

148 201



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

*MECANISMO DEL EFECTO BLOQUEADOR DEL
DIPIRIDAMOL EN LA UROGENESIS
ESTIMULADA POR HORMONAS*



LIBRERIA DE LA FACULTAD DE QUIMICA

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
PATRICIA VELAZQUEZ GOMEZ



1990



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 está 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.

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS

I. RESUMEN

II. ANTECEDENTES

1. Síntesis de Urea
2. Regulación de la Ureogénesis
 - 2.1. Dietas y Cantidad de Enzimas
 - 2.2. Regulación Inmediata
 - 2.2.1. Sustratos: Acetilglutamato
 - 2.2.2. Hormonas
3. Hormonas y Segundos Mensajeros
 - 3.1. En Generalidades
 - 3.2. En Relación con la Ureogénesis
4. Adenocina
 - 4.1. Acciones Farmacológicas
 - 4.2. Relación con la Ureogénesis
5. Dipiridamo.
 - 5.1. Acciones Farmacológicas
 - 5.2. Efectos Moleculares
6. Planteamiento del Problema

III. Objetivo de la Tesis

IV. Material y Métodos

1. Materiales

1.1. Material Biológico

1.2. Equipo

1.3. Reactivos

2. Métodos

2.1. Aislamiento de hepatocitos

2.2. Aislamiento de Mitochondrias

2.3. Determinación de la Incorporación de Glutamina

2.4. Actividad de la Glutaminasa Mitochondrial

V. Resultados y Discusión

VI. Conclusiones

VII. Bibliografía

RESUMEN

Estudios previos del grupo de trabajo donde se realizó esta tesis han demostrado que el dipiridamol, en un intervalo de concentración de 10^{-12} a 10^{-6} M, inhibe la estimulación hormonal (glucagon, epinefrina y adenosina) de la ureogénesis, siempre y cuando se utilice como sustrato precursor de la urea a la glutamina. Sin embargo, en este trabajo se encontró que cuando el sustrato para la síntesis de urea es el carbonato de amonio, no se observa inhibición de la ureogénesis estimulada por glucagon. Los datos sugieren que este efecto del dipiridamol, puede deberse a una inhibición en la actividad de la enzima glutaminasa, o bien a un trastorno en el transporte de la glutamina. Estas dos etapas intervienen en la regulación de la biosíntesis de urea, al permitir la liberación del nitrógeno amídico de la glutamina, en forma de amoniaco, para que se utilice posteriormente como sustrato en la biosíntesis de urea. Los resultados obtenidos muestran que el tratamiento con dipiridamol no produce bloqueo en el transporte de glutamina a través de la membrana plasmática ni de la membrana mitocondrial, pero sí se observa una disminución de la actividad de la glutaminasa mitocondrial.

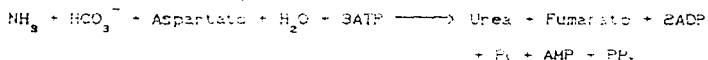
Se concluye que el dipiridamol al inhibir la actividad de la glutaminasa mitocondrial explica, al menos en parte, el bloqueo que produce en la estimulación hormonal de la biosíntesis de urea.

ANTECEDENTES

1. SINTESIS DE UREA

La formación de urea en los animales ureotélicos es un proceso extraordinariamente rápido y eficiente; permite disponer de cantidades muy importantes de amoníaco, que es muy tóxico, y formar la urea, prácticamente inerte, la cual es sintetizada en el hígado, vertida a la sangre y eliminada por el riñón. Las reacciones y los intermediarios en la biosíntesis de un mol de urea a partir de un mol de amoníaco y otro de dióxido de carbono (activados con Mg^{2+} y ATP), así como del nitrógeno α -amino del aspartato, se muestran en la figura 1 (1).

En la síntesis de urea se requiere la participación de 5 reacciones enzimáticas sucesivas; algunas de esas reacciones ocurren en el citosol en tanto que otras se llevan a cabo en la mitocondria. La formación de urea es un proceso energéticamente costoso, lo cual asegura su irreversibilidad. La ecuación general es:



El proceso se inicia con la condensación de un mol de amoníaco, otro de dióxido de carbono y 2 de fosfato (derivado del ATP) para formar carbamíl fosfato, la reacción es catalizada por la carbamíl fosfato sintasa I (CPS I) y gasta 2 moles de ATP (por lo menos en tejidos de mamíferos) que los convierte en 2 moles de

ADP por mol de NH_3 y CO_2 consumidos y condensados [11].

Se ha comprobado que en organismos eucariontes existen 2 enzimas que sintetizan carbamil fosfato, y son la CPS I y la CPS II. El numeral romano I representa la forma mitocondrial para la ureogenesis, a fin de distinguirla de la forma citosólica (II). Esta última ejerce una función diferente y es necesaria en la biosíntesis de los nucleótidos. Es importante indicar que la CPS I, requiere en forma absoluta de N-acetil glutamato (NAG), que actúa como efector alosterico, al asociarse con activadores iónicos como el K^+ y el Mg^{2+} . A su vez, el NAG se forma a partir de glutamato y acetil Co A en una reacción catalizada por la NAG sintetasa.

Posteriormente, el carbamil fosfato (CP) sintetizado reacciona con la ornitina para formar citrulina y fosfato inorgánico, la reacción es catalizada por la ornitina transcarbamilasa (OTC). La citrulina a su vez, atraviesa la membrana de la mitocondria por un transportador aún no caracterizado adecuadamente; sin embargo, se ha descrito que en circunstancias fisiológicas este transportador no limita la velocidad de la ureogenesis [2] y también hay reportes que indican que el transportador intercambia citrulina, la cual sale de la mitocondria, a cambio de ornitina que penetra a la mitocondria y mantiene la funcionalidad del ciclo.

A continuación, la citrulina formada y el aspartato se unen por medio del grupo amino del aspartato para formar arginino succinato. Esta reacción es catalizada por la arginino succinato,

sintasa y requiere de ATP. Es importante indicar que a partir de esta etapa las reacciones subsiguientes se llevan a cabo en el citosol.

El siguiente paso, consiste en el desdoblamiento reversible del arginin succinato en arginina y fumarato, catalizado por la enzima arginin succinasa. El fumarato formado, puede ser convertido en oxalacetato mediante las reacciones de la fumarasa y de la malato deshidrogenasa y luego transaminado este para regenerar el aspartato. Por otra parte, la arginina se transforma en ornitina y urea. La hidrólisis del grupo guanidinico de la arginina es catalizado por la arginasa, la cual se encuentra en el hígado de todos los organismos ureotélicos. La arginasa altamente purificada preparada del hígado de mamíferos es activada por el Co^{2+} o el Mn^{2+} . La ornitina y la lisina son potentes inhibidores que compiten con la arginina.

2. REGULACION DE LA UROGENESIS

Existe un gran número de estudios, que intentan identificar los pasos limitantes en la vía de la síntesis de urea. Se ha analizado en dichos estudios: 1) La disponibilidad de ATP [3], 2) La disponibilidad de equivalentes reductores [4 y 5], 3) Los niveles de diversos iones [6], 4) Las actividades de los sistemas de transporte de aniones localizados en la membrana mitocondrial [4] y 5) La disponibilidad de sustratos del ciclo [7].

Esos estudios han demostrado que la síntesis de la urea,

depende en gran medida de la concentración disponible de ATP y del estado oxidado-reductor de los piridín nucleótidos, en compartimentos celulares específicos, lo que a su vez altera la concentración de metabolitos y su transporte a través de la membrana mitocondrial.

Los aspectos más estudiados en la regulación del ciclo de la urea han sido:

2.1. DIETAS Y CANTIDAD DE ENZIMAS

Schimke [8, 9 y 10] publicó que los niveles de las enzimas hepáticas participantes en la biosíntesis de la urea se modifican coordinadamente en ratas en función del contenido de la proteína de una dieta. Las ratas alimentadas con dieta libre de proteínas, pero adecuada en calorías, mostraron una distribución de todas las enzimas de la urea, mientras que aquellas en ayuno prolongado, tuvieron un incremento [10]. Estos hallazgos condujeron a Schimke [8] a concluir que: todas las condiciones estudiadas que llevan a la degradación de proteínas, producen un aumento en la excreción de urea, ya sea con una dieta rica en proteínas, el ayuno prolongado o la administración de corticosteroides, todas las condiciones se asociaron con aumentos de las 5 enzimas del ciclo de la urea proporcionales al incremento en la síntesis de urea. Se ha publicado una adaptación similar a la ingesta de proteínas en la dieta en los primates, incluyendo al mono [11].

Das y Waterlow [12] observaron que en las ratas, la calidad de la proteína ingerida era importante en el efecto sobre

los niveles de las enzimas del ciclo de la urea. Al sustituir la caseína por gelatina, no hubo cambios en la actividad enzimática, aun cuando la salida de nitrógeno aumentó al doble.

Es relevante que la administración de una dieta rica en proteína aumenta no solo los niveles de las enzimas que participan en la biosíntesis de la urea, sino también el nivel de acetilglutamato (AG) el activador de la CPS I (13).

Los efectos de dietas altas y bajas en proteínas, y del ayuno prolongado en ratas, sobre los niveles del RNAm y la síntesis de CPS I y OTC han sido recientemente estudiados por Mori y colaboradores (14). Los niveles hepáticos de RNAm traducibles de CPS I y OTC fueron 4.2 y 2.2 veces más altos, respectivamente, en el caso de ratas alimentadas con una dieta con 50% de caseína comparadas contra ratas alimentadas con 5% de caseína. Estos autores observaron que las diferencias en los niveles de RNAm eran un poco más grandes que las diferencias en los niveles de las actividades enzimáticas (3.3 y 1.9 veces respectivamente) y que las proteínas enzimáticas (3.3 y 2.1 veces respectivamente). Los resultados indican que los cambios dependientes de la CPS I y OTC son desidos, principalmente, a cambios específicos en los niveles de RNAm traducibles para las enzimas.

2.2. REGULACION INMEDIATA

2.2.1. SUSTRATOS

N-acetilglutamato como se menciona anteriormente, la CPS I es la unica enzima de la biosintesis de la urea que requiere un cofactor esencial para su actividad, el N-acetilglutamato (NAG), el cual actua como modulador alosterico (15 y 16). Los estudios de Hensgens (17) han demostrado el importante papel de la concentracion de NAG mitocondrial en la regulacion de la biosintesis de la citrulina y urea, a tiempos cortos, bajo diferentes condiciones hormonales y nutricionales.

Ya que la sintesis de NAG depende de la disponibilidad de acetil CoA y glutamato, la concentracion intramitocondrial de NAG dependera de: 1) la generacion de acetil CoA en la oxidacion de piruvato y acidos grasos; 2) el ciclo del acido citrico para la formacion de α -cetoglutarato y 3) la glutamato deshidrogenasa y las transaminasas para la formacion de glutamato. Un factor mas en la regulacion de la sintesis de NAG es la arginina, la cual actua como un efector positivo de la AS sintasa (18).

2.2.2. HORMONAS

No se ha demostrado un efecto hormonal directo sobre la actividad de las enzimas participantes en la biosintesis de la urea. La mayoria de los datos publicados a cerca de los efectos hormonales, en sistemas mas complejos, parecen ser efectos secundarios sobre la gluconeogenesis, produccion de ATP y otros procesos metabolicos. Las hormonas estudiadas que tienen algun

efecto son: a) corticosteroides (19 y 18); b) glucagon (17, 19, y 20); c) hormonas de crecimiento (21); d) AMPc (19 y 22) y e) hormona tiroidea (18 y 23).

3. HORMONAS Y SEGUNDOS MENSAJEROS

3.1. GENERALIDADES

Las hormonas capaces de producir respuestas metabólicas inmediatas sobre la célula, reaccionan con receptores específicos localizados en la cara externa de la membrana plasmática. Esta interacción, produce la aparición de algún metabolito intracelular, conocido como segundo mensajero. Los cambios moleculares que suceden entre la interacción hormona-receptor y la aparición del segundo mensajero, constituyen el "mecanismo de transducción" del receptor.

Un mensajero intracelular cuya existencia ha sido claramente demostrada es el AMP cíclico (AMPc). Este nucleótido se acumula en respuesta a la acción de varias hormonas polipeptídicas, y de algunas catecolaminas. Sutherland y colaboradores, demostraron la existencia de un factor termolabile capaz de estimular la glucogenólisis, este factor fue identificado como AMPc (24). La elucidación del mecanismo a través del cual el AMPc es capaz de estimular la glucogenólisis, fue una etapa fundamental en la comprensión de la acción hormonal. El AMPc es capaz de activar una proteína quinasa, la cual fosforila a la fosforilasa b quinasa convirtiéndola a una forma más activa (Figura 2). Esta enzima, a su vez, fosforila a la glucógeno fosforilasa A,

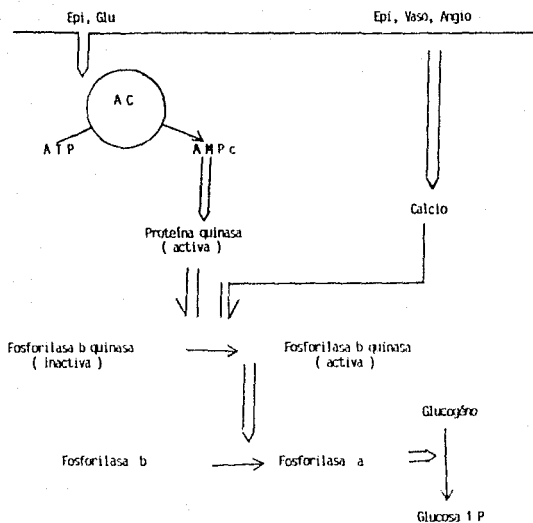


FIGURA 2 ESQUEMA DE LA ACTIVIDAD DE LA GLUCOGENOLISIS POR HORMONAS QUE ACTUAN A TRAVES DE CALCIO O DE AMPc.

que es la forma activa de la enzima. Esta, en presencia de fosfato inorgánico, degrada el glucógeno y forma glucosa 1-P.

La enzima que cataliza la formación de AMPc a partir de ATP es la adenilato ciclasa, la cual se encuentra localizada en la cara interna de la membrana plasmática. El sistema a través del cual la actividad de la adenilato ciclasa es modificada por hormonas está constituida, por lo menos, por 3 elementos: 1) un receptor específico para la hormona; 2) un complejo proteico que acopla a este receptor con la subunidad catalítica de la ciclasa, cuya actividad está regulada por nucleótidos de guanina; 3) la subunidad catalítica de la ciclasa.

Después del descubrimiento del AMPc y su papel como segundo mensajero, prácticamente todas las acciones hormonales eran atribuidas a aumentos o disminuciones en los niveles de este nucleótido cíclico. Poco a poco fue resultando claro que podían existir otros segundos mensajeros. El calcio libre citosólico, fue uno de los candidatos más importantes. Por otro lado, ya desde los años 60's, se había observado que algunas hormonas producían un aumento en el recambio del fosfatidilinositol. Sin embargo, fue hasta 1978 que Mitchell [28] asoció estos dos fenómenos y propuso que el recambio de fosfatidilinositol jugaban un papel clave en la acción de hormonas que actuaban a través del calcio citosólico.

Estas ideas provocaron una verdadera revolución en la bioquímica de la acción hormonal y este proceso se ha convertido en una de las fronteras de investigación más activas. A continuación se presenta en forma simplificada y esquemática el

funcionamiento de este sistema de transducción (figura 5).

La interacción hormona-receptor en la cara externa de la membrana plasmática, activa al receptor, este a su vez activa a una proteína transductora a la que se le ha dado el nombre de "Np", que estimula a la fosfolipasa de tipo c (PL-C), específica para el fosfoinositol difosfato (PIP₂), el cual es hidrolizado a dos compuestos : el inositol trisofato (IP₃), hidrosoluble, que difunde al citoplasma celular, y el diacilglicerol (DG), compuesto hidrofóbico que permanece, por lo menos en parte, en la membrana plasmática. Estos dos compuestos, el IP₃ y el DG son los segundos mensajeros del sistema (26).

El IP₃ se fija a receptores intracelulares existentes en el retículo endoplásmico y ocasiona una liberación del calcio al citosol (27). Como es bien conocido, el calcio libre se mantiene en niveles muy bajos en el citoplasma de las células (en el rango de 100 a 300 nanomolar); bajo la acción de algunas hormonas y por medio del IP₃ la concentración de calcio en el citoplasma puede aumentar entre 3 y 10 veces. Dicho aumento en las concentraciones de este catión activa a una gran variedad de enzimas, entre ellas a algunas proteínas cinasas, de reacciones metabólicas debido a los efectos hormonales.

Por otro lado se ha descubierto una enzima que es activada por DG, la proteína cinasa C (28). Esta proteína existe en dos localizaciones : soluble en el citoplasma y asociada a la membrana plasmática y es capaz de fosforilar a múltiples proteínas, tanto citosólicas como de la membrana (28). Es por lo

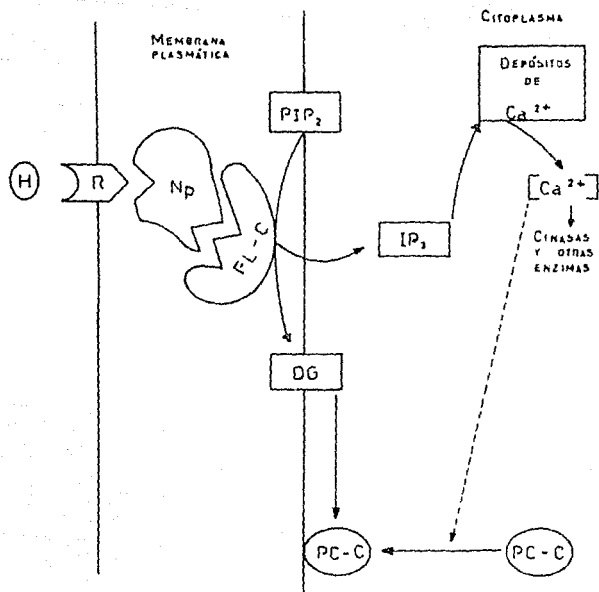


FIGURA 3 MODELO ESQUEMÁTICO DE LA ACCIÓN DE HORMONAS A TRAVÉS DEL RECAMBIO DE FOSFOINOSÍTIDOS. H. HORMONA; R. RECEPTOR; Np. PROTEÍNA ACOPLADORA; FL-C. FOSFOLIPASA C; PIP₂. FOSFATIDILINOSITOL BIFOSFATO; DG. DIACILGLICERICO; IP₃. INOSITOL TRIFOSFATO; PC-C. PROTEÍNA CINASA C. (26).

tanto, bajo la acción de esta proteína cinasa C y de las enzimas activadas por el calcio (cinasa y otras enzimas) que se propaga la acción de las hormonas que utilizan este particular sistema de transducción (27 y 29).

3.2. EN RELACION CON LA UROGENESIS

Se sabe que diversas hormonas son capaces de regular el metabolismo hepático del amonio y estimular la biosíntesis de la urea, entre las hormonas con dicha capacidad, las más conocidas y mejor estudiadas son la epinefrina y el glucagón. La epinefrina, estimula la glucogenólisis hepática y la lipólisis, en el tejido adiposo. Uno de los efectos más comunes es el que se produce sobre un heterogéneo tipo de células, disparando una serie de respuestas que prepara al organismo vertebrado a "luchar o huir". Dentro de estas respuestas se tiene un aumento en la presión sanguínea, el incremento en el ritmo cardíaco y el rendimiento del corazón, el relajamiento del músculo liso y la contracción de otros tejidos musculares. La epinefrina funciona como una hormona circulante que es liberada por la médula suprarrenal, es una catecolamina, que para obtener las respuestas mencionadas, interacciona con receptores específicos, de los cuales existen, cuando menos en los hepatocitos, dos tipos primarios, los receptores "alfa" y los receptores "beta" adrenérgicos (30).

El glucagón, es una hormona polipeptídica del páncreas, secretada a la sangre por las células alfa de los islotes de Langerhans. Esta hormona ejerce su acción en el hígado de acuerdo

a los requerimientos homeostáticos del organismo. Es uno de los componentes principales en el sistema glucorregulador, el cual mantiene en equilibrio la concentración de glucosa del medio interno. Dicho equilibrio se ejerce con la participación de la insulina, por medio de señales neuroendócrinas. Además, el glucagón estimula la gluconeogénesis, así como la síntesis de urea; el mecanismo mediante el cual se lleva a cabo la estimulación de la síntesis de urea aún no está elucidado. Sin embargo, se ha descrito que esta hormona produce una aceleración de la proteólisis hepática, simultáneamente con una inhibición de la síntesis proteica en el mismo órgano. Aparentemente, se retrasa la terminación de las cadenas polipeptídicas en los ribosomas, por lo que se ha sugerido la acción de la hormona a nivel de la elongación, o de la terminación, de las cadenas polipeptídicas. El efecto neto de estas dos acciones independientes de la hormona es incrementar el reservorio hepático de aminoácidos, favoreciendo así la formación de urea y proporcionando precursores para la gluconeogénesis [30].

La mayor parte de los estudios sobre efectos de estas hormonas en el hígado, se han abocado a sus acciones glucogenolíticas, específicamente a la activación de la fosforilasa del glucógeno. No obstante, la producción de glucosa por el hígado puede depender de dos mecanismos, uno es la glucogenólisis, y el otro es la síntesis de glucosa a partir de sustratos distintos a los carbohidratos, mediante el proceso de gluconeogénesis [31].

La estimulación de la gluconeogenesis a partir de aminoácidos tiene como consecuencia inmediata el incremento en la cantidad de amonio libre formado a partir de la desaminación de estos precursores. La cantidad de urea formada, aumenta en este tipo de condiciones fisiológicas, en las cuales es necesaria una movilización de aminoácidos de las proteínas periféricas hacia el hígado. De aquí se hace aparente que los procesos que conducen a una estimulación de la gluconeogenesis a partir de los aminoácidos, producen habitualmente una estimulación de flujo de amonio a través del ciclo de la urea (31).

4. ADENOSINA

4.1. ACCIONES FARMACOLÓGICAS

En las últimas décadas la adenosina se ha convertido en una molécula de extraordinario interés por la diversidad de efectos biológicos que se le han descrito. Recientemente, los estudios se han orientado hacia efectos fisiológicos y metabólicos del nucleósido, siendo estos muy variados. En el sistema nervioso se le sugiere el papel de neuromodulador (32). Se ha visto que produce vasodilatación en diversos órganos como son: las arterias coronarias de mamífero, el cerebro, el intestino y el tejido adiposo (33). En el tejido hepático se ha demostrado que aumenta la poza de ATP y consecuentemente eleva la carga energética del hepatocito (34), incrementa el glucógeno por la actividad aumentada de la glucógeno sintetasa (35). Frecuentemente se le ha

relacionado con la acción hormonal a diferentes niveles: en la síntesis de hormonas esteroideas [36], en la modulación de la liberación de la insulina [37], en la reacción hormonal del glucagón [38], e incluso, *per se*, se le ha considerado como una hormona local [39].

4.2. RELACION CON LA UROGENESIS

En hepatocitos aislados incubados con adenosina a concentraciones superiores a 500 μM , se ha descrito una inhibición en la síntesis de urea. Los autores de este trabajo concluyen que dicha inhibición en la ureogénesis evita el consumo de ATP y tentativamente explica la acumulación del nucleótido al suministrar adenosina. Sin embargo, otros autores [40], con concentraciones de adenosina de 100 μM obtuvieron un aumento en la cantidad de urea sintetizada. Estos resultados se presentan en la (figura 4).

Shimizu y Daly, en 1970, propusieron la existencia de un receptor externo para la adenosina capaz de estimular a la adenilato ciclasa. Por otro lado, las observaciones de Burnstock en 1972, sobre la existencia de nervios purinérgicos, apoya la hipótesis de una acción fisiológica extracelular del nucleósido [41]. La confirmación de esta hipótesis fue obtenida por la demostración de que la adenosina, a bajas concentraciones, estimula la adenilato ciclasa en membranas aisladas de plaquetas.

Sin bien la adenosina aumenta los niveles de AMPc en

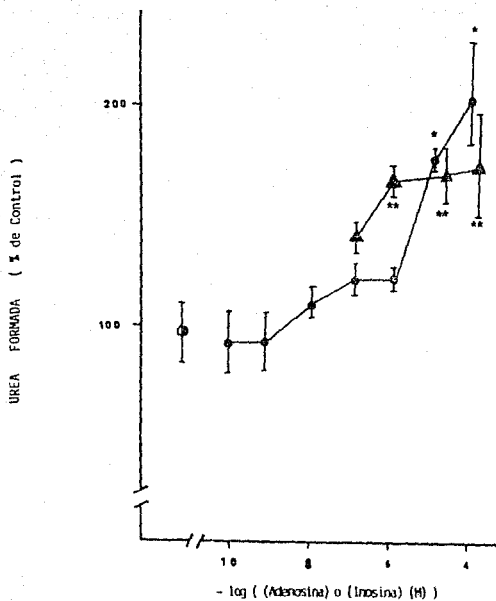


FIGURA 4 ESTIMULACION DE LA SINTESIS DE UREA POR ADENOSINA E INSINA (●) CONTROL; (■) INSINA; (▲) ADENOSINA. SIGNIFICANCIA ESTADISTICA CONTRA EL CONTROL * P 0.05, ** P 0.001 (45).

diversos tejidos, en otros produce una disminución del nucleótido (R): un tipo de receptor activador de la adenilato ciclasa, denominado A₂, y un segundo tipo mediador de una acción inhibitoria, denominada A₁ [41].

El tratamiento de las células con inhibidores del transporte de la adenosina (dipiridamol y p-nitrobenzilguanosina) potencia el efecto del nucleosido sobre los niveles de AMPc, lo cual indica que los sitios R se encuentran localizados en la superficie externa de la membrana.

5. DIPIRIDAMOL

5.1. ACCIONES FARMACOLOGICAS

El dipiridamol (DIP) es un fármaco que actualmente se encuentra en el mercado, en México, con el nombre de Persantin; se ha utilizado en la terapéutica de la angina de pecho por su acción dilatadora de los vasos coronarios. Sin embargo, los ensayos clínicos no lograron demostrar beneficios importantes, y en la propaganda del fármaco, ya no se insiste en esa propiedad. Sus efectos farmacológicos son semejantes a los de la papaverina. Relaja el músculo liso, disminuye la resistencia vascular coronaria, aumenta el flujo coronario y la tensión de oxígeno en la sangre del seno coronario. En dosis terapéuticas no altera la presión arterial, ni la respiración periférica. Este fármaco es capaz de disminuir la frecuencia de los fenómenos tromboembólicos en pacientes con válvulas cardíacas artificiales [42].

En la actualidad, el dipiridamol se halla todavía en

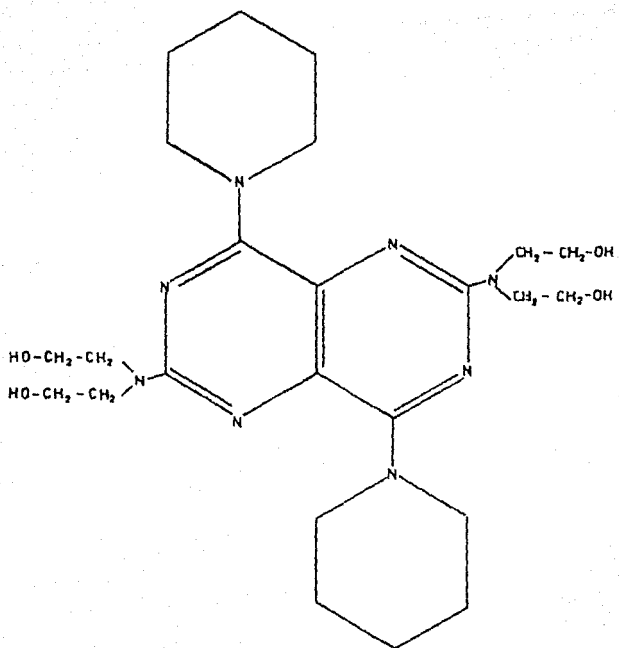


FIGURA 5 DIPERIDAMOL.

fase de investigación, para determinar su valor en trastornos hematológicos acompañados de un aumento en la adhesividad de plaquetas. Los resultados de los ensayos clínicos no son concluyentes.

5.2. EFECTOS MOLECULARES

A mediados de la década de los 60's se observó en animales de experimentación que el dipiridamol interfería con la agregación de las plaquetas y evitaba la formación de trombos. Aparentemente este efecto del dipiridamol se debe a que aumenta el contenido de AMPc, ya que inhibe la activación de la fosfodiesterasa; además, inhibe la recaptura celular de la adenosina; este último fenómeno parece explicar el efecto vasodilatador coronario selectivo del dipiridamol (43). Uno de los papeles del ADP es provocar la agregación de plaquetas y se ha observado que la adenosina inhibe este efecto del ADP (44). Bloqueando la captación de adenosina hacia el interior de los eritrocitos, con dipiridamol, propiamente aumenta la concentración plasmática de adenosina hasta un valor en el cual inhibe la agregación provocada por el ADP (45) (figura 5).

6. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Con el propósito de caracterizar el mecanismo de acción ureogénica de la adenosina se utilizó el dipiridamol. Como este fármaco bloquea la captación celular de adenosina (43), la

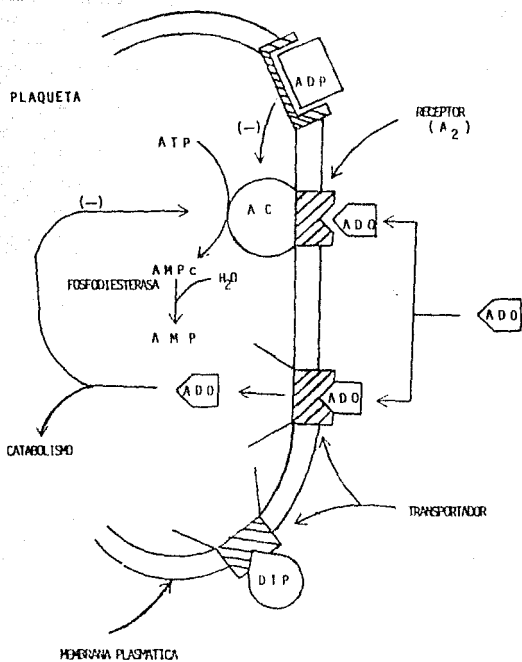


FIGURA 6 MODELO ESQUEMATICO DE LA ACCION ANTIPLAQUETARIA QUE EJERCE EL DIPIRIDAMOL. AC. ADENILATO CICLASA; ADO. ADENOSINA; DIP. DIPIRIDAMOL.

incubación de los hepatocitos, simultáneamente con dipiridamol, y adenosina, podría significar la acción, específica del dipiridamol, adenosina. En caso de que el dipiridamol, mantenga el estado ureogénico de la adenosina podría interpretarse tentativamente la necesidad de captación del nucleótido por el hepatocito para así ejercer la estimulación en la síntesis de urea. La no aduñarse la acción de la adenosina sobre la ureogénesis, en presencia del dipiridamol, podría significar que la acción del nucleótido actúa a nivel de la membrana celular sin necesidad de pasar al interior del hepatocito. Como un control interno del experimento, con el mismo lote de hepatocitos con los que se ensayo la incubación simultánea de adenosina y dipiridamol, se realizaron incubaciones con las hormonas glucagon y epinefrina, suplementadas con dipiridamol. Se sabe que ambas hormonas activan la ureogénesis al interaccionar con sus respectivos receptores unidos en la cara externa de la membrana de los hepatocitos. Por lo tanto, se esperaba que el dipiridamol no afectara el estado promotor de la ureogénesis por el glucagon.

Estos experimentos fueron realizados por R. Guinzberg del mismo grupo de trabajo donde se realizó esta tesis. Los resultados se encuentran resumidos en las figuras 7, 8 y 9, donde se muestra, para el caso del glucagon, que el dipiridamol, a dosis tan bajas como 10^{-11} M., bloquea el efecto ureogénico de la adenosina (figura 7), de la epinefrina (figura 8) y el glucagon (figura 9).

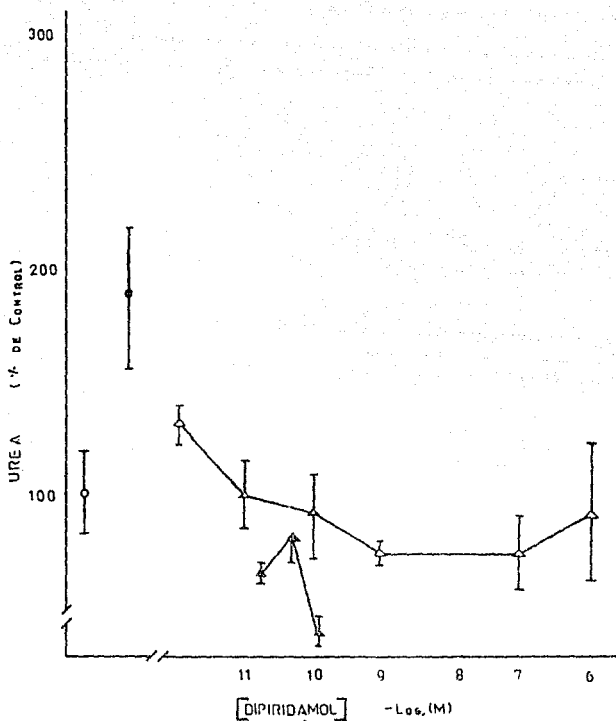


FIGURA 7 BLOQUEO POR DIPIRIDAMOL DE LA UROGENESIS ESTIMULADA POR ADENOSINA. LOS HEPATOCITOS FUERON INCUBADOS DURANTE 60 MINUTOS EN PRESENCIA DE ADENOSINA 10^{-6} M. (●) Y CON CONCENTRACIONES CRECIENTES DE DIPIRIDAMOL (▲); DIPIRIDAMOL SOLO (△); CONTROL (○). CADA PUNTO REPRESENTA EL PROMEDIO DE 5 EXPERIMENTOS Y LAS LINEAS VERTICALES INDICAN LA DESVIACION ESTANDAR, LA FUENTE DE NITROGENO FUE GLUTAMINA (10 mM).

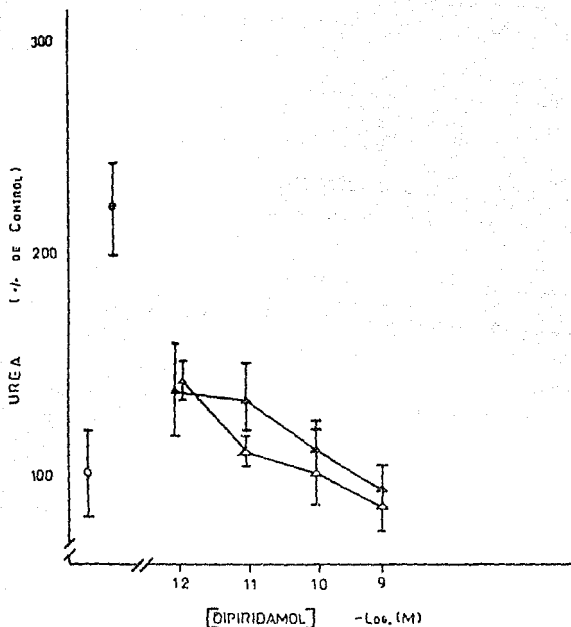


FIGURA 8 BLOQUEO POR DIPIRIDAMOL DE LA UREOGENESIS ESTIMULADA POR EPINEFRINA. LOS HEPATOCITOS FUERON INCUBADOS DURANTE 60 MINUTOS EN PRESENCIA DE EPINEFRINA 10^{-6} M SOLA (●) Y CON CONCENTRACIONES CRECIENTES DE DIPIRIDAMOL (▲); DIPIRIDAMOL SOLO (△); CONTROL (○). CADA PUNTO REPRESENTA EL PROMEDIO DE 5 EXPERIMENTOS Y LAS LINEAS VERTICALES INDICAN LA DESVIACION ESTANDAR. LA FUENTE DE NITROGENO FUE GLUTAMINA (10 mM).

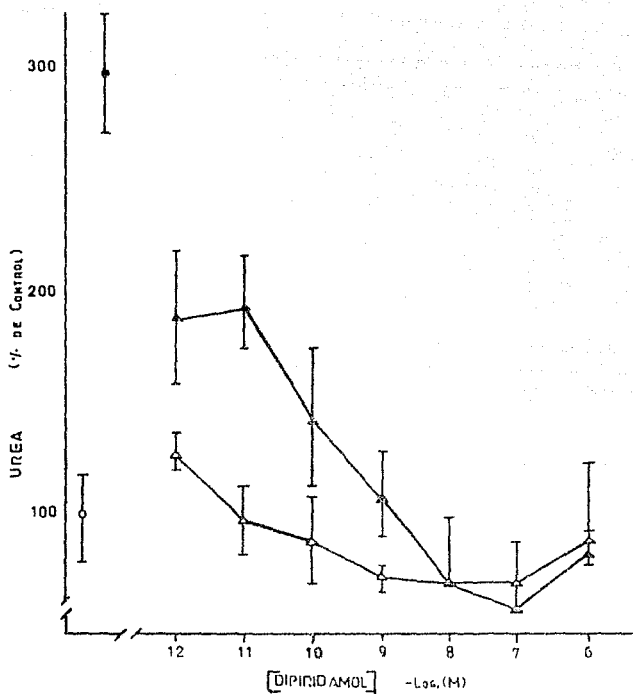


FIGURA 9 BLOQUEO POR DIPRIDAMOL DE LA UREAGENESIS ESTIMULADA POR GLUCAGON. LOS HEPATOCITOS FUERON INCUBADOS DURANTE 60 MINUTOS EN PRESENCIA DE GLUCAGON 10^{-6} M (10) Y CON CONCENTRACIONES CRECIENTES DE DIPRIDAMOL (▲); DIPRIDAMOL SOLO (Δ); CONTROL (O). CADA PUNTO REPRESENTA EL PROMEDIO DE 6 EXPERIMENTOS Y LAS LINEAS VERTICALES INDICAN LA DESVIACION ESTANDAR. LA FUENTE DE NITROGENO FUE GLUTAMINA (10 mM).

Es importante resaltar que el dipiridamol, per se, no modifica la velocidad basal de la biosíntesis de urea, pero definitivamente inhibe la estimulación provocada por la adenosina, epinefrina y el glucagón. Por consiguiente se concluye que el dipiridamol no ayuda a caracterizar el mecanismo de la acción ureogénica de la adenosina, pero además manifiesta una acción inhibitoria sobre la estimulación de la velocidad de la síntesis de urea ocasionada por los tres compuestos anotados.

OBJETIVO DE LA TESIS

El objetivo de este trabajo de tesis es intentar definir el mecanismo molecular por el cual el dipiricamol ejerce un efecto inhibitorio sobre la estimulación en la velocidad de síntesis de urea en hepatocitos estimulados por adenosina, epinefrina o glucagon.

MATERIALES Y METODOS

1. MATERIALES

1.1. MATERIAL BIOLÓGICO

Los experimentos fueron realizados empleando ratas macho de la cepa Wistar, con un peso de 150 a 200 g, alimentadas.

1.2. EQUIPO

Aparato de perfusión (Schimassek, H, 1963)

Baño de agitación Dubnoff

Centrifuga clínica Lourdes Instruments Corp.

Centrifuga Sorvall FRC-S refrigerada

Contador de centelleo Tricarb (Packard)

Espectrofotómetro Gifford Instruments y Ultrospec II (LKB)

Homogenizador de tejidos tipo Potter-Eveljhem

Oxímetro con electrodo (Yellow Springs Instruments) polarográfico tipo Clark y registrador

Potenciometro Metrohm Herisau

1.3. REACTIVOS

Adenosina-5'-difosfato (ADP), albumina sérica de bovino, colagenasa tipo II Worthington, deshidrogenasa glutámica (GLDH), dipiridamol, glutamina y ornitina. Estos reactivos fueron obtenidos de la compañía Sigma Chemical.

³H-Glutamina (glutamina marcada, actividad específica 50 Ci/mmol), de la compañía Amersham, UK.

Todos los demás reactivos utilizados fueron de grado analítico obtenidos de las compañías Baker y Merck de México.

2 METODOS

2.1. AISLAMIENTO DE HEPATOCITOS

Los hepatocitos fueron aislados empleando la técnica descrita por Berry y Friend en 1969 (48). El fundamento de esta técnica consiste en exponer al máximo los espacios intercelulares del hígado a la acción de la colagenasa, la cual degrada gran parte de los elementos adhesivos presentes entre las células. Para lograr esto, se anestesia al animal, se disecciona y canula la vena porta, a través de la cual se realiza una infusión continua de un medio salino amortiguado en el cual se encuentra disuelta la colagenasa. El hígado es aislado posteriormente. El medio empleado en estos experimentos fué el de Krebs-Ringer bicarbonato, constituido por NaCl 120 mM, KCl 4.75 mM, KH_2PO_4 1.2 mM, MgSO_4 1.2 mM, NaHCO_3 12 mM y CaCl_2 1.27 mM, ajustado a pH 7.4 a 37°C equilibrado con O_2/CO_2 (95% / 5%).

Este medio, con colagenasa, es recirculado hasta que la consistencia del hígado se vuelve blanda, y este se desintegra fácilmente al presionarlo. El tejido dispersado se filtra a través de una malla de nylon, y la suspensión de células así obtenida se centrifuga a 2000 rpm, por un minuto. El sobrenadante se descarta y las células se resuspenden en medio fresco, sin colagenasa y suplementado con albúmina bovina al 1%.

El aparato utilizado para perfusión y aislamiento de células se muestra en la figura 10.

La viabilidad de los hepatocitos fue cuantificada por la técnica de exclusión de azul de tripan, la cual consiste en que la membrana de las células no viables permite la entrada del colorante y las células se colorean de azul, a diferencia de la membrana de las células viables que no es atravesada por el colorante. Se utilizaron para realizar los experimentos, como hepatocitos con viabilidad mayor de 90% (46).

2.2. AISLAMIENTO DE MITOCONDRIAS

Las mitocondrias de hígado se obtuvieron de acuerdo al método descrito por Schneider y Hoegboom (47) modificado de la siguiente manera. Se empleó como medio de aislamiento manitol-buffer, constituido por: manitol 0.3 M, EDTA (ácido etilén diamino tetraacético) 1 mM, TES (ácido N-tris (hidroximetil) hidroximetil 1-2 aminometanosulfónico) 5 mM, ajustado a pH 7.3 con hidróxido de sodio 5N. Las mitocondrias se aíslan de acuerdo a los siguientes pasos:

- a) Decapitar y desangrar al animal
- b) Extraer el hígado y depositarlo en un vaso que contenga buffer frío, cortarlo en pedacitos y enjuagar con el mismo buffer 2 o 3 veces para eliminar al máximo la presencia de eritrocitos.
- c) Homogenizar 2 ó 3 veces el hígado en un homogenizador tipo E-P, repartir el homogenizado en dos tubos de centrifuga y centrifugar a 3.000 rpm durante 10 minutos a 5° C.

APARATO DE PERFUSION

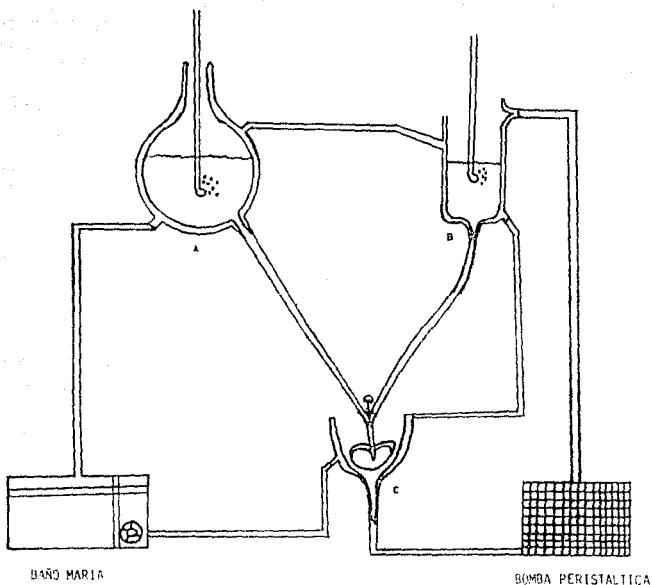


FIGURA 10 SISTEMA DE PERFUSION. EL RECIPIENTE A, DE DOBLE PARED CONTIENE RINGER-KREBS, CON EL CUAL EL HIGADO AISLADO, PERFUNDIDO Y DESANGRADO SE COLOCA EN EL RECIPIENTE C. EL MEDIO ES DESHECHADO DEL PASO POR EL HIGADO. DESPUES DE LA PERIFUSION AL HIGADO POR MEDIO DE UNA BOMBA PERISTALTICA RINGER-KREBS CON CALCIO Y COLAGENASA CONIENIDA EN EL RECIPIENTE B, LA TEMPERATURA ES MANTENIDA MEDIANTE LA RECIRCULACION DE AGUA A 37 °C POR LA DOBLE PARED DE LOS RECIPIENTES. LOS MEDIOS SE MANTIENEN SATURADOS DE O₂/CO₂ MEDIANTE BURBUJEO.

- d) Recuperar el sobrenadante en otro tubo limpio y desechar el sedimento.
- e) Centrifugar a 8,000 rpm durante 10 minutos a 5° C. Desechar el sobrenadante y resuspender suavemente el sedimento con buffer frío.
- f) Centrifugar a 10,000 rpm durante 10 minutos a 5° C. Desechar el sobrenadante y resuspender el sedimento (mitocondrias) con 0.8 ml de buffer frío.

La proteína mitocondrial fue determinada por medio de la reacción de Biuret [48]. Se utilizó albumina sérica bovina como estándar, a la cual se le adicionó KCN para corregir por turbidez [49].

El consumo de oxígeno fue medido por medio de un electrodo de oxígeno (Yellow Spring Inst., Corp.). El medio de respiración contenía succinato o glutamato-malato 10 mM como sustratos oxidables. Además, 3.3 mM de fosfato-Tris pH 7.4, 2.6 mM de MgCl₂, 3.3 mM de KCl, 260 mM de Manitol, 4.3 mM de TES, 0.67 mM de EDTA, en un volumen final de 3.0 ml a pH 7.3, en una cámara cerrada. La respiración mitocondrial y la relación ADP : O fueron calculadas de acuerdo con Estabrook [50].

2.3. DETERMINACION DE LA INCORPORACION DE LA GLUTAMINA

El transporte de glutamina fue determinado tanto en hepatocitos como en mitocondrias aislados. Los hepatocitos y las mitocondrias fueron aislados de acuerdo a las técnicas descritas en las secciones 2.1 y 2.2. El medio de incubación para los

hepatocitos consta de solución de Ringer-Krebs suplementado con albúmina al 1%, ornitina 3 mM, ^3H -Glutamina 26.3 Ci/mmol y en alguno de los tubos el agente a evaluar (dipiridamol 10^{-6}).

El periodo de incubación es de 45 minutos a 37°C . en una atmósfera equilibrada de O_2/CO_2 (95% / 5%) en constante agitación. Al final de este periodo el contenido de los tubos es filtrado y las células son lavadas perfectamente con solución de KCl al 1%. Se colocan en un vial, se secan y se les agrega el líquido de centelleo para determinar la actividad presente.

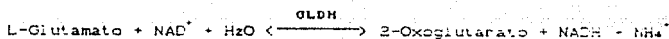
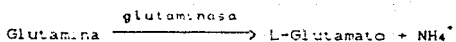
El medio de incubación para las mitocondrias está constituido de manitol-buffer suplementado con ^3H -Glutamina 26.3 Ci/mmol y dipiridamol 10^{-6} M. El periodo de incubación es de 1 minuto a 37°C en constante agitación. Al término de la incubación se efectúa el mismo procedimiento descrito para los hepatocitos.

2.4. ACTIVIDAD DE GLUTAMINASA MITOCONDRIAL

La actividad de glutaminasa fue medida en preparaciones crudas de mitocondrias aisladas de hígado de rata, incubadas por 10 minutos, en presencia o ausencia del Dipiridamol. La técnica de aislamiento de mitocondrias usada fue la descrita en la sección 2.2. La actividad de la glutaminasa fue estimada mediante la cuantificación de glutato, producido durante 10 minutos a partir de la adición de glutamina. El medio de incubación para la determinación de glutamato está constituido por glutamina 20 mM, Tris/HCl 75 mM, KCl 15 mM, K_2HPO_4 5 mM, KHCO_3 16 mM, succinato 10 mM, MgCl_2 3 mM y rotenona 5 mg/ml, ajustado a pH 7.3. La rotenona

se usa para bloquear el consumo de NADH en la cadena respiratoria.

Después de la incubación, el glutamato formado fue cuantificado mediante la técnica descrita por Bernt y Bergmeyer (51). En esta técnica, el glutamato es sometido a la acción de la deshidrogenasa glutámica, con la consecuente formación de NADH. La cantidad de NADH formado se estima por su coeficiente de extinción molecular a 340 nm.



RESULTADOS Y DISCUSION

Con el objeto de iniciar el estudio del mecanismo de acción del dipiridamol, al bloquear el efecto ureogénico de las hormonas glucagon y epinefrina, y el nucleosido adenosina, se realizó un análisis de la mezcla de incubación empleada por Guinzberg y col. para obtener los resultados presentados en las figuras 7, 8 y 9. En primer lugar se decidió sustituir la glutamina por iones amonio en forma de carbonato de amonio. En los experimentos previos la glutamina se empleó como precursor de los grupos amino de la urea; la sustitución tuvo como función obviar la acción de la glutaminasa sobre la glutamina para generar glutamato y amonio. También se determinó utilizar únicamente glucagon como hormona estimulante de la producción de urea, ya que fué con esta hormona donde se observó en forma más marcada el efecto bloqueador que produce el dipiridamol en la estimulación hormonal de la ureogénesis (figura 8); por otra parte, la bibliografía consultada no reporta que el dipiridamol ejerce algún efecto sobre el metabolismo del glucagon, tal como sucede con la adenosina (45). Los resultados obtenidos en esta etapa se encuentran resumidos en la figura 11.

En esta figura se observa que el efecto bloqueador en la estimulación hormonal de la ureogénesis producido por el dipiridamol no se efectúa cuando el sustrato ureogénico es carbonato de amonio. Estos resultados nos llevan a pensar en que

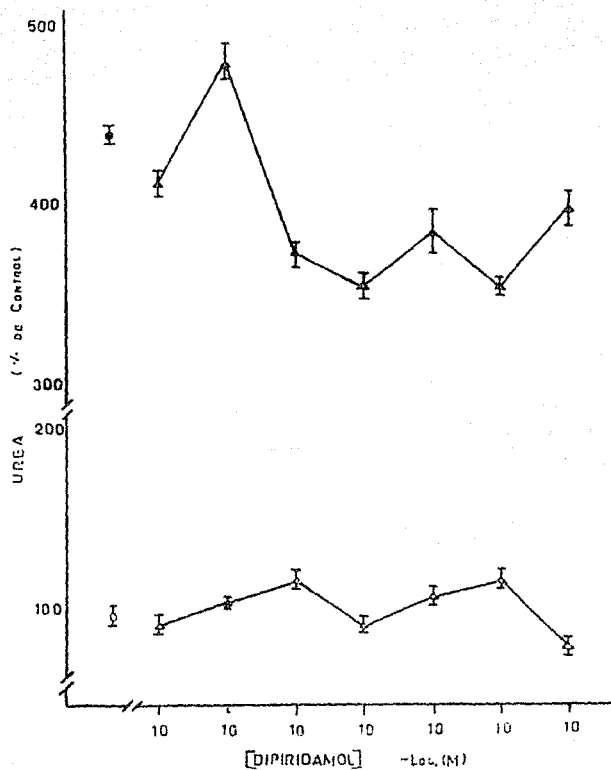


FIGURA 11 EFECTOS DEL DIPIRIDAMOL EN LA UROGENESIS ESTIMULADA POR GLUCAGON TENIENDO COMO SUSTRATO UROGENETICO CARBONATO DE AMONIO. LOS HEPATOCITOS FUERON INCUBADOS DURANTE 60 MINUTOS EN PRESENCIA DE GLUCAGON 10^{-6} SOLO (●) Y CON CONCENTRACIONES CRECIENTES DE DIPIRIDAMOL (▲); DIPIRIDAMOL SOLO (◻); CONTROL (○). CADA PUNTO REPRESENTA EL PROMEDIO DE 4 EXPERIMENTOS Y LAS LINEAS VERTICALES INDICAN LA DESVIACION ESTANDAR. LA FUENTE DE NITROGENO FUE CARBONATO DE AMONIO (3 mM).

el dipiridamol afecta alguna etapa en el metabolismo de la glutamina, de tal manera que se logre bloquear la estimulación hormonal de la biosíntesis de urea.

La glutamina es el aminoácido más abundante en el cuerpo humano, tiene la concentración más alta en el plasma, representa más del 50 % del contenido intracelular de aminoácidos (52 y 53). La glutamina es sintetizada a partir de glutamato y amoníaco en una amplia variedad de tejidos que contienen la enzima glutamina-sintetasa; y es degradada por la enzima glutaminasa, rindiendo glutamato y amoníaco (54).

La glutamina juega un papel central en la fisiología y el metabolismo celular. Es un constituyente principal de las proteínas y péptidos endógenos y dietéticos. Su participación es importante para mantener el balance ácido-básico (55). Actúa como un combustible respiratorio en la mucosa de intestino delgado y en varias células malignas (56). También es un precursor de aminoazúcares y de varios nucleótidos como el ATP, purinas y pirimidinas (57). En humanos y otros mamíferos relacionados actúa como agente detoxificante del exceso de iones amonio generados durante el catabolismo de proteínas (58).

El hígado de rata *in vivo* realiza tanto la incorporación, como la liberación de glutamina, dependiendo del estado de alimentación del animal. Las magnitudes de estos procesos son (con excepción de la alanina) mayores que las de cualquier otro aminoácido.

Cuando se tiene glutamina como sustrato para el hígado

de rata aislado y se agrega glucagon u otras hormonas con efectos dependientes del calcio, tales como catecolaminas, se encuentra que disminuye la concentración intracelular de glutamina y aumenta la formación de glucosa y urea, lo cual indica que esas hormonas estimulan la utilización de dicho sustrato. Existen dos hipótesis que podrían explicar la estimulación de la ureogénesis; una de ellas considera a la glutaminasa como el paso limitante de la velocidad (el que tendría el mayor coeficiente de flujo), y la otra sugiere al transportador de glutamina en la membrana plasmática como regulador. Ninguna de estas hipótesis se ha comprobado plenamente (59).

En base a estas hipótesis planteadas, nosotros proponemos que el dipiridamol afecta posiblemente alguno de estos dos caminos o bien a ambos, dando como consecuencia un bloqueo en la ureogénesis estimulada por hormonas con el sustrato glutamina.

Sin embargo, se decidió estudiar en primer lugar la incorporación de glutamina en hepatocitos aislados en presencia de dipiridamol, pues se sabe que el dipiridamol bloquea la captación de adenosina por los eritrocitos (48), por lo cual se propone que esta droga ejerza un efecto similar sobre la glutamina. Para realizar estos experimentos fue necesario utilizar glutamina marcada con tritio. Los resultados de los experimentos se encuentran representados en la figura 12.

Los datos encontrados en esta etapa nos muestran que la incorporación de glutamina en hepatocitos de rata se favorece, con respecto al control, cuando se adiciona dipiridamol. En

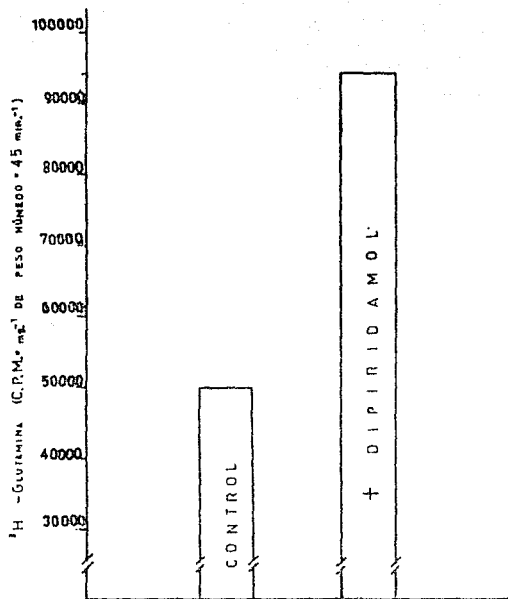


FIGURA 12 INCORPORACION DE GLUTAMINA EN HEPATOCITOS AISLADOS. EL CONTROL REPRESENTA LA INCORPORACION DE GLUTAMINA EN AUSENCIA DE DIPIRIDAMOL, EN EL OTRO CASO LA CONCENTRACION DE DIPIRIDAMOL FUE DE 10^{-6} M. LA ACTIVIDAD ESPECIFICA DE GLUTAMINA PARA AMBOS CASOS FUE DE 26.3 μ Ci/mmol.

consecuencia, surgió la siguiente pregunta ¿Puede el dipiridamol bloquear la captación de glutamina por mitocondrias? Se sabe que realmente es en ese organelo donde se localiza la glutaminasa y por lo tanto donde se requiere la presencia de la glutamina, para desaminarse y poder ceder sus grupos amino para la biosíntesis de urea. Con el propósito de resolver esta pregunta se midió la incorporación de glutamina radioactiva en mitocondrias aisladas de hígado de rata en condiciones control y bajo el efecto de dipiridamol. Los resultados de estos experimentos se muestran en la figura 13, en los cuales se puede apreciar que el dipiridamol, al igual que sucede en los hepatocitos, favorece la incorporación de la glutamina en las mitocondrias aisladas.

Los resultados de estos experimentos nos dan información de que el dipiridamol no inhibe el transporte de glutamina al interior de la célula o al interior de la mitocondria y por lo tanto no proporciona bases experimentales que sustenten su efecto bloqueador sobre la ureogénesis estimulada por hormonas. Como se planteó al inicio de este trabajo, otra alternativa para explicar la mencionada acción del dipiridamol es a través de una modificación en la actividad de la glutaminasa en presencia de este fármaco. Es importante mencionar que existen datos donde se muestra que la actividad de esta enzima es estimulada por hormonas tales como el glucagón, la epinefrina, la vasopresina y la angiotensina (60), por consiguiente una posible inhibición en su actividad por el dipiridamol podría ser la base molecular de su efecto analizado en esta tesis.

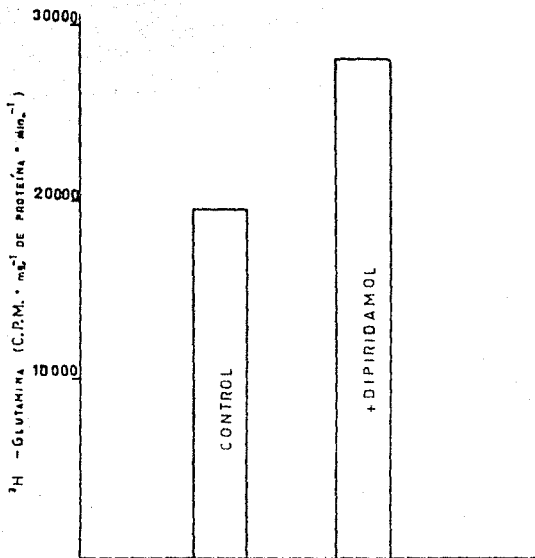


FIGURA 13 INCORPORACION DE GLUTAMINA EN MITOCONDRIAS AISLADAS DE HIGADO DE RATA. EL CONTROL REPRESENTA LA INCORPORACION DE GLUTAMINA EN AUSENCIA DE DIPIRIDAMOL, EN EL OTRO CASO LA CONCENTRACION DE DIPIRIDAMOL FUE DE 10^{-6} M. LA ACTIVIDAD ESPECIFICA PARA AMBOS TAIOS FUE 26.3 μ Cl/mmol.

Se determinó la actividad de la glutaminasa en ausencia y presencia del dipiridamol; los resultados de la determinación se muestran resumidos en la figura 14.

De manera general, se consideró que los resultados encontrados en esta etapa son alentadores porque en ellos se muestra que la actividad de la enzima glutaminasa se disminuye en presencia del dipiridamol. A pesar de que la disminución encontrada en la actividad de la enzima, no es tan marcada como se esperaría en proporción al bloqueo encontrado en la biosíntesis de urea, causado por este mismo fármaco, se considera válida esta explicación. Ya que realmente el bloqueo impresionante que se observa, es en la estimulación hormonal de la ureogénesis, más no en condiciones basales, que son las usadas en este trabajo, aunque también se ven afectadas. Tomando en cuenta todas estas consideraciones se recomienda como siguiente paso estudiar la inhibición causada por el dipiridamol en la actividad de la glutaminasa previamente estimulada por la aplicación de los agentes capaces de activarla.

Por lo tanto, una vez que se detectó que este fármaco inhibe la actividad de la glutaminasa, se recomienda estudiar, que sucede con la glutamina que no se cataboliza. ¿Podría aumentar la concentración de este aminoácido a un nivel en el que se distorsione el metabolismo? Sería interesante contestar esta pregunta, ya que el dipiridamol es un fármaco que se encuentra en uso médico y las concentraciones plasmáticas necesarias para ejercer sus efectos terapéuticos (3-5 molas/l), se asemejan a las

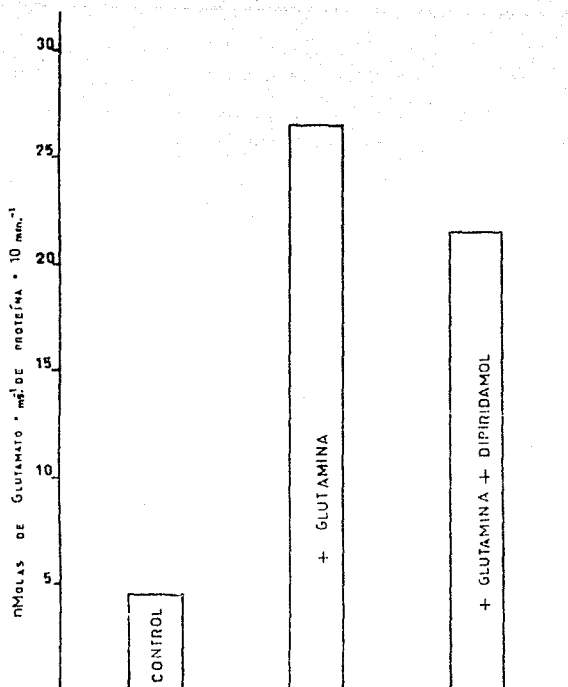


FIGURA 14 ACTIVIDAD DE LA GLUTAMINA EN MITOCONDRIAS AISLADAS DE HIGADO DE RATA. EL CONTROL REPRESENTA LA ACTIVIDAD DE LA GLUTAMINASA SIN GLUTAMINA EXÓGENA; EN LOS OTROS CASOS LA CONCENTRACION DE GLUTAMINA FUE DE 20 mM Y LA DEL DIPIRIDAMOL FUE 10^{-6} M.

utilizadas en este trabajo (10^{-6} M).

Finalmente, es necesario mencionar la posibilidad de utilizar el dipiridamol en estudios en los que se requiera inhibir la estimulación de la actividad de la enzima glutaminasa.

CONCLUSIONES

- 1.- El transporte de glutamina no es afectado por dipiridamol.
- 2.- El dipiridamol inhibe la actividad de la glutaminasa mitocondrial, (10%) explicando de esta forma el bloqueo que produce en la estimulación hormonal de la ureogénesis.
- 3.- El dipiridamol es un fármaco que puede utilizarse en estudios en los cuales se requiera bloquear la actividad de la glutaminasa.
- 4.- Además de inhibir el transporte de adenosina se debe considerar su efecto colateral descrito en este trabajo, sobre todo para sus aplicaciones terapéuticas.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

BIBLIOGRAFIA

1. - Martín, Moyes, Rodwell y Granner. Bioquímica de Harper. 10^a edición. Ed. El Manual Moderno, S.A. de C.V. México, 1986
2. - Grisolia, S. y Rubio, S. "Metabolismo de sustancias nitrogenadas"; Bioquímica y Biología Molecular, Temas de actualidad para graduados. Eds. S. Ochoa, L.F. León, J. Oro y A. Sols. Ed. Salvat, Barcelona, 1986
3. - Wanders, R.J.A.; Van Woerkan, G.M.; Nootboon.; "Relationship between the rate of citrulline synthesis and bulk changes in the intramitochondrial ATP:ADP ratio in rat liver mitochondria"; Eur. J. Biochem.; 113: 295-302, 1981.
4. - Meijer, A.J. y Gimpel, J.A.; "Role and anion translocation across the mitochondrial membrane in the regulation of urea synthesis from ammonia by isolated rat hepatocytes"; J. Biol. Chem.; 250: 7728-7738, 1975.
5. - Peten, L.G. y Plant, G.W.E.; "NADP-specific isocitrate dehydrogenase in regulation of urea synthesis in rat hepatocytes"; Biochem. J.; 190: 591-592, 1980.
6. - Helmreich, E.J.M. y Bakardjieva, A.; "Hormonally stimulated adenylate cyclase: a membranous multicomponent system"; Bio. Systems.; 12: 295-304, 1980.
7. - Saneki, T. y Katunuma, N.; "Analysis of regulation factors for urea synthesis by isolated perfused rat liver"; J. Biochem.; 77: 659-669, 1975.

8. - Schimke, R.T.; "Studies of factors affecting the levels of urea cycle enzymes in rat liver"; *J. Biol. Chem.*; 238: 1012-1018, 1963
9. - Schimke, R.T.; "Differential effects of fasting and proteinfree diets on levels of urea cycle enzymes in rat liver"; *J. Biol. Chem.*; 237: 1921-1924, 1962.
10. - Schimke, R.T.; "Adaptive characteristics of urea cycle enzymes in the rat"; *J. Biol. Chem.*; 237: 1921-1924, 1962.
11. - Muzum, C.T. and Snodgrass, P.J.; "Urea cycle adaptation protein in primates"; *Science*; 172: 1042-1043, 1971.
12. - Aebi, H.; "Coordinated changes in enzymes of the ornithine cycle and response to dietary conditions"; In "The urea cycle"; Grisolia, S.; Baquena, R. and Mayor, F. (Eds.); Johann Wiley & Sons, New York, 1976
13. - Snigiesada, N.; Aoyagi, K. and Tatibana, M.; "Role of Acetylglutamate level and its possible significance in control of urea synthesis in mammalian liver"; *Eur. J. Biochem.*; 85: 385-391, 1978.
14. - Mori, M.; Mauro, S.; Tatibana, M. and Cohen, P.P.; "Cell-Free translation of carbamyl phosphate synthetase I and ornithine transcarbamylase messenger RNAs in rat liver. Effect of dietary protein and fasting on transla in RNA levels"; *J. Biol. Chem.*; 255-260, 1981.

15. - Shigesada, K. and Talibana, M.; "Acetylglutamate Synthetase from Rat Liver Mitochondria. Partial Purification and Catalytic Properties"; *Eur. J. Biochem.*; 84: 285-291, 1976.
16. - Marxgall, M.; "Carbamyl Phosphate Synthetase from Frog Liver"; in "The Urea Cycle"; Grisolia, S.; Baquero, R. and Mayor, F.; (Eds.) John Wiley & Sons, New York, p. 133-142, 1976.
17. - Hensgens, H.E.S.J.; Verhoven, A.J. and Meijer, A.J.; "The Relationship between Intramitochondrial N-Acetylglutamate and Activity of Carbamoyl-phosphate Synthetase (Ammonia). The Effect of Glucagon"; *Eur. J. Biochem.*; 107: 197-205, 1980.
18. - Lamers, W. H. and Mooren, P.G.; "Role of glucocorticosteroid hormones on the levels of rat liver carbamoyl phosphate synthase (ammonia) and arginase activity during ontogenesis"; *Biol. Neonate*; 37: 113-137, 1980.
19. - Gebhardt, R. and Mecke, D.; "Permissive effect of Dexamethasone on Glucagon. Induction of Urea-Cycle enzymes in perfused primary cultures of rat hepatocytes"; *Eur. J. Biochem.*; 97: 29-35, 1976.
20. - Yamasaki, R.K. and Graetz, S.S.; "Glucagon stimulation of citrulline formation in isolated hepatic mitochondria"; *Arch. Biochem. Biophys.*; 178: 19-25, 1977.
21. - Moleen, P. and Burney, M.W.; "Effect of Adrenalectomy and of Growth hormone on enzymes concerned with urea synthesis in rat liver"; *Biochem. J.*; 87: 96-104, 1965.

22. - Eskins, E. and Rahia, N.C.R.; "Changes in the activities of urea synthesis caused by dexamethasone and dibutyryl adenosine 3': 5'- Cyclic monophosphate in fetal rat liver maintained in organ culture"; *Biochem. J.*; 160: 159-162, 1976.
23. - Cohen, P.P.; Brucker, R.F. and Morris, S.M.; "Cellular and molecular aspects of thyroid hormone action during amphibian metamorphosis"; In *Hormonal protein and peptides, Vol. VI, Thyroid hormones*, L.C.H.; (Ed.) Academic Press, Inc. New York, p. 273-381, 1978.
24. - Pasmussen, H.; "Organization and control of endocrine systems"; In *Textbook of Endocrinology*; [Williams, R.H., ed.] W.B. Saunders, Co. Philadelphia; p 1-30, 1974.
25. - Mitchell, R.H.; "Inositol phospholipids and cell surface receptor function"; *Biochem. Biophys. Acta*; 413: 81-88; 1975.
26. - García Sainz, J.A.; Hernández Sotomayor, T.; Contreras Rodríguez, J.L.; "Modulación de la acción α adrenérgica por la actividad de la proteína cinasa C"; Enviado a publicación.
27. - Berridge, M.J.; Irvine, R.F.; "Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction"; *Nature*, 312: 315-317, 1984.
28. - Nishizuka, Y.; "Studies and perspectives of protein Kinase C"; *Science*, 239: 305-312; 1984.

- 29.- Cohen, P.; "The role of protein phosphorylation in normal and hormonal control of cellular activity"; *Nature*. 296: 613-616; 1982.
- 30.- Guinzberg Perrusquia R.; "Regulación Hormonal de la Ureogénesis en Hepatocitos Aislados"; Tesis de maestría.; U.N.A.M.; México, 1988.
- 31.- Corvera, S.; "Regulación Hormonal de la Ureogénesis"; Tesis de maestría.; U.N.A.M.; México, 1984.
- 32.- Fox, I.H. and Kelley, W.N.; "The role of adenosine and 2'-deoxyadenosine in mammalian cells"; *Ann. Rev. Biochem.*; 47: 665-689, 1978.
- 33.- Scott, J.M.; "Role of chemical factors in regulation of blood flow through kidney, hind limb and heart"; *Amer. J. Physiol.*; 208: 813-824, 1965.
- 34.- Chagoya de Sanchez, V.; Brunner, A. y Piña, E.; "In vivo modification of the energy charge in the liver cell"; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*; 46: 1441-1445, 1972.
- 35.- Chagoya de Sanchez, V. y Piña, E.; "Adenosine, a glucogenic and lipogenic compound"; *FEBS Lett.*; 19: 331-334, 1972.
- 36.- Wolff, S. and Cook, G.H.; "Activation of steroidogenesis and adenylate cyclase by adenosine in adrenal and Leydig tumor cells"; *J. Biol. Chem.*; 252: 887-893, 1977.
- 37.- Ismail, N.A.; Densahry, E.E. and Montague, W.; "Adenosine and the regulation of insulin secretion by isolated rat islets of Langerhans"; *Biochem. J.*; 164: 409-413, 1977.

38. - Weir, G.C.; Knowlton, S.D. and Martin, D.B.; "Nucleotide and nucleoside stimulation of glucagon secretion endocrinology"; 97: 932-936, 1975.
39. - Sattin, A. and Rall, T.W.; "The effect of adenosine and adenine nucleotides on the cyclic adenosine 3'5'-phosphate content of guinea-pig cerebral cortex slices"; Mol. Pharmacol. Exp. Ther.; 192: 22-32, 1970.
40. - Gunzberg, P.R.; Laguna, I.; Guzman, R.; Zentella, A. and Piña, E.; "Effect of adenosine and inosine on ureogenesis in hepatocytes"; Biochem. J.; 245: 371-374, 1987.
41. - Burnstock, G.; "Purinergetic nerves"; Pharmacol. Rev.; 24: 509-561, 1972.
42. - De Graff, A.C. and Lyon, A.F.; "Evaluation of dipyridamole"; Am. Heart. J.; 65: 423-427, 1963.
43. - Ogston, D. and Douglas, A.S.; "Anticoagulant and thrombolytic drugs"; Drug; 1: 228-231, 1971.
44. - Stafford, A.; "Potentiation of adenosine and the adenine nucleotides by dipyridamole"; Br. J. Pharmac. Chemother.; 29: 218-227, 1968.
45. - Cuculanu, M.P.; Nishizawa, E.E. and Mustard, J.F.; "Effect of pyrimido-pyrimidine compounds on platelet function"; J. Lab. Clin. Med.; 77: 958-963, 1971.
46. - Berry, M.H. and Friend, D.S.; "High yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells"; J. Cell. Biol.; 43: 506-520, 1969.

47. - Schneider, W.C. y Hogeboom, G.H.; "Intracellular distribution of enzymes"; V: Further studies on the distribution of cytochrome C in rat liver homogenates.; J. Biol. Chem.; 189: 123-128, 1950.
48. - Cleland, K.W. and Slater, E.C.; "Respiratory granules of heart muscle"; Biochem. J.; 53: 547-556, 1953.
49. - Keyser, J.W. and Vaughn, J.; "Turbidities in the estimation of serum proteins by the biuret method. Proc. of the Biochemical Society"; Biochem. J.; 44: 124-127, 1949.
50. - Estabrook, R.W.; "Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurement of ADP:O ratios"; In Methods in Enzymology, (Estabrook and Pullman, eds.); 10: 41-47, 1967.
51. - Bernt, E. and Bergmeyer, H.U.; "L-Glutamate"; In Methods of Enzymatic Analysis; Academic Press, New York; p 1708-1709, 1974
52. - Ademrad, N. and Miller, B.M.; "The physiologic and nutritional significance of plasma free amino acid levels", IPEN; 7: 163-170, 1983.
53. - Felig, P.; "Amino acid metabolism in man"; Annu. Rev. Biochem.; 44: 933-955, 1975.
54. - Kovacevic, Z. and J.D. McGivan; "Mitochondrial metabolism of glutamine and glutamate and its physiologic significance"; Physiol. Rev.; 53: 547-505, 1983.

55. - Adae, S.K. and Lotspeich, W.P.; "Relation between glutamine utilization and production in metabolic acidosis"; *Am. J. Physiol.*; 215: 269-277, 1968.
56. - Kovacevic, Z. and Morris, H.P.; "The role of glutamine in the oxidative metabolism of malignant cells"; *Cancer. Res.*; 32: 326-333, 1972.
57. - Meister, A.; "Biochemistry of glutamate: glutamine and glutathione"; In: *Glutamic Acid Advances in Biochemistry and Physiology*; Edited by L.J. Filler, Jr. New York: Raven, p. 69-84, 1979.
58. - Pitts, R.F.; "Renal production and excretion of ammonia"; *Am. J. Med.*; 36: 730-741, 1962.
59. - Raymonds S. Ochs.; "Recent thoughts on hepatic glutamine metabolism"; *TIBS*; 11: 236-236, 1986.
60. - Corvera, S. and Garcia Sainz A.; "Hormonal stimulation of mitochondrial glutaminase"; *Biochem. J.*; 210: 957-960, 1983.