



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**  
**FACULTAD DE QUIMICA**

**EFFECTO DE ADENOSINA EN LA GLUCONEOGENESIS  
HEPÁTICA "IN VIVO" PAPEL DE LA ENERGIA, ESTA-  
DO REDOX Y OXIDACION DE LOS ACIDOS GRASOS.**

**T E S I S**  
**PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

**Lucía Yáñez Maldonado**

**1 9 8 2**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# I N D I C E

	Pag.
I. INTRODUCCION.	
I.1. Metabolismo de adenosina.	1
I.2. La adenosina como un arma para el estudio del metabolismo intermedio	1
a) Biosíntesis del glucógeno hepático	3
b) Aumento de la carga energética del hepatocito	4
c) Aumento del potencial de óxido-reducción mitocondrial	4
d) Regulación de la oxidación de los ácidos grasos.	5
I.3. Importancia fisiológica de la adenosina	6
I.4. Antecedentes del trabajo.	7
I.5. Gluconeogénesis, su regulación	8
I.6. Controversia y objetivo a esclarecer en el trabajo.	10
II. MATERIAL Y METODOS.	14
II.1. Tratamiento	14
II.2. Preparación de extractos	15
II.3. Determinación de metabolitos	
II.3.1. Fundamento	15
II.3.2. Reactivos	18
II.3.3. Cálculos	20
II.4. Incorporación de radioactividad a metabolitos	21
II.4.1. Fundamento	21
II.4.2. Aplicación de la muestra	21
II.4.3. Corrimiento	22
II.4.4. Revelado	22
II.4.5. Cuantificación de la marca	23
III. RESULTADOS	
III.1. Efecto de la adenosina sobre los niveles de glucosa hepática y la gluconeogénesis de lactato-C <sup>14</sup> y glicerol-C <sup>14</sup> .	24
III.1.1. Efecto de adenosina sobre los niveles de glucosa hepática	24
III.1.2. Gluconeogénesis a partir de lactato-C <sup>14</sup> .	

	Pag.
III.1.3. Gluconeogénesis a partir de glic <u>e</u> rol-C <sup>14</sup>	28
III.2. Efecto de adenosina sobre el destino de -- glicerol-C <sup>14</sup> .	28
III.2.1. Efecto de adenosina sobre la distri <u>bi</u> ción del glicerol-C <sup>14</sup> .	28
III.2.2. Formación de lactato a partir de -- glicerol-C <sup>14</sup> .	35
III.2.3. Formación de $\alpha$ -glic <u>e</u> rofosfato a par <u>tir</u> de glicerol-C <sup>14</sup> .	35
III.3. Efecto de la adenosina sobre la lipogénesis hepática a partir de glicerol-C <sup>14</sup> .	39
III.4. Efecto de adenosina sobre el contenido de nu <u>cl</u> eótidos de adenina y fosfato en el hígado.	44
IV. DISCUSION	47
V. CONCLUSIONES	52
VI. RESUMEN	53
VII. BIBLIOGRAFIA	55

Abreviaturas Usadas:

AA = aminoácidos  
ACTH = hormona adrenocorticotrópica  
ADP = adenosín difosfato  
AMP = adenosín monofosfato  
AMPc = adenosín monofosfato cíclico  
ATP = adenosín trifosfato  
Ci = curie  
CoA = coenzima A  
c.p.m. = cuentas por minuto  
D.O. = densidad óptica  
DHAP = dihidroxiacetona fosfato  
1,3-DPG = 1,3-difosfoglicerato  
FAD = flavín adenín dinucleótido  
FADH = flavín adenín dinucleótido reducido  
GDH = glicerofosfato deshidrogenasa  
 $\alpha$ GP = alfa glicerofosfato  
G-6-P = glucosa-6-fosfato  
3-P-GA = 3-fosfogliceraldehído  
3-GP = 3-glicerofosfato  
GTP = guanosín trifosfato  
H K = hexoquinasa  
LDH = lactato deshidrogenasa  
M K = mioquinasa  
NAD = nicotín adenín dinucleótido  
NADH = nicotín adenín dinucleótido reducido  
NADP = nicotín adenín dinucleótido fosfato  
NADPH = nicotín adenín dinucleótido fosfato reducido  
PEP = fosfoenol piruvato  
Pi = fósforo inorgánico  
P K = piruvato quinasa

## I. INTRODUCCION

### I.1. Metabolismo de adenosina.

La adenosina es un nucleósido de adenina intermedio en la degradación de nucleótidos, se encuentra en el citoplasma en cantidades muy pequeñas y su movimiento en las células está regulado (fig.1). Se tiene conocimiento de su presencia en el fluido extracelular y en el plasma.

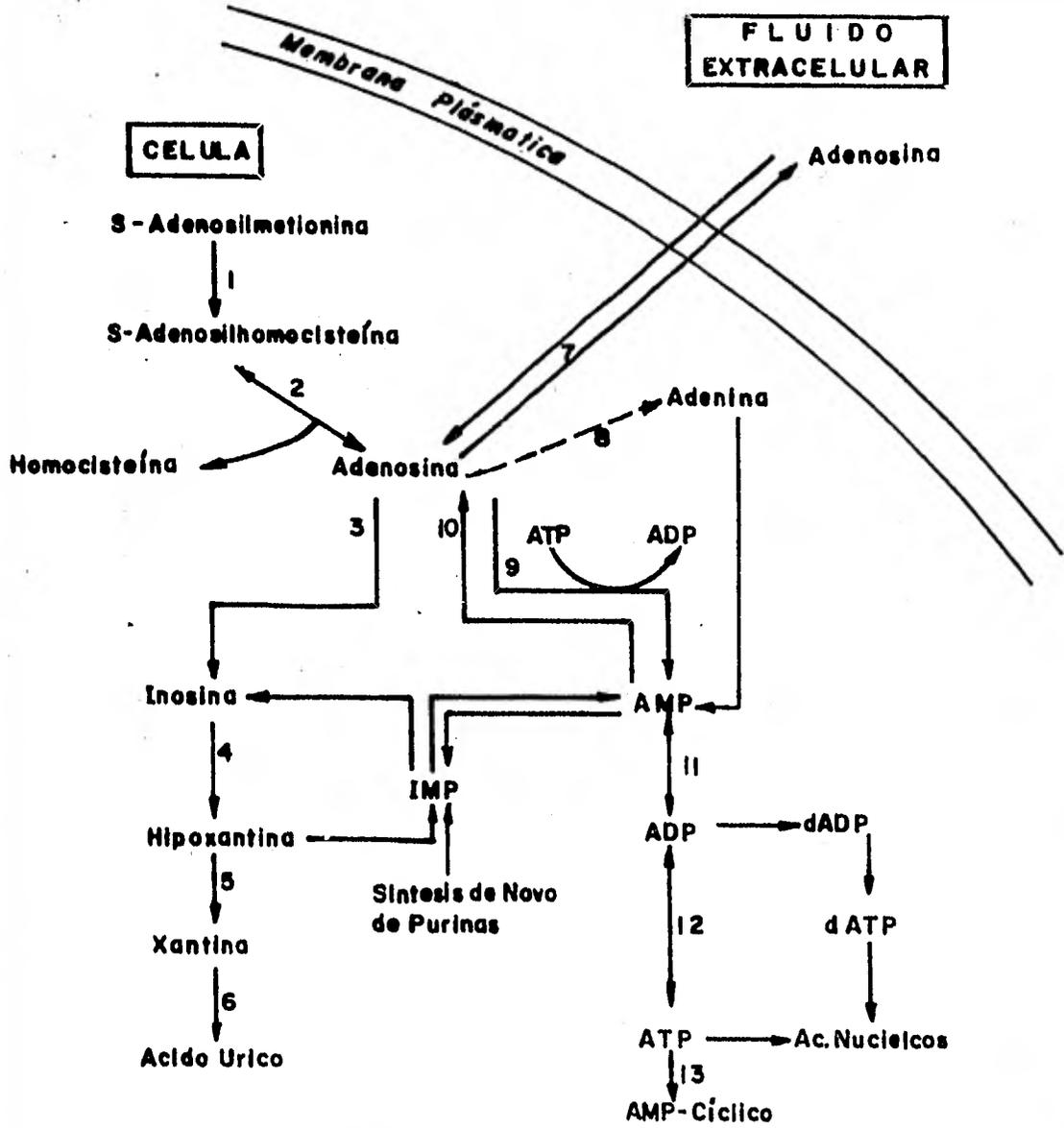
Formación.- La adenosina se forma de la defosforilación del AMP, la cual está catalizada por la enzima 5'-nucleotidasa, o por la degradación de S-adenosilhomocisteína.

Transporte.- Este nucleósido de adenina puede formarse dentro de la célula o entrar a ella por medio de mecanismos de difusión facilitada (fig.1). Los estudios realizados en eritrocitos y leucocitos indican la presencia de un acarreador que media la captación de pirimidín y purín nucleósidos. La Km para el transporte de adenosina tiene un valor entre 4 y 40  $\mu\text{M}$  para las células nucleadas y de 100  $\mu\text{M}$  para eritrocitos.

Regulación.- La conversión de adenosina a inosina o a nucleótidos de adenina dentro de la célula, está regulada por las actividades de las enzimas adenosina deaminasa y adenosina quinasa respectivamente; una baja concentración de adenosina favorecerá su conversión a AMP (3  $\mu\text{M}$  en eritrocitos), mientras que una alta concentración de adenosina traerá consigo la activación de la adenosina deaminasa y con ésto la producción de inosina e hipoxantina (1).

### I.2. La Adenosina como un arma para el estudio del metabolismo intermedio.

La adenosina tiene una actividad fisiológica muy grande, cuyas concentraciones se encuentran en los límites de



- |  |                                |
|--|--------------------------------|
| 1.- S-adenosilmetionina metiltransferasa | 8.- Adenosina fosforilasa      |
| 2.- S-adenosilhomocisteína hidrolasa     | 9.- Adenosina quinasa          |
| 3.- Adenosino Deaminasa                  | 10.- 5' nucleotidasa           |
| 4.- Purín nucleósido. fosforilasa        | 11.- Adenilato quinasa         |
| 5.- y 6.- Xantín oxidasa                 | 12.- Nucleósido difosfoquinasa |
| 7.- Mecanismo de Transporte              | 13.- Adenilato ciclasa         |

FIG. 1

$10^{-6}$  M. Cuando se inyecta por vía intraperitoneal a dosis de  $7.5 \times 10^{-3}$  M, se llega a alcanzar un nivel hasta cien veces mayor que el nivel fisiológico normal, con estas concentraciones ha sido posible detectar puntos de regulación metabólica, por esta razón se ha considerado a la adenosina como un arma para el estudio del metabolismo intermedio (2). Los procesos en los que se ha logrado detectar puntos de regulación gracias a la adenosina son:

a) Biosíntesis del glucógeno hepático.

Desde 1970 Chagoya y cols. encontraron que al tratar ratas adrenalectomizadas con adenosina al efecto del cortisol sobre el aumento en la concentración de glucógeno hepático era disminuído marcadamente (90%), sin embargo la incorporación de alanina- $C^{14}$  y glucosa- $C^{14}$  se encontraba aumentada en comparación con las ratas control, ésto sumado con el aumento en el proceso lipogénico que también produce la adenosina (3) sugería que al haber una demanda aumentada de glucosa en el tejido adiposo causada por la adenosina, esta glucosa se debía obtener a partir de la glucogenólisis y por tanto el nivel de glucógeno disminuye.

Más tarde, se observó que inyectando solamente adenosina a ratas normales el glucógeno aumenta su concentración y su recambio en 23 veces (4).

Con todo lo anterior fué necesario que se investigara el efecto del nucleósido en el proceso enzimático de síntesis de glucógeno (5), encontrándose que la administración de adenosina por vía intraperitoneal producía en la enzima glucógeno sintetasa del hígado (considerada como el punto de mayor importancia en la biosíntesis de glucógeno) un aumento de 8 veces en la actividad de la forma activa, esta elevación no está mediada por insulina, pues en las ratas diabéticas se observa un incremento de 5 veces la actividad

de la forma activa de la enzima glucógena sintetasa. La actividad también fué medida administrando a los animales cicloheximida o actinomicina, no encontrándose ninguna elevación en la activación, por lo que se piensa que el efecto de la adenosina es sobre la síntesis de la proteína que transforma la forma inactiva de la glucógeno sintetasa a la forma activa.

b) Aumento en la carga enegética del hepatocito.

En el trabajo de Chagoya y cols. (5) se observó que desde los 15 min hasta los 30 min de tratamiento con adenosina se producía una disminución del Pi sérico y hepático, así como elevación de ATP, lo cual sugería la utilización del Pi en la formación ATP. Además existía la evidencia que metabolitos como Pi y ATP regulaban "in vivo" la síntesis de glucógeno (De wulf y Hers 1967 (6), Glismann, Pauk y Hern 1967 (7), Todo ésto encaminaba a pensar que la adenosina pudiera estar incrementando la carga energética de la célula hepática.

Al administrar adenosina a ratas normales, se observó un incremento en los niveles de ATP y una disminución de ADP y AMP desde los 30 min hasta los 120 min. Al calcularse la carga energética según Atkinson (8) se encontró que el valor de ésta, en los animales tratados con adenosina era muy cercana a 1 (0.93). que correspondería a un incremento de los procesos biosintéticos (9).

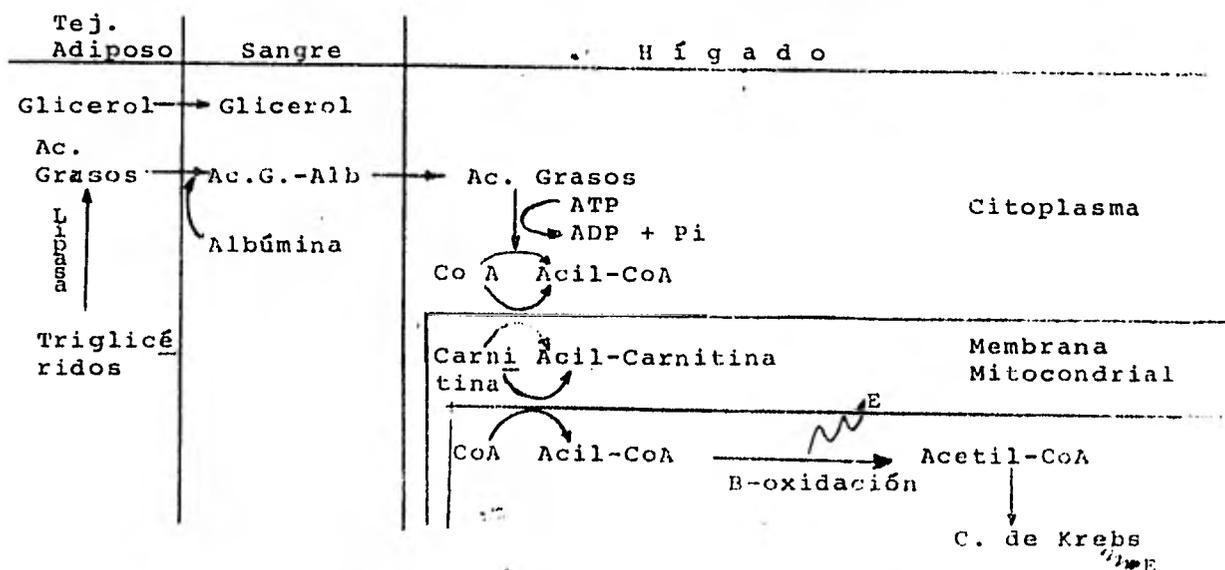
c) Aumento del potencial de óxido reducción mitocondrial.

El estado óxido-reducción citoplásmico y mitocondrial se ha considerado como un parámetro importante en la regulación del metabolismo celular; habitualmente se calcula de la relación NAD/NADH, calculada a su vez con las con-

centraciones de una pareja de óxido-reducción citoplásmica como lactato y piruvato, y de otra pareja de localización mitocondrial como es beta-hidroxibutirato y acetoacetato y de las constantes de equilibrio de las respectivas reacciones (10). Al determinar los potenciales de óxido-reducción en el hígado de ratas tratadas con adenosina se encontró que después de 15 min de tratamiento el estado oxidado de la mitocondria aumenta, recuperando su valor normal a los 60 min, por el contrario en el citoplasma el estado reducido es incrementado después de los 60 min de la inyección del nucleósido. (11).

d) Regulación de la oxidación de los ácidos grasos.

En el hombre como en la rata la oxidación de los ácidos grasos constituye una importante fuente de energía, cuando por alguna razón la oxidación de los carbohidratos no abastece de suficiente energía al organismo como es el caso del ayuno. A continuación se esquematiza en forma sencilla el proceso de oxidación de los ácidos grasos.



Los puntos de importancia en la regulación, donde la adenosina participa son los siguientes:

Disponibilidad del sustrato.- La adenosina disminuye la disponibilidad de los ácidos grasos, pues elimina el efecto lipolítico de hormonas como ACTH, TSH, glucagon y epinefrina (12) al impedir la estimulación de la lipasa hormona sensible (13).

Captación de los ácidos grasos.- El nucleósido de adenina administrado a los animales de experimentación, -- causa inhibición en la captación de los ácidos grasos (14), -- no se conoce el mecanismo, pero posiblemente es a través de -- inhibir la acil-CoA sintetasa (15) (16).

Activación de los ácidos grasos.- La adenosina -- produce una inhibición en la enzima activadora del ac. graso, la acil-CoA sintetasa situada fuera de la mitocondria.

Destino de los ácidos grasos.- Una vez que el -- ácido graso se ha activado la adenosina activa la oxidación -- del mismo.

Oxidación de los ésteres de carnitina.- Se ha encontrado que la adenosina aumenta la oxidación de la palmitoil-carnitina (17).

Efecto de la carga energética de la célula sobre la oxidación de los ácidos grasos.- Ya que la adenosina causa aumento en la carga energética del hepatocito (9) y disminución en la oxidación de los ácidos grasos, la última pudiera ser consecuencia del aumento en la carga energética (2).

### I.3. Importancia fisiológica de la adenosina.

a) En el sistema cardiovascular.- La adenosina -- se ha propuesto como regulador del flujo sanguíneo coronario, ya que se libera cuando hay un balance negativo de oxígeno en el miocardio produciendo así vasodilatación en el músculo li-

so de la arteria y consecuentemente la restauración del balance de oxígeno (18).

b) En el sistema nervioso.- Se ha llegado a describir a la adenosina como neurotransmisor y como depresor de los nervios de la corteza cerebral.

c) En la secreción de hormonas.- La adenosina estimula la secreción de hormonas como son: el glucagon y la -- hormona del crecimiento.

d) En los niveles de AMPc.- Uno de los efectos más importantes de la adenosina es el de incrementar el AMPc en sistemas como son los linfocitos de ratón, músculo miocardio, plaquetas; y disminuir la concentración de este mismo en adipocitos, hígado y cerebro de rata. Los efectos sobre la -- concentración del AMPc están relacionados con la presencia de un receptor específico para la adenosina que se encuentra en la membrana celular (1).

#### I.4. Antecedentes del trabajo.

Existe un considerable número de reportes donde -- se describe la interdependencia del proceso de gluconeogé-- sis con la oxidación de los ácidos grasos, así tenemos que -- Krebs y cols. (19) describen un aumento de la formación de -- glucosa a partir de lactato y fumarato cuasado por ácidos gra-- sos de cadena corta (propionato, butirato, n-hexanoato) y por los cuerpos cetónicos (acetoacetato y  $\beta$ -hidroxibutirato) en -- rebanadas de corteza renal; por otro lado Williamson (20) encuentra también aumentado el proceso gluconeogénico al adicio-- nar ácido oleico a perfundidos de hígado y atribuye este au-- mento al incremento en la velocidad de oxidación de los áci-- dos grasos, otros autores reportan además del aumento de la -- gluconeogénesis producido por la aceleración en la oxidación de los ácidos grasos, alteración en la actividad de la enzima piruvato carboxilasa (20, 21, 22).

En contraste con lo anterior, Chagoya y cols. (5) han encontrado aumento en los niveles de glucosa sanguínea - en animales en ayuno tratados con adenosina, los cuales tienen disminuída la oxidación de los ácidos grasos (4). Además Rodín y cols. (23) han reportado recientemente que la adenosina produce un incremento en la gluconeogénesis de lactato en segmentos de túbulos renales.

En los animales en ayuno, la gluconeogénesis tiene que ser la fuente principal de glucosa y por tanto de - - energía para el hígado y los tejidos periféricos, por esta - razón y los antecedentes ya expuestos resulta interesante el evaluar el proceso gluconeogénico en el hígado de ratas que por haber recibido tratamiento de adenosina presentan inhibición de la oxidación de los ácidos grasos (4) y una disminución en la disponibilidad de NADH mitocondrial (11), además del aumento a 0.93 de la carga energética, que puede estar - sugiriendo el aumento de la gluconeogénesis como el proceso de biosíntesis (8).

Ya que se va a explorar el proceso de gluconeogénesis se hace necesario la presentación en forma resumida -- del mismo así como su regulación, la cual puede estar afectada por la adenosina.

#### 1.5. Gluconeogénesis, su regulación.

La gluconeogénesis es un proceso metabólico que sintetiza glucosa a partir de sustancias que no son carbohidratos. Se considera que el organismo lo lleva a cabo en -- condiciones tales que la disponibilidad de carbohidratos no satisface las demandas energéticas del animal; entre estas - condiciones se incluye el ayuno, una dieta baja en carbohidratos, etc. en las que se observa el mantenimiento de un nivel normal de glucosa circulante y de los tejidos para sa- - tisfacer las necesidades del organismo. En los mamíferos el

proceso gluconeogénico se realiza principalmente en el hígado y en el riñón (24).

En este proceso se utiliza como fuentes de carbono compuestos como: lactato, glicerol, aminoácidos gluconeogénicos (alanina, serina, cistina, cisteína e hidroxiprolina) - los cuales deben ser convertidos primero a piruvato y fosfoenolpiruvato para poder comenzar la ruta de formación de glucosa. La vía gluconeogénica no es una simple reversa de la glucólisis, pues existen cuatro enzimas diferentes que son las que la regulan:

a) Piruvato carboxilasa.- Se encuentra en la mitocondria y cataliza la reacción de carboxilación de piruvato a oxaloacetato, el cual subsecuentemente se puede deshidrogenar a malato o transaminar a aspartato y así atravesar la membrana mitocondial (25). Esta enzima necesita acetil-CoA para su funcionamiento y es inhibida por ADP (26).

b) Fosfoenol piruvato carboxiquinasa.- Esta enzima se encuentra en el citosol en los hepatocitos de rata, cataliza la conversión del oxalacetato citoplásmico en fosfoenol piruvato. La enzima es regulada por algunas hormonas, - en el caso del hígado de rata la insulina tiene un efecto depresivo en su actividad (27).

c) D-fructuosa-1,6-difosfato-1-fosfatasa.- Se encarga de convertir D-fructuosa-1,6-difosfato en D-fructuosa-6-fosfato, son capaces de inhibirla el AMP y el ADP.

d) D-glucosa-6-fosfatasa.- Transforma la D-glucosa-6-fosfato a D-glucosa, esta enzima es inhibida por Pi y por D-glucosa (fig.2).

La biosíntesis de estas cuatro enzimas se encuentra regulada por las hormonas insulina y cortisol; insulina la inhibe y cortisol la estimula (26).

Como se mencionó arriba, los glucocorticoides como el cortisol se reconocen ampliamente como estimuladores -

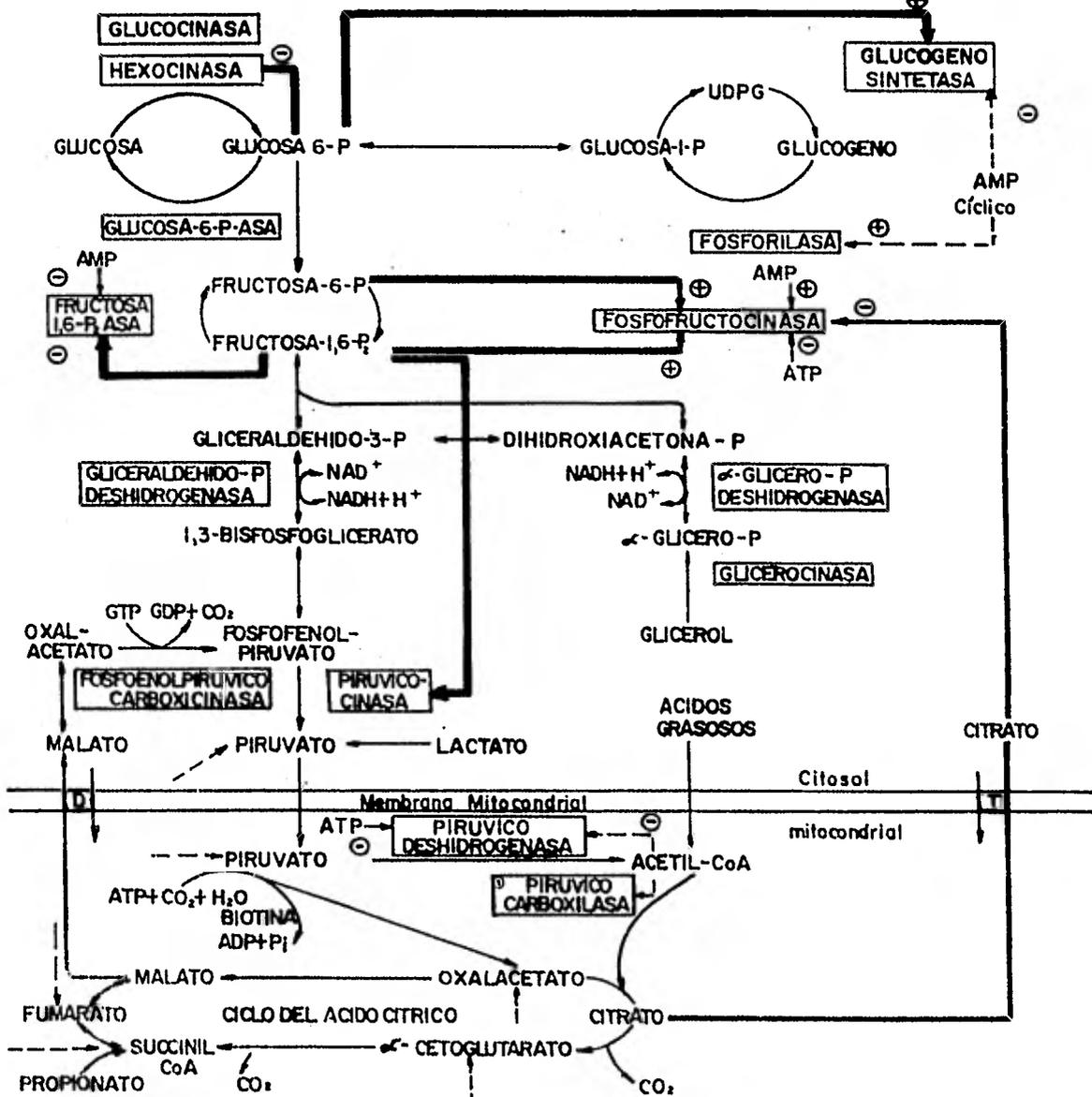
de la formación de carbohidratos en hígado a través del -- proceso gluconeogénico, el mecanismo de esta estimulación -- se ha estudiado intensamente por varios investigadores, pero los eventos moleculares que inician el proceso todavía -- no se conocen. Los glucocorticoides deben actuar sobre algún sistema fundamental de la organización celular que participe en la regulación de la gluconeogénesis y que pueda -- operar esencialmente en la misma forma pero en menor proporción en ausencia de las hormonas correspondientes. Moriwa-ki y Landau al investigar el origen de los carbonos del glu-cogено en el hígado de animales normales hallaron que 50% -- proceden de glicerol, 20% de glucosa, 5-10% de alanina y el resto de fuentes endógenas y que el cortisol no modifica es-tas proporciones, sino que solamente aumenta la cantidad de glucógeno formado (24). Este proceso requiere de energía, -- para sintetizar una molécula de glucosa se consumen seis en-laces de alta energía (4 ATP y 2 GTP) (25). La mayor parte de la energía consumida durante la gluconeogénesis es prove-niente de la oxidación de los ácidos grasos producidos du-rante la lipólisis de triglicéridos (24).

Una dificultad que se presenta cuando se estu-dia la gluconeogénesis es la cantidad tan grande de conexio-nes que tiene con otras vías metabólicas como la glucólisis, la oxidación de los ácidos grasos, el ciclo de los ácidos -- tricarboxílicos, lipogénesis y cetogénesis.

#### I.6. Controversia y objetivo a esclarecer en -- el trabajo.

A pesar de que se sugiere a la adenosina como -- un arma para detectar puntos de regulación metabólica, ha -- surgido cierta confusión respecto a las respuestas cualita-tiva y cuantitativamente diferentes que la adenosina produ-ce dependiendo de los sistemas usados para la experimen-ta-ción. En el animal intacto, la adenosina produce aumento --

# ENZIMAS CLAVE EN EL CONTROL DE LA GLUCOLISIS Y GLUCONEOGENESIS EN EL HIGADO

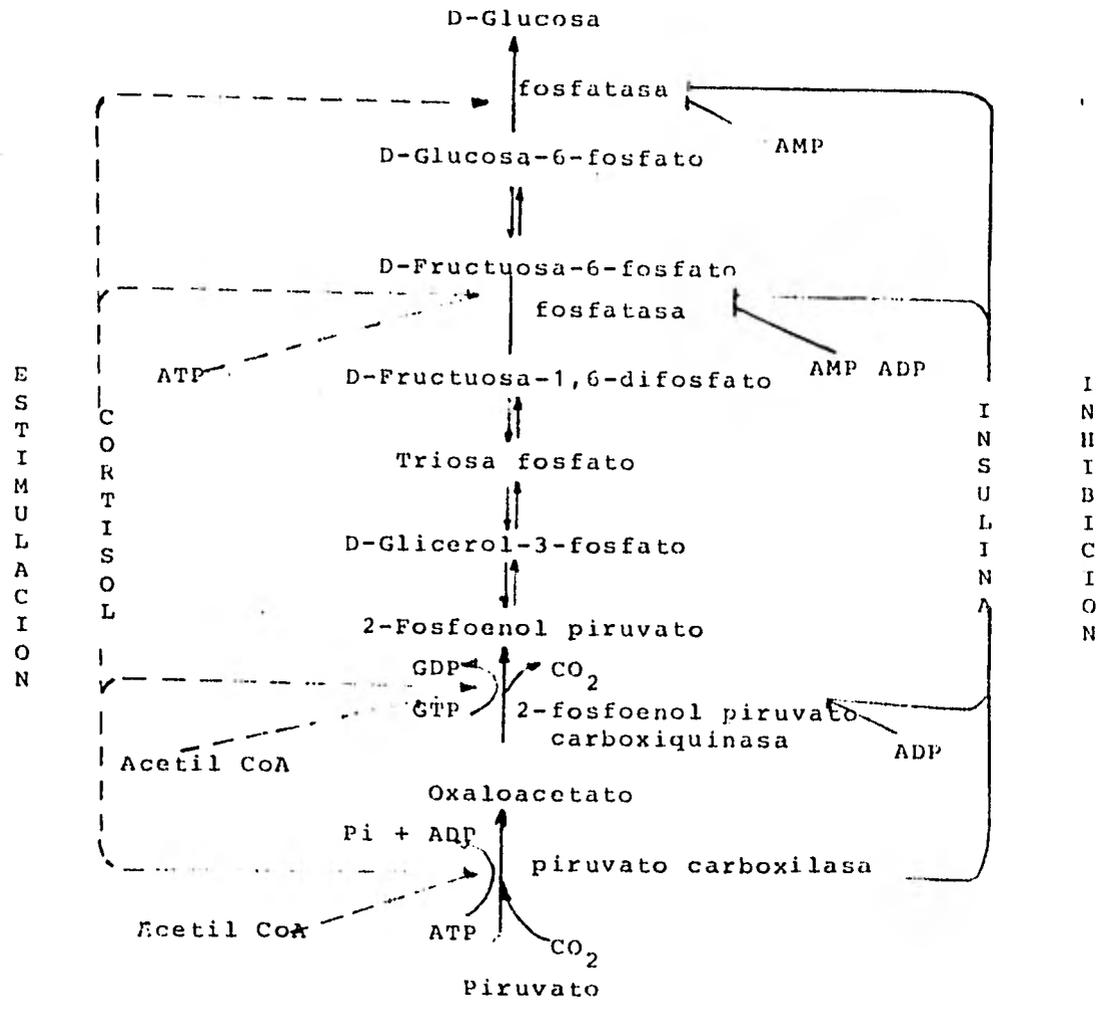


⊕ ACTIVACION  
 ⊖ INHIBICION  
 ALOSTERICA

ⓓ TRANSPORTADOR DE DICARBOXILATO  
 Ⓣ TRANSPORTADOR DE TRICARBOXILATO

--- INDICA LOS PUNTOS DE AFLUJO DE LOS AMINOACIDOS DESPUES DE TRANSAMINACION  
 O DEAMINACION

## METABOLISMO DE LOS CARBOHIDRATOS



Regulación de la Gluconeogénesis

Fig. 3

de 6 veces en la incorporación de alanina-C<sup>14</sup> a glucógeno hepático (4), inhibición de 40% en la oxidación de palmitato - (280, disminución de 85% en la relación de  $\beta$ -hidroxibutirato/acetoacetato (11) y 70% de disminución en la producción de los cuerpos cetónicos (17). Por otra parte, en hepatocitos aislados incubados con adenosina se ha observado 50% de inhibición en la gluconeogénesis de lactato, ningún cambio en la tasa de oxidación de oleato a cuerpos cetónicos y aumento de la relación B-hidroxibutirato/acetoacetato (19).

La disminución en la oxidación de los ácidos grasos y la producción de los cuerpos cetónicos detectada en los hígados de los animales tratados con adenosina (17) predicen una disminución en el proceso gluconeogénico, mientras que los datos previos como la elevación a 6 veces la incorporación de alanina-C<sup>14</sup> a glucógeno (4) y la moderada hiperglucemia (5) sugieren la elevación del mismo proceso. En este trabajo se intenta aclarar el problema investigando la conversión del glicerol-C<sup>14</sup> y del lactato-C<sup>14</sup> a glucosa, así como el destino del glicerol-C<sup>14</sup> en la rata tratada con adenosina, además se explora las pozas de adenín nucleótidos a -- tiempos menores de los ya explorados (9). Con estos datos se espera tener un mejor entendimiento de las relaciones entre la gluconeogénesis, la cetogénesis y la oxidación de los ácidos grasos con la energía y los estados redox de la célula.

## II. MATERIAL Y METODOS.

### II.1. Tratamiento

En este trabajo se usaron ratas macho de la raza Wistar, cuyo peso varió entre 100 y 150 g. Estos animales se mantuvieron en ayuno por aproximadamente 16 horas antes del tratamiento y después fueron sacrificados. El tratamiento que se les dió fue el siguiente:

Grupo tiempo cero.- Este grupo de ratas no recibió ningún tratamiento.

Grupo testigo.- Consistió en una inyección intraperitoneal de solución salina isotónica a dosis de 1 ml. por cada 100 g. de peso corporal que fue aplicada 15, 30, 60 y 120 min antes de su sacrificio y otra de material radiactivo, Glicerol-C<sup>14</sup> o Lactato-C<sup>14</sup> según fuera el caso, a dosis de 2  $\mu$ Ci/100 de peso, que se aplicó siempre 15 minutos antes de su muerte.

Grupo problema.- El tratamiento consistió en la inyección intraperitoneal de adenosina 20 mg/ml a dosis de 1 ml/100 g de peso del animal.

Todos los animales fueron sacrificados por decapitación y se les tomó muestras de sangre, hígado y músculo para preparar extractos perclóricos con los que se trabajó. Se procuró que la toma de las muestras y preparación de extractos se realizara en el menor tiempo posible (5 seg).

A los animales que fueron inyectados con glicerol-C<sup>14</sup> se les extrajo además pequeños pedazos de cerebro, corazón, músculo, hígado y una pequeña cantidad de sangre para investigar la distribución de la radioactividad de glicerol.

#### II.1.1. Soluciones de tratamiento:

a) Adenosina 20 mg/ml preparada en solución salina isotónica y con pH= 7.3.

b) Solución salina isotónica 0.85 % de NaCl.

c) Glicerol-C<sup>14</sup>. - La solución inyectada a las ratas tuvo una concentración de 2  $\mu\text{Ci}/100 \mu\text{l}$  y fue preparada a partir de una solución comercial de 50  $\mu\text{Ci}/\text{ml}$  y actividad específica de 100.1 mCi/nmol.

d) Lactato-C<sup>14</sup>. - Concentración final de - - - - 2  $\mu\text{Ci}/100 \mu\text{l}$ , preparada a partir de Lactato-C<sup>14</sup> 100  $\mu\text{Ci}/\text{ml}$  y con actividad específica de 174.8 mCi/nmol.

## II.2. Preparación de extractos.

Los extractos de hígado y músculo se prepararon con una muestra de tejido de 100 a 150 mg., la cual fue homogeneizada con 2 ml de ácido perclórico 6% p/v, el homogenado se centrifugó a 13,000 rpm y 0°C durante 10 min, con el precipitado se hizo una segunda extracción usando 1 ml. más del ácido. En el caso de los extractos de sangre se ocupó un volumen de 250  $\mu\text{l}$  para su preparación. Todos los extractos se neutralizaron con 0.18 ml. de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 5 M.

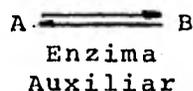
## II.3. Determinación de metabolitos

### II.3.1. Fundamento (30).

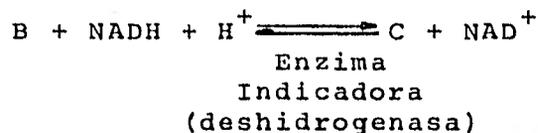
Determinación de AMP, ADP, ATP,  $\alpha$ -glicerofosfato, glicerol, glucosa y lactato. - En estas determinaciones se usaron enzimas deshidrogenasas dependientes de NAD y de NADP, las cuales tienen la capacidad de reducirlos a NADH y NADPH, compuestos que absorben la luz a 340 nm de longitud de onda. Las determinaciones se llevaron a cabo directamente, cuando el metabolito a determinar era el sustrato de la enzima deshidrogenasa, o bien llevando a cabo una reacción auxiliar para obtener el sustrato de la deshidrogenasa, detectándose incremento o decremento de la absorbancia a 340 nm.

Ecuación general:

Reacción auxiliar



Reacción indicadora

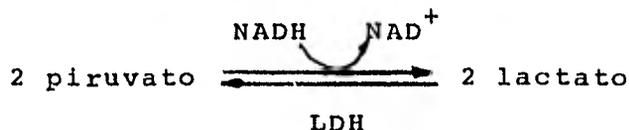
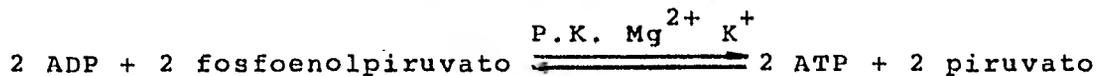
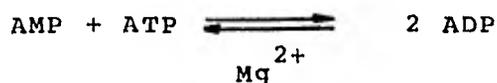


Las variaciones en la densidad óptica debida a NADH o NADPH son proporcionales a la cantidad del producto formado, pudiéndose detectar formación o desaparición de la coenzima reducida.

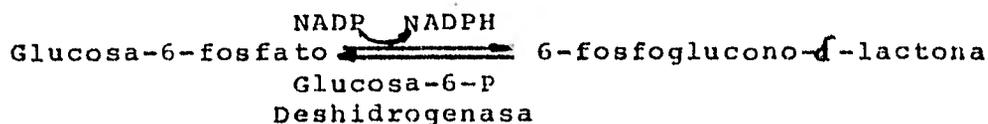
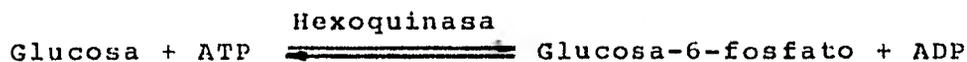
Reacciones:

a) Adenosín-5'-difosfato y Adenosín-5'-monofosfato

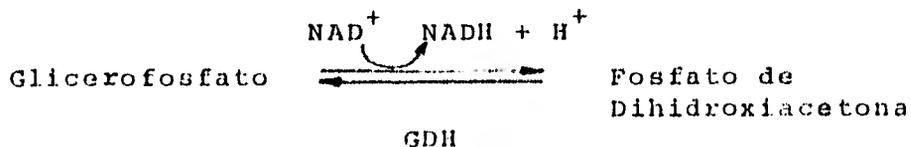
M.K.



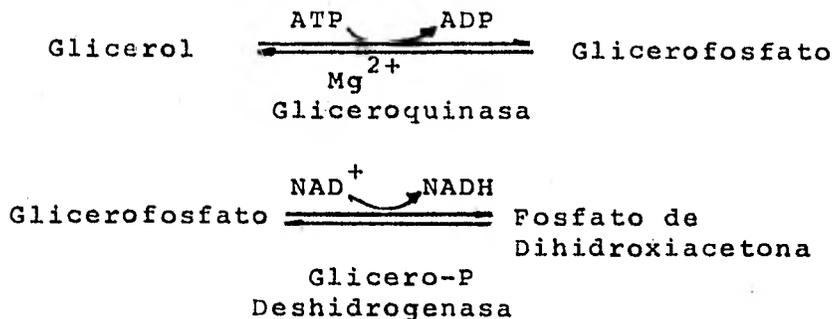
b) Adenosín-5'-trifosfato.- En este caso se usó como coenzima NADP que es reducida a NADPH y también absorbe a 340 nm.



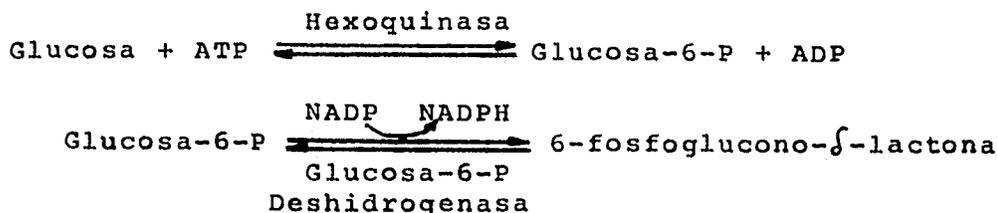
c) Glicerofosfato



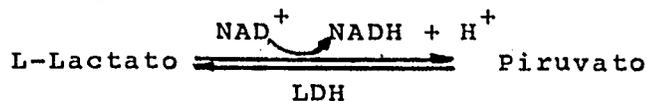
d) Glicerol



e) Glucosa



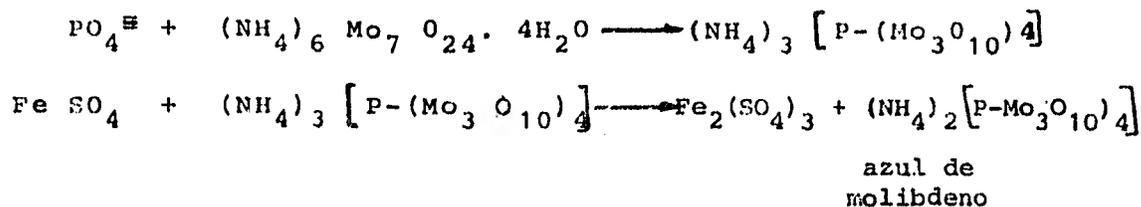
f) Lactato



Determinación de fósforo inorgánico. Método Summer (31).

En este método se cuantifica el fósforo inorgánico por la reacción que se lleva a cabo entre éste y el molibdato de amonio para formar fosfomolibdato de amonio, que al ser reducido por el ión ferroso del  $\text{FeSO}_4$  se transforma en el complejo azul de molibdeno. La intensidad del color azul que se produce se mide a 660 nm de longitud de onda.

Reacción:



Determinación de lípidos hepáticos. Método de Folch (32).

La mayor parte de los lípidos, tanto en los tejidos como en la sangre se encuentran unidos a proteínas, por esta razón es necesario destruir estos enlaces con un disolvente orgánico como el metanol y después extraer los lípidos con cloroformo. En el método de Folch se usa directamente la mezcla cloroformo-metanol, para la desnaturalización de las proteínas y extracción de los lípidos; la cantidad de estos últimos se determina por diferencia de peso después de evaporar el disolvente orgánico y retirar los restos de proteína por diálisis.

### II.3.2. Reactivos

Adenosín-5'-difosfato y Adenosín-5'-monofosfato

- a) Solución amortiguadora de trietanol-amina --  
0.05 M con pH= 7.55
- b) Solución 0.5 M de sulfato de magnesio
- c) Solución 2.0 M de cloruro de potasio
- d) Solución de ácido etilén diamino tetracético  
100/mg pH= 7.0
- e) Sol. 0.04 M de fosfoenol piruvato
- f) NADH 0.01 M
- g) ATP 0.01 M
- h) Lactato deshidrogenasa 860 U/mg de prot.
- i) Piruvato quinasa 38.5 U/mg de prot.
- j) Mioquinasa 1690 U/mg de prot.
- k) Sol. patrón 10 mM de AMP
- l) Sol. patrón 10 mM de ADP

## Adenosín-5'-trifosfato

- a) Solución amortiguadora de trietanol-amina 0.05 M y pH= 7.55
- b) Sol. 0.01 M. de cloruro de magnesio
- c) NADP 0.007 M
- d) Glucosa 0.5 M.
- e) Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa 330 U/mg de prot.
- f) Hexoquinasa 370 U/mg de prot.
- g) Sol. patrón de ATP 10 mM.

## Glicerofosfato

- a) Solución amortiguadora glicina-hidrazina (glicina 1M; 0.4M hidrazina) pH = 9.5
- b) NAD 0.05 M
- c)  $\alpha$ -glicerofosfato deshidrogenasa 135 U/mg. de prot.
- d) Sol. patrón 10 mM de  $\alpha$ -glicerofosfato

## Glicerol

- a) Sol. amortiguadora 0.2 M glicina, 1 M. hidrazina y 0.002 M  $MgCl_2$  pH = 9.8 (ajustado con KOH 10 M).
- b) ATP 0.05 M
- c) NAD 0.02 M.
- d)  $\alpha$ -glicerofosfato deshidrogenasa 135 U/mg de prot.
- e) Gliceroquinasa 110 U/mg de prot.
- f) Sol. patrón de glicerol 10 mM

## Glucosa

- a) Solución amortiguadora Tris-HCl 0.1 M pH= 8.0
- b) Sol. 0.1 M de  $MgCl_2$
- c) Sol. de albúmina sérica bovina 4 mg/ml
- d) ATP 0.01 M
- e) NADP 0.003 M
- f) Hexoquinasa 370 U/mg de prot.
- g) Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa 330 U/mg de prot.

## Lactato

- a) Amortiguador glicina 1 M. hidrazina 0.4 M y pH = 9.5
- b) NAD 0.05 M.
- c) Lactato deshidrogenasa 860 U/mg de prot.
- d) Patrón de lactato 10 mM.

## Fósforo Inorgánico

- a) Solución 6.6% p/v de  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
- b)  $\text{H}_2\text{SO}_4$  7.5 N
- c) Sol. 10% p/v de  $\text{FeSO}_4$
- d) Sol. patrón de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  9.158 mg/100 ml = 20.85  $\mu\text{g/ml}$  de  $\text{P}_i$

## Lípidos hepáticos

- a) Mezcla cloroformo-metanol 2:1

Exceptuando la determinación de lípidos, todas las demás se hicieron en celdillas de cuarzo de 1 ml de capacidad con paso de luz de 1 cm; los cambios de la D.O. se registraron en un espectrofotómetro Zeiss a 340 nm de longitud onda y 660 nm para el caso de  $\text{P}_i$ .

## II.3.3. Cálculos

Para obtener las concentraciones de aquellos metabolitos que se determinan por la aparición o desaparición de NADH y NADPH se uso la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración} = \frac{\text{D.O.} \times \text{vol. final}}{(\text{nmol/g.t.h.}) \text{ muestra} \times \epsilon \times \text{peso de la muestra.}}$$

siendo  $\epsilon =$  Absorbancia de NADH o NADPH considerando que  $\epsilon = 6.22$  es el coef. de extinción molar del mismo.

El fósforo inorgánico fue calculado de la siguiente forma:

$$\text{Concentración (mg/g.t.h.)} = \frac{\text{D.O. prob.} \times 0.02085 \text{ mg/ml} \times \text{vol. final}}{\text{D.O. patrón} \times \text{peso de la muestra}}$$

Con las concentraciones de ATP, ADP, AMP y Pi se determinó la carga energética y el potencial de fosforilación:

$$\text{C. E.} = \frac{\text{ATP} + 1/2 \text{ ADP}}{\text{ATP} + \text{ADP} + \text{ADP}}$$

$$\text{Potencial de Fosforilación} = \frac{\text{ATP}}{\text{ADP} + \text{Pi}}$$

#### II.4 Incorporación de radioactividad a los metabolitos.

La incorporación de marca a lactato y  $\alpha$ -glicerofosfato proveniente de glicerol- $C^{14}$  se determinó separando por el método de cromatografía en capa fina estos metabolitos y después cuantificando en ellos la radioactividad. Además se determinó la cantidad de marca que permaneció en el compuesto radioactivo inyectado (glicerol o lactato). En el caso de la determinación de glicerol incorporado a lípidos, sólo se cuantificó radioactividad en los lípidos extraídos por el método de Folch.

II.4.1. Fundamento.- En el método de cromatografía se aprovecha la afinidad que existe entre un disolvente (fase móvil) y el compuesto que se desea separar para que éste pueda ascender por el soporte, que en este caso es la capa de sílica-gel. Según sea la afinidad existente entre ambos, el compuesto a separar recorrerá una distancia caracte-

rística; y a la relación entre la distancia recorrida por - este último y la que recorrió el disolvente que se conoce - como Rf.

II.4.2. Aplicación de las muestras.- A una distancia aproximada de 1 cm del borde de la placa cromatográfica se aplicó un volumen de 0.2 ml de extracto perclórico mezclado con 10 ml de acarreador con una concentración de 10 mM en todos los casos. Este volumen fue aplicado en pequeñas - gotas de tal manera que ocupara la menor área posible.

#### II.4.3. Corrimiento

Lactato.- Se usó como fase móvil una mezcla de - etanol-amoniaco-agua 80:4:16, con la cual se obtuvo un - -- RF=0.59. La cámara se saturó por espacio de 2 horas y las - muestras se dejaron correr por 3.5 hrs. (37)

Glicerol.- Se usó la misma fase móvil que para - el caso de lactato siendo el Rf correspondiente a glicerol - 0.67, aunque en el método original se recomendaba otra fase móvil.

$\alpha$ -glicerofosfato.- La fase móvil consistió en una mezcla 65:35:8 de cloroformo-metanol-agua, el Rf fue de 0.70. La cámara se saturó con la mezcla durante 4 hrs. y el tiempo de corrimiento fue de 3 hrs. (38)

II.4.4. Revelado.- Se hizo rociando el reactivo revelador correspondiente sobre las placas secas.

Lactato.- El revelador fue una solución alcohólica de púrpura de bromocresol pH= 10 con la cual se colorearon de amarillo los sitios donde se hallaba lactato.

Glicerol.- Se usó ac. crómico (6 partes de  $H_2SO_4$  conc. + 1 parte de sol. saturada de  $K_2Cr_2O_7$ ), el cual reveló con manchas azules al glicerol. (las manchas solamente duraron 30 seg.) (37).

$\alpha$ -glicerofosfato.- la solución reveladora fue la siguiente:

0.5 g molibdato de amonio

5.0 ml agua

1.5 m. HCl 25 %

2.5 ml.  $\text{HClO}_4$  70 %

Acetona en volumen suficiente para llevar a 50 ml.  
 $\alpha$ -glicerofosfato se tiñó de color azul oscuro sobre un fondo azul claro (39).

#### II.4.5. Cuantificación de la marca.

Los sitios donde se revelaron los compuestos a - - cuantificar fueron raspados y este polvo fue contado en un contador Packard Tri-Carb usando INSTA-GEL como líquido de centelleo.

II.4.6. Cálculo de la actividad específica.- Este valor resulta de relacionar la radioactividad en el compuesto separado y su concentración en la muestra.

$$\text{Radioactividad en el compuesto} = \frac{\text{c.p.m.} \times \text{vol. final}}{\text{muestra} \times \text{peso del tejido}} = \text{c.p.m./g.t.h.}$$

$$\text{Actividad específica} = \frac{\text{radioactividad}}{\text{concentracion}} = \text{c.p.m./mol}$$

### III. RESULTADOS

Algunos de los efectos de adenosina en hígado como son la inhibición de la oxidación de los ácidos grasos y la producción de cuerpos cetónicos (17) sugerían una inhibición en el proceso de gluconeogénesis, sin embargo también se había reportado a la adenosina como causante de hiperglicemia (5) y de un aumento en la incorporación de alanina-C<sup>14</sup> a glucógeno hepático. Por estas razones se decidió investigar directamente el efecto de adenosina sobre el nivel de la glucosa hepática y la gluconeogénesis usando como sustratos lactato-C<sup>14</sup> y glicerol-C<sup>14</sup>.

III.1. Efecto de adenosina sobre los niveles de glucosa hepática y la gluconeogénesis de lactato-C<sup>14</sup> y glicerol-C<sup>14</sup>.

III.1.1. Efecto de adenosina sobre los niveles de glucosa hepática.

Como se puede observar en la fig. 4, la adenosina tiene un claro efecto sobre los niveles hepáticos de glucosa, se puede apreciar una elevación que prevalece hasta los 60 min y que recupera el valor normal a los 120 min del tratamiento con adenosina.

Para poder conocer la forma en que adenosina afectaba el proceso de gluconeogénesis, se administró, vía intraperitoneal, lactato-C<sup>14</sup> y glicerol-C<sup>14</sup> a dos grupos diferentes de animales, y se calculó la cantidad de nanomoles de cada uno de estos sustratos transformados a glucosa-C<sup>14</sup>.

III.1.2. Gluconeogénesis a partir de lactato-C<sup>14</sup>.

En la tabla 1 se puede apreciar que a los 15 y 120 min después de la administración de adenosina, la actividad específica de glucosa se ve aumentada pero al calcularse las nanomoles de lactato-C<sup>14</sup> transformadas en glucosa-C<sup>14</sup> se nota más claramente el efecto gluconeogénico de adenosina, --

### EFFECTO DE ADENOSINA SOBRE NIVELES DE GLUCOSA EN HIGADO

Tiempo (mins.)	Control	Adenosina
0	4.8 $\pm$ 0.24 (5)	
15	4.6 $\pm$ 0.25 (6)	6.36 $\pm$ 0.40 (10)
30	4.2 $\pm$ 0.16 (9)	6.3 $\pm$ 0.35 (11)
60	4.5 $\pm$ 0.44 (19)	5.1 $\pm$ 0.28 (21)
120	5.9 $\pm$ 0.55 (10)	5.39 $\pm$ 0.49 (15)

\*El número dentro del paréntesis indica la cantidad de determinaciones realizadas

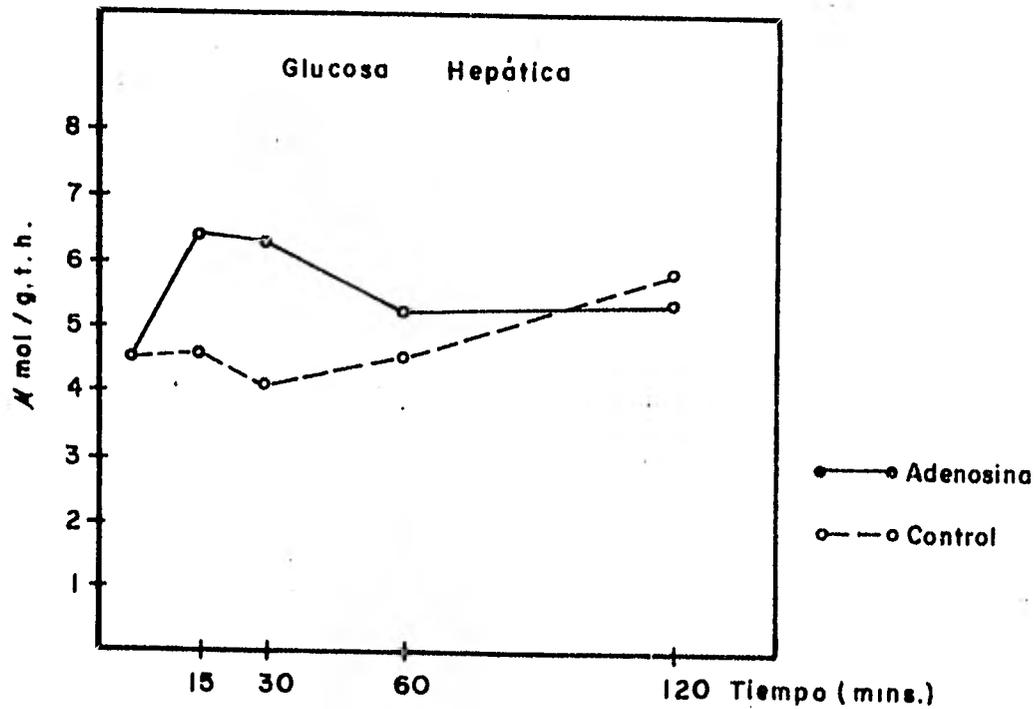


Fig. 4

Tabla 1 GLUCONEOGENESIS A PARTIR DE LACTATO

Tiempo de Tratamiento mins.	SALINA				ADENOSINA			
	cpm $10^3/\mu\text{mol}$ de glucosa	Lactato $\mu\text{mol/g.t.h.}$	cpm $10^3/\mu\text{mol}$ lactato	$\mu\text{mol}$ de lactato glucosa /g.t.h.	cpm $10^3/\mu\text{mol}$ de glucosa	Lactato $\mu\text{mol/g.t.h.}$	cpm $10^3/\mu\text{mol}$ lactato	$\mu\text{mol}$ lactato glucosa g.t.h.
0		1.19 $\pm$ 0.185 (12)						
15	3.65 $\pm$ 0.49 (4)	2.01 $\pm$ 0.11 (9)	23 $\pm$ 0.25 (9)	7 300	5.32 $\pm$ 0.32 (10)	2.07 $\pm$ 0.22 (9)	2.3 $\pm$ 0.49 (8)	14 710
30	3.64 $\pm$ 0.23 (6)	1.76 $\pm$ 0.05 (4)	5.6 $\pm$ 0.95 (4)	2743	2.55 $\pm$ 0.13 (7)	2.17 $\pm$ 0.08 (4)	2.9 $\pm$ 0.37 (4)	5 566
60	3.75 $\pm$ 0.21 (4)	1.417 $\pm$ 0.122 (4)	4.13 $\pm$ 0.95 (4)	4 113	3.75 $\pm$ 0.30 (8)	1.802 $\pm$ 0.081 (4)	2.8 $\pm$ 0.47 (4)	6 817
120	4.07 $\pm$ 0.42 (6)	1.241 $\pm$ 0.133 (3)	2.79 $\pm$ 0.53 (3)	8428	4.79 $\pm$ 0.44 (7)	1.89 $\pm$ 0.37 (3)	1.89 $\pm$ 0.53 (3)	14 343

\* El número dentro del paréntesis indica la cantidad de determinaciones realizadas.

Tabla 2 GLUCONEOGENESIS A PARTIR DE GLICEROL

Tiempo de Tratamiento	S A L I N A				A D E N O S I N A			
	cpm $10^3/\mu\text{mol}$ de glucosa	Glicerol $\mu\text{mol}/\text{g.t.h.}$	cpm $10^3/\mu\text{mol}$ glicerol	$\eta\text{mol}$ de glicerol glucosa/g.t.h.	cpm $10^3/\mu\text{mol}$ de glucosa	Glicerol $\mu\text{mol}/\text{g.t.h.}$	cpm $10^3/\mu\text{mol}$ glicerol	$\eta\text{mol}$ glicerol glucosa/g.t.h.
0		$0.254 \pm 0.04$ (4)						
15	$3.04 \pm 0.36$ (3)	$0.454 \pm 0.06$ (4)	$53.4 \pm 18.6$ (5)	342.0	$1.86 \pm 0.04$ (3)	$0.521 \pm 0.102$ (5)	$33.4 \pm 9.5$ (5)	354.0
30	$6.31 \pm 0.26$ (3)	$0.280 \pm 0.02$ (8)	$30.4 \pm 5.0$ (8)	876.0	$3.49 \pm 0.47$ (6)	$0.25 \pm 0.02$ (8)	$31.9 \pm 10.2$ (8)	693.0
60	$3.33 \pm 0.27$ (12)	$0.380 \pm 0.08$ (6)	$26.0 \pm 4.2$ (6)	580.0	$3.09 \pm 0.33$ (9)	$0.45 \pm 0.06$ (6)	$38.8 \pm 7.9$ (6)	405.0
120	$3.19 \pm 0.029$ (4)	$0.530 \pm 0.05$ (6)	$25.8 \pm 3.2$ (6)	729.0	$3.60 \pm 0.80$ (4)	$0.63 \pm 0.03$ (8)	$16.9 \pm 1.4$ (8)	1148.0

\* El número entre paréntesis indica la cantidad de determinaciones realizadas

ya que se registra un aumento de hasta 100% (15 min) del -- lactato transformado en glucosa.

### III.1.3. Gluconeogénesis a partir de glicerol-C<sup>14</sup>

Los resultados obtenidos para la determinación del efecto de adenosina sobre la conversión de glicerol-C<sup>14</sup> a -- glucosa-C<sup>14</sup> se muestra en la tabla 2. La adenosina no tuvo ninguna influencia en el flujo de glicerol hacia glucosa, -- aunque se pudiera pensar que existiera una inhibición cuando se observa solamente la actividad específica de glucosa-C<sup>14</sup>.

### III.2 Efecto de adenosina sobre el destino de glic<sub>erol</sub>-C<sup>14</sup>.

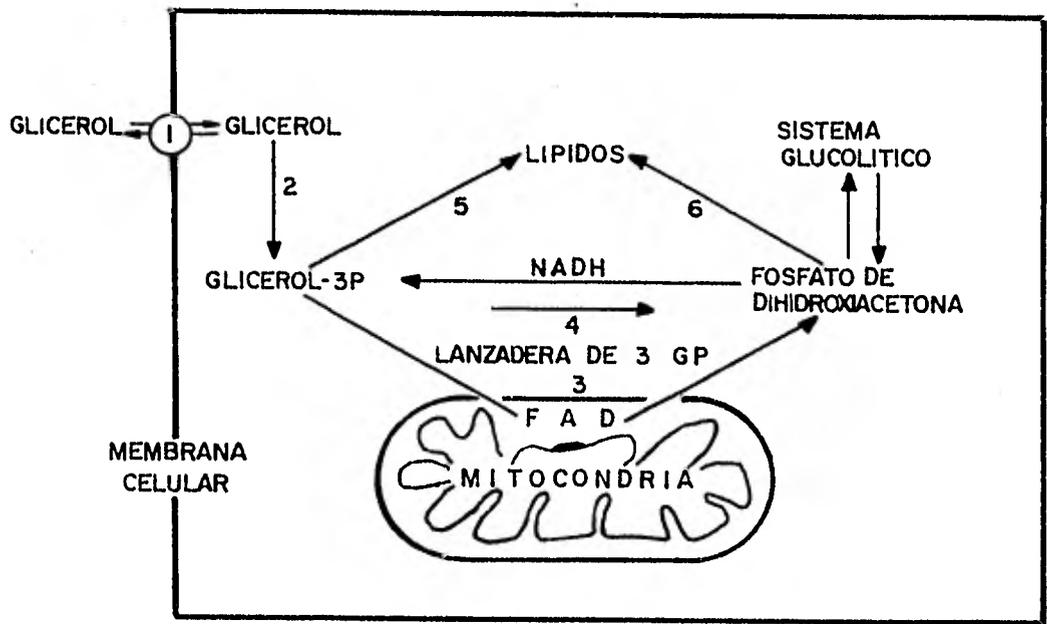
El glicerol es un compuesto bioquímicamente importante, pues puede ser convertido a glucosa, fosforilado y -- convertido en glicerol-3-fosfato con la siguiente transformación a triglicéridos y fosfolípidos, o bien, puede ser oxidado a piruvato (fig.5). Como se observó ya (tabla 2) la adenosina no tiene efecto sobre la transformación de glice- - - rol-C<sup>14</sup>, pero posiblemente si tiene algún efecto en los dos caminos restantes, como lo sugiere la disminución en la actividad específica del glicerol, por este motivo se exploraron ambas posibilidades.

#### III.2.1. Efecto de adenosina sobre la distribución de glicerol-C<sup>14</sup>

Lo primero que se hizo fue comprobar la utilización de glicerol radioactivo en el animal de experimentación, para ésto se inyectó por vía intraperitoneal glicerol-C<sup>14</sup> y se cuantificó la radioactividad en cinco tejidos que fueron: hígado, sangre, músculo, esquelético, cerebro y corazón.

La manera como adenosina afectó la distribución de glicerol-C<sup>14</sup> en el organismo de la rata se muestra en las fi

### UTILIZACION CELULAR DE GLICEROL



#### SIMBOLOGIA

- 1. \_ PROTEINA TRANSPORTADORA DE GLICEROL
- 2. \_ GLICERO QUINASA
- 3. \_ G-3-P DESHIDROGENASA
- 4. \_ G-3-P OXIDORREDUCTASA
- 5. \_ G-3-P ACILTRANSFERASA
- 6. \_ DHAP ACILTRANSFERASA

DISTRIBUCION DE RADIOACTIVIDAD DE GLICEROL C<sup>14</sup>

## HIGADO

Tiempo (mins)	SALINA		ADENOSINA		P
	cpm 10 <sup>3</sup> /g	%	cpm 10 <sup>3</sup> /g	%	
15	280.2 ± 18.4 (6)	21.4	157.3 ± 10.3 (6)	10.4	<0.001
30	158.2 ± 20.6 (6)	12.6	127.0 ± 8.6 (5)	10.1	0.25
60	157.5 ± 9.8 (5)	11.8	132.8 ± 35.0 (4)	9.9	—
120	344.3 ± 36.0 (3)	27.3	268.4 ± 8.9 (3)	21.2	—

\* El número entre paréntesis indica la cantidad de determinaciones

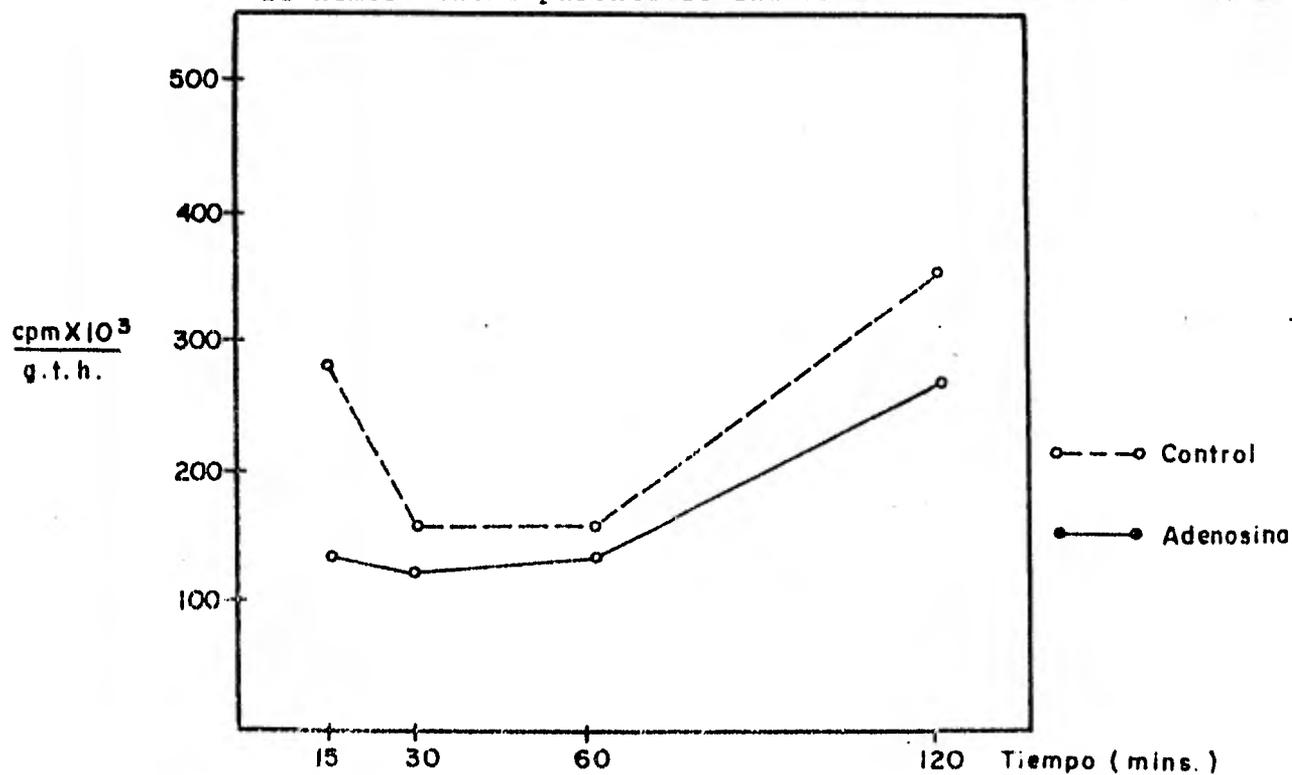


Fig. 6

DISTRIBUCION DE RADIOACTIVIDAD DE GLICEROL C<sup>14</sup>

SANGRE

Tiempo (mins)	SALINA		ADENOSINA		P
	cpm X 10 <sup>3</sup> /g	%	cpm X 10 <sup>3</sup> /g	%	
15	41.8 ± 6.1 (4)	5.7	31.1 ± 5.4 (4)	4.2	<0.02
30	22.8 ± 2.6 (5)	2.6	22.4 ± 1.9 (5)	3.1	
60	35.8 ± 5.0 (5)	4.9	30.2 ± 4.1 (4)	4.11	
120	49.9 ± 6.8 (3)	6.8	34.8 ± 5.3 (3)	4.7	

\* El número entre paréntesis indica las determinaciones realizadas

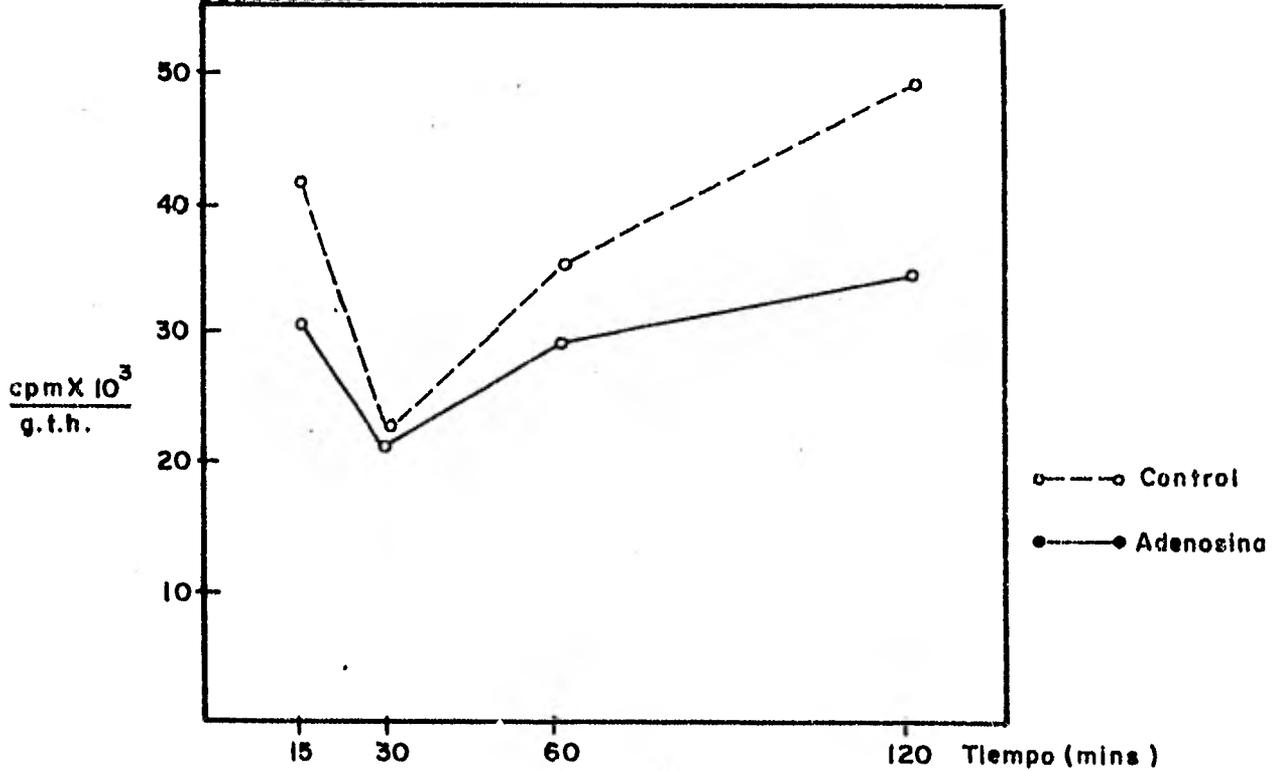


Fig. 7

DISTRIBUCION DE RADIOACTIVIDAD DE GLICEROL-C<sup>14</sup>

## MUSCULO

Tiempo (mins)	SALINA		ADENOSINA		P
	cpm X 10 <sup>3</sup> /g	%	cpm X 10 <sup>3</sup> /g	%	
15	15.3 ± 2.3 (3)	22.4	14.1 ± 2.3 (4)	19.2	—
30	13.2 ± 1.1 (5)	15.0	12.0 ± 2.1 (5)	14.0	—
60	17.4 ± 3.4 (4)	19.8	21.4 ± 4.7 (4)	25.2	—
120	34.6 ± 10.5 (3)	27.5	17.5 ± 11.7 (3)	19.7	—

\* El número entre paréntesis indica la cantidad de determinaciones realizadas.

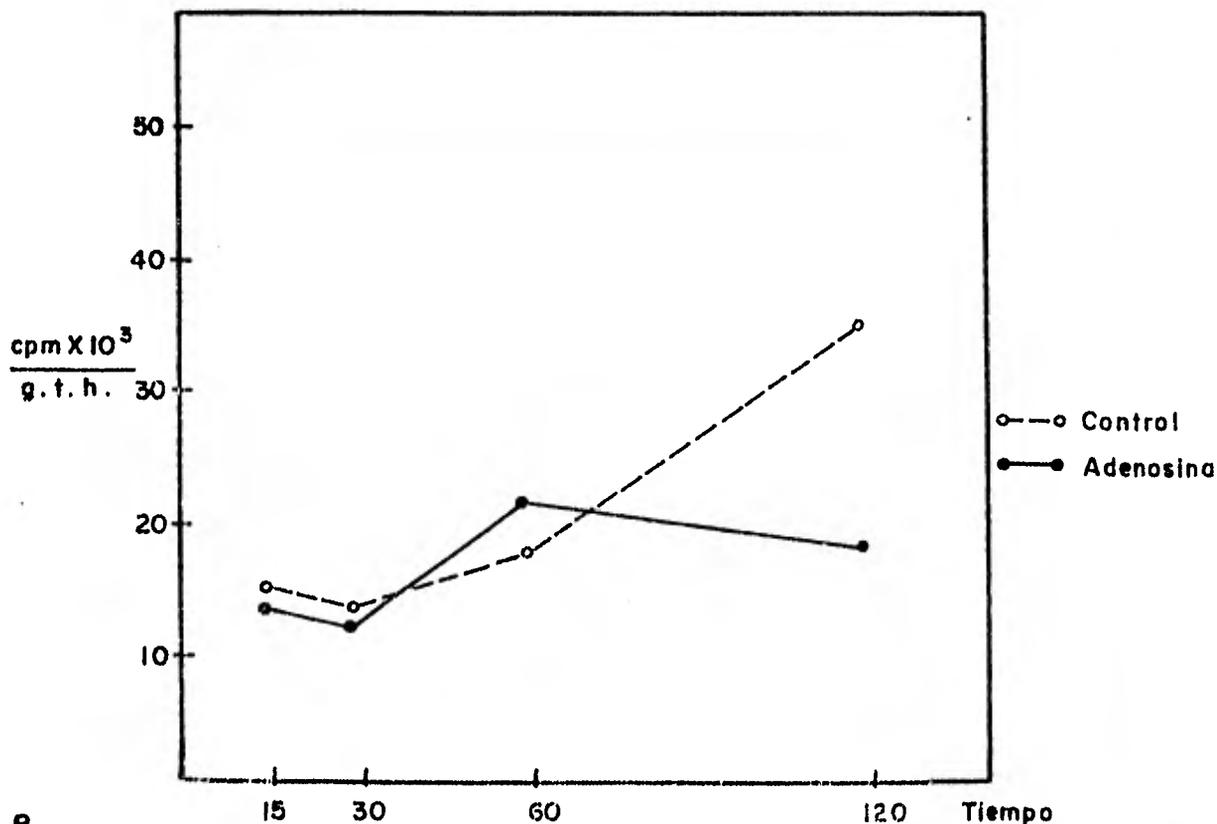


Fig. 8

DISTRIBUCION DE ACTIVIDAD DE GLICEROL-C<sup>14</sup>

## C E R E B R O

Tiempo (mins.)	SALINA		ADENOSINA		P
	cpm X 10 <sup>3</sup> /g	%	cpm X 10 <sup>3</sup> /g	%	
15	60.2 ± 2.5 (4)	2.2	40.8 ± 3.8 (4)	1.5	< 0.01
30	39.3 ± 3.3 (5)	1.4	27.2 ± 1.8 (5)	1.0	< 0.025
60	65.7 ± 15.4 (4)	1.7	41.9 ± 3.3 (4)	1.6	—
120	115.6 ± 11.6 (3)	4.2	49.3 ± 8.0 (3)	1.7	< 0.01

\* El número entre paréntesis indica la cantidad de determinaciones realizadas.

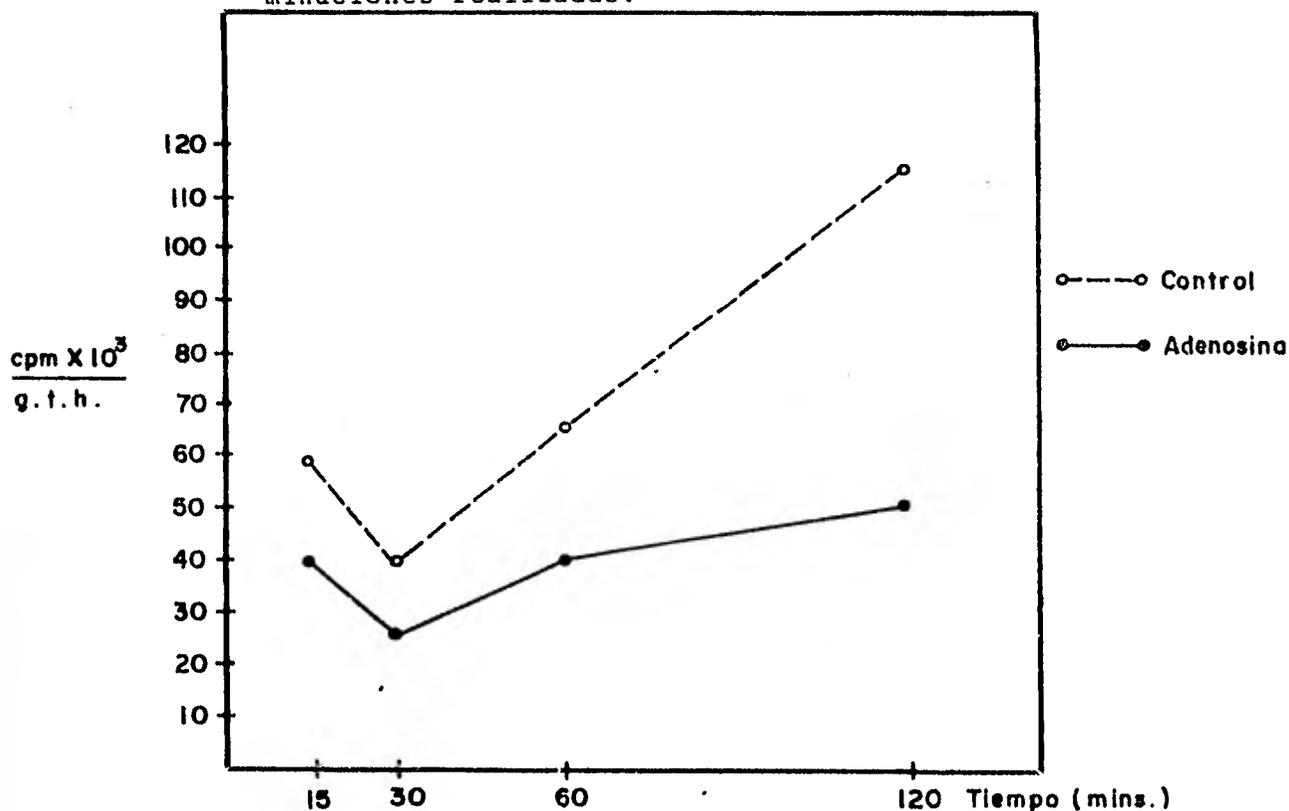


Fig. 9

DISTRIBUCION DE RADIOACTIVIDAD DE GLICEROL C<sup>14</sup>

## CORAZON

Tiempo (mins.)	S A L I N A		A D E N O S I N A		P
	cpm X 10 <sup>3</sup> g.	%	cpm X 10 <sup>3</sup> g.	%	
15	37.1 ± 4.3 (3)	0.8	34.3 ± 3.7 (4)	0.7	—
30	19.9 ± 3.3 (5)	0.4	21.6 ± 3.0 (5)	0.5	—
60	27.5 ± 2.0 (4)	0.7	47.6 ± 14.4 (4)	1.1	<0.1
120	77.8 ± 13.6 (3)	1.7	88.9 ± 19.5 (3)	2.0	—

\* El número entre paréntesis indica la cantidad de determinaciones realizadas.

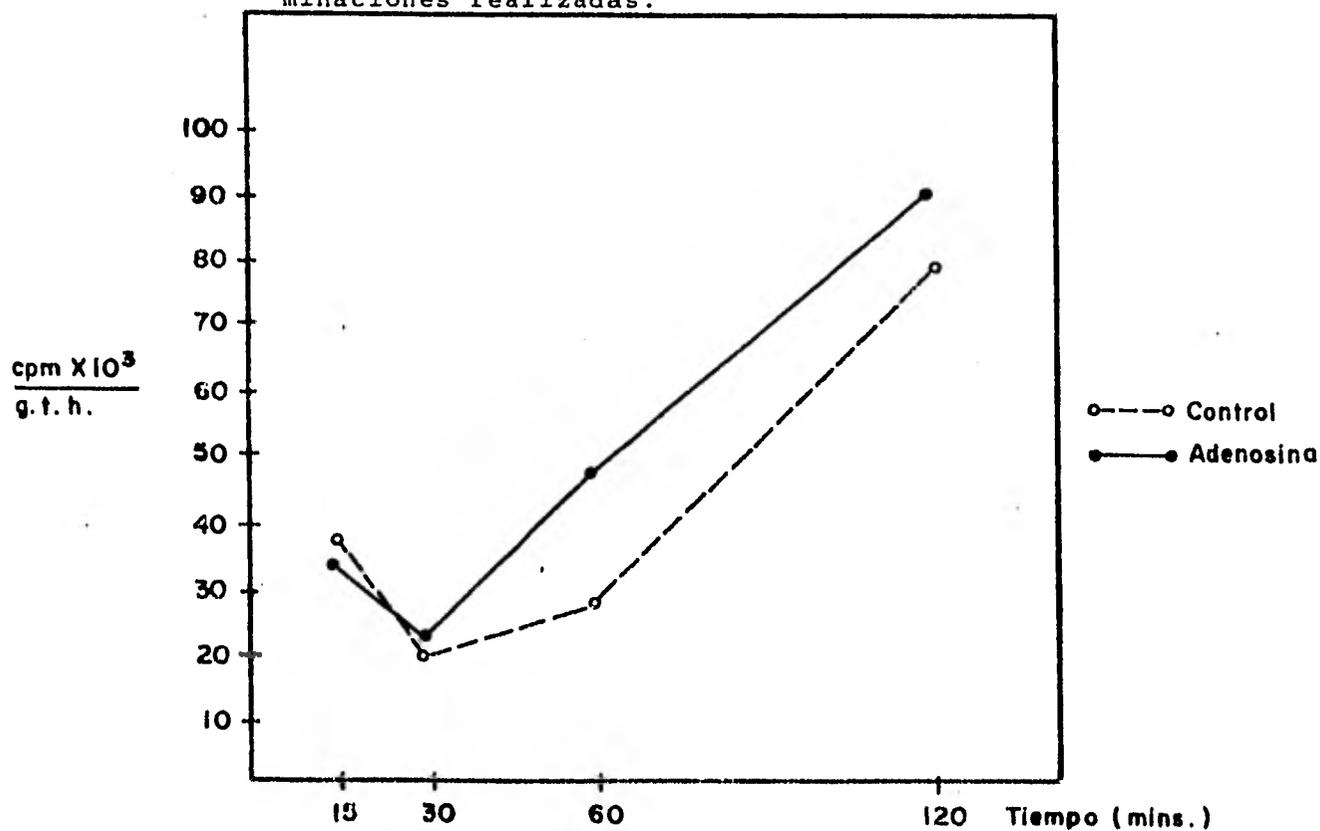


Fig. 10

guras 6, 7, 8, 9 y 10. La adenosina produjo una disminución en la captación del compuesto radioactivo en hígado, sangre y cerebro, pero en músculo y corazón provocó un marcado aumento a los 60 min del tratamiento, que en el caso del corazón se mantuvo hasta los 120 min.

La mayor parte de la radioactividad de glicerol-C<sup>14</sup> fue utilizada hígado y músculo esquelético, debido a que este último se encuentra en una alta proporción en el organismo (50%).

Las rutas metabólicas del glicerol se siguieron en los tejidos donde se encontró su marca en mayor cantidad, hígado y músculo, así como en sangre que es el medio de transporte del organismo.

### III.2.2. Formación de lactato a partir de glicerol.

Con la transformación de glicerol a lactato se buscó explorar su degradación en la vía glucolítica.

En el hígado durante las dos horas de tratamiento con adenosina se notó un aumento en el flujo de glicerol-C<sup>14</sup> a lactato-C<sup>14</sup> (exceptuando los 60 min) fig. 11.

En la fig. 12 se puede apreciar que la adenosina causó una disminución en la concentración de lactato a los 120 min del tratamiento. Además se observa que las concentraciones del lactato hepático y circulante son muy similares.

En el caso del tejido muscular, la cantidad de lactato procedente de glicerol-C<sup>14</sup> se considera mínima en comparación con la que tiene normalmente este tejido, sin embargo, se nota un incremento importante en la formación de lactato causado bajo el efecto de adenosina (fig.13).

### III.2.3. Formación de $\alpha$ -glicerofosfato a partir de glicerol.

En hígado, la simple inyección de solución salina

## INCORPORACION DE GLICEROL C<sup>14</sup> A LACTATO EN H I G A D O

Tiempo (mins.)	S A L I N A			A D E N O S I N A		
	Lactato Mol/g.t.h.	Lactato cpm 10 <sup>3</sup> /Mol	Glicerol en Lac- tato. Mol/g.t.h.	Lactato Mol/g.t.h.	Lactato cpm 10 <sup>3</sup> /Mol	Glicerol en Lactato Mol/g.t.h.
0	1.19 ± 0.18 (12)					
15	1.93 ± 0.28 (4)	3.42 ± 0.40 (4)	0.1235	2.55 ± 0.39 (5)	3.92 ± 1.08 (5)	0.298
30	1.58 ± 0.13 (7)	5.87 ± 0.34 (7)	0.3245	2.05 ± 0.18 (7)	5.26 ± 1.29 (7)	0.613
60	2.07 ± 0.16 (6)	4.04 ± 1.04 (6)	0.3320	2.35 ± 0.22 (6)	6.06 ± 1.36 (6)	0.340
120	1.97 ± 0.16 (5)	3.45 ± 0.53 (5)	0.5700	1.38 ± 0.20 (8)	5.90 ± 0.56 (8)	0.820

\* El número entre paréntesis indica la cantidad de determinaciones realizadas.

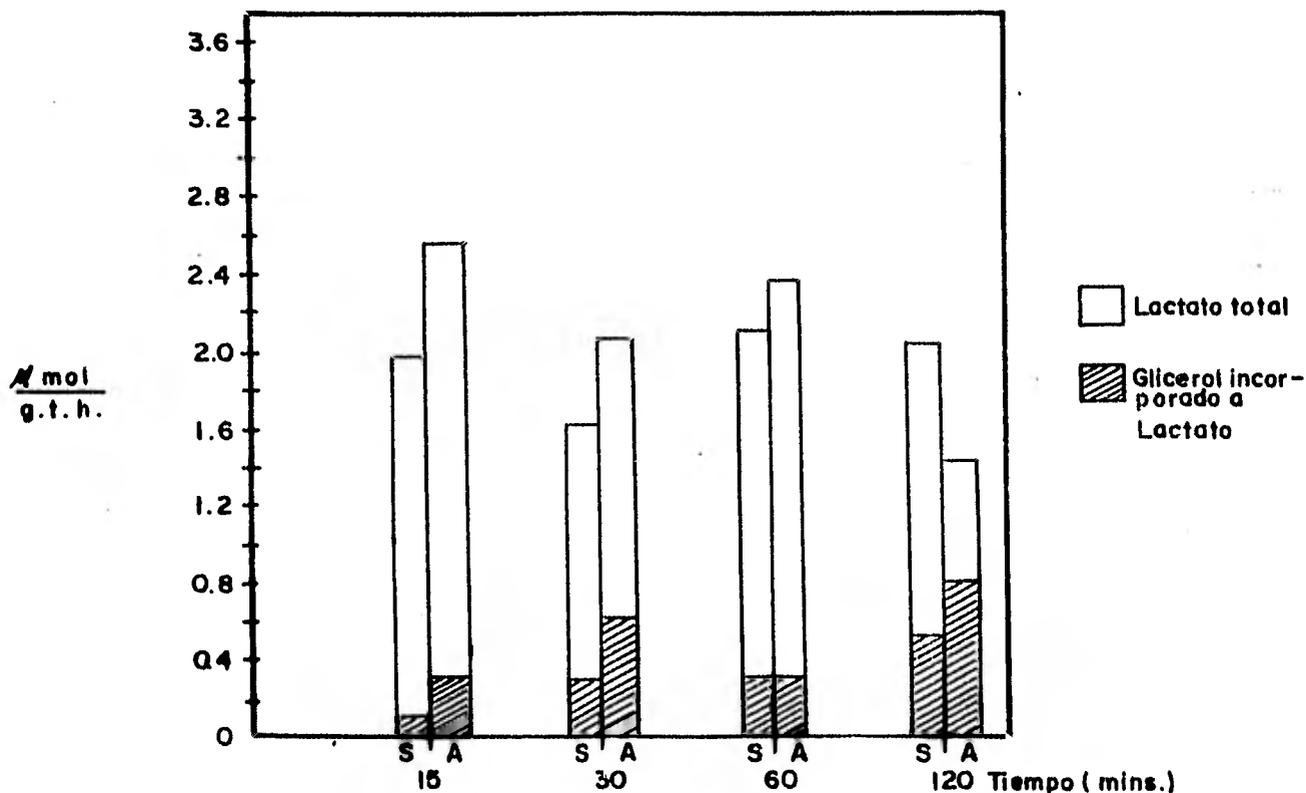


FIG. II

## INCORPORACION DE GLICEROL-C<sup>14</sup> A LACTATO EN SANGRE

Tiempo (mins.)	S A L I N A			A D E N O S I N A		
	Lactato μmol/g.t.h. (5)	Lactato cpmX10 <sup>3</sup> /μmol (5)	Glicerol en Lactato μmol/g.t.h. (5)	Lactato μmol/g.t.h. (5)	Lactato cpmX10 <sup>3</sup> /μmol (5)	Glicerol en Lactato μmol/g.t.h. (5)
15	2.76 ± 0.52 (5)	2.38 ± 0.40 (5)	0.145	2.28 ± 0.26 (5)	1.78 ± 0.45 (5)	0.107
30	1.90 ± 0.10 (8)	3.47 ± 0.70 (8)	0.110	2.41 ± 0.16 (8)	2.28 ± 0.29 (8)	0.100
60	1.83 ± 0.21 (6)	3.00 ± 0.86 (6)	0.217	2.02 ± 0.15 (6)	2.70 ± 0.62 (6)	0.132
120	1.79 ± 0.21 (6)	3.43 ± 1.08 (6)	0.038	2.07 ± 0.21 (6)	2.78 ± 0.75 (6)	0.033

\* El número entre paréntesis indica la cantidad de determinaciones realizadas en cada caso.

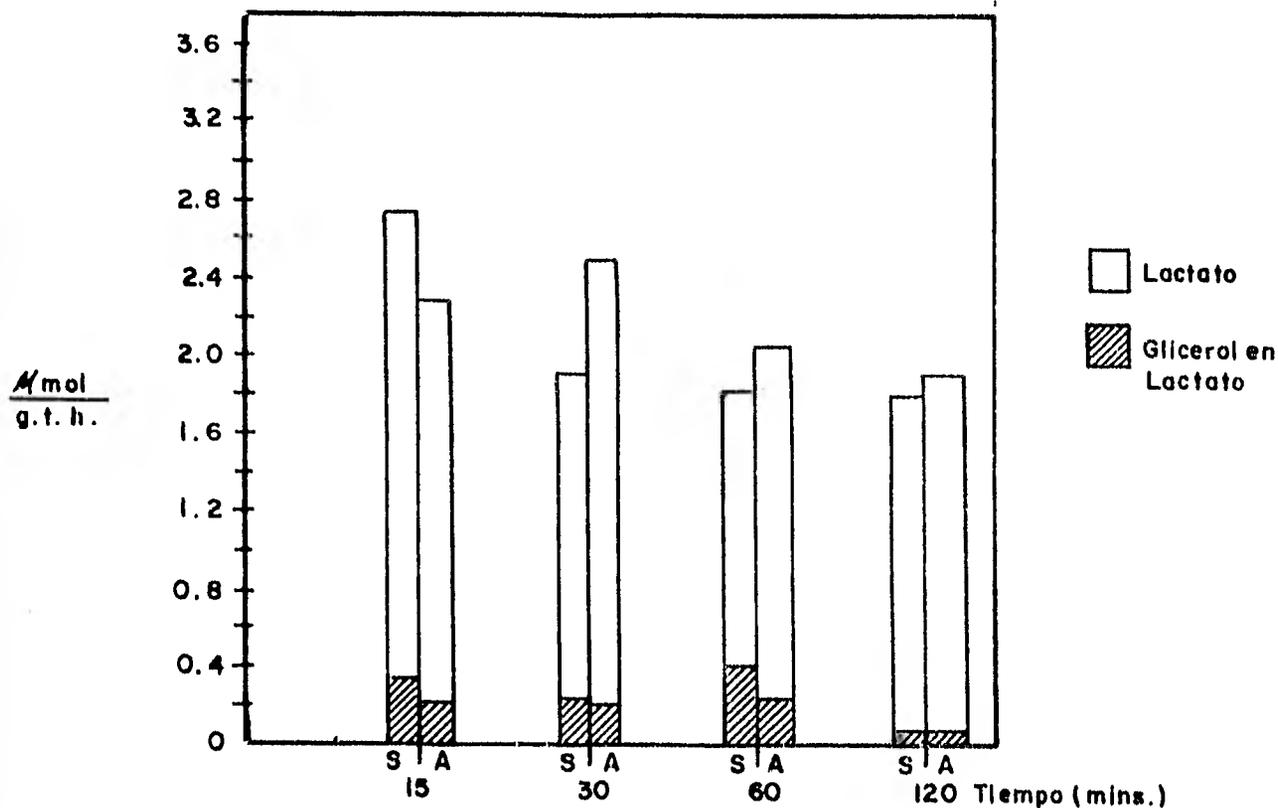


Fig. 12

INCORPORACION DE GLICEROL-C<sup>14</sup> EN LACTATO EN  
MUSCULO

Tiempo (mins.)	S A L I N A			A D E N O S I N A		
	Lactato μmol/g.t.h.	Lactato cpmX10 <sup>3</sup> /μmol	Glicerol en Lac- mol.g.t.h.	Lactato μmol/g.t.h.	Lactato cpmX10 <sup>3</sup> /μmol	Glicerol en Lac- μmol/g.t.h.
15	7.16 ± 1.23 (6)	0.85 ± 0.19 (6)	0.4367	16.87 ± 2.6 (6)	1.13 ± 0.55 (6)	0.692
30	8.27 ± 0.49 (7)	0.72 ± 0.18 (7)	0.414	11.90 ± 0.59 (8)	0.69 ± 0.10 (8)	0.238
60	12.8 ± 0.38 (6)	0.49 ± 0.11 (6)	0.306	10.4 ± 1.15 (5)	0.48 ± 0.07 (5)	0.372
120	21.7 ± 1.2 (4)	0.73 ± 0.25 (5)	0.883	21.7 ± 3.50 (5)	0.29 ± 0.03 (5)	0.170

\* El número de determinaciones realizadas se encuentra entre pa-  
réntesis.

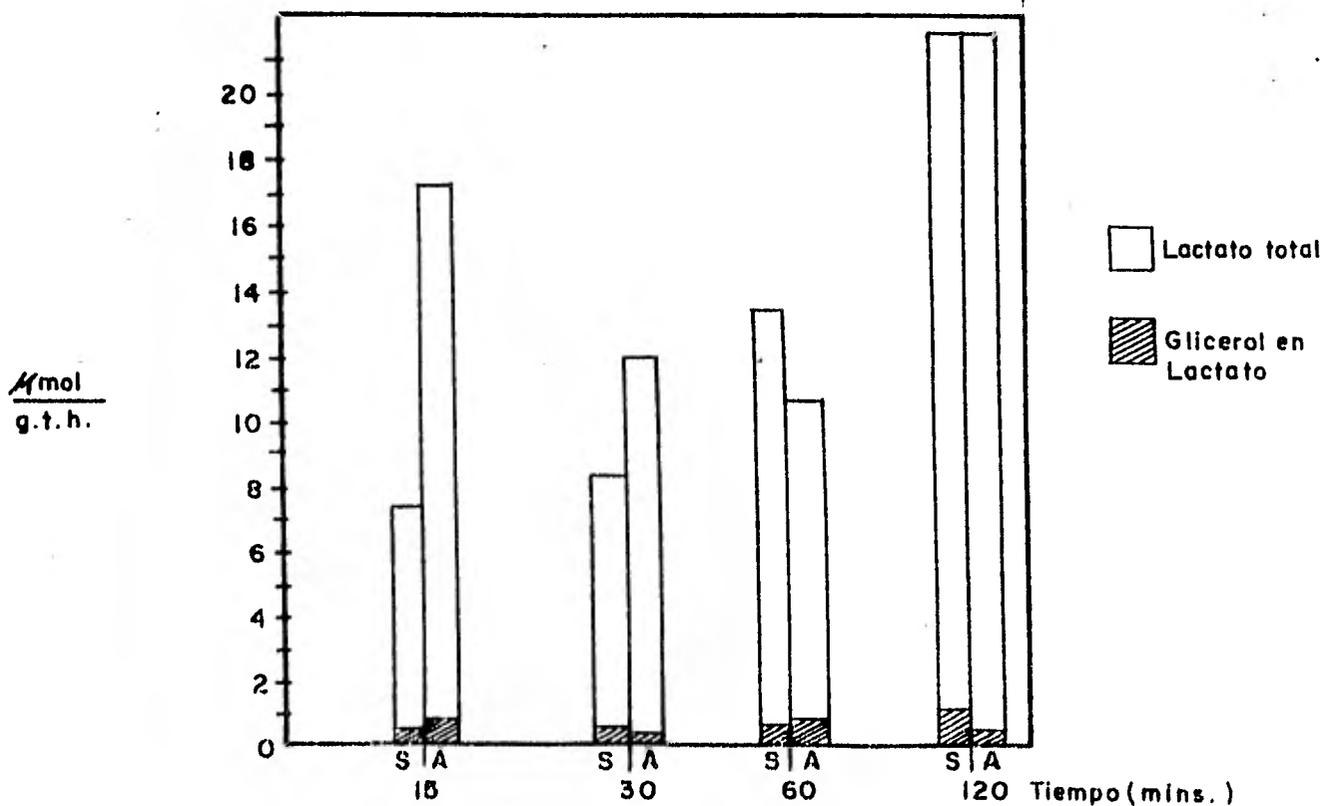


FIG. 13

y de adenosina produjo un aumento en la producción de  $\alpha$ -glicerofosfato, que en los animales inyectados con S.S.I. volvió al valor normal a los 60 min, y en los que recibieron -- tratamiento con adenosina se mantiene elevado, sin embargo -- la actividad específica de  $\alpha$ -glicerofosfato se vió disminuída en el grupo al que se dió adenosina por vía i. p., lo -- cual sugiere que el  $\alpha$ -glicerofosfato radioactivo se encuen-- tra diluído con el no radioactivo. La cantidad de glicerol transformado en  $\alpha$ -glicerofosfato fue similar en ambos grupos (fig.14). El aumento en los niveles de  $\alpha$ -glicerofosfato pue de deberse a la no utilización del compuesto en presencia de adenosina, por no existir ácidos grasos activados en presen-- cia del nucleósido que se esterifiquen al  $\alpha$ -glicerofosfato.

En sangre, (fig. 15) los niveles de  $\alpha$ -glicerofosfa to son muy bajos y se observa una ligera disminución en la -- concentración de  $\alpha$ -glicerofosfato que va acompañada de una -- elevación en la actividad específica del mismo y de la trans-- formación a  $\alpha$ -glicerofosfato del glicerol-C<sup>14</sup> que se mantie-- ne en la misma proporción que en el grupo control; por lo -- tanto este efecto no es debido a adenosina, sino a los tras-- tornos que se originan por el manejo de los animales de expe-- rimentación.

En la figura 16 se muestra la transformación del -- glicerol-C<sup>14</sup> a  $\alpha$ -glicerofosfato a lo largo de 2 horas de tra-- tamiento en el tejido muscular, hasta los 30 min la cantidad de glicerol transformada a  $\alpha$ -glicerofosfato es mayor en los animales control, pero después de una hora de tratamiento -- con el nucleósido, éste tiene un efecto acelerador en la fos-- forilación del glicerol-C<sup>14</sup>.

### III.3. Efecto de la adenosina sobre la lipogéne-- sis hepática a partir de glicerol.

Como lo muestra la tabla 3, la inyección de adeno-- sina a los animales en ayuno produjo una inhibición en la -- formación de lípidos a partir del glicerol-C<sup>14</sup>, y ésto con--

INCORPORACION DE GLICEROL-C <sup>14</sup>A  $\alpha$ -GLICEROFOSFATO EN  
HIGADO

Tiempo (mins.)	S A L I N A			A D E N O S I N A		
	$\alpha$ -Glicero - P μmol/g.t.h.	$\alpha$ -Glicero - P cpm x 10 <sup>3</sup> /g.t.h.	Glicerol en $\alpha$ -GP μmol/g.t.h.	$\alpha$ -Glicero - P μmol/g.t.h.	$\alpha$ -Glicero - P cpm x 10 <sup>3</sup> /g.t.h.	Glicerol en $\alpha$ -GP μmol/g.t.h.
0	0.093 ± 0.009 (4)					
15	0.207 ± 0.04 (5)	70.7 ± 10.4 (5)	0.274	0.297 ± 0.053 (6)	25.1 ± 4.0 (6)	0.223
30	0.150 ± 0.04 (9)	147 ± 27.8 (9)	0.593	0.31 ± 0.04 (9)	84.2 ± 10.0 (9)	1.649
60	0.07 ± 0.005 (4)	179 ± 49.3 (4)	0.659	0.20 ± 0.05 (4)	76.4 ± 14.0 (3)	0.353
120	0.09 ± 0.02 (3)	172 ± 2.1 (3)	0.453	0.26 ± 0.05 (7)	38.6 ± 6.8 (7)	0.494

\* El número entre paréntesis indica la cantidad de determinaciones realizadas.

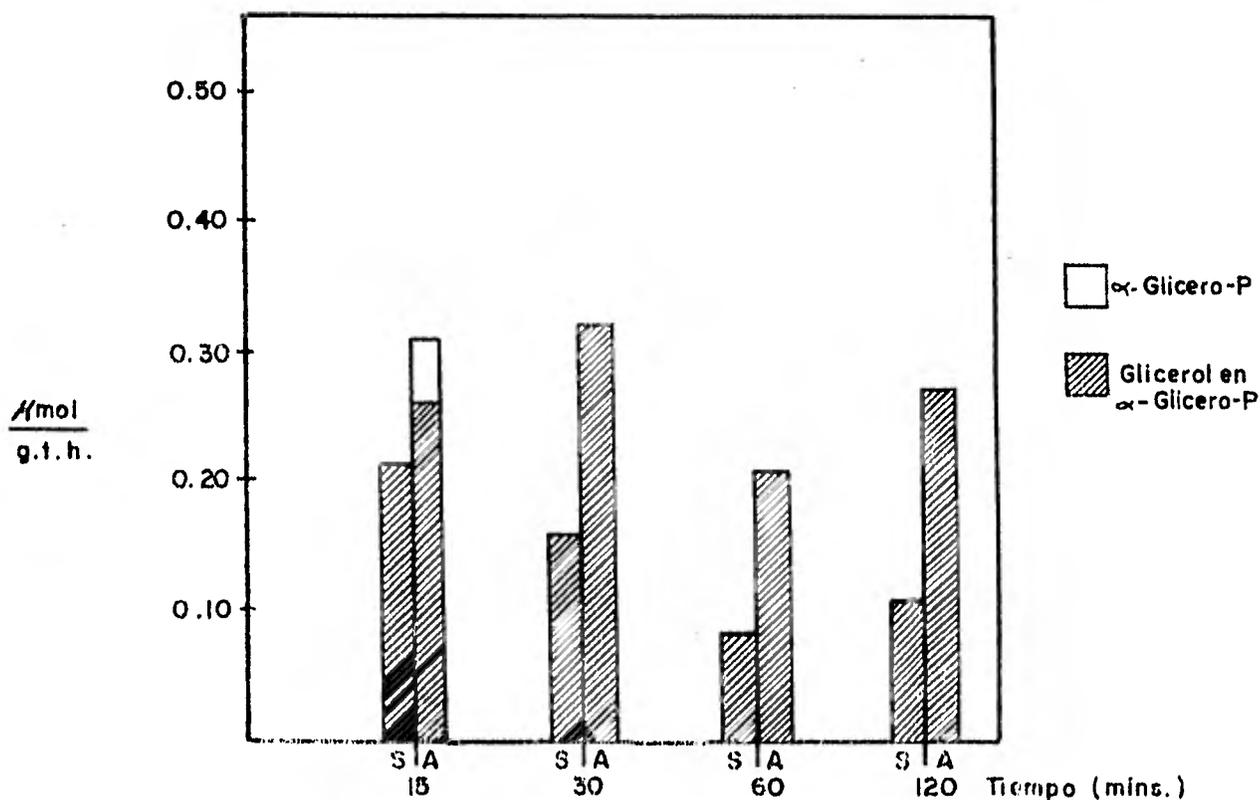


Fig. 14

INCORPORACION DE GLICEROL- $C^{14}$  A  $\alpha$ -GLICEROFOSFATO EN

## SANGRE

Tiempo (mins)	SALINA			ADENOSINA		
	$\alpha$ -Glicero - P Mol/g.t.h.	$\alpha$ -Glicero - P cpm.X10 <sup>7</sup> /g.t.h.	Glicerol en $\alpha$ -G-P Mol/g.t.h.	$\alpha$ -Glicero - P mol g.t.h.	$\alpha$ -Glicero - P cpmX10 <sup>7</sup> /g.t.h.	Glicerol en $\alpha$ -G-P Mol /g.t.h.
15	0.047 $\pm$ 0.005 (6)	94.7 $\pm$ 24.5 (6)	0.271	0.044 $\pm$ 0.006 (5)	104.4 $\pm$ 17.5 (5)	0.276
30	0.050 $\pm$ 0.010 (7)	196.7 $\pm$ 19.1 (7)	0.326	0.050 $\pm$ 0.003 (8)	179.0 $\pm$ 50.2 (3)	0.398
60	0.040 $\pm$ 0.004 (6)	202.6 $\pm$ 57.7 (6)	0.584	0.032 $\pm$ 0.004 (6)	281.2 $\pm$ 68.0 (6)	0.438
120	0.024 $\pm$ 0.004 (5)	24.8 $\pm$ 77.8 (5)	0.059	0.021 $\pm$ 0.008 (5)	136.0 $\pm$ 802.0 (5)	0.350

\* El número entre paréntesis indica la cantidad de determinaciones realizadas.

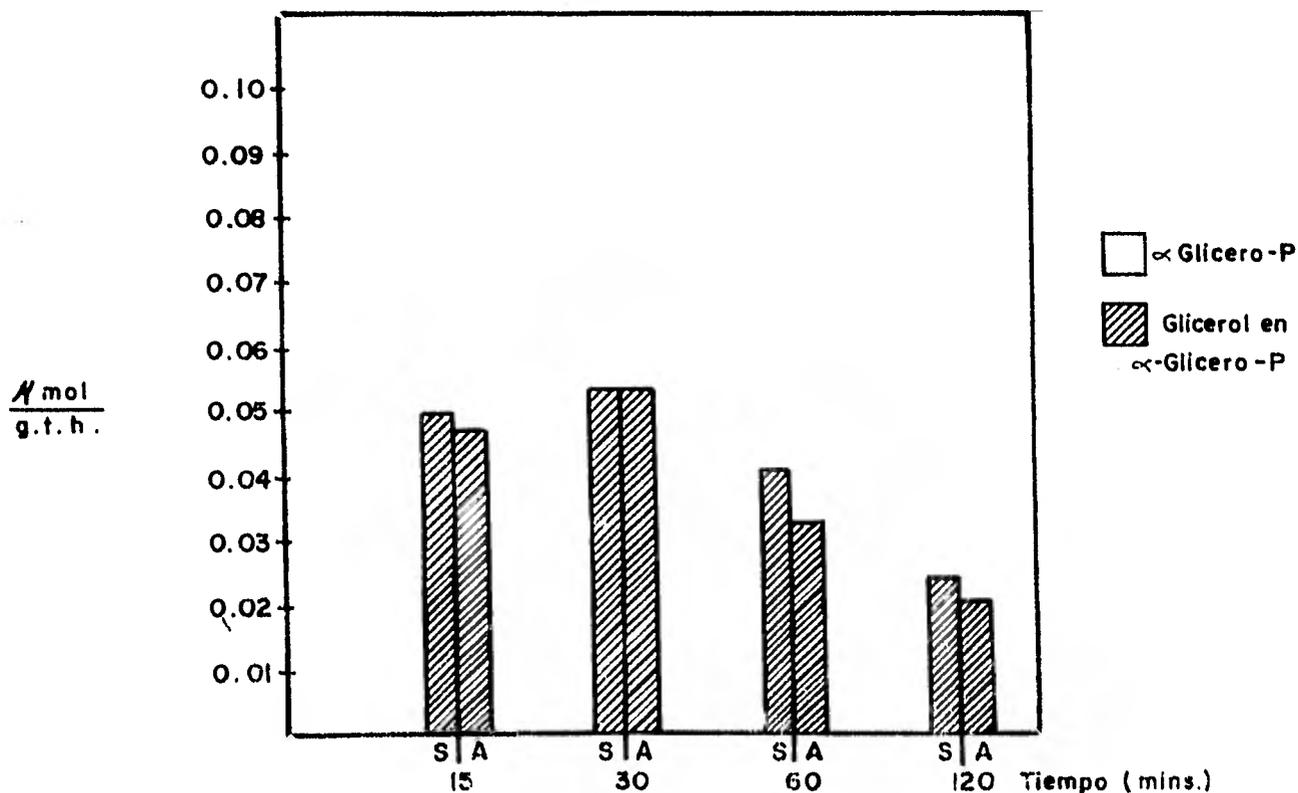


Fig. 15

INCORPORACION DE GLICEROL-C<sup>14</sup>A  $\alpha$ -GLICEROFOSFATO EN  
MUSCULO

Tiempo (mins)	SALINA			ADENOSINA		
	$\alpha$ -Glicero-P $\mu$ mol/g.t.h.	$\alpha$ -Glicero-P cpmX10 <sup>3</sup> /g.t.h.	Glicerol en $\alpha$ -GP $\mu$ mol/g.t.h.	$\alpha$ -Glicero-P $\mu$ mol/g.t.h.	$\alpha$ -Glicero-P cpmX10 <sup>3</sup> /g.t.h.	Glicerol en $\alpha$ -GP $\mu$ mol/g.t.h.
15	0.46 $\pm$ 0.092 (6)	12.92 $\pm$ 2.30 (6)	0.429	1.17 $\pm$ 0.19 (5)	5.39 $\pm$ 0.092 (5)	0.197
30	0.74 $\pm$ 0.12 (8)	13.90 $\pm$ 2.80 (7)	0.746	0.54 $\pm$ 0.06 (8)	10.00 $\pm$ 1.900 (7)	0.350
60	0.68 $\pm$ 0.07 (6)	8.20 $\pm$ 1.50 (6)	0.272	0.37 $\pm$ 0.08 (6)	13.30 $\pm$ 1.50 (6)	0.992
120	0.34 $\pm$ 0.085 (4)	23.40 $\pm$ 6.10 (4)	0.444	0.40 $\pm$ 0.09 (4)	18.8 $\pm$ 4.70 (4)	0.509

\* El número entre paréntesis indica la cantidad de determinaciones realizadas.

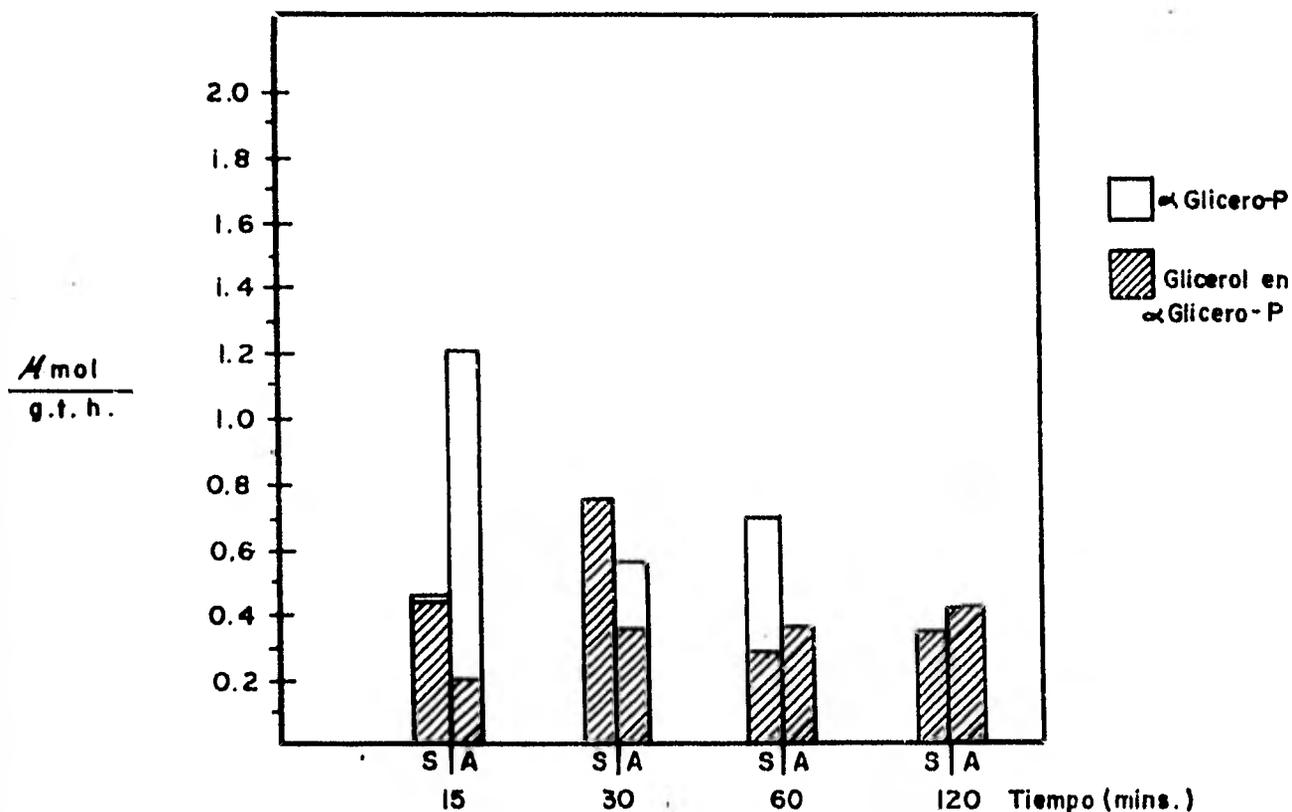


Fig. 16

Tabla 3. Lipogénesis Hepática a partir de Glicerol-C 14

Tiempo de Tratamiento	SALINA		ADENOSINA		P
	$\frac{\text{cpm} \times 10^2}{\text{mg. de lípidos}}$	$\frac{\text{nmol de glicerol}}{\text{mg. de lípidos}}$	$\frac{\text{cpm} \times 10^2}{\text{mg. de lípidos}}$	$\frac{\text{nmol de glicerol}}{\text{mg. de lípidos}}$	
15	$3.88 \pm 0.31$ (4)	7.2	$1.99 \pm 0.14$ (4)	5.9	0.005
30	$3.79 \pm 0.78$ (4)	12.0	$1.92 \pm 0.20$ (7)	7.5	0.05
60	$4.69 \pm 0.28$ (8)	17.0	$2.44 \pm 0.35$ (6)	4.8	0.001
120	$3.62 \pm 0.38$ (7)	13.0	$2.31 \pm 0.46$ (11)	15.0	0.05

\* El número entre paréntesis indica la cantidad de determinaciones - realizadas en cada caso.

cuerda con la acumulación de  $\alpha$ -glicerofosfato ya mencionada; al no utilizarse  $\alpha$ -glicerofosfato para la formación de los lípidos, los niveles de éste se mantendrán incrementados. -- De igual manera, este hecho concuerda con la inhibición sobre la activación de los ácidos grasos causada por la adenosina, reportada por Chagoya y cols. en 1977 (17).

#### III.4. Efecto de adenosina sobre el contenido de nucleótidos de adenina y fosfato inorgánico en el hígado.

En el trabajo previo del laboratorio (9), se encontró que la adenosina causa un incremento en los niveles de ATP entre los 30 y 120 min del tratamiento, así como una disminución de ADP y AMP, con ésto, la relación ATP/ADP y la carga energética se ven también aumentadas por la administración de adenosina. En este trabajo se quiso investigar el efecto de la adenosina a los 15 min del tratamiento para poder integrar el efecto del nucleósido en las dos horas del tratamiento. Se encontró que la poza de AMP experimenta un notable aumento (237%) y que la carga energética no es incrementada en este breve tiempo, así mismo el potencial de fosforilación no experimentó ningún incremento (tabla 4).

Tabla 4. Efecto de Adenosina sobre los parámetros energéticos del hígado

Tratamiento	Tiempo (mins.)	ATP	ADP	AMP	PI	A.Núidos Totales	$\frac{ATP}{ADP}$	Carga Energética	Potencial de Fosforilación
—	0	$3.58 \pm 0.34$ (5)	$1.37 \pm 0.27$ (4)	$0.29 \pm 0.06$ (5)	$5.43 \pm 0.26$ (7)	5.38	2.41	0.8	802
Salina	15	$2.30 \pm 0.17$ (6)	$1.21 \pm 0.05$ (6)	$0.16 \pm 0.03$ (5)	$6.44 \pm 0.29$ (6)	3.73	1.92	0.78	491
Adenosina	15	$2.86 \pm 0.23$ (6)	$1.47 \pm 0.12$ (6)	$0.38 \pm 0.06$ (6)	$5.44 \pm 0.29$ (5)	4.71	1.97	0.76	596

\* El número entre paréntesis indica la cantidad de determinaciones realizadas en cada caso.

## IV. DISCUSION

La adenosina farmacológicamente es un arma útil - en la regulación del metabolismo intermedio, pues ya se ha visto que aumenta la síntesis del glucógeno hepático (3), - aumenta la carga energética del hepatocito (9), disminuye - la oxidación de los ácidos grasos (17), aumenta el potencial redox mitocondrial (11), etc., desde el punto de vista fisiológico este nucleósido tiene un papel no menos importante ya que se le ha propuesto como neurotransmisor (1) por su liberación en el sistema nervioso, como regulador del flujo sanguíneo coronario (18) y activador de la adenilato ciclasa (1).

En el estudio de los efectos de adenosina, así como de otras sustancias en el animal íntegro, no se puede -- descartar la participación del sistema nervioso y la liberación de hormonas, sin embargo resulta más conveniente que -- los estudios realizados "in vivo", pues con el animal intacto no se pierde el ambiente natural de la célula, no se destruyen las comunicaciones existentes entre las células, ni se altera la concentración química original del medio ambiente y por lo tanto el metabolismo celular presentará mucho menos alteraciones que en un sistema de células aisladas en el que se ha perdido la integridad del tejido y posiblemente el medio ambiente que se proporciona no es una reproducción -- exacta del que tiene en el organismo. Por todas estas razones, en este trabajo se prefirió usar el animal íntegro como sistema de experimentación.

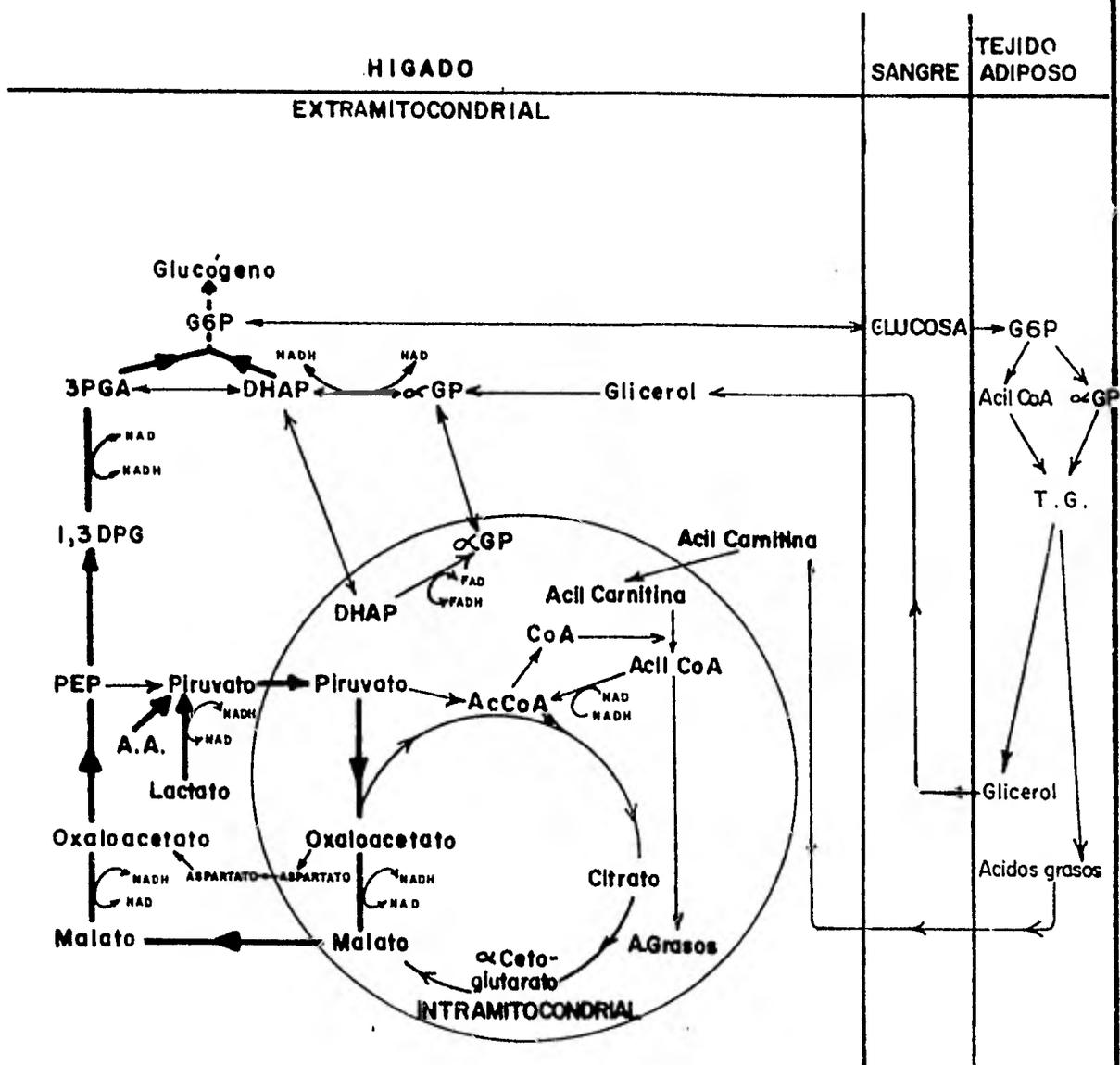
De los resultados obtenidos en este estudio, la -- elevación de la glucosa hepática (fig. 4) y la hiperglucemia moderada producida por la adenosina (5), podría explicarse -- por una disminución en la utilización de la glucosa o bien -

por un incremento en su biosíntesis. La primera posibilidad es factible, pues Ismail (36) ha encontrado que la adenosina inhibe la liberación de la insulina en los islotes de Langerhans aislados. Si este efecto de adenosina se presentara también en el animal íntegro, ésta podría ser la explicación de la hiperglucemia y del aumento en el nivel de glucosa hepática, pero considerando que a la adenosina se le han adjudicado acciones parecidas a las de la insulina como el incrementar la lipólisis en el epidídimo (4) y la glucogénesis en el hígado (4), esta probabilidad pierde valor. La segunda posibilidad que sugiere el aumento en la síntesis de glucosa a partir de precursores gluconeogénicos es apoyada por el aumento de 60 a 100% que se observa en la gluconeogénesis de lactado en los animales tratados con adenosina (tabla 1), aunque no se presenta el mismo efecto en la formación de glucosa a partir de glicerol (tabla 2). Resultados similares fueron obtenidos por Rodin y cols. (23) quienes encontraron un incremento en la gluconeogénesis de lactato en fragmentos de túbulos renales en ratas que recibieron alimento. Sin embargo Wilkening (37) midiendo el mismo proceso y usando el mismo sustrato, pero en hepatocitos de rata que recibieron alimento no obtiene ningún cambio en la velocidad de formación de glucosa. Además Lund (29) reportó un 50% de inhibición en la gluconeogénesis de lactato a causa de adenosina usando también hepatocitos aislados, aunque es importante señalar que en las condiciones de ensayo que él usa no se altera la velocidad de producción de los cuerpos cetónicos y la relación NAD/NADH mitocondrial se halló aumentada casi dos veces, siendo que la adenosina produce "in vivo" inhibición en la oxidación de los ácidos grasos y cetogénesis, además de aumentar en seis veces la relación NAD/NADH mitocondrial (11).

Las diferencias en las respuestas a adenosina dependiendo del sistema usado, pueden deberse a que es muy di fícil llegar a reproducir las condiciones de un organismo vivo, y con cualquier variación por pequeña que sea, pueden producirse cambios importantes en el metabolismo, que lle-- van a encontrar efectos diferentes. Tal es el caso del de-- cremento hallado en el Pi en suero e hígado causado "in vi- vo" por adenosina (5) y el aumento que esta misma causa al usar hepatocitos aislados (29).

En el caso de las diferencias encontradas en el -- efecto de adenosina sobre la gluconeogénesis, pudiera ser -- también una consecuencia de cambios metabólicos producidos -- por el sistema usado. Atendiendo al hecho de que la adenosina disminuye la oxidación de los ácidos grasos (17) y que el aumento en la oxidación de estos mismos estimula el proceso de gluconeogénesis (19 - 22) se esperaría que dicho proceso se viera inhibido en presencia de adenosina y usando lactato como sustrato, pero no ocurre así, pues en este trabajo se -- ha encontrado que la gluconeogénesis a partir del lactato es es tá aumentada por causa de la adenosina.

La explicación para el aumento de la gluconeogéne-- sis a partir de lactato, puede ser que la adenosina causa -- independencia entre la oxidación de los ácidos grasos y la -- gluconeogénesis, pues el NADH producido durante la oxidación de los ácidos grasos no participa en la gluconeogénesis, y -- es el que se produce por la transformación de lactato a piru vato el que se utiliza para la reversa de la deshidrogenasa del 3-fosfogliceraldehído. Esta idea está apoyada por el -- trabajo de Meijer y cols. (38) en el cual se muestra la sali da del oxalacetato mitocondrial vía aspartato el cual no es fuente de NADH citoplásmico (fig 17). Además este mecanismo concuerda con el hecho de que la adenosina no cambia el esta do redox citoplasmático (11) y sí modifica el mitocondrial -- aumentando la relación NAD/NADH con lo cual se podría modifi ca



Integración del proceso gluconeogénico en el hígado con el metabolismo del tejido adiposo. Las líneas gruesas indican el proceso gluconeogénico. Las abreviaturas usadas son: G6P, glucosa-6-fosfato; 3PGA, 3 fosfogliceraldehido; DHAP; fosfato de dihidroxiacetona; αGP, alfa glicerofosfato; 1,3 DPG, 1,3 difosfoglicerato; PEP, fosfoenil piruvato; A.A. aminoácidos; AcCoA, acetil coenzima A; CoA, coenzima A; T.G., triglicéridos; NADH-NAD, nicotin adenin dinucleótido reducido y oxidado; FADH-FAD, flavin adenin dinucleótido reducido y oxidado. No se señalan todos los intermediarios de los ciclos metabólicos indicados.

Fig. 17

car el equilibrio de la deshidrogenasa málica hacia la acumulación de oxalacetato y consecuente transaminación a aspartato.

La gluconeogénesis es un proceso en el que se demanda energía y por lo tanto debe haber una estrecha relación entre el contenido de ATP y la velocidad gluconeogénica, en el presente trabajo no se ha podido correlacionar el aumento en la velocidad de gluconeogénesis de lactato con la baja en los parámetros energéticos a los 15 min de tratamiento con adenosina, sin embargo el aumento en la formación de glucosa si concuerda con la elevación de dichos parámetros -- que se presentan entre los 30 y 120 min de tratamiento (9).

Como una razón adicional para apoyar lo que aquí -- se sugiere, está el hecho de que no se modifique la gluconeogénesis del glicerol (tabla 2), en la que no participa el metabolismo mitocondrial que es el que se ve modificado por la adenosina.

El efecto de la adenosina acelerando el proceso -- de gluconeogénesis, podría pensarse que fuera solamente una consecuencia del aumento en el flujo sanguíneo producido por la dilatación en el tejido muscular liso de las arterias que irrigan el hígado, pero al no encontrarse aumento en este -- proceso al usar como sustrato glicerol, esta explicación se invalida, puesto que el efecto es sólo sobre la formación de glucosa a partir de lactato.

Con respecto a la ruta que sigue el glicerol en -- las ratas tratadas con adenosina, por los resultados obtenidos, podemos decir que éste se acumula en forma de  $\alpha$ -glicero-- fosfato, frenándose de esta manera su esterificación y consecuentemente la formación de triglicéridos, esto concuerda -- con la disminución que produce la adenosina en los lípidos --

hepáticos (17); ya que la transformación de glicerol a glucosa y a lactato (glucólisis) no experimenta ningún cambio en presencia de adenosina en el tejido hepático. En el músculo, la adenosina aumenta la formación de lactato a partir de glicerol de una manera notable, ya que los niveles de lactato muscular se ven incrementados bajo el efecto del nucleósido. La deficiencia de energía debida al ayuno, es compensada en este tejido por la degradación del glucógeno a glucosa y la conversión de ésta a lactato por el proceso de glucólisis anaerobia, y en este caso por la conversión de glicerol a lactato que también proporcionará dos moléculas de ATP.

Llama la atención que la actividad específica de lactato en hígado y sangre es muy semejante en los diferentes grupos de experimentación (fig. 11 y 12) sin embargo existe una verdadera diferencia en la actividad específica en relación al lactato muscular, lo que sugiere que posiblemente no exista una libre difusión de lactato al torrente sanguíneo, sin embargo esta posibilidad no se explora, pues no es el objetivo del trabajo.

## V. CONCLUSIONES

1.- La adenosina aumenta la gluconeogénesis de lactato en el hígado del animal en ayuno, a pesar de que produce inhibición en la oxidación de los ácidos grasos y posiblemente este efecto se deba al aumento que ésta causa en el estado energético del hepatocito y en el potencial redox mitocondrial.

2.- Los diferentes resultados que se obtienen bajo el efecto de adenosina en diferentes procesos incluyendo la gluconeogénesis, dependiendo del sistema de experimentación usado, posiblemente se debe a las alteraciones metabólicas que se producen al modificar de alguna forma el ambiente natural ya sea de la célula o del órgano en cuestión.

3.- La adenosina no modifica el metabolismo del glicerol en forma directa, sino que la disminución de los lípidos hepáticos se debe a la inhibición que ésta produce en la activación de los ácidos grasos.

4.- En el músculo la adenosina causa una elevación del proceso de degradación glucolítica de glicerol, ya que el producto de esta vía, el lactato se ve notablemente aumentado.

## V. RESUMEN

La administración intraperitoneal de adenosina a ratas en ayuno produce modificaciones en el metabolismo hepático como: aumento en los parámetros energéticos, biosíntesis del glucógeno y potencial redox mitocondrial, y disminución de la oxidación de los ácidos grasos. Siendo la gluconeogénesis hepática la principal fuente de glucosa y por tanto de energía para el animal en ayuno, se exploró ésta en presencia del nucleósido ya que algunos de los efectos arriba mencionados sugieren una inhibición del mismo.

Los puntos estudiados fueron: la gluconeogénesis de lactato y de glicerol, el destino del glicerol en el hígado, sangre y músculo, así como el contenido de nucleótidos de adenina en hígado bajo el influjo de la adenosina y por un período de dos horas.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

- 1.- Aumento en la glucosa hepática, paralelo al aumento de la glucosa sanguínea hallada por Chagoya y cols. (5).
- 2.- Aumento del 60-100% en la gluconeogénesis de lactato.
- 3.- Ninguna alteración en la gluconeogénesis del glicerol.
- 4.- Elevación del lactato y del  $\alpha$ -glicerofosfato formados a partir de glicerol, en hígado y músculo; y ningún cambio en la sangre.
- 5.- Inhibición de la lipogénesis a partir de glicerol en hígado.

6.- Disminución de los parámetros energéticos a los 15 min de la inyección intraperitoneal de adenosina, lo cual precede al aumento encontrado antes por Chagoya y cols. (9).

Con estos resultados se puede explicar la elevación de la glucosa sanguínea y hepática por el aumento en la gluconeogénesis de lactato producido por cambios en el estado redox mitocondrial y parámetros energéticos de la célula.

Respecto al destino del glicerol, se puede decir que la adenosina causa aumento en el proceso glucolítico del mismo y su acumulación como  $\alpha$ -glicerofosfato en músculo e hígado respectivamente.

## VII. BIBLIOGRAFIA

- 1.- Fox, I. H. y Kelley, W. N. (1978) Ann. Rev. Biochem. 47, 655-686.
- 2.- Chagoya de Sánchez V. (1981) Temas Selectos de Fisiología Celular C. I. F.C.. UNAM. Editores: A. Peña, R. Tapia y - Drucher-Colín. Pags. 51-68.
- 3.- Chagoya de Sánchez V., Briones, R. y Piña, E. (1971) - -- Biochem. Pharmacol. 20, 2535-2541.
- 4.- Chagoya de Sánchez V. y Piña E. (1972) FEBS Letters 19, -- 331-334.
- 5.- Chagoya de Sánchez V., Brunner, A., Sánchez, M. E., López, C. y Piña, E. (1974) Arch. Biochem. Biophys. 160, 145-150.
- 6.- De Wulf, H. y Hers. H. G. (1967) Eur. J. Biochem. 2, 50.
- 7.- Glinsmann, W., Pauk, G. y Hern, E. (1970) Biochem. Biophys. Res. Comm. 39, 774.
- 8.- Atkinson, D. E. (1968) Biochemistry 7, 4030.
- 9.- Chagoya de Sánchez V., Brunner, A. y Piña, E. (1972) - - Biochem, Biophys. Res. Comm. 46, 1444.
- 10.- Kerbs, H. En M. P. Stulberg, International Symposium Enzymatic Aspects of Metabolic Regulation, National Cancer - Institute Monograph (1967) 27, 331.
- 11.- Chagoya de Sánchez V. y Piña, E. (1977) FEBS Letters 83, 321.
- 12.- Dole, V. P. (1961) J. Biol. Chem. 236, 3126-3130.
- 13.- Craig, C. M., Herts, R. C. y Fain, N. J. (1978) J. Biol. Chem. 253, 3114-3122.
- 14.- García-Saíñz, J. A., Hernández M. R., Santamaría, A. y -- Chagoya de Sánchez V. (1979) Biochem. Pharmacol. 28, 1409.
- 15.- De Jong, J. W. (1971) Biochem. Biophys. Acta 243, 288-298.
- 16.- Chagoya de Sánchez V. y Alvarez, G. P. (1972) Octavo FEBS Meeting, Amsterdam.
- 17.- Chagoya de Sánchez V., Alvarez, G. P., Jiménez, B., Villalobos, M. R. y Piña, E. (1977) Biochem. Biophys. Res. -- Comm. 76, 804-812.

- 18.- Berne, R. M. (1963) American J. of Physiol. 204, 317-322.
- 19.- Krebs, H. A., Speake, R. N. y Hems, R. (1965) Biochem. J. 94, 712.
- 20.- Williamson, J. R., Browning, E. T. y Olson, M. S. (1968) in Advances in Enzyme Regulation (Weber, G. Ed.) Vol. 6 Pags. 67-100.
- 21.- Williamson, J. R., Kreisberg, R. A. y Felts, P. W. (1966) Proc. Natl. Ac. Soc. 56, 247-254.
- 22.- Struck, E., Ashmore, J. y Weiland, O., (1966) in Advances in Enzyme Regulation (Weber, G. Ed.) Vol. 4, Pags. 219-224.
- 23.- Rodin, D. A., Rodin, R. A. y Saggerson, E. D. (1980) Biochem. Pharmacol. 20, 828-829.
- 24.- Chagoya de Sánchez V. (1969) Regulación de la Gluconeogénesis Inducida por el Cortisol. Ensayos Bioquímicos -- Pags. 167-184.
- 25.- Lehninger, A. L. "Biochemistry" Second Edition 1975. -- Worth Publishers Inc. Pags. 535-536, 637, 840.
- 26.- Montgomery, R., Dryer, R. L., Conway, T. W. y Spector A. A. "Biochemistry: A Case-Oriented Approach" The C. U. - Mosby Co. Saint Louis 1974 Pags. 280-282.
- 27.- Hanson, R. W. y Mehlman M. A. "Gluconeogenesis: Its Regulation in Mammalian Species". Wiley Interscience (1976) Pag. 49.
- 28.- Chagoya de Sánchez V. (1971) Tesis Doctoral. Fac. de Química U. N. A. M.
- 29.- Lund, P., Cornell, N. W. y Krebs, H. A. (1975) Biochem. J. 152, 593-599.
- 30.- Bergmeyer, H. V. "Methods of Enzymatic Analysis" 2a. Impresión 1965 Verlag Chemie G. M. B. H. Weinheim Bergstr. -- Academic Press.
- 31.- Summer, J. B. (1944) Science 100, 413- 414.
- 32.- Folch, J., Lees, M. y Sloane Stanley, G. H. (1957) J. Chem. 226, 497-509.
- 33.- Verschiede Organische Verbindungen. G. M. B. H. Weinheim - Bergstr Pags. 260-263.

- 34.- Thin Layer Chromatography a Laboratory Handbook. Egon ---  
Stahl 2a. Edition Springer Verlag N. Y. Inc. 1969 Pag. 389
- 35.- Hanes, T. S. (1949) En "Reactivos de Colbración para Cro-  
matografía en Capa Fina y Papel" Merck, Darmstadt Rep. -  
Federal Alemana 1975 pag. 77.
- 36.- Ismail, N. A., El Denshary, E. E. S. M., Montague, W. (1977)  
Biochem. J. 164, 409-413.
- 37.- Wikening, J., Nowack, J. y Decker, K. (1975) Biochem. Bio-  
phys. Acta 392, 299-309.
- 38.- Meijer, A. J., Gimpel, J. A., Deleemo, G., Tischler, J. M.,  
Tager, J. M. y Williamson, J. R. (1978) J. Biol. Chem. - -  
253, 2308-2320.