rat thalamic and cortical neurons.  
*J. Molec. Neurosci.*

**Barajas, L., Sokolski, N. K. and Lechago, J. (1983).** Vasoactive intestinal peptide-immunoreactive nerves in the kidney.  
*Neurosci. Lett.*, 43, 263-269.

**Baraniuk, J.N., Marek, L., Kowalski, M.L. and Kaliner, M.A. (1989).** Neuropeptides in skin.

In: Boss JD, eds. Skin immune system, 1st ed. Boca Ratón, FL: CRC Press, p. 307-326.

**Barbezat, G.O. and Grossman, M.L. (1971).** Intestinal secretion: stimulation by peptides. *Science*, 174, 422-424.

**Bardrum, B., Ottesen, B., Fahrenkrug, J. and Fuchs, A.R. (1988).** Release of oxytocin and vasopressin by intracerebroventricular vasoactive intestinal peptide.

*Endocrinology* 123, 2249-2254.

**Bar-Shavit, Z. and Goldman, R. (1986).** Substance P and neurotensin.

*Meth. Enzym.*, 132, 326-334.

**Bataille, D., Freychet, P. and 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.

**Bathena, S.J., Louie, J., Schechter, G.P., Redman, R.S., Whol, L. and Recant, L. (1981).** Identification of human mononuclear leukocytes bearing receptors for somatostatin and glucagon.

*Diabetes*, 30, 127-131.

**Beed, E.A., O'Doriso, M.S., O'Doriso, T.M. and Gaginella, T.S. (1983).** Demonstration of a functional receptor for vasoactive intestinal polypeptide on Molt 4b T-lymphoblast.

*Regul. Pept.*, 6, 1-12.

**Bell, G.I., Sanchez-Pescador, R., Laybourn, P.J. and Najarian, R.C. (1983).** Exon duplication and divergence in the human pre-pro-glucagon gene.

*Nature*. 304, 368-371.

**Bell, G.I. (1986).** The glucagon superfamily: precursor structure and gene organization.

*Peptide* 7, 27-37.

**Bepler, G., Rotsch, M., Jaques, G., Haeder, M., Heymanns, J., Hartog, G., Kiefer, P. and Havermann, K.J. (1988).** Peptides and growth factors in small cell lung cancer: production, binding sites, and growth effects.

*Cancer Res. Clin. Oncol.* 114, 235-244.

**Berzi, M. and Nagy, E. (1987).** The effect of prolactin and growth hormone on hemolymphopoietic tissue and immune function.

In: *Hormones and Immunity*. Berdzi, I. and Kovacs, K. (eds.). MTP Press Limited, Norwell, pp.145.

**Besedovsky, H.O., Sorkin, E., Keller, M. and Muller, J. (1975).** Changes in blood hormone levels during the immune response.

*Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 150, 466-470.

**Besedovsky, H.O., Del Rey, A. and Sorkin, E. (1981).** Lymphokine containing supernatants from Con A-stimulated cells increase corticosterone blood levels.

*J. Immunol.* 126, 385-387.

- Besedovsky, H.O., Del Rey, A., Sorkin, E., Da Prada, M., Burri, R. and Honogger, C.G. (1983).** The immune response evokes changes in brain noradrenergic neurons. *Science* 221, 564-566.
- Besedovsky, H.O., Del Rey, A., Sorkin, E. and Dinarello, C.A. (1986).** Immunoregulatory feedback between interleukin-1 and glucocorticoid hormones. *Science* 233, 652-654.
- Besson, J., Rotsztein, W., Laburthe, M., Epelbaum, J. and Rosellin, G. (1979).** Vasoactive intestinal peptide (VIP): brain distribution, subcellular localization and effect of deafferentation of the hypothalamus in wale rats. *Brain Res.* 165, 79-85.
- Besson, J. (1988).** Distribution and pharmacology of vasoactive intestinal peptide receptors in the rat brain and pituitary. *Ann. NY Acad. Sci.* 527, 51-67.
- Beutler, B., Cerami, A. (1989).** The biology of cachectin/TNF a primary mediator of host response. *Annu. Rev. Immunol.*, 7, 625.
- Bissonnette, M., Collen, M.J., Adachi, H., Jensen, R.T. and Gardner, J.D. (1984).** Receptors for vasoactive intestinal peptide and secretin on rat pancreatic acini. *Am. J. Physiol.* 246, G710-G717.
- Bjoro, T., Ostberg, B.C., Sand, O., Gordeladze, J., Iversen, J.G., Torjensen, P.A., Gautvik, K.M. and Haug, E. (1987).** Vasoactive intestinal peptide and peptide with N-terminal histidine and C-terminal isoleucine increase prolactin secretion in cultured rat pituitary cells (GH4C1) via a cAMP-dependent mechanism which involves transient elevation of Ca<sup>2+</sup>. *Mol. Cell. Endocrinol.* 49, 119-128.
- Blalock, J.E. (1989).** A molecular basis for bidirectional communication between the immune and neuroendocrine systems. *Physiol. Rev.* 69, 1-32.
- Blalock, J.E. and Costa, O. (1990).** Immune neuroendocrine interactions: implications for reproductive physiology. *Ann. NY Acad. Sci.* 564, 261-266.
- Blalock, J.E. (1992).** Production of peptide hormones and neurotransmitters by the immune system. In: *Neuroimmunoendocrinology, Chemical Immunology*, edited by Blalock, J.E. Basel:karger, Basel. P. 1-19.
- Blalock, J.E. (1994a).** The immune system: our sixth sense. *Immunologist* 2, 8-15.
- Blalock, J.E. (1994b).** The syntax of immune-neuroendocrine communication. *Immunol. Today* 15, 504-511.
- Blank, M.A., Kimura, K., Fuortes, M. and Jaffe, B.M. (1990).** VIP antagonist [Ac-Tyr<sup>1</sup>,D-Phe<sup>2</sup>]GRF<sub>1-29</sub>-NH<sub>2</sub>: an inhibitor of vasodilation in the feline colon. *Am. J. Physiol.* 259, G252.

- Blecher, M. and Goldstein, S. (1977).** Hormone receptors: VI. On the nature of binding of glucagon and insulin to human circulating mononuclear leukocytes. *Molec. Cell. Endocr.*, 8, 301-315.
- Bloom, S.R., Polak, J.M. and Pearse, A.G.E. (1973).** Vasoactive intestinal peptide and water-diarrhoea syndrome. *Lancet* 2, 14-16.
- Bloom, S.R., Christofides, N.D., Delamarter, J., Buell, G., Kawashima, E. and Polak, J.M. (1983).** Diarrhoeain VIPoma patients associated with cosecretion of a second active peptide (peptide histidine isoleucine) explained by single coding gene. *Lancet*, ii, 1163-1165.
- Blum, A.M., Mathew, R., Cook, G.A., Metwali, A., Felman, R. and Weinstock, J.V. (1992).** Murine mucosal T cells have VIP receptors functionally distinct from those on epithelial cells. *J. Neuroimmunol.*, 39, 101-108.
- Bodanszky, M., Klausner, Y.S., Lin, C.Y., Mutt, V. and Said, S.I. (1974).** Synthesis of the vasoactive intestinal peptide (VIP). *J. Amer. Chem. Soc.*, 96, 4973-4978.
- Boirivant, M., Fais, S., Annibale, B., Agostini, D., Delle Fave, G. and Pallone, F. (1994).** Vasoactive intestinal polypeptide modulates the in vitro immunoglobulin A production by intestinal lamina propria lymphocytes. *Gastroenterology* 106, 576-582.
- Boissard, C., Hejblum, G., Marie, J.C., Gespach, C. and Rosellin, G. (1984).** Desensibilisation au VIP par rétro-régulation des récepteurs de ce peptide dans les cellules transformées HT-29 de l'épithélium colique humain en culture. *C.R. Acad. Sciences, Paris*, 229, 795-798.
- Boissard, C., Marie, J.C., Hejblum, G., Gespach, C. and Rosellin, G. (1986).** Vasoactive intestinal peptide receptor regulation and reversible desensitization in human colonic carcinoma cells in culture. *Cancer Res.* 46, 4406-4413.
- Bokoch, G.M., Katada, T., Horthup, J.K., Ui, M. and Gilman, A.G. (1984).** Purification and properties of the inhibitory guanine nucleotide-binding regulatory component of adenylate cyclase. *J. Biol. Chem.*, 259, 3560-3567.
- Bondesson, L., Norolind, K., Liden, S., Gafvellin, G., Theodorsson, E. and Mutt, V. (1991).** Dual effect of vasoactive intestinal peptide (VIP) on leucocyte migration. *Acta Physiol. Scand.* 141, 477-481.
- Boudard, F. and Bastide, M. (1991).** Inhibition of mouse T-cell proliferation by CGRP and VIP: effects of these neuropeptides on IL-2 production and cAMP synthesis. *J. Neurosci.* 29, 29-41.
- Bourne, H.R., Sanders, D.A. and McCormick, F. (1990).** The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Nature*, 348, 125-132.

- Bozou, J.C., Couvineau, A., Rouyer-Fessard, C., Laburthe, M. and Kitabgi, P. (1987).** Phorbol ester induces loss of VIP stimulation adenylate cyclase and VIP-binding sites in HT-29 cells.  
FEBS Lett. 211, 151-154.
- Bradford, M.M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.  
Annal Biochem. 72, 248-254.
- Brenneman, D.E. and Eiden, L.E. (1986).** Vasoactive intestinal peptide and electrical influence neural survival.  
Pro. Natl. Acad. Sci. USA 83, 1159-1162.
- Brenneman, D.E. and Foster, G.A. (1987).** Structural specificity of peptides influencing neuronal survival during development.  
Peptides, 8, 687-694.
- Brenneman, D.E., Schultzberg, M., Bartfai, T. and Gozes, I. (1992).** Cytokine regulation of neuronal survival.  
J. Neurochem. 58, 639-642.
- Bromberg, Y. and Pick, E. (1985).** Activation of NADPH-dependent superoxide production in a cell-free system by sodium dodecyl sulphate.  
J. Biol. Chem. 260, 13539-13545.
- Bulloch, K. (1985).** Neuroanatomy of lymphoid tissue: a review. In:  
Neural Modulation of Immunity, edited by Gillemín, R. New York: Raven Press. p. 111.
- Bustos, R. and Sobrino, F. (1989).** Control of fructose 2,6-bisphosphate levels in rat macrophages by glucose and phorbol ester.  
FEBS Lett 17; 251(1-2): 143-6.
- Buttke, T.M. and Sandstrom, P.A. (1994).** Oxidative stress as a mediator of apoptosis.  
Immunol Today, 15, 7-10.
- Calvo, J.R., Guerrero, J.M., Molinero, P., Blasco, R. and Goberna, R. (1986a).** Interaction of VIP with human peripheral blood lymphocytes: specific binding and cyclic AMP production.  
Gen. Pharmac. 17, 185-189.
- Calvo, J.R., Molinero, P., Jiménez, J., Goberna, R. and Guerrero, J.M. (1986b).** Interaction of vasoactive intestinal peptide with rat lymphoid cells.  
Peptides, 7, 177-181.
- Calvo, J.R., Couvineau, A., Guijarro, L. and Laburthe, M. (1989).** Solubilization and hydrodynamic characterization of guanine nucleotide sensitive vasoactive intestinal peptide-receptor complexes from rat intestine.  
Biochemistry. 28, 1667-1673.
- Calvo, J.R., Morales, M.F., Mesa, J.C. and Goberna, R. (1990).** Nucleotide regulation of vasoactive intestinal peptide binding to bovine thyroid plasma membranes.  
Biosc. Rep. 10, 519-525.
- Calvo, J.R. and Guerrero, J.M. (1993).** Interaction between the immune and neuroendocrine systems: The role of vasoactive intestinal peptide and other neuroendocrine signals.  
Trends in Comparat. Biochem. Physiol., 1, 985-998.

- Calvo, J.R., Guerrero, J.M., López González, A., Osuna, C. and Segura J.J. (1994a).** Characteristics of receptors for VIP in rat peritoneal macrophages. *Peptides* 15, 309-315.
- Calvo, J.R., Montilla, M.L., Guerrero, J.M. and Segura, J.J. (1994b).** Expression of VIP receptors in mouse peritoneal macrophages: Functional and molecular characterization. *J. Neuroimmunol.* 50, 85-93.
- Calvo, J.R., Caraballo, M.I., Pozo, D., Segura, J.J., Osuna, C. and Guerrero, J.M. (1995).** VIP receptor-effector system in rat Harderian gland and its coupling to activation of type II tyrosine 5'-deiodinase. *Peptides*, 16, 551-557.
- Calvo, J.R., Pozo, D. and Guerrero, J.M. (1996).** Functional and molecular characterization of VIP receptors and signal transduction in human and rodent immune system. *Adv. Neuroimmunol.* 6, 39-47.
- Calzolari, A. (1898).** Recherches experimentales sur un rapport probable entre la fonction du thymus et celle des testicules. *Arch. Ital. Biol.* 30, 71-76.
- Card, J.P., Fitzpatrick-McElligott, S., Gozes, I. and Baldino F. (1988).** Localization of vasopressin-, vasoactive intestinal polypeptide-, peptide histidine isoleucine- and somatostatin-mRNA in rat suprachiasmatic nucleus. *Cell Tissue Res.* 252, 307-315.
- Carlsson, B., Törnell, J. and Hillensjö, T. (1987).** Vasoactive intestinal peptide stimulates meiosis of follicle enclosed rat oocytes in vitro. *Acta Physiol. Scand.* 129, 437-439.
- Carmena, M.J. and Prieto, J.C. (1983).** Cyclic-AMP stimulating effect of vasoactive intestinal peptide in isolated epithelial cells of the rat ventral prostate. *Biochem. Biophys. Acta.* 263, 414-418.
- Carmena, M.J. and Prieto, J.C. (1985).** Cyclic-AMP response to vasoactive intestinal peptide and  $\beta$ -adrenergic or cholinergic agonists in isolated epithelial cells of rat ventral prostate. *Biosc. Rep.*, 5, 791-797.
- Carmena, M.J., Clemente, C., Guijarro, L.G. and Prieto, J.C. (1992).** The effect of streptozotocin diabetes on the vasoactive intestinal peptide receptor-effector system in membranes from rat ventral prostate. *Endocrinology*, 131, 1993-1998.
- Carr, D.J.J. (1991).** The role endogenous opioids and their receptors in the immune system. *Soc. Exp. Biol. Med.* 198, 710-720.
- Caughey, G.H., Leidig, F., Viro, N.F. and Nadel, J.A. (1988).** Substance P and vasoactive intestinal peptide degradation by mast cell tryptase and chymase. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 244, 133-137.
- Clark, W.G., Lipton, J.M. and Said, S.I. (1978).** Hyperthermic responses to vasoactive intestinal polypeptide (VIP) injected into the third cerebral ventricle of cats. *Neuropharmacology*, 17, 883-885.

- Clarke, B.L. and Bost, K.L. (1989).** Differential expression of functional adrenocorticotrophic hormone receptors by subpopulations of lymphocytes.  
*J. Immunol.* 143, 464-469.
- Clerici, N., Reboiras, S., Fierro, C. and Leyva-Cobian, F. (1984).** Expression of Ia-like (HLA-DR) antigens on human alveolar macrophages.  
*Clin. Exp. Immunol.*, 58, 388-394.
- Cline, M.J. (1970).** Monocytes and macrophages: differentiation and function.  
*Formation and Destruction of Blood Cells*, edited by T.J. Greenwalt and G.A. Jamieson, p. 222. Lippincott, Philadelphia.
- Cohn, Z.A. (1978).** The activation of mononuclear phagocytes: fact, fancy and future.  
*J. Immunol.*, 121, 813-816.
- Cohn, J.A. (1987).** Vasoactive intestinal peptide stimulates protein phosphorylation in a colonic epithelium cell line.  
*Am. J. Physiol.* 253, G420- 424.
- Collen, M.J., Sutliff, V.E., Pan, G.Z. and Gardner, D. (1982).** Postreceptor modulation of action of VIP and secretin on pancreatic enzyme secretion by secretagogues that mobilize cellular calcium.  
*Am. J. Physiol.* 242, G423-G428.
- Comsa, J., Leonardt, H., and Wekerk, H. (1982).** Hormonal coordination of the immune response.  
*Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 92, 116.
- Cook, D.N., Beck, M.A., Coffman, T.M., Kirby, S.L., Sheridan, J.F., Pragnell, I.B. and Smithies, O. (1995).** Requirement of MIP-1 $\alpha$  for an inflammatory response to viral infection.  
*Science*, 269, 1583-1585.
- Couvineau, A., Rouyer-Fessard, C., Fournier, A., St. Pierre, S., Pipkorn, R. and Laburthe, M. (1984).** Structural requirements for VIP interaction with specific receptors in human and rat intestinal membranes: effect of nine partial sequences.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 121, 493-498.
- Couvineau, A. and Laburthe, M. (1985).** The rat liver vasoactive intestinal peptide binding site. Molecular characterization by covalent cross linking and evidence for differences from the intestinal receptor.  
*Biochem. J.* 225, 473-479.
- Couvineau, A., Rousset, M. and Laburthe, M. (1985b).** Molecular identification and structural requirement of vasoactive intestinal peptide (VIP) receptors in the human colon adenocarcinoma cell line, HT29.  
*Biochem. J.*, 231, 139-413.
- Couvineau, A., Gammeltoft, S. and Laburthe, M. (1986a).** Molecular characteristics and peptide specificity of vasoactive intestinal peptide receptors from rat cerebral cortex.  
*J. Neurochem.* 47, 1469-1475.
- Couvineau, A., Voisin, T., Guijarro, L. and Laburthe, M. (1990).** Purification of vasoactive intestinal peptide receptor from porcine liver by a newly designed one-step affinity chromatography.  
*J. Biol. Chem.*, 265, 386-393.

**Couvineau, A., Rouyer-Fessard, C., Darmoul, D., Maoret, J.J., Carrero, I., Ogier-Denis, E. and Laburthe, M. (1994).** Human intestinal VIP receptor: cloning and functional expression of two cDNA encoding proteins with different N-terminal domains. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 193, 546-553.

**Cox, H.M. and Cuthbert, A.W. (1989).** Secretory actions of vasoactive intestinal polypeptide, peptide histidine isoleucine and helodermin in rat small intestine: the effects of putative VIP antagonist upon VIP-induced ion secretion. *Regul. Pept.* 26, 127.

**Cupps, T.R. and Fauci, A.S. (1982).** Corticosteroid mediated immunoregulation in man. *Immunol. Rev.* 65, 133-155.

**Cutz, E., Chan, W., Track, N.S., Goth, A. and Said, S.I. (1978).** Release of vasoactive intestinal peptide in mast cells by histamine liberators. *Nature* 275, 661-662.

**Chastre, E., Gespach, C., Rosselin, G. and Broer, Y. (1985).** Récepteurs fonctionnels et spécifiques du peptide intestinal vasoactif dans les entérocytes isolés chez le rat à l'âge foetal ou adulte. *C.R. Acad. Sci. Paris*, 300, 399-404.

**Chelbi-Alix, M.K., Boissard, C., Rosselin, G. and Thang, M.N. (1990).** Le peptide intestinal vasoactif induit la 2'5'oligoadénylate synthétase et l'état antiviral dans les cellules du cancer du colon HT-29. *C.R. Acad. Sci. Paris*, t. 310, Série III: 147-153.

**Chiba, T., Taminato, T., Kadowaki, S., Scino, Y., Matsukura, S. and Fujita, T. (1980).** Effects of glucagon, secretin and vasoactive intestinal polypeptide on gastric somatostatin and gastrin release from isolated perfused rat stomach. *Gastroenterology*, 76, 67-71.

**Chiodi, H. (1940).** The relationship between the thymus and the sexual organs. *Endocrinology* 26, 107-109.

**Christophe, J., Conlon, T.P. and Gardner, J.D. (1976).** Interaction of porcine vasoactive intestinal peptide with dispersed pancreatic acinar cells from guinea pig. *J. Biol. Chem.*, 251, 4629-4634.

**Dalsgaard, C.J., Hokfelt, T., Schultzberg, M., Lundberg, J.M., Terenius, L., Dockrey, G.J. and Goldstein, M. (1983).** Origin of peptide-containing fibers in the inferior mesenteric ganglion of the guinea-pig: Immunohistochemically studies with antisera to substance P, enkephalin, vasoactive intestinal polypeptide, colecystokinin and bombesin. *Neuroscience* 9, 191-211.

**Danek, A., O'Dorisio, M.S., O'Dorisio, T.M. and George, J.M. (1983).** Specific binding sites for vasoactive intestinal polypeptide on non-adherent peripheral blood lymphocytes. *J. Immunol.* 131, 1173-1177.

**Dardenne, M. and Savino, W. (1994).** Control of thymus physiology by peptidic hormones and neuropeptides. *Immunol. Today* 15, 518-523.

- Dartt, D.A., Baker, A.K., Vaillant, C. and Rose, P.E. (1984).** Vasoactive intestinal polypeptide stimulation of protein secretion from rat lacrimal gland acini. *Am. J. Physiol.* 247, G502-509.
- Davis, G.R., Santa Ana, C.A., Morawski, S.G. and Fordtran, J.S. (1981).** Effect of vasoactive intestinal polypeptide on active and passive transport in the human jejunum. *J. Clin. Invest.* 67, 1687-1694.
- Davoren, J.B. and Hsueh, A.J.W. (1985).** Vasoactive intestinal peptide: a novel stimulator of steroidogenesis by cultured rat granulosa cells. *Biol. Reprod.* 33, 37-52.
- De la Fuente, M., Delgado, M., Del Rio, M., Martínez, C., Hernanz, A. and Gomáriz, R.P. (1993).** Stimulation by vasoactive intestinal peptide (VIP) of phagocyte function in rat macrophages. *Regul. Pept.* 48, 345-353.
- De la Fuente, M., Delgado, M., Del Rio, M., Garrido, E., Leceta, J., Hernanz, A. and Gomáriz, R.P. (1994).** Vasoactive intestinal peptide modulation of adherence and mobility in rat peritoneal lymphocytes and macrophages. *Peptides* 15, 1157-1163.
- De la Fuente, M., Delgado, M. and Gomáriz, R.P. (1996).** VIP modulation of immune cells functions. *Adv. Neuroimmunol.* 6, 75-91.
- De Lean, A., Hancock, A. and Lefkowitz, R.J. (1982).** Validation and statistical analysis of a computer modeling method for quantitative analysis of radioligand binding data for mixtures of pharmacological receptor subtypes. *Mol. Pharmacol.*, 21, 5-8.
- Delgado, M., Pozo, D., Martínez, C., Garrido, E., Leceta, J., Calvo, J.R. and Gomáriz, R.P. (1996).** Characterization of gene expression of VIP and VIP1-receptor in rat peritoneal lymphocytes and macrophages. *Regul. Pept.* 62, 161-166.
- Delgado, M., Martínez, C., Leceta, J., Garrido, E. and Gomáriz, R.P. (1996b).** Differential VIP and VIP1 receptor gene expression in rat thymocytes subsets. *Peptides* 17, 803-807.
- Delgado, M., Garido, E., Martínez, C., Leceta, J. and Gomáriz, R.P. (1996d).** Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptides (PACAP27 and PACAP38) protect CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> thymocytes from glucocorticoid-induced apoptosis. *Blood* 87, 5152-5161.
- Delgado, M., Martínez, M.C., Pozo, D., Leceta, J., Calvo, J.R., Ganea, D. and Gomáriz, R.P. (1997).** VIP and PACAP enhance IL-6 release and mRNA levels by resting murine peritoneal macrophages: in vitro and in vivo studies. *J. Leukocyte Biol.*
- Delgado, M., Muñoz-Elias, E.J., Kan, Y., Gozes, I., Fridkin, M. and Brenneman, D.E. (1998).** Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide inhibit tumor necrosis factor alpha transcriptional activation by regulating nuclear factor-KB and cAMP response element-binding protein/c-Jun. *J. Biol. Chem.* 273 (47), 31427-36.

- De Meyts, P. (1976).** Insulin and growth hormone receptors in human cultured lymphocytes and peripheral blood lymphocytes.  
Methods in receptor research I. Marcel Dekker, INC, New York, pp. 301-383.
- De Souza, E.B. (1993).** Corticotropin-releasing factor and interleukin-1 receptors in the brain-endocrine-immune axis.  
Ann. NY Acad. Sci. 697, 9-27.
- Dickinson, K.E.J., Schachter, M., Miles, C.M.M., Coy, D.H. and Sever, P.S. (1986).** Characterization of vasoactive intestinal peptide (VIP) receptors in mammalian lung.  
Peptides, 7, 791-800.
- Dinarello, C.A. and Mier, J.W. (1987).** Current concepts: Lymphokines.  
New England J. Medicine, 317, 940-948.
- Dimaline, R., Peart, W.S. and Unwin, S.J. (1983).** Effects of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) on renal function and plasma renin activity in the conscious rabbit.  
J. Physiol., 344, 379-388.
- Dinarello, C.A. and Wolf, S.M. (1993).** The role of Interleukin-1 in disease.  
N. Eng. J. Med., 328, 106-113.
- Domschke, S., Domschke, W., Bloom, S.R., Mitznegg, P., Lux, G. and Strunz, U. (1978).** Vasoactive intestinal peptide in man: pharmacokinetics, metabolic and circulatory effects.  
Gut, 19, 1049-1053.
- Dunn, A.J. (1988).** Nervous system-immune system interactions: a overview.  
J. Rec. Res., 8, 589-607.
- Dupont, C., Gespach, C., Chenut, B. and Rosselin, G. (1980a).** Regulation by vasoactive intestinal peptide of cyclic AMP accumulation in gastric epithelial gland: a characteristic of human stomach.  
FEBS Lett. 113, 25.
- Dupont, C., Laburthe, M., Broyart, J.P., Bataille, D. and Rosselin, G. (1980b).** Cyclic AMP production in isolated colonic epithelial cells: 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. and Rosselin, G. (1981).** Importance of the vasoactive intestinal peptide receptor in the stimulation of cyclic adenosine 3'-5'-monophosphate in gallbladder epithelial cells of man. Comparison with the guinea pig.  
J. Clin. Invest., 67, 742-752.
- Duvilanski, B.H., Lasaga, M., Seilicovich, A., Afione, S., Diaz, M.C. and Debeljuk, L. (1990).** Vasoactive intestinal peptide affects the GABAergic system in the hypothalamic-pituitary axis.  
Brain. Res. Bull., 25, 215-219.
- Edwards, R.M. (1988).** Distribution of vasoactive intestinal peptide-sensitive adenylate cyclase activity along the nephron.  
Eur. J. Pharmacol. 157, 227-230.
- Edwards, S.W. and Watson, F. (1995).** The cell biology of phagocytes.  
Immunol. Today, 16, 508-510.

- Eedy, D.J., Shaw, C., Armstrong, E.P., Johnston, C.F. and Buchanan, K.D. (1990).** Vasoactive intestinal peptide (VIP) and peptide histidine methionine (PHM) in human eccrine sweat glands: demonstration of innervation, specific binding sites and presence in secretions. *Br. J. Dermatol.* 123, 65-76.
- Ekström, J. and Tobin, G. (1990).** Protein secretion in salivary glands of cats in vivo and in vitro response to vasoactive intestinal peptide. *Acta Physiol. Scand.* 140, 95-103.
- Epelbaum, J., Tapia-Arancibia, L., Besson, J., Rotsztejn, W.H. and Kordon, C. (1979).** VIP inhibits release of somatostatin from hypothalamus in vitro. *Eur. J. Pharmacol.*, 58, 493-495.
- Escudero, F., Carmena, M.J. and Prieto, J.C. (1987).** Tumor-promoting phorbol esters interfere with the vasoactive intestinal peptide receptor/effector system in rat prostatic epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 149, 221-226.
- Ericsson, A., Schalling, M., McIntyre, K.R., Lundberg, J.M., Larhammar, D., Seroogy, K., Hokfelt, T. and Persson, H. (1987).** Detection of neuropeptide Y and its mRNA in megacaryocytes: enhancer levels in certain autoimmune mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84, 5585-5589.
- Espat, N.J., G. Cheng, M.C., Kelley, S.B., Vogel, C.A., Sninsky and Hocking, M.P. (1995).** Vasoactive intestinal peptide and substance P receptor antagonists improve postoperative ileus. *J. Surg. Res.* 58, 719.
- Fabre, C., El Battari, A., Karamanos, Y., et al. (1993).** Glycosilation of VIP receptors: a molecular basis for receptor heterogeneity. *Peptides.* 14, 483-489.
- Fahrenkrug, J. (1979).** Vasoactive intestinal polypeptide: measurement, distribution and putative neurotransmitter function. *Digestion* 19, 149-169.
- Fahrenkrug, J., Bek, T., Lundberg, J.M. and Hökfelt, T. (1985).** VIP and PHI in cat neurons: co-localization but variable tissue content possible due to differential processing. *Regul. Pept.* 12, 21-34.
- Fahrenkrug, J. and Emson, P.C. (1989).** Characterization and distribution of peptides from the vasoactive intestinal peptide precursor in the normal human brain. *J. Neurochem.* 53, 1142-1148.
- Fantini, J., Tirard, A., El Battari, A., Luis, J., Muller, J.M., Pichon, J. et Marvaldi, J. (1985).** Système immunitaire intestinal. Le recepteur du VIP sur le lymphocyte T: un nouveau marqueur de différenciation?. *Gastroenterol. Clin. Biol.*, 9, 929-935.
- Felten, D.L., Felten, S.Y., Carlson, S.L., Olschowka, J.A. and Livnat, S. (1985).** Noradrenergic and peptidergic innervation of lymphoid tissues. *J. Immunol.* 135, 755s-765s.

**Felten, D.L., Felten, S.Y., Bellinger, D.L., Carlson, S.L., Ackerman, K.D., Madden, K.S., Olschowka, J.A. and Livnat, S. (1987).** Noradrenergic sympathetic neural interactions with the immune system: structure and function. *Immunol. Rev.* 100, 225-260.

**Felten, S.Y. and Felten, D.L. (1991).** Innervation of lymphoid tissue. In: *Psychoneuroimmunology*, edited by Ader, R., Felten, D.L. and Cohen, R. San Diego, CA: Academic. p. 27-68.

**Felten, S.Y., Felten, D.L., Bellinger, D.L. and Olschowka, J.A. (1992).** Noradrenergic and peptidergic innervation of lymphoid organs. In: *Chemical Immunology: Neuroimmunoendocrinology*, edited by Blalok, J.E. Basel: Karger. Basel, p. 25-48.

**Fernández-Cruz, E., Ulich, T. and Schrieber, R.D. (1985).** In vivo activity of lymphokine activated macrophages in host defense against neoplasia. *Immunol.*, 134, 3489-3496.

**Finch, R.J., Sreedharan, S.P. and Goetzl, E.J. (1989).** High affinity receptors for vasoactive intestinal peptide on human myeloma cells. *J. Immunol.*, 142, 1977-1981.

**Fishbein, V.A., D.H., Coy, S.J., Hocart, N.Y., Jiang, J.E., Mrozinski, S.A., Mantey and Jensen, R.T. (1994).** A chimeric VIP-PACAP analogue but not VIP pseudopeptides function as VIP receptor antagonists. *Peptides*, 15, 95.

**Franconi, G., Graf, P.D., Lazarus, S.C., Nadel, J.A. and Caughey, G.H. (1989).** Mast cell tryptase and chymase reverse airway smooth muscle relaxation induced by vasoactive intestinal peptide in the ferret. *Pharmacol. Exp. Ther.* 248, 947-951.

**Frandsen, E.K. and Mooday, A.J. (1973).** Lipolytic action of a newly isolated vasoactive intestinal polypeptide. *Horm. Metab. Res.*, 5, 196-199.

**Frandsen, E.K., Krishma, G.A. and Said, S.L. (1978).** Vasoactive intestinal polypeptide promotes cyclic adenosine 3':5'-monophosphate accumulation in guinea pig trachea. *Br. J. Pharmacol.*, 62, 367-369.

**Furness, J.B., Borstein, J.C., Murphy, R. and Pompolo, S. (1992).** Roles of peptides in transmission in the enteric nervous system. *Trends Pharmacol. Sci.* 15, 66-71.

**Gajkowska, B. and Viron, A. (1991).** Ultrastructural evidence for endogenous vasoactive intestinal peptide-like immunoreactivity in neurohypophysis. *Neuroendocrinol. Lett.* 13, 387-391.

**Gala, R.R. (1991).** Prolactin and growth hormone in the regulation of the immune system. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 198, 513-527.

**Gala, R.R. and Shevach, E.M. (1993).** Influence of bromocriptine administration to mothers on the development of pup thymocyte and splenocyte subsets and on mitogen-induced proliferation in the mouse. *Life. Sci.*, 53(26), 1981-1994.

**Gallatin, W.M., Weisman, I.L. and Butcher, E.C. (1983).** A cell-surface molecule involved in organ-specific homing of lymphocytes.  
*Nature*, 304, 30-34.

**Gallin, J.I., Sandler, J.A., Clyman, R.I., Manganiello, V.C. and Vaughan, M. (1978).** Agents that increase cAMP inhibit accumulation of cGMP and depress human monocyte locomotion.  
*J. Immunol.*, 120, 492-496.

**Ganea, D. and Sun, L. (1993).** Vasoactive intestinal peptide downregulates the expression of IL-2 but not of IFN gamma from stimulated murine T lymphocytes.  
*J. Neuroimmunol.* 47, 147-158.

**Gauldie, J., Richards, C., Harnish, D. et al. (1987).** Interferon  $\beta_2/b$  cell stimulatory factor 2 shares identity with monocyte-derived hepatocyte-stimulating factor and regulates the major acute phase protein response in liver cells.  
*Proc. Natl. Acad. Sci.* 84, 7251-7255.

**Gawler, D., Milligan, G., Spiegel, A. M., Unson, C.G. and Houslay, M.D. (1987).** Abolition of the expression of inhibitory guanine nucleotide regulatory protein  $G_i$  activity in diabetes.  
*Nature*. 327, 229-232.

**Gerard, C. and Gerard, N.P. (1994).** Anaphylotoxin and its seven transmembrane-segment receptor.  
*Ann. Rev. Immunol.* 12, 775-808.

**Gespach, C., Emani, S. and Rosselin, G. (1984).** Gastrin inhibitory peptide (GIP), pancreatic glucagon and vasoactive intestinal peptide (VIP) are cAMP-inducing hormones in the human gastric cancer cell line HGT-1. Homologous desensitization of VIP receptor activity.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 120, 641-649.

**Gespach, C., Chedeville, A., Hurbain-Kosmath, I., Housset, B., Derenne, J.P. and Abita, J.P. (1989).** Adenylate cyclase activation by VIP-helodermin and histamine  $H_2$  receptors in human THP-1 monocytes/macrophages: A possible role in the regulation of superoxide anions production.  
*Regul. Pept.* 26, 158-170.

**Giachetti, A., Said, S.I., Reynolds, R.C. and Koniges, F.C. (1977).** Vasoactive intestinal polypeptide in brain: localization and release from isolated nerve terminals.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, 3424-3428.

**Giachetti, A. and Said, S.I. (1979).** Axonal transport of vasoactive intestinal peptide in sciatic nerve.  
*Nature*. 281, 574-575.

**Gilman, A.G. (1987).** G proteins: transducers of receptor-generated signals.  
*Ann. Rev. Biochem.*, 56, 615-649.

**Goetzl, E.J., Chernov-Rogan, T., Cooke, M.P., Renold, F. and Payan, D.G. (1985).** Endogenous somatostatin-like peptides of rat basophilic leukemia cells.  
*J. Immuno.* 135, 2707-2712.

**Goetzl, E.J., Kodama, K.T., Turck, C.W., Schiogolev, S.A., Sreedharan, S.P. (1989).** Unique pattern of cleavage of vasoactive intestinal peptide by human lymphocytes.  
*Immunology* 66, 554-562.

**Goetzl, E.J., Grotmol, T., Van Dyke, R.W., Turck, C.W., Wershil, B., Galli, S.J. and Sreedharen, S.P. (1990).** Generation and recognition of vasoactive intestinal peptide by cells of the immune response.

Ann. N.Y. Acad. Sci. 131, 34-44.

**Goetzl, E.J., Patel, D.R., Kishiyama, J.L. et al. (1994).** Specific recognition of the human neuroendocrine receptor for vasoactive intestinal peptide by anti-peptide antibodies.

Molec. Cell. Neurosci. 5, 145-152.

**Goezt, E.J. (1980).** Mediators of immediate hypersensitivity derived from arachidonic acid.

New. Engl. J. Med. 303, 822.

**Goldstein, A.L., Low, T.L., McAdoo, M., McClure, J., Thurman, G.B., Rossi, J.L., Lay, C-Y, Chang, D., Wang, S-S., Harvey, C., Ramel, A.H. and Meienhofer, J. (1977).** Thymosin  $\alpha_1$ : isolation and sequence analysis of an immunologically active thymic polypeptide.

Pro. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 725-729.

**Gomariz, R.P., Lorenzo, M.J., Cacedo, L., Vicente, A. and Zapata, G. (1990).** Demonstration of immunoreactive vasoactive intestinal peptide (irVIP) and somatostatin (ir(SOM)) in rat thymus.

Brain. Behav. Immun., 4, 151-161.

**Gomariz, R.P., De la Fuente, M., Hernanz, A. and Leceta, J. (1992).** Occurrence of vasoactive intestinal peptide (VIP) in lymphoid organs from rat and mouse.

Ann. NY. Acad. Sci. 650, 13-18.

**Gomariz, R.P., Leceta, J., Garrido, E., Garrido, T. and Delgado, M. (1994b).** Vasoactive intestinal peptide (VIP) mRNA expression in rat T and B lymphocytes.

Regul. Pept. 50, 177-184.

**Gordon, S., Perry, V.H., Rabinowitz, S., Chung, L.P. and Rosen, H. (1988).** Plasma membrane receptors of the mononuclear phagocyte system.

J. Cell. Sci., suppl. 9, 1-26.

**Gourlet, P., De Neef, P., Cnudde, J., Waelbroeck, M. and Robberecht, P. (1997a).** In vitro properties of a high affinity selective antagonist of the VIP<sub>1</sub> receptor.

Pepetides 18, 1555-1560.

**Gourlet, P., Vandermeers, A., Vertongen, P., Rathé, J., De Neef, P., Cnudde, J., Waelbroeck, M. and Robberecht, P. (1997b).** Development of high affinity selective VIP<sub>1</sub> receptor agonists.

Pepetides 18, 1539-1545.

**Goyal, R. K., Rattan, S. and Said, S.L. (1980).** VIP as a possible neurotransmitter of non-cholinergic, non-adrenergic neurons.

Nature, 288, 378-380.

**Gozes, I., Avidor, R., Katznelson, D., Yahav, Y., Croce, C. and Hubner, K. (1987a).** The gene encoding vasoactive intestinal peptide is located on human chromosome 6p21-6qter.

Hum. Genet. 75, 41-44.

**Gozes, I., Nakai, H., Byers, A., Avidor, R., Weinstein, Y., Shani, Y. and Shows, T.B. (1987b).** Sequential expression in the nervous system of the VIP and c-myc genes located on the human chromosomal region 6q24.

Somatic Cell and Mol. Gen. 13, 305-313.

- Gozes, I. and Brenneman, D.E. (1989).** VIP: molecular biology and neurobiological function. *Mol. Neurobiol.* 3, 201-236.
- Gozes, I., Avidor, R., Biegon, A. and Baldino, F. Jr.(1989).** Lactation elevates vasoactive intestinal peptide messenger ribonucleic in rat supraquiasmatic nucleus. *Endocrinology* 124, 181-186.
- Gozes, I., Shani, Y., Liu, B. and Burbach, J.P. (1989b).** Diurnal variation in vasoactive intestinal peptide messenger RNA in the supraquiasmatic nucleus of the rat. *Neurosci. Res. Commun.* 5, 83-86.
- Gozes, I., Brenneman, D.E., Fridkin, M., Asofsky, R. and Gozes, Y. (1991).** VIP antagonist distinguishes VIP-R on spinal cord cells and lymphocytes. *Brain Res.* 540, 319-321.
- Grant, S.M. and Heel R.C. (1992).** Recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (rGM-CSF). *Drugs* 43, 516-560.
- Grider, J.R. and Makhlof, G.M. (1986).** Colonic peristaltic reflex: identification of VIP as mediator of descending relaxation. *Am. J. Physiol.* 251, G40-G45.
- Grider, J.R. and Rivier, J.R. (1990).** Vasoactive intestinal peptide (VIP) as transmitter of inhibitory motor neurons of the gut: evidence from the use of selective VIP antagonists and VIP antiserum. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 253, 738-742.
- Griffiths, N.M., Simmons, N.L. and Rivier, J. (1989).** Vasoactive intestinal peptide stimulation of renal adenylate cyclase and antagonism by (4-Cl-D-Phe<sup>6</sup>, Leu<sup>17</sup>)VIP. *Pflügers Arch.* 414, 222.
- Grossman, C.J. (1985).** Interactions between the gonadal steroid and the immune system. *Science*, 227, 257-261
- Guarcello, V., Weigent, D.A. and Blalock, J.E. (1991).** Growth hormone releasing factor receptors on lymphocytes. *Cell. Immunol.* 136, 291-301.
- Guerrero, J.M., Prieto, J.C., Elorza, F.L., Ramírez, F. and Goberna, R. (1981).** Interaction of vasoactive intestinal peptide with human blood mononuclear cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 21, 151-159.
- Guerrero, J.M., Prieto, J.C., Calvo, J.R. and Goberna, R. (1984).** Activation of cyclic AMP-dependent protein-kinase by VIP in blood mononuclear cells. *Pepetides* 5, 371-373.
- Guijarro, L.G., Rodríguez-Pena, M.S. and Prieto, J.C. (1991).** Characterization of vasoactive intestinal peptide receptors in rat seminal vesicle. *Am. J. Physiol.* 260, E286-E291.
- Habaud, O. and Lissitzky, S. (1977).** Thiotropin-specific binding to human peripheral blood monocytes and polymorphonuclear leukocytes. *Mol. Cell. Endocrinol.* 7, 79-87.

- Hakanson, R., Sundler, F. and Uddman, R. (1982).** Vasoactive intestinal peptide. Said, S. ed., pp. 121-144, Raven Press, New York.
- Hamasaki, Y., Mojarad, M. and Said, S. I. (1983).** Relaxant action of VIP on cat pulmonary artery: comparison with acetylcholine, isoproterenol and PGE<sub>1</sub>. *J. Appl. Physiol.*, 54, 1607-1611.
- Hamilton, T.A. and Adams, D.O. (1987).** Molecular mechanisms of signal transduction in macrophages. *Immunol. Today*, 8, 151-158.
- Hansson, M., Asea, A., Ersson, U., Hermodsson, S. and Hellstrand, K. (1996).** Induction of apoptosis in NK cells by monocyte-derived reactive oxygen metabolites. *J. Immunol.* 156, 42-47.
- Harbour, D.V., Leon, S., Keating, C. and Hughes, T.K. (1990).** Thiotropin modulates B-cell function through specific bioactive receptors. *Prog. Neuroendocrinol. Immunol.* 3, 266-276.
- Harmar, A.J. and Lutz, E. (1994).** Multiple receptors for PACAP and VIP. *Trends Pharmacol. Sci.* 15, 97-99.
- Hartschuh, W., Reinecke, W., Weihe, E. and Yanahara, W. (1984).** VIP-immunoreactivity in the skin of various mammals. Immunohistochemical, radioimmunological and experimental evidence for a dual localization in cutaneous nerves and Merckel cells. *Peptides*, 5, 239-245.
- Hayakawa, Y., Obata, K.I., Itoh, N., Yanahara, N. and Okamoto, H. (1984).** Cyclic AMP regulation of pro-vasoactive intestinal polypeptide/PHM-27 synthesis in human neuroblastoma cells. *J. Biol. Chem.* 259, 9207-9211.
- Heinz-Erian, P., Dey, R.D. and Said, S.I. (1985).** Deficient vasoactive intestinal peptide innervation in sweat glands of cystic fibrosis patients. *Science*, 229, 1407-1409.
- Hermanson, A., Dalsgaard, C.J., Björklund, H. and Lindblom, U. (1987).** Sensory reinnervation and sensibility after superficial skin wounds in human patients. *Neurosci. Lett.* 74, 377-382.
- Hernandez, D.E., Jennes, C. and Emerik, S.G. (1987).** Brain vasoactive intestinal peptide: a potent stimulant of gastric acid secretion. *Brain Res.* 420, 129-134.
- Hertel, C. and Perkins, J.P. (1984).** Receptor-specific mechanisms of desensitization of  $\beta$ -adrenergic receptor function. *Mol. Cell. Endocrinol.* 37, 245-256.
- Hery, M., Faudon, M. and Hery, F. (1984).** Effect of vasoactive intestinal peptide on serotonin release in the suprachiasmatic area of the rat. Modulation by oestradiol. *Peptides*, 5, 313-317.

**Hetland, G., Johnson, E., Falk, R.J. et al. (1986).** Synthesis of complement components C5, C6, C7, C8 and C9 in vitro by human monocytes and assembly of the terminal complement complex.

Scand. J. Immunol. 24, 421-428.

**Hetland, G. and Eskeland, T. (1987).** Mouse peritoneal macrophages cultured serum-free deposit complement on IgM-coated sheep erythrocytes in vitro.

Acta Path. Microbiol. Immunol Scand, Sect C. 95, 15-20.

**Hiestand, P.C., Mekler, P., Nordmann, R., Grieder, A. and Permondgkol, C. (1986).** Prolactin as a modulator of lymphocyte responsiveness provides a possible mechanism of action for cyclosporin.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83, 2599-2603.

**Hildebrandt, J.D., Codina, J., Risinger, R. and Birnbaumer, C. (1984).** Identification of subunit associated with adenylyl cyclase regulatory proteins  $N_s$  and  $N_i$ .

J. Biol. Chem., 259, 2039-2043.

**Hill, J.M., Gozes, I., Hill, J.L., Fridkin, M. and Brenneman, D.E. (1991).** Vasoactive intestinal peptide antagonist retards the development of neonatal behaviors in the rat.

Peptides 12, 187-192.

**Hill, J.M., Agoston, D.V., Gressens, P. and McCune, S.K. (1994).** Distribution of VIP mRNA and two distinct VIP binding sites in the developing rat brain: relation to ontogenic events.

J. Comp. Neurol. 342, 186-205

**Hill, M.R.S., Wallick, D.W., Mongeon, L.R., Martin, P.J. and Levy, M.N. (1995).** Vasoactive intestinal polypeptide antagonist attenuate vagally induced tachycardia in the anesthetized dog.

Am. J. Physiol. 38, H1467.

**Hirano. (1994).** Interleukin 6.

En: The Cytokine handbook 2nd ed. New York: Academic press, 145-166.

**Hirata, Y., Tomita, M., Takata, S. and Fujita, T. (1985).** Functional receptors for vasoactive intestinal peptide in cultured vascular smooth muscle cells from rat aorta.

Biochem. Biophys. Res. Commun., 132, 1079-1087.

**Hökfelt, T., Schultzberg, M., Lundberg, J.M., Fuxe, J., Mutt, V., Fahrenkrug, J. and Said, S.I. (1982).** Distribution of vasoactive intestinal polypeptide in the central and peripheral nervous systems as revealed by immunocytochemistry.

Vasoactive intestinal Peptide, Said (Ed.) Raven Press, New York, p, 65.

**Hohmann, E.L. and Tashjian Jr, A.H. (1984).** Functional receptors for vasoactive intestinal peptide on human osteosarcoma cells.

Endocrinology, 114, 1321-1327.

**Holligshead, L.M. and Goa, K.L. (1991).** Recombinant granulocyte colony-stimulating factor (rG-CSF). A review of its pharmacological properties and prospective role in neutropenic conditions.

Drugs, 42, 300-330.

**Hoosein, N.M., Black, B.E., Brattain, D.E. and Brattain, M.G. (1989).** Promotion of differentiation in human colon carcinomacells by vasoactive intestinal polypeptide.

Regul. Pept. 24, 15-26.

**Hoshino, M., Yanaihara, C., Hong, Y.M., Kishida, S., Katsumaru, Y., Vandermeers, A., Vandermeers-Piret, M.C., Robberecht, P., Christophe, J. and Yanaihara, N. (1984).** Primary structure of helodermin, a VIP-secretin-like peptide isolated from Gila monster venom. *FEBS Lett.*, 178, 233-239.

**Huang, M. and Rorstad, O.P. (1987).** VIP receptors in mesenteric and coronary arteries: a radioligand binding study. *Peptides*, 8, 477-485.

**Hueso, C., Carmena, M.J. and Prieto, J.C. (1989).** Identification of specific binding sites for vasoactive intestinal peptide in rat testis leydig cells and study of developmental changes. *Biochem. Int.*, 16, 951-958.

**Hvidsten, D., Lindsetmo, O., Rokke, O., Jenssen, T.G., Burhol, P.G. and Revhaug, A. (1989).** Clearance of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) in the porcine pulmonary circulation. *Regul. Pept*, 26, 267-275.

**Ichinose, M., Sawada, M. and Maeno, T. (1994).** Inhibitory effect of VIP on phagocytosis in mouse peritoneal macrophage. *Regul. Pept*, 54, 457-466.

**Inagaki, N., Yoshida, H., Mizuta, M., Mizuno, N., Fujii, Y., Gono, T., Miyazak, J. and Susumu, S. (1994).** Cloning and functional characterization of a third PACAP receptor subtype expressed in insulin-secreting cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 2679-2684.

**Inoue, Y., Kaku, K., Kaneko, T., Yanaihara, N. and Kanno, T. (1985).** Vasoactive intestinal peptide binding to specific receptors on rat parotid acinar cells induces amylase secretion accompanied by intracellular accumulation of cyclic adenosine 3',5' -monophosphate. *Endocrinology* 116, 686-692.

**Ipp, E., Dobbs, R.E. and Unger, R.H. (1978).** Vasoactive intestinal peptide stimulates pancreatic somatostatin release. *FEBS. Lett.*, 90, 76-78.

**Ishihara, T., Shigemoto, R., Mori, K., Takahashi, K. and Nagata, S. (1992).** Functional expression and tissue distribution of a novel receptor for vasoactive intestinal peptide. *Neuron* 8, 811-819.

**Isihoka, C., Yoshida, A., Kimata, H. and Mikawa, H. (1992).** Vasoactive intestinal peptide stimulates immunoglobulin production and growth of human B cells. *Clin. Exp. Immunol.* 87, 504-508.

**Itoh, N., Obata, K., Yanaihara, N. and Okamoto, H. (1983).** Human preprovasoactive intestinal polypeptide contains a novel PHI-27-like peptide, PHM-27. *Nature*, 304, 547-549.

**Itoh, S. and Yoshikawa, K. (1985).** Antidipsogenic action of vasoactive intestinal peptide in the rat. *Neuropharmacol.*, 24, 793-795.

**Johansson, O. and Lundberg, J.M. (1981).** Ultrastructural localization of VIP-like immunoreactivity in large dense-core vesicles of "cholinergic-type" nerve terminals in cat exocrine glands.

Neuroscience, 6, 847-851.

**Johnson, H.M., Downs, M.O. and Pontzer, C.H. (1992).** Neuroendocrine peptide hormone regulation of immunity.

In: Neuroimmunoendocrinology, chemical immunology, edited by Blalock, J.E. Basel: Karger. p. 49-83.

**Johnston, J.A., Taub, D.D., Lloyd, A.R., Conlon, K., Oppenheim, . and Kevlin, D.J. (1994).** Human T lymphocyte chemotaxis and adhesion induced by vasoactive intestinal peptide.

J. Immunol. 153, 1762-1768.

**Joborn, H., Larsson, R., Rastad, J., Nygren, P., Akerstrom, G. and Ljunghall, S. (1991).** Vasoactive intestinal polypeptide stimulates parathyroid hormone release by interaction with cyclic adenosine monophosphate production of bovine parathyroid cells.

Acta. Endocrinol. 124, 54-59.

**Jünemann, K., Ehmke, H., Kummer, W., Mayer, B., Bührle, C. and Alken, P. (1993).** Coexistence of nitric oxide synthase and vasoactive intestinal polypeptide in nerve terminals of human corpus cavernosum penis.

J. Urol. 149, 245A-245A.

**Kabemura, T., Misiwa, T., Chijiwa, Y., Nasu, T. and Nawata, H. (1992).** Substance P, vasoactive intestinal polypeptide, and gastrin catabolism in canine liver and kidney.

Dig. Dis. Sci. 37, 1661-1665.

**Kaku, K., Tsuchiya, M., Matsuda, M., Inoue, Y., Kaneko, T. and Yanaihara, N. (1985).** Light and agonist after vasoactive intestinal peptide binding and intracellular accumulation of adenosine 3', 5'-monophosphate in the rat pineal gland.

Endocrinology, 117, 2371-2375.

**Kao, T.L., Harbour, D.V., Smith, E.M. and Meyer, W.J. (1989).** Immunoreactive growth hormone production by cultured lymphocytes.

Endocrinology, A343.

**Kao, T.L., Supowit, S.C., Thompson, E.A. and Meyer W.J. (1992).** Immunoreactive growth hormone production by human lymphocyte cell lines.

Cell. Mol. Neurobiol. 12, 483-498.

**Karnovsky, M.L. and Lazdins, J.K. (1978).** Biochemical criteria for activated macrophage.

J. Immunol. 121, 809-813.

**Kasson, B.G., Lim, P. and Hsueh, J.W. (1986).** Vasoactive intestinal peptide stimulates androgen biosynthesis by cultures neonatal testicular cells.

Mol. Cell. Endocrinol. 48, 21-29.

**Kastin, A.j., Coy, D.H., Schally, A.V. and Meyers, L.A. (1978).** Activity of VIP, somatostatin and others peptides in the mouse vas deferens assay.

Pharmac. Biochem. Behav. 9, 673-676.

**Katada, T., Oinuma, M. and Ui, M. (1986).**

J. Biol. Chem. 261, 5215-5221.

- Kaufmann, S.H.E. (1995).** Immunity to intracellular microbial pathogens. *Immunol Today*, 16, 338-342.
- Kerins, C. and Said, S.I. (1973).** Hyperglycemic and glycogenolytic effects of vasoactive intestinal polypeptide. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 142, 1014-1017.
- Kim, S.W., Bauchamp, D., Townsend, C.M. and Thompson, J.C. (1991).** Vasoactive intestinal peptide inhibits c-myc expression and growth of human gastric carcinoma cells. *Surgery* 110, 270-276.
- Kimata, H., Yoshida, A., Fujimoto, M. and Mikawa, H. (1993).** Effect of vasoactive intestinal peptide, somatostatin, and substance P on spontaneous IgE and IgG4 production in atopic patients. *J. Immunol.* 150, 4630-4640.
- Kimura, C., Ohkubo, S., Ogi, K., Hosoya, M., Itoh, Y., Onda, H., Miyata, A., Jiang, L., Dahl, R.R., Stibbs, H.H., Arimura, A. and Fujino, M. (1990).** A novel peptide which stimulates adenylate cyclase: Molecular cloning and characterization of the ovine and human cDNAs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 166, 81-89.
- Klarskov, P., Gerstenberg, T. and Hald, T. (1984).** Vasoactive intestinal polypeptide influence on lower urinary tract smooth muscle from human and pig. *J. Urol.* 131, 1000.
- Kobayashi, R., Chen, Y., Lee, T.D., Davis, M.T., Ito, O. and Walsh, J.H. (1994).** Degradation of vasoactive intestinal polypeptide by rabbit gastric smooth muscle membranes. *Peptides*. 15, 323-332.
- Koenig, J.I., Snow, K., Clark, B.D., Toni, R., Cannon, J.G., Show, A.R., Dinarello, C.A., Reichlin, S., Lee, S.L. and Lechan, R.M. (1990).** Intrinsic pituitary interleukin-1beta is induced by bacterial lipopolysaccharide. *Endocrinology* 126, 3053-3058.
- Komisaruk, B.R., Banas, C., Heller, S.B., Whipple, N., Barbato, G.F. and Jordan, F. (1988).** Analgesia produced by VIP administered directly to the spinal cord in rat. *Ann. NY. Acad. Sci.* 527, 650-654.
- Kondo, H. and Yui, R. (1982).** An electron microscopic study on VIP like-immunoreactive nerve fibers in the celiac ganglion of guinea pig. *Brain Research* 237, 227-231.
- Konturek, S.J., Thor, P., Dembiski, A. and Krol, R. (1975).** VIP: comparison with secretin for potency and spectrum of physiology action. *Gastrointestinal Hormones* (Eds. Thompson, J.C. University Texas Press, Austin and Londres) pp. 611-633.
- Kover, K. and Moore, W.V. (1984).** Comparison of hGH binding to isolated rat liver macrophages and hepatocytes. *Horm. Metab. Res.* 16, 193-197.
- Krown, K.A., Wang, Y.F. and Walker, A.M. (1994).** Autocrine interaction between prolactin and its receptor occurs intracellularly in the 235-1 mammothroph cell line. *Endocrinology* 134, 1546-1552.

- Kruger, T.E., Smith, L.R., Harbour, D.V. and Blalock, J.E. (1989).** Thyrotropin: and endogenous regulator of the in vitro immune response. *J. Immunol.* 142, 744-747.
- Laburthe, M., Bataille, D. and Rosselin, G. (1977).** Vasoactive intestinal peptide (VIP): variation of the jejuno-ileal content in developing rat as measured by radio receptor assay. *Acta Endocrinol.* 84, 588-589.
- Laburthe, M., Rousset, M., Boissard, C., Chevalier, G., Zweibaum, A. and 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. USA* 75, 2772-2775.
- Laburthe, M., Prieto, J.C., Amiranoff, B., Dupont, C., Hui Bon Hoa, I. and Rosselin, G. (1979a).** Interaction of vasoactive intestinal peptide with isolated intestinal epithelial cells from rat. 2.Characterization and structural requirements of the stimulatory effect of vasoactive intestinal peptide on production of adenosine 3',5'-monophosphate. *Eur. J. Biochem.* 96, 239-248.
- Laburthe, M., Mangeat, P., Marchis-Mouren, G. and Rosselin, G. (1979c).** Activation of cyclic AMP-dependent protein kinases by vasoactive intestinal peptide (VIP) in isolated intestinal epithelial cells from rat. *Life Sci.* 25, 1931-1938.
- Laburthe, M., Boissard, G., Chevalier, G., Zweibaum, A. and Rosselin, G. (1981).** Peptide receptors in human lung tumor cells in culture: vasoactive intestinal peptide (VIP) and secretin interaction with the Calu-1 and SW-900 cells line. *Regul. Pept.* 2, 219-230.
- Laburthe, M., Breant, B. and Rouyer-Fessard, C. (1984).** Molecular identification of receptors for vasoactive intestinal peptide in rat intestinal epithelium by covalent cross-linking. *Eur. J. Biochem.* 139, 181-187.
- Laburthe, M. (1985).** Le peptide intestinal vasoactif (VIP): un neuropeptide ubiquitaire membre d'une famille structurale de peptides regulateurs. *Biochimie.* 67, 11-17.
- Laburthe, M., Chenut, B., Rouyer-Fessard, C., Tatemoto, K., Couvineau, A., Servin, A. and Amiranoff, B. (1986).** Interaction of peptide YY with rat intestinal epithelial plasma membranes: binding of the radioiodinated peptide. *Endocrinology* 118, 5, 1910-1917.
- Laburthe, M. and Couvineau, A. (1988).** Molecular analysis of VIP receptors. A comparison with receptors for VIP-related peptides. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 527, 296-313.
- Laburthe, M., Couvineau, A., Amiranoff, B. and Voisin, T. (1994).** Receptors for gut regulatory peptides. *Bailliere Clin. Endocrinol. Metab.* 8, 77-111.
- Lacaze-Masmonteil, T., De Keyzer, Y., Luton, J.P., Kahn, A. and Bertagna, X. (1987).** Characterization of proopiomelanocortin transcripts in human non pituitary tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 84, 7261-7265.

- Lacey, C.B., Elde, R.P. and Seybold, V. (1991).** Localization of vasoactive intestinal peptide binding sites in the thymus and bursa of Fabricius of the chicken. *Peptides* 12, 383-391.
- Lamperti, E.D., Rosen, K.M. and Villa-Komaroff, L. (1991).** Characterization of the gene and messages for vasoactive intestinal polypeptide (VIP) in rat and mouse. *Mol. Brain Res.* 9, 217-231.
- Larsen, J.J., Boeck, V. and Ottesen, B. (1981).** Effect of vasoactive intestinal polypeptide on cerebral blood flow in the goat. *Acta Physiol. Scand.* 111, 471-474.
- Larsson, L.I., Fahrenkrug, J., Schaffalitzky de Muckadell, O.B., Sundler, F., Hakanson, R. and Rehfeld, J.F. (1976).** Localization of vasoactive intestinal peptide (VIP) to central and peripheral neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73, 3197-3200.
- Larsson, L.I., Fahrenkrug, J. and 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. and Schaffalitzky de Muckadell, O.B. (1978).** Innervation of the pancreas by VIP immunoreactive nerves. *Life Sci.* 22, 773-780.
- Leceta, J., Martinez, C., Delgado, M., Garrido, E. and Gomariz, R.P. (1994).** Lymphoid cell subpopulations containing vasoactive intestinal peptide in the rat. *Peptides* 15, 791-797.
- Lee, M., Jensen, R.T., Huang, S.C., Bepler, G., Korman, L. and Moody, T.W. (1990).** Vasoactive intestinal peptide binds with high affinity to non-small cell lung cancer cells and elevates cyclic AMP levels. *Peptides* 11, 1205-1209.
- Le Meuth, V., Farjaudon, M.E., Rosselin, G., Guilloteau, P. and Gespach, C. (1991).** Characterization of binding sites for VIP-related peptides and activation of adenylate cyclase in developing pancreas. *Am. J. Physiol.* 260, G265-G274.
- Lenta, S.R., Tsiang, M. and Sadler, J.E. (1991).** Regulation of thrombomodulin by tumor necrosis factor  $\alpha$ : comparison of transcriptional and posttranscriptional mechanism. *Boold* 77, 542-550.
- Lilling, G., Wollman, Y., Goldstein, M.N., Rubinraut, S., Fridkin, M., Brenneman, D.E. and Gozes, I. (1995).** Inhibition of human neuroblastoma growth by a specific VIP antagonist. *J. Mol. Neurosci.* 5, 231.
- Lieschke, G.J. and Burgess, A.W. (1992).** Granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *New Engl. J. Med.* 327, 28-35 y 99-106.
- Lindahl, U., Kolset, S.O., Bogvald, J., et al. (1982).** Studies with a luminogenic peptide substrate on blood coagulation factor X/Xa produced by mouse peritoneal macrophages. *Biochem. J.* 206, 231-237.

- Lindahl, U., Pejler, G., Bogvald, J., et al. (1989).** A prothrombinase complex of mouse peritoneal macrophages.  
*Arch. Biochem. Biophys.* 273, 180-188.
- Litwin, D.K., Wilson, A.K. and Said, S.I. (1992).** Vasoactive intestinal polypeptide inhibits rat alveolar macrophage phagocytosis and chemotaxis in vitro.  
*Regul. Pept.* 40, 63-74.
- Lolait, S.J., Clements, J.A. Markwick, A.J., et al. (1986).** Pro-opiomelanocortin messenger ribonucleic acid and posttranslational processing of beta endorphin in spleen macrophages.  
*J. Clin. Invest.* 77, 1776-1779.
- Loren, T., Tornquist, K and Alumets, J. (1980).** VIP (vasoactive intestinal peptide) immunoreactive neurons in the retina of the rat.  
*Cell. Tiss. Res.* 210, 167-170.
- Lowrie, D. B., Jackett, B.S. and Ratcliffe, N.A. (1985).** *Micobacterium microti* may protect itself from intracellular destruction by releasing cAMP into phagosomes.  
*Nature* 254, 600-602.
- Luis, J., Muller, J.M., Abadie, B., Martin, J.M., Marvaldi, J. and Pichon, J. (1986).** Cycle of vasoactive intestinal peptide and its binding site in a human adenocarcinoma cell line (HT-29).  
*Eur. J. Biochem.* 156, 631-636.
- Luis, J., Martin, J.M., El Battari, A., Marvaldi, J. and Pichon, J. (1988).** The vasoactive intestinal peptide (VIP) receptor: recent data and hypothesis.  
*Biochimie.* 70, 1311-1322.
- Luis, J., Martin, J.M., El Battari, A., Reynier, M., Marvaldi, J. and Pichon, J. (1989).** A human melanoma-derived cell line (IGR39) with a very high number of vasoactive-intestinal-peptide (VIP) receptors. I. Molecular characterization of the binding site.  
*Eur. J. Biochem.* 180, 429-433.
- Lundberg, J.M., Anggard, A., Fahrenkrug, J., Hokfelt, T., and Mutt, V. (1980).** Vasoactive intestinal polypeptide in cholinergic neurons of exocrine glands: functional significance of coexisting transmitters for vasodilation and secretion.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77, 1651-1655.
- Lundberg, J.M., Anggard, A. and Fahrenkrug, J. (1981).** Complementary role of vasoactive intestinal peptide (VIP) and acetylcholine for cat submandibular gland blood flow and secretion.  
*Acta. Physiol. Scand.* 113, 317-327.
- Lutz, E.M., Sheward, W.J., West, K.M., Morrow, J.A., Fink, G. and Harmar, A.J. (1993).** The VIP2 receptor: molecular characterization of a cDNA encoding a novel receptor for vasoactive intestinal peptide.  
*FEBS Lett.* 334, 3-8.
- Lygren, I., Revhaug, A., Burhol, P.G., Giercksky, K-E. and Jenssen, T.G. (1984).** Vasoactive intestinal polypeptide and somatostatin in leukocytes.  
*Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 44,347-351.
- Mackanes, G.B. (1969).** The influence of immunologically committed lymphoid cells on macrophage activity in vivo.  
*J. Exp. Med.* 129, 973-976.

- Magistretti, P.J., Manthorpe, M., Bloom, F.E. and Varon, S. (1983).** Functional receptors for vasoactive intestinal polypeptide in cultured astroglia from neonatas rat brain. *Regul. Pept.* 6, 71-80.
- Magistretti, P.J., Hof, P.R., Martin, J.L., Dietl, M. and Palacios. J.M. (1988).** High and low-affinity binding sites for vasoactive intestinal peptide (VIP) en the rat kidney revealed by microscopic autoradiography. *Regul. Pept.* 23, 145-152.
- Magistretti, P.J. (1990).** VIP neurons in the cerebral cortex. *Trends Pharmacol. Sci.* 11, 250-254.
- Maimone, D., Cioni, C., Rosa, S., Macchia, G., Aloisi, F. and Annunziata, P. (1993).** Norepinephrine and VIP induce IL-6 secretion by astrocytes: synergism with IL-1 $\beta$  and TNF $\alpha$ . *J. Neuroimmunol.* 47, 73-82.
- Makhlouf, G.M. and Said, S.I. (1975).** The effect of vasoactive intestinal peptide (VIP) on digestive and hormonal function. *Gastrointestinal Hormones.* (Eds. Thompson, J.C. University Texas Press, Austin y Londres) pp. 699-710.
- Malm, L., Sundler, F. and Uddman, R. (1980).** Effect of vasoactive intestinal polypeptide on resistance and capacitance vessels in the nasal mucosa. *Acta Otolaryngol.* 90, 304-308.
- Mao, Y. K., Wang, Y.F. and Daniel, E.E. (1993).** Distribution and characterization of vasoactive intestinal polypeptide binding in canine lower esophageal sphincter. *Gastroenterology* 105, 1370-1377.
- Marie, J.C., Hui Bon Hoa, D., Jackson, R., Hejblum, G. and Rosselin (1985).** The biological relevance of HPLC-purified vasoactive intestinal peptide monoiodinated at tyrosine 10 or tyrosine 22. *Regul. Pept.* 12, 113-123.
- Martin, J.L., Rose, K., Hughes, G.J. and Magistretti, P.J. (1986).** [Mono [<sup>125</sup>I]iodo-Tyr<sup>10</sup>, MetO<sup>17</sup>]-Vasoactive Intestinal Polypeptide: Preparation, characterization and use for radioimmunoassay and receptor binding. *J. Biol. Chem.* 261, 5320-5327.
- Martin, J. M., Luis, J., Marvaldi, J., Pichon, J. and Pic, P. (1989).** A human melanoma-derived cell line (IGR 39) with a very high number of vasoactive intestinal peptide (VIP) receptors. 2. Effect of VIP on cyclic AMP production and on cell-surface VIP-binding sites. *Eur. J. Biochem.* 180, 435-439.
- Martin, J.H. and Edwards, S.W. (1994).** Interferon gamma enhanced monocyte cytotoxicity via enhanced reactive oxygen intermediate production absence of an effect on macrophage cytotoxicity is due failure to enhance reactive nitrogen intermediate productic. *Immunol.* 81, 592-597.
- Martinez, C., Delgado, M., Gomariz, R.P. and Ganea (1996).** Vasoactive intestinal peptide (VIP) and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) inhibit IL-10 production in murine T lymphocytes. *J. Immunol.* 156, 4128-4236.

- Martinez, C., Delgado, M., Pozo, D., Leceta, J., Calvo, J.R., Ganea, D. and Gomariz, R.P. (1997).** Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide modulate endotoxin-induced IL-6 production by murine peritoneal macrophages. *J. Neuroimmunol.*
- Maruno, K. and Said, S.I. (1993).** Small-cell lung carcinoma: inhibition of proliferation by vasoactive intestinal peptide and helodermin and enhancement of inhibition by anti-bombesin antibody. *Life Sci.* 52, p1267-p1271.
- Mathew, R.C., Cook, G.A., Blum, A.M. Metwali, A., Felman, R. and Weinstock, J.V. (1992).** VIP stimulates T lymphocytes to release IL-5 in murine Schistosomiasis mansoni infection. *J. Immunol.* 148, 3572-3577.
- Mayo, K.E. Cerelli, G.M., Lebo, R.V., Bruce, B.D., Rosenfeld, M.G. and Evans, R.M. (1985).** Gene encoding human growth hormone-releasing factor precursor: structure, sequence, and chromosomal assignment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 63-67.
- Meloni, F., Bertoletti, R., Corsico, A., Difazio, P., Cecchetti, M. and Gialdronigrassi, G. (1992).** Bombesin/gastrin-releasing peptide levels of peripheral mononuclear cells, monocytes and alveolar macrophages in chronic bronchitis. *Int. J. Tissue Reactions Exp. and Clin. Aspects.* 14, 195-201.
- Metcalf, D. (1989).** The molecular control of cell division, differentiation, commitment and maturation in hemopoietic cells. *Nature* 339, 27-30.
- Metchnikoff, E. (1905).** *Immunity in Infective Diseases.* Cambridge, London.
- Mezey, E. and Kiss, J. Z. (1985).** Vasoactive intestinal peptide containing-neurons in the paraventricular nucleus may participate in regulating prolactin secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 245-247.
- Milligan, G., Mullaney, I., Unson, C. G., Marshall, L., Spiegel, A.M. and McArdle, H. (1988).** GTP analogues promote release of the  $\alpha$  subunit of the guanine nucleotide binding protein, Gi2, from membranes of rat glioma C6BU1 cells. *Biochem. J.* 254, 567-574.
- Misbahuddin, M., Oka, M., Nakanishi, A. and Morita, K. (1988).** Stimulatory effect of vasoactive intestinal polypeptide on catecholamine secretion from isolated guinea pig adrenal chromaffin cells. *Neurosci. Lett.* 92, 202-206.
- Misbin, R.I., Wolfe, M.M., Morris, P., Buynitzky, J. and McGuigan, J.E. (1982).** Uptake of vasoactive intestinal peptide by rat liver. *Am. J. Physiol.* 243, G103-G111.
- Molinero, P., Calvo, J.R., Goberna, R. and Guerrero, J.M. (1985).** The interaction of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) with isolated bovine thyroid plasma membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 128, 1336-1341.

**Moody, T.W., Zia, F., Breneman, D., Fridkin, M., Davidson, A. and Gozes, Y. (1993).** A VIP antagonist inhibits the growth of non-small cell lung cancer.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 4345-4349.

**Moore, T.C. and Lachman, P.J. (1982).** Cyclic AMP reduces and cyclic GMP increases the traffic of lymphocytes through peripheral lymph node of sheep in vivo.  
Immunology 47, 423-429.

**Moore, T. C. (1984).** Modification of lymphocyte traffic by vasoactive neurotransmitter substances.  
Immunology 52, 511-518.

**Moore, T.C., Spruck, C.H. and Said, S.I. (1988).** Depression of lymphocyte traffic in sheep by vasoactive intestinal peptide (VIP).  
Immunology 64, 475-478.

**Moore, K. W., O'Garra, A., Malefyt, R. de W., Viera, P. and Mosmann, T.R. (1993).** Interleukin-10.  
Annual Review of Immunology 11, 165-190.

**Morley, J.E., Kay, N.E., Solomon, G.F. and Plotnikoff, N.P. (1987).** Neuropeptides: conductors of the immune orchestra.  
Life Sciences 41, 527-544.

**Morris, J.L. and Murphy, R. (1989).** Porcine VIP is more potent than guinea pig VIP in relaxing the guinea pig uterine artery.  
Peptides 10, 887-889.

**Munn, D.H., Pressey, J., Beall, A.C., Hudes, R., Alderson, M.R. (1996).** Selective activation-induced apoptosis of peripheral T cells imposed by macrophages.  
J. Immunol. 156, 523-532.

**Munson, P.J. and Rodbard, D. (1980).** LIGAND: a versatile computerized approach for characterization of ligand-binding systems.  
Anal. Biochem. 107, 220-239.

**Murthy, S.K. and Makhlof, G.M (1994).** Vasoactive intestinal peptide/pituitary adenylate cyclase-activating peptide activation of membrane-bound NO synthase in smooth muscle mediated by pertussis toxin-sensitive G<sub>i</sub>1-2.  
J. Biol. Chem. 269, 15977-15980.

**Muccetola, M. and Grasso, G. (1990).** Somatostatin and vasoactive intestinal peptide reduce interferon gamma production by human peripheral blood mononuclear cells.  
Immunobiology. 180, 419-430

**Myers, A.K., Farhat, M.Y. Vaz, C.A., Keiser, H.R. and Zukowska-Grojec, Z. (1988).** Release of immunoreactive neuropeptide Y by rat platelets.  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 155, 118-122.

**Nau, R., Ballmann, M. and Conlon, J.M. (1987).** Binding of vasoactive intestinal polypeptide to dispersed enterocytes results in rapid removal of the NH<sub>2</sub>-terminal histidyl residue.  
Mol Cell. Endocrinol. 52, 97-103.

- Nguyen, T.D. (1988).** Peptide T from human immunodeficiency virus envelope does not interact with hepatic, intestinal and colonic vasoactive intestinal peptide (VIP) receptor. *Peptides* 9, 425-428.
- Nilsson, Ch., Fahrenkrug, J., Lindwall-Axelsson, M. and Owman, Ch. (1991).** Epithelial cells purified from choroid plexus have receptors for vasoactive intestinal polypeptide. *Brain Res.* 542, 241-247.
- Nilsson, S.F.E., De Neef, P., Robberecht, P. and Christophe, J. (1994).** Characterization of ocular receptors for pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) and their coupling to adenylate cyclase. *Exp. Eye Res.* 58, 459-467.
- Nishizawa, M., Hayakawa, Y., Yanaihara, N. and Okamoto, H. (1985).** Nucleotide sequence divergence and functional constraint in VIP precursor mRNA evolution between human and rat. *FEBS Lett.* 183, 55-59.
- Nohr, D. and Weihe, E. (1991).** The neuroimmune link in the bronchus-associated lymphoid tissue (BALT) of cat and rat: peptides and neural markers. *Brain Behav. Immun.* 5, 84-101.
- Nyberg, B., Angelin, B. and Einarsson, K. (1992).** Somatostatin does not block the effect of vasoactive intestinal peptide on bile secretion in man. *Eur. J. Clin. Invest.* 22, 60-66.
- Oates, E.L., Allaway, G.P., Armstrong, G.R., Boyajian, R.A., Kehrl, J.H. and Prabhakar, B.S. (1988).** Human lymphocytes produce pro-opiomelanocortin gene-related transcripts. *J. Biol. Chem.* 263, 10041-10044.
- O'Donnell, M., Garippa, R.J., O'Neill, N.C., Bolin, D.R. and Cottrell, J.M. (1991).** Structure-activity studies of vasoactive intestinal peptide. *J. Biol. Chem.* 266, 6389-6392.
- O'Dorisio, M.S., O'Dorisio, T.M., Cataland, S. and Balcerzak, S.P. (1980).** VIP as a biochemical marker for polymorphonuclear leukocytes. *J. Lab. Clin. Med.* 96, 666-672.
- O'Dorisio, M.S., Hermina, N.S., O'Dorisio, T.M. and Balcerzak, P. (1981).** Vasoactive intestinal polypeptide modulation of lymphocyte adenylate cyclase. *J. Immunol.* 127, 2551-2556.
- O'Dorisio, M.S., Wood, C.L., Wenger, G.D. and Vassalo, L.M. (1985a).** Cyclic AMP-dependent protein kinase in Molt 4b lymphoblasts: identification by photoaffinity labeling and activation in intact cells by vasoactive intestinal peptide (VIP) and peptide histidine isoleucine (PHI). *J. Immunol.* 134, 4078-4085.
- O'Dorisio, M.S., Wood, C.L. and O'Dorisio, T.M. (1985b).** Vasoactive intestinal peptide and neuropeptide modulation of the immune response. *J. Immunol.* 135, 792-796.
- O'Dorisio, M.S., Vasiloff, J., Campolito, L.B. and Bresnahan, J.C. (1988).** Characterization of the vasoactive intestinal peptide receptor in rat frontal cortex. *Neurosc. Res. Comm.* 2, 19-28.

- O'Doriso, M.S. and Campolito, L.B. (1989a).** Comparison of vasoactive intestinal peptide-mediated protein phosphorylation in human lymphoblasts and colonic epithelial cells. *Mol. Immunol.* 26, 583-589.
- O'Doriso, M.S., Shannon, B.T., Fleshman, D.J. and Campolito, L.B. (1989b).** Identification of high affinity receptors for vasoactive intestinal peptide on human lymphocytes of B cell lineage. *J. Immunol.* 142, 3533-3536.
- Olah, A., Lahel, C., Anderson, W.B., Brenneman, D.E. and Von Agoston, D. (1994).** Subnanomolar concentration of VIP induces nuclear translocation of protein kinase C in neonatal cortical astrocytes. *J. Neurosci. Res.* 39, 355-363.
- Oliva, D., Nicosia, S., Spada, A. Giannattasio, G.L. (1982).** VIP stimulates ACTH release and adenylate cyclase in human ACTH-secreting pituitary adenomas. *Eur. J. Pharmacol.* 83, 101-105.
- Ollerenshaw, S., Jarvis, D., Woolcock, A., Sullivan, C. and Scheibner, T. (1989).** Absence of immunoreactive vasoactive intestinal polypeptide in tissue from the lung of patients with asthma. *N. Engl. J. Med.* 320, 1244-1248.
- O'Neal, K. D., Montgomery, D.W., Truong, T.M. and Yu-Lee, L.Y. (1992).** Prolactin gene expression in human thymocytes. *Mol. Cell. Endocrinol.* 87, R19-R23.
- Osterud, B., Bogwald, J. and Lindahl, U. (1981).** Production of blood coagulation factor V and tissue thromboplastin by macrophages in vitro. *FEBS Letters* 127, 154-156.
- Ottaway, C.A., Bernaerts, C., Chan, B. and Greenberg, G.R. (1983).** Specific binding of vasoactive intestinal peptide to human circulating mononuclear cells. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 61, 664-671.
- Ottaway, C.A. and Greenberg, G.R. (1984).** Interaction of vasoactive intestinal peptide with mouse lymphocytes: specific binding and the modulation of mitogen response. *J. Immunol.* 132, 417-423.
- Ottaway, C.A. (1984).** In vitro alteration of receptors for vasoactive intestinal peptide changes the in vivo localization of mouse T cells. *J. Exp. Med.* 160, 1054-1069.
- Ottaway, C.A. (1987).** Selective effect of VIP on the mitogen response of murine T cells. *Immunology.* 62, 291-297.
- Ottaway, C.A. Lewis, D.L. and Asa, S.L. (1987b).** Vasoactive intestinal peptide-containing nerves in Peyer's patches. *Brain. Behav. Immunol.* 1, 148-158.
- Ottaway, C.A. (1988).** Vasoactive intestinal peptide as a modulator of lymphocyte and immune function. *Ann.N.Y. Acad. Sci.* 527, 486-500.

**Ottaway, C.A., Lay, T.E. and Greenberg, G.R. (1990).** High affinity specific binding of vasoactive intestinal peptide to human circulating T cells, B cells and large granular lymphocytes.

J. Neuroimmunol. 29, 149-155.

**Ottaway, C.A. (1992).** Receptors for VIP on murine lymphocytes turn over rapidly.

J. Neuroimmunol. 29, 241-254.

**Ottaway, C.A. (1992c).** Role of sulfhydryl groups in the binding of vasoactive intestinal peptide to its receptor on murine lymphocytes.

J. Neuroimmunol. 39, 49-56.

**Ottesen, B., Fahrenkrug, J., Wagner, G., Ulrichsen, H., Einer-Jensen, N., Carter, A.M., Larsen, J.J. and Stolberg, B. (1980).** Effects of VIP in the female genital tract.

Endocrinol. Japon. 1, 71-78.

**Ottesen, B., Larsen, J.J., Fahrenkrug, J., Stjernquist, M. and Sundler, F. (1981).** Distribution and motor effect of VIP in female genital tract.

Am. J. Physiol. 240, E32-E36.

**Ottesen, B., Stau-Olsen, P., Gammeltoft, S. and Fahrenkrug, J. (1982).** Receptors for vasoactive intestinal polypeptide on crude smooth muscle membranes from porcine uterus.

Endocrinology 110, 2037-2043.

**Pandol, S.J., Dharmasathaphorn, K., Schoeffield, M.S., Vale, W. and Rivier, J. (1986).** Vasoactive intestinal peptide receptor antagonist (4-Cl-D-Phe<sup>6</sup>,Leu<sup>17</sup>)VIP.

Am. J. Physiol. 250, G553-G557.

**Pascual, D.W. and Bost, K.L. (1990).** Substance P production by P339D1 macrophages: a possible autocrine for this neuropeptide.

Immunology 71, 52-56.

**Paul, S., Heinz-Erian P. and Said, S.I. (1985).** Increased levels of autoantibody to vasoactive intestinal peptide in cystic fibrosis.

Clin. Res. 33, 82A.

**Paul, S. and Said, S.I. (1987).** Characterization of receptors for vasoactive intestinal peptide from the lung.

J. Biol. Chem. 262, 158-162.

**Paul, S., Said, S.I., Thompson, A.B., Volle, D.J., Agrawal, D.K., Foda, H. and de la Rocha, S. (1989).** Characterization of autoantibodies to vasoactive intestinal peptide in asthma.

J. Neuroimmunol. 23, 133-142.

**Paul, S., Mei, S., Mody, B., Eklund, S.H., Beach, C.M., Massey, R.J. and Hamel, F. (1991).** Cleavage of vasoactive intestinal peptide at multiple sites by autoantibodies.

J. Biol. Chem. 266, 16128-16134.

**Payan, D.G., McGillis, J.P. and Goetzl, E.J. (1986).** Neuroimmunology.

Adv. In Immunol. 39, 299-323.

**Pearce, P., Khalid, B.A.K. and Funder, J.W. (1981).** Androgens and the thymus.

Endocrinology. 109, 1073-1077.

- Peele, M.E., Carr, F.E., Baker, J.R. Jr., Wartofsky, L. and Burman, K.D. (1993).** TSH beta subunit gene expression in human lymphocytes.  
*Am. J. Med. Sci.* 305, 1-7.
- Pellegrini, I., Lebrum, J.J., Ali, S. and Kelly, P.A. (1992).** Expression of prolactin and its receptor in human lymphoid cells.  
*Mol. Endocrinol.* 6, 1023-1031.
- Perez, J.L., Losa, J.E. y Jimenez, A. (1990).** Fenotipo del macrófago alveolar.  
*Inmunología* 9, 79-90.
- Perry, H.M., Chappel, J.C.E., Martin, K.J. and Teitelbaum, S.L. (1984).** Parathyroid hormone receptors in circulating human mononuclear leukocytes.  
*J. Biol. Chem.* 259, 5531-5535.
- Peuriere, S., Susini, Ch., Esteve, J-P., Vaysse, N. and Escoula, I. (1990).** Dual effect of VIP on the mitogenic response of rabbit spleen lymphocytes.  
*Regul. Pept.* 27, 117-126.
- Pincus, D.W., DiCicco-Bloom, E.M. and Black, I.B. (1990a).** Vasoactive intestinal peptide regulates mitosis, differentiation and survival of cultured sympathetic neuroblast.  
*Nature* 343, 564-567.
- Pincus, D.W., DiCicco-Bloom, E.M. and Black, I.B. (1990b).** Vasoactive intestinal peptide regulation fo neuroblast mitosis and survival: role of cAMP.  
*Brain. Res.* 514, 355-357.
- Piotrowski, W. and Foreman, J.C. (1985).** On the actions of substance P, somatostatin and vasoactive intestinal peptide on rat peritoneal mast cells and in human skin.  
*Arch. Pharmacol.* 331, 364-368.
- Polak, J.M., Pearse, A., Garraud, J.C. and Bloom, S.R. (1974).** Cellular localization of vasoactive intestinal peptide in the mammalian and aviam gastrointestinal tract.  
*Gut.* 15, 720-724.
- Polak, J.M., Gu, J., Mina, S. and Bloom, S.R. (1981).** VIPergic nerves in the penis.  
*Lancet* II, 217-219.
- Polak, J.M. and Bloom, S.R. (1983).** Regulatory peptides: key factors in the control of bodily functions.  
*Br. Med. J.* 286, 1461-1466.
- Porter, J.P., Said, S.I. and Ganong, W.F. (1983).** Vasoactive intestinal peptide stimulates renin secretion in vitro: evidence for a direct action of the peptide on the renal juxtaglomerular cells.  
*Neuroendocrinology* 36, 404-411.
- Porter, J.P. and Ganong, W.F. (1988).** Vasoactive intestinal peptide and renin secretion.  
*Ann. NY Acad. Sci.* 527, 465-477.
- Pozo, D., Guerrero, J.M. and Calvo, J.R. (1995).** Homologous regulation of vasoactive intestinal peptide (VIP) receptors on rat peritoneal macrophages.  
*Peptides* 16, 313-318.

**Pozo, D., Segura, J.J., Carrero, I., Guijarro, L.G., Prieto, J.C. and Calvo, J.R. (1996).** Characterization of adenylyl cyclase stimulated by VIP in rat and mouse peritoneal macrophages membranes.

Biochim. Biophys. Acta 1312, 249-254.

**Prieto, J.C., Laburthe, M. and Rosselin, G. (1979).** Interaction of vasoactive intestinal peptide with isolated intestinal epithelial cells from rat. I. Characterization, quantitative aspects and structural requirements of binding sites.

Eur. J. Biochem. 96, 229-239.

**Prieto, J.C., Guerrero, J.M., De Miguel, C. and Goberna, R. (1981).** Interaction of vasoactive intestinal peptide with a cell line (HeLa) derived from human carcinoma of the cervix: binding to specific sites and stimulation of adenylate cyclase.

Mol. Cell. Biochem. 97, 167-176.

**Prieto, J.C. (1982).** Inhibitory effect of somatostatin on basal and VIP-stimulated cyclic AMP production and cyclic AMP-dependent protein kinase activity in HeLa cells.

FEBS Letters 144, 173-176.

**Prieto, J.C. and Carmenam.J. (1983).** Receptors for vasoactive intestinal peptide on isolated epithelial cells of rat ventral prostate.

Biochem. Biophys. Acta 763, 408-413.

**Pruss, R.M., Moskal, J.R., Eiden, L.E. and Beinfeld, M.C. (1985).** Specific regulation of vasoactive intestinal polypeptide biosynthesis by phorbol ester in bovine chromaffin cells.

Endocrinology. 117, 1020-1026.

**Prydz, H. and Allison A. (1978).** Tissue thromboplastin activity of isolated human monocytes.

Thromb. Haemostas. 39, 582-591.

**Racusen, L.C. and Binder, H.J. (1977).** Alteration of large intestinal electrolyte transport by vasoactive intestinal polypeptide in the rat.

Gastroenterology. 73, 790-796.

**Rattan, S., Said, S.I. and Goyal, R.K. (1977).** Effect of VIP on the lower esophageal sphincter pressure.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 155, 40-43.

**Raufman, J. Maalhotra, R. and Singh, L. (1991).** PACAP-38, a novel peptide from ovine hypothalamus, is a potent modulator of amylase release from dispersed acini from rat pancreas.

Regul. Pept. 36, 121-129.

**Riou, F., Cespuglio, R. and Jouvét, M. (1982).** Endogenous peptides and sleep in the rat: III. The hypnogenic properties of VIP.

Neuropeptides 2, 265-277.

**Rist, R., Jones, G. and Naftalin, R. (1990).** Synergistic activation of 2-deoxy-D-glucose uptake in rat and murine peritoneal macrophages by human macrophage colony-stimulating factor stimulated coupling between transport and hexokinase activity and phorbol-dependent stimulation of pentose phosphate-shunt activity.

Biochem. J. 265, 243-249.

**Robberecht, P., De Neef, P., Lammens, M., Deschodt-lanckman, M. and Christophe, J. (1978).** Specific binding of vasoactive intestinal peptide to brain membranes from guinea pig.

Eur. J. Biochem. 90, 147-154.

**Robberecht, P., Conlon, T.P. and Gardner, J.D. (1979).** Interaction of porcine vasoactive intestinal peptide with dispersed pancreatic acinar cells from the guinea pig.  
J. Biol. Chem. 251, 4635-4639.

**Robberecht, P., Chatelain, P., De Neef, P., Camus, J.C., Waelbroeck, M. and Christophe, J. (1981).** Presence of vasoactive intestinal peptide receptors coupled to adenylate cyclase in rat lung membranes.  
Biochim. Biophys. Acta 773, 271-278.

**Robberecht, P., Tatemoto, K., Chatelain, P., Waelbroeck, M., Delhaye, G., Taton, P., De Neef, P., Camus, J.C., Heuse, D. and Christophe, J. (1982b).** Effects of PHI on vasoactive intestinal peptide receptors and adenylate cyclase activity in lung membranes. A comparison in man, rat, mouse and guinea pig.  
Regul. Pept. 4, 241, 250.

**Robberecht, P., Waelbroeck, M., Camus, J.C., De Neef, P. and Christophe, J. (1984).** Importance of disulfide bonds in receptor for vasoactive intestinal peptide and secretin in rat pancreatic plasma membranes.  
Biochim. Biophys. Acta 773, 271-278.

**Robberecht, P. and Chatelain, P. (1985).** Effects of the peptides of the VIP family on the cardiovascular system.  
Regul. Pept. (Suppl). 3, 8.

**Robberecht, P., Waelbroeck, M., De Neef, P., Camus, J.C., Coy, D.H. and Christophe, J. (1988a).** Pharmacological characterization of VIP receptors in human lung membranes.  
Peptides. 9, 339-345.

**Robberecht, P., Waelbroeck, M., De Neef, P., Tastenoy, M., Gourlet, P., Cogniaux, J. and Christophe, J. (1988b).** A new type of functional VIP receptor has an affinity for helodermin in human SUP-T1 lymphoblasts.  
FEBS LETTERS, 228, 351-355.

**Robberecht, P., Abello, J., Damien, C., De Neef, P., Vervisch, E., Hooghe, R. and Christophe, J. (1989a).** Variable stimulation of adenylate cyclase activity by vasoactive intestinal-like peptide and  $\beta$ -adrenergic agonist in murin T-cell lymphomas of immature, helper, and cytotoxic types.  
Immunobiology 179, 422-431.

**Robberecht, P., De Neef, P., Goulet, P., Cauvin, A., Coy, D.H. and Christophe, J. (1989b).** Pharmacological characterization of the novel helodermin/VIP receptor present in human SUP-T1 lymphoma cell membranes.  
Regul. Pept. 26, 117-126.

**Robberecht, P., De Neef, P., Waelbroeck, M., Tastenoy, M. and Christophe, J. (1989c).** VIP and related peptide induce rapid homologous desensitization in the human lymphoma SUP-T1 cell line.  
Peptides 10, 441-446.

**Robberecht, P., Cauvin, A., Gourlet, P. and Christophe, J. (1990).** Heterogeneity of VIP receptors.  
Arch. Int. Pharm. Ther. 303, 51-66.

**Roberts, A.I., Panja, A., Brodin, R.E. and Ebert, E.C. (1991).** Human intraepithelial lymphocytes. Immunomodulation and receptor binding of vasoactive intestinal peptide. *Dig. Dis. Sci.* 36, 341-346.

**Robichon, A., Sreedharan, S.P., Yang, J., Shames, R.S., Gronroos, E.C., Cheng, P.P.J. and Goetzl, E.J. (1993).** Induction of aggregation of Raji human B-lymphoblastic cells by vasoactive intestinal peptide. *Immunology* 79, 574-579.

**Rodriguez-Pena, M.S., Guijarro, L.G. and Prieto, J.C. (1991).** Adenylyl cyclase stimulation by VIP in rat seminal vesicle membranes. *Peptides* 12, 821-824.

**Rola-Pleszczynski, M., Bolduc, D. and St-Pierre, S.(1985).** The effects of vasoactive intestinal peptide on human natural killer cells function. *J. Immunol.* 135, 2569-2573.

**Rosa, R.M., Silva, P., Stoff, J.S. and Epstein, F.H. (1985).** Effect of vasoactive intestinal peptide on isolated perfused rat kidney. *Am. J. Physiol.* 249, E494.

**Rosenfeld, R., Thorsson, A.V. and Hintz, R.L. (1979).** Increased somatomedin receptors sites in newborn circulating mononuclear cells. *J. Clin. Endocr. Metab.* 48, 456-461.

**Rosenstreich, D.L. (1981).** The macrophage. *Cellular functions in immunity and inflammation.* Edwards Arnolds (Ed.), pp. 127-159.

**Rosselin, G., Maletti, M., Besson, J. Rostene, W. (1982).** A new neuroregulator: the vasoactive intestinal peptide or VIP. *Mol. Cell. Endocrinol.* 27, 243-262.

**Rosselin, G., Anteonis, A., Astesano, A., Boissard, C., Gali, P., Hejblum, G and Marie, J.C. (1988).** Regulation of the vasoactive intestine peptide receptor. *Ann. NY. Acad. Sci.* 527, 220-237.

**Roupas, P. and Herington, A.C. (1989).** Cellular mechanisms in the processing of growth hormone and its receptor. *Mol. Cell. Endocrinol.* 61, 1-14.

**Rouyer-Fessard, A., Augeron, C., Grasset, E., Maoret, J.J., Laboisse, C.L. and Laburthe, M. (1989).** VIP receptors and control of short circuit current in the human intestinal clonal cell line Cl. 19A. *Experientia* 45 (1989), 1102-1105.

**Ruff, M.R., Martin, B.M., Ginns, E.I., Farrar, W.L. and Pert, C.B. (1987).** CD4 receptor binding peptides that block HIV infectivity cause human monocyte chemotaxis. *BEBS Lett.* 211, 17-22.

**Ryan, J. and Cohen G. (1977).** Effect of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) on basal and cholecystokinin-induced gallbladder pressure. *Gastroenterology* 73, 870-874.

**Sacerdote, P., Ruff, M.R. and Pert, C.B. (1987).** Vasoactive intestinal peptide 1-12: a ligand for the CD4 (T4) human immunodeficiency virus receptor.

J. Neurosci. Res. 18, 102-107.

**Sacerdote, P., Wiedermann, C.J., Wahl, L.M., Pert, C.B. and Ruff, M.R. (1991).** Visualization of cholecystokinin receptors on a subset of human monocytes and in rat spleen.

Peptides 12, 167-176.

**Sadaye, H., Harmon, J.W., Moody, T.W. and Korman L.Y. (1988).** Autoradiographic distribution of vasoactive intestinal polypeptide receptors in rabbit and rat small intestine.

Peptides 9, 23-30.

**Said, S. and Mutt, V. (1969).** Long acting vasodilatation peptide from lung.

Nature 224, 699-700.

**Said, S.I. and Mutt, V. (1970).** Polypeptide with broad biological activity: Isolation from small intestine.

Science 169, 1217-1218.

**Said, S.I. and Mutt, V. (1972).** Isolation from porcine intestinal wall of a vasoactive octacosapeptide related to secretin and to glucagon.

Eur. J. Biochem. 28, 199-204.

**Said, S.I., Boster, L.P., Spath, J.A. and Kontos, H.A. (1972).** Positive inotropic action of newly isolated vasoactive intestinal polypeptide (VIP).

Clin. Res. 20, 39-.

**Said, S.I. and Makhoul, G.M. (1974).** Vasoactive intestinal polypeptide: spectrum of biological activity.

Endocrinology of the gut, (Eds. Chey, W.Y., Brooks, F.P., Thorofare, N.J., C.B.), pp. 88-102.

**Said, S.I. and Rosenberg, R.M. (1976).** Vasoactive intestinal polypeptide abundant immunoreactivity in neural cells lines and normal neurons tissue.

Science 192, 907-908.

**Said, S.I. and Mutt, V. (1977).** Relationship of spasmogenic and smooth muscle relaxant peptide from normal lung to other vasoactive compounds.

Nature 265, 84-85.

**Said, S. I. and Porter, J.C. (1979).** Vasoactive intestinal polypeptide release into hypophysial portal blood.

Life Sciences 24, 227-230.

**Said, S.I. (1982).** Vasoactive peptides in the lung, with special reference to vasoactive intestinal peptide.

Experimental Lung Research 3, 343-348.

**Said, S.I. (1986).** Vasoactive intestinal peptide.

J. Endocrinol. Invest. 9, 191-200.

**Saito, K., Yamatani, K., Manaka, H., Takahashi, K., Tominaga, M. and Sasaki, H. (1992).** Role of Ca<sup>2+</sup> on vasoactive intestinal peptide-induced glucose and adenosine 3'-5'-monophosphate production on the isolated perfused rat liver.

Endocrinology. 130, 2267-2273.

- Sakakibara, H., Shima, K. and Said, S.I. (1994).** Characterization of vasoactive intestinal peptide receptors on rat alveolar macrophages.  
*Am. J. Physiol.* 267, L259-L262.
- Samson, W.K., Said, S.I. and McCann, S.M. (1979).** Radioimmunity localization of vasoactive intestinal polypeptide in hypothalamic and extrahypothalamic sites in the rat brain.  
*Neurosci.* 12, 265-269.
- Samson, W.K., Burton, K.P., Reeves, J.P. and McCann, S.M. (1981).** Vasoactive intestinal peptide stimulates luteinizing hormone-releasing hormone release from median eminence synaptosomes.  
*Regul. Pept.* 2, 253-261.
- Sánchez, V., Goberna, R. and Calvo, J.R. (1991).** Glycogenolytic effect of vasoactive intestinal peptide in the rat in vivo.  
*Experientia* 47, 625-626.
- Sarlis, N.J., Stephanou, A., Knight, R.A., Lightman, S.L. and Chowdrey, H.S. (1993).** Effects of glucocorticoids and chronic inflammatory stress upon anterior pituitary interleukin-6 mRNA expression in the rat.  
*Br. J. Rheumatol.* 32, 653-657.
- Scatchard, G. (1945).** The attractions of proteins for small molecules and ions.  
*Ann. N.Y. Acad. Sci.* 51, 660-672.
- Schobitz, B., Van Den Dobbelsteen, M., Holsboer, F., Sutanto, W. and De Kloet, E.R. (1993).** Regulation of interleukin-6 gene expression in rat.  
*Endocrinology* 132, 1569-1576.
- Scholar, E.M. and Paul, S. (1991).** Stimulation of tumor cell growth by vasoactive intestinal peptide.  
*Cancer* 67, 1561-1564.
- Schorr, B.A., Said, S.I. and Makhlof, G.M. (1974).** Inhibition of gastric secretion by synthetic vasointestinal peptide (VIP).  
*Clin. Res.* 22, 23.
- Schultz, R.M., Pavlidis, M., Stylos, W.A. and Chirigos, M.A. (1978).** Regulation of macrophage tumoricidal function: a role for prostaglandin E.  
*Science* 202, 320-321.
- Segura, J.J., Guerrero, J.M., Goberna, R. and Calvo, J.R. (1991).** Characterization of functional receptors for vasoactive intestinal peptide (VIP) in rat peritoneal macrophages.  
*Regul. Pept.* 37, 195-203.
- Segura, J.J., Guerrero, J.M., Goberna, R. and Calvo, J.R. (1992a).** Stimulatory effect of vasoactive intestinal peptide (VIP) on cyclic AMP production in rat peritoneal macrophages.  
*Regul. Pept.* 37, 195-203.
- Segura, J.J., Guerrero, J.M., Goberna, R. and Calvo, J.R. (1992b).** Guanine nucleotide regulation of VIP binding to rat peritoneal macrophage membranes.  
*Peptides* 13, 953-955.

**Segura, J.J., Guerrero, J.M., Lopez-Gonzalez, M.A. and Calvo, J.R. (1993).** Vasoactive intestinal peptide (VIP) inhibits substrate adhesion capacity of rat peritoneal macrophages by a mechanism that involves cAMP.  
*Cell. Adhes. Commun.* 1, 213-221.

**Seljelid, R. and Eskeland, T. (1993).** The biology of macrophages: I general principles and properties.  
*Eur. J. Haematol.* 51, 267-275

**Shaffer, M.M., Carney, D.N., Korman, L.Y., Lebovic, G.S. and Moody, T.W. (1987).** High affinity binding of VIP to human lung cancer cell lines.  
*Peptides* 8, 1101-1106.

**Sharma, S.K., Verma, U., Pande, J.N., Murugesan, K. and Guleria, J.S. (1988).** Glucocorticoid receptors in bronchoalveolar lavage fluid in sarcoidosis. A preliminary report.  
*Chest* 93, 577-579.

**Sharp, P.J., Sterling, R.L., Talbot, R.T. and Huskisson, N.S. (1989).** The role of hypothalamic vasoactive intestinal polypeptide in the maintenance of prolactin secretion in incubating bantam hens: observations using passive immunohistochemistry.  
*J. Endocrinol.* 122, 5-13.

**Shebalin, M., Said, S.I. and Makhlouf, G.M. (1977).** Stimulation of insulin and glucagon secretion by vasoactive intestinal peptide.  
*Am. J. Physiol.* 232, E197-E200.

**Shimura, S., Sasaki, T., Ikeda, K., Sasaki, H. and Takishima, T. (1988).** VIP augments cholinergic-induced glycoconjugate secretion in tracheal submucosal glands.  
*J. Appl. Physiol.* 65 (6), 2537-2544.

**Shivers, B.D., Göröcs, T.J., Gottschall, P.E. and Arimura, A. (1991).** Two high affinity binding sites for pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide have different tissue distribution.  
*Endocrinology* 128, 3055-3065.

**Shreeve, S.M., De Luca, A.W., Diehl, N.L. and Kerdome, J.C. (1992).** Molecular properties of the vasoactive intestinal peptide receptor in aorta and other tissues.  
*Peptides* 13, 919-926.

**Simonneau, V., Ouichou, A. and Pèvet, P. (1990).** Vasoactive intestinal peptide stimulates melatonin release from perfused pineal glands of rats.  
*J. Neural. Transm. (GenSect).* 79, 69-79.

**Sirianni, M.C., Annibale, B., Tagliaferri, F., Fais, S., De Luca, S., Pallone, F., Delle Fave and Aiuti, F. (1992).** Modulation of human natural killer activity by vasoactive intestinal peptide (VIP) family. VIP, glucagon and GHRF specifically inhibit NK activity.  
*Regul. Pept.* 38, 79-87.

**Smet, P.J., Edyvane, K.A., Jonavicius, J. and Marshall, V.R. (1994).** Colocalization of nitric oxide synthase with vasoactive intestinal peptide, neuropeptide Y, and tyrosine hydroxylase in nerves supplying the human ureter.  
*J. Urol.* 152, 1292-1296.

- Smith, K.A., Crabtree, G.R., Kennedy, S.J. and Munck, A.U. (1977).** Glucocorticoid receptors and glucocorticoid sensitivity of mitogen stimulated and unstimulated human lymphocytes.  
*Nature* 267, 523-525.
- Smith, E.M. and Blalock, J.E. (1981).** Human lymphocyte production of corticotropin and endorphin-like substances: association with leukocyte interferon.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78, 7530-7534.
- Smith, E.M., Galin, F.S., LeBoeuf, R.D., Coppenhaver, D.H., Harbour, D.V. and Blalock, J.E. (1990).** Nucleotide and amino acid sequence of lymphocyte-derived corticotropin: Endotoxin induction of a truncated peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87, 1057-1060.
- Smith, E.M., Phan, M., Coppenhaver, D., Kruger, T.E. and Blalock, J.E. (1993).** Human lymphocyte production of immunoreactive thyrotropin.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 80, 6010-6013.
- Smitherman, T.C., Sakio, H., Geumei, A.M., Yoshida, T., Oyamada, M. and Said, S.I. (1982).** Coronary vasodilator action of VIP.  
Vasoactive intestinal peptide. Ed. Said, S.I., New York, Raven Press, pp. 169-176.
- Spangelo, B.L., Judd, A.M., MacLeod, R.M., Goodman, D.W. and Isakson, P.C. (1990).** Endotoxin-induced release of interleukin-6 from rat medial basal hypothalamus.  
*Endocrinology* 127, 1779-1785.
- Spangelo, B.L., MacLeod, R.M. and Isakson, P.C. (1991).** Production of interleukin-6 by anterior pituitary cells in vitro.  
*Endocrinology* 126, 582-586.
- Spangelo, B.L., Judd, A.M., Isakson, P.C. and MacLeod, R.M. (1991b).** Interleukin-1 stimulates interleukin-6 release from rat anterior pituitary cells in vitro.  
*Endocrinology* 128, 2685-2692.
- Spiegel, A.M. (1989).** Receptor-effector coupling by G-proteins.  
*TEM.* nov/dec, 72-76.
- Sreedharan, S.P., Patel, D.R., Xia, M., Ichikawa, S. and Goetzl, E.J. (1994).** Human vasoactive intestinal peptide receptors expressed by stable transfectants couple to two distinct signaling pathways.  
*Biochemical and biophysical research communications* 203, 141-148.
- Stallwood, D., Brugger, C.H., Baggenstoss, B.A., Stemmer, P.M., Shiraga, H., Landers, D.F. and Paul, S. (1992).** Identity of a membrane-bound vasoactive intestinal peptide-binding protein with calmodulin.  
*J. Biol. Chem.* 267, 19617-19621.
- Stanisz, A.M., Befus, B. and Bienenstock, J. (1986).** Differential effects of vasoactive intestinal peptide, substance P and somatostatin on immunoglobulin synthesis and proliferation by lymphocytes from Peyer's patches, mesenteric lymph nodes and spleen.  
*J. Immunol.* 136, 152-156.
- Staun-Olsen, P., Ottesen, B., Bartels, P.D., Nielsen, M.H., Gammeltoft, S. and Fahrenkrug, J. (1982).** Receptors for vasoactive intestinal polypeptide on isolated synaptosomes from rat cerebral cortex. Heterogeneity of binding and desensitization of receptors.  
*J. Neurochem.* 39, 1242-1251.

- Stephanou, A., Jessop, D.S., Knight, R.A. and Lightman, S.L. (1990).** Corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity and mRNA in human leukocytes. *Brain. Behav. Immun.* 4, 67-73.
- Stjernquist, M., Hakanson, R., Leander, S., Owman, C., Sundler, F and Uddman R. (1983).** Immunohistochemical localization of substance P, vasoactive intestinal polypeptide and gastrin-releasing peptide in the vas deferens and seminal vesicle, and the effect of these and eight other neuropeptides on resting tension and neurally evoked contractile activity. *Regul. Pept.* 7, 67-86.
- Strader, C.D., Fong, T.M., Tota, M.R. and Underwood, D. (1994).** Structure and function of G protein-coupled receptors. *Annu. Rev. Biochem.* 63, 101-132.
- Sun, L. and Ganea, D. (1993).** Vasoactive intestinal peptide inhibits IL-2 and IL-4 production through different molecular mechanism in T cells activated via the TCR/CD3 complex. *J. Neuroimmunol.* 48, 59-69.
- Sundler, F., Alumets, J., Hakanson, R., Ingemansson, S., Fahrenkrug, J. and Schaffalitzky de Muckadek, O.B. (1977).** VIP innervation of the gallbladder. *Gastroenterol.* 72, 1375-1377.
- Sundler, F., Alumets, J., Fahrenkrug, J., Hakanson, R. and Schaffalitzky de Muckadek, O.B. (1979).** Cellular localization and ontogeny of immunoreactive VIP in the chicken gut. *Cell. Tissue Res.* 196, 193-201.
- Svenson, M., Poulsen, L.K., Fomsgaard, A., et al. (1989).** IgG autoantibodies against interleukin 1 $\alpha$  in sera of normal individual. *Scand. J. Immunol.* 29, 489-492.
- Tang, W.L. and Gilman, A.G. (1992).** Adenylyl cyclases. *Cell.* 70, 869-872.
- Tatemoto, K. and Mutt, V. (1981).** Isolation and characterization of the intestinal peptide porcine PHI (PHI-27), a new member of the glucagon-secretin family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 6603-6607.
- Tatsuno, I., Gottschall, P.E. and Arimura, A. (1991).** Inhibition of mitogen-stimulated proliferation of murine splenocytes by a novel neuropeptide, pituitary adenylyl cyclase activating polypeptide: a comparative study with vasoactive intestinal peptide. *Endocrinology* 128, 728-734.
- Territo, M.C. and Cline, M.J. (1975).** Mononuclear phagocyte proliferation, maturation and function. *Clin. Haematol.* 4, 685.
- Tornwall, J., Uusitalo, H., Hukkanen, M., Sorsa, T. and Konttinen, Y.T. (1994).** Distribution of vasoactive intestinal peptide (VIP) and its binding sites in labial salivary glands in Sjogren's syndrome and in normal controls. *Clin. Exp. Rheumatol.*, 12, 287-292.
- Treves, A.J., Schechter, B., Cohen, I.R. and Feldman, M. (1976).** Sensitization of T lymphocytes in vitro by syngeneic macrophages fed with tumor antigens. *J. Immunol.* 116, 1059-1061.

**Tseng, J. and O'Dorisio, M.S. (1989).** Mechanism of vasoactive intestinal peptide (VIP)-mediated immunoregulation.

In: Neuroimmune networks: Physiology and Diseases. Alan R.L. (ed), New York, pp. 105-111.

**Tsukada, T., Horovitch, S.J., Moutminy, M.R., Mandel, G. and Goodman, R.H. (1985).** Structure of the vasoactive intestinal polypeptide gene.

DNA 4, 293-300.

**Tsukada, T., Fink, J.S., Mandel, G. and Goodman, R.H. (1987).** Identification of a region in the human vasoactive intestinal polypeptide gene responsible for regulation by cyclic AMP.

J. Biol. Chem. 262, 8743-8747.

**Tsunawaki, S. and Nathan, C.F. (1984).** Enzymatic basis of macrophage activation.

J. Biol. Chem. 259, 4305-4312.

**Tsuto, T., Okamura, H., Fukui, K., Obata, H.L., Terubayashi, H., Iwai, N., Majima, S., Yanaihara, N. and Ibata, Y. (1982).** An immunohistochemical investigation of vasoactive intestinal polypeptide in the colon of patients with Hirschsprung's disease.

Neuroscience Letters 34, 57-62.

**Uddman, R., Alumets, J., Edvinsson, I., Hakanson, R. and Sundler, F. (1978a).** Occurrence and distribution of VIP nerves in the nasal mucosa and tracheobronchial wall.

Acta Otolaryngol. 86, 445-448.

**Uddman, R., Alumets, J., Edvinsson, L., Hakanson, R. and Sundler, F. (1978b).** Peptidergic (VIP) innervation of the esophagus.

Gastroenterol. 75, 5-8.

**Uddman, R., Alumets, J., Hakanson, R., Loren, I. and Sundler, F. (1980a).** Vasoactive intestinal peptide (VIP) occurs in nerves of the pineal gland.

Experientia 36, 1119-1120.

**Uddman, R., Fahrenkrug, J., Malm, M., Alumets, J., Hakanson, R. and Sundler, F. (1980b).** Neuronal VIP in salivary glands: distribution and release.

Acta Physiol. Scand. 110, 31-38.

**Usdin, T.B., Bonner, T.I. and Mezey, E. (1994).** Two receptors for vasoactive intestinal polypeptide with similar specificity and complementary distributions.

Endocrinology 135, 2662-2680.

**Vaalasti, A., Linnoila, I. and Hervonen, A. (1980).** Immunohistochemical demonstration of VIP, [Met<sup>5</sup>]- and [Leu<sup>5</sup>]-enkephalin immunoreactive nerve fibers in the human prostate and seminal vesicles.

Histochemistry 66, 89-98.

**Van Damme, J., Opdenakker, G., Simpson, R.J., et al. (1987).** Identification of the human 26 kDa protein, interferon  $\beta^2$  (IFN $\beta_2$ ) as a B cell hybridoma/plasmocytoma growth factor induced by interleukin 1 and tumor necrosis factor.

J. Exp. Med. 165, 914-919.

**Vand Der poll, T., Romijn, J. A., Endert, E. and Sauerwein, H.P. (1993).** Effects of tumor necrosis factor on the hypothalamic-pituitary-testicular axis in healthy men.

Metabolism 42, 303-307.

**Van Furth, R. and Cohn, Z. A. (1968).** The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *J. Exp. Med.* 128, 415.

**Vankelecom, H., Carmeliet, P., Van Damme, J., Billiau, A. and Denef, C. (1989).** Production of interleukin-6 by folliculo-stellate cells of the anterior pituitary gland in a histiotypic cell aggregate culture system. *Neuroendocrinology* 49, 102-106.

**Van Noordem, S., polak, J.M., Bloom, S.R. and Bryant, M.G. (1979).** Vasoactive intestinal polypeptide in the pituitary pars nervosa. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 5, 149-153.

**Varma, S., Sabharwal, P., Sheridan, J.F. and Malarkey, W.B. (1993).** Growth hormone secretion by human peripheral blood mononuclear cells detected by an enzyme-linked immunoplaque assay. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 76, 4953.

**Vassalli, P. (1992).** The pathophysiology of tumor necrosis factor. *Annu. Rev. Immunol.* 10, 411-453.

**Verner, J.V. and Morrison, A.B. (1958).** Islet cell tumor and a syndrome of refractory watery diarrhea and hypokalemia. *Am. J. Med.* 25, 374.

**Vertongen, P., Schiffman, S.N., Gourlet, P. and Robberecht, P (1997).** Autoradiographic visualisation of the receptor subclasses for vasoactive intestinal polypeptide (VIP) in rat brain. *Peptides* 18, 1547-1554.

**Vidal, H., Comte, B., Beylot, M. and Riou, P.J. (1988).** Inhibition of glucose oxidation by vasoactive intestinal peptide in isolated rat enterocytes. *J. Biol. Chem.* 263, 9206-9211.

**Vogel, S.E., Weedon, L.L., oppenheim, J.J. and Rosenstreich, D.L. (1981).** Defective Fc-mediated phagocytosis in C34/HeJ macrophages. Correction By cAMP agonists. *J. Immunol.* 126, 441-445

**Waelbroeck, M., Robberecht, P., Coy, D.H., Camus, J., De Neef, P. and Christophe, J. (1985).** Interaction of growth hormone-releasing factor (GRF) and 14 GRF analogs with vasoactive intestinal peptide (VIP) receptors of rat pancreas. Discovery of (N-Ac-Tyr<sup>1</sup>, D-Phe<sup>2</sup>)-GRF (1-29)-NH<sub>2</sub> as a VIP antagonist. *Endocrinology* 116, 2643-2649.

**Wallengren, J., Ekman, R. and Sundler, F. (1987).** Occurrence and distribution of neuropeptides in human skin. An immunocytochemical and immunochemical study on normal skin and blister fluid from inflamed skin. *Acta Derm. Venereol. (Stockholm)* 67, 185-192.

**Wanke, I.E. and Rorstad, O.P. (1990).** Receptors for vasoactive intestinal peptide in rat anterior pituitary glands: localization of binding to lactotropes. *Endocrinology* 126, 1981-1988.

**Warwick-Davies, J., Lowrie, D.B. and Cole, P.J. (1995).** Growth hormone is a human macrophage activating factor. Priming of human monocytes for enhanced release of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *J. Immunol.* 154, 1909.

**Waschek, J.A. and Eiden, L.E. (1988).** Calcium requirements for barium stimulation of enkephalin and vasoactive intestinal biosynthesis in adrenomedullary chromaffin cells. *Neuropeptides* 11, 39-45.

**Waschek, J.A., Lelievre, V., Bravo, D.T., Nguyen, T. and Muller, J.M. (1997).** Retinoic acid regulation of the VIP and PACAP autocrine ligand and receptor system in human neuroblastoma cell lines. *Peptides* 18(6), 835-841.

**Weigent, D.A. and Blalock, J.E. (1990).** Immunoreactive growth hormone releasing in rat leukocytes. *J. Neuroimmunol.* 29, 1-13.

**Weigent, D.A. and Blalock, J.E. (1995).** Associations between the neuroendocrine and immune system. *J. Leukoc. Biol.* 57, 137-150.

**Weihe, E., Hartschuh, W. and Reinecke, M. (1981).** Peptidergic (neurotensin, VIP) innervation of the skin. *Acta Anatómica* III, 461.

**Weihe, E., Hohn, D. and Michael, S. (1991).** Molecular anatomy of the neuroimmune connection. *Int. J. Neurosci.* 59, 1-23.

**Weinstock, J.V. and Boros, D.L. (1981).** Heterogeneity of the granulomatous response in the liver, colon, ileum and ileal Peyer's patches to Schistosoma eggs in murine schistosomiasis mansoni. *J. Immunol.* 127, 1906-1909.

**Weinstock, J.V. and Blum, A. (1989).** Tachykinin production by granuloma eosinophils in murine schistosomiasis mansoni. *J. Immunol.* 142, 3256-3261.

**Weinstock, J.V., Blum, A. and Malloy, T. (1990).** Macrophages within the granulomas of murine schistosomiasis mansoni are a source of somatostatin 1-14 like molecule. *Cell. Immunol.* 131.

**Weinstock, J.V. and Blum, A.M. (1990).** Detection of vasoactive intestinal peptide and localization of its mRNA within granulomas of murine schistosomiasis. *Cell. Immunol.* 125, 291-300.

**Weinstock, J.V. (1991).** Production of neuropeptides by inflammatory cells within the granulomas of murine Schistosomiasis mansoni. *Eur. J. Clin. Invest.* 131, 381-390.

**Weissman, G., Dukor, P. and Zurier, R.B. (1971).** Effect of cyclic AMP on release of lysosomal enzymes from phagocytes. *Nature New Biol.* 231, 131-135.

**Werb, Z., Foley, R. and Munck, A. (1978).** Interaction of glucocorticoids with macrophages. Identification of glucocorticoid receptors in monocytes and macrophages. *J. Exp. Med.* 147, 1684-1694.

**Werhil, B.K., Turck, C.W., Sreedharan, S.P., Yang, J., An, S., Galli, S.J and Goetzl, E.J. (1993).** Variants of vasoactive intestinal peptide in mouse mast cells and rat basophilic leukemia cells.

Cell. Immunol. 151, 369-378.

**Westendorf, J.M., Philips, M.A. and Schonbrunn, A. (1983).** Vasoactive intestinal peptide stimulates hormone release from corticotropic cells in culture.

Endocrinology 112, 550-554.

**Whaley, K. (1980).** Biosynthesis of complement components and the regulatory proteins of the alternative complement pathway by human peripheral blood monocytes.

J. Exp. Med. 151, 501-516.

**Wharton, J., Polak, J.M., Bryant, M.G., Van Noorden, S., Bloom, S.R. and Pearse, A. G.E.(1979).** Vasoactive intestinal polypeptide (VIP)-like immunoreactivity in salivary glands.

Life Sci. 25, 273-280.

**Wiedemann, C.J., Goldman, M.E. and Plutchkok, J.J. (1986).** Bombesin in human and guinea pig alveolar macrophages.

J. Immunol. 137, 3928-3932.

**Wiik, P. Opstad, P.K. and Boyum, A. (1985).** Binding of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) by human blood monocytes: demonstration of specific binding sites.

Regul. Pept. 12, 145-153.

**Wiik, P. (1988a).** Homologous regulation of adenylate-cyclase coupled receptors for VIP on human mononuclear leukocytes.

Regul. Pept. 20, 323-333.

**Wiik, P., Opstad, P.K., Knardahl, S. and Boyum, A. (1988b).** Receptors for vasoactive intestinal peptide (VIP) on human mononuclear leukocytes are upregulated during prolonged strain and energy deficiency.

Peptides 9, 181-186.

**Wiik, P. (1989a).** Vasoactive intestinal peptide inhibits the respiratory burst in human monocytes by a cyclic AMP-mediated mechanism.

Regul. Pept. 25, 187-197.

**Wiik, P., Haugen, A.H., Lovhaug, D., Boyum, A. and Opstad, P.K. (1989b).** Effect of VIP on the respiratory burst in human monocytes ex vivo during prolonged strain and energy deficiency.

Peptides 10, 819-823.

**Wiik, P. (1991).** Glucocorticoids upregulated the high affinity receptors for vasoactive intestinal peptide (VIP) on human mononuclear leukocytes in vitro.

Regul. Pept. 35, 19-30.

**William, L.T. and Lefkowitz, R.J. (1977).**

J. Biol. Chem. 252, 7207-7213.

**Willis, E., Ottesen, B., Wagner, G., Sundler, F. and Fahrenkrug, J. (1981).** Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) as a putative neurotransmitter in a penile erection.

Life Sci. 33, 383-391.

**Wintrobe, M.M. (1974).** Clinical hematology, 7 th Edn. In: Lea and Febiger (ed). Philadelphia, 221-285.

**Wood, C.L. and Blum, J.J. (1982).** Effecto of vasoactive intestinal polypeptide on glycogen metabolism in rat hepatocytes.  
Am. J. Physiol. 242, E262-E272.

**Wood, C.L., O'Dorisio, M.S., Vassalo, L.M., Malarkey, W.B. and O'Dorisio, T.M. (1985).** Vasoactive intestinal peptide effects on GH<sub>3</sub> pituitary tumor cells: high affinity binding, affinity labeling, and adenylate cyclase stimulation.  
Regul. Pept. 12, 237-248.

**Xin, Z., Tang, H. and Ganea, D. (1994).** VIP inhibits IL-2 and IL-4 production in murine thymocytes activated via the TCR/CD3 complex. J. Neuroimmunol. 54, 59-68.

**Xu, X.J. and Wiesenfeld-Hallin, Z. (1991).** An analogue of growth hormone releasing factor (GRF), (Ac-Tyr<sup>1</sup>,D-Phe<sup>2</sup>)-GRF-(1-29), specifically antagonizes the facilitation of the flexor reflex induced by intrathecal vasoactive intestinal peptide in rat spinal cord.  
Neuropeptides 18, 129.

**Yiangou, Y., Serrano, R., Bloom, S.R., Peña, J. and Festenstein, H. (1990).** Effects of pre-pro-vasoactive intestinal peptide-derived peptides on the murine immune response.  
J. Neuroimmunol. 29, 65-72.

**Zentel, H.J. and Weihe, E. (1991).** The neuro-B cell link of peptidergic innervation in the Bursa Fabricii.  
Brain Behav. Immuno., 5, 132-147.

**Zorn, N.E. and Russell, D.H. (1990).** Vasoactive intestinal peptide (VIP) activation of nuclear protein kinase C in purified nuclei of rat splenocytes.  
Bioch. Pharmacol. 40, 2689-2694.

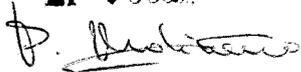
# UNIVERSIDAD DE SEVILLA

El Doctorado en Medicina ha otorgado el título de Doctor en Medicina por los abajo firmantes  
en la fecha que se indica para juzgar a tesis Doctoral de  
D. MANUEL MONTILLA DE LA TORRE  
titulado CARACTERIZACIÓN Y FARMACOCINÉTICA DEL SISTEMA RECEPTOR-EFECTOR PARA EL PEPTIDO INTESTINAL VASOACTIVO (VIP) EN MACROFAGOS PERITONEALES DE RATON  
acordó otorgar la calificación de Sobresaliente "cum laude"  
por una unidad de

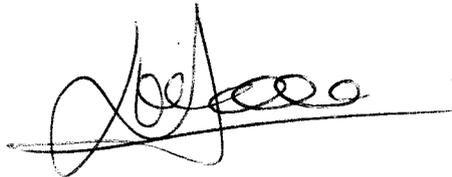
Sevilla, 28 de MAYO

2008

El Vocal,



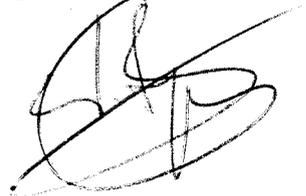
El Presidente



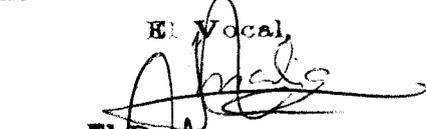
El Vocal,



El Secretario,



El Vocal,



El Doctorado,

