

Actualizaciones en Osteología Vol 1 (Nº inaugural): 34-39, 2005.

ACCIÓN DE LA VITAMINA D EN INTESTINO

ANA J. RUSSO DE BOLAND*

Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia. Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca.

Resumen

La vitamina D desempeña un rol central en la regulación de la homeostasis de calcio, modulando los flujos de calcio hacia y desde el medio extracelular. La vitamina D, proveniente de la dieta o de la conversión del 7-dehidrocolesterol en la piel durante la exposición a la luz ultravioleta, es transportada por el plasma al hígado donde se convierte en 25(OH)-vitamina D₃, el que luego en riñón es transformado por la 1 α -hidroxilasa en la forma hormonalmente activa 1,25(OH)₂-vitamina D₃ o calcitriol. El calcitriol actúa a través de un mecanismo genómico mediado por un receptor intracelular, típico de hormonas esteroidales y además produce efectos rápidos sobre el transporte de calcio que son independientes de la acción génica. La absorción intestinal de calcio es un proceso saturable y dependiente de energía. El calcio entra desde el lumen a la célula intestinal a través de la membrana de borde en cepillo (BBM). La proteína ligadora de calcio (calbindina D9 K) facilita la absorción de calcio acarreándolo hacia la membrana basolateral (BLM) donde el calcio es extruido al sistema vascular por la Ca-ATPasa, el *anti-porter* Na⁺/Ca²⁺ y exocitosis. El principal efecto genómico del calcitriol en el metabolismo del calcio es aumentar la absorción intestinal de calcio induciendo la síntesis de varias proteínas, incluyendo a la calbindina D9 K y a la Ca-ATPasa, involucradas en el transporte de calcio intestinal. En células intestinales la hormona activa en forma rápida y transitoria las vías mensajeras intracelulares adenilil ciclasa/AMPC/PKA y fosfolipasa C/IP3/DAG/PKC que participan en la regulación del calcio intracelular promoviendo el influjo de calcio a través de canales dependientes de voltaje, y provocando la liberación de calcio de los depósitos intracelulares. En estas células, el calcitriol también estimula vías de señalización intracelular ligadas a la fosforilación en tirosina que conducen a la activación de la tirosina quinasa citosólica c-Src la que participa en la fosforilación de la fosfolipasa C γ y de las proteinquinas reguladas por mitógenos (MAP quinasas) ERK1 y ERK2, enzimas que regulan la proliferación celular. Como consecuencia de la activación de ERK1 y ERK2, la hormona induce en células intestinales la expresión de la oncoproteína c-Fos, y estimula la síntesis de ADN.

Palabras clave: vitamina D; intestino; transporte de calcio; transducción de señales; MAP quinasas

* Correo electrónico: aboland@criba.edu.ar

Summary

INTESTINAL ACTION OF VITAMIN D

Vitamin D has a central role in the homeostasis of calcium metabolism, regulating calcium fluxes into and out of the extracellular medium. Vitamin D, coming from the diet or from the skin (through conversion of 7-dehydrocholesterol during exposure to ultraviolet sunrays) is transported in plasma to the liver, where it is converted into 25(OH)-vitamin D₃, which is in turn converted in the kidney by the enzyme 1 α -hydroxylase into 1,25(OH)₂-vitamin D₃ or calcitriol, the hormonally active form of the vitamin. Calcitriol acts through a genomic mechanism mediated by an intracellular receptor, in a way that is typical of steroid hormones, and also produces rapid effects on calcium transport which are independent of genomic actions. Intestinal calcium absorption is a saturable, energy-dependent process. Calcium enters into the intestinal cell from the lumen through the brush border membrane (BBM). Calcium-binding protein (calbindin D9 K) facilitates calcium absorption carrying it towards the basolateral membrane (BLM), where it is extruded to the vascular system by Ca-ATPase, the anti-porter Na⁺/Ca²⁺, and exocytosis. The main genomic effect of calcitriol on calcium metabolism is to increase intestinal calcium absorption, inducing the synthesis of several proteins, including calbindin D9 K and Ca-ATPase, involved in the cation transport. In intestinal cells the hormone activates, in a fast and transient way, the adenylyl cyclase/AMPc/PKA and phospholipase C/IP3/DAG/PKC intracellular messenger pathways, which participate in the regulation of intracellular calcium promoting calcium influx through voltage-dependent channels, and causing the release of calcium from intracellular stores. In these cells, calcitriol also stimulates intracellular signaling pathways leading to phosphorylation of tyrosine residues which, in turn, activate the cytosolic tyrosin-kinase c-Src. This kinase participates in the phosphorylation of phospholipase C- γ and the mitogen-activated protein kinases (MAPK) ERK1 and ERK2, which regulate cellular proliferation. As a consequence of the activation of ERK1 and ERK2, the hormone induces the expression of oncoprotein c-Fos in intestinal cells, and stimulates DNA synthesis.

Key words: vitamin D; intestine; calcium transport; signal transduction; MAP kinases

Introducción

La vitamina D₃ desempeña una función primordial en la regulación del metabolismo del calcio y fósforo en vertebrados. También participa en otras importantes funciones biológicas regulando la proliferación y diferenciación celular y el sistema inmune.¹ Los órganos clásicos de acción de la hormona son intestino, hueso y riñón, donde se han encontrado receptores específicos.² Además de los órganos clásicos, se han encontrado receptores para la hormona en una gran variedad de tejidos incluyendo el músculo esquelético y cardíaco.

Los organismos superiores obtienen vitamina D de la dieta o de la conversión del 7-dehidrocolesterol en la piel, durante la exposición a la luz ultravioleta. Para que sea biológicamente activa, la Vitamina D tiene que ser metabolizada en el organismo a productos más polares.³ Es transportada por la sangre al hígado donde es hidroxilada [25(OH)-vitamina D₃], y luego al riñón donde sufre una segunda hidroxilación para convertirse en la forma hormonalmente activa: 1,25(OH)₂-vitamina D₃ o calcitriol.

Absorción intestinal de calcio

El calcitriol es el principal regulador de la absorción intestinal de calcio. El calcio se absorbe en el intestino delgado a través de un proceso saturable y dependiente de energía (transcelular), localizado en el duodeno y de un proceso pasivo (paracelular) que funciona a lo largo de todo el intestino.⁴ El proceso transcelular comprende tres fases: A) entrada del calcio desde el lumen a la célula intestinal a través de canales de calcio especializados (TRPV5 y TRPV6), localizados en la membrana de borde en cepillo (BBM), B) difusión intracelular, mediada por la proteína citosólica ligadora de calcio (calbindinD-9k) y C) extrusión del calcio al sistema vascular, mediado por la Ca-ATPasa y el *anti-porter* Na⁺/Ca²⁺ localizados en la membrana basolateral (BLM) (Fig. 1).

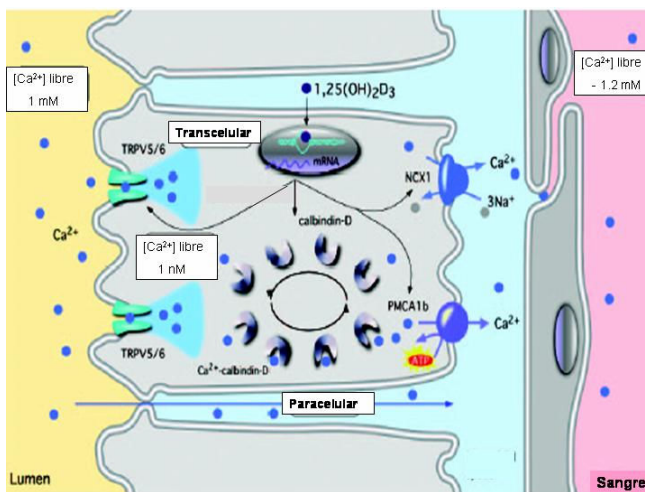


Figura 1. Transporte epitelial de calcio

Las células intestinales absorben calcio por medio de un transporte paracelular y transcelular. El transporte pasivo y paracelular de Ca²⁺ es dirigido por un gradiente electroquímico (flecha azul). El calcitriol [1,25(OH)₂D₃] estimula las etapas individuales del transporte transcelular de Ca²⁺

incrementando los niveles de expresión de los canales de Ca^{2+} luminal, las calbindinas y los sistemas de extrusión. El transporte transcelular de Ca^{2+} ocurre en tres etapas: entrada de Ca^{2+} a través los canales de Ca^{2+} (TRPV5 y TRPV6); difusión del Ca^{2+} unido a las calbindinas a la membrana basolateral y extrusión del Ca^{2+} vía la Ca^{2+} ATPasa (PMCA1b) y el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX1). Esto resulta en una neta absorción de Ca^{2+} desde el espacio luminal al compartimiento extracelular.

La hormona regula el transporte de calcio en el intestino mediante dos mecanismos: un mecanismo genómico y un mecanismo rápido independiente de la acción génica (Fig. 2).

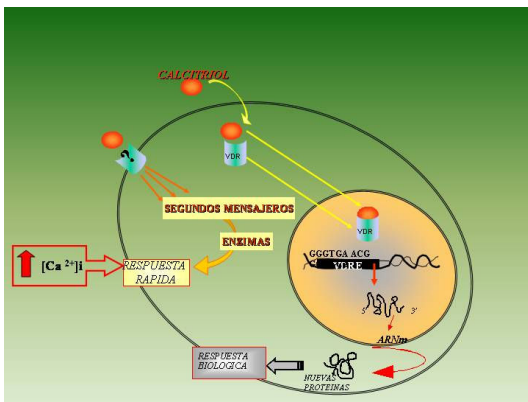


Figura 2. Mecanismo de acción del calcitriol es células intestinales

El calcitriol actúa en intestino a través de dos mecanismos: Uno típico de hormonas esteroidales, uniéndose con su receptor (VDR) específico en el citosol o núcleo, el complejo H-VDR interactúa en el núcleo con secuencias específicas de ADN, induciendo la transcripción génica y la síntesis de nuevas proteínas. El otro mecanismo es a nivel de membrana, independiente de la síntesis *de novo* de proteínas, activando vías de transducción de señales que conducen en pocos segundos o minutos a una respuesta biológica, siendo la más importante el aumento del calcio intracelular.

Mecanismo genómico: Es similar al de otras hormonas esteroidales y es mediado por una interacción esteroespecífica del calcitriol con su receptor VDR, el cual forma heterodímeros con el receptor retinoico X (RXR).⁵ Luego de unirse al VDR, en el citosol o núcleo, el complejo VDR-calcitriol se asocia, en el núcleo de la célula intestinal, con secuencias específicas del ADN. Se forman nuevas moléculas de ARN mensajero que codifican la síntesis de proteínas esenciales para la absorción intestinal de calcio. Las calbindinas,⁶ proteínas ligadoras de calcio involucradas en el transporte y regulación intracelular del calcio, son el

producto génico mejor entendido y más estudiado. La hormona también induce la biosíntesis de los canales de calcio de la BBM, TRPV5 (CaT1) y TRPV6 (CaT2),⁷ involucrados en el transporte transcelular de calcio y la Ca-ATPasa y el *anti-porter* $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, involucrados en la extrucción del calcio intestinal.⁸

Mecanismo no-genómico: La hormona estimula la entrada de calcio a la célula intestinal a través de poros o canales de calcio localizados en la membrana basolateral. El cierre y la apertura de estos canales es controlado por el potencial de la membrana (canales sensibles a voltaje) y regulados por fosforilación de las proteínas que forman el poro o canal. Se ha demostrado que el agonista de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje BAY K8644, de la familia de dihidropiridinas, estimula el influjo de Ca^{2+} de igual forma que concentraciones fisiológicas de calcitriol, mientras que el antagonista de estos canales de Ca^{2+} nifedipina bloquea el incremento inducido por la hormona.⁹ Se comprobó que el calcitriol estimula la actividad de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje a través de fosforilaciones mediadas por las proteinquinas A y C (Fig. 3), provocando la elevación de la concentración intracelular de calcio.^{10, 11}

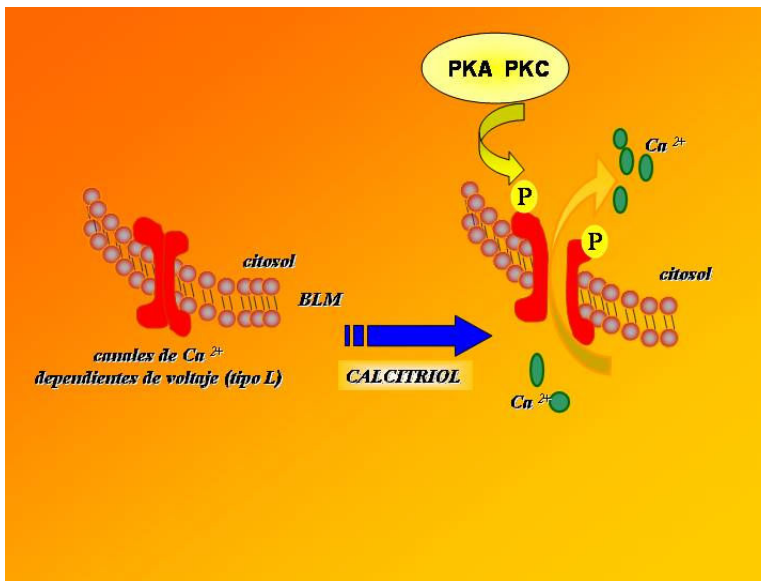


Figura 3. Apertura de los canales de Ca^{2+} -dependientes de voltaje por fosforilaciones mediadas por PKA y PKC. El tratamiento con calcitriol provoca la activación de las kinasas A y C, las que fosforilan los canales de calcio dependientes de voltaje (tipo L) en la membrana basolateral (BLM), esto provoca la apertura del canal y por consiguiente la entrada de calcio al enterocito.

Activación de vías mensajeras

La adenilil ciclasa (AC) desempeña un rol clave en la transducción de señales hormonales, generando AMPc; este segundo mensajero activa a la proteinquinasa A (PKA) uniéndose a su subunidad regulatoria.¹² En células intestinales de aves y mamíferos, el calcitriol activa, en segundos o minutos, la vía AC/AMPc/PKA.^{11, 13} La hormona incrementa en más de dos veces los niveles de AMPc y produce un aumento similar en la actividad de la enzima AC en membranas microsomales.¹³ Además, en células intestinales, el calcitriol estimula la hidrólisis de polifosfoinosítidos por la fosfolipasa C (PLC) generando los segundos mensajeros inositol trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG).¹⁴⁻¹⁶ El DAG activa a la proteína quinasa C y el IP3 moviliza calcio de los depósitos de calcio intracelular. En células duodenales, el calcitriol induce un rápido aumento de la concentración de calcio citosólico, debido a la movilización de Ca^{2+} de depósitos endógenos, seguido de un aumento sostenido que proviene del medio extracelular.¹⁷ Este aumento transitorio de la concentración de calcio intracelular estimula el proceso de exocitosis y la actividad de la Ca-ATPasa en la membrana basolateral del enterocito, lo que conduce a un rápido aumento del pasaje de calcio al sistema vascular.

Receptores asociados a membrana

Los efectos rápidos del calcitriol, que se manifiestan en segundos-minutos, inducen la regulación secundaria de genes que resultan en los efectos genómicos. Algunos efectos rápidos iniciados en la membrana plasmática son específicos de esta hormona esteroidea y pueden ser inhibidos por antagonistas del calcitriol. Esto ha estimulado a los investigadores a buscar receptores específicos asociados a la membrana plasmática. Recientemente se ha aportado evidencia de la existencia de un receptor para calcitriol en la membrana basolateral de células intestinales.¹⁸ Es una proteína de 64 kD que ha sido denominada 1,25D3-MARRS; en el 2004, el ADNc que codifica para esta proteína ha sido clonado en duodeno

de aves.¹⁹ Hay evidencia experimental de la importancia fisiológica de los efectos rápidos iniciados en la membrana plasmática, demostrando que el ligando de la proteína 1,25D3MARRS correlaciona con la estimulación de vías de transducción de señales y transporte de calcio en intestino,²⁰ evidenciando la independencia de los efectos no-genómicos del receptor nuclear.

Sin embargo en otros tejidos se ha demostrado la participación del receptor nuclear (VDR) tradicional en la iniciación de los efectos rápidos en la membrana plasmática. Esta hipótesis es sustentada por el trabajo de Erben y col.,²¹ los que demuestran que desaparecen los efectos rápidos no-genómicos por disrupción del VDR en ratones. Por lo tanto, el problema de la señalización a nivel de membrana y su conexión con el receptor clásico nuclear en intestino deberá ser más profundamente estudiado.

Activación de cascadas mitogénicas

En estas células, el calcitriol también estimula vías de señalización intracelular ligadas a la fosforilación en tirosina que conducen a la activación de la fosfolipasa C γ y de las proteinquinasas reguladas por mitógenos (MAP quinasas) ERK1 y ERK2,^{22, 23} enzimas que regulan la proliferación celular.²⁴ La hormona aumenta ya al minuto la actividad de estas MAP quinasas, y su fosforilación en residuos de tirosina, con una cinética comparable con los cambios observados en la actividad enzimática.²³ Se ha demostrado que la tirosina citosólica c-Src participa en la fosforilación de las MAP quinasas ERK1 y ERK2, ya que PP1, un inhibidor específico de esta familia de quinasas suprime la fosforilación de ERK1/2 inducida por calcitriol.²³ Hasta el presente se desconoce cómo es transmitida la señal del calcitriol desde su receptor de membrana a la tirosinquinasa citosólica c-Src.

La fosfatidil inositol 3-quinasa (PI3K) es miembro de una familia de quinasas lipídicas, implicada en muchos procesos fisiológicos, entre ellos, regulación de la proliferación, diferenciación y supervivencia celular.²⁵ Además de actuar como quinasa lipídica, PI3K ha sido implicada en la regulación de la cascada de MAP quinasas, específicamente en la activación de ERK1 y ERK2.²⁶ Sin embargo, en

células intestinales PI3K no participa en la fosforilación de las MAPK inducida por calcitriol. Es más, si bien la hormona activa a PI3K en otros tejidos blanco, en intestino no estimula la actividad enzimática de PI3K ni la fosforilación de su subunidad regulatoria p85.²³

En células de mamíferos se han identificado tres familias de MAP quinasas: ERK1/2, JNK1/2 y las p38 MAPKs.²⁷ Las tres familias de MAP quinasas son activadas por quinasas (MAP-quinasa quinasas) de especificidad dual, que las fosforilan en residuos de tirosina y treonina. Existe evidencia de que el calcitriol, además de activar a ERK1/2, también estimula la actividad y fosforilación en tirosina de p38 MAPK siendo máxima la respuesta a los 2 min de exposición a la hormona (4-5 veces sobre basales).²⁸ La fosforilación de p38 por calcitriol depende de la dosis, siendo el mayor estímulo entre 0,1 y 1 nM y es totalmente suprimida por el inhibidor específico de esta quinasa, el compuesto SB 203580. Se demostró que PKA, PKC y la tirosina quinasa citosólica c-Src son parte del mecanismo por el cual el calcitriol activa a p38 MAPK, ya que los efectos de la hormona son atenuados por el antagonista de AMPc, el compuesto Rp-cAMP, el inhibidor de PKC, Ro 318220 y el inhibidor de c-Src PP1.²⁸

Los efectos rápidos, no-genómicos, del calcitriol parecen modular funciones biológicas e interactuar con el núcleo celular para controlar respuestas genómicas asociadas con la diferenciación y proliferación celular. Se ha demostrado que, como consecuencia de la activación de ERK1/2 y de p38 MAPK, la hormona induce en células intestinales la expresión de la oncoproteína de expresión temprana c-Fos.²⁸ El calcitriol también estimula la síntesis de ADN en las células intestinales a través de la vía mitogénica de las MAP quinasas ERK1/2, ya que la proliferación de estas células inducida por la hormona es suprimida por un inhibidor específico de ERKs, el compuesto PD98059 (Fig. 4).

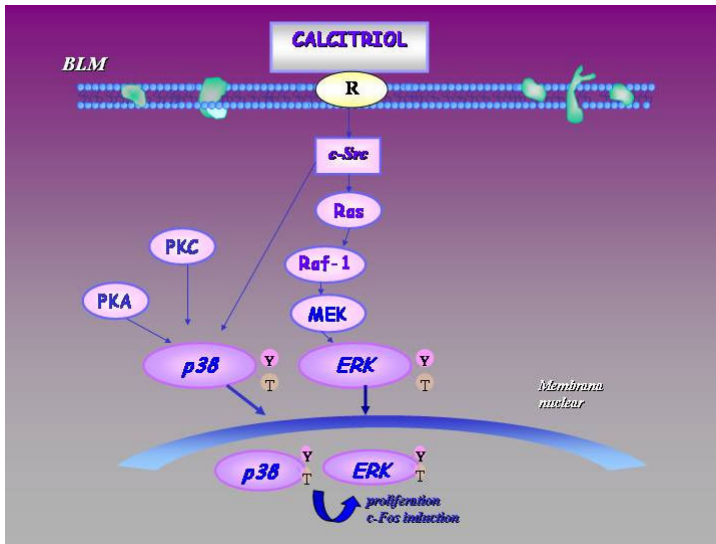


Figura 4. Estimulación de vías mitogénicas por calcitriol

El calcitriol activa a la tirosina quinasa citosólica cSrc, luego Src inicia la cascada de las ERKs fosforilando en tirosina a proteínas adaptadoras, seguido de la activación de Ras y Raf quinasa. Raf fosforila a MEK, que a su vez activa a ERK por fosforilación dual en tirosina y treonina. También vía c-Src, PKA y PKC la hormona activa a p38 MAPK, la que se fosforila en tirosina y treonina. Una vez activadas, ERK y p38 MAPK se translocan al núcleo, donde inducen la expresión de la oncoproteína c-Fos y la proliferación.

Futuras investigaciones nos indicarán si el calcitriol también modula la actividad de JNK y si alguna de las cascadas mitogénicas activadas por la hormona tiene un rol en la apoptosis de las células intestinales.

Conclusión: Está demostrado que en células intestinales el calcitriol tiene dos importantes roles: regulación de la absorción intestinal de calcio y activación de cascadas mitogénicas que controlan la proliferación y diferenciación celular. La existencia de un receptor en la membrana plasmática y la activación de flujos de calcio y quinasas, luego del tratamiento con calcitriol, sugiere que el receptor de membrana interactuaría con proteínas G y con tirosinquinasa no receptoras que inician la señalización intracelular. Sin embargo, hasta el momento, no hay evidencia directa de interacción del receptor de membrana con proteínas G. Si bien se ha acumulado evidencia de la importancia del receptor de membrana en las respuestas rápidas, no-genómicas de la hormona, en otros tejidos se ha

demostrado la participación del receptor nuclear tradicional (VDR). A pesar de los importantes avances en este campo en los últimos 15 años, y de la nueva información obtenida de estudios con animales transgénicos y animales donde se ha silenciado la expresión del VDR, muchas preguntas importantes sobre la conexión de las respuestas genómicas con las iniciadas en la membrana plasmática todavía necesitan resolverse.

(Recibido: julio de 2005. Aceptado: agosto de 2005)

Referencias

1. Walters MR. *m*Newly identified actions of the vitamin D endocrine system. *Endocr Rev* 1992; 13: 719-64.
2. Stumpf WE, Sar M, Reid FA, et al. Target cells for 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in intestinal tract, stomach, kidney, skin, pituitary, and parathyroid. *Science* 1979; 206: 1188-90.
3. Holick MF. Vitamin D: photobiology, metabolism, mechanism of action, and clinical applications. En: Favus MJ, ed. *"Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism"*, 5th ed. Washington, DC: American Society for Bone and Mineral Research, 2003; pp 129-37.
4. Fullner CS. Intestinal calcium absorption: calcium entry. *J Nutr* 1992; 122: 644-50.
5. Kimmel-Jehan C, Jehan F, DeLuca HF. Salt concentration determines 1,25-dihydroxyvitamin D₃ dependency of vitamin D receptor-retinoid X receptor-vitamin D-responsive element complex formation. *Arch Biochem Biophys* 1997; 341:75-80.
6. Christakos S, Barletta F, Huening M, et al. Vitamin D target proteins: function and regulation. *J Cell Biochem* 2003; 88: 238-44.
7. Hoenderop JG, Nilius B, Bindels RJ. Epithelial calcium channels: from identification to function and regulation. *Pflugers Arch* 2003; 446: 304-8.
8. Pannabecker TL, Chandler JS, Wasserman RH. Vitamin-D-dependent transcriptional regulation of the intestinal plasma membrane calcium pump. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 213: 499-505.

9. Boland AR de, Nemere I, Norman AW. Ca^{2+} -channel agonist BAY K8644 mimicks $1,25(\text{OH})_2$ -vitamin D_3 rapid enhancement of Ca^{2+} transport in the perfused duodenum. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 166: 217-22.
10. Boland AR de, Norman AW. Evidence for involvement of protein kinase C and cAMP-dependent protein kinase in the $1,25(\text{OH})_2$ -vitamin D_3 -mediated rapid stimulation of intestinal Ca^{2+} transport. *Endocrinology* 1990; 127: 39-45.
11. Boland AR de, Norman AW. Influx of extracellular calcium mediates $1,25(\text{OH})_2$ -vitamin D_3 -dependent rapid stimulation of duodenal Ca^{2+} transport. *Endocrinology* 1990; 127: 2475-80.
12. Soderling T. Protein kinases, regulation by autoinhibitory domains. *J Biol Chem* 1990; 265: 1823-6.
13. Massheimer V, Boland RL, Boland AR de. Rapid $1,25(\text{OH})_2$ -Vitamin D_3 stimulation of calcium uptake by rat intestinal cells involves a dihydropyridine-sensitive cAMP-dependent pathway. *Cellular Signalling* 1994; 6: 299-304.
14. Wali RK, Baum CL, Sitrin MD, Brasitus TA. $1,25(\text{OH})_2$ vitamin D_3 stimulates membrane phosphoinositide turnover, activates protein kinase C, and increases cytosolic calcium in rat colonic epithelium. *J Clin Invest* 1990; 85: 1296-303.
15. Wali RK, Baum CL, Bolt MJC, Brasitus TA, Sitrin MD. $1,25$ -dihydroxyvitamin D_3 inhibits Na^+ - H^+ exchange by stimulating membrane phosphoinositide turnover and increasing cytosolic calcium in CaCo-2 cells. *Endocrinology* 1992; 131: 1125-33.
16. Boland AR de, Facchinetti MM, Balogh G, Massheimer V, Boland RL. Age-associated decrease in inositol 1,4,5-trisphosphate and diacylglycerol generation by $1,25(\text{OH})_2$ vitamin D_3 in rat intestine. *Cellular Signalling* 1996; 8: 153-7.
17. Boland AR de, Nemere I. Rapid actions of vitamin D compounds. *J Cell Biochem* 1992; 49: 32-6.
18. Nemere I, Dormanen MC, Hammond MW, Okamura WH, Norman AW. Identification of a specific binding protein for $1,25$ -dihydroxyvitamin D_3 in basal-lateral membranes of chick intestinal epithelium and relationship to transcaltachia. *J Biol Chem* 1994; 269: 23750-6.
19. Nemere I, Farach-Carson MC, Rohe B, et al. Ribozyme knockdown functionally links a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ membrane binding protein ($1,25\text{D}_3$ -MARRS) and phosphate uptake in intestinal cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 7392-7.

- 20.** Larsson B, Nemere I. Effect of growth and maturation on membrane-initiated actions of 1,25-dihydroxyvitamin D₃. II. Calcium transport, receptor kinetics and signal transduction in intestine of female chickens. *J Cell Biochem* 2003; 90: 901-3.
- 21.** Erben RG, Soegiarto DW, Weber K, et al. Deletion of deoxyribonucleic acid binding domain of the vitamin D receptor abrogates genomic and nongenomic functions of vitamin D. *Mol Endocrinol* 2002; 16: 1524-37.
- 22.** Boland AR de, Norman AW. 1,25(OH)₂-vitamin D₃-signaling in chick enterocytes: Enhancement of tyrosine phosphorylation and rapid activation of MAP kinase. *J Cell Biochem* 1998; 69: 470-82.
- 23.** Gonzalez Pardo V, Russo de Boland A. Tyrosine phosphorylation signaling dependent on 1 α ,25(OH)₂-Vitamin D₃ in rat intestinal cells: Effect of ageing. *J Biochem Cell Biol* 2004; 36: 489-504.
- 24.** Marshall CJ. Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* 1995; 80: 179-85.
- 25.** Fruman DA, Meyers RE, Cantley LC. Phosphoinositide kinases. *Annu Rev Biochem* 1998; 67: 481-507.
- 26.** von Willebrand M, Jascur T, Bonnefoy-Berard N, et al. Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase blocks T cell antigen receptor/CD3-induced activation of the mitogen-activated kinase Erk2. *Eur J Biochem* 1996; 235: 828-35.
- 27.** Murga C, Fukuhara S, Gutkind JS. Novel molecular mediators in the pathway connecting G-protein-coupled receptors to MAP kinase cascades. *Trends Endocrinol Metab* 1999; 10: 122-7.
- 28.** González Pardo V, Boland R, Russo de Boland A. 1 α ,25(OH)₂-Vitamin D₃ stimulates intestinal cell p38 MAPK activity and increases c-fos expression. *Int J Biochem Cell Biol* 2005 (en prensa).