

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE FARMACIA

" SOLUBILIZACION DE RECEPTORES PARA EL PEPTIDO
INTESTINAL VASOACTIVO (VIP) EN MEMBRANAS
PLASMATICAS DE HIGADO DE RATA "

por

Ma del Rosario Garrido Márquez

Tesis presentada para optar
al grado de Licenciado.
Sevilla, Octubre de 1981.

" SOLUBILIZACION DE RECEPTORES PARA EL PEPTIDO
INTESTINAL VASOACTIVO (VIP) EN MEMBRANAS PLASMATICAS
DE HIGADO DE RATA "

por

Ma DEL ROSARIO GARRIDO MARQUEZ

DIRECTOR

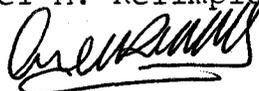
R. Goberna Ortiz



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

PONENTE

Angel M. Relimpio



Profesor Adjunto del
Departamento de Bioquímica
de la Facultad de Farmacia
de Sevilla.



Trabajo presentado para optar
al grado de Licenciada en
Farmacia.

Sevilla 5 de Octubre de 1981.



CATEDRA DE BIOQUIMICA
FACULTAD DE MEDICINA
SEVILLA-9

PROF. RAIMUNDO GOBERNA

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

CERTIFICA: que el trabajo titulado: "Solubilización de
receptores para el péptido intestinal vasoac-
tivo (VIP) en membranas plasmáticas de hígado
de rata", ha sido realizado en este Departamento
por M^a del Rosario Garrido Márquez bajo mi
dirección.

Sevilla, 5 de Octubre de 1981



R. Goberna

Prof. Dr. R. Goberna

Quiero expresar mi agradecimiento al Prof. Goberna, Director del Departamento de Bioquímica, por su apoyo y colaboración en todo momento. Al Dr. Guerrero, cuya ayuda y estímulo han hecho posible la culminación de este trabajo. Al resto de mis compañeros de la Cátedra.

A mis padres y hermanos

A Juan Antonio y Aurelio

INDICE

INTRODUCCION.....	2
1. Concepto de receptor.....	2
1.1. Concepto y propiedades del receptor.....	2
1.2. Modelos biológicos en el estudio de receptores para hormonas peptídicas.....	4
1.2.1. Organos intactos y preparaciones de tejidos.....	8
1.2.2. Células intactas aisladas.....	9
1.2.3. Fracciones subcelulares.....	11
1.2.4. Receptores solubilizados.....	11
2. Solubilización de receptores.....	13
2.1. Introducción.....	13
2.2. Métodos de solubilización.....	16
2.2.1. Detergentes.....	18
3. El péptido intestinal vasoactivo.....	26
3.1. Estructura química.....	26
3.2. Distribución.....	29
3.3. Acciones biológicas.....	32
3.4. Mecanismo de acción.....	37
3.5. Fisiopatología del VIP.....	44
3.6. VIP como neurotransmisor.....	46
4. Objetivos.....	49
MATERIAL Y METODOS.	
1. Aislamiento de membranas plasmáticas de hígado de rata.....	52
2. Criterio de purificación.....	55
3. Determinación de proteínas.....	59
4. Marcaje de VIP con ^{125}I	59
5. Aislamiento de VIP porcino.....	63

6.	Solubilización de receptores.....	66
6.1.	Solubilización.....	66
6.2.	Reducción de la concentración del detergente.....	67
7.	Separación del complejo ^{125}I -VIP-receptor.....	69
7.1.	Separación mediante polietilenglicol.....	69
7.2.	Separación mediante carbón.....	73
7.3.	Separación mediante filtración en gel.....	75
7.3.1.	En presencia de Lubrol PX a alta concentración.....	75
7.3.2.	En presencia de Lubrol PX a baja concentración.....	78
8.	Interacción del ^{125}I -VIP con la fracción solubilizada según ensayo de Hummel y Dreyer....	81
9.	Determinación del peso molecular del complejo ^{125}I -VIP-receptor.....	84

RESULTADOS

1.	Solubilización de membranas hepáticas.....	86
1.1.	Determinación de proteínas.....	86
2.	Interacción del ^{125}I -VIP-fracción solubilizada..	88
2.1.	Identificación del complejo ^{125}I -VIP- fracción solubilizada.....	88
2.2.	Interacción del ^{125}I -VIP-fracción solubili- zada según ensayo de Hummel y Dreyer.....	113
3.	Peso molecular del complejo ^{125}I -VIP-receptor..	118

DISCUSION.....	120
----------------	-----

CONCLUSIONES.....	130
-------------------	-----

RESUMEN..... 132

BIBLIOGRAFIA..... 135

ABREVIATURAS

5'AMP: 5' adenosín monofosfato

BSA: albúmina sérica bovina

AMPC: 3'5'adenosín monofosfato

Ci: curio

c.p.m.: cuentas por minuto

DEAE-celulosa: etilen diamino tetracetato-celulosa

D.O.: densidad óptica

DTE: dithioeritritol

EDTA: etilendiaminotetracetato sódico

GIP: péptido inhibidor gástrico

GMP: guanosín monofosfato

Gpp(NH): 5' guanililimido difosfato

GTP: guanosín trifosfato

Kd: constante de disociación

Km: constante de Michaelis

Ppdo: precipitado

P.m.: peso molecular

r.p.m.: revoluciones por minuto

Tampón A: Tris 35 mM, pH 7'5, Lubrol PX 0'5%, DTE 0'2 mM

Tampón B: Tris 35 mM, pH 7'5, DTE 0'2 mM, EDTA 1 mM

Tampón C: Tris 35 mM, pH 7.5, EDTA 1 mM, BSA 0'1 %,

¹²⁵I-VIP (50.000 c.p.m./ml).

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

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

TCA: ácido tricloroacético

Tris: trihidroximetilaminometano

VIP: péptido intestinal vasoactivo

^{125}I -VIP: VIP marcado con ^{125}I .

V_0 : volumen vacío.

V_t : volumen total.

INTRODUCCION

1. CONCEPTO DE RECEPTOR.

1.1 CONCEPTO Y PROPIEDADES DEL RECEPTOR.

Muchos efectos biológicos se inician en la superficie celular debido a la interacción entre una sustancia (hormona, neurotransmisor, etc.) y una región específica de la membrana plasmática. Esta interacción consiste en la unión de dicha sustancia a algún (os) componente de la membrana plasmática que usualmente se denomina " receptor ".

Actualmente, parece bien establecido que esta interacción sustancia - receptor, constituye el primer paso de su mecanismo de acción, y que esta acción se manifiesta como una amplia gama de efectos biológicos tales como: síntesis de proteínas, transformación y proliferación celular, alteración de la permeabilidad de la membrana, transmisión neurohumoral etc.

Está igualmente bien establecido que este es el mecanismo fundamental por el cual actúan gran número de hormonas peptídicas y no peptídicas, neurotransmisores etc. (Catt, 1977).

Varios datos vienen a confirmar esto:

1° La exposición de una hormona a la célula diana va seguida de una rápida respuesta biológica.

- 2° Las hormonas peptídicas cuando se acoplan a sustancias macromoleculares, retienen su actividad biológica, debido probablemente a que son incapaces de entrar en la célula.
- 3° La localización de receptores de hormonas peptídicas en la membrana plasmática se ha puesto mejor de manifiesto mediante la unión de hormonas marcadas, biológicamente activas, con preparaciones de tejidos, células intactas, o, incluso, fracciones solubilizadas. Así se han podido determinar las características cinéticas, estequiométricas, y de especificidad de la interacción hormona-receptor.

La definición de receptor es, todavía, un concepto operacional, ya que no se ha conseguido una caracterización completa de su estructura físico-química, aislado del resto de las estructuras de la membrana plasmática, así esta definición es puramente funcional y se basa en las características especiales de la unión que mantiene con su hormona correspondiente. Según Freychet (1976), estas características se pueden sistematizar en las siguientes reglas;

- 1° La hormona se une a su receptor correspondiente con un alto grado de afinidad y especificidad.
- 2° El número de receptores debe ser finito.
- 3° El receptor se encuentra localizado, o predomina, en la

membrana plasmática celular.

4° La unión de la hormona a su receptor es rápida y reversible.

5° La unión hormona-receptor debe estar relacionada directa o indirectamente con los efectos biológicos de la hormona.

Debemos resaltar que el término " receptor " es usado para designar sólo aquel, o aquellos componentes de la membrana celular que reconocen selectivamente a una hormona determinada en una reacción de unión específica, sin incluir en este término los hechos que ocurren posteriormente a dicho reconocimiento y que conducen mediante una serie de pasos concatenados a la respuesta celular específica de cada hormona (sistema efector). (Figura 1)

Tenemos por lo tanto, que la mayor y más importante propiedad de los receptores, es su especificidad para una hormona dada, y que esta propiedad fundamental se mantiene cuando el receptor es "liberado" de la membrana, esto es, cuando es solubilizado, aún cuando en estas condiciones no podamos verificar su efecto biológico.

1.2. MODELOS BIOLÓGICOS EN EL ESTUDIO DE RECEPTORES PARA HORMONAS PEPTÍDICAS.

Los primeros trabajos que sugerían que los receptores para hormonas peptídicas podían estar en la superficie

celular fueron realizados con anticuerpos anti-hormona (Pastan et al, 1966.) : en trabajos llevados a cabo con insulina se encontró que suero anti-insulina revertía la acción de la misma, sugiriendo que la hormona, aun en el momento de su acción, estaba expuesta al medio extracelular, o sea, en la membrana plasmática de la célula. Por otro lado, insulina acoplada a partículas insolubles de agarosa, se mostró biológicamente activa (Cuatrecasas, 1969.), dado que, bajo esta forma, la hormona no puede entrar en la célula intacta, se concluyó que su efecto biológico era generado por la interacción de la hormona con receptores de la superficie celular.

En trabajos realizados en 1969 con ^{125}I -ACTH y ^{125}I -Angiotensina (Lefkowitz et al, 1970; Lin y Goodfriend, 1970, respectivamente) se desarrollaron nuevos métodos de trabajo que fueron rápidamente aplicados a la insulina, glucagón y otras hormonas peptídicas (Roth, 1973 ; Cuatrecasas, 1974 ; Kahn, 1975 ; Freychet et al, 1974.)

El descubrimiento del cAMP como un " segundo mensajero " intracelular y la localización del sistema adenilatoclasa dependiente de la hormona en la membrana plasmática de la célula (Fig. 2), consolidaron el concepto de la existencia de receptores en la superficie celular.

Así, gracias al uso de hormonas marcadas radioactivamente y de diferentes modelos biológicos conteniendo receptores, la interacción hormona-receptor se ha convertido en una realidad bioquímica cuantificable.

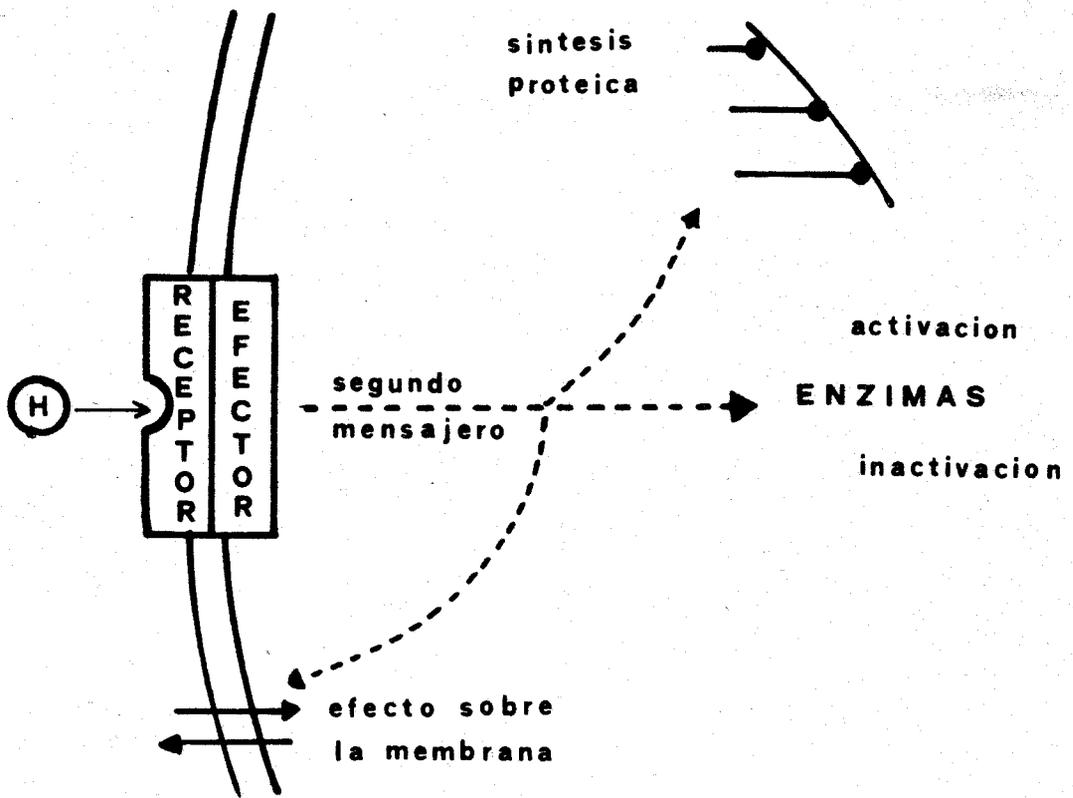


Fig. 1 Mecanismo general de acción de las hormonas peptídicas.

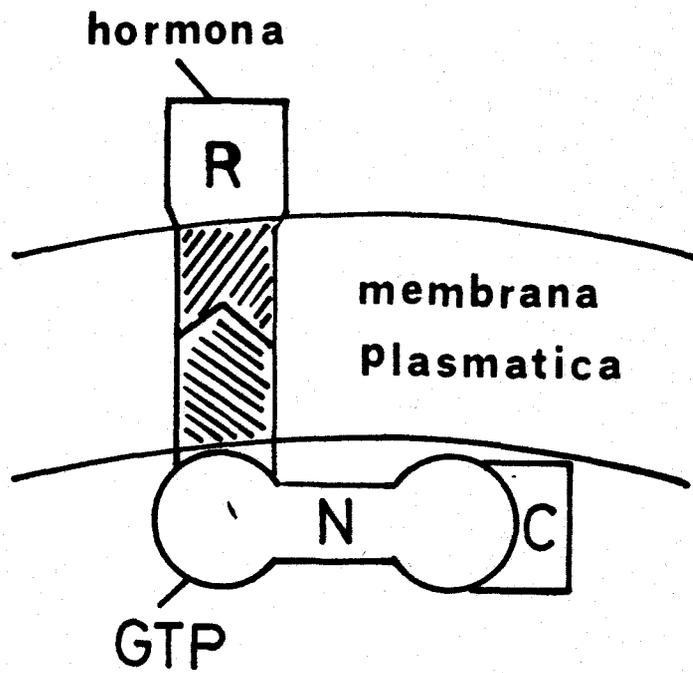


Fig. 2 Modelo del sistema receptor-efector propuesto por Rodbell (1980).

Los métodos básicos para el estudio de la interacción hormona-receptor requieren:

1. Un trazador u hormona marcada con un isótopo radioactivo, (^{14}C , ^{125}I , ^3H , etc.).
2. Una apropiada preparación de receptores.
3. Un medio apropiado de separación del complejo hormona-receptor, de la hormona libre.

El uso de hormonas marcadas radioactivamente debe llenar dos requisitos:

1. La hormona marcada radioactivamente debe retener la actividad biológica de la hormona nativa.
2. La radioactividad específica de la hormona marcada debe ser lo bastante alta para permitir el uso de bajas concentraciones de la misma, o sea, concentraciones cercanas a las fisiológicas.

Para el estudio de receptores podemos emplear:

1. Organos intactos y preparaciones de tejidos.
2. Células intactas aisladas.
3. Fracciones sub-celulares, (membranas plasmáticas).
4. Receptores solubilizados.

1.2.1. Organos intactos y preparaciones de tejidos.

Los estudios sobre la unión hormona-receptor en órganos intactos aislados y tejidos, presentan las ventajas teó-

ricas de estar en condiciones más " fisiológicas ", y presentar mínimas alteraciones celulares. En contrapartida encontramos que este tipo de preparaciones presentan barreras de difusión donde debemos tener en cuenta factores como la degradación hormonal y la naturaleza heterocelular de la muestra, ya que tanto en órganos, como en homogenados de tejidos, la población celular que contiene el receptor específico para una hormona dada, representa sólo un tanto por ciento de la población total, dando una alta proporción de unión inespecífica, y errores debidos a interacciones celulares, hechos estos que llevan a una mayor dificultad a la hora de sacar conclusiones específicas y establecer correlaciones entre las determinaciones bioquímicas y la actividad celular.

1.2.2. Células intactas aisladas.

En estudios sobre la unión hormona-receptor pueden utilizarse dos tipos de células; aquellas obtenidas de órganos con reconocida capacidad diana para una hormona dada, (hígado, tejido adiposo etc.), o células que no están claramente reconocidas como células diana, pero que son más accesibles y no requieren ser aisladas de un órgano compacto como, por ejemplo, células mononucleares sanguíneas.

Las células intactas aisladas poseen una ventaja poten-

cial sobre otras preparaciones: son metabólicamente activas y con ellas es posible medir tanto la unión hormonal como su efecto biológico; esto es de particular interés en el caso de hormonas cuyo segundo mensajero no sea conocido, como es el caso de la insulina.

Otra ventaja de este tipo de preparaciones consiste en la posibilidad de permitir una cuantificación directa de los parámetros de unión por célula, así como alteraciones de los receptores que conduzcan a una alteración de su efecto biológico.

Sin embargo, muchas veces es difícil establecer correlaciones directas entre la unión hormona receptor y su efecto biológico, varios factores concurren a ello:

- Los receptores específicos hormonales pueden estar presentes en células que, en determinado momento del desarrollo del órgano o de su función, no responde a la hormona.
- Las condiciones experimentales óptimas para la medición de la unión hormona-receptor, pueden diferir de aquellas necesarias para medir el efecto biológico.
- El número de receptores de la superficie celular: si este es pequeño, se necesitarán altas concentraciones de células para obtener una unión significativa.
- La dificultad en el aislamiento de poblaciones celulares puras.

1.2.3. Fracciones sub-celulares (membranas plasmáticas)

Recientemente, el uso de técnicas de ultracentrifugación y de marcadores específicos ha permitido la obtención de fracciones subcelulares a partir de un homogenado de tejido.

Presentan ciertas ventajas sobre las células intactas como son:

- La degradación hormonal y la adsorción inespecífica pueden ser controladas o minimizadas desde que, al estar esta fracción subcelular más purificada - en cuanto a receptores -, puede ser usada a concentraciones menores.
- La misma preparación puede ser utilizada varias veces si es preparada en cantidad suficiente.
- Pueden ser conservadas congeladas por largos períodos de tiempo, semanas e incluso meses (-50°C).

Estas preparaciones deben tener un alto grado de purificación, ya que aún en fracciones muy purificadas encontramos un 5% - 10% de contaminación de proteínas de diferentes fracciones, lo que lleva a errores debidos a la unión inespecífica.

1.2.4. Receptores solubilizados.

Los receptores pueden ser obtenidos, separados del resto

de la estructura celular mediante procesos que incluyen solubilización de los mismos con detergentes y posterior centrifugación, ultrafiltración y filtración de exclusión en gel.

Los receptores así obtenidos poseen muchas, ya que no todas, de las características de los receptores de células intactas o membranas plasmáticas.

Los receptores solubilizados ofrecen considerables ventajas a la hora de purificar y posteriormente caracterizar la molécula del receptor.

2. SOLUBILIZACION DE RECEPTORES.

2.1. INTRODUCCION.

Se puede abordar el estudio de receptores de dos formas diferentes:

- Una " directa ", consistente en la investigación de la unión de hormonas marcadas a sus receptores específicos en la membrana celular.
- Una " indirecta ", donde se pretende caracterizar el receptor mediante las correlaciones entre concentración hormonal y respuesta biológica.

El primer método, aparece como el método de elección para definir la especificidad de la acción hormonal y para el estudio de la interacción de hormonas de la misma familia y péptidos estructuralmente relacionados, con sus efectos .

De este modo, análisis cinéticos y estequiométricos de la reacción hacen posible estimar la aparente afinidad y la capacidad máxima de unión de la hormona a su correspondiente receptor, permitiendo útiles comparaciones con estudios fisiológicos.

En el segundo método citado, si la respuesta biológica a estudiar constituye el último paso de la cadena de efectos que tiene lugar a partir del receptor, la definición

de este último, será puramente operacional.

Por otro lado, si la respuesta biológica a considerar es un evento primario que implique directamente al "segundo mensajero", no podemos detectar por este método, aquellos receptores cuyo segundo mensajero no haya sido identificado.

Estos métodos de análisis han dado como resultado una gran información sobre las propiedades y características de la interacción entre diversas hormonas y sus correspondientes receptores : cinética, especificidad, saturabilidad, reversibilidad, receptores y constantes de afinidad, efectos de los nucleótidos, etc.

Sin embargo, aunque inestimables, los datos obtenidos son esencialmente descriptivos, y revelan muy poco sobre los mecanismos moleculares reales de esta interacción.

Una aproximación directa a este problema, es solubilizar y purificar el sistema receptor-efector y entonces analizarlo por los medios convencionales de estudio de interacciones de proteínas ligantes.

En este punto debe ser estipulado el qué debe ser solubilizado y qué debe ser analizado. Preferentemente,

habría que solubilizar el complejo receptor-efector íntegramente, y entonces, aislar y estudiar separadamente cada componente de este complejo. Este problema ha sido abordado usando una gran variedad de técnicas (Levey, 1973 ; Ryan y Storm, 1974), sin que hasta ahora hayan dado el resultado deseado.

Una alternativa a la solubilización de todo el complejo receptor-sistema efector de las membranas plasmáticas, es solubilizar y aislar separadamente cada macromolécula. Este método tiene la ventaja, inicialmente al menos, de no preocuparse sobre la integridad de ambos componentes durante el proceso de aislamiento.

En este sentido, en trabajos realizados sobre el glucagón, Pohl et al (1971), obtuvieron un 15% de solubilización de la adenil ciclasa de membranas plasmáticas, sin que hubiera respuesta al glucagón. Resultados similares fueron descritos por Swislocki et al, (1973) y por Blecher et al (1972), quienes encontraron adenil ciclasa insensible al glucagón en extractos solubilizados de membranas plasmáticas de hígado de rata obtenidas por el método de Neville. Del mismo modo, Giorgio et al, (1974) y Blecher et al (1972), describieron las propiedades del receptor para glucagón en membranas de hepatocitos.

En trabajos realizados con insulina (Cuatrecasas, 1972;

Roth, 1973; Kahn, 1975; Freychet, 1976; Jacobs et al , 1977), el tratamiento de membranas del tejido adiposo y de hígado de rata con detergentes no iónicos, condujo a una disolución de la membrana y a la desaparición en el residuo tras centrifugación, de la actividad de unión de insulina, actividad esta que es recuperada en el sobrenadante tras centrifugación a 300.000xg por un período de tiempo de 70 min a 4°C. Mediante filtración en gel de las proteínas solubilizadas, se comprobó que la insulina se une de modo específico y reversible a los constituyentes solubilizados de la membrana. Krupp y Livingston (1978), tratando células del tejido adiposo con detergentes no iónicos (Tritón X-100), encontró evidencia sobre la existencia de dos componentes diferentes de receptores para insulina existentes en el material solubilizado de membranas de adipocitos, con diferentes características de unión para la insulina.

Por lo expuesto anteriormente, podemos concluir que la solubilización de las proteínas de membranas, permite un estudio específico y detallado de sus características físico-químicas

2.2. METODOS DE SOLUBILIZACION.

Debemos entender que la palabra solubilización se refiere primariamente a la ausencia de sedimentación signifi-

cativa tras centrifugación a 300.000xg durante un período de 6 hr., y ausencia de retención de material en filtros con poros de 0.2 μ (Cuatrecasas, 1972)

Muchos y muy variados métodos y sustancias han sido utilizados para la obtención de proteínas de membranas, bien receptores, complejo adenil ciclasa u otros. Así, Neville (1968) demostró la solubilización de una proteína de membrana órgano específica (hígado), mediante soluciones alcalinas diluidas, y fraccionada por electroforesis en disco a pH 2.7 en urea. Para la solubilización y aislamiento de glicoproteínas de membranas como por ejemplo: receptores de lecitina, se emplean diversos agentes como el diiodosalicilato, piridina, guanidina, fenol, y más recientemente detergentes no iónicos del tipo del Tritón X-100. Otros agentes usados en solubilización de proteínas de membranas son: dodecilsulfato de sodio (SDS), dimetil sulfóxido, dimetil formamida, hexafluoroisopropanol y piridina, (Hollenberg y Cuatrecasas)

Recientemente se ha generalizado el uso de detergentes no iónicos en procesos de solubilización de proteínas de membrana y usando diversos métodos de fraccionamiento como son precipitación con polietilenglicol, electroforesis en gel de poliacrilamida, filtración en gel y cromatografía de afinidad.

Ross (1981) describe un método físico de separación de las subunidades catalítica y reguladora de la adenil

ciclasa hepática mediante solubilización en colato con elevada fuerza iónica y bajo estas condiciones, separadas por cromatografía en filtración en gel.

De los diversos métodos y sustancias empleados, el más interesante para este trabajo, es el de la utilización de detergentes no iónicos, que se expone a continuación.

2.2.1. DETERGENTES.

El uso de detergentes en bioquímica experimental, ha ido aumentando progresivamente, particularmente en el campo de la bioquímica de membranas donde la extracción de proteínas de su envoltorio lipídico es a menudo necesaria.

Las proteínas de membrana están caracterizadas por una zona hidrofóbica que interacciona directamente con la zona hidrofóbica de la bicapa lipídica (Tanford y Reynolds, 1976).

Detergentes no iónicos tales como Lubrol PX, la serie del Tritón, Brij, Tween y otros, son particularmente útiles para la solubilización y caracterización de estas proteínas, ya que no alteran apreciablemente las propiedades de las mismas y tienen selectividad de solubilización.

Durante la solubilización, el detergente no iónico reemplaza a la mayoría de las moléculas lipídicas en contac-

to con la zona hidrofóbica de las proteínas de membrana y conduce a la formación de micelas proteínas-detergente solubles. En contraste con las proteínas de membrana que poseen estructura anfifílica, proteínas solubles en agua o hidrofílicas presentan poca, o ninguna, interacción hidrofóbica con los detergentes no iónicos y no es de esperar que sus propiedades físico-químicas sean influenciadas por la presencia del detergente en la solución (Helenius y Simons, 1975). Diversas propiedades de estas micelas mixtas, tales como tamaño y capacidad hidrofóbica, van a depender de las propiedades de las proteínas solubilizadas, de la temperatura, así como de las propiedades del detergente presente en el complejo y la concentración del mismo.

Según Tanford y Reynolds (1976), el tamaño del resto apolar de los detergentes no iónicos es un parámetro crítico para su penetración y colocación dentro de la bicapa lipídica. Sin embargo, trabajos recientes (Guillon et al, 1978) hacen depender en gran medida el efecto solubilizante del detergente de la longitud de la cadena polar de oxietileno. La capacidad de solubilización va en aumento con el número de unidades de oxietileno hasta un valor de 10, y decrece rápidamente a partir de valores superiores a 12, llegando a casi desaparecer a valores por encima de 15.

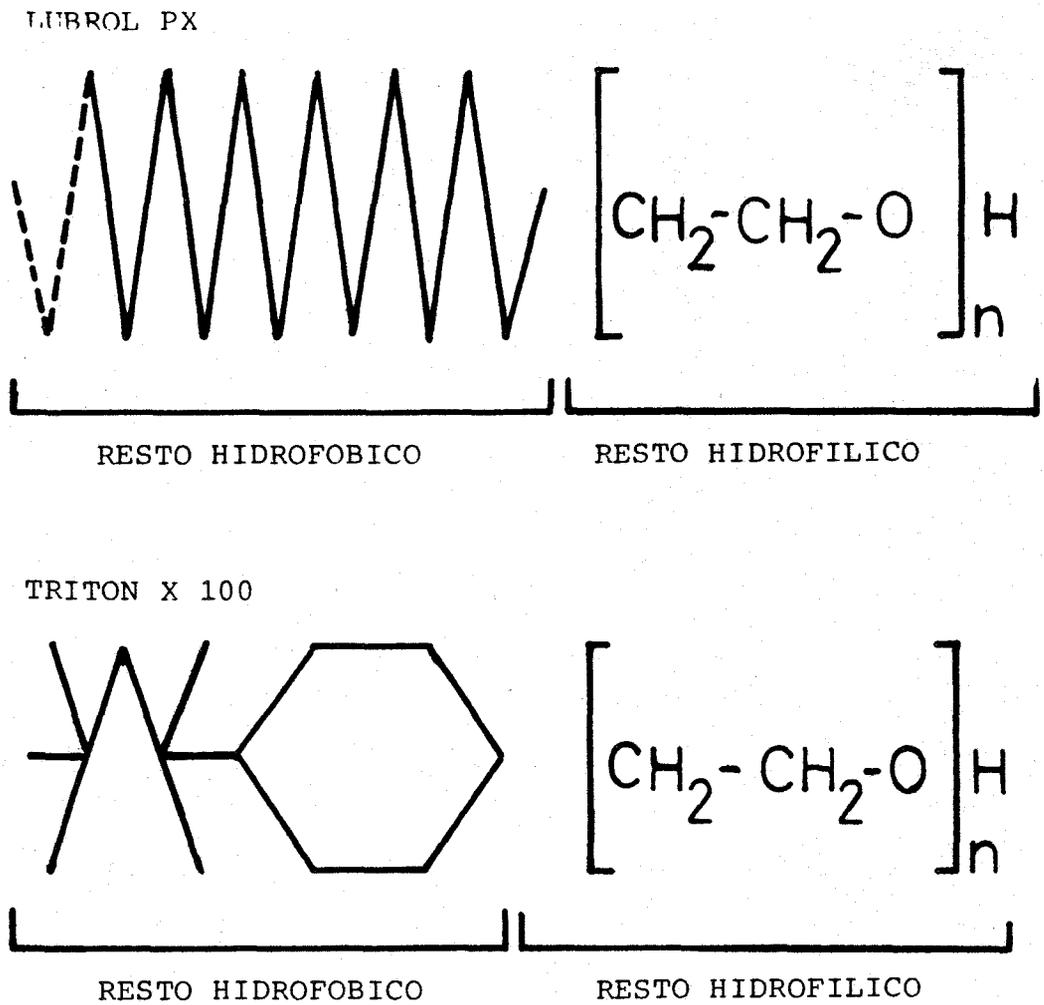


Fig. 3 Fórmula lineal del Lubrol PX y Tritón X 100.

Según el modelo elaborado por Helenius y Simons (1975), el proceso de solubilización es debido a la penetración del detergente dentro de la membrana, lo que aumenta la curvatura de la bicapa lipídica. Así, este grado de curvatura inducido por el detergente no iónico, dependerá del tamaño del residuo polar. A este respecto, estudios conformacionales de detergentes no iónicos, revelan la existencia de una configuración en zig-zag para la cadena oxietilénica; así, los detergentes con mayor capacidad de solubilización serán aquellos con un resto polar del mayor tamaño compatible con la configuración en zig-zag (Fig. 3).

Al mismo tiempo que el uso de detergentes no iónicos ocupa un puesto preferente en los métodos de solubilización de proteínas de membrana por su eficiencia y selectividad de solubilización, también se encuentran en la literatura referencias que indican que su presencia en la solución proteica provoca alteraciones diversas en subsecuentes análisis. Así se describe un marcado descenso en la actividad de la adenil ciclasa obtenida de fuentes diversas, dificultando esta inactivación la posterior purificación del enzima (Guillon et al., 1978). De igual modo, pueden ocurrir "artefactos" durante la cromatografía de las proteínas, o distorsiones en los patrones de electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecakil sulfato de sodio (SDS)

(Horikawa y Ogawara, 1979). Otro de los efectos observados en análisis realizados con trazadores radiactivos de naturaleza anfipática es la formación de micelas entre estos y el detergente (Giorgio et al. 1974), ocasionando disturbios en la unión receptor-trazador (Jacobs et al. 1977).

Estos efectos provocados por la presencia del detergente son debidos a factores tales como temperatura, concentración y estructura del mismo.

Temperatura:

Los detergentes no iónicos presentan soluciones homogénea a 0°C; a medida que la temperatura aumenta se forman soluciones micelares claras, y, el peso molecular de estas micelas va aumentando hasta que en determinado momento la solución se torna súbitamente turbia. A esta temperatura, llamada punto de turbidez, ocurre una microscópica separación de fases en la solución, que a temperaturas aún mayores se convierte en dos fases claramente diferenciadas una enriquecida en detergente y la otra sin él (Bordier, 1981).

Concentración:

La concentración del detergente es uno de los factores más importantes a considerar, ya que por encima de un cierto valor conocido como concentración micelar crítica (cmc) el detergente forma agregaciones micelares que pueden interferir no sólo "per se" en patrones de

cromatografía y electroforesis, sino que también " atrape " en estas micelas cantidades indeterminadas del material en análisis (trazador o enzima) ocasionando heterogeneidad en la población molecular, con diferente accesibilidad hacia el sustrato.

Por estas razones, es importante determinar la concentración micelar crítica del detergente usado para solubilizar membranas biológicas. Diversos medios pueden emplearse para ello como son espectrofotometria, tensión interfacial y dispersión óptica. Para citar un ejemplo, Goldstein y Blecher (1976) dan como cmc para el Lubrol PX, valores entre 0'16 y 0'18 mM.

Estructura:

Como fue mencionado anteriormente, la estructura del detergente es otro factor importante no sólo en la eficacia de la solubilización, sino también en efectos posteriores. Sukow et al (1980), en estudios sobre la unión de detergentes no iónicos de la serie del Tritón X, relatan la disminución de la capacidad de unión conforme aumenta el número de unidades de oxietileno en varios de los componentes de la serie.

Por lo tanto, habría que pensar que dentro del proceso de solubilización, tan importante como el uso del detergente, debe ser la reducción de la concentración del mismo, desde los valores necesarios para que la solubi-

lización tenga lugar, a valores que, tras ella, no alteren análisis posteriores y mantengan sin embargo estas proteínas en solución.

Existen numerosos métodos tendentes a resolver el problema de la reducción del detergente en los métodos de análisis. Así, Harrison et al (1978) describen la reducción de la concentración del detergente no iónico Tritón X-100 de una solución de receptores de membranas placentarias humanas mediante agitación de la misma con gel de estireno-divinilbenzeno neutro, con exclusión de peso molecular límite de 14.000 (BIOBEADS SM-2), llevando el detergente a concentraciones por debajo de su concentración micelar crítica. Jacobs et al (1977), en trabajos con receptores de insulina en membranas plasmáticas de hígado de rata, proceden a una cromatografía en DEAE-celulosa y posterior cromatografía de afinidad en agarosa como medio de reducir la concentración del detergente. De modo similar, Giorgio et al (1974), trabajando con receptores para glucagón, abordan la eliminación del detergente por ultrafiltración y posterior cromatografía de afinidad en Hidroxilapatita. Horikawa y Ogawara (1979), describen un procedimiento rápido para la remoción de detergentes no iónicos de una solución proteica, consistente en la extracción, mediante cloroformo, del detergente de dicha solución proteica;

para evitar la precipitación de proteínas al contacto con el cloroformo, se añade previamente SDS, lo que permite la recuperación de las proteínas en la fase acuosa. Por otro lado, Whitmore y Wheeler (1979), postulan como un método conveniente de eliminación del detergente, la cromatografía unidireccional en placa fina de silicagel conteniendo sulfato de magnesio (2.5%) actuando como fase móvil una mezcla solvente conteniendo cloroformo, metanol e hidróxido de amonio (35%).

Como se ve el uso de detergentes no iónicos es un buen método para la solubilización de proteínas de membranas siempre que la concentración del mismo sea reducida, tras la solubilización, a valores por debajo de su concentración micelar crítica.

3. EL PEPTIDO INTESTINAL VASOACTIVO.

En el curso de los primeros experimentos conducentes al descubrimiento de la secretina, Bayliss y Starling (1902) detectan la presencia, en los extractos intestinales que utilizaban, de una sustancia distinta capaz de producir un descenso de la presión arterial. Fue esta capacidad hipotensora la que permitió, sesenta y ocho años más tarde, el descubrimiento (Said y Mutt, 1970) y aislamiento (Said y Mutt, 1970a), del péptido intestinal vasoactivo (VIP), a partir de duodeno porcino.

Los primeros ensayos biológicos mostraron que este péptido es un vasodilatador periférico, y más particularmente del lecho mesentérico. Estas observaciones iniciales son el origen de su denominación.

3.1. ESTRUCTURA QUIMICA.

El péptido intestinal vasoactivo está compuesto por 28 aminoácidos, y fueron los propios descubridores los que llevaron a cabo la tarea de secuenciarlo (Said y Mutt, 1972; Mutt y Said, 1974). De ahí a la obtención sintética en el laboratorio sólo hubo un paso (Bodansky et al, 1974 ; Coy y Gardner, 1980).

El péptido intestinal vasoactivo se ha obtenido también a partir del tracto gastrointestinal de pollo (Nilsson

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

Fig. 4 Secuencia de aminoácidos del VIP porcino, bovino y de pollo. Las diferencias se encuentran en las posiciones 11, 13, 26 y 28.

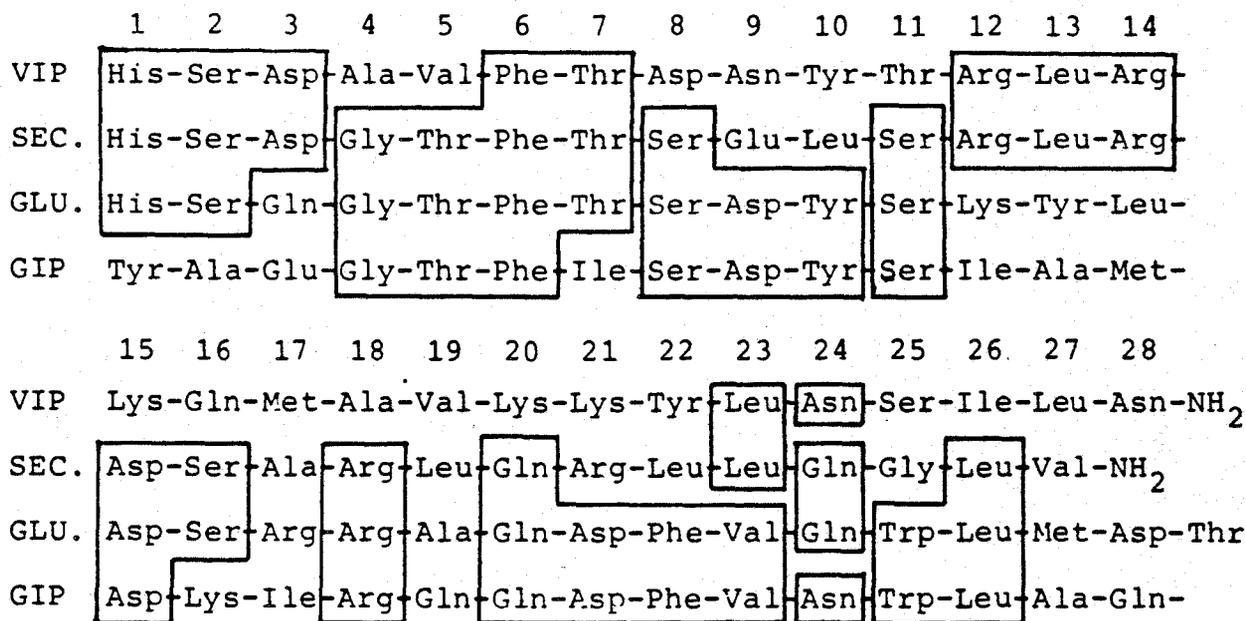


Fig. 2 Secuencia de aminoácidos de VIP, secretina, glucagón y GIP humanos (sólo presentan los primeros 28 aminoácidos del GIP)

1974 y 1975) y de res bovina (Calquist et al, 1979.) siendo este último igual al porcino en cuanto a su secuencia de aminoácidos, mientras que, el de pollo, se diferencia solamente en 4 aminoácidos próximos al extremo terminal. (Fig. 4).

El VIP se encuentra relacionado estructuralmente con otras hormonas gastrointestinales como la secretina (27 aminoácidos, 9 aminoácidos en común), el glucagón (29 aminoácidos, 15 comunes), y en menor grado, con el péptido inhibidor gástrico (GIP), (43 aminoácidos, 3 idénticos). Es por ello que, junto a los péptidos citados, se le puede encontrar integrado en el grupo II de hormonas gastrointestinales propuesto por Pearse (1974). (Fig. 5).

3.2. DISTRIBUCION.

Al principio se consideró al VIP como una hormona o péptido de acción exclusivamente intestinal y cuya síntesis se realizaba " in situ ". Así, en 1974, Polak, utilizando antisuero específico, demostró la presencia del péptido prácticamente a todo lo largo del tracto intestinal. Trabajos realizados en intestino (Buffa et al, 1977) y páncreas (Buffa et al, 1977), parecían corroborar estos resultados.

Sin embargo, actualmente, la mayor parte de los datos

que aparecen en la literatura apuntan a identificar el VIP en terminaciones nerviosas no solamente en tubo digestivo, sino también en los más variados sistemas de la economía.

Así pues, encontramos abundantes terminaciones " vipérgicas " a lo largo del aparato digestivo, desde glándulas salivales (Uddman et al, 1980b), esófago (Besson et al, 1977), estómago (Larsson et al, 1976; Sundler et al, 1979), intestinos delgado y grueso (Larsson et al 1976 y 1979 ; Dimaline et al, 1980), hasta páncreas (Larsson et al, 1978 ; Fujii et al, 1980), y vesícula biliar (Sundler et al, 1977).

En el tracto genito-urinario se encuentran terminaciones nerviosas vipérgicas, siendo especialmente abundantes a nivel de vejiga, uretra proximal, próstata, vesículas seminales y vasos deferentes en el hombre (Vaaalasti et al, 1980 ; Alm et al, 1980), y de cervix uterino en la mujer (Alm et al, 1980 y 1980a).

La mucosa y submucosa que revisten el tracto respiratorio , se encuentran ampliamente inervadas por terminaciones nerviosas que contienen el péptido, (Uddman et al 1978a, 1980, 1981). Presentan también terminaciones vipérgicas el músculo esquelético (Jarhult et al, 1980) placenta (Attia et al, 1976) y células libres del tipo de mastocitos (Cutz et al, 1978) y leucocitos polimorfonucleares (O'Dorisio et al, 1980).

Sin embargo, quizás sea en el Sistema Nervioso Central donde se ha realizado mayor número de estudios a fin de detectar la presencia del VIP. Por métodos radioinmunológicos e inmunohistoquímicos, en diversos modelos animales, se ha realizado un estudio sistemático de las diferentes estructuras que forman parte del sistema. Las mayores concentraciones del péptido se localizan en el cortex cerebral y núcleo amigdalino medio (Samson et al, 1979), mientras que en cerebelo son inapreciables (Samson et al, 1979).

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

Como se puede constatar, la distribución de las terminaciones nerviosas vipérgicas es muy amplia. A pesar de todo, hay que hacer notar que estas terminaciones se hallan preferentemente en íntima relación con células epiteliales de función secretora y de transporte, con musculatura lisa y vasos sanguíneos. Estas localizaciones pueden " a priori ", dar una idea de que las funciones

que el péptido intestinal vasoactivo va a cumplir, se refieren a la regulación de fenómenos de secreción, del flujo sanguíneo y de la tonicidad de la musculatura lisa.

3.3. ACCIONES BIOLÓGICAS.

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

Como se ha descrito en el apartado anterior, a pesar de la amplia distribución del péptido por toda la economía, va a actuar principalmente sobre glándulas de secreción externa o interna, musculatura lisa y vasos sanguíneos, sin menoscabo de otras acciones en órganos y tejidos que, en principio, no presentan inervaciones " vipérgicas " como es el caso del hígado y tejido adiposo.

1. Aparato Digestivo.

A) Efecto sobre la musculatura lisa.

Está descrita una acción relajante sobre la musculatura

lisa y esfínter a nivel esofágico tras contracción producida por carbamilcolina o pentagastrina (Uddman et al, 1978 ; Siegel et al, 1978). Efectos similares se observan en estómago (Konturek et al, 1975), intestino (Said y Makhlouf, 1974) y vesícula biliar (Said, 1974; Ryan y Riave, 1978) donde además, el VIP inhibe el efecto estimulante de la contracción que ejerce la colecistiquina (Ryan y Cohen, 1977).

B) Efecto sobre la función secretora.

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

En el estómago inhibe la secreción ácida; esta inhibición se acompaña de una reducción del flujo sanguíneo mucoso como se aprecia mediante el aclaramiento de aminopirina (Konturek et al, 1976).

Sin embargo, el VIP estimula de forma dosis-dependiente la secreción intestinal, aumentando el flujo de agua, Na^+ , K^+ , y en especial de Cl^- hacia la luz del tubo digestivo (Barbezat y Grossman, 1971; Guenter et al, 1980; Beubler, 1980), siendo el efecto ostensible a nivel de mucosa cólica (Waldman et al, 1977) y tiene especial interés en los casos en que el VIP plasmático se encuentra muy elevado (Síndrome de Verner-Morrison y otros tumores), ya que explica la presencia de diarreas de

difícil tratamiento (Bloom et al, 1973; Said y Faloo-
na, 1975; Hansen et al, 1980).

En el páncreas la inyección intravenosa de VIP provoca un aumento del volumen de la secreción exocrina y un incremento en la concentración de bicarbonato (Said y Mutt, 1972; Dimaline y Dockray, 1979). Este efecto es dosis-dependiente obteniéndose un máximo de respuesta del orden de un 20% de la obtenida con secretina (Kon-
turek et al 1975 y 1975a; Tournut et al, 1977).

Sobre la vesícula biliar el VIP produce un efecto inver-
sor del flujo de absorción, aumentando la secreción de
agua y electrolitos (Jansson et al, 1978).

C) Efecto sobre el flujo sanguíneo.

El VIP es un potente vasodilatador de la circulación
mesentérica, siendo este uno de sus primeros efectos
descritos (Said y Mutt, 1970a y b; Eklund et al, 1979).
Este efecto es debido a la acción relajante que ejerce
sobre la musculatura lisa de la pared vascular.

2. Sistema Nervioso Central.

En el Sistema Nervioso Central parece ejercer cierta
función reguladora sobre otras sustancias, así el pépti-
do intestinal vasoactivo inhibe la liberación de soma-
tostatina del hipotálamo medio basal, mientras que no
la altera en el hipotálamo anterior, amígdala y cortex

Epelbaun et al, 1979). Por el contrario está descrito que estimula la liberación de hormona luteinizante (LH), hormona del crecimiento (GH) Y prolactina (Vijayan et al, 1979).

3. Sistema Genito-Urinario.

En el sistema genito urinario de la mujer el VIP provoca el aumento del flujo sanguíneo del miometrio (Ottensen et al, 1980) y un efecto relajante sobre los esfínteres (Walles et al, 1980). Prieto et al (1981), utilizan do células en cultivo de una estirpe maligna de carcinoma de cérvix (HeLa), encontraron que el VIP estimula la producción de cAMP.

En el hombre el único efecto comprobado consiste en la contracción de los vasos deferentes.

4. Aparato Respiratorio.

En el Aparato Pespiratorio, el VIP produce aumento del flujo vascular que irriga la mucosa nasal (Malm et al, 1980), y relajación de la musculatura lisa de la pared traqueobronquial (Said et al, 1979; Matsuzaki et al, 1980).

5. Músculo esquelético.

A nivel de la musculatura esquelética, el VIP produce

una potente acción dilatadora que permite un aumento del flujo vascular (Jarhult et al, 1980). También se ha descrito una activación de la adenil ciclasa de músculo cardíaco por VIP (Chatelain et al, 1980 y 1980a).

6. Secreción Endocrina.

Es bien conocido ya que a nivel de los islotes de Langerhans el VIP estimula la secreción de insulina y glucagón (Schebalin et al, 1974 y 1977; Bataille et al, 1977; Jensen et al, 1978; Arilla et al, 1981). Sólo en presencia de glucosa a concentraciones fisiológicas, puede potenciarse la secreción de insulina (Schebalin et al, 1977; Arilla et al, 1981), mientras que la secreción del glucagón se potencia a concentraciones relativamente bajas de glucosa (Jensen et al, 1978). También se ha descrito un efecto estimulante de la secreción de somatostatina por el islote (Ipp et al, 1978).

A nivel de corteza de glándulas suprarrenales parece que el péptido estimula la producción de 20-dihidroprogesterona al igual que la ACTH (Morera et al, 1979). Mucho más recientemente se ha podido comprobar el efecto estimulador sobre la secreción de hormonas tiroideas (Ahren et al, 1980).

Estos efectos, junto con el papel que el VIP juega en la síntesis y liberación de determinados neuropéptidos (pro

lactina, etc.) conforman por el momento, el espectro de acciones del péptido sobre el sistema endocrino.

7. Acciones Metabólicas.

Es precisamente a nivel de hígado y tejido adiposo, en los que hasta el momento no se han descrito terminaciones " vipérgicas ", donde se encuentran dos claros efectos metabólicos del VIP según una actividad similar al glucagón. Por un lado estimula la glucogenólisis en hígado (Kerins y Said, 1973) con una potencia del 20-30% del glucagón, provocando hiperglucemia. Por otro, estimula la lipólisis en adipocitos de rata (Desbuquois et al, 1973; Saito et al, 1978).

En resumen, las acciones biológicas del VIP son muy variadas y cada día más numerosas. Es pues necesario, determinar el valor fisiológico y real de cada uno de estos fenómenos, e integrarlos según un modelo funcional coherente.

3.4. MECANISMO DE ACCION.

Como ya se expuso en el primer apartado de este trabajo, se podría definir el mecanismo de acción de una hormona como la forma particular en que interacciona con una determinada célula diana sobre la que induce una serie de cambios metabólicos (activación de enzimas) que van a

dar como resultado final un efecto biológico. En este sentido, hasta lo que se conoce, pueden diferenciarse para el VIP tres etapas sucesivas:

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

Además de estas tres etapas expuestas según los mecanismos clásicos de acción hormonal (Figs 1, 2), hay que valorar el papel que los guanil nucleótidos juegan en este proceso utilizando como referencia el modelo propuesto por Rodbell (1980) para el glucagón y que puede hacerse extensivo en gran medida al VIP (Fig.6).

1. Receptores para VIP.

Se han caracterizado receptores para VIP, acoplados a una adenil ciclasa (efector), en numerosos tejidos :

- a) Células del epitelio intestinal (Laburthe et al, 1979, 1980) y membranas plasmáticas del mismo origen (Amiranoff et al 1978, 1980).
- b) Hepatocitos y membranas hepáticas (Debusquois et

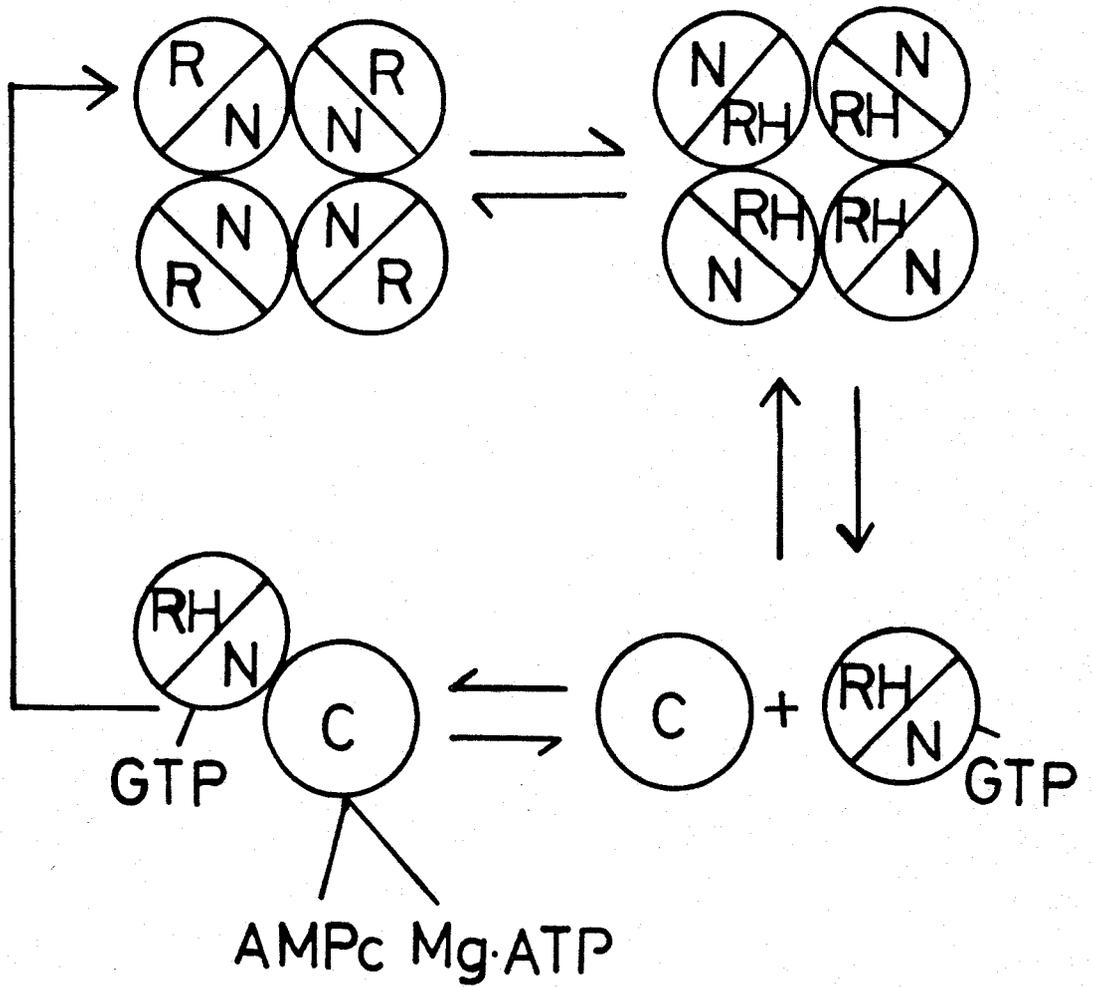


Fig. 6 Fases de la interacción hormona-receptor-effector según Podbell (1980).

- al, 1974; Bataille et al, 1974, 1975 y 1977; Guerrero et al, 1981).
- c) Células acinares del páncreas (Christophe et al, 1976; Gardner et al, 1977).
 - d) Adipocitos (Bataille et al, 1974 y 1975).
 - e) Tráquea (Frandsen et al 1978).
 - f) Cerebro: se han caracterizado en membranas cerebrales de áreas conocidas por ser ricas en el péptido, incluyendo corteza cerebral, hipotálamo, hipocampo, cuerpo estriado y tálamo (Taylor y Pert, 1979 ; Robberecht et al, 1978 y 1979)
 - g) Páncreas exocrino (Christophe et al, 1976; Ariella et al, 1981).
 - h) En células tumorales cultivadas de carcinoma de cervix uterino (HeLa) (Prieto et al, 1981) y de colon (HT-29 y HRT-18) (Laburthe et al, 1978).

Salvo en contadas ocasiones (Taylor y Pert, 1979; Binder et al, 1980 ; Desbuquois et al, 1974), siempre se describe para todas las estirpes celulares la existencia de dos tipos de receptores para VIP en la membrana celular: uno es de alta afinidad (K_d 0'5-4'0 nM) y otro de baja afinidad (K_d 50-200 nM) (Christophe et al, 1976; Prieto et al, 1979 y 1981; Guerrero et al, 1981). Posiblemente sólo los receptores de alta afinidad estarían acoplados

al sistema adenil ciclasa.

Es de interés valorar en el estudio de receptores si estos se modifican, bien en su número, bien en cuanto afinidad, en determinadas condiciones fisiopatológicas. Aparentemente, los receptores para VIP en la rata van aumentando progresivamente desde el nacimiento, hasta estabilizarse a las dos semanas de edad (Robberecht et al, 1979). A partir de ahí no se ha encontrado circunstancia alguna que los modifique, aunque se ha estudiado en algunos estados fisiológicos propicios como el ayuno (Prieto et al, 1980). Incluso en células tumorales en cultivo (HT-29), los receptores permanecen con las mismas características estequiométricas (Laburthe et al, 1978 y 1980).

2. Activación del sistema adenil ciclasa.

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

El aumento de cAMP por acción del VIP está descrito en muchos sistemas celulares, incluso en algunos para los que aún no se han caracterizado los receptores. En la mayor parte de los casos estudiados, el efecto del VIP es dosis-dependiente, obteniéndose la mitad de la esti-

mulación máxima (K_m) a una concentración del péptido entre 0'2 y 5'0 nM, según las estirpes celulares. Estos valores son muy semejantes a los de la constante de disociación (K_d) de los receptores de alta afinidad para las mismas células, por lo que se postula que sólo estos receptores están acoplados al sistema adenil ciclasa y por consiguiente son capaces de continuar la cascada de reacciones que culmina con el efecto biológico (Laburthe et al 1979a; Prieto et al, 1981; Ramirez-Cárdenas et al, 1981).

3. Activación de quinasas.

El cAMP producido bajo el estímulo del VIP es capaz de activar a determinadas proteínas quinasas que presumiblemente catalizarán la fosforilación de otras proteínas intracelulares. (Laburthe et al, 1979b, Mangeat, 1981)

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

4. Papel regulador de los guanil nucleótidos.

Los efectos de los guanil nucleótidos sobre la interac-

ción del VIP a membranas hepáticas están en consonancia con el modelo descrito por Rodbell (1971 y 1978) (Fig. 6) para la interacción del glucagón con membranas hepáticas.

Los guanil nucleótidos inhiben la unión del ^{125}I -VIP a membranas hepáticas debido a un incremento de la velocidad de disociación del complejo péptido-receptor (Ramirez-Cárdenas, 1981). Resultados similares fueron obtenidos en membranas de cerebro (Robberecht et al., 1978) y de epitelio intestinal (Amiranoff et al, 1980).

Los guanil nucleótidos (GTP y Gpp(NH)p) potencian el incremento de la actividad adenil ciclasa producido por el VIP (Ramirez-Cárdenas, 1981). El papel regulador de los guanil nucleótidos sobre la producción de AMPc estimulada por el VIP también ha sido descrito en pituitaria anterior de rata (Robberecht et al, 1979) y en membranas acinares pancreáticas (Olijer y Gardner, 1979).

Los guanil nucleótidos parecen actuar regulando la interconversión de los receptores de alta y baja afinidad, conduciendo a activaciones diferentes de la adenil ciclasa. Esto explica porqué el Gpp(NH)p es menos efectivos que el GTP para inhibir la unión del ^{125}I -VIP a membranas hepáticas, pero es más potente que el GTP para estimular la producción de AMPc (Ramirez-Cárdenas, 1981).

3.5. FISIOPATOLOGIA DEL VIP.

Los primeros en determinar los niveles del VIP plasmático en el sujeto sano fueron Bloom et al (1973), quienes postularon valores inferiores a 100 pg/ml. Se han realizado numerosos radioinmunoensayos para cuantificar su concentración (Said y Faloona, 1975 ; Ebeid et al, 1976 y 1978; Burhol et al, 1978; Chang et al, 1979), obteniéndose valores en la población normal que oscilan entre 1-5 pM (Chang et al, 1979; Galbo et al, 1979) y 20-40 pM (Bloom et al, 1973; Said y Faloona, 1975; Ebeid et al, 1976).

En principio se postuló que la presencia del VIP circulante se debería a un simple fenómeno de rebosamiento a nivel de las terminaciones nerviosas. No obstante, parece que esas concentraciones en plasma podrían elevarse en determinadas condiciones fisiológicas como el ayuno y el ejercicio (Galbo et al, 1979), la acidificación duodenal (Burhol et al, 1978) y la administración de oxitocina y neostigmina (Bitar et al, 1980), aunque la importancia fisiológica de estos cambios está aún por dilucidar.

Ocurre algo similar en estados patológicos diversos como enfermedades hepáticas (Hunt et al, 1979), en los animales los efectos del VIP incluyen vasodilatación periférica, hiperglucemia, hiperventilación, etc., fenómenos

también observados en pacientes con cirrosis, por lo que se ha postulado que el VIP, que normalmente es inactivado en el hígado, pueda escapar a la sangre y contribuir a estas anormalidades.

En 1958 Verner y Morrison describen el caso de dos pacientes con cuadros de diarreas hídricas profundas asociadas a hipokalemias y aclorhidria; la autopsia reveló la presencia de un tumor benigno de páncreas. Es en 1967 cuando Marks et al, designan bajo el término de WDHA este tipo de síndrome, igualmente denominado cólera pancreático. Bloom et al (1973) observan que los niveles plasmáticos de VIP en estos pacientes son muy superiores a los normales (más de 1000 pg/ml); sin embargo la implicación del VIP en el síndrome de WDHA no está admitida de manera unánime, pudiendo estar implicados otros varios mediadores como glucagón, enteroglucagón, secretina y serotonina (Schmitt et al, 1975) y PGE, PGF y calcitonina (Rambaud et al, 1975).

Encontramos niveles alterados de VIP en tumores productores del mismo en estructuras como bronquios (Said y Faloona, 1975) y médula adrenal (Said y Faloona, 1975; Cooperman et al, 1978). También se produce en ganglioneuromas retroperitoneales (Fausa et al, 1973; Hansen et al, 1980) o mediastínicos (Swift et al, 1975) y en ganglioneuroblastomas (Ricour et al, 1977).

3.6. VIP COMO NEUROTRANSMISOR

La localización del péptido intestinal vasoactivo en distintos niveles del organismo, particularmente importante a nivel del sistema nervioso, sugiere que no es una hormona en el sentido clásico propuesto por Baylis y Starling (1904), sino que actúa como un neurotransmisor o como una hormona de acción local o paracrina.

Constataciones mediante métodos histoquímicos de la presencia del VIP a nivel de fibras nerviosas y periféricas son el origen de la hipótesis actual tendente a atribuirle una función de neurotransmisor.

Como ya se ha visto en el apartado 3.2, el VIP se localiza en el S.N.C. en zonas bien determinadas, mientras que periféricamente se encuentran en las terminaciones nerviosas y plexos que inervan diversas estructuras, así como en ganglios simpáticos y nervios vago y ciático. Esta localización en las fibras nerviosas es específica del VIP y no está descrita para la secretina, glucagón o GIP (Bryarn et al. 1976).

En la fracción sinaptosomal del cerebro (Giachetti et al. 1977) se han observado estructuras redondas u ovaladas conteniendo gránulos de 700 a 1.600 Å de diámetro. El tamaño de estos gránulos es superior a los que contienen acetil-colina o noradrenalina. Además estas fibras no son afectadas por la 6-hidroxidopamina, cono-

cida por destruir totalmente las fibras adrenérgicas, lo que indica que es un sistema no adrenérgico, no colinérgico, el que contiene el VIP.

El descubrimiento por Deschodt-Lanckman et al. (1977) de la activación de una adenil ciclasa altamente específica a nivel de una fracción sinaptosomal de cerebro de puerco, constituye un argumento suplementario en favor de la función de neurotransmisor atribuida al VIP; en efecto, los neurotransmisores del S.N.C. tales como norepinefrina, dopamina, serotonina e histamina actúan a través de la adenil ciclasa.

Por otro lado, el VIP es liberado por estímulos fisiológicos. La despolarización conseguida con K^+ (55 nM), en presencia de Ca^{2+} , provoca la liberación del VIP de sinaptosomas (Giachetti et al. 1977).

El péptido es también liberado por estimulación eléctrica del nervio vago (Fahrenkrug et al. 1978), distensión del "fundus" gástrico (Chayvialle et al. 1980), estimulación mecánica de la mucosa intestinal y por infusiones de agonistas colinérgicos (neostigmina) (Bitar et al. 1980) y oxitocina (Bitar et al. 1980).

La acción del VIP al igual que otros neurotransmisores (acetil colina y norepinefrina) es rápidamente terminada por catabolismo, lo que sugiere la presencia de un sistema enzimático encargado de su degradación (Fahren-

krug, 1980). La vida media del VIP porcino fue determinada por Modlin et al. (1978) y es de $0'85 \pm 0'12$ min.

Quizás la única propiedad que le falta al VIP para cumplir su papel de neurotransmisor, sea la existencia de antagonistas fisiológicos que inhiban su acción.

No obstante, aunque no está definitivamente comprobado, se apunta hacia la somatostatina como la encargada de ejercer esta función (Fanhrenkrug, 1979 y 1980).

4. OBJETIVOS.

Los estudios de la interacción entre hormonas peptídicas y sus receptores, han sido realizados fundamentalmente con células intactas y preparaciones de membranas aisladas (Cuatrecasas, 1972; Freychet et al. 1974; Bataille et al. 1977).

Anteriormente se ha abordado este estudio con receptores solubilizados en el caso de hormonas como la insulina (Cuatrecasas, 1972; Jacobs et al, 1977; Harrison et al 1978; Krupp y Livingston, 1978) , glucagón (Levey et al, 1974; Giorgio et al, 1974; Welton et al, 1977; Ross, 1981) y somatotropina (Bonifacino et al, 1981). Se ha caracterizado el receptor para el péptido intestinal vasoactivo en hígado utilizando como modelo experimental membranas plasmáticas parcialmente purificadas según el método de Neville (1968) (Desbuquois, 1974; Ramírez-Cárdenas 1981). Sin embargo nada hay descrito en cuanto a estudios con receptores solubilizados. En vista de lo anteriormente expuesto, los objetivos de este trabajo han sido los siguientes:

1. Verificar la posibilidad de la solubilización de los receptores para VIP de membranas plasmáticas de hígado de rata.
2. Comprobar la existencia de una unión específica entre el VIP y sus receptores solubilizados.

3. Comprobar la posibilidad de estudios cinéticos y estequiométricos con fracciones del receptor solubilizado.

MATERIAL Y METODOS

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE FARMACIA
BIBLIOTECA

1. AISLAMIENTO DE MEMBRANAS PLASMATICAS DE HIGADO DE RATA.

Realizado según el método de Neville (1968) con algunas modificaciones.

a) Animales: ratas Wistar hembras de 170-220 g de peso y aproximadamente 2 meses de edad, de nuestro propio animalario. Alimentadas hasta el momento del sacrificio con una dieta standard tipo Purina y agua "ad libitum".

b) Reactivos:

- Medio de homogenización: NaHCO_3 1 mM.
- Sacarosa 69% (p/p): disolver 69 g de sacarosa en 31 ml de agua bidestilada y desionizada (comprobar la concentración con un refractómetro).
- Sacarosa 42% (p/p): disolver 42 g de sacarosa en 58 ml de agua bidestilada y desionizada.
- Centrífuga refrigerada de alta velocidad (Beckman, J21).
- Ultracentrífuga (Beckman, L5-40).
- Homogenizador de vidrio tipo Potter (25 ml).

c) Método

Todas las etapas deben realizarse a 4°C.

1.- Decapitar y sangrar 7 u 8 ratas. Laparatomizar y extraer el hígado. Se colocan en un vaso

- de precipitado. Triturar con tijeras hasta que quede una papilla. Pesar aprox. 40 g y desechar el resto.
- 2.- Homogeneizar en Potter de vidrio a razón de 1 g de tejido por cada 2 ml de medio, mediante 8 golpes de émbolo. Todo el homogeneizado se pasa a un vaso de precipitado que contiene 250 ml de medio y se agita la suspensión durante 5 min.
 - 3.- Filtrar a través de una gasa doble. Volver a filtrar a través de una gasa cuádruple. El filtrado se agita y se toman 2 alícuotas de 0'3 ml para determinar proteínas (Lowry et al. 1951) y actividad de la 5'-mononucleotidasa.
 - 4.- Centrifugar el filtrado a $1.500 \times g$ (equivalente en la centrífuga Beckman J-21 y rotor JA-20 a 6.500 r.p.m.) durante 30 min a 4°C. Desechar el sobrenadante por decantación.
 - 5.- Trasvasar el sedimento a un Potter y homogeneizar mediante 3 golpes de émbolo.
 - 6.- El homogeneizado se lleva a un erlenmeyer que contenga aprox. 34 ml de sacarosa 69%. Añadir agua bidestilada hasta unos 60 ml y agitar. Mediante el refractómetro ajustar la solución al 44% (p/p) (añadiendo agua a solución de sacarosa al 69%, según sea necesario).

- 7.- Repartir la solución ajustada al 44% en tres tubos de ultracentrífuga (para rotor SW-27, ultracentrífuga Beckman modelo L5-65). Añadir cuidadosamente, con pipeta Pasteur, sacarosa al 42% para conseguir un gradiente discontinuo 44%/42%. Equilibrar el peso de los tres tubos puestos ya en sus fundas correspondientes. Centrifugar a 90.000xg (equivalente a 25.000 r.p.m.) durante 120 min a 4°C.
- 8.- Recoger las membranas que flotan con una espátula de cuchara y pasarlas a un tubo de plástico que contenga 10 ml de medio. Agitar fuertemente. Llenar el tubo con mas medio, con objeto de diluir la sacarosa de la suspensión de membranas plasmáticas.
- 9.- Centrifugar a 3.000xg (equivalente en la centrifuga J-21 a 15.000 r.p.m.) durante 10 min a 4°C. desechar el sobrenadante.
- 10.- Resuspender el sedimento en medio hasta un volumen final de 20 ml. Agitar fuertemente para conseguir una suspensión homogénea de membranas plasmáticas. Distribuir en alícuotas de 0'5 ml. Preparar, además, alícuotas de 0'3 ml que se usarán para determinar proteínas y actividad de 5'-mononucleotidasa.

Todas las alícuotas de la suspensión de membranas se conservan a -70°C pudiéndose mantener a esta temperatura durante meses.

2. CRITERIO DE PURIFICACION.

Para valorar el grado de purificación de las membranas plasmáticas, con respecto a otras estructuras celulares, se ha utilizado como marcador la actividad de la 5'-mononucleotidasa. Este enzima es específico de la membrana, no encontrándose prácticamente en otras estructuras subcelulares.

La 5'-mononucleotidasa cataliza la reacción:



La técnica consiste en incubar las membranas con 5'-AMP, detener la reacción con ácido tricloroacético al 25% y determinar en el sobrenadante la cantidad de Pi producido (Michell y Hawthorne, 1965).

a) Reactivos:

- Tampón Tris: Tris 100 mM/MgCl₂ 7'3 mM, pH 7'5.
- Sustrato: 5'-AMP (Merck) 1'73 mg/ml en tampón Tris.
- Membranas: obtenidas en los pasos 3 y 10 del método de aislamiento antes explicado y diluidas en Tris 10 mM, pH 7'5 de modo que la concentración de proteínas sea del orden de 1-5 mg/ml.
- TCA: ácido tricloroacético al 25%.
- Reactivo I: 5'7 g de NaHCO₃ y 0'2 g de Na₂SO₃ se disuelven en aprox. 50 ml de agua bidestilada y desionizada; se añade 0'1 g de α-naftilamina, calentando

para poder disolverla. Enrasar a 100 ml y conservar en oscuridad.

- Reactivo II: 1'25 g de molibdato amónico y 7 ml de H_2SO_4 concentrado se disuelven en agua bidestilada y desionizada hasta un volumen final de 500 ml.
- Pi (curva standard): 57'4 mg de $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ se disuelven en 100 ml de TCA 1%. Se obtiene una solución de 100 $\mu g/ml$ de fósforo.

b) Técnica

En tubos de 10 ml (en frío) añadir 200 μl de suspensión de membranas y 2 ml de sustrato (5'-AMP).

Incubar 15 min a 37°C con agitación.

Poner los tubos en frío y añadir 800 μl de TCA al 25%.

Agitar. Centrifugar 10 min a 3.000 r.p.m. a 4°C.

Recoger 500 μl del sobrenadante para determinar el Pi liberado. A dichos sobrenadantes se les denomina problema A y B.

Problema A: el sobrenadante se obtiene de la incubación del 5'-AMP con el homogenado inicial.

Problema B: el sobrenadante se obtiene de la incubación del 5'-AMP con la suspensión final de membranas.

Curva standard

<u>Tubo</u>	<u>Pi standard</u>	agua bidestilada <u>y desionizada</u>	<u>µg Pi/tubo</u>
B	-	1000 µl	-
1	100 µl	900 µl	10
2	200 µl	800 µl	20
3	300 µl	700 µl	30
4	400 µl	600 µl	40
Problema A	500 µl sbte A	500 µl	X
Problema B	500 µl sbte B	500 µl	Y

Añadir a todos los tubos 5 ml de reactivo II y 1 ml de reactivo I. Incubar 10 min a 37°C en baño con agitación. Se leen las absorbancias en espectrofotómetro a 660 nm y se representa la curva standard del Pi como se ve en la fig. 7.

La actividad de la 5'-mononucleotidasa se expresa finalmente como µmoles Pi liberados/mg de proteína/h. El grado de purificación relativa de las membranas plasmáticas se obtiene dividiendo la actividad de la 5'-mononucleotidasa de la preparación de membranas por la del homogenado inicial.

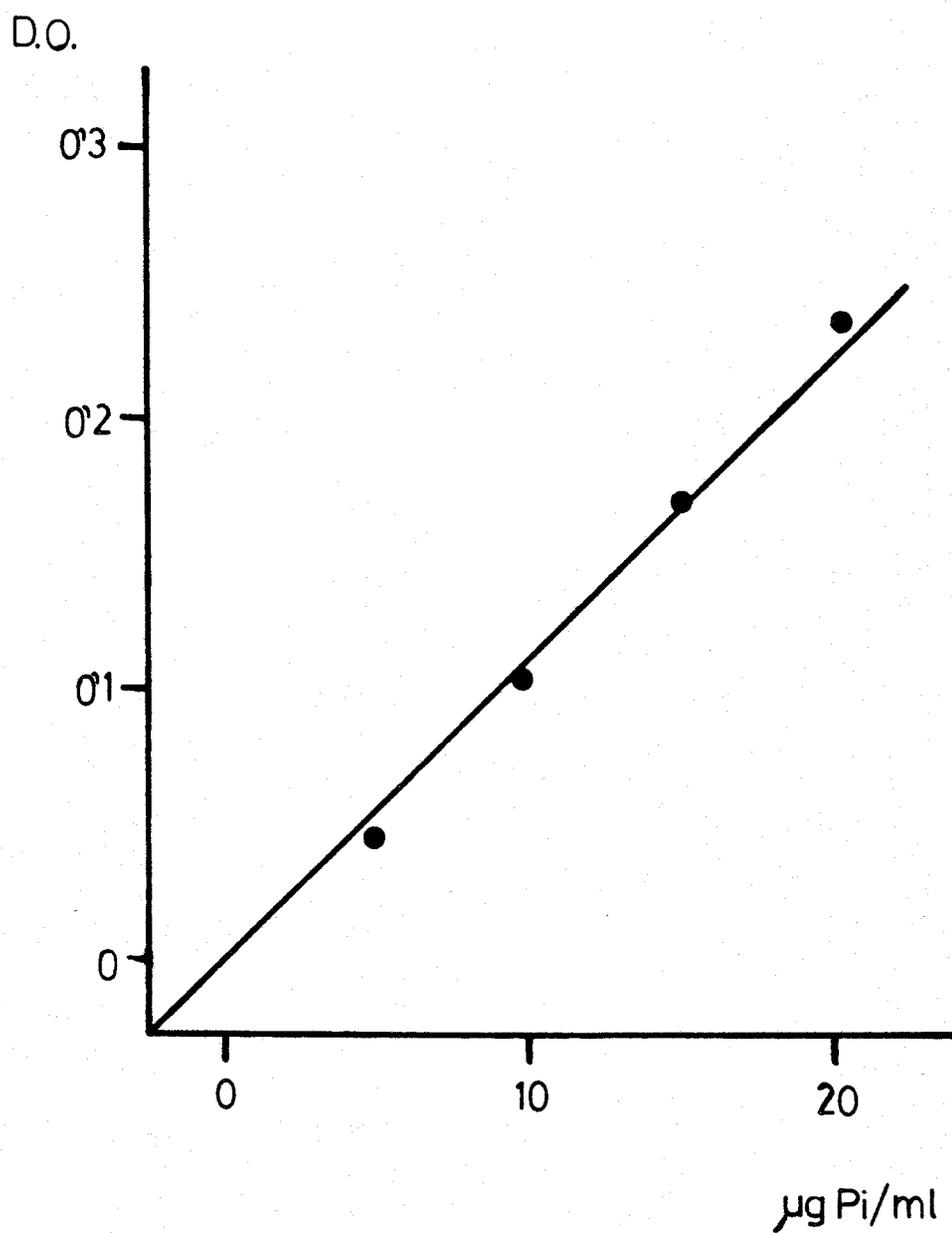


Fig.7 Curva standard de la determinación de Pi.

3. DETERMINACION DE PROTEINAS.

Por el método de Lowry (Lowry, 1951) utilizando albúmina bovina.

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

a) Reactivos

- VIP: 0'5 mg de VIP porcino (lote n° 1008, Peninsula Laboratories, code 7161) se disuelven en 0'5 ml de HCl 0'005 N, quedando a una concentración de 3×10^{-4} M. Después de agitar durante 60 min se reparte en alícuotas del siguiente modo:

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

6 alícuotas de 50 μl como "stock de VIP a 3×10^{-4} M.

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

Se reparte en alícuotas de 50 μl .

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

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

- ^{125}I Na (AMERSHAM IMS 30): con una actividad de 100 mCi/ml, preparado en NaOH, pH 7-11, libre de reductores y 99'6% de pureza radioquímica.
- Cloramina T (1 mg/ml): 25 mg de cloramina T ($\text{C}_7\text{H}_7\text{Cl NaO}_2\text{S}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$, Merck) se disuelven en 10 ml del tampón fosfato antes descrito. Se prepara 10-15 min antes del marcaje y se mantiene en la ascuridad hasta su uso. Se utiliza en el marcaje como oxidante débil.
- Metabisulfito sódico (2 mg/ml): 25 mg de metabisulfito sódico ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$, Merck) se disuelven en 5 ml de tampón fosfato. El metabisulfito se utiliza como reductor para detener la reacción de oxidación desencadenada por la cloramina T.
- Tris 50 mM, BSA 2%, pH 7'5 (TB).
- Tris 50 mM, BSA 2%, bacitracina 2 mg/ml, pH 7'5 (TBB).
- Acido/alcohol: mezcla al 50% (v/v) de ácido acético 1 N con etanol absoluto. Preparar 50 ml y conservar a 4°C.
- Talco: desleír un comprimido de 50 mg en 0'5 ml de agua destilada.

b) Marcaje

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

Con micropipeta se añade a este tubo:

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

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

c) Purificación

A la mezcla de marcaje se le añade 0'1 ml de la suspensión de talco. Agitar y centrifugar 10 min a 3.000 r.p.m. (Beckman TJ-6). Aspirar el sobrenadante que contiene iodo libre. Añadir 1 ml de la mezcla acético/etanol al sedimento de talco. Agitar y volver a centrifugar 10 min a 3.000 r.p.m. El sobrenadante, que contiene el ^{125}I -VIP, se reparte en alícuotas de 50 μ l y se conserva a -20°C hasta su uso.

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

d) Cálculo del porcentaje de incorporación.

Tomar 400 μl de la mezcla de marcaje diluida en 5ml de TB y añadirle 100 μl de la suspensión de talco. Agitar y centrifugar 10 min a 3.000. r.p.m. Contar la radiactividad del precipitado y del sobrenadante y calcular el porcentaje de radiactividad del primero con respecto a la radiactividad total:

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

En los marcajes realizados (n=7) el porcentaje de incorporación alcanza un valor medio de $79'1 \pm 2'4$.

e) Actividad específica.

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

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

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

5. AISLAMIENTO DE VIP PORCINO.

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

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

b. Homogenizar con un sistema de aspas (1 kg de tejido en 4 l de ácido acético 0'5 M). Sonicar durante 10 s y centrifugar a 3.000 r.p.m. durante 1 h. Eliminar la capa de grasa superior con una espátula, tomar el sobrenadante y filtrarlo a través de papel Whatman 541 dos veces. Ajustar el pH del filtrado a 7'5 con NH_4OH .

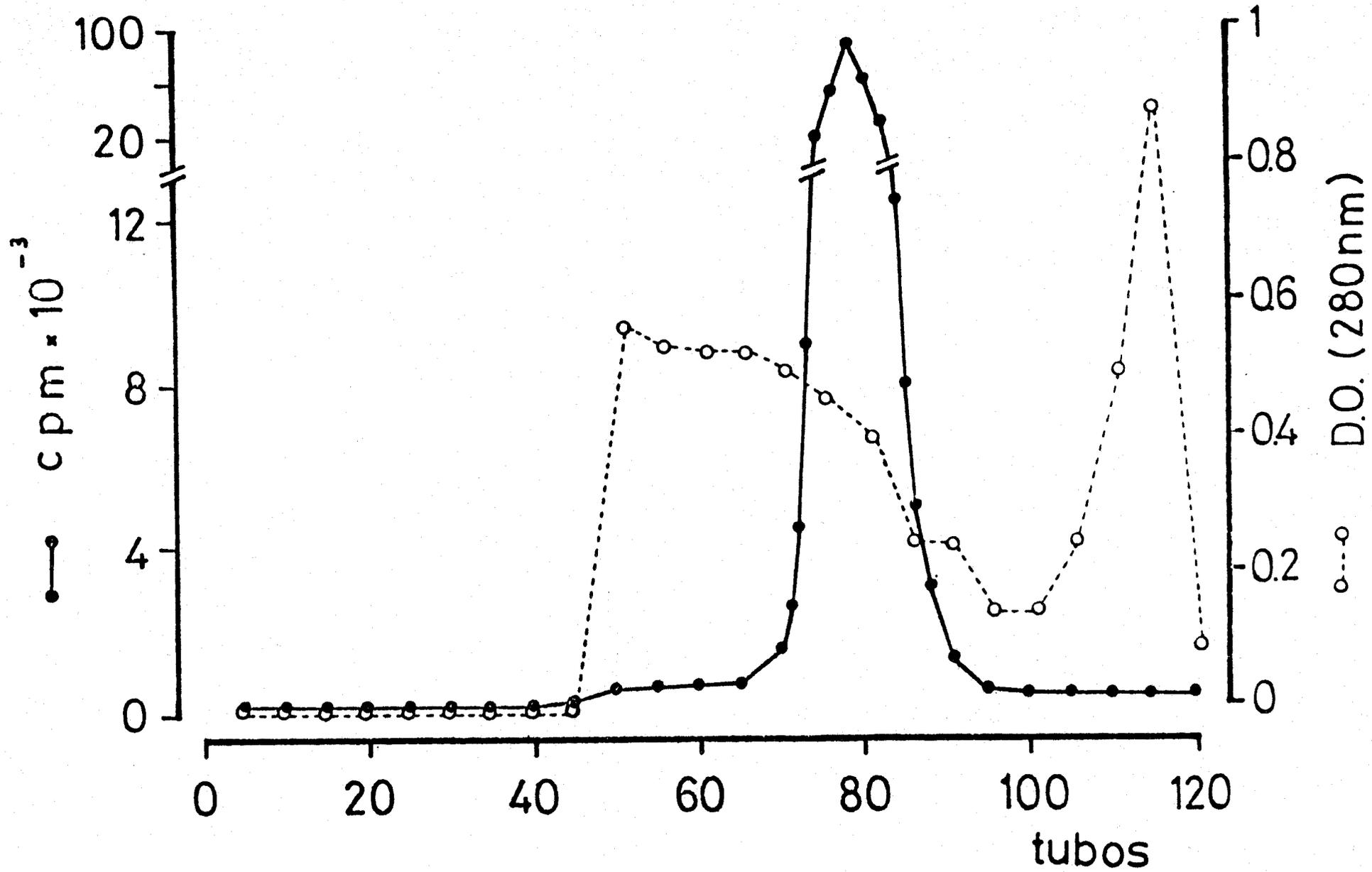
c. Añadir 80 g de talco y agitar. Centrifugar 20 min a 3.000 r.p.m. Desechar el sobrenadante y resuspender el precipitado en 2.400 ml de ácido acético 1 N/ etanol absoluto al 50% (v/v). Centrifugar 50 min a 3.000 r.p.m. Congelar el sobrenadante y liofilizar. En este paso se obtuvo 1'64 g de material liofilizado.

d. Reconstituir en 15 ml de ácido acético 0'2 M. Centrifugar 10 min a 4.000 r.p.m. Tomar el sobrenadante y hacerlo pasar a través de una columna de Sephadex G-25 (2'4x60 cm) eluyendo con ácido acético 0'2 M y calibrando con ^{125}I -VIP (500.000 c.p.m.). Recoger 120 alícuotas de 2 ml y contar la radiactividad (fig.8). Unir las

fracciones correspondientes al pico de radiactividad y liofilizarlas. En este paso se obtuvo 32 mg de material liofilizado.

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

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



6. SOLUBILIZACION DE RECEPTORES.

6.1. SOLUBILIZACION.

Se pretende obtener las proteínas (receptores) que unen específicamente al VIP, para lo cual es necesario aislarlas del resto de las estructuras de la membrana mediante solubilización con el detergente no iónico Lubrol PX. A fin de que el detergente no interfiera en análisis posteriores, se procede a una reducción en la concentración del mismo, que permita al mismo tiempo mantener las proteínas en solución.

a) Reactivos

- Tampón Tris 35 mM, pH 7'5, dithioerithritol (DTE) 0'2 mM, Lubrol PX 0'5% (detergente no iónico: etilenglicol monododecanil éter; Sigma) (tampón A).
- Membranas hepáticas: las membranas que se conservan a -70°C, se descongelan lentamente en el momento del experimento.
- Sonicador MSA.
- Centrífuga refrigerada de alta velocidad (Beckman J-21.)
- Ultracentrífuga (Beckman L5-40).

b) Método

- Todas las etapas deben ser realizadas a 4°C.

- En tubos de plástico (3 ml) se añade suspensión de membranas hasta un volumen final que contenga aproximadamente 14 mg de proteínas. Centrifugar 10 min a 3000 r.p.m. y eliminar el sobrenadante.
- Añadir 4 ml de tampón Tris 35 mM, pH 7'5, Lubrol PX 0'5%, DTE 0'2 mM. Agitar 15 min A fin de aumentar la solubilización de las proteínas de membrana, la mezcla es sonicada por tres períodos de tiempo de 30 segundos cada uno.
- Transferir la mezcla a un tubo de ultracentrífuga y centrifugar a 100.000 xg durante 90 min a 4°C. Recoger el sobrenadante y reservar. Resuspender el precipitado restante ;proceder a nueva solubilización según el método descrito. Juntar ambos sobrenadantes. Repartir en alícuotas y conservar a -20°C hasta su uso. En otras experiencias, esta fracción solubilizada se somete a un proceso de reducción del detergente como se explica a continuación.

6.2. REDUCCION DE LA CONCENTRACION DEL DETERGENTE.

a) Reactivos

- Tampón Tris 35 mM, pH 7'5, DTE 0'2 mM, EDTA 1 mM (tampón B).
- Condensadores Minicón B-15.

- Ultracentrífuga (Beckman L5-40).

b) Método

- El sobrenadante obtenido en la solubilización es llevado a concentradores Minicón B-15 (con exclusión de pesos moleculares por debajo de 15.000), donde es concentrado y posteriormente diluido con tampón B exento del detergente. Esta operación se repite tres veces, de forma que la concentración teórica del Lubrol quede por debajo de 0'001%.
- El volumen final obtenido es centrifugado nuevamente a 100.000 xg durante 30 min a fin de eliminar las proteínas precipitadas tras la reducción del detergente.

7. SEPARACION DEL COMPLEJO ^{125}I -VIP-RECEPTOR.

7.1. SEPARACION MEDIANTE POLIETILENGLICOL.

Cuando la reacción primaria de unión está completa, se añade el polietilenglicol a una concentración a la cual una de las fracciones sea insoluble y precipite, mientras que la otra permanece en solución. Esta separación depende de la carga electrostática, que a su vez depende del punto isoeléctrico y el pH del medio, y consiste en la reducción del agua "libre" del sistema, capaz de mantener una molécula en solución.

A) Efecto de la concentración de polietilenglicol sobre la precipitación del ^{125}I -VIP libre.

Se pretende encontrar la concentración de polietilenglicol que no precipite al trazador libre, para ello se realizan incubaciones del trazador libre con diferentes concentraciones del agente precipitante.

a) Reactivos

- TBB: Tris 50 mM, pH 7'5, BSA 2%, bacitracina 2 mg/ml.
- TB: Tris 50 mM, pH 7'5, BSA 2%.
- ^{125}I -VIP: 50 pM de concentración final.
- Polietilenglicol.

b) Método

- En tubos de 3 ml. se añade por este orden:

250 μ l de TBB.

200 μ l de TB.

50 μ l de ^{125}I -VIP (50 pM de concentración final).

- Incubar 30 min a 30°C y a continuación se añade 1 ml de polietilenglicol de tal forma que quede a concentraciones finales entre 3 y 18%. Agitar, dejar reposar 15 min y centrifugar a 3.000 r.p.m. Aspirar el sobrenadante y contar la radioactividad del precipitado.

B) Efecto de la concentración de BSA sobre la precipitación del ^{125}I -VIP libre por polietilenglicol.

Para ver si la albúmina es capaz de disminuir el porcentaje de precipitación del trazador libre se realiza la siguiente experiencia.

a) Reactivos

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

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

- Tris 50 mM, pH 7'5, Lubrol PX 0'5%.

- ^{125}I -VIP: 50 pM (concentración final).

- Tris 50 mM, pH 7'5, BSA a diferentes concentraciones de forma que esta última quede a concentraciones fina-

les entre 1 y 8%.

- Polietilenglicol: al 24%, de forma que quede a una concentración final del 8%.

b) Método

- A tubos de 3 ml se añaden por este orden:

250 μ l de TBB.

150 μ l de TB.

50 μ l de ^{125}I -VIP (concentración final 50 pM).

50 μ l de Tris 50 mM, pH 7'5, Lubrol PX 0'5%, o TB dependiendo de que la experiencia se realice en presencia o ausencia del detergente.

- Incubar 30 min a 30°C y añadir 0'5 ml de cada una de las diferentes preparaciones de albúmina, agitar. Añadir 0'5 ml de polietilenglicol al 24% (8% de concentración final), agitar y dejar reposar 15 min Centrifugar 30 min a 3.000 r.p.m. Aspirar el sobrenadante y contar la radioactividad del precipitado.

c) Incubación de la fracción solubilizada con el trazador.

a) Reactivos

- TBB: Tris 50 mM, pH 7'5, BSA 2%, bacitracina 2 mg/ml.
- TB: Tris 50 mM, pH 7'5, Bsa 2%.
- Fracción solubilizada con bajo contenido en lubrol (70 μ g/50 μ l).

- VIP frío: disoluciones diferentes de VIP nativo, de forma que quede a concentraciones finales entre 10^{-11} y 10^{-7} M
- VIP no específico: preparado en TB de forma que quede a una concentración final de $1 \mu\text{M}$.
- ^{125}I -VIP: 50 pM (concentración final).
- Tris 50 mM, BSA 20% (8% de concentración final).
- Polietilenglicol al 24% en Tris 50 mM.

b) Método

- A tubos de 3 ml añadir en el siguiente orden:
 - 250 μl de TBB.
 - 100 μl de TB.
 - 50 μl de TB, de diferentes disoluciones de VIP frío o VIP inespecífico.
 - 50 μl de la fracción solubilizada con bajo contenido en Lubrol (70 ug de proteínas).
 - 50 μl de ^{125}I -VIP (50 pM de concentración final).
- Incubar 30 min a 30 °C y añadir 0'5 ml de Tris 50mM BSA 20% (8% concentración final). Agitar y añadir 0'5 ml de polietilenglicol al 24% , agitar y dejar reposar 15 min Centrifugar 30 min a 3.000 r.p.m. Aspirar el sobrenadante, contar la radioactividad del precipitado.

7.2. SEPARACION MEDIANTE CARBON.

La separación con carbón está basada en la adsorción no específica de moléculas biológicas a la superficie de ciertas partículas.

A) Efecto del detergente sobre la precipitación del ^{125}I -VIP libre por carbón.

En primer lugar se pretende ver si el ^{125}I -VIP es precipitado por una suspensión de carbón-albúmina y si esta precipitación se ve alterada por la presencia en el medio de incubación de concentraciones crecientes del detergente Lubrol PX.

a) Reactivos

- TBB: Tris 50mM, pH 7'5, BSA 2%, bacitracina 2 mg/ml.
- TB: Tris 50 mM, pH 7'5, BSA 2%.
- ^{125}I -VIP: concentración final 50 pM.
- Lubrol PX en Tris 50mM, pH 7'5, a concentraciones iniciales de 0'1, 0'5 y 1%. (p/v).
- Carbón 5%, BSA 2'5% en tampón Tris 50 mM, PH 7'5.

b) Método

- En tubos de 3 ml. se añaden por este orden:

250 μl de TBB

150 μl de TB

50 μl de ^{125}I -VIP

50 μ l de tampón Tris 50 mM, pH 7'5, o de las diferentes concentraciones de Lubrol PX.

- Agitar, incubar 30 min a 30°C. Añadir 150 μ l de la suspensión de carbón-albúmina, agitar y centrifugar 10 min a 3.000 r.p.m. Aspirar el sobrenadante y contar la radioactividad del precipitado.

B) Incubación de la fracción solubilizada con el receptor.

Se pretende verificar la eficiencia del método de separación con carbón-albúmina de la fracción libre del trazador y la fracción del mismo ligada a las proteínas.

a) Reactivos

- TBB: Tris 50 mM, pH 7'5, BSA 2%, bacitracina 2 mg/ml.
- TB: Tris 50 mM, pH 7'5, BSA 2%.
- Fracción solubilizada con bajo contenido en Lubrol.
- ^{125}I -VIP: 50 pM de concentración final.
- VIP frío: disoluciones diferente de VIP nativo de forma que quede a concentraciones finales entre 10^{-11} y 10^{-7} M.
- VIP no específico: preparado en TB de forma que quede a una concentración final de 1 μ M.
- Carbón 5%, BSA 2'5%.

7.3. SEPARACION MEDIANTE FILTRACION EN GEL.

Está basada en la separación por diferencias de pesos moleculares. El complejo trazador-proteínas ligadas, es por definición, de mayor peso molecular que el trazador libre, y pueden así ser separados mediante filtración en gel de agarosa (Sepharose 6B, equivalente a agarosa al 6%). La separación en Sepharose 6B se realiza con fracciones de solubilizado con alto y bajo contenido del detergente.

7.3.1. EN PRESENCIA DE LUBROL PX A ALTA CONCENTRACION.

Se pretende ver la influencia del detergente en la separación de la fracción libre de la ligada.

A) Interacción previa a la solubilización.

a) Reactivos

- TBB: Tampón Tris 50 mM, pH 7'5, BSA 2%, bacitracina. 2mg/ml.
- ^{125}I -VIP: Una alícuota de VIP (stock) se repurifica con talco y se diluye en TBB .
- Preparación de membranas de hígado de rata parcialmente purificadas obtenidas por el método de Neville.
- Tampón Tris 35 mM, pH 7'5, Lubrol PX 0'5%, DTE 0'2mM (tampón A).
- Sacarosa al 50%.

b) Método

- Todas las etapas deben ser realizadas a 4°C.
- En tubos de plástico (3 ml), añadir suspensión de membranas hasta un volumen final que contenga aproximadamente 10 mg de proteínas. Centrifugar 10 min. Eliminar el sobrenadante.
- Añadir VIP marcado en TBB de forma que quede a una concentración final de 50 pM y pasarlo al tubo que contiene la preparación de membranas. Agitar.
- Incubar 30 min a 15°C. Centrifugar en microfuga 5 min. Decantar el sobrenadante.
- Añadir 1 ml de tampón A. Agitar e incubar 15 min a 4°C realizando en este período tres sonicaciones de 30 seg cada uno. Añadir 100ul de sacarosa al 50%. Centrifugar 90 min a 100.000 xg.
- El sobrenadante se hace pasar a través de la columna de sepharose 6B. El tampón de elución es el tampón A, y se recogen fracciones de 1 ml cada una. La radioactividad se mide en contador γ . Las proteínas se miden por densidad óptica a 280 nm.

B) Interacción tras la solubilización.

a) Reactivos

- Fracción del solubilizado con alto contenido en detergente.

- ^{125}I -VIP: Una alícuota del VIP marcado (stock) se repurifica con talco y se diluye en TBB.
- Tampón Tris 35mM, pH 7'5, Lubrol PX 0'5%, DTE 0'2 mM. (tampón A).

b) Método

- La fracción solubilizada con alto contenido en detergente (1 ml), es incubada con ^{125}I -VIP a concentraciones de 50 pM (115 pg), durante 30 min a 15°C.
- La solución incubada se hace pasar por la columna de Sepharose 6B y eluidas con el tampón A, recogiendo fracciones de 1 ml cada una, midiendo la radioactividad en contador γ y las proteínas en densidad óptica a 280 nm.

Para comprobar la especificidad de la unión se realizan incubaciones de la fracción solubilizada con alto contenido en Lubrol PX en presencia del trazador y una concentración en exceso de VIP frío.

a) Reactivos

- Fracción de solubilizado con alto contenido en Lubrol.
- VIP frío: VIP nativo a concentración final de 1 μM .
- ^{125}I -VIP: 50 pM de concentración final.
- Tampón Tris 35 mM, pH 7'5, DTE 0'2 mM, Lubrol PX 0'5%.

b) Método

- La fracción solubilizada con alto contenido en el detergente (1 ml), es preincubada con el VIP frío (1 μ M) durante 5 min. Se añade a continuación el 125 I-VIP (50 pM) y se incuba durante 30 min a 15°C.
- La solución incubada se hace pasar por la columna de Sepharose 6B y es eluida con el tampón A, recogiendo fracciones de 1 ml cada una. La radioactividad es medida en contador γ . Las proteínas son controladas por densidad óptica a 280 nm.

7.3.2. EN PRESENCIA DE LUBROL PX A BAJA CONCENTRACION.

a) Reactivos

- Fracción solubilizada con bajo contenido en Lubrol PX, obtenida según el método descrito en el apartado 6 de Material y Métodos.
- Tampón Tris 35 mM, pH 7'5, DTE 0'2 mM, EDTA 1mM, (tampón B).
- 125 I-VIP: Una alícuota del VIP marcado (stock) se repurifica con talco y se diluye en TBB de modo que quede a una concentración final de 50 pM.

b) Método

- Incubar 1 ml de la fracción solubilizada con bajo contenido del detergente con 125 I-VIP a una concentra-

ción final de 50 pM (115 pg), a 30°C durante 30 min. Enfriar a 4°C. Añadir 100 μ l de sacarosa al 50%.

- Cromatografiar en columna de Sepharose 6B previamente equilibrada con el tampón B. La elución se lleva a cabo con el mismo tampón B. Recoger alícuotas de 1 ml y medir la radioactividad en contador γ . Las proteínas son medidas por densidad óptica a 280 nm.

Para comprobar la especificidad de la unión ^{125}I -VIP-receptor, se realizan incubaciones de la fracción solubilizada con bajo contenido en el detergente en presencia del trazador y una concentración en exceso del VIP no marcado.

a) Reactivos

- Fracción del solubilizado con bajo contenido en Lubrol PX
- Tampón Tris 35 mM, pH 7.5, DTE 0.2 mM, EDTA 1 mM (tampón B).
- ^{125}I -VIP: VIP marcado (stock) se repurifica con talco y se diluye en TBB de modo a que quede a una concentración final de 50 pM.

b) Método

- Preincubar 1ml de la fracción solubilizada con el VIP frío a una concentración en exceso (1 μ M) durante 5 min.

Se añade a continuación el ^{125}I -VIP (50 pM) y se incuba durante 30 min a 15°C .

- La solución incubada se hace pasar por la columna de Sepharose 6B y es eluida con el tampón A, recogiendo fracciones de 1 ml cada una. La radioactividad es medida en contador γ . Las proteínas son controladas por densidad óptica a 280 nm.

8. INTERACCION DEL ^{125}I -VIP CON LA FRACCION SOLUBILIZADA

SEGUN ENSAYO DE HUMMEL Y DREYER.

Hummel y Dreyer (1962) desarrollaron un método para estudiar interacciones reversibles entre macromoléculas y sustancias de bajo peso molecular. Una proteína P, es colocada en una solución con un ligante L (trazador radioactivo) al cual se une, en esta solución la cantidad de L es reducida en una cantidad equivalente al complejo P-L formado.

Una alícuota de esta solución es colocada en una columna de Sephadex G-50 equilibrada con la misma solución de L usada para la proteína. La columna es eluida con la misma solución de L. La radioactividad es medida en el eluato.

Conforme el complejo P-L aparece en el eluato, la radioactividad en exceso emerge en un pico por encima de la línea basal de radioactividad. Inmediatamente después de este pico de radioactividad, la concentración de L en el eluato decrece por debajo de la línea base formando una depresión que se extiende hasta el volumen final de la columna. Esta depresión representa la cantidad de L que no se unió a la proteína (L libre) y es proporcional al exceso de concentración de L en el pico de proteínas.

Preparación de la columna.

a) Reactivos

- Sephadex G-50: solución acuosa.
- NaCl 0'1 M.
- Tampón Tris 35 mM, pH 7'5, EDTA 1'0 mM, BSA 0'1% (tampón C), conteniendo ^{125}I -VIP (50.000 c.p.m./ml aproximadamente), preparado en el momento de su uso.

b) Método

- Pequeñas columnas de plástico de 9 x 0'9 cm son rellenas con Sephadex G-50 (exclusión de pesos moleculares de 1.500-30.000). Las moléculas con peso molecular por encima de estos límites son totalmente excluidas en el V_0 de la columna, las de menor tamaño son eluidas en el volumen total de la columna.
- La columna es prelavada con NaCl 0'1 M y posteriormente equilibrada a 4°C con tampón C conteniendo ^{125}I -VIP (50.000 c.p.m./ml). La columna es conservada a 4°C hasta su uso.

Incubación de la fracción solubilizada.

a) Reactivos

- Fracción solubilizada con bajo contenido en Lubrol PX obtenida según el método descrito en el apartado 6 de Material y Métodos.

- Tampón Tris 35 mM, pH 7'5, EDTA 1 mM, BSA 0'1%, conteniendo ^{125}I -VIP (50.000 c.p.m./ml), (tampón C).
- VIP no específico: (1 μM).
- Sacarosa al 50%.

b) Método

- 20 μl de la fracción solubilizada (27'2 μg de proteínas), se incuban con 0'5 ml del tampón C conteniendo ^{125}I -VIP a tiempos de 5, 15 y 30 min y a 30 min en presencia de una concentración en exceso de VIP no específico (1 μM). Añadir 100 μl de sacarosa al 50%.
- Una alícuota de 0'2 ml es pasada en columna de Sephadex G-50 y se recogen fracciones de 0'2 ml. El tampón de elución es el mismo tampón C. La radioactividad es medida en contador γ .

9. DETERMINACION DEL PESO MOLECULAR DEL COMPLEJO

^{125}I -VIP-RECEPTOR.

a) Reactivos

- Sepharose 6B.
- Tris 35 mM, pH 7'5, DTE 0'2 mM, EDTA 1 mM. (tampón B)
- Solución patrón de pesos moleculares; 3 mg de las siguientes proteínas disueltas en 1 ml de tampón B:
 - Tiroglobulina (P.m. 660.000)
 - Ferritina (P.m. 450.000)
 - Catalasa (P.m. 240.000)
 - Hemoglobina (P.m. 68.000)
- ^{125}I -VIP incubado con la fracción solubilizada.

b) Método

- En una columna de Sepharose 6B (28 x 1'5 cm), previamente equilibrada con el tampón B, se aplica un volumen de 0'5 ml de la solución patrón de pesos moleculares. Se recogen muestras de 1 ml y se mide la densidad óptica de cada fracción a las longitudes de onda de máxima absorción de cada una de las proteínas empleadas: tiroglobulina a 280 nm, ferritina, catalasa y hemoglobina a 405 nm.
- Para la cromatografía del complejo ^{125}I -VIP-receptor se procede del mismo modo que para la solución patrón de pesos moleculares.

RESULTADOS

1. SOLUBILIZACION DE MEMBRANAS HEPATICAS.

1.1. DETERMINACION DE PROTEINAS.

Membranas plasmáticas de hígado de rata parcialmente purificadas por el método de Neville (1968), fueron solubilizadas con el detergente no iónico Lubrol PX a una concentración de 0'5% según el proceso visto en el apartado 6 de Material y Métodos.

Tras la solubilización, se procedió a eliminar el detergente presente en el medio mediante repetidas filtraciones y lavados en Minicón B-15 con posterior ultracentrifugación para eliminar una posible precipitación proteica. La recuperación de proteínas se determina por el método de Lowry (1951).

En la tabla 1 se representan los valores de proteínas obtenidas en la preparación de membranas y la recuperación de las mismas al finalizar el proceso total de la solubilización. Como se puede apreciar, las proteínas presentes en la fracción solubilizada representan casi un 50% del total presente en las membranas.

Tabla 1

Recuperación de proteínas de membranas solubilizadas con Lubrol PX, expresada en valores absolutos y porcentuales. (\bar{X} de dos experiencias por triplicado)

	proteínas(mg)	% recuperación
Membranas parcialmente purificadas.	14'4	47'2
Membranas solubilizadas	6'8	

2. INTERACCION DEL ^{125}I -VIP-FRACCION SOLUBILIZADA

2.1. IDENTIFICACION DEL COMPLEJO ^{125}I -VIP FRACCION SOLUBILIZADA.

Una vez conocida la concentración de proteínas de la fracción solubilizada el paso siguiente consiste en verificar la existencia de receptores de VIP. Para ello se hace necesario el uso de un trazador radiactivo, en este caso el ^{125}I -VIP, con el cual seguir la unión del mismo al receptor.

Para verificar esta unión es necesario separar la fracción libre de la fracción ligada y determinar la radiactividad de esta última como índice de la unión del trazador al receptor. En células intactas y membranas, la separación del complejo se hace simplemente mediante centrifugación; en fracciones solubilizadas, sin embargo, este proceso no es viable, debido a lo cual se hace necesario encontrar un sistema de separación adecuado a este método de trabajo.

En el presente trabajo se estudian tres métodos de separación:

- a) Polietilenglicol
- b) Carbón dextrano
- c) Filtración en gel en agarosa al 6%.

A) Separación mediante el uso de polietilenglicol.

El polietilenglicol es ampliamente utilizado en técnicas de radioinmunoensayo para la separación de la fracción libre de la fracción ligada. Su mecanismo general de acción es una precipitación fraccionada que actúa reduciendo la cantidad de agua "libre" del sistema, de tal forma que, proteínas con un punto isoeléctrico cercano a la neutralidad precipitan antes que aquellas que tienen un punto isoeléctrico ácido o básico.

Se pretende verificar si el polietilenglicol es capaz de precipitar la molécula del ^{125}I -VIP-receptor sin precipitar el trazador radiactivo libre.

En la Fig. 9 , se representa el efecto de diferentes concentraciones de polietilenglicol sobre la precipitación del ^{125}I -VIP libre. Como puede observarse, la precipitación del péptido libre es proporcional a la concentración de polietilenglicol. De acuerdo con esto, para las experiencias siguientes se eligió una concentración del polietilenglicol al 5% ya que a este valor, el porcentaje del trazador precipitado permanecía inferior al 15% (tabla 2).

Para disminuir los valores del blanco, se llevó a cabo la precipitación con polietilenglicol al 5% en presencia de concentraciones crecientes de albúmina bovina (BSA). Como puede verse en la Fig. 10 , la adición de albúmina al medio disminuye la precipitación del trazador libre por polietilenglicol de tal forma que se alcanza sólo un 5% a concentraciones de albúmina tan altas como 8%, (tabla 3). La presencia de Lubrol PX en el medio de incubación no modifica la precipitación del $^{125}\text{I-VIP}$.

Una vez encontradas las condiciones aparentemente óptimas para el proceso de separación del complejo $^{125}\text{I-VIP}$ -fracción solubilizada del trazador libre, se procede a la incubación de un solubilizado de membranas con bajas concentraciones de Lubrol, en presencia del trazador, tras lo cual se añade la albúmina y el polietilenglicol y se centrifuga contándose la radioactividad del precipitado. En la tabla 4 se observa como con este método no se consigue detectar la unión específica entre el $^{125}\text{I-VIP}$ y las proteínas solubilizadas.

Este resultado negativo puede deberse:

- 1) A la ausencia de receptores específicos para el $^{125}\text{I-VIP}$ en la fracción solubilizada.
- 2) A que el complejo $^{125}\text{I-VIP}$ -receptor no sea precipitable por el polietilenglicol.

Tabla 2

Porcentaje de ^{125}I -VIP precipitado en presencia de concentraciones crecientes de polietilenglicol (\bar{X} de triplicados)

	PEG (g%)									
	0	3	5	8	9	10	11	12	15	18
^{125}I -VIP ppdo (% total)	7	12	14	16	17	18	20	22	26	31

Tabla 3

Porcentaje de ^{125}I -VIP precipitado por polietilenglicol en presencia de concentraciones crecientes de albúmina (\bar{X} de triplicados).

	BSA (g%)							
	1'2	1'8	3'0	3'6	4'2	5'4	6'6	7'8
^{125}I -VIP ppdo (% total)	13'5	15'0	13'0	10'2	8'0	7'0	7'0	5'5

Tabla 4

Porcentaje de unión específica de ^{125}I -VIP a proteínas solubilizadas en ausencia y presencia de concentraciones crecientes de VIP frío (10^{-11} - 10^{-7}M).

^{125}I -VIP (% total) N.S. (n = 3)
------------------------------------	--------------------

%¹²⁵I-VIP ppdo.

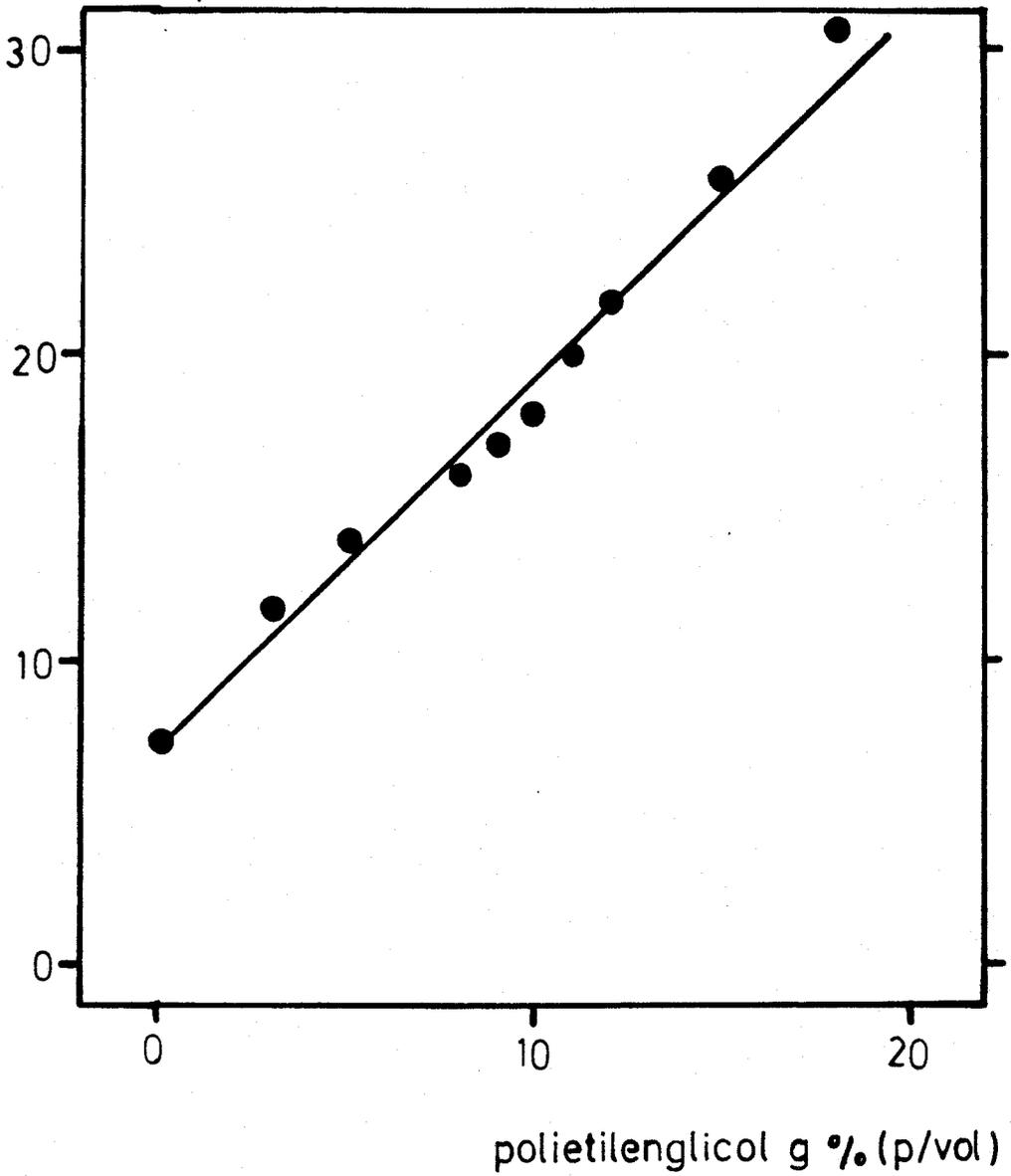


Fig. 9 Efecto de la concentración del polietilenglicol sobre la precipitación del ¹²⁵I-VIP.

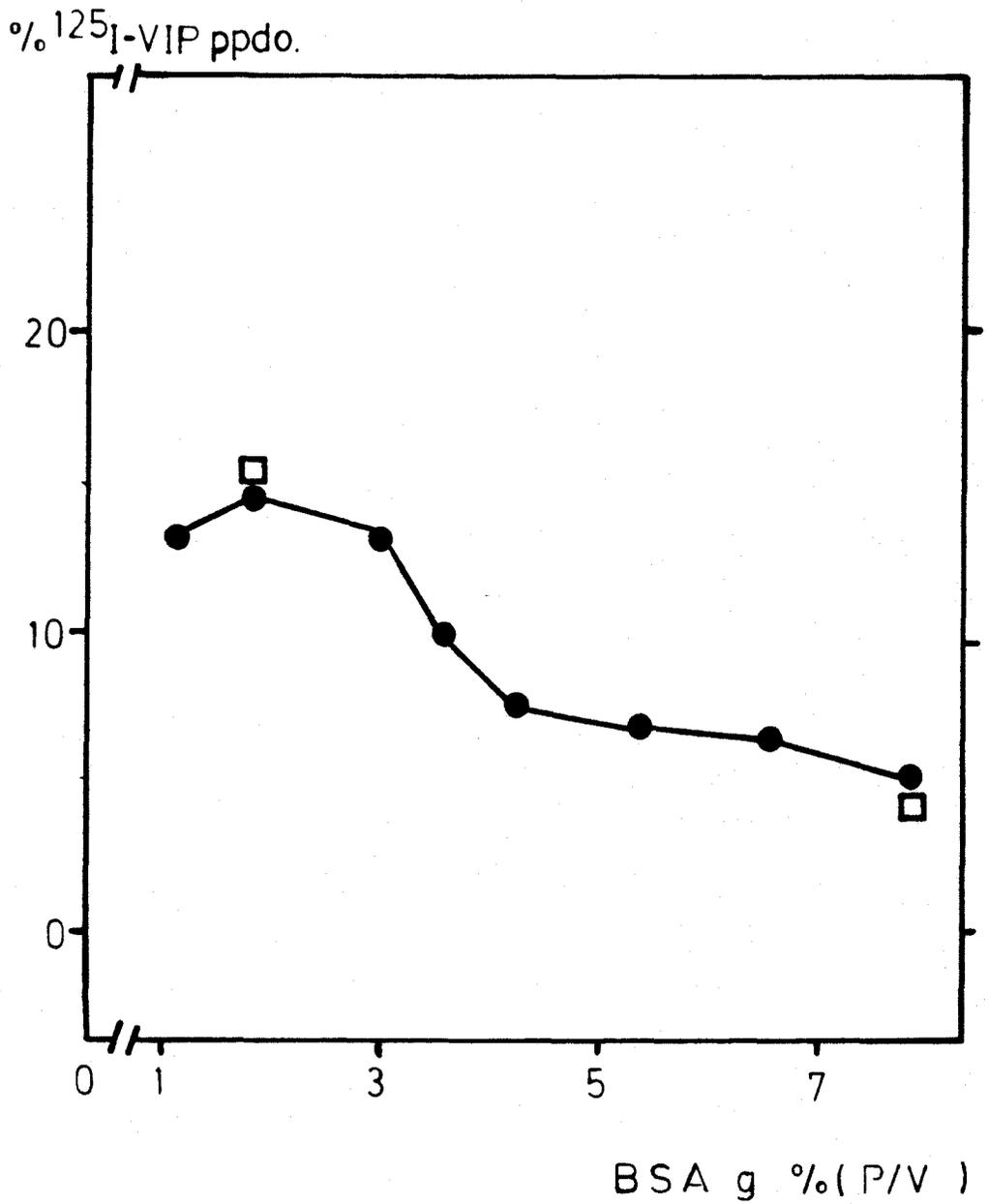


Fig. 10 Efecto de la concentración de albúmina sobre la precipitación del $^{125}\text{I-VIP}$ por polietilenglicol (en presencia de Lubrol PX 0'5%, ● ; en ausencia de Lubrol PX, □)

B) Separación mediante el uso de carbón.

La separación mediante carbón está basada en la adsorción de moléculas biológicas a la superficie de ciertas partículas. Se recomienda el " pre-tratamiento " de estas partículas con sustancias con peso molecular adecuado al tamaño máximo de sus poros, a fin de evitar que en ellos se situen macromoléculas como puedan ser el complejo trazador-receptor. En el presente caso el carbón es pre-tratado con albúmina (PM=67.000).

Del mismo modo que con el polietilenglicol, es necesario comprobar que el carbón es capaz de separar de modo eficaz, la fracción libre del trazador radioactivo de la fracción ligada a las proteínas solubilizadas.

En la Fig. 11 , tabla 5 , se expresa el porcentaje de de ^{125}I -VIP precipitado con el carbón en ausencia y presencia de concentraciones crecientes del detergente Lubrol PX. Como puede observarse, casi la totalidad de VIP marcado es precipitada por el carbón, sin que el detergente presente en el medio tenga algún efecto.

En vista de estos resultados, se efectúa la incubación de la fracción solubilizada con el ^{125}I -VIP en presencia de concentraciones crecientes de VIP frío tras lo cual se procede a la separación mediante el carbón, para obtener en el sobrenadante el complejo ^{125}I -VIP-receptor.

La tabla 6 , muestra que esto no ocurre, obteniéndose valores muy similares a los conseguidos en el control, indicando que en este caso, al igual que con el polietilenglicol, o no hay receptores para el péptido intestinal vasoactivo, o bien que la molécula del ^{125}I -VIP-receptor, sea de peso molecular lo bastante bajo para ser también precipitado con el carbón.

Tabla 5

Separación del ^{125}I -VIP libre mediante carbón. Efecto de la ausencia y presencia del detergente a concentraciones crecientes (\bar{x} de triplicados).

	Lubrol PX (g%)			
	0	0'1	0'5	1
^{125}I -VIP ppdo (% del total)	92	93	94	91

Tabla 6

Porcentaje de unión específica de ^{125}I -VIP a proteínas solubilizadas en ausencia y presencia de concentraciones crecientes de VIP frío (10^{-11} - 10^{-7} M).

^{125}I -VIP (% total) N.S. (n = 3)
------------------------------------	--------------------

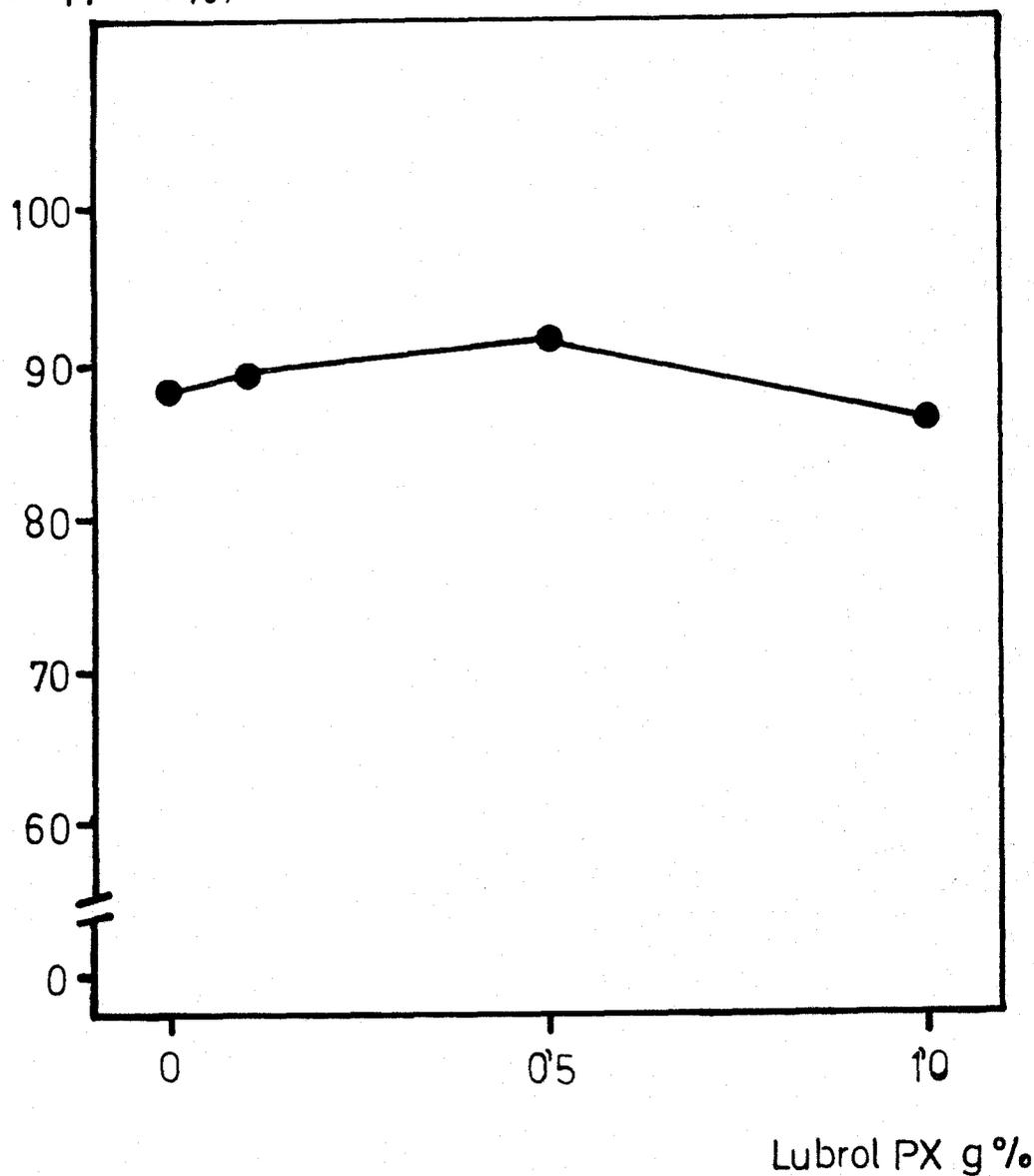
$^{125}\text{I-VIP}$ ppdo (%)

Fig. 11 Efecto de la concentración del detergente sobre la precipitación del $^{125}\text{I-VIP}$ por el carbón.

C) Separación mediante filtración en gel.

Por definición el complejo trazador-proteínas ligadas, debe ser mayor que el trazador libre y puede obtenerse la separación en dos fases mediante cromatografía de exclusión de pesos moleculares. El material de bajo peso molecular (trazador libre) se distribuye libremente dentro y fuera del gel, mientras que el complejo unido no puede atravesar libremente la malla formada por el gel y es segregada en una pequeña parte del sistema.

En el presente caso la filtración en gel se lleva a cabo en columna (28 x 1'5 cm) con agarosa al 6%, presentando exclusión de pesos moleculares de 10^4 - 4×10^6 para proteínas y 10^4 - 1×10^6 para polisacáridos.

Para la calibración de la columna se emplea el azul dextrano, con un peso molecular de 2.000.000 y el Na^{125}I con un peso molecular de 148. La Fig. 12 muestra los límites de exclusión de la columna, con el azul dextrano indicando el volumen vacío de la columna (V_0), y el Na^{125}I en el volumen total de la misma (V_t).

Una vez determinados los límites de exclusión de la columna se hace pasar por la misma ^{125}I -VIP y se determina su volumen de salida. En la Fig. 13 puede observarse el patrón de elución de ^{125}I -VIP en tampón Tris 35mM en ausencia de cualquier otro factor. El ^{125}I -VIP eluye en un volumen próximo al V_t .

En la Fig. 14 se observa el patrón de elución del ^{125}I -VIP y de la albúmina (peso molecular = 67.000) como marcador proteico.

Está descrito en la literatura (Giorgio et al, 1974; Jacobs et al, 1977.) que los detergentes no iónicos, como los de la serie Tritón X y lubrol PX forman, en algunos casos, micelas con el trazador radioactivo, alterando así el patrón cromatográfico posterior. Para comprobar si esto ocurre efectivamente, el ^{125}I -VIP es cromatografiado en gel de agarosa (Sepharose 6B) en ausencia de membranas y en presencia del detergente no iónico Lubrol PX, a una concentración de 0'5% en tampón A. Bajo estas condiciones, el ^{125}I -VIP aparece próximo al Volumen total de la columna; no se observa la aparición de ningún pico que pueda corresponder a una asociación micelar del detergente y el trazador; es decir, que el patrón cromatográfico del ^{125}I -VIP no se modifica por la presencia del detergente. (Fig. 15)

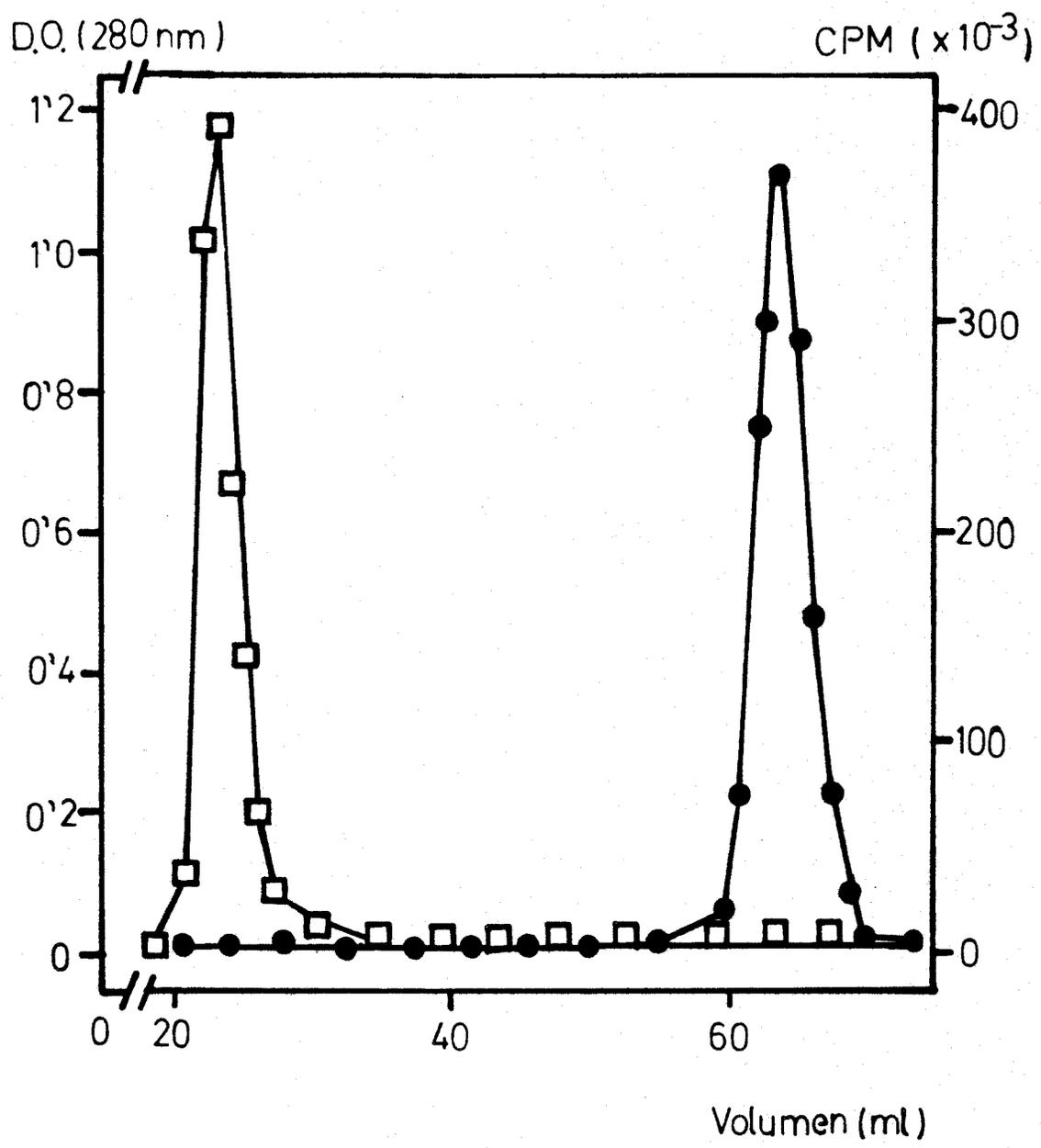


Fig. 12 Calibración de la columna de Sepharose 6B con azul dextrano (□-□) y ¹²⁵I (●-●).

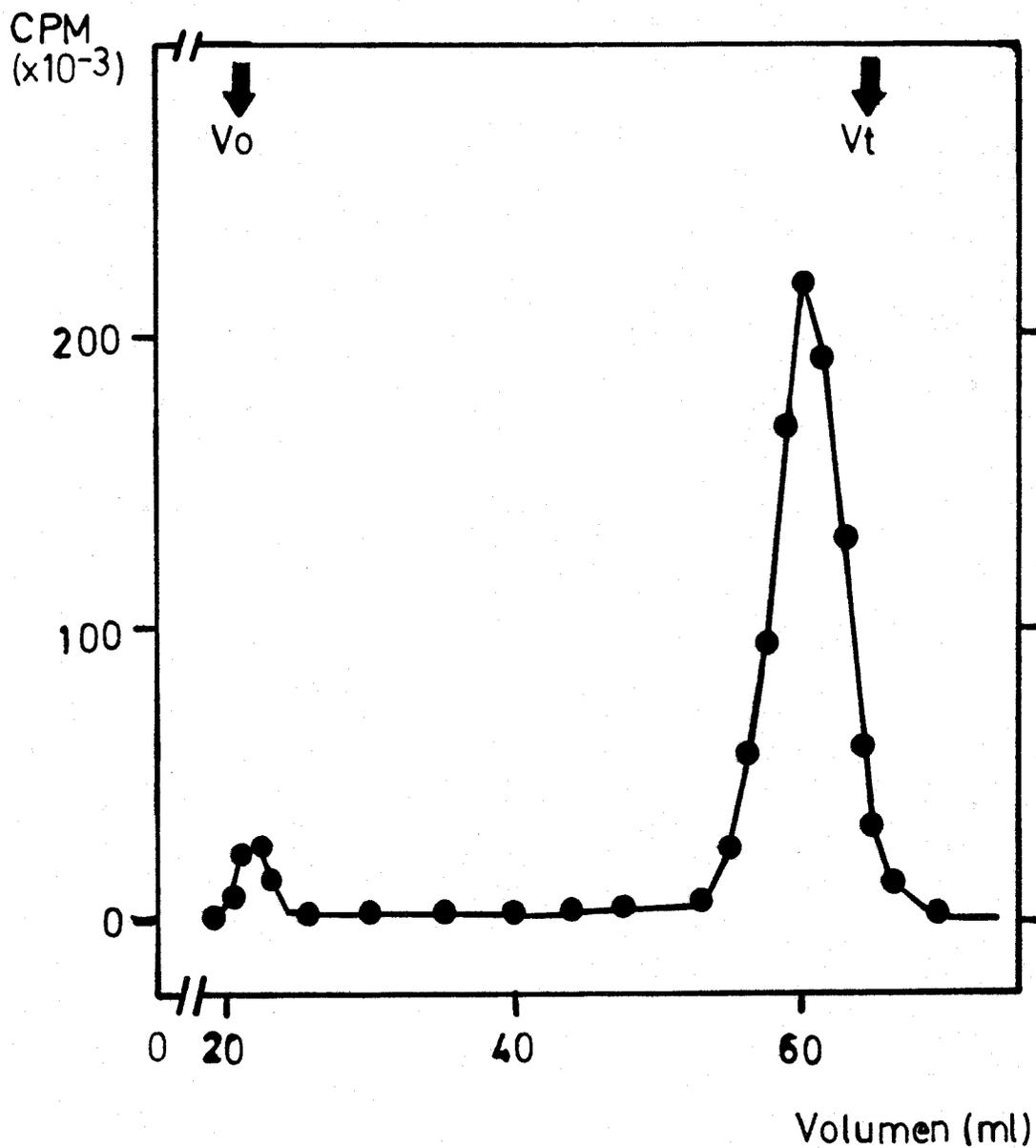


Fig. 13 Patrón de elución del ^{125}I -VIP en columna de Sepharose 6B.

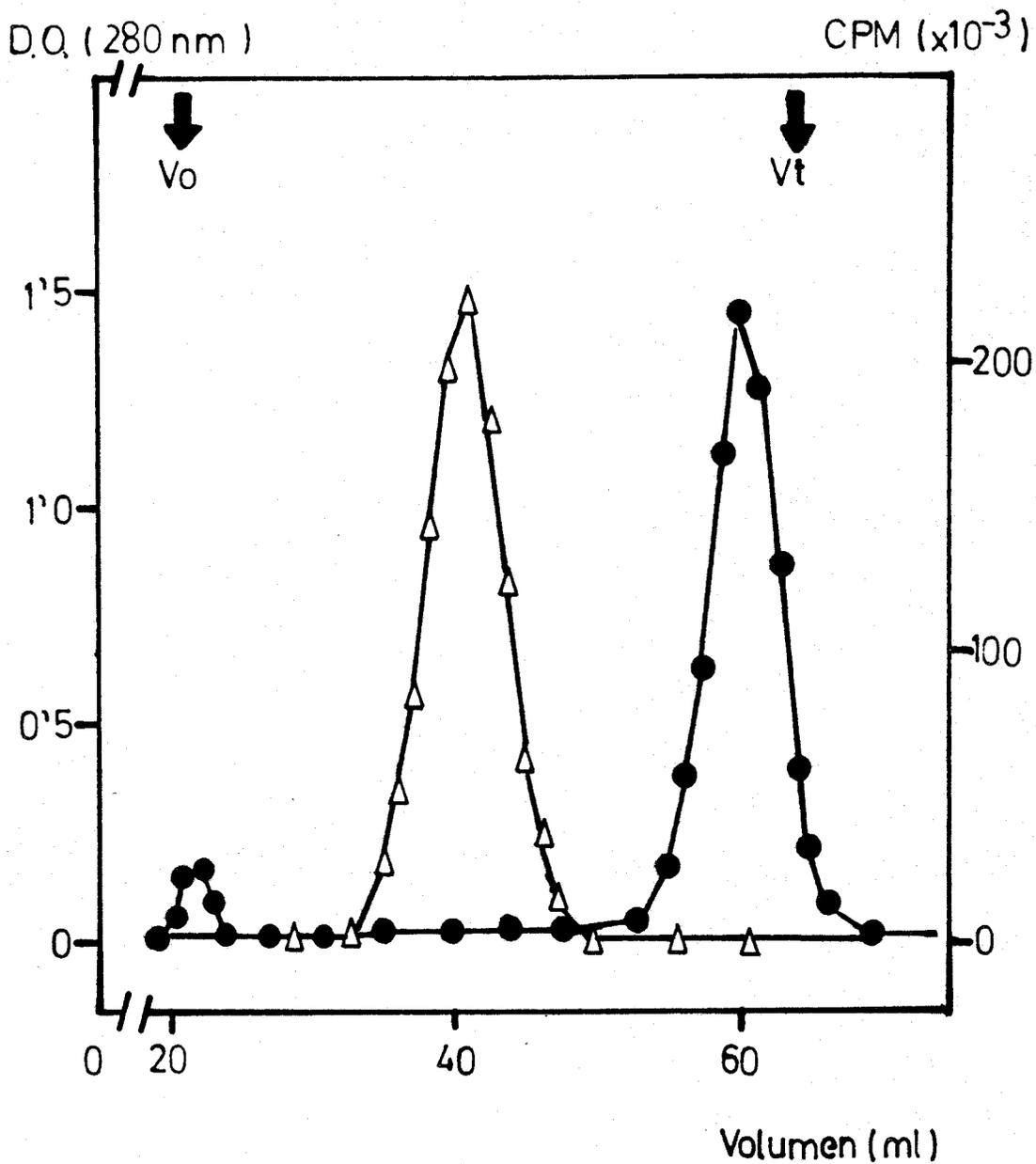


Fig. 14 Patrón de elución del ^{125}I -VIP en columna de Sepharose 6B (\bullet - \bullet) con BSA como marcador proteico. (Δ - Δ)

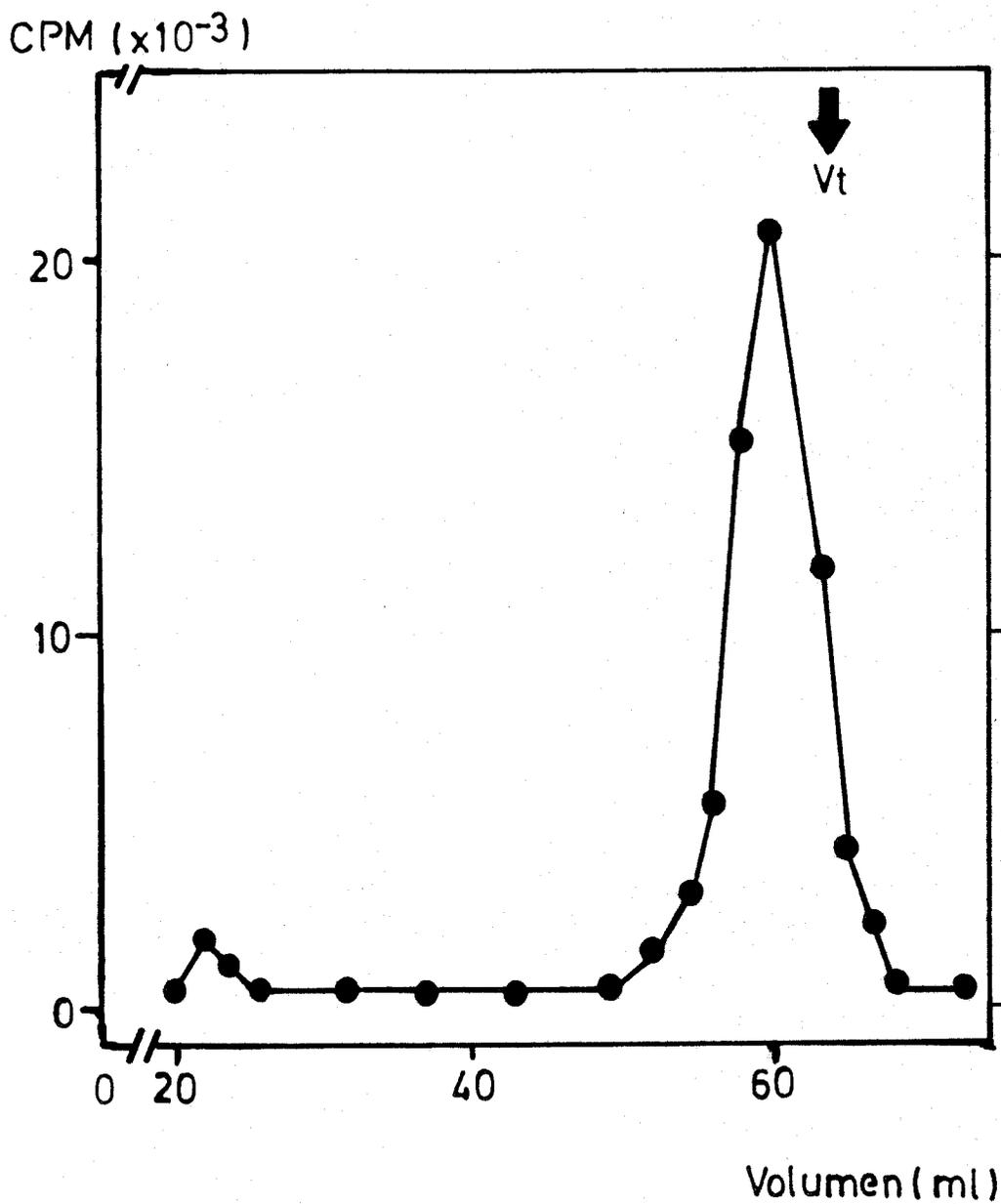


Fig. 15 Patrón de elución del ^{125}I -VIP en columna de Sepharose 6B en presencia de Lubrol PX.

Interacción previa a la solubilización.

En los primeros experimentos realizados, membranas plasmáticas de hígado de rata (14'4mg de proteína), fueron incubadas con ^{125}I -VIP en tampón Tris 35 mM, pH 7'5 y recuperadas mediante centrifugación. Las proteínas marcadas fueron extraídas con Tampón A conteniendo Lubrol PX 0'5% y posteriormente fueron cromatografiadas en columna de Sepharose 6B. La elución de proteínas fue seguida midiendo la absorvancia a 280 nm. El ^{125}I -VIP fue medido mediante contaje de radioactividad en contador .

La Fig.16 muestra el patrón de proteínas obtenido. Como puede observarse, las proteínas son eluidas en tres picos: un pico de proteínas de gran peso molecular que aparecen en el volumen vacío de la columna; un segundo pico que se sitúa en un volumen aproximado de 46 ml, y un tercer pico próximo al V_t de la columna.

En la Fig.17 se puede ver el patrón radioactivo obtenido de la experiencia descrita; en esta gráfica se observa la presencia de dos picos significativos, el primero próximo al V_t de la columna y que se corresponde con el ^{125}I -VIP, según se ve en el experimento control, y el segundo, eluyendo en un volumen aproximado de 46ml. La existencia de este segundo pico, coincidente con una absorción espectrofotométrica, apuntaría hacia la exis-

tencia de un complejo ^{125}I -VIP-fracción solubilizada, pero este pico aunque indicativo, no es concluyente, ya que el porcentaje de VIP marcado unido debería ser mayor. Hay que tener en cuenta que la fracción solubilizada contiene exclusivamente trazador unido a proteínas. Sin embargo el patrón cromatográfico proteico muestra que prácticamente toda la radioactividad se concentra en forma de ^{125}I -VIP libre. Esto quiere decir que durante el proceso de solubilización se produce la disociación del complejo VIP-receptor.

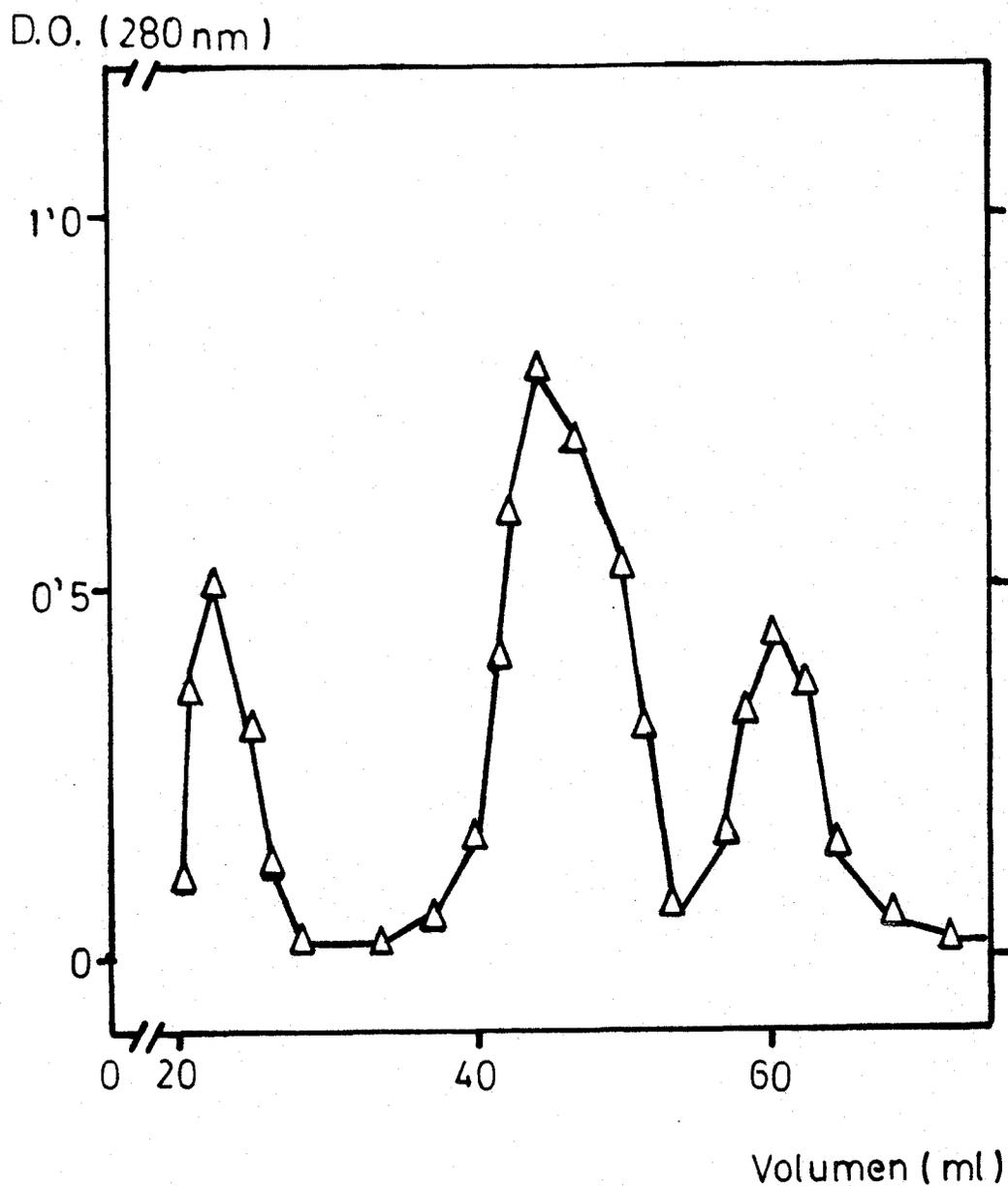


Fig. 16 Patrón de elución de proteínas solubilizadas con Lubrol PX.

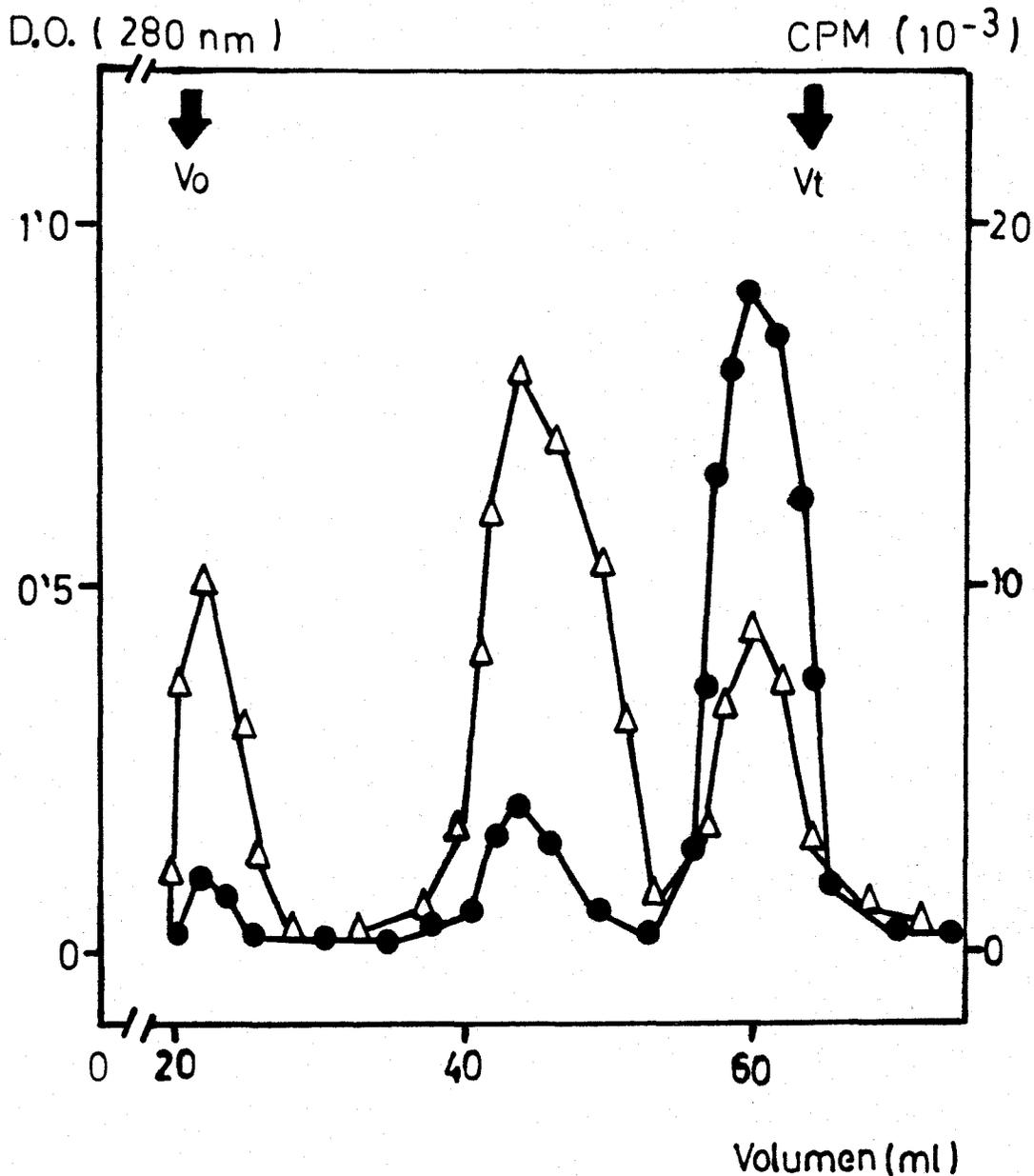


Fig. 17 Patrón de elución del trazador incubado con membranas previamente a la solubilización (●-●) (elución de proteínas □-□).

Interacción tras la solubilización.

En vista del resultado obtenido en el apartado anterior, se modificó el procedimiento en el sentido de obtener primero una fracción soluble, para lo cual se extrajeron las proteínas de membrana mediante incubación con tampón A conteniendo Lubrol PX 0'5% y posteriormente incubar esta fracción soluble con VIP marcado, tras lo cual se procedió a la filtración en gel de agarosa, siendo el tampón de elución el mismo Tampón A.

En la Fig. 18 se puede ver un patrón proteico y radioactivo similar al de la figura anterior, donde el porcentaje de ^{125}I -VIP unido a proteínas, es ligeramente mayor, pero sin ser aún representativo, pudiendose pensar que este pico de unión ^{125}I -VIP-proteínas, no representase una unión específica.

Para comprobar lo anterior, se hace necesario realizar una incubación en presencia del trazador y una concentración en exceso de VIP frío ($1\mu\text{M}$). En la Fig. 19 puede observarse el resultado. Al incubar la fracción solubilizada con un exceso de VIP frío el patrón radioactivo del pico de unión VIP-receptor debe estar muy disminuido. Como puede apreciarse, esto sólo ocurre en pequeño grado, indicando que este pico representa mayoritariamente una unión no específica.

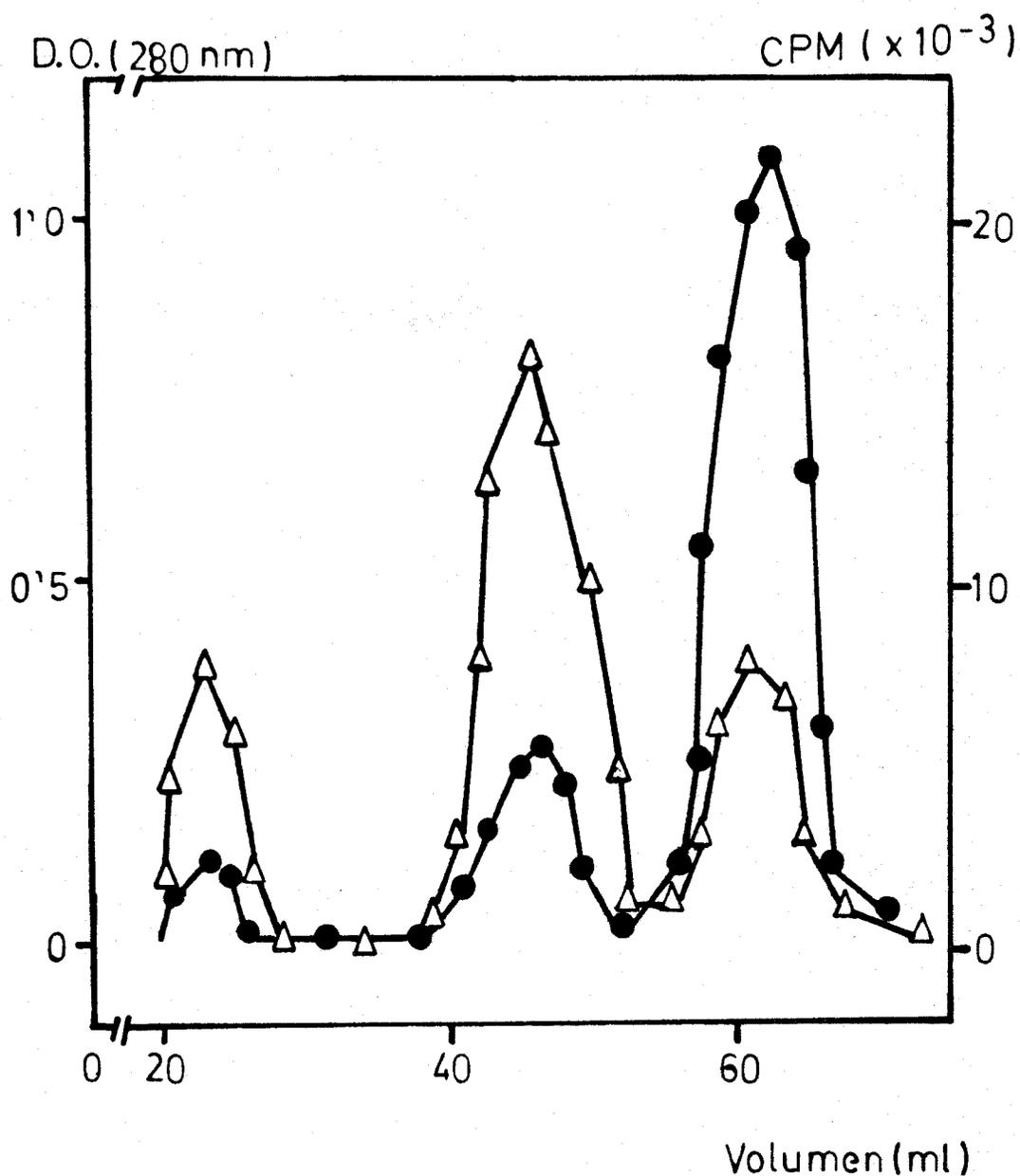


Fig. 18 Patrón de elución del trazador incubado con la fracción solubilizada en presencia de Lubrol PX (●-●), (elución de proteínas □-□).

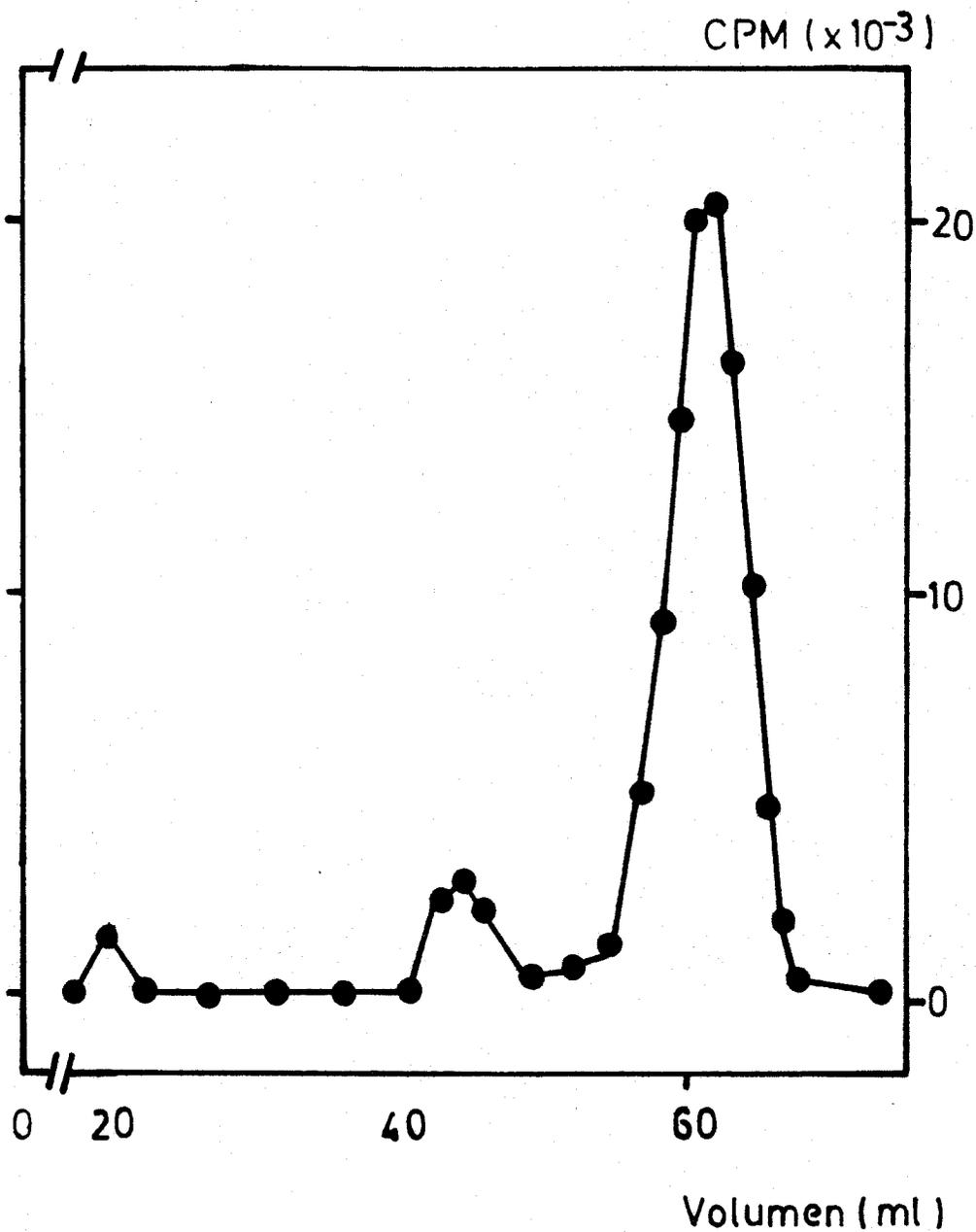


Fig. 19 Patrón de elución del trazador incubado con fracción solubilizada (con Lubrol PX) en presencia de VIP frío (1 μ M).

Interacción trazador-receptor en ausencia del detergente

Hasta este punto, en los intentos de separación e identificación del complejo ^{125}I -VIP-receptor, se había trabajado con fracciones solubilizadas que contenían el detergente a concentraciones muy altas (0'5 %) lo que podía ser el factor interferente, produciendo una unión inestable entre el VIP y sus proteínas específicas como está descrito para el caso del glucagón (Giorgio et al, 1974).

A fin de verificar esto, se trató de eliminar o al menos reducir la concentración del detergente a niveles que, manteniendo las proteínas en solución, no interfirieran con la unión trazador-receptor. Para ello se realizó primero la solubilización de las proteínas, tras lo cual y previa a la incubación con el trazador radioactivo, se procedió a reducir la concentración del detergente mediante los pasos citados en Material y Métodos. De esta forma se obtienen fracciones de solubilizado con bajo contenido en Lubrol (concentración teórica por debajo de 0'001%). Estas fracciones de solubilizado con bajo contenido del detergente van a ser sometidas a los procesos ya descritos de incubación con el ^{125}I -VIP y cromatografía en Sepharose 6B. El resultado está expresado en la Fig. 20 . Se verifica en este caso la existencia de dos picos, uno que eluye próximo

al volumen total de la columna y el otro con un punto máximo en el volumen de 46ml. En este caso este último pico representa aproximadamente un 50% de la radioactividad total, lo que parece indicar que sí se consigue una unión entre el trazador y las proteínas solubilizadas.

Al igual que en el caso anterior, es necesario confirmar la especificidad de esta unión, para lo cual se realiza la incubación de la fracción solubilizada con bajo contenido en Lubrol, con el trazador radioactivo en presencia de una concentración en exceso de VIP frío ($1\mu\text{M}$). La Fig. 21 muestra como, efectivamente, el pico de unión VIP-receptor desaparece, ya que el VIP frío ha desplazado casi completamente al trazador de su unión a las proteínas solubilizadas.

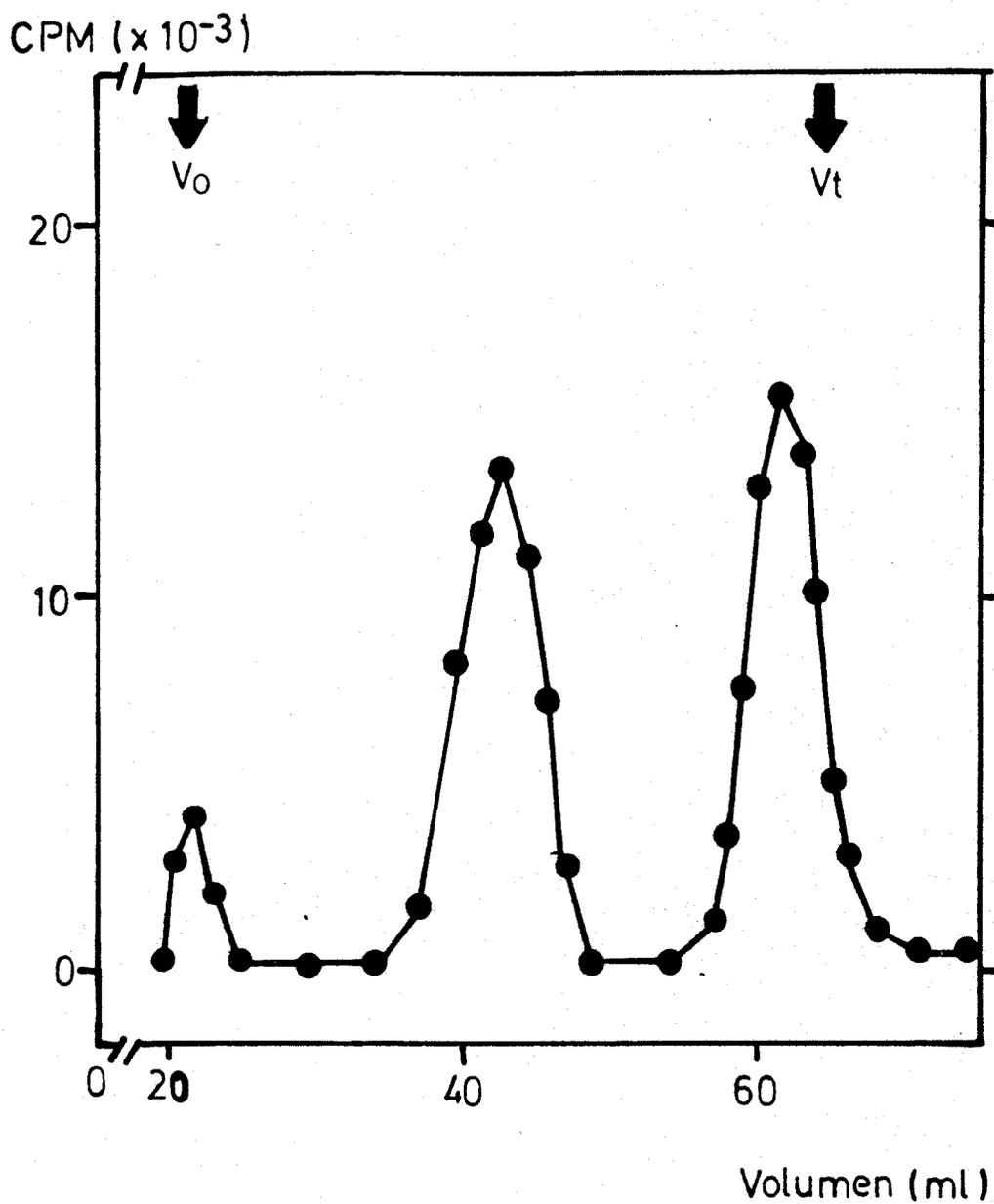


Fig 20 Patrón de elución del trazador incubado con la fracción solubilizada con bajo contenido en Lubrol PX.

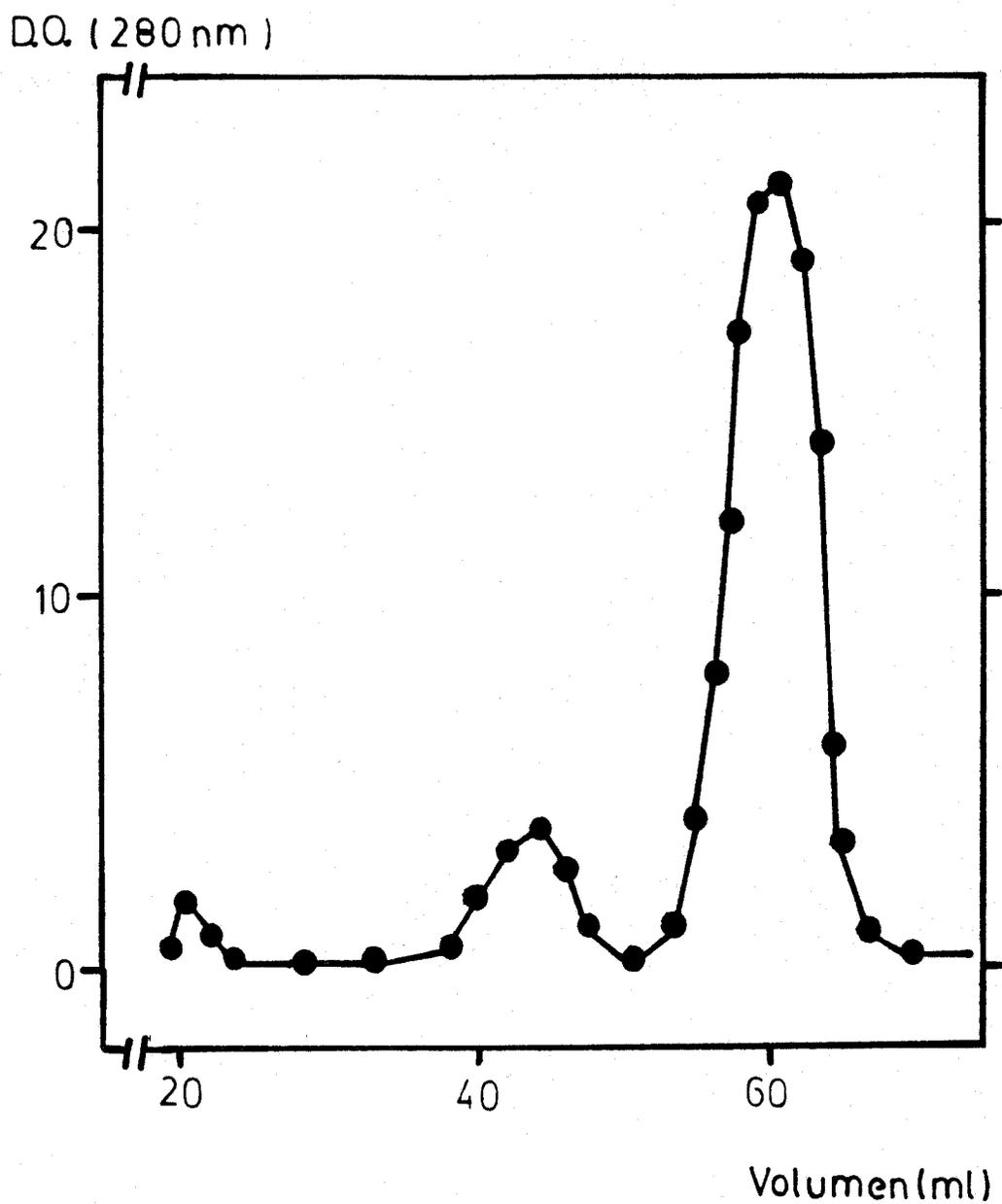


Fig. 21 Patrón de elución del trazador incubado con la fracción solubilizada (sin Lubrol PX) en presencia de VIP frío (1 μM)

2.2. INTERACCION DEL ^{125}I -VIP-FRACCION SOLUBILIZADA SEGUN ENSAYO DE HUMMEL Y DREYER.

Las siguientes experiencias se realizaron según el principio desarrollado por Hummel y Dreyer (1962). Para ello, una alícuota de fracción solubilizada (27'2 μg de proteínas) con bajo contenido en Lubrol se incubaba con tampón C que contiene ^{125}I -VIP (50 pM). Al término de la incubación 0'2 ml de la solución se aplican a una columna de Sephadex G-50 equilibrada y eluida con el mismo tampón C. En la fig.22 puede verse el patrón de elución del complejo ^{125}I -VIP-receptor según las condiciones descritas; como se observa, aparece un pico de radioactividad sobre la línea basal correspondiente al trazador unido a las proteínas solubilizadas, seguido de una depresión que representa el defecto de radioactividad ocasionado por la diferencia de emigración entre el trazador libre y el trazador unido a proteínas.

Una vez comprobada la interacción entre el ^{125}I -VIP y su receptor, se trató de estudiar esta interacción a diferentes tiempos, para lo cual se efectuaron incubaciones (30°C) a tiempo 5, 15 y 30 min, así como en presencia de VIP frío (30 min). Los resultados se expresan en la Fig. 23 . Prácticamente a todos los tiempos estudiados, los picos obtenidos son muy similares, indicando que se alcanza ya a los 5 min un alto porcen-

taje de unión que aumenta a los 15 min y alcanza un máximo a los 30 min. En la tabla 7 se expresa la unión del trazador a la fracción solubilizada en función de las proteínas.

Tabla 7

Unión del ^{125}I -VIP a proteínas solubilizadas de membranas en función del tiempo de incubación.

<u>Tiempo de incubación</u>	<u>pg ^{125}I-VIP/100 μg prot.</u>
5 min.....	39'7
15 min.....	61'9
30 min.....	70'3
Inespecífico (30 min).....	17'3

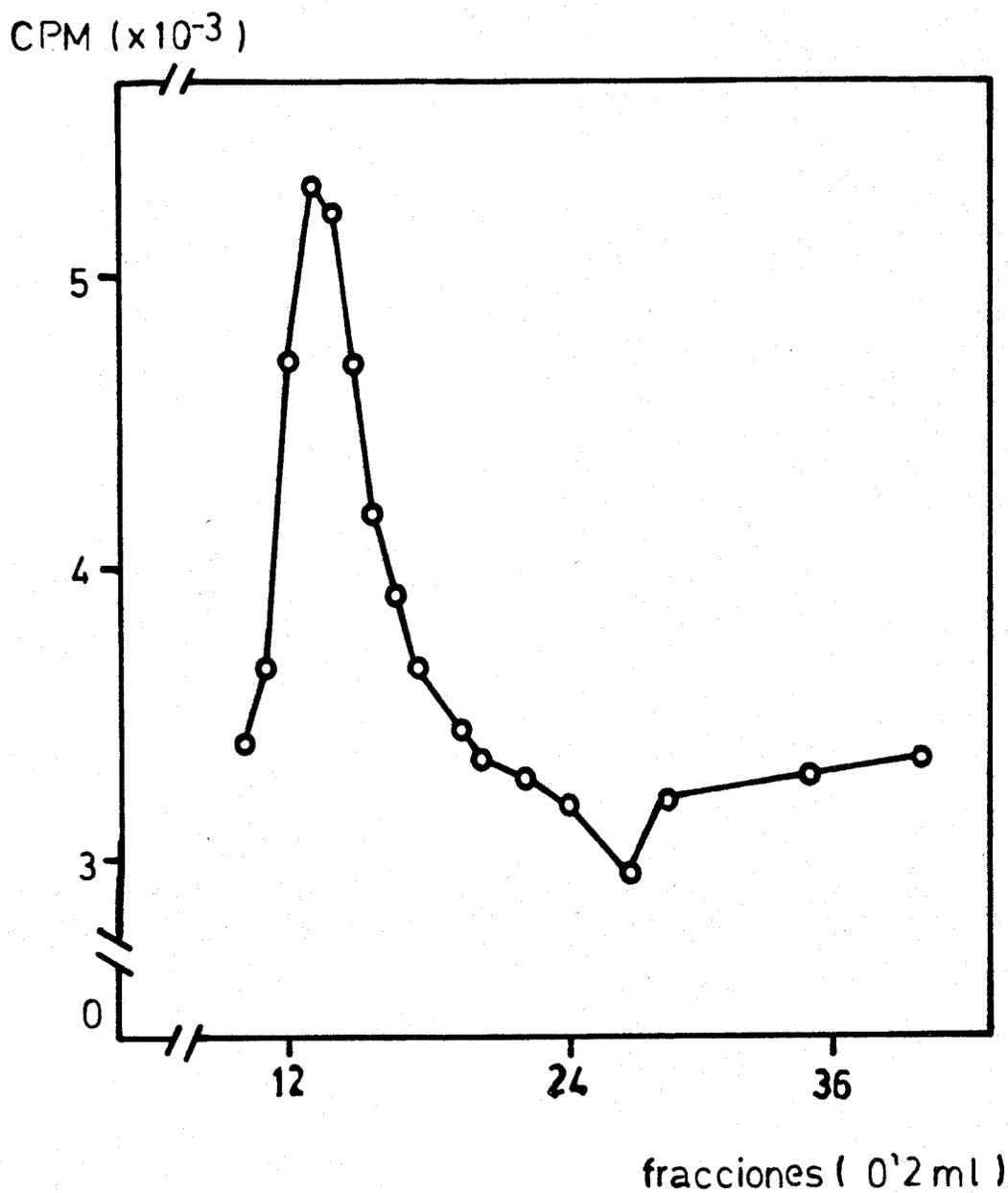


Fig. 22 Patrón de elución del trazador incubado con la fracción solubilizada con bajo contenido en Lubrol PX según el principio desarrollado por Hummel y Dreyer.

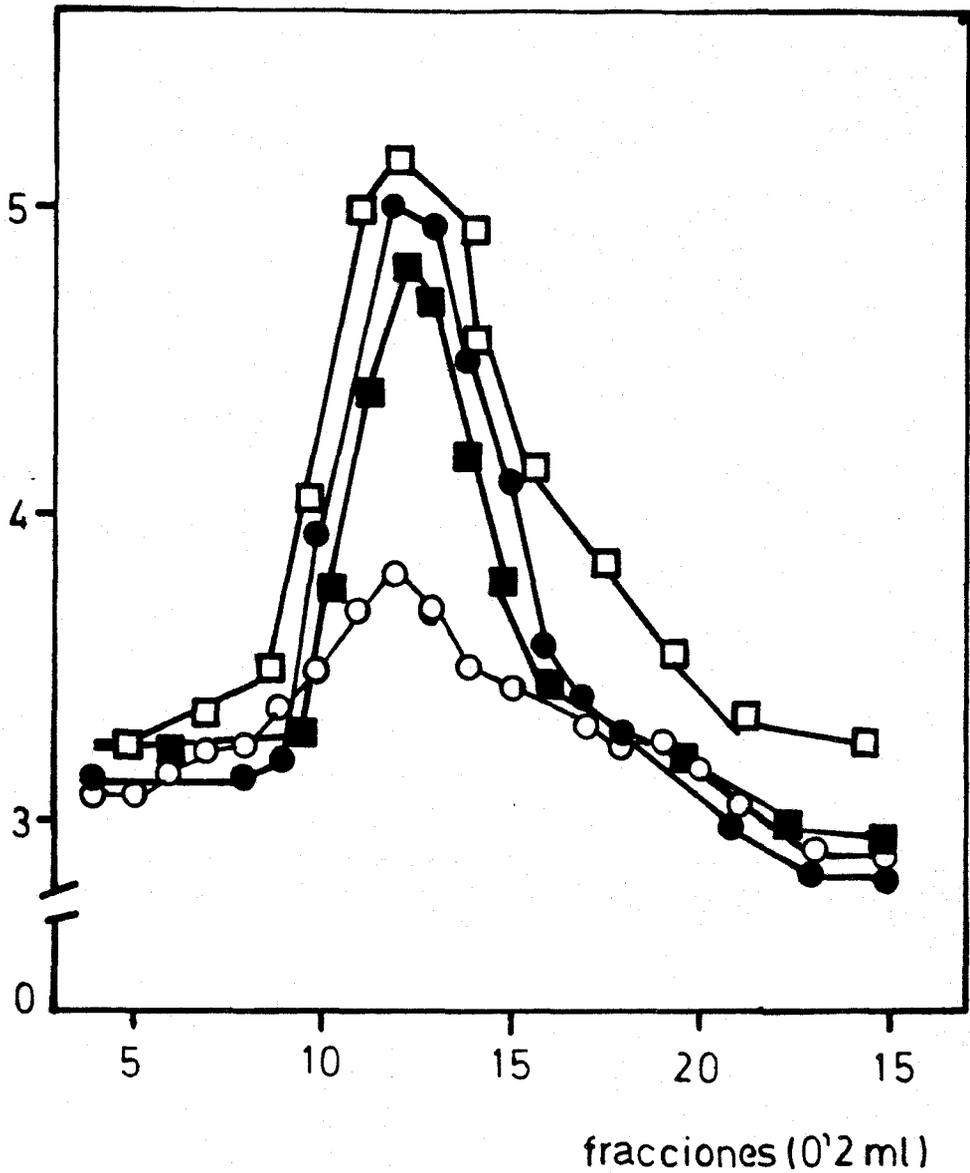
CPM ($\times 10^{-3}$)

Fig 23 Patrón de elución (Sephadex G-50) del trazador incubado con la fracción solubilizada con bajo contenido en Lubrol PX (5 min, ■-■ ; 15 min, ●-● ; 30 min, □-□ ; unión no específica ○-○)

3. PESO MOLECULAR DEL COMPLEJO ^{125}I -VIP-RECEPTOR.

La determinación del peso molecular del complejo ^{125}I -VIP-receptor se realizó mediante filtración en gel en columna de Sepharose 6B, según se describe en Material y Métodos.

Al representar gráficamente los pesos moleculares de la solución patrón de proteínas frente al volumen de elución de las mismas (Fig. 24), se obtiene una línea recta sobre la cual se interpola el volumen al cual eluye el complejo ^{125}I -VIP-receptor. De estos datos se estima que el peso molecular de este complejo es de aproximadamente 80.000.

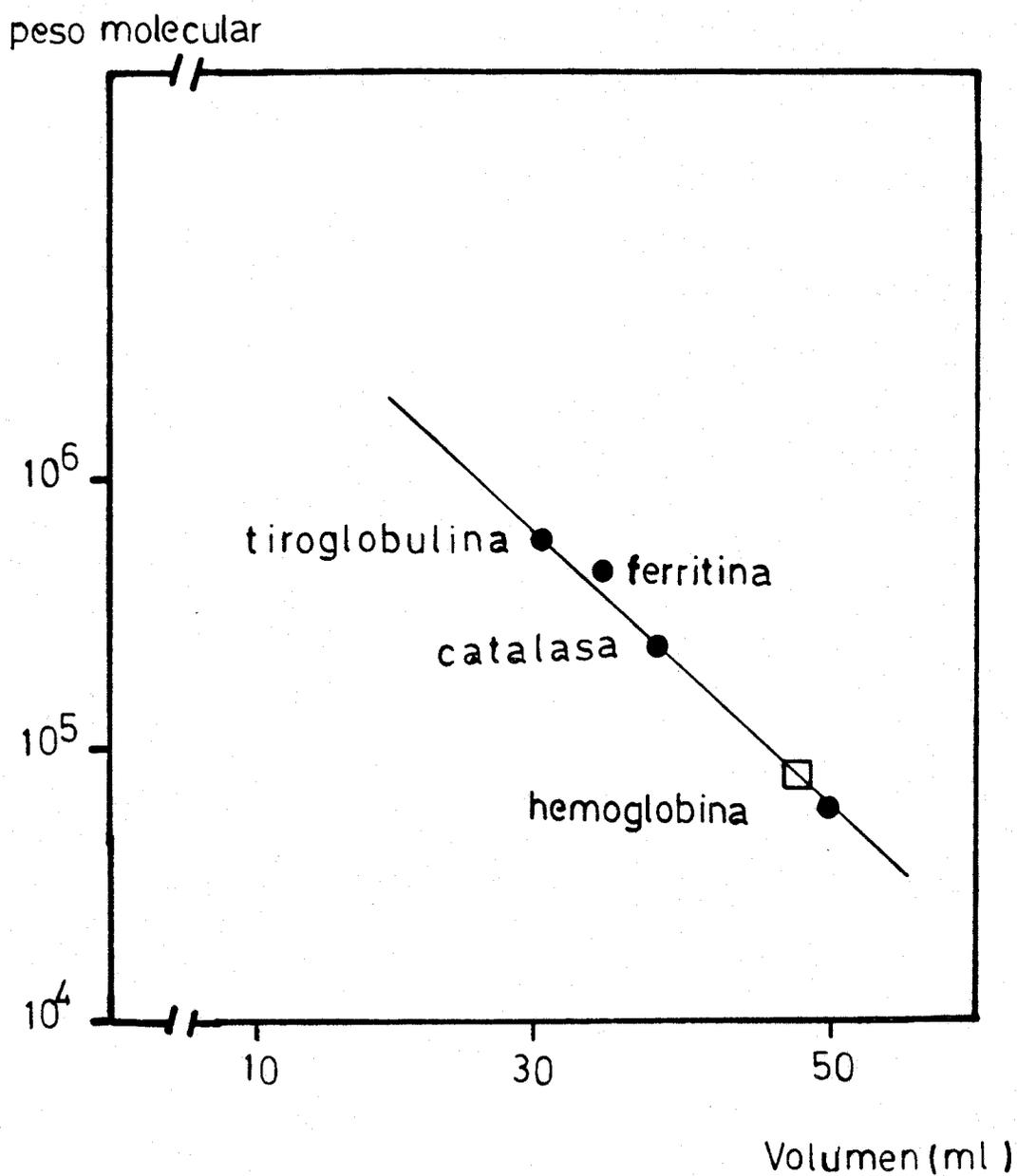


Fig. 24 Estimación del peso molecular del complejo ^{125}I -VIP-receptor (□).

DISCUSION

En el presente trabajo se ha caracterizado por primera vez de una forma sistemática, la solubilización de receptores para el péptido intestinal vasoactivo (VIP) a partir de membranas plasmáticas de hígado de rata parcialmente purificadas (Neville, 1968). En los últimos años se han venido publicando diversos trabajos de solubilización de receptores de hormonas peptídicas principalmente insulina y glucagón, donde los receptores aislados retienen muchas, si no todas de las características de los receptores en la estructura intacta de la membrana (Cuatrecasas, 1972; Jacobs et al, 1977; Krupp y Livingston, 1978). Sin embargo para el VIP no se ha descrito todavía ninguna de las características de la interacción con su receptor solubilizado.

Se ha utilizado como materia prima para la obtención de los receptores, membranas plasmáticas de hígado de ratas que son de fácil obtención y en las que está descrita la existencia de receptores para el péptido (Desbuquois et al, 1974; Guerrero et al, 1981). Este mismo modelo de membranas ha sido utilizado por otros autores para obtener receptores de insulina (Cuatrecasas, 1972; Jacobs et al, 1977), glucagón (Blecher y Goldstein, 1976; Welton et al, 1977), y somatotropina (Bonifacino et al, 1981). El proceso de solubilización de lleva a cabo mediante el uso de detergentes no iónicos como el Lubrol PX, que posee una gran eficiencia y selectividad

para solubilizar proteínas de membranas, y que ha sido utilizado con éxito en la solubilización de receptores para el glucagón (Giorgio et al, 1974; Levey et al, 1974). Sin embargo, para los receptores de insulina se utilizan preferentemente detergentes de la serie del Tritón (Cuatrecasas, 1972). Este último no ha dado tan buenos resultados en el caso del glucagón, es por ello que considerando el VIP como un péptido relacionado estructuralmente con el glucagón, se intenta la solubilización con Lubrol PX.

Debido a la frecuente mención en la literatura de efectos de inhibición de la unión trazador-receptor y disminución de la actividad de la adenil ciclasa producida por los detergentes (Giorgio et al, 1974; Guillon et al, 1978; Bonifacino et al, 1981), se hace necesaria la reducción de la concentración del mismo, una vez llevado a cabo la solubilización, ya que parece demostrado que estos efectos de inhibición y disminución de actividad desaparecen con la eliminación del detergente de la solución proteica (Giorgio et al, 1974; Welton et al, 1977; Guillón et al, 1978; Horikawa y Ogawara, 1979). La reducción de la concentración del detergente por ultracentrifugación puede ser seguida por medición del detergente marcado radioactivamente con C^{14} hasta niveles por debajo de su concentración micelar crítica, estimada por Goldstein y Blecher (1976) entre 0'16 y 0'18 mM

(aproximadamente 0'008%).

Siguiendo este proceso, en la solubilización de membranas plasmáticas de hígado de ratas parcialmente purificadas por el método de Neville (1968), se obtuvo un índice de recuperación de proteínas de aproximadamente un 50 % (Tabla 1), valores estos similares a los descritos para el glucagón (Giorgio et al, 1974) y somatotropina (Bonifacino et al, 1981), que consiguen recuperarse entre un 40 y un 60 % de proteína.

Para verificar la existencia de receptores para el péptido intestinal vasoactivo, es necesario el uso de un trazador radioactivo. El ^{125}I -VIP, marcado por la técnica de Laburthe et al, (1977) con algunas modificaciones, es el trazador utilizado. Se ha comprobado que el VIP marcado se une a receptores de idéntico modo que el VIP frío (Prieto et al, 1979).

Se comprueba la existencia de una unión VIP-receptor midiendo la fracción de ^{125}I -VIP ligada al receptor, para lo cual es necesario encontrar un método adecuado de separación de dicha fracción de la fracción libre. Uno de los métodos ensayados fue la separación mediante el uso de polietilenglicol, empleado con éxito por Cuatrecasas (1972) y Jacobs (1977) para receptores de insulina, el objetivo era ver si obteníamos una precipitación del complejo ^{125}I -VIP-receptor, sin precipitar el trazador libre. Efectivamente el polietilenglicol (5%),

en presencia de albúmina, apenas precipita al trazador libre (Fig. 10), sin embargo, con estas mismas condiciones no se conseguía precipitar el hipotético complejo ^{125}I -VIP-receptor.

Esto puede ser debido bien a que la fracción solubilizada no posea receptores específicos para el VIP, o bien que el complejo trazador-receptor no sea precipitable por el polietilenglicol, debido a que este complejo posea un punto isoeléctrico próximo al del trazador libre al pH en que se realiza la incubación.

En vista de este resultado negativo, se procedió a intentar la separación mediante carbón saturado con albúmina. Al igual que en el caso anterior, mediante este método se consiguen unos blancos muy aceptables, de hecho este método es el que se utiliza en el radioinmunoensayo de VIP (Bloom et al, 1973). Sin embargo tras la incubación del trazador con la fracción solubilizada con bajo contenido en Lubrol PX, no se consigue identificar el complejo ^{125}I -VIP-receptor, ya que los valores obtenidos fueron muy similares a los blancos. Esto nos plantearía nuevamente la posibilidad de que en la fracción solubilizada no existiese el receptor para VIP o que dicho receptor tuviese un peso molecular tan bajo como para ser adsorbido al carbón y precipitado junto con este de la misma forma que el trazador.

Por último, se utilizó un método de separación ampliamente descrito en el caso de proteínas solubilizadas, como es la filtración en gel (Giorgio et al, 1974; Levey et al, 1974; Welton et al, 1977; Ross, 1981).

En el presente trabajo se utilizó concretamente filtración en Sepharose 6B (equivalente a gel de agarosa al 6%).

Entre los diversos controles realizados antes de proceder a la separación se realizó una incubación del trazador radioactivo con el detergente a la concentración de ensayo, observándose que este no interfería con el ^{125}I -VIP ya que no tenía lugar la formación de micelas que ha sido descrita para otras hormonas peptídicas como glucagón (Giorgio et al, 1974), e insulina (Cuatrecasas, 1972). Como resultado, en los primeros ensayos realizados se trabajó con fracciones de solubilizado con alto contenido en detergente incubando la preparación de membranas con el trazador y procediendo posteriormente a la extracción del receptor mediante la solubilización del receptor con el detergente. Procediendo de este modo no se obtuvo una unión significativa, por lo que se varió ligeramente el método solubilizando primero las proteínas de membrana y después incubando la fracción soluble con el detergente, obteniéndose sin embargo un resultado similar al anterior.

Se pensó entonces que el detergente interfería con la unión ^{125}I -VIP-receptor dando como resultado una unión inestable, con una rápida disociación de la unión trazador-receptor, esto estaría de acuerdo con los trabajos de Giorgio et al, (1974), quienes han descrito la imposibilidad de obtener una unión estable entre el ^{125}I -glucagón y su receptor solubilizado, así como dificultades en la purificación de los mismos y en la realización de ensayos de unión trazador-receptor, por lo que en experiencias posteriores se redujo la concentración del detergente hasta valores teóricos por debajo de 0'001% donde, aunque manteniendo las proteínas en solución, no interfiriera con la unión ^{125}I -VIP-receptor. Así se procedió a incubar el trazador radioactivo con fracciones solubilizadas con bajo contenido del detergente obteniéndose el resultado observado en la Fig. 20, donde se puede apreciar una clara unión del ^{125}I -VIP a las proteínas solubilizadas. Para comprobar que esto representase una unión específica, se realizó una incubación con una concentración en exceso de VIP frío, observándose que este desplazaba casi completamente al VIP marcado (Fig,21), confirmando la especificidad de la unión.

Las experiencias anteriores son de tipo cualitativo, indispensables para verificar la existencia de una unión entre el ^{125}I -VIP y su receptor, sin embargo hace falta

otro método que nos permita cuantificar esta unión y que posibilite la realización de estudios cinéticos, estequiométricos y de especificidad, para ello se ha utilizado el método desarrollado por Hummel y Dreyer, (1962) para estudiar interacciones entre macromoléculas. Este método ha sido utilizado con éxito por Giorgio et al, (1974); Blecher y Goldstein, (1976) para estudios con el glucagón. Siguiendo este método se realizaron incubaciones (30°C) de la fracción solubilizada con el ^{125}I -VIP a diferentes tiempos (5, 15 y 30 min.) y a 30 min. en presencia de una concentración en exceso de VIP frío. Los valores cuantitativos obtenidos se expresan en la tabla 7 (Fig. 23) en la que se puede observar que prácticamente a los 5 min. se obtiene un alto porcentaje de unión, aumentando ligeramente a los 15 y 30 min. La unión inespecífica corresponde a un 24% de la unión total máxima. Estos valores son similares a los obtenidos para el glucagón (Giorgio et al, 1974), donde si bien la cinética de asociación es algo más lenta, puede explicarse debido a la temperatura de incubación, sensiblemente menor en este caso.

La estimación del peso molecular del receptor para el VIP se realizó por separación cromatográfica en columna de Sepharose 6B. Mediante representación semilogarítmica de los resultados (Fig. 24), encontramos un peso molecular para el complejo ^{125}I -VIP-receptor de aproxi-

madamente 80.000. Esta es la primera vez que se ha calculado el peso molecular del receptor para el VIP, por lo que no podemos compararlo con datos previamente descritos. El relativamente bajo peso molecular de este complejo comparado con el del glucagón (P.m. estimado de 200.000) (Giorgio et al, 1974), e insulina (P.m. estimado de 300.000) (Cuatrecasas, 1972), puede ser un claro motivo para la imposibilidad de separación del complejo ^{125}I -VIP-receptor mediante los métodos empleados del carbón y el polietilenglicol.

En conclusión, puede afirmarse que mediante la utilización de un detergente no iónico como el Lubrol PX se consigue la solubilización de proteínas que ligan al VIP. Sin embargo, la naturaleza fisiológica de las proteínas ligantes obtenidas en el presente trabajo debe ser estudiada. Si "receptor" en este contexto se define como la molécula de la membrana plasmática capaz de reconocer e interaccionar con el péptido intestinal vasoactivo de una forma específica, entonces, las macromoléculas aisladas pueden ser consideradas como el verdadero receptor. Por el contrario, si la definición de receptor incluye también el que esta interacción conlleve otros procesos metabólicos como la activación del sistema adenil ciclasa (Ramírez-Cárdenas et al, 1981), entonces no se puede afirmar que estas proteínas que ligan VIP sean un receptor biológicamente significativo.

La prueba de la identidad de esta estructura con el receptor fisiológico depende del acoplamiento de esta interacción VIP-receptor con una activación del sistema adenil ciclasa proveniente de la misma fuente (membrana plasmática).

CONCLUSIONES

1. El uso de detergentes no iónicos del tipo del Lubrol PX permite la solubilización de las proteínas de membrana plasmática de hígado de rata parcialmente purificadas (Neville, 1968). Obteniéndose un índice de recuperación de aproximadamente 50%.
2. La utilización de preparados con alto contenido en detergente, no permite una adecuada identificación del complejo ^{125}I -VIP-receptor.
3. Utilizando preparados con bajo contenido en detergente (valores teóricos por debajo de 0'001%), puede obtenerse una identificación del complejo ^{125}I -VIP-receptor, siempre y cuando la fracción ligada se separe de la libre mediante filtración en gel (Sepharose 6B). El uso de polietilenglicol y carbón saturado con albúmina, no permitió una separación real entre las fracciones libre y ligada.
4. La unión observada es específica ya que desaparece al añadir al medio de incubación una concentración en exceso de VIP frío.
5. Utilizando el principio desarrollado por Hummel y Dreyer para el estudio de la interacción del ^{125}I -VIP con su receptor solubilizado, observamos claramente la existencia de la unión VIP-receptor. Este método permite obtener datos cuantitativos de dicha unión.

6. La unión del trazador radioactivo al receptor solubilizado depende del tiempo de incubación obteniéndose un elevado porcentaje de unión a los 5 min , y alcanzándose un máximo tras 30 min de incubación . La unión inespecífica representa aproximadamente un 24 % de la unión total máxima.
7. El peso molecular estimado para el complejo ^{125}I -VIP-receptor es de aproximadamente 80.000 daltons.

RESUMEN

Se ha caracterizado el receptor específico para el péptido intestinal vasoactivo (VIP) en membranas plasmáticas de hígado de rata, sin que hasta ahora se haya abordado su estudio con receptores solubilizados, el presente trabajo pretende caracterizar de una forma sistemática, la solubilización de dichos receptores.

La solubilización se realiza mediante el detergente no iónico Lubrol PX, que permite una solubilización de proteínas del 50%. Como trazador para las experiencias de unión se utiliza VIP marcado con ^{125}I , por el método de la cloramina T. Se ensaya la separación de las fracciones libre y ligada mediante polietilenglicol, carbón y filtración en gel (Sephacrose 6B). Otro tipo de experiencias de unión se llevaron a cabo según el principio desarrollado por Hummel y Dreyer (1962). Se calcula el peso molecular del complejo ^{125}I -VIP-receptor mediante cromatografía de exclusión de pesos moleculares, con diferentes proteínas actuando como marcadores.

De los métodos ensayados, tanto el polietilenglicol como el carbón, se mostraron ineficaces en la separación de las fracciones libre y ligada, por el contrario, mediante la filtración en gel se obtuvo la identificación del complejo ^{125}I -VIP-receptor, aunque sólo en aquellas fracciones solubilizadas a las que previamente se redujo la concentración del detergente, comprobándose la especificidad de esta unión mediante la adición al medio de incu-

bación de un exceso de VIP frío.

Según el principio desarrollado por Hummel y Dreyer (1962), se realizaron experiencias de unión a diferentes tiempos de incubación, encontrándose que la unión del trazador al receptor es proporcional al tiempo de incubación alcanzándose un máximo a los 30 min (30°C).

El peso molecular estimado para el complejo ^{125}I -VIP-receptor es de 80.000 daltons.

BIBLIOGRAFIA

AHREN,B., ALUMETS,J., ERICSSON,M., FAHRENKRUG,J., FAHRENKRUG,L., HAKANSON,R., HEDNER,P., LOREN,I., MELANDER,A., RERUP,C. y SUNDLER,F. (1980) VIP occurs in intrathyroidal nerves and stimulates thiroid hormone secretion.
Nature, 2, 343-345.

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

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

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

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

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

ATTIA,R.R., EBEID,A.M., MURRAY,T. y FISCHER,J.E. (1976)
The placenta as a posible source of gut peptide hormones.
Surg.Forum, 27, 432-434.

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

BATAILLE,D., FRYCHET,P. y ROSSELIN,G. (1974) Interaction
of glucagon, gut glucagon, vasoactive intestinal polypep-
tide and secretin with liver and fat cell plasma membranes:
Binding to specific sites and stimulation of adenylate
cyclase.
Endocrinology, 95, 713-721.

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

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

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

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

BESSON, J., ROTSZTEJN, W., LABURTHE, M., EPELBAUM, J.,
BEAUDET, A., KORDON, C. y ROSSELIN, G. (1979) Vasoactive in-
testinal peptide (VIP): brain distribution, subcellular lo-
calization effect of deafferentation of the hypothalamus in
male rats.

Brain Res., 165, 79-85.

BEUBLER, E. (1980) Influence of vasoactive intestinal poly-
peptide on net water flux on cyclic adenosine 3',5'-monophos-
phate formation in the rat jejunum.

Arch. Pharmacol., 313, 127-131.

BINDER, H.J., LEMO, G.F. y GARDNER, J.D. (1980) Receptors
for vasoactive intestinal peptide and secretin on small in-
testinal epithelial cells.

Am. J. Physiol. 238, G190-G196.

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

Gastroenterology, 79, 1288-1294.

BLECHER, M., GIOGIO, N.A. y JOHNSON, C.B. (1972) en *The Role
of Membranes in Metabolic Regulation* (Mehlman, M.A. y Han-
son, R.W., eds.) pp 367-383, Academic Press, N.Y.

BLECHER, M. y GOLDSTEIN, S. (1976) Solubilization of liver plas-
ma membrane glucagon receptors en "*Hormone receptor interac-
tion: molecular aspects.*" (Levey, G.S. ed.) Marcel Dekker inc.
N.Y. y Basel.

BLOOM, S.R., POLAK, J.M. y PEARSE, A.G.E. (1973) Vasoactive in-
testinal peptide and water-diarrhoea syndrome.

Lancet, 2, 14-16

BODANSKY, M., KLAUSNER, Y.S., LIN, C.Y., MUTT, V. Y SAID, S.I.
(1974) Synthesis of the vasoactive intestinal peptide
(VIP)

J.Amer.Chem.Soc., 96, 4973-4978.

BORDIER, C. (1981) Phase separation of integral membrane
proteins in Tritón X-114 solution.

J.Biol.Chem., 256, 1604-1607.

BONIFACINO, J.S., SANCHEZ, S.H. y PALADINI, A.C. (1981)
Characterization of human somatotropin binding to detergent-
solubilized lactogenic receptors from rat liver.

Biochem.J., 194, 385-394.

BRYAN, M.G., BLOOM, S.R., POLAK, J.M., ALBUQUERSE, R.H., MODLIN,
I. y PEARSE, A.E.G. (1976) Possible dual role for vasoactive
intestinal polypeptide as gastrointestinal hormone and neu-
rotransmitter substance.

Lancet., 1, 991-993.

BUFFA, R., CAPELLA, C., SOLCIA, E., FRIGERIO, B. y SAID, S.I.
(1979) Vasoactive intestinal peptide (VIP) cells in the pan-
creas and gastrointestinal mucosa. An immunohistochemical
and ultrastructural study.

Histochem., 50, 217-228.

BURHOL, P.G., LYGREN, I. y WALDUN, H.L. (1978) Radioimmuno-
assay of vasoactive intestinal polypeptide in plasma.

Scand.J.Gastroent., 13, 807-813.

CALQUIST, M., MUTT, V. y JORNVALL, H. (1979) Isolation and
characterization of bovine vasoactive intestinal peptide
(VIP).

FEBS Lett., 108, 457-460.

CATT, K.J., (1977) Peptide hormone receptors.
Ann.Rev.Physiol., 39, 529-557.

CHANG, T., ROTH, F.L., TAI, H.H. y CHEY W.Y. (1979) Radioimmunoassay of vasoactive intestinal polypeptide.
Analitical Biochem., 97, 286-297.

CHATELAIN, P., ROBBERECHT, P., DE NEEF, P., DESCHODT-LANCKMAN, M., KONIG, W. y CHRISTOPHE, J. (1980) Secretin and VIP stimulated adenylate cyclase from rat heart. I. General properties and structural requeriments for enzyme activation.
Pflugers Arch., 389, 29-35.

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

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

CHRISTOPHE, J., CONLON, T.P. y GARDNER, J.D. (1976) Interaction of porcine vasoactive intestinal peptide with dispersed pancreatic acinar cells from guinea pig.
J.Biol.Chem., 251, 4629-4634.

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

COY, D.H. y GARDNER, J. (1980) Solid-Phase synthesis of porcine vasoactive intestinal peptide.

Int.J.Peptide protein Res., 15, 73-78

CUATRECASAS, P. (1972b) Isolation of the insulin receptor of liver and fat-cell membranes.

Proc.Natl.Acad.Sci. USA., 69, 318

CUATRECASAS, P. (1974) Membrane receptors.

Ann.Rev.Biochem., 43, 169

CUATRECASAS, P., RIKH, I. (1974) Insulin receptors en Methods in Enzimology, vol XXXIV (Jacoby W.B. y Wilchek, M. eds.) Acad. Press, N.Y.

CUTZ, E., CHAG, W., TRACK, N.S., GOTH, A. y SAID, S.I. (1978) Release of vasoactive intestinal polypeptide in mast cells by histamine liberators.

Nature, 275, 661-662.

DESBUQUOIS, B., LAUDAT, M.H. y LAUDAT, P. (1973) Vasoactive intestinal polypeptide and glucagon: stimulation of adenylate cyclase activity via distinct receptors in liver and fat cell membranes.

Biochem.Biophys.Res.Comm., 53, 1187-1194.

DESBUQUOIS, B. (1974) The inraction of vasoactive intestinal polypeptide and secretin with liver-cell membranes.

Eur.J.Biochem., 46, 439-450

DESCHODT-LANCKMAN, M., ROBBERECHT, P. y CHRISTOPHE, J. (1977) Characterization of VIP-sensitive adenylate cyclase in guinea pig brain.

FEBS Lett., 83, 76-80

DIMALINE, R. y DOCKRAY, G.J. (1979) Potent stimulation of the avian exocrine pancreas by porcine and chicken vasoactive intestinal peptide.

J. Physiol., 294, 153-163.

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

Gastroenterology., 70, A-99.

EBEID, A.M., MURRAY, P., HIRSA, H., WESDORP, R.I.C. y FISCHER, J.E. (1976) Radioimmunoassay of vasoactive intestinal peptide.

J. Surg. Res., 20, 355-360

EBEID, A.M., MURRAY, P. y FISCHER, J.E. (1978) Vasoactive intestinal peptide and the water diarrhoea syndrome.

Ann. Surg., 187, 411-416

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

Acta Physiol. Scand., 105, 461-468

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

Eur. J. Pharmacol., 58, 493-495.

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

J. Physiol., 280, 405-422.

- FAHRENKRUG, J. (1979) Vasoactive intestinal polypeptide: measurement, distribution and putative neurotransmitter function.
Digestion, 19, 149-169
- FAHRENKRUG, J. (1980) Vasoactive intestinal polypeptide.
Trends Neurosci., Enero, 1-2.
- FAUSA, O., FRETHEIM, B., ELGJO, K., SEMB, L.S. y GJONE, E. (1973) Intractable watery diarrhoea, hypokalemia and aclorhidria associated with non-pancreatic retroperitoneal neurogeneus tumour containing vasoactive intestinal peptide (VIP).
Scand.J.Gastroent., 8, 713-717.
- FRANSEN, E.K., KRISHNA, G.A. y SAID, S.I. (1978) Vasoactive intestinal polypeptide promotes cyclic adenosine 3',5'-monophosphate accumulation in guinea pig trachea.
Br.J.Pharmacol., 62, 367-369.
- FREYCHET, P., KAHN, R., ROTH, J. y NEVILLE, D.M. (1972) Insulin interaction with liver plasma membranes. Independence of binding of the hormone and its degradation.
J.Biol.Chem., 247, 3953-3961.
- FREYCHET, P. (1975) Recepteurs de l'insuline
Diabete et Metabolisme, 1, 57-68.
- FREYCHET, P. (1976) Interaction of polypeptide hormones with cell membrane specific receptors: studies with insulin and glucagon.
Diabetologie, 12, 83-100.
- FREYCHET, P. (1976) Insulin receptors en Methods in Receptor Research (Ed. M. Blecher) Marcel Dekker inc. N.Y., pp 385-422.

FUJII,S., KOBAYASHI,S., FUJITA,T. y YANAIHARA,N. (1980) VIP-immunoreactive nerves in the pancreas of the snake *Elaphe quadrivirgata* (boie): another model for insular neurosecretion.

Biomed.Res., 1, 180-184.

GALBO,H., HAILSTED,J., FAHRENKRUG,J. y SCHAFFALITZKY DE MUCKADELL,O.B. (1979) Fasting and prolonged exercise on vasoactive intestinal polypeptide in plasma.

Acta Physiol.Scand., 105, 374-377.

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

GIACHETTI,A., SAID,S.I., REYNOLDS,R.C. y KONIGES,F.C. (1977) Vasoactive intestinal polypeptide in brain: localization in and release from isolated nerve terminals.

Proc.Natl.Acad.Sci.USA., 74, 3124-3128.

GIORGIO,N.A., JOHNSON,C.B. y BLECHER,M. (1974) Hormone receptors III. Properties of glucagon-binding proteins isolates from liver plasma membranes.

The J. of Biological Chem., 249, 428-437

GUERRERO,J.M., PRIETO,J.C., RAMIREZ-CARDENAS,R., CALVO, J.R. y GOBERNA,R. (1981) Properties of vasoactive intestinal peptide-receptors interaction in rat liver membranes.

Rev.Esp.Fisiol. 37, 1-8.

GUILLON,G., ROY,C. y JARD,S. (1978) A systematic study of effects of non-ionic detergents on solubilization and activity of pig kidney adenylate cyclase.

Eur.J.Biochem., 92, 341-348.

GOLDSTEIN,S. y BLECHER,M. (1976) Isolation of glucagon receptor proteins from rat liver plasma membranes, en "Methods in Receptors research,"Part I (Blecher,M. ed) Marcel Dekker inc. N.Y.

HARRISON,L.C., BILLINGTON,T., EAST,I.J., NICHOLS,R.J. y CLARK,S. (1978) The effect of solubilization on the properties of human placental membranes.

Endocrinology, 102, 1485-1495

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

Acta Paediatr.Scand., 69, 419-429

HELENIUS,A., y SIMONS,K., (1975). Solubilization of membrane by detergent.

Biochem.Biophys.Acta, 415, 29-79

HORIKAWA,S. y OGAWARA,H. (1979) A simple and rapid procedure for removal of Tritón X-100 from protein solution.

Anal.Biochem., 97, 116-119

HUMMEL,J.P. y DREYER,W.J. (1962) Measurement of protein binding phenomena by gel filtration.

Biochem.Biophys.Acta, 63, 530-532

HUNT,S., VAAMONDE,C.A., RATTASSI,T., BERIAN,G., SAID,S.I. y PAPPER,S. (1979) Circulating levels of vasoactive intestinal polypeptide in liver disease.

Arch.Int.Med., 139, 994-996.

IPP,E., DOBBS,R.E. y UNGER,R.H. (1978) Vasoactive intestinal peptide stimulated pancreatic somatostatin release

FEBS Lett. , 90, 76-78.

JACOBS,S., SHECHTER,Y., BISSELL,K. y CUATRECASAS,P. (1977) Purification and properties of insulin receptors from rat liver membranes.

Biochem.Biophys.Res.Comm., 77, 981-988

JANSSON,R., STEEN,G. y SUANVIK,J. (1978) Effect of intravenous vasoactive intestinal peptide (VIP) on gallbladder functions in the cat.

Gastroenterol., 75, 47-50.

JARHULT,J., HELLSTRAND,P. y SUNDLER,F. (1980) Immunohistochemical localization and vascular effects of vasoactive intestinal polypeptide in skeletal muscle of cat.

Cell. Tissue Res., 207, 55-64.

JENSEN,S.L., FAHRENKRUG,J., HOLLST,J.J., NIELSEN,O.V. y SCHAFFALITZKY DE MUCKADELL,O.B. (1978) Secretory effects of VIP on isolated perfused porcine pancreas.

Am.J.Physiol., 235, E 387-391.

KAHN,C.R. (1975) Membrane receptors for polipeptide hormones en " Methods in Membrane Biology " (Korn,E.D.,ed) 3, pp 81-146 .N.Y. and London Plenum Press.

KERINS,C. y SAID,S.I. (1973) Hyperglycemic and glycogenolytic effects of vasoactive intestinal polypeptide
Proc.Soc.Exptl.Biol.Med, 143, 1014-1017.

KONTUREK,S.J., THOR,P., DEMVISKI,A. y KROL,R. (1975)
Vasoactive intestinal polypeptide: comparison with secretin for potency and spectrum of physiologic action en
" Gastrointestinal Hormones " (Thompson,J.C. ed.) University Texas Press, Austin and London, pp 611-633.

KONTUREK,S.J., DEMVISKI,A., THOR,P. y KROL,R. (1976)
Comparison of vasoactive intestinal peptide (VIP) and secretin in gastric secretion and mucosal blood flow.
Pfluger Arch., 361, 175-181

KRUPP,M.N. y LIVINGSTON,J.N. (1978) Insulin binding to solubilized material from fat cell membranes: evidence for two binding species
Proc.Nat.Acad.Sci. USA, 75, 2593-2597

LABURTHE,M., BESSON,J., HUI BON HOA,D. y ROSSALIN,G. (1977)
Recepteurs du peptide intestinal vasoactif (VIP) dans les enterocytes liaison specifique et stimulation de l'AMP cyclique.
C.R.Acad.Sc. Paris, 284, D 2139-2142.

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

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

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

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

LARSSON, L.I., FAHRENKRUG, J., HOLST, J.J. y SCHAFFALITZKY DE MUCKADELL, O.D. (1978) Inervation of the pancreas by vasoactive intestinal polypeptide (VIP) immunoreactive nerves. Life Sci., 22, 773-780.

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

LEFKOWITZ, R., ROTH, J., PRICER, J. y PASTON, W. (1970) ACTH-receptors in the adrenal: specific binding of ACTH ^{125}I and its relation to adenyl cyclase. Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 65, 745.

- LEVEY, G.S., FLETCHER, M.A. y KLEIN, I.R. (1974) Characterization of ^{125}I -glucagon binding in a solubilized separation of cat myocardial adenylate cyclase.
The J. of Biol.Chem., 249, 2665-2673.
- LIN, S.Y. y GOODFRIEND, T.L. (1970) Angiotensin receptors.
Am.J.Physiol., 218, 1319.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. y RANDALL, R.J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent.
J.Biol.Chem., 193, 265-275.
- MALM, L., SUNDLER, F. y UDDMAN, R. (1980) Effect of vasoactive intestinal polypeptide on resistance and capacitance vessels in the nasal mucosa.
Acta Otolaringol., 90, 304-308.
- MARKS, I.N., BANK, S. y LOUW, J.H. (1967) Islet cell tumor of the pancreas with reversible watery diarrhea and achlorhydria.
Gastroenterology. 52, 695-708.
- MATSUZAKI, Y., HAMASAKI, Y. y SAID, S.I. (1980) Vasoactive intestinal peptide: a possible transmitter of non adrenergic relaxation of guinea pig airways.
Science, 210, 1252-1253.
- MICHEL, R.H. y HAWTHORNE, J.N. (1975) Mononucleotidase: Characteristics and activity in the plasma membrane.
Biochem.Biophys.Res.Commun. 21, 333-340.
- MODLIN, I.M., MITCHELL, S.J. y BLOOM, S.R. (1978) The systemic release and Pharmacokinetics of VIP. en " Gut Hormones, (Bloom, S.R., ed) Churchill-Livingston, London, 470-474.

MORERA, A.M., CATHIARD, A.M., LABURTHE, M. y SAEZ, J.M. (1979) Interaction of vasoactive intestinal peptide (VIP) with a mouse adrenal cell line (Y-1) : specific binding and biological effects.

Biochem.Biophys.Res.Comm., 90, 78-85.

MUTT, V. y SAID, S.I. (1974) Structure of the porcine vasoactive intestinal octacosapeptide. The aminoacid sequence. Use of kallikrein in its determination.

Eur.J.Biochem., 42, 581-589.

NEVILLE, D.M. Jr. (1968) Isolation of an organ specific protein antigen from cell surface membrane of rat liver.

Biochem.Biophys.Acta, 154, 540-552.

NILSSON, A. (1975) Structure of the vasoactive intestinal octacosapeptide from chicken intestine. The aminoacid sequence.

FEBS Lett., 60, 322-326.

O'DORISIO, M.S., O'DORISIO, T.M., CATALAND, S. y BALCERZAK, S. (1980) Vasoactive intestinal polypeptide as a biochemical marker for polymorphonuclear leukocytes.

J.Lab.Clin.Med., 96, 666-672.

OLINER, E.J. y GARDNER, J.D. (1979) Action of VIP and secretin on adenylate cyclase activity in acinar cells from guinea pig pancreas.

Gastroenterology, 77, 704-713.

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

Endocrinol.Japon., 1, 71-78.

- PASTAN, I., ROTH, J. Y MACHIA, V. (1966) Binding of hormone to tissue: the first step in polypeptide hormone action. Proc.Natl.Acad.Sci.USA., 56, 1802
- PEARSE, A.G.E. (1974) The gut as an endocrine organ. Brit.J.Hosp.Med., 11, 697-707.
- POHL, S.L., BIRNBAUMER, L. y RODBELL, M. (1971) The glucagon sensitive adenyl cyclase system in plasma membranes of rat liver. J.Biol.Chem., 246, 1846-1856.
- POLAK, J.M., PEARSE, A.G.E., GARAUD, J.C. y BLOOM, S.R. (1974) Cellular localization of vasoactive intestinal peptide in the mammalian and avian gastrointestinal tract. Gut , 15, 720-724.
- PRIETO, J.C., LABURTHE, M. y ROSSELIN, G. (1979) Interaction of vasoactive intestinal peptide with isolated intestinal epithelial cell from rat. I. Characterization quantitative aspects and structural requirements of binding sites. Eur.J.Biochem., 96, 229-239.
- PRIETO, J.C., GUERRERO, J.M., DE MIGUEL, C. y GOBERNA, R. (1981) Interaction of vasoactive intestinal peptide with a cell line (Hella) derived from human carcinoma of the cervix: binding to specific sites and stimulation of adenylate cyclase .
Mol.Cell Biochem., (en prensa)
- RAMBAUD, J.C., MODIGLIAN, R., MATUCHANSKY, C., BLOOM, S.R. y SAID, S.I. (1975) Pancreatic cholera studies on tumoral secretions and pathophysiology of the diarrhea. Gastroenterology, 69, 110-122.

RAMIREZ-CARDENAS, R., PRIETO, J.C., GUERRERO, J.M. y GOBERNA, R. (1981) Guanyl nucleotide regulation of vasoactive intestinal peptide interaction with rat liver membranes. Rev.Esp.Fisiol., 37, 9-16.

RICOUR, C., DUHAMEL, J.F., LESEC, G. y SCHWEISGUTH, O. (1977) Diarrhee cholericiforme dans un cas de ganglioneuroblastome Arch.Franc.Ped., 34, 552-555.

ROBBERECHT, P., DE NEEF, P., LAMMENS, M., DESCHODT-LANCKMAN, M. y CHRISTOPHE, J.P. (1978) Specific binding of vasoactive intestinal peptide to brain membranes from guinea pig Eur.J.Biochem., 90, 147-154.

ROBBERECHT, P., DESCHODT-LANCKMAN, M., DE NEEF, P. y CHRISTOPHE, J.P. (1979) Vasoactive intestinal peptide: levels and functional receptors in rat brain before and after weaning. Life Sci., 25, 1001-1008.

RODBELL, M. (1973) The problem of identifying the glucagon receptor. Fed.Proc., 32, 1854-1858.

RODBELL, M. (1980) The role of hormone receptor and GTP-regulatory proteins in membrane transduction. Nature, 284, 17-22.

ROSS, E.M. (1981) Physical separation of the catalytic and regulatory proteins of hepatic adenylate cyclase. The J. of Biol.Chem., 256, 1949-1953.

ROTH, J. (1973) Peptide hormone binding to receptors: a review of direct studies in vitro. Metabolism., 22, 1059-1073.

ROTH, J., KAHN, C.R., LESNIAK, M.A., GORDEN, P., DE MEYTZ, P., MEGYESI, K., NEVILLE, M.D. Jr., GAVIN, J.R. III, SOLL, A.H., FREYCHET, P., GOLDFINE, I.D., BAR, R.S. y ARCHER, J.A.

(1975) Receptors for insulin NSILA-s and growth hormone applications to disease states in man.

Recent.Prog.Hormone Res., 31, 95-139.

RYAN, J.P. y COHEN, S. (1977) Effect of vasoactive intestinal polypeptide on basal and cholecystokinin induced gallbladder pressure .

Gastroenterol., 73, 870-872.

RYAN, J.P. y RYAVE, S. (1978) Effect of vasoactive intestinal polypeptide on gallbladder smooth muscle in vitro.

Am.J.Physiol., 234, E44-E46.

RYAN, J. y STORM, D.R. (1974). Solubilization of glucagon and epinephrine sensitive adenylate cyclase from rat liver.

Biochem.Biophys.Res.Comm., 60, 304.

SAID, S.I. y MUTT, V. (1970) Potent peripheral and splanchnic vasodilator peptide from normal gut.

Nature, 225, 863-864.

SAID, S.I. y MUTT, V. (1970a) Polypeptide with broad biological activity.

Science, 169, 1217-1218.

SAID, S.I. y MUTT, V. (1972) Isolation from porcine intestinal wall of a vasoactive octacosapeptide related to secretin and to glucagón.

Eur.J.Biochem., 28, 199-204.

SAID, S.I. (1974) Smooth muscle relaxant activity of vasoactive intestinal polypeptide. en IV International Symposium on Endocrinology, London, pp297-301.

SAID,S.I. y MAKHLOUF,G.M. (1974) Vasoactive intestinal polypeptide: spectrum of biological activity, en "Endocrinology of the gut" (Chey,W.Y., BROOKS,F.P., THOROFARE,N.J., ISLACK,C.B. eds.), pp 88-102.

SAID,S.I. Y FALOONA,G.R. (1975) Elevated plasma and tissue levels of vasoactive intestinal polypeptide in the watery-diarrhea syndrome due to pancreatic, bronchogenic and other tumors.

N.Engl.J.Med., 293, 155-160.

SAID,S.I. (1979) VIP in relation to neural and neuroendocrine function. en " Hormone Receptors in Digestion and Nutrition" (Rosselin,G., Fromageot,P. y Bonfils,S.,eds.) Elsevier/North Holland Amsterdam-N.Y., 439-445.

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

Endocrinol.Japon., 25, 403-405.

SAMSON,W.K., SAID,S.I. y McCANN,S.M. (1979) Radioimmunologic localization of vasoactive intestinal polypeptide in hypothalamic and extrahypothalamic sites in the rat brain. Neurosci., 12, 265-269.

SCHEBALIN,M., SAID,S.I. y MAKHLOUF,G.M. (1977) Stimulation of insulin and glucagon secretion by vasoactive intestinal peptide.

Am.J.Physiol., 232, E197-E200.

SCHMITT,M.G., SOERGEL,K.H., HENSLEY,G.T. y CHEY,W.Y. (1975) Watery diarrhea associated with pancreatic islet cell carcinoma.

Gastroenterology, 69, 206-216.

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

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

SUKOW, W.W., SANDBERG, H.E., LEWIS, E.A., EATOUGH, D.J. y HANSEN, L.D. (1980) Binding of the Tritón X series of non-ionic surfactants to bovine serum albumin. Biochem. 19, 912-917.

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

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

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

SWISLOCKI, N.I., TIERNEY, J. y SONENBERG, M. (1973). Activation of solubilized liver membrane adenylate cyclase by nucleotide. Biochem. Biophys. Res. Comun., 53, 1109.

- TANFORD,C. y REYNOLDS,J.A. (1976) Structural aspects of the use of non-ionic detergents.
Biochem.Biophys.Acta, 457, 133-170.
- TAYLOR,D.P. y PERT, C.B. (1979) Vasoactive intestinal polypeptide specific binding to rat brain membranes.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA., 76, 660-664.
- TOURNUT,R., ESTIVAL,A., VAYSSE,N., PASCAL,J.P. y RIBET,A. (1977) Vasoactive intestinal peptide interaction with secretin on isolated rat pancreas.
Irish J.Med.Sci., 146, 20-21 (resumen)
- UDDMAN,R., ALUMETS,J., EDVINSSON,L., HAKANSON,R. y SUNDLER F. (1978) Peptidergic (VIP) innervation of the esophagus
Gastroenterol., 75, 5-8.
- UDDMAN,R., ALUMETS,J., DENSERT,O., HAKANSON,R. y SUNDLER, F. (1978a) Occurrence and distribution of VIP nerves in the nasal mucosa and tracheobronchial wall.
Acta Otolaryngol., 86, 445-448.
- UDDMAN,R., MALM,R. y SUNDLER,F. (1980) The origin of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) nerves in the feline nasal mucosa.
Acta Otolaryngol., 89, 152-156.
- UDDMAN,R., FAHRENKRUG,J., MALM,R., ALUMETS,J., HAKANSON,R. y SUNDLER,F. (1980b) Neuronal VIP in salivary glands : distribution and release.
Acta Physiol.Scand., 110, 31-38.

UDDMAN,R., MALM,M., FARENKRUG,J. y SUNDLER,F. (1981) VIP increased in nasal blood during stimulation of the vidian nerve.

Acta Otolaringol., 91, 135-138.

VAALASTI,A., LINNOILA,I. y HERVONEN,A. (1980) Immunohistochemical demonstration ofVIP, (Met)⁵- and (Leu)⁵- enkephalin immunoreactive nerve fibres in the human prostate and seminal vesicles.

Histochem.,66, 89-98.

VERNER,J.V. y MORRISON,A.V. (1958) Islet cell tumor and a syndrome of refractory watery diarrhea and hipokalemia.

Am.J.Med., 25, 374-380.

VIJAYAN,E., SAMSON,W.K., SAID,S.I.y McCANN,S.M. (1979) Vasoactive intestinal peptide : evidence for a hypothalamic site of action to release growth hormone, luteinizing hormone and prolactin in conscious ovariectomized rats.

Endo. , 104, 53-64

WALDMAN,D.B., GARDNER,J.D., ZFASS,A.M. y MAKHLOUF,G.M. (1977) Effects of vasoactive intestinal peptide,secretin and related peptides on rat colonic transport and adenylylate cyclase activity.

Gastroenterol., 73, 518-523.

WALLES,B., HAKANSON,R., HELM,G., OWMAN,C., SJOBERG,N.O. y SUNDLER,F. (1980) Relaxation of human female genital sphincters by the neuropeptide vasoactive intestinal polypeptide.

Am.J.Obst.Gynecol., 138, 337-338.

WHITMORE,D.A. y WHEELER,K.P. (1980) A simple method for the separation and assay of non-ionic detergents.

J.of Biochem. and Biophys.Methods, 2, 133-138.