

11261

10
2ej.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Medicina
Departamento de Bioquímica

“Efectos Metabólicos de la Adenosina en Hígado de Mamífero: Dependencia de Calcio y/o Amp-Cíclico en la Estimulación de la Gluconeogénesis y la Glucogenólisis”

T E S I S

Que se sustenta para optar por el grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOMEDICAS
(BIOQUIMICA)**

Presentado por:

Med. Cir. Rosa Elizabeth González Benítez

Tutor:

Dr. Enrique Piña Garza

Cotutores:

Dr. Rafael Villalobos Molina

M. en C. Raquel Guinzberg Perrusquia



México, D. F.

1998

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

259656



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

**A mi esposo:
Dr. Moises Laureano Lazcano**

**A mis padres:
Leonardo González Medina
Rosa María Benítez Nieto**

**A mi hermana:
Diana Gabriela González Benítez**

INDICE

	PAGINA
<u>RESUMEN</u>	I
<u>TABLA DE ABREVIATURAS</u>	1
<u>I. INTRODUCCION.</u>	
I.1. Gluconeogénesis.	4
I.2. Glucogenólisis.	6
I.3. Adenilil Ciclasas.	8
I.4. La Adenosina y sus Receptores.	12
I.5. Proteínas G.	
I.5.1. Estructura y funcion.	15
I.5.2. Conformación del receptor y transmisión de la señal.	17
I.5.3. Vías de transducción divergentes.	19
I.5.4. Selectividad de un receptor con una proteína G.	20
<u>II. ANTECEDENTES.</u>	
II.1. La Adenosina y el AMP-cíclico.	22
II.2. La Adenosina y el Calcio.	23
II.3. Vías de Transducción de los Receptores a Adenosina.	23
II.4. Corriente de Calcio en células no excitables.	31
<u>III. HIPOTESIS.</u>	33
<u>IV. OBJETIVOS.</u>	33
<u>V. MATERIAL Y METODOS.</u>	
V.1. Aislamiento de Hepatocitos.	34
V.2. Agonistas de los Receptores a Adenosina.	35
V.3. Gluconeogénesis.	36
V.4. Glucogenólisis.	36
V.5. Acumulación de AMP-cíclico.	37
<u>VI. RESULTADOS.</u>	
VI.1. Gluconeogénesis.	38
VI.2. Glucogenólisis.	44
VI.3. Acumulación de AMP-cíclico.	51
<u>VII. DISCUSION</u>	
VII.1. La adenosina como agente fisiológico.	57
VII.2. Gluconeogénesis.	58
VII.3. Glucogenólisis.	60

VII.4. Acumulación de AMP-cíclico.	61
VII.5. APNEA, ¿un nuevo receptor?	64
VIII. <u>CONCLUSIONES</u>	66
IX. <u>BIBLIOGRAFIA.</u>	68

RESUMEN

"EFECTOS METABOLICOS DE LA ADENOSINA EN HIGADO DE MAMIFERO: DEPENDENCIA DE CALCIO Y/O AMP-CICLICO EN LA ESTIMULACION DE LA GLUCONEOGENESIS Y LA GLUCOGENOLISIS"

En la regulación de la gluconeogénesis y la glucogenólisis hepáticas participan tanto el calcio como el AMP-cíclico (AMPc). Ambos moduladores estimulan a las dos vías metabólicas. La adenosina es un nucleósido de purina que juega un papel importante en el metabolismo hepático. La adenosina es capaz de estimular a la gluconeogénesis, la glucogenólisis y la ureagénesis. La adenosina ejerce sus acciones a través de receptores de membrana específicos. Hasta la fecha se han identificado cuatro subtipos de receptores a adenosina: A1, A2a, A2b y A3. Los receptores a adenosina pertenecen a la superfamilia de receptores de 7 dominios transmembranales, acoplados a proteínas G. Los receptores A1 se acoplan a proteínas Gi, por medio de la subunidad α inhiben a la adenilil ciclasa, disminuyendo los niveles de AMPc; y por medio de las subunidades $\beta\gamma$ estimulan a la fosfolipasa C (PLC), aumentando los niveles de calcio y activando a la protein cinasa C (PKC). Los receptores A2a se acoplan a proteínas Gs y activan a la adenilil ciclasa, aumentando los niveles de AMPc. Los receptores A3 se acoplan a dos tipos de proteína G, la Gi y la Gq. Por medio de las Gi se inhibe a la adenilil ciclasa y por medio de las Gq activan a la PLC.

El propósito de este trabajo fue el investigar si las acciones de la adenosina sobre la gluconeogénesis y la glucogenólisis hepáticas son a través de un receptor específico para cada una de las vías mencionadas. Además el investigar si las acciones de la adenosina sobre las vías metabólicas estudiadas y sobre el AMPc, dependían de la presencia de calcio extracelular.

Para este propósito se aislaron hepatocitos de ratas macho de la cepa Wistar con un peso de 150-200 gr. La gluconeogénesis se midió como la formación de glucosa con el método de glucosa oxidasa en hepatocitos de ratas ayunadas por 24 hrs. Se utilizó como sustrato gluconeogénico al lactato 10 mM. La glucogenólisis se midió como la formación de glucosa con el método de glucosa oxidasa en hepatocitos de ratas alimentadas *ad libitum*. El AMPc se midió por radioinmunoensayo en hepatocitos de ratas alimentadas *ad libitum*. En los tres casos se hicieron dos grupos experimentales: células en la presencia de CaCl₂ 1.2mM y células en ausencia de calcio extracelular. Este último grupo experimental fué tratado con EGTA 1.2 mM 10 min. previos a la incubación. En todos los experimentos las células fueron incubadas en presencia de diferentes concentraciones de adenosina o de los agonistas específicos. Se utilizó como agonista A1 el CCPA con una K_d=0.4nM; para el A2a el CGS21680 con una K_d=15 nM; y para el A3 el IB-MECA con una K_d=1.1 nM y el APNEA con una K_d=15.5 nM.

En los resultados se observó que la adenosina estimula a la gluconeogénesis y a la glucogenólisis de una manera dependiente de la concentración y estos efectos no dependen de la presencia de calcio extracelular. La estimulación de los receptores A1 resultó en: (i) una inhibición de la gluconeogénesis (60% por debajo de la basal), independientemente del calcio extracelular; (ii) una estimulación de la glucogenólisis (130% por arriba de la basal), dependiente de la concentración e independiente del calcio extracelular; y (iii) una inhibición de los niveles de AMPc en un 40%, dependiente de la presencia de calcio extracelular, ya que en ausencia de éste no hubo cambio en los niveles basales de AMPc.

La estimulación de los receptores A2a resultó en: (i) a concentraciones nanomolares promueven la gluconeogénesis (100% por arriba de la basal), independientemente del calcio extracelular; sin embargo a concentraciones micromolares en ausencia de calcio estimulan la gluconeogénesis en un 200% y en presencia del mismo la mantienen un 20% por arriba de la basal; (ii) una estimulación de la glucogenólisis (50% por arriba de la basal), dependiente de la concentración y del calcio extracelular; y (iii) un aumento en los niveles del AMPc en un 50%, efecto que depende del calcio extracelular.

La estimulación de los receptores A3 con IB-MECA, resultó en: (i) a concentraciones nanomolares promueven la gluconeogénesis en un 40%, mientras que a concentraciones micromolares inhiben esta vía en un 40%, ambos efectos dependen de la concentración y del calcio extracelular; (ii) un pequeño aumento del 30% en la glucogenólisis en presencia de calcio, mientras que en ausencia del mismo no se modificaron los niveles basales; y (iii) una disminución de los niveles de AMPc en un 40% dependiendo de la concentración y del calcio extracelular.

La estimulación con el agonista APNEA resultó en: (i) una estimulación de la gluconeogénesis en un 40% dependiendo de la concentración y del calcio extracelular; (ii) a concentraciones nanomolares estimuló la glucogenólisis en un 50%, mientras que a concentraciones micromolares la disminuyó hasta los niveles basales, ambos efectos dependientes del calcio extracelular; y (iii) un gran aumento de los niveles de AMPc en un 100% en presencia de calcio extracelular, mientras que en ausencia de éste fue capaz de disminuir los niveles basales en un 40%, ambos efectos dependientes de la concentración.

La respuesta bifásica obtenida en muchos de los resultados se puede explicar por la falta de selectividad de los agonista. Al utilizar concentraciones mayores de la K_d señalada, un agonista puede estimular a otro(s) subtipo(s) de receptor.

Sin embargo, se puede llegar a las siguientes conclusiones: (i) se demostró metabólicamente la presencia de tres subtipos (A1, A2a y A3) de receptores a adenosina en hígado de rata; (ii) en las acciones de la adenosina sobre la gluconeogénesis, predomina el subtipo de receptor A2a; (iii) en las acciones de la adenosina sobre la glucogenólisis, predomina el subtipo de receptor A1; (iv) a pesar de que el efecto de los agonistas a adenosina sobre el AMPc parece depender de la presencia de calcio extracelular, aparentemente no es así en la estimulación de las vías metabólicas.

Ciertamente los resultados obtenidos nos dejan ver la complejidad de las vías de transducción de señales y de la regulación del metabolismo celular. Sin embargo, dan la pauta para investigaciones posteriores, tomando en cuenta la expresión de otros tipos de receptores y de vías de regulación que coexisten en este diseño experimental, la célula nativa.

TABLA DE ABREVIATURAS

A ₁	receptor de adenosina del subtipo 1
A _{2a}	receptor de adenosina del subtipo 2a
A _{2b}	receptor de adenosina del subtipo 2b
A ₃	receptor de adenosina del subtipo 3
A ₄	receptor de adenosina del subtipo 4
ADO	adenosina
ADP	adenosín difosfato
α_i	subunidad α de la proteína G _i
AMP	adenosín monofosfato
AMPc	adenosín monofosfato-cíclico.
APNEA	N ⁶ -2-etiladenosina
α_q ó Gq α	subunidad α de la proteína G _q
α_s	subunidad α de la proteína G _s
ATP	adenosín trifosfato
$\beta\gamma$ ó G $\beta\gamma$	subunidades $\beta\gamma$ de la proteína G
$\beta\gamma_{i/o}$	subunidades $\beta\gamma$ de la proteína G _{i/o}
C	subunidad catalítica
Ca ²⁺	calcio

CaM-Ca ²⁺	calcio-calmodulina
CCPA	2-cloro-N ⁶ -ciclopentiladenosina
CGS21680	2-[4-(2-carboxietil)-feniletilamina]-5'-N- etilcarboxamidoadenosina
CHO	ovocitos de hamster chino
CV-1808	2-fenilaminoadenosina
DAG	diacilglicerol
EXT.	extracelular
G α	subunidad α de la proteína G
GDP	guanosín difosfato
GTP	guanosín trifosfato
IB-MECA	N ⁶ -(3-iodobencil)adenosina-5'-N- metiluronamida
ICRAC	corriente de calcio activada por liberación de calcio
IMP	inosín monofosfato
INT.	intracelular
IP ₃	inositol-1,4,5-trisfosfato.
K ⁺	potasio
μ M	micromolar
mM	milimolar
nM	nanomolar
P ₁	receptor purinérgico tipo 1
P ₂	receptor purinérgico tipo 2

PCR	reacción en cadena de polimerasa
PIP ₂	fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato
PKA	proteína cinasa dependiente de AMPc
PKC	proteína cinasa dependiente de calcio.
PLC	fosfolipasa C
PLC β	isoenzima β de la fosfolipasa C
proteína G	proteína de unión de nucleótidos de guanina
RE	retículo endoplásmico
REC ó R	receptor
RNAm	ácido ribonucleico mensajero

I INTRODUCCIÓN

I.1. GLUCONEOGENESIS.

En los mamíferos existe un equilibrio de glucosa sanguínea que permite muy pocas variaciones. Uno de los mecanismos para mantener la glucemia es la síntesis "de novo" de glucosa a partir de precursores no azúcares, proceso conocido como gluconeogénesis. La gluconeogénesis se lleva a cabo, principalmente, en el hígado y en la corteza renal. La gluconeogénesis y la síntesis de urea representan las vías biosintéticas principales del hígado durante el ayuno [1]. Algunos de los substratos gluconeogénicos son: lactato, piruvato, glicerol y alanina, siendo el lactato uno de los más importantes.

En la regulación de la gluconeogénesis cabe destacar el papel de la fructosa-2,6-bisfosfato, una molécula señal. Al aumentar los niveles de fructosa-2,6-bisfosfato se inhibe la gluconeogénesis, debido a que actúa sobre la fructosa-1,6-bisfosfatasa. La fructosa-2,6-bisfosfato se forma por fosforilación de la fructosa-6-fosfato, en una reacción catalizada por la fosfofructocinasa-2. También la fructosa-2,6-bisfosfato es hidrolizada a fructosa-6-fosfato por la fructosa-2,6-bisfosfatasa. Tanto la fosfofructocinasa-2 como la fructosa-2,6-bisfosfatasa se encuentran en la misma cadena peptídica 55 kd (Fig. 1). Esta enzima bifuncional contiene un dominio regulador en la región amino terminal, seguido por un dominio quinasa y un dominio fosfatasa [3].

ENZIMA BIFUNCIONAL

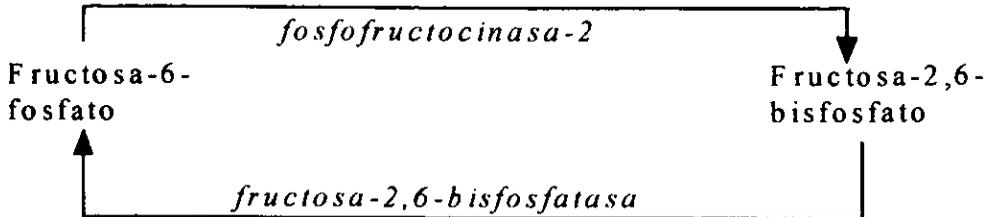


Figura 1. Síntesis y Degradación de la Fructosa-2,6-bisfosfato. La fructosa-2,6-bisfosfato se sintetiza y se degrada por una enzima bifuncional. La fosfofructocinasa-2 cataliza su síntesis a partir de la fructosa-6-fosfato y la fructosa-2,6-bisfosfatasa cataliza su hidrólisis hacia fructosa-6-fosfato.

Esta enzima bifuncional puede ser regulada tanto por el AMP-cíclico (AMPc) como por el calcio. Un aumento en la concentración del AMPc activa la subunidad catalítica (C) de la proteína cinasa dependiente de AMPc (PKA). La PKA fosforila a las enzimas fosfofructocinasa-2 y fructosa-2,6-difosfatasa; de este modo, se inhibe la síntesis de fructosa-2,6-difosfato y se activa su degradación (Fig. 2). La PKA también fosforila a la piruvato cinasa, inactivándola, esto disminuye el ciclo fútil piruvato/fosfoenolpiruvato, con lo que se reconduce al fosfoenolpiruvato hacia la síntesis de glucosa (Fig. 2). La adrenalina promueve la gluconeogénesis por estimulación de los receptores α -1 adrenérgicos, incrementando el calcio citosólico, y disminuyendo la concentración de la fructosa-2,6-difosfato. El aumento de calcio activa a una proteína cinasa dependiente de calcio (PKC), que fosforila a la fosfofructocinasa-2 (Fig. 2) [2].

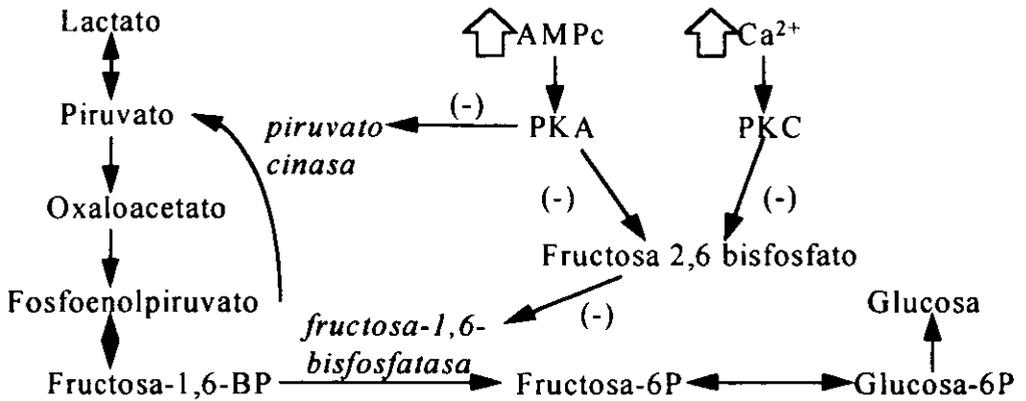


Figura 2. Regulación de la Gluconeogénesis por el AMPc y el Calcio. Un aumento de AMPc citosólico o de calcio, activan a una proteína cinasa dependiente de AMPc (PKA) o a una proteína cinasa dependiente de calcio (PKC), respectivamente. Tanto la PKA como la PKC inhiben (-) la síntesis de la fructosa-2,6-bisfosfato, la cual a su vez inhibe (-) a la fructosa-1,6-bisfosfatasa. Además, la PKA también inhibe (-) a la piruvato cinasa, disminuyendo el ciclo fútil de piruvato/fosfoenolpiruvato. Tanto el calcio como el AMPc van a promover la gluconeogénesis.

1.2. GLUCOGENOLISIS.

Otra forma de obtener glucosa libre es por la degradación del glucógeno. En la glucogenólisis primero actúa la enzima glucógeno fosforilasa, la cual acorta las cadenas del glucógeno eliminando los restos glucosilos terminales que aparecen en forma de glucosa-1-fosfato. Posteriormente la enzima desramificante cataliza dos reacciones sucesivas: la primera es una glucosiltransferasa y la segunda (amilo-1.6-

glucosidasa) es la hidrólisis del residuo que permanecía unido por enlace α 1-6 para dar glucosa libre. Tanto la síntesis como la degradación del glucógeno se regulan por efectores alostéricos (AMP, ATP, glucosa-6-fosfato, entre otros) y por modificación covalente a través de fosforilación y desfosforilación [3].

La glucógeno fosforilasa es un dímero con un sitio activo para unirse al glucógeno, otro para la glucosa, un sitio de unión al AMP y un sitio inhibidor. Cada uno de los monómeros puede ser fosforilado en la serina-14. La fosforilación de este sitio convierte la forma *b* o inactiva, en la forma *a* o activa. La enzima que fosforila a la glucógeno fosforilasa es la fosforilasa cinasa, formada por 3 subunidades: α , β y δ . La subunidad δ es la calmodulina, proteína que también existe separadamente, que juega un papel regulador. La calmodulina liga cuatro iones calcio por monómero; cuando las subunidades de calmodulina de la fosforilasa cinasa están activadas, la molécula entera cambia a la conformación activa y es capaz de fosforilar a la glucógeno fosforilasa. De esta manera el incremento en la concentración de calcio provoca la degradación del glucógeno. Por medio de la adrenalina, el complejo adrenalina-receptor convierte al fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato a inositol-1,4,5-trisfosfato (IP₃) y diacilglicerol [3]. El IP₃ es capaz de liberar calcio del retículo endoplásmico e incrementar su concentración en el citosol. Al final se obtiene una activación de la fosforilasa cinasa por medio de la calmodulina (Fig. 3) [3].

La glucogenólisis hepática responde también a los incrementos en los niveles de AMPc. El AMPc activa a las subunidades C de la PKA, enzima capaz de fosforilar las subunidades α y β de la fosforilasa cinasa y de esta manera activarla y promover la glucogenólisis (Fig. 3) [3].

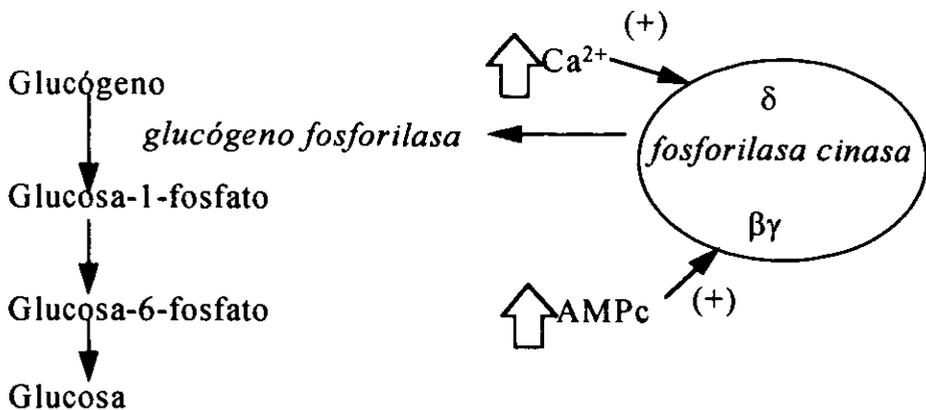


Figura 3. Regulación de la Glucogenólisis por AMPc y Calcio. Un aumento de AMPc intracelular fosforila a las subunidades $\beta\gamma$ de la fosforilasa cinasa y de este modo se activa la glucógeno fosforilasa y se promueve la glucogenólisis. La subunidad δ (calmodulina) de la fosforilasa cinasa liga cuatro iones Ca^{2+} , activándose y promoviendo la glucogenólisis. Los símbolos (+) indican activación.

1.3. ADENILIL CICLASAS.

La adenilil ciclasa es una enzima que transforma al ATP en AMPc. Se han identificado ocho tipos de adenilil ciclasas transmembranales en mamíferos (I - VIII). En hígado de mamífero se encuentran los tipos IV, V, VI y VII [4]. Los diversos tipos de adenilil ciclasas pueden ser regulados de diferentes maneras, dando como resultado una gran complejidad en la regulación de las vías de transducción de señales. Las adenilil ciclasas se clasifican en tres grupos en base a sus vías de regulación. El grupo 1 formado por los tipos I, III y VIII; el grupo 2 formado por los

tipos II, IV y VII; y el grupo 3 formado por los tipos V y VI [4]. Los tres grupos de adenilil ciclasas son activados por la subunidad α de las proteínas G_s .

El grupo 1 es activado por la subunidad α de la proteína G_s y por un aumento en la concentración de calcio intracelular. El calcio intracelular aumenta a expensas de calcio extracelular (canales) o a expensas de depósitos intracelulares. Este grupo es inhibido por la subunidad α de las proteínas $G_{i/o}$. La adenilil ciclasa tipo I se inhibe también por las subunidades $\beta\gamma$ de las proteínas $G_{i/o}$ (Fig. 4) [4].

El grupo 2 tiene en común que las subunidades α de las proteínas G_i activan a la enzima sólo en presencia de la subunidad α de las G_s y solo la adenilil ciclasa tipo II puede ser activada por medio de la PKC. No se conoce un mecanismo inhibitorio para este grupo (Fig. 5) [4].

Las adenilil ciclasas del grupo 3 son activadas por ciertas isoformas de la PKC, inhibidas por la subunidad α de las proteínas G_i , por la PKA (retroalimentación negativa) y por bajas concentraciones de calcio intracelular (0.1 - 1 μ M) proveniente del medio extracelular y no de almacenes intracelulares (Fig. 6) [4].

De esta manera se puede integrar una regulación interna de diversas vías de transducción de señales: AMPc, calcio-calmodulina y PKC.

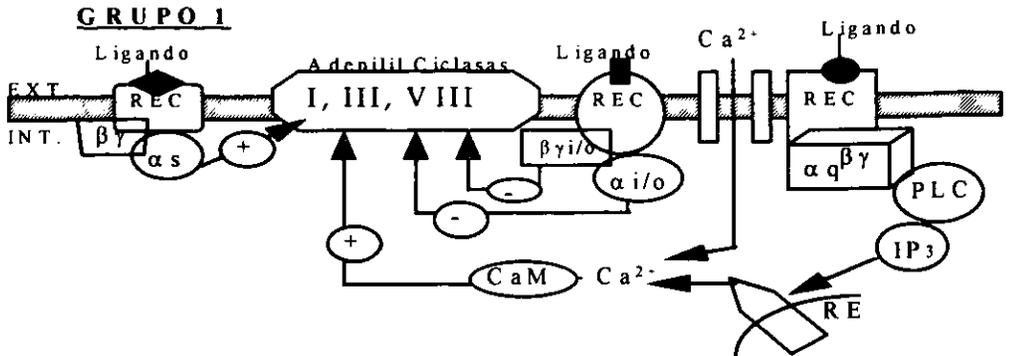


Figura 4. Regulación del Grupo 1 de Adenilil Ciclasas. El grupo 1 está compuesto por las adenilil ciclasas I,III y VIII. Este grupo es activado (+) por la subunidad α de las proteínas G_s (α_s) y por calcio-calmodulina (CaM-Ca²⁺). El incremento de calcio citosólico puede provenir de calcio extracelular (a través de un canal) ó por activación de una proteína G_q ($\alpha_q\beta\gamma$) por interacción ligando-receptor (REC). La proteína G_q activa a la fosfolipasa C (PLC) la cual da inositol-1,4,5-trisfosfato (IP₃). El IP₃ libera calcio del retículo endoplásmico (RE). El grupo 1 es inhibido (-) por las subunidades $\beta\gamma$ ($\beta\gamma_i/o$) y por la subunidad α (α_i/o) de las proteínas G_{i/o}.

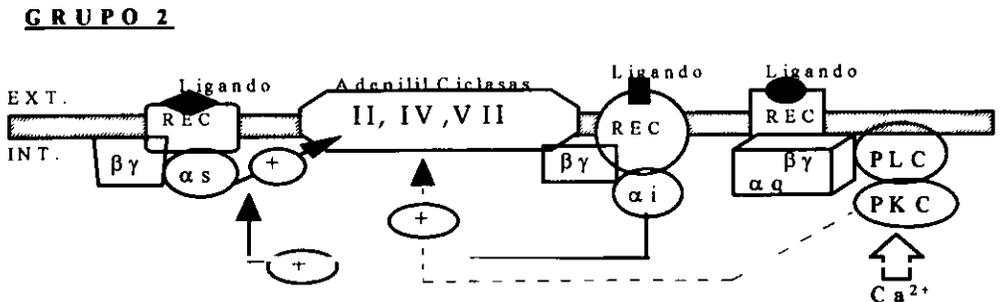


Figura 5. Regulación del Grupo 2 de las Adenilil Ciclasas. El grupo 2 está compuesto por las adenilil ciclasas tipo II, IV y VII. Este grupo es activado (+) por la subunidad α (α_s) de las proteínas G_s. La subunidad α (α_i) de las proteínas G_i es capaz de potenciar el efecto de las subunidades α de las proteínas G_s. Este grupo también es activado por la proteína cinasa C (PKC), dependiente de calcio. La PKC puede ser activada por una proteína G_q ($\alpha_q\beta\gamma$). No se conoce un mecanismo inhibitorio para este grupo. La abreviatura (REC) significa receptor.

GRUPO 3

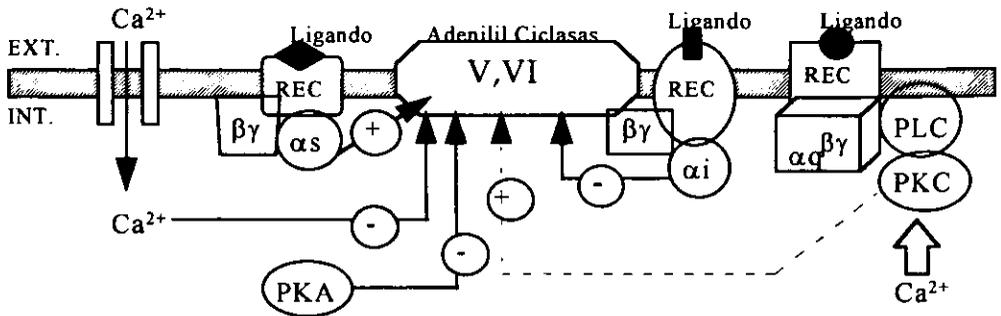


Figura 6. Regulación del Grupo 3 de las Adenilil Ciclasas. El grupo 3 está compuesto por las adenilil ciclasas del tipo V y VI. Este grupo es activado (+) por la subunidad α (α_s) de las proteínas G_s y por la proteína cinasa C (PKC), dependiente de calcio (Ca^{2+}). La PKC puede ser activada por las subunidades de una proteína G_q ($\alpha_q\beta\gamma$), las cuales activan a la fosfolipasa C (PLC). Este grupo es inhibido por las subunidades α de las proteínas G_i (α_i), por la proteína cinasa dependiente de AMPc (PKA) y por un aumento en el calcio citosólico proveniente del medio extracelular. La abreviatura (REC) significa receptor.

1.4. LA ADENOSINA Y SUS RECEPTORES.

La adenosina es un nucleósido de purina que es intermediario en la vía de la degradación de las purinas. La adenosina es transportada hacia las células por medio de difusión facilitada, pero también es formada en las células a partir del 5'-AMP o de la degradación de la S-adenosilhomocisteína. El 5'-AMP intracelular es degradado hacia adenosina por una 5'-nucleotidasa específica [5, 19]. La adenosina es degradada hacia inosina por la adenosín deaminasa y hacia AMP por la adenosín cinasa (Fig. 6) [5, 19].

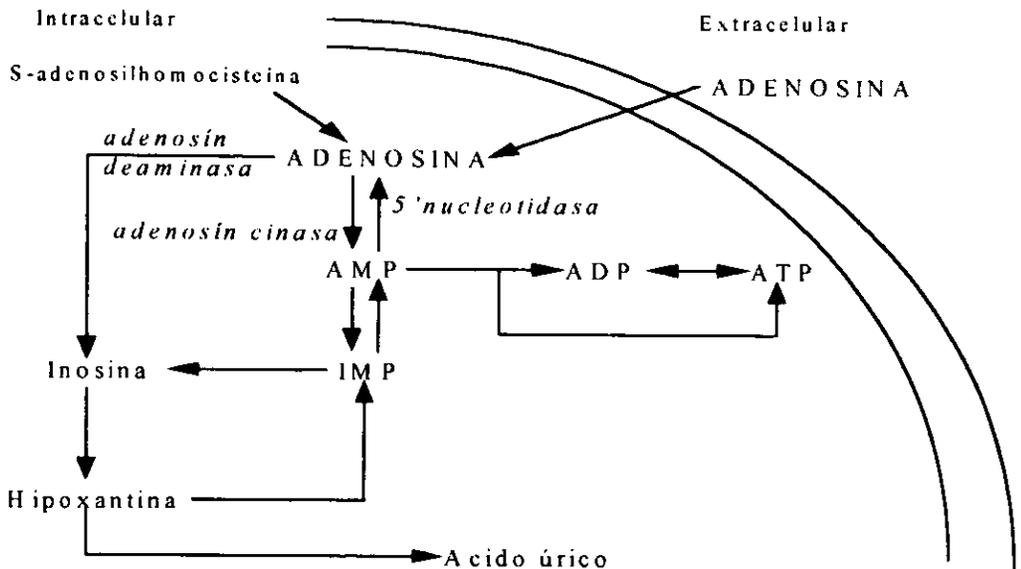


Figura 7. Metabolismo de la Adenosina. La adenosina puede ser transportada al interior de las células por medio de difusión facilitada. La adenosina en el citosol es sintetizada a partir de AMP por medio de una 5'-nucleotidasa específica. La adenosina es degradada hacia inosina por medio de la adenosin deaminasa y hacia AMP por medio de la adenosin cinasa.

Entre las propiedades biológicas de la adenosina se encuentra su toxicidad en las células de mamíferos y bacterias [5]. En sistema nervioso central produce disminución en la liberación de neurotransmisores, sedación, disminución en la actividad locomotora, hiperalgesia y actúa como anticonvulsivante. En el sistema cardiovascular produce vasodilatación, vasoconstricción, bradicardia, un efecto inotrópico negativo e inhibición de la agregación plaquetaria. En riñón produce disminución en el filtrado glomerular, funciona como antiurético e inhibe la liberación de renina. En el sistema respiratorio produce broncoconstricción, broncodilatación, secreción de moco y depresión respiratoria. En el sistema

gastrointestinal produce inhibición de la secreción de ácido gástrico [6]. Las acciones opuestas de la adenosina en un mismo sistema se deben a la activación de diferentes receptores de membrana para la misma [6].

Actualmente hay evidencia de la existencia de un gran número de células que contienen receptores de membrana donde la adenosina actúa para modificar las funciones celulares [7]. Estos receptores son llamados, en general, purinoceptores, los cuales están subdivididos. En un principio fueron clasificados como receptores P₁ y P₂, siendo los primeros más sensibles a la adenosina y al AMP y los responsables de la modulación de la actividad de la adenilil ciclasa, mientras que los P₂ son más sensibles al ATP y al ADP [19]. Actualmente los receptores P₁, específicos para la adenosina, se subdividen en cuatro subtipos: A₁, A_{2a}, A_{2b} y A₃ [8]; recientemente se propone la existencia de un quinto tipo de receptor denominado A₄ [38,39], el cual no ha sido clonado.

Tradicionalmente, los receptores para la adenosina han sido clasificados en subtipos, basándose principalmente en sus características de unión del ligando y las respuestas bioquímicas obtenidas por su activación. El primer parámetro incluye las afinidades relativas de una serie de agonistas como también la sensibilidad a antagonistas. La clonación de los receptores de adenosina se inició en 1989 con el aislamiento de los cDNAs del "receptor huérfano", denominados RDC7 y RDC8, por Libert y cols. [9]. Posteriormente se confirmó que el RDC7 y el RDC8 codificaban al receptor A₁ [10] y a el receptor A₂ [11], respectivamente. Los receptores de adenosina pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G y se

caracterizan por siete dominios transmembranales de aproximadamente 22 a 25 aminoácidos hidrofóbicos (Fig. 8) [12]. Se considera que el lado intracelular de estos receptores,

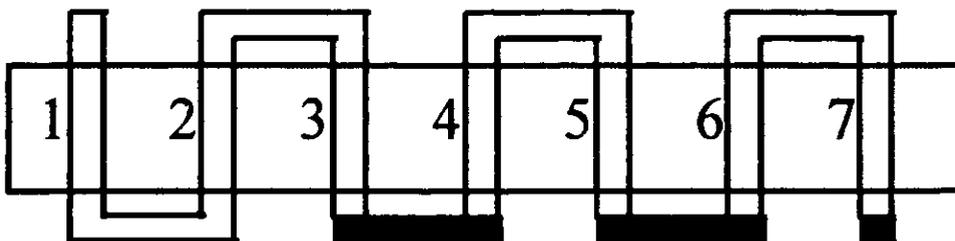


Figura 8. Modelo Esquemático de un Receptor de 7 Dominios Transmembranales. El área sombreada intracelular representa a las asas intracelulares 3-4 y 5-6, junto con la porción carboxilo terminal. En estas regiones se presupone que interacciona la proteína G acopladora.

particularmente las regiones de las asas intracelulares 3-4 y 5-6; y la porción carboxilo terminal, interacciona con la proteína G acopladora (Fig. 8) [13].

1.5. PROTEINAS G.

1.5.1. Estructura y función.

Las proteínas de unión de nucleótidos de guanina o proteínas G son heterotrímeros compuestos por las subunidades α , β y γ . Las proteínas G se clasifican en base de su subunidad α [14]. Hasta la fecha, se conocen 23 subunidades α codificadas por 17 genes diferentes y pueden ser subdivididas en cuatro familias, basándose en el grado de homología de la secuencia primaria: $G_{\alpha s}$,

$G_{\alpha i}$, $G_{\alpha q}$ y $G_{\alpha 12}$ [15]. Las concentraciones celulares de proteínas G que pertenecen a la familia $G_{i/o}$ exceden considerablemente a aquellas de las otras familias [14]. La subunidad α consiste en dos dominios: un dominio con actividad de GTPasa y un dominio de α -hélice, que es común a todas las subunidades α . Las proteínas G se encuentran normalmente en reposo unidas a GDP. Cuando ocurre la unión del agonista al receptor, y activación del mismo, el GDP se intercambia por GTP citosólico y la proteína G se disocia en dos componentes: la subunidad α unida al GTP y las subunidades $\beta\gamma$. Eventualmente, la subunidad α se inactiva a sí misma (actividad de GTPasa) y, ya unida a GDP, se vuelve a reconstituir la proteína G con sus tres subunidades α , β y γ (Fig. 9) [14].

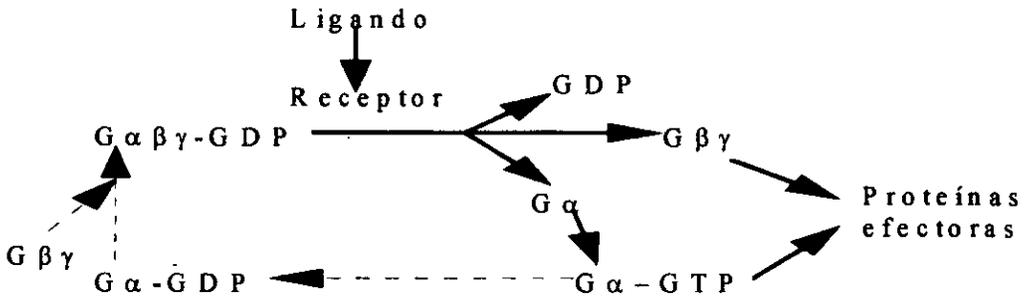


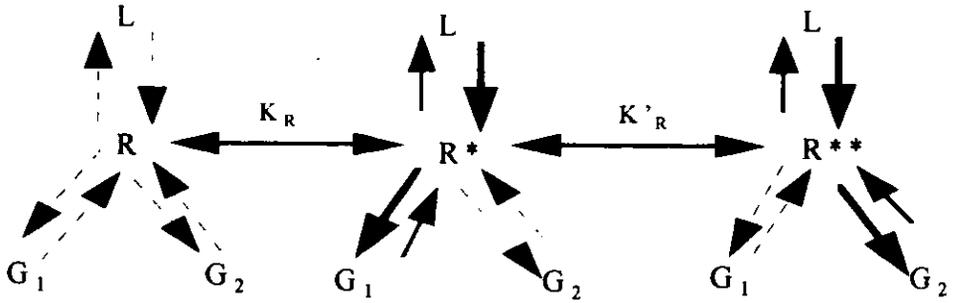
Figura 9. Modelo Esquemático de la Activación y Desactivación de las Proteínas G. La proteínas G se encuentran normalmente en reposo unidas a GDP ($G_{\alpha\beta\gamma}-GDP$). Cuando ocurre activación del receptor por unión del ligando existe una salida del GDP y se separan las subunidades en $\beta\gamma$ ($G_{\beta\gamma}$) y en subunidad α (G_{α}). La subunidad α intercambia el GDP por GTP. Entonces la subunidad α unida a GTP ($G_{\alpha}-GTP$) junto con las subunidades $\beta\gamma$ son capaces de activar a las proteínas efectoras. Posteriormente por la actividad de GTPasa de la subunidad α se hidroliza al GTP y vuelve a quedar unida la subunidad α al GDP ($G_{\alpha}-GDP$) y en este momento se unen las subunidades $\beta\gamma$ ($G_{\beta\gamma}$) para volver a reconstruir el trímero unido a GDP.

Se han descrito cinco subunidades β y diez subunidades γ [16]. Las subunidades β y γ se encuentran asociadas fuertemente y se les puede manejar como una sola unidad funcional. Tanto las subunidades α unidas a GTP como los dímeros $\beta\gamma$ son moléculas activas por sí mismas y modulan la actividad de proteínas efectoras específicas [17,18].

1.5.2. Conformación del Receptor y Transmisión de la Señal.

Recientemente se ha propuesto la existencia de múltiples estados de activación de los receptores acoplados a proteínas G [20]. Los estados de activación permiten explicar el hecho de que un solo receptor activado puede “escoger” entre múltiples vías de transducción por las proteínas G. Diferentes estados de activación de un receptor difieren en su habilidad para unirse a una proteína G específica, influido por la unión de un sólo ligando (Fig 10). Si se postulan diferentes conformaciones del receptor que de manera preferencial se acoplan a distintas proteínas G, es legítimo extender el modelo mencionado y proponer la hipótesis de que diferentes agonistas pudieran estabilizar la formación de complejos ternarios (ligando-receptor-proteína G) con diferente eficacia (Fig. 10). El acoplamiento de proteínas G con los receptores de 7 dominios transmembranales puede ser regulado a nivel del receptor, por modificaciones del propio ligando (Fig. 10) [14].

(A)



(B)

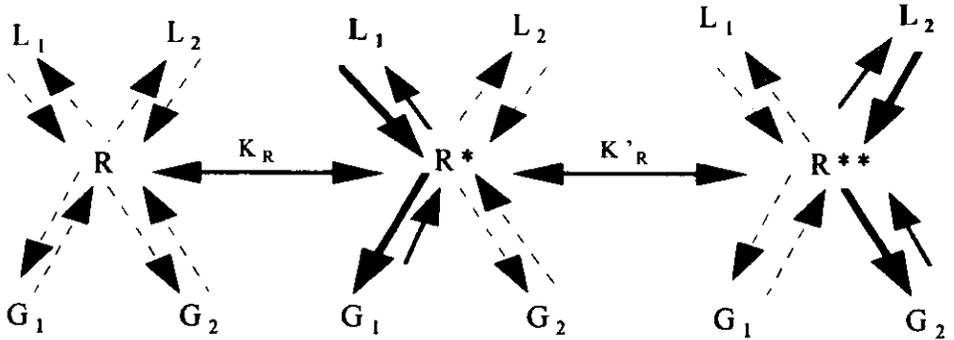


Figura 10. Modelo Hipotético de Diferentes Estados Conformationales de un Receptor. Se propone que un receptor acoplado a proteínas G puede tener un sólo estado inactivo (R) y dos diferentes estados conformationales activos (R^* y R^{**}). Una conformation dada va a determinar si el receptor se acopla preferencialmente a una u otra proteína G (G_1 vs. G_2). El receptor puede interactuar con (A) un ligando (L) o con (B) dos ligandos (L_1 y L_2) diferentes. En el último caso cada uno de los dos ligando va a estabilizar al receptor en un estado conformational. Todas las conformaciones posibles de un receptor van a existir simultáneamente en equilibrio. Este equilibrio va a estar controlado por una constante, K_R para la transición entre R y R^* y K'_R para la transición entre R^* y R^{**} . Se desconoce si exista una transición directa del estado inactivo, R, al estado R^{**} o si solo R^{**} se puede lograr a través de R^* .

1.5.3. Vías de Transducción Divergentes.

La activación de una sola proteína G puede dar una bifurcación en la señal: después de la activación del receptor, la subunidad α manda una señal a los efectores, pero el dímero $\beta\gamma$ también propaga parte de la información [17]. Se han descrito diversos receptores que son capaces de inhibir la adenilil ciclasa y simultáneamente estimular a la fosfolipasa C (muscarínicos, serotonina, dopamina, adrenalina, etc.). En este tipo de acoplamiento dual, la inhibición de la adenilil ciclasa ocurre a bajas concentraciones del agonista y es independiente del número de receptores. En contraste, la activación de la fosfolipasa C requiere de concentraciones considerablemente mayores del agonista (de 20 a 50 veces) y está correlacionada directamente con la abundancia del receptor [14]. Ambas vías de transducción son sensibles a la toxina pertussis y por medio de anticuerpos se identificaron las subunidades $G_{\alpha i}$. Ambos efectores, la adenilil ciclasa y la fosfolipasa C, se ven activados por una sola proteína G que pertenece a la familia G_i . Las subunidades α de la proteína G_i son las responsables de inhibir la actividad de la adenilil ciclasa y las subunidades $\beta\gamma$ de activar a la PLC [14]. Un aspecto característico para la señalización *via* $G\beta\gamma$, en contraste a las subunidades α , es el hecho que se necesita una mayor concentración del dímero $\beta\gamma$ [21].

El potencial para respuestas celulares divergentes a un receptor estimulado puede depender de la diferente expresión de los elementos de transducción de señales (proteínas G, efectores y proteínas moduladoras) en un tipo celular. Esto da como resultado la necesidad de considerar críticamente, y con precaución, si las

respuestas obtenidas en las células transfectadas proveen información útil que pueda extrapolarse a una célula intacta.

Diversos receptores acoplados a proteínas G_s estimulan a la fosfolipasa C. Entre estos receptores se encuentran los de la hormona estimulante del tiroides (TSH), la hormona luteinizante (LH-CG), la hormona folículo estimulante (FSH), la calcitonina, el glucagon, la secretina, el receptor D_1 para dopamina y un receptor β adrenérgico de pavo [14]. La activación de la fosfolipasa C por los receptores acoplados a la proteína G_s requiere un mayor número de receptores y una mayor concentración del agonista. La activación de la adenilil ciclasa y de la fosfolipasa C por los receptores acoplados a G_s ha sido interpretada como la unión de dos proteínas G diferentes (G_s y G_q). También como la generación de $G_{\alpha s}$ unido a GTP y de dímeros $\beta\gamma$ derivados de G_s [22].

1.5.4. Selectividad de un Receptor con una Proteína G.

Muchos receptores son capaces de activar diferentes proteínas G tanto *in situ* como en sistemas reconstituidos, dando como resultado bifurcaciones en las vías de transducción. Un mecanismo para impartir selectividad en el proceso de transducción puede ser la compartimentalización de los componentes del mismo [22]. La selectividad de interacción entre un receptor y una proteína G puede originarse de diferentes afinidades o eficacias de los componentes de transducción.

Una célula está provista de un cierto número de receptores, de efectores y de subunidades α , β y γ de proteínas G. La expresión de diferentes subunidades de proteínas G puede resultar en un gran número de heterotrímeros $\alpha\beta\gamma$ diferentes, si es que todas las subunidades se asocian al azar. Todavía no se sabe si ciertas subunidades α se combinan preferencialmente con ciertos complejos $\beta\gamma$. Existe evidencia de que no todas las combinaciones posibles de $\beta\gamma$ se formen en realidad [23, 24]. Se ha observado que, en general, las subunidades β determinan la unión con el receptor y las subunidades γ determinan la interacción con el efector [25-27].

Los receptores acoplados a proteínas G han evolucionado de entidades estáticas hacia moléculas muy dinámicas capaces de converger señales por un cambio conformacional. Muchos de los receptores acoplados a proteínas G no sólo se transducen por activación de una sola proteína G para generar una señal intracelular, sino lo más frecuente es que diferentes proteínas G son activadas por un sólo receptor. [14]. Las señales de transducción mediadas por proteínas G pueden ser observadas como una red de señales muy organizada, permitiendo la intercomunicación ("cross-talk") entre ellas [28].

II ANTECEDENTES

II.1. ADENOSINA Y EL AMP-CICLICO.

Existe controversia sobre las acciones de la adenosina en el metabolismo hepático y, principalmente, sobre su mecanismo de acción. Se ha observado que en los hepatocitos aislados de rata, concentraciones micromolares de adenosina estimulan la síntesis de urea [29], la glucogenólisis [30] y la gluconeogénesis [31].

Se han propuesto como segundos mensajeros tanto al AMPc como al calcio en la modulación por adenosina de las respuestas de los hepatocitos. Sin embargo, la información acerca de los cambios del AMPc en los hepatocitos de rata incubados con adenosina es contradictoria: Fain y Shepherd [32] reportaron que concentraciones micromolares de adenosina y de 2'5' dideoxiadenosina no aumentaban el valor basal del AMPc. En contraste, Marchand y cols. [33] y Bartons y cols. [34] encontraron que la síntesis de AMPc era estimulada por concentraciones milimolares de adenosina o por la 2-cloroadenosina.

Carabaza y cols. [35] observaron que el AMPc se incrementaba por la adenosina sólo en hepatocitos de ratas alimentadas, pero no así en animales en ayuno. Sin embargo, en otros estudios se muestra que en hepatocitos de ratas ayunadas, la adenosina aumenta la síntesis de urea [29] y la gluconeogénesis a partir de lactato [31]. Además, hepatocitos aislados incubados con adenosina (1 μ M) no aumentaron las concentraciones basales de AMPc [32,36] en contraste con la estimulación de la ureagénesis, glucogenólisis y gluconeogénesis [29-31].

II.2. ADENOSINA Y EL CALCIO.

Existe evidencia que involucra al calcio como posible mediador de la respuesta del hepatocito a la adenosina. Carabaza y cols. [35] proponen que la adenosina moviliza calcio en la activación de la glucógeno fosforilasa. En el trabajo de Díaz y cols. [36] se observa que la síntesis de urea, estimulada por la adenosina, se ve suprimida cuando los hepatocitos son incubados en ausencia de calcio. En este mismo trabajo se sugiere que la adenosina aumenta el calcio citosólico sólo si el calcio externo está disponible. Esta evidencia es apoyada por el reporte de Guinzberg y cols. [37], en donde se sugiere que la adenosina estimula la entrada de calcio en los hepatocitos, probablemente, a través de canales de calcio operados por receptor, los cuales son cerrados por la despolarización de la membrana plasmática.

II.3. VIAS DE TRANSDUCCION DE LOS RECEPTORES A ADENOSINA.

La adenosina ejerce sus acciones a través de receptores de membrana específicos, designados A_1 , A_{2a} , A_{2b} y A_3 ; recientemente se propuso la existencia de un quinto tipo de receptor denominado A_4 [38,39], el cual no ha sido clonado. Por medio de experimentos de PCR con transcriptasa reversa se detectaron, en hígado de rata, niveles muy bajos de RNAm, muy similares para los cuatro subtipos de receptor a adenosina [40].

El receptor A_1 es una proteína de 328 aminoácidos y de 36,700 Daltones. Se encuentra abundantemente expresado en cerebro (principalmente en la corteza,

cerebelo, tálamo e hipocampo), médula espinal, adipocitos, testículo, corazón y riñón [55]. Estos receptores se encuentran acoplados preferencialmente a proteínas G_i , y se han asociado clásicamente con la inhibición de la actividad de la adenilil ciclasa [41,42]. La activación de la fosfolipasa C (PLC) mediada por receptores A_1 y la subsecuente elevación de IP_3 y de los niveles de calcio intracelular es contradictoria. Algunos autores mencionan que en células o tejidos intactos los agonistas A_1 no tienen efecto sobre la actividad de la PLC [43], otros que activan la PLC [44,45], mientras que otros más mencionan que aumentan [46,47] o disminuyen [48,49] la actividad de la PLC. Se ha reportado la estimulación directa de la PLC por agonistas A_1 en células de los túbulos colectores renales de conejo [44]. La activación de la PLC fue abolida por la toxina pertussis y se demostró que era independiente de los cambios en los niveles de AMPc [44]. Se han publicado resultados divergentes en lo que se refiere a la activación de PLC en células de mamíferos, transfectadas con el receptor A_1 humano [50] y canino [51]. La activación del receptor A_1 humano por agonistas produjo un aumento moderado de calcio intracelular, el cual aparentemente dependía de depósitos intracelulares (fase inicial) y de fuentes extracelulares (fase sostenida) (Fig. 11) [50]. En tejidos cardíacos la activación de este receptor involucra la activación de canales de potasio [52] y en sistema nervioso la modulación de canales de calcio (Fig. 11) [53]. En un estudio con hepatocitos de rata [54] se sugiere que la estimulación de este receptor es capaz de activar a la fosfodiesterasa y de esta manera disminuir los niveles de AMPc, se observó que bloquea el efecto inhibitorio que tiene el glucagon sobre la fosfodiesterasa, acción

que es sensible a la toxina pertussis. Por lo anterior se puede suponer que el receptor A_1 acoplado a una proteína G_i es capaz (por medio de su subunidad α) de inhibir la actividad de la adenilil ciclasa, mientras que el dímero $\beta\gamma$ activa a la $PLC\beta$ y, probablemente, a la fosfodiesterasa (Fig. 11).

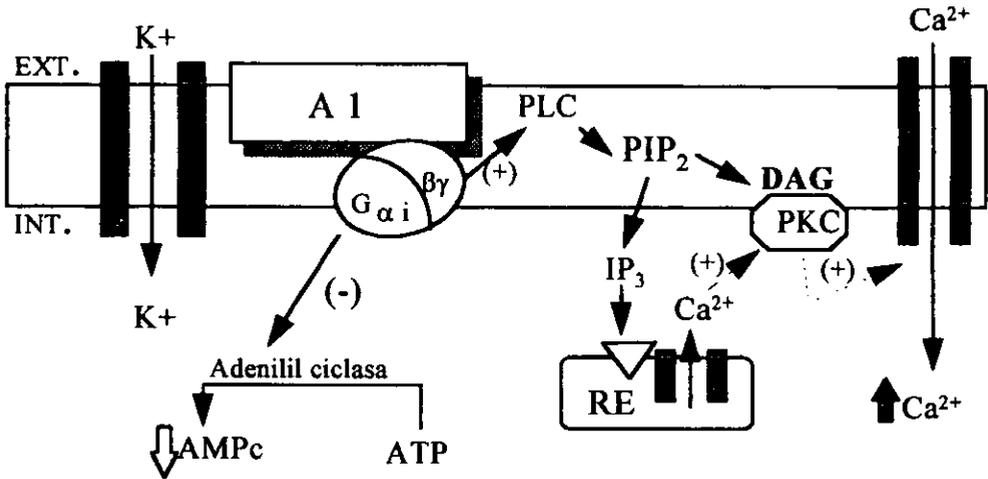


Figura 11. Modelo Esquemático de las Vías de Transducción del Receptor A_1 . El receptor A_1 por medio de la subunidad α de la G_i inhibe la adenilil ciclasa, disminuyendo los niveles intracelulares de AMPc. Por medio del dímero $\beta\gamma$ de la G_i activa a la PLC que promueve la degradación de PIP_2 a DAG e IP_3 . El IP_3 tiene un receptor-canal en el RE, al unirse a éste se promueve una salida de calcio al espacio intracelular. El DAG junto con un aumento de Ca^{2+} intracelular activan a la PKC. La PKC es capaz de fosforilar, y así activar un canal de calcio. Las abreviaturas utilizadas son: fosfolipasa C (PLC); fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP_2); diacilglicerol (DAG); proteína cinasa dependiente de calcio (PKC); fosfatidilinositol-1,4,5-trisfosfato (IP_3); retículo endoplásmico (RE); inhibición (-), y activación (+).

El receptor A_{2a} es una proteína de 410-412 aminoácidos y de 45,000 Daltones. Se encuentra ampliamente distribuido en cerebro, también se encuentra en humano en corazón, riñón, pulmón, hígado y plaquetas [55]. La activación de este receptor se ha asociado con la activación de la adenilil ciclasa por medio de una G_s (Fig. 12) [41,42]. En miocitos arteriales la activación del receptor por medio de agonistas abre canales entrantes de potasio que son sensibles a la fosforilación de la PKA (Fig. 12) [56].

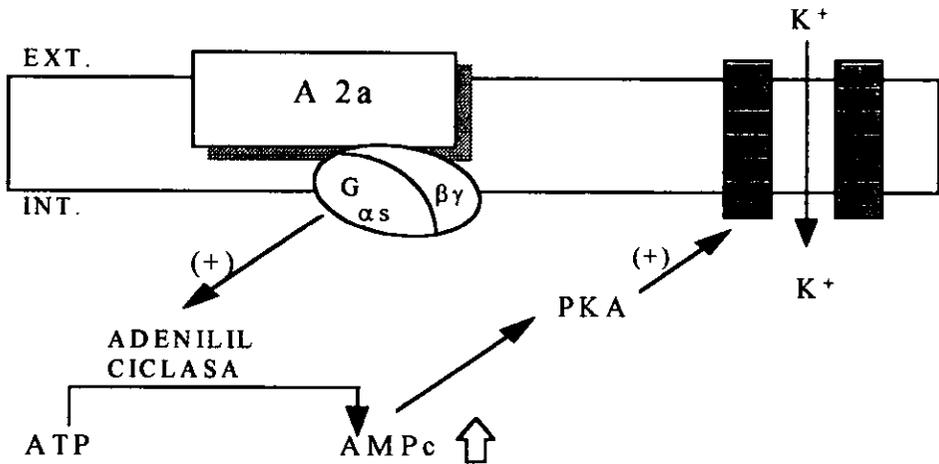


Figura 12. Modelo Esquemático de las Vías de Transducción del Receptor A_{2a} . El receptor A_{2a} por medio de la G_s activa la adenilil ciclasa, aumentando los niveles de AMPc intracelular. Este aumento de AMPc activa a la PKA, la cual fosforila y activa a un canal de potasio sensible a la misma. Las abreviaturas utilizadas son: como agonista A_{2a} el (2-p-carboxietil) fenilamina-5'-N-carboxamidoadenosina (CGS21680), proteína cinasa dependiente de AMPc (PKA), y activación (+).

La discriminación de dos subclases diferentes de los receptores A_2 se ha propuesto basándose en las diferencias observadas para la unión de los agonistas (A_{2a} alta afinidad y A_{2b} baja afinidad) y las variaciones en la distribución anatómica (A_{2a} en el cuerpo estriado; A_{2b} en otras regiones cerebrales) [55]. Ovocitos de *Xenopus*, transfectados con el RNAm del A_{2b} , respondieron a la adenosina o NECA con la producción de una corriente entrante, típica de aquellos receptores acoplados a la activación de la PLC (Fig. 13) [57]. Sin embargo, evidencias de activación de la PLC por este subtipo de receptor están limitadas a este sistema experimental. En estos mismos ovocitos transfectados se ha propuesto que el A_{2b} puede activar canales de calcio (Fig. 13) [55].

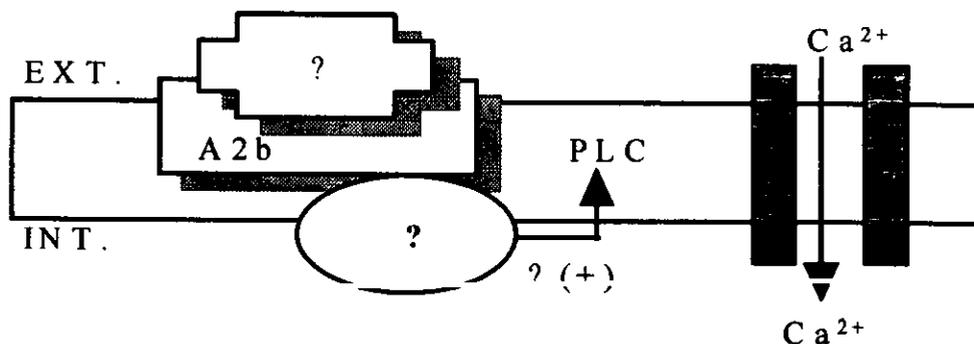


Figura 13. Modelo Esquemático de las Vías de Transducción de los Receptores A_{2b} . No se conoce un agonista específico para este subtipo de receptor ni a que tipo de proteína G se encuentra acoplado. Lo único que se sabe es que es capaz de activar a la PLC y se encuentra asociado a un canal de calcio. Las abreviaturas utilizadas son: fosfolipasa C (PLC); activación (+); y cuando no se sabe el mecanismo (?).

El receptor A_3 es una proteína de 320 aminoácidos que comparte una homología en la secuencia primaria con el A_1 del 47% y con el A_{2a} del 42%. La estimulación de este receptor da como resultado una inhibición en la actividad de la adenilil ciclasa estimulada por forskolina y este efecto es sensible a la toxina pertussis (Fig. 14) [58]. Existen diferencias importantes entre especies en cuanto a la distribución tisular del receptor. En rata el lugar más abundante es el testículo [55]. En ovocitos de hamster chino (CHO) transfectados, se demostró que la activación del receptor inhibe la actividad de la adenilil ciclasa con un máximo de inhibición del 40-50% [58-60]. También en células CHO transfectadas se ha observado que el A_3 es capaz de acoplarse a dos tipos diferentes de proteínas G: G_i y G_q (Fig. 14) [61,62]. Por medio de la subunidad α de la G_i inhibe la actividad de la adenilil ciclasa, por el dímero $G_{i\beta\gamma}$ activa de forma moderada a la PLC, ambos efectos son sensibles a toxina pertussis (Fig. 14). Por medio de la $G_{q\alpha}$ el receptor A_3 activa a la PLC (Fig. 14). En células cebadas se ha observado que la activación de este receptor activa canales de potasio (Fig. 14) [55]. Sin embargo, la información disponible acerca de estas acciones tan sólo se puede obtener a partir de estos sistemas experimentales, ya que no se han realizado estudios en células o tejidos nativos.

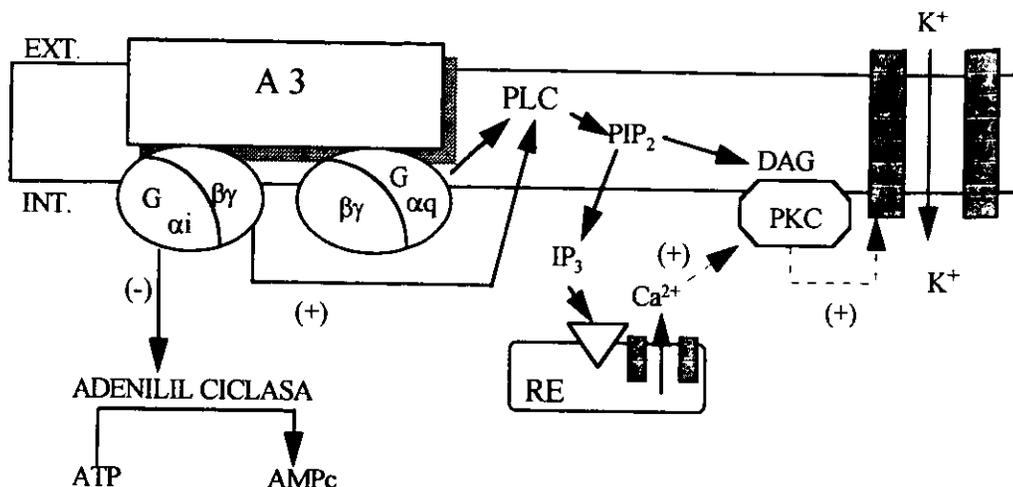


Figura 14. Modelo Esquemático de las Vías de Transducción de los Receptores A3. Este tipo de receptor se puede acoplar a dos tipos diferentes de proteínas G. Por medio de la subunidad α de G_i inhiben a la adenilil ciclasa y disminuye el AMPc intracelular. Por medio del dímero $\beta\gamma$ de G_i junto con la G_q activan la PLC, la cual induce la degradación de PIP₂ en DAG e IP₃. El IP₃ tiene un receptor-canal en el RE, el cual al ser activado promueve la salida de calcio. El DAG junto con un aumento de Ca^{2+} activan a la PKC. La PKC fosforila y activa un canal de potasio sensible a ésta. Las abreviaturas utilizadas son: fosfolipasa C (PLC); fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP₂); diacilglicerol (DAG); proteína cinasa dependiente de calcio (PKC); fosfatidilinositol-1,4,5-trisfosfato (IP₃); retículo endoplásmico (RE); inhibición (-); y activación (+).

Recientemente se ha propuesto la existencia de un quinto tipo de receptor denominado A_4 [38,39]. Con el nuevo agonista, $[^3\text{H}]\text{CV 1808}$, se ha observado que en ciertas áreas del cerebro de rata, cuerpo estriado e hipocampo, este nuevo receptor promueve un aumento en la entrada de potasio (Fig. 15) [38]. Sin embargo, no se tiene más información acerca de su secuencia o a qué tipo de proteína G se encuentra acoplado.

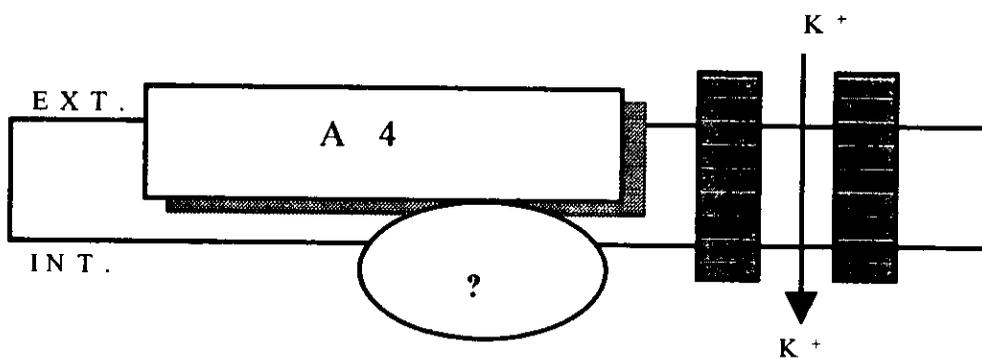


Figura 15. Modelo Esquemático de las Vías de Transducción del Receptor A_4 . Acerca de este nuevo subtipo de receptor no se conoce a que tipo de proteína G se encuentra acoplado. Lo único que se conoce es que se encuentra relacionado con canales entrantes de potasio en cerebro de rata. Las abreviaturas utilizadas son: cuando no se conoce el mecanismo (?).

II.4. CORRIENTE DE CALCIO EN CELULAS NO EXCITABLES.

En células no excitables, como los hepatocitos, el proceso de entrada de calcio y el mecanismo por el cual es activado este proceso se encuentra poco definido. Existe evidencia de que la entrada de calcio está controlada por el contenido de calcio en los almacenes sensibles a IP_3 y a ryanodina [67]: cuando estos almacenes se depletan como resultado de la generación de IP_3 , la entrada de calcio es activada. El mecanismo de comunicación entre los almacenes de calcio y la vía de entrada del ión no está claro. Se ha propuesto que existe una interacción entre la porción citoplásmica del receptor a IP_3 y la membrana plasmática. La señal se transmite a través de una interacción proteína-proteína [68]. Otra propuesta es la existencia de un factor de flujo de calcio, el cual es liberado desde los almacenes y activa los canales de calcio en la membrana plasmática [67,69]. El mensajero propuesto ha sido purificado parcialmente, pero su naturaleza química no ha sido definida [70].

Para distinguir a la corriente capacitativa de calcio de otras corrientes por canales, Hoth y Penner [71] designaron el término de corriente de calcio activada por la liberación de calcio (ICRAC). Esta corriente capacitativa de calcio son canales no acarreadores. El calcio actúa de manera bifásica, a bajas concentraciones de calcio

activa el canal y altas concentraciones de calcio inactiva el canal. La depleción del calcio del retículo endoplásmico activa a el canal, de igual manera el IP₃ activa el canal. La PKC inactiva a el canal. La entrada de calcio por el canal es bifásica, se activa de manera muy rápida, pero después se revierte igual de rápido [72]. En hepatocitos de rata se ha demostrado la presencia de este tipo de corriente de calcio ICRAC [73].

III HIPOTESIS

Las acciones metabólicas de la adenosina sobre la gluconeogénesis y la glucogenólisis involucran la estimulación de un receptor específico para cada una de las vías metabólicas mencionadas.

La adenosina moviliza calcio y genera AMP-cíclico para llevar a cabo dichas acciones.

IV OBJETIVOS

IV.1. OBJETIVO GENERAL:

Precisar el mecanismo de transducción de la adenosina en la regulación del metabolismo hepático.

IV.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS:

1. Explorar si los efectos de la adenosina sobre la gluconeogénesis y la glucogenólisis son a través de receptores de membrana específicos de la adenosina para cada una de las vías metabólicas mencionadas y si es así, investigar a qué subtipos pertenecen.
2. Investigar si los efectos de la adenosina dependen de la presencia de calcio extracelular.
3. Investigar los efectos de la estimulación de los diferentes subtipos de receptores sobre la acumulación de AMP-cíclico y si éstos dependen de la presencia de calcio extracelular.

V MATERIAL Y METODOS

V.1. AISLAMIENTO DE HEPATOCITOS:

Se utilizaron ratas Wistar macho con un peso de 150 a 200 gramos, las cuales fueron anestesiadas con éter. Los hepatocitos fueron aislados utilizando el método de Berry y Friend [74] con pequeñas modificaciones [29]. Brevemente, después de anestesiada la rata se practica una laparotomía. Se hacen a un lado los intestinos junto con epiplón, posteriormente se localiza la vena porta y se marcan en ella dos ligaduras, una distal y otra proximal con respecto al borde hepático. Se ata la ligadura distal y se canula la vena porta entre las dos ligaduras. La vena se canula con solución Ringer-Krebs bicarbonato a 37.5°C y pH de 7.4. Posteriormente se espera a que el hígado se encuentre perfundido en su totalidad y la cánula se liga junto con la vena con la ligadura proximal inicial. Finalmente se separa el hígado y se sacrifica la rata con un corte de los nervios vagos. El hígado unido a la cánula se coloca en el aparato de perfusión manteniendo la temperatura y el pH constantes. La solución Ringer-Krebs bicarbonato se cambia por una solución de colagenasa al 1%. Se deja perfundir el hígado con colagenasa durante 10 min aproximadamente. Posteriormente, se coloca el hígado en una caja de Petri de plástico y se lava con solución Ringer-Krebs bicarbonato y se termina de deshacer con un tubo de ensayo de plástico. El hígado separado junto con la solución Ringer-Krebs bicarbonato se filtran hacia un recipiente de plástico. Obteniéndose de esta manera los hepatocitos, los cuales fueron lavados en dos ocasiones antes de cada experimento.

Las células fueron suspendidas en Ringer-Krebs bicarbonato: NaCl 120 mM, KCl 5.7 mM, KH₂PO₄ 1.2 mM, MgSO₄ 1.2 mM y NaHCO₃ 12 mM, ajustado a pH de 7.4 a 37.5°C y equilibrado con O₂/CO₂ (95%/5%). La viabilidad celular se comprobó por medio del método de exclusión de azul de Tripano y todos los experimentos fueron realizados cuando se obtenía un >90% de viabilidad. Cada experimento se realizó de manera rutinaria por duplicado. Cada tubo contenía de 35 a 45 mg de peso húmedo de células hepáticas.

V.2. AGONISTAS DE LOS RECEPTORES A ADENOSINA:

Para la estimulación de los receptores A₁ se utilizó el 2-cloro-N⁶-ciclopentiladenosina (CCPA), el cual tiene una K_d para los A₁ de 0.4 nM y para los A_{2a} de 3900 nM [8]. Para la estimulación de los receptores A_{2a} se utilizó el (2-p-carboxietil)fenilamina-5'-N-carboxamidoadenosina (CGS21680), el cual tiene una K_d para los A_{2a} de 15 nM y para los A₁ de 2600 nM [8]. Para la estimulación de los receptores A₃ se utilizó el N⁶-2-etiladenosina (APNEA), el cual tiene una K_d para los A₃ de 15.5 nM (12, 55) y también se utilizó el N⁶-(3-iodobencil)adenosina-5'-N-metiluronamida (IB-MECA), el cual tiene una K_d para los A₃ de 1.1 nM (12, 55). Las concentraciones utilizadas estuvieron en el rango de 10⁻¹⁰ a 10⁻⁴ M. En los experimentos de gluconeogénesis y glucogenólisis también se utilizó adenosina como agonista fisiológico.

V.3. GLUCONEOGENESIS:

Los hepatocitos aislados de ratas ayunadas por 24 hrs fueron incubados a 37°C durante una hora en presencia de lactato 10 mM y de adenosina (de 10^{-9} a 10^{-5} M) ó de los diferentes agonistas de adenosina. Se hicieron dos grupos experimentales: células en la presencia de CaCl_2 1.2 mM y células en ausencia de calcio extracelular. Este último grupo fue incubado con EGTA 1.2 mM durante 10 min previos a la exposición de los diferentes agentes utilizados. La glucosa liberada hacia el medio se midió en el sobrenadante después de centrifugar los tubos a 50 g a 3°C por 10 min, utilizando el procedimiento de glucosa oxidasa (75). Los resultados se obtuvieron como μmol de glucosa formada por gramo de peso húmedo de hepatocitos en una hora.

V.4. GLUCOGENOLISIS:

Los hepatocitos aislados de ratas alimentadas *ad libitum* fueron incubados a 37°C durante 45 min en presencia de adenosina (de 10^{-10} a 10^{-4} M) ó de los diferentes agonistas para los receptores a adenosina. Se hicieron dos grupos experimentales, células en la presencia de CaCl_2 1.2 mM y células en ausencia de calcio extracelular. Este último grupo fue incubado con EGTA 1.2 mM durante 10 min previos a la exposición de los agentes mencionados. La liberación de glucosa al medio fue medida en el sobrenadante después de centrifugar los tubos a 50 g a 3°C durante 10 min, por medio del procedimiento de glucosa oxidasa (75). Los resultados

se obtuvieron como μ molas de glucosa formada por gramo de peso húmedo de hepatocitos en 45 min.

V.5. ACUMULACION DE AMP-CICLICO:

Los hepatocitos aislados de ratas alimentadas *ad libitum* fueron incubados a 37°C durante 2 min. en la presencia de los diferentes agonistas de adenosina. Se hicieron dos grupos experimentales: células en la presencia de CaCl_2 1.2 mM y células en ausencia de calcio extracelular. Este último grupo fué incubado con EGTA 1.2 mM durante 10 min previos a la exposición de los agentes mencionados. Al final de la incubación se adicionó a cada tubo 100 μ l de HCl 2 N. Posteriormente, los tubos fueron calentados en un baño de agua hirviendo por 2 min. y luego fueron neutralizados al adicionar a cada tubo 100 μ l de NaOH 2 N. El AMPc fue determinado utilizando el Amersham Kit TRK432. Los resultados se obtuvieron como pmolas de AMPc por mg de peso húmedo de hepatocitos.

VI RESULTADOS

VI.1. GLUCONEOGENESIS:

El nivel basal de glucosa fue 19.8 ± 1.8 μ molas de glucosa formada por gr. de peso húmedo en 1 hr \pm error estándar, siendo el promedio de 30 experimentos realizados por duplicado con diferentes preparaciones celulares.

La adenosina a la concentración de 1 nM en presencia de calcio extracelular no modificó el nivel basal de glucosa (Fig. 16), sin diferencias significativas entre los dos grupos experimentales (Tabla 1). A la concentración de 10 nM en presencia de calcio la adenosina aumentó un 15% la producción de glucosa (Fig. 16) ($P < 0.01$ vs. control) sin diferencias significativas con el grupo sin calcio (Tabla 1). La adenosina a 0.1 μ M aumentó la producción de glucosa en un 33% (Fig. 16) ($P < 0.01$ vs. control) tanto en presencia como en ausencia de calcio extracelular (Tabla 1). A la concentración de 1 μ M la adenosina en presencia y ausencia de calcio extracelular (Fig. 16) aumentó el nivel de glucosa en un 40% ($P < 0.01$ vs. control) (Tabla 1). Finalmente, la adenosina a 10 μ M en presencia de calcio aumenta un 23% la producción de glucosa ($P < 0.01$ vs. control) (Fig. 16), mientras que en ausencia de calcio la aumenta en un 45% ($P < 0.01$ vs. control) (Fig. 16). A 10 μ M de adenosina existen diferencias significativas entre los dos grupos experimentales ($P < 0.05$) (Tabla 1).

En general, la adenosina estimula la gluconeogénesis hasta en un 40% dependiendo de la concentración e independientemente de la presencia de calcio extracelular.

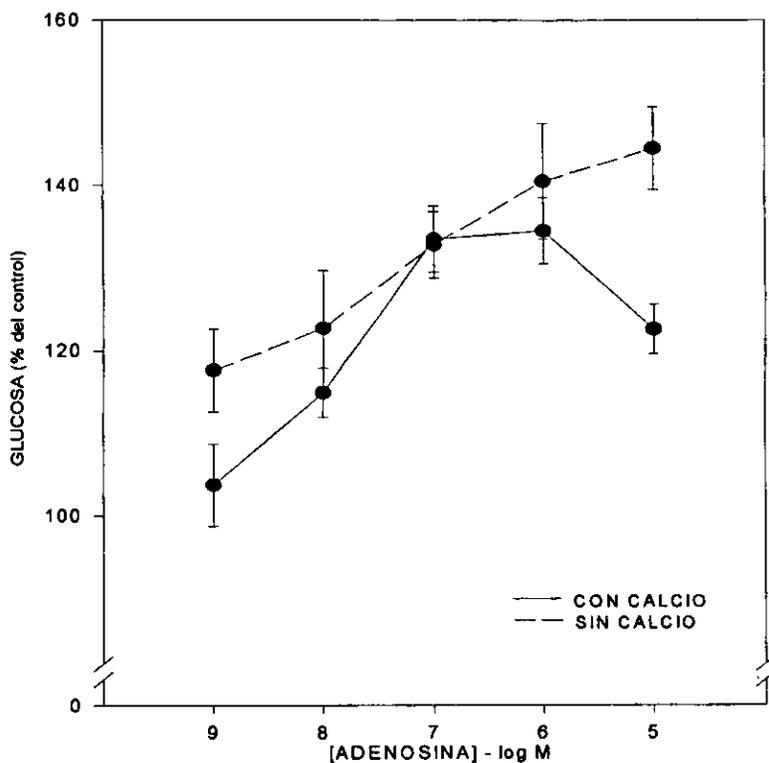


FIGURA 16. EFECTO DE LA ADENOSINA SOBRE LA GLUCONEOGENESIS. Hepatocitos aislados de ratas ayunadas por 24 hrs fueron incubados durante 1 hr con diferentes concentraciones de adenosina en presencia (—) ó en ausencia (----) de calcio extracelular. Los resultados están expresados como el porcentaje con respecto al control, cuyos valores fueron de 19.8 ± 1.8 μ molas de glucosa formada por gramo de peso húmedo de hepatocitos en una hora \pm error estándar y son el promedio de 14 experimentos realizados por duplicado con diferentes preparaciones de células.

La estimulación con CCPA (Figs. 17A y 17B) disminuyó el nivel de glucosa en un 56% ($P < 0.01$) (Tabla 1). No existen diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos experimentales (Tabla 1).

El CGS21680 a 0.1 nM aumentó en un 45% la producción de glucosa ($P < 0.01$ vs. control) tanto en presencia como en ausencia de calcio extracelular (Figs. 17A y B) (Tabla 1). A la concentración de 1 nM el CGS21680 aumenta el nivel de glucosa en un 65% ($P < 0.01$ vs. control) (Figs. 17A y B) sin diferencias significativas entre los dos grupos experimentales (Tabla 1). El CGS21680 a 10 nM aumentó en un 105% la producción de glucosa ($P < 0.01$ vs. control) (Figs. 17A y B) sin diferencias significativas entre los dos grupos experimentales (Tabla 1). A la concentración de 0.1 μM de CGS21680, en presencia de calcio, se aumenta la producción de glucosa en un 102% (Fig. 17A) ($P < 0.01$ vs. control); mientras que en ausencia de calcio la aumenta en un 142% (Fig. 17B) ($P < 0.01$ vs. control). A 0.1 μM de CGS21680 existen diferencias significativas ($P < 0.01$) entre los dos grupos experimentales (Tabla 1). El CGS21680 a 1 μM en presencia de calcio extracelular estimula la producción de glucosa en un 95% (Fig. 17A) ($P < 0.01$ vs. control); mientras que en ausencia de calcio aumenta un 186% la producción de glucosa (Fig. 17B) ($P < 0.01$ vs. control). A 1 μM de CGS21680 existen diferencias significativas ($P < 0.01$) entre los dos grupos experimentales (Tabla 1). En presencia de calcio el CGS21680 a una concentración de 10 μM aumenta la producción de glucosa en un 80% (Fig. 17A) ($P < 0.01$ vs. control); mientras que en ausencia de calcio extracelular la estimula en un 190% (Fig. 17B) ($P < 0.01$ vs. control). A 10 μM de CGS21680 existen diferencias significativas ($P < 0.01$) entre los dos grupos experimentales (Tabla 1). Finalmente, el

CGS21680 a 100 μM en presencia de calcio aumentó la producción de glucosa en un 50% (Fig. 17A) ($P < 0.01$ vs. control); mientras que en ausencia de calcio la estimula en un 200% (Fig. 17 B) ($P < 0.01$ vs. control). A 100 μM de CGS21680 existen diferencias significativas ($P < 0.01$) entre los dos grupos experimentales (Tabla 1).

En resumen, el CGS21680 a concentraciones nanomolares estimula la gluconeogénesis hasta en un 105% sin diferencias entre los dos grupos experimentales. Mientras que a concentraciones micromolares en presencia de calcio con el CGS21680 se observa un descenso moderado de la producción de glucosa (50%), pero nunca por debajo de la basal; en ausencia de calcio aumenta tres veces el nivel basal de glucosa con diferencias significativas entre los dos grupos experimentales.

La estimulación con IB-MECA, en presencia de calcio extracelular (Fig. 17A), a concentraciones de 1 a 10 nM, aumentó el nivel basal de glucosa hasta en un 30% ($P < 0.01$ vs. control) sin diferencias significativas con el grupo sin calcio (Tabla 1). Mientras que a concentraciones de 0.1 a 100 μM se observó una dramática disminución, inhibiendo a la gluconeogénesis en un 40% ($P < 0.01$) (Fig. 17A). En contraste, en ausencia de calcio extracelular (Fig. 17B), a concentraciones de 0.1 a 100 μM el IB-MECA no modificó el nivel basal de glucosa (Tabla 1).

La estimulación con APNEA, en presencia de calcio extracelular (Fig. 17A), resultó en un aumento del 50% ($P < 0.01$) (Tabla 1), de manera dependiente de la concentración (0.1 nM - 100 μM). Existen diferencias significativas ($P < 0.01$) (Tabla 1) entre los dos grupos experimentales. En ausencia de calcio extracelular (Fig. 17B) el APNEA nunca rebasó el nivel basal de glucosa (Tabla 1).

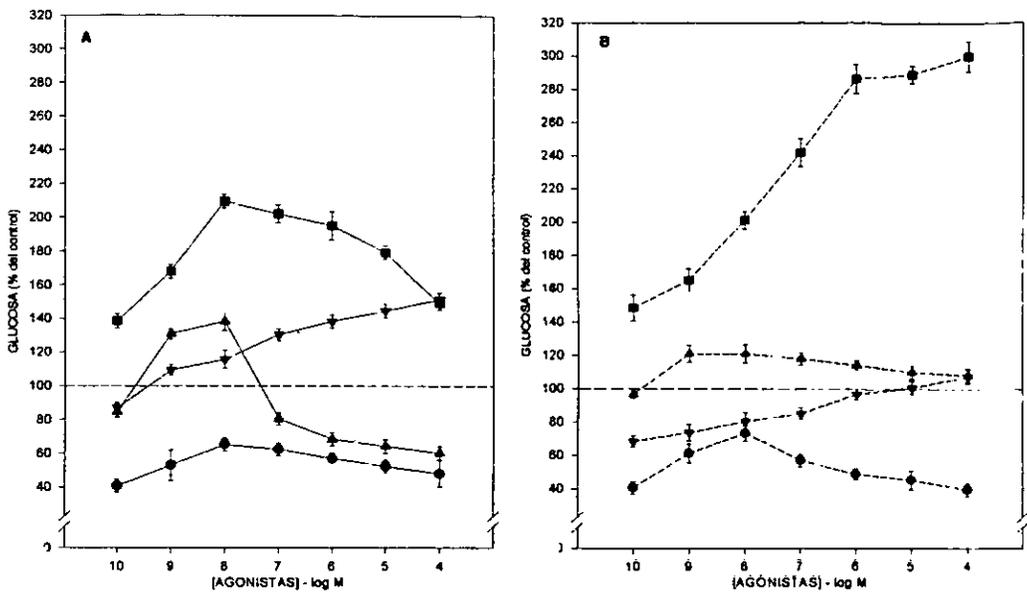


FIGURA 17. EFECTO DE LOS AGONISTAS DE LOS RECEPTORES DE ADENOSINA SOBRE LA GLUCONEOGENESIS. Hepatocitos aislados de ratas ayunadas por 24 hrs. fueron incubados durante 1 hr. en presencia (A) ó en ausencia (B) de calcio extracelular con los diferentes agonistas de los receptores de adenosina: CCPA (●), CGS21680 (■), IB-MECA (▲) y APNEA (▼). Los resultados están expresados como el porcentaje con respecto al control, cuyos valores fueron de 19.8 ± 1.8 μ mol de glucosa formada por gramo de peso húmedo de hepatocitos en una hora \pm error estándar. Los resultados son el promedio de cuatro experimentos realizados por duplicado con diferentes preparaciones celulares.

TABLA 1. GLUCONEOGENESIS EN PRESENCIA Y EN AUSENCIA DE CALCIO EXTRACELULAR.

Gluconeogénesis con calcio (glucosa % del control)																				
[agonista]-log M	ADO		E.E. +/-		CCPA		E.E. +/-		CGS21680		E.E. +/-		IB-MECA		E.E. +/-		APNEA		E.E. +/-	
	10	ooo	ooo	ooo	ooo	3.0+	40.76	3.0+	4.3+	138.43	4.3+	84.56	3.8++	87.09	4.6+++**					
9	103.7	5.0	5.0	3.1+	3.1+	52.99	3.1+	3.2+	167.95	3.2+	130.87	9.0++	109.30	3.8*						
8	114.9	3.0++	3.0++	5.5+	5.5+	65.22	5.5+	4.0+	209.47	4.0+	138.27	3.8+	115.72	3.8+++*						
7	133.5	4.0+	4.0+	3.6+	3.6+	62.50	3.6+	5.4+*	201.93	5.4+*	80.57	3.8+++*	130.29	3.0+*						
6	134.5	4.0+	4.0+	3.8+	3.8+	57.10	3.8+	8.3+*	195.15	8.3+*	68.46	3.2+*	138.23	3.0+*						
5	122.6	3.0+**	3.0+**	4.0+	4.0+	52.50	4.0+	4.0+*	179.18	4.0+*	64.43	3.8+*	144.62	3.0+*						
4	ooo	ooo	ooo	4.0+	4.0+	48.30	4.0+	4.0+*	148.95	4.0+*	60.40	7.8+*	151.13	3.8+*						

Gluconeogénesis sin calcio (glucosa % del control)																				
[agonista]-log M	ADO		E.E. +/-		CCPA		E.E. +/-		CGS21680		E.E. +/-		IB-MECA		E.E. +/-		APNEA		E.E. +/-	
	10	ooo	ooo	ooo	3.3+	40.63	3.3+	7.8+	148.31	7.8+	96.64	3.8	68.25	3.0+**						
9	117.6	5	5	5.1+	61.14	5.1+	6.9+	165.08	6.9+	120.80	5.7+	73.66	3.4+*							
8	122.7	7++	7++	5.3+	73.37	5.3+	5.1+	201.13	5.1+	120.80	4.7+	80.41	4.7+*							
7	132.8	4+	4+	3.6+	57.06	3.6+	8.4+*	241.81	8.4+*	118.00	3.5+*	85.13	3.7+++*							
6	140.5	7+	7+	3.0+	48.91	3.0+	8.6+*	286.19	8.6+*	114.00	5.2*	96.63	3.0*							
5	144.5	5+**	5+**	4.0+	45.50	4.0+	5.2+*	289.00	5.2+*	110.00	5.7*	100.66	3.4*							
4	ooo	ooo	ooo	4.2+	39.70	4.2+	9.0+*	300.00	9.0+*	108.20	4.0*	107.41	4.7*							

Los resultados están expresados como el porcentaje con respecto al control (19.8 ± 1.8 μmol/L de glucosa por gramo de peso húmedo de células en una hora ± error estándar). (+) P < 0.01 vs. control; (++) P < 0.05 vs. control; (*) P < 0.01 vs. con/sin calcio; (**) P < 0.05 vs. con/sin calcio. Adenosina (ADO).

VI.2. GLUCOGENOLISIS:

El nivel basal de glucosa fue 62.3 ± 1.6 μ molas de glucosa por gr. de peso húmedo de células en 45 min. \pm error estándar, siendo el promedio de 20 experimentos realizados por duplicado con diferentes preparaciones celulares.

La adenosina a 0.1 nM en presencia de calcio aumentó la producción de glucosa en un 25% (Fig. 18) ($P < 0.05$ vs. control); mientras que en ausencia de calcio no modificó el nivel de glucosa (Fig. 18). A 0.1 nM de adenosina existen diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los dos grupos experimentales (Tabla 2). A la concentración de 1 nM la adenosina en presencia de calcio extracelular aumentó la producción de glucosa en un 30% (Fig. 18) ($P < 0.05$ vs. control); mientras que en ausencia de calcio la adenosina la aumentó en un 15% (Fig. 18) ($P < 0.05$ vs control). A 1 nM de adenosina existen diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los dos grupos experimentales (Tabla 2). La adenosina a 10 nM en presencia de calcio extracelular estimula la producción de glucosa en un 42% (Fig. 18) ($P < 0.05$ vs. control); mientras que en ausencia de calcio la estimula en un 18% (Fig. 18) ($P < 0.05$ vs. control). A 10 nM de adenosina existen diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los dos grupos experimentales (Tabla 2). En presencia de calcio extracelular, 0.1 μ M de adenosina aumentó la producción de glucosa en un 57% (Fig. 18) ($P < 0.01$ vs. control); mientras que en ausencia de calcio la aumentó en un 33% (Fig. 18) ($P < 0.05$ vs. control). A 0.1 μ M de adenosina existen diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los dos grupos experimentales. La adenosina a concentración de 1 μ M en presencia de calcio extracelular estimula la producción de glucosa en un 63% (Fig. 18) ($P < 0.01$ vs. control); mientras que en ausencia de calcio la estimula en un 48% (Fig. 18) ($P < 0.01$

vs. control). A 1 μM de adenosina existen diferencias significativas ($P < 0.01$) entre los dos grupos experimentales (Tabla 2). La adenosina a 10 μM estimula la producción de glucosa en un 57% (Fig. 18) ($P < 0.01$ vs control) tanto en presencia como en ausencia de calcio extracelular (Tabla 2). Finalmente, la adenosina a 100 μM no modifica el nivel basal de glucosa en presencia y ausencia de calcio extracelular (Fig. 18) (Tabla 2).

En general la adenosina estimula la glucogenólisis desde 1 nM a 1 μM , siendo esta última concentración el máximo de estimulación (63% por arriba de la basal). A concentraciones de 10 a 100 μM disminuye la producción de glucosa hasta el nivel basal. El calcio extracelular va a potenciar el efecto estimulador de la adenosina sobre la glucogenólisis.

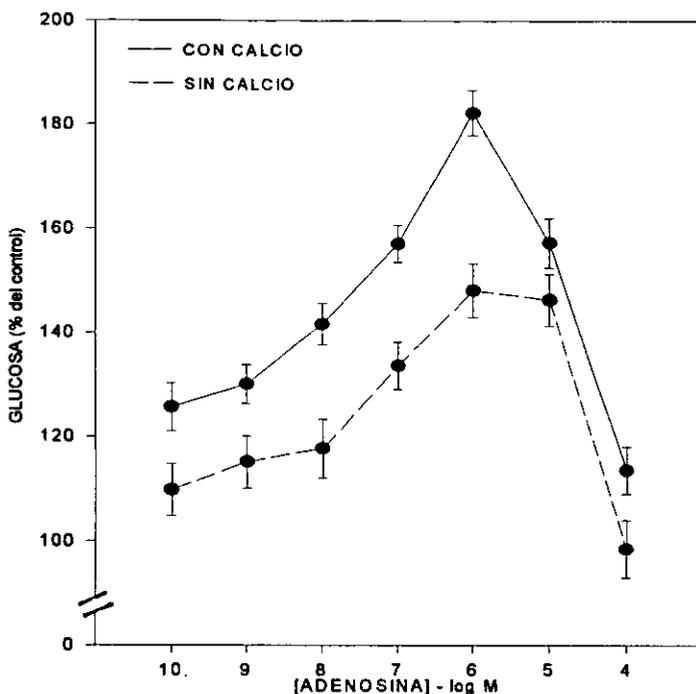


FIGURA 18. EFECTOS DE LA ADENOSINA SOBRE LA GLUCOGENOLISIS.

Hepatocitos aislados de ratas alimentadas fueron incubados durante 45 min. con diferentes concentraciones de adenosina en presencia (—) ó en ausencia (---) de calcio extracelular. Los resultados están expresados como el porcentaje con respecto al control, cuyos valores fueron de 62.3 ± 1.6 μ mol de glucosa formada por gramo de peso húmedo de hepatocitos en 45 min. \pm error estándar. Estos resultados son el promedio de cuatro experimentos realizados por duplicado con diferentes preparaciones celulares.

La estimulación con CCPA en la presencia de calcio extracelular (Fig. 19A) aumentó hasta un 140% el nivel de glucosa ($P < 0.01$ vs. control) (Tabla 2), de manera dependiente de la concentración (0.1 nM - 100 μ M). En ausencia de calcio extracelular (Fig. 19B) el CCPA incrementó hasta en un 80% ($P < 0.01$ vs. control) el nivel de glucosa (Tabla 2), dependiente de la concentración (0.1 nM - 100 μ M). Sin embargo, existen diferencias significativas entre los dos grupos experimentales ($P < 0.01$) (Tabla 2).

La estimulación con CGS21680, en presencia de calcio extracelular (Fig. 19A), aumentó hasta un 50% el nivel de glucosa ($P < 0.01$ vs. control) de manera dependiente de la concentración (0.1 nM - 1 μ M). En contraste, el CGS21680 en ausencia de calcio extracelular (Fig. 19B) disminuyó hasta en un 40% el nivel de glucosa ($P < 0.01$ vs. control) (Tabla 2), de manera dependiente de la concentración (0.1 nM - 100 μ M). Existen diferencias significativas entre los dos grupos experimentales ($P < 0.01$) (Tabla 2).

La estimulación con IB-MECA, en presencia de calcio extracelular (Fig. 19A), a concentraciones de 0.1 nM a 10 μ M produjo un aumento de glucosa hasta del 30% por arriba de la basal ($P < 0.01$ vs. control) (Tabla 2). Mientras que en ausencia de calcio extracelular (Fig. 19B) a concentraciones de 10 nM a 100 μ M no modificó el nivel basal de glucosa (Tabla 2). Existen diferencias significativas entre los dos grupos experimentales ($P < 0.01$) (Tabla 2).

La estimulación con APNEA, en presencia de calcio extracelular (Fig. 19A), a concentraciones de 0.1 a 10 nM aumentó hasta un 35% el nivel de glucosa ($P < 0.01$ vs. control) (Tabla 2). Mientras que a concentraciones de 0.1 a 100 μ M se observa

una disminución importante hasta el nivel basal. En contraste, en ausencia de calcio extracelular (Fig. 19B) disminuye la producción de glucosa hasta en un 50% por debajo de la basal ($P < 0.01$ vs. control) (Tabla 2) de manera dependiente de la concentración (0.1 - 100 μM). Existen diferencias significativas entre los dos grupos experimentales ($P < 0.01$) (Tabla 2).

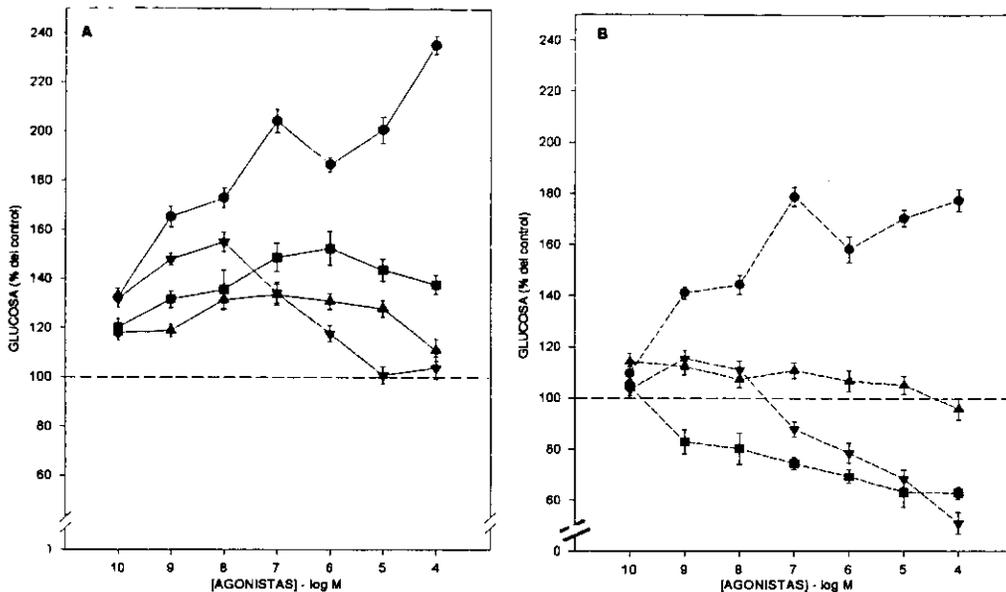


FIGURA 19. EFECTO DE LOS AGONISTAS DE LOS RECEPTORES DE ADENOSINA SOBRE LA GLUCOGENOLISIS. Hepatocitos aislados de ratas alimentadas fueron incubados durante 45 min. en presencia (A) ó en ausencia (B) de calcio extracelular con los diferentes agonistas de los receptores para la adenosina: CCPA (●), CGS21680 (■), IB-MECA (▲) y APNEA (▼). Los resultados están expresados como el porcentaje con respecto al control, cuyos valores fueron de 62.3 ± 1.6 μ molas de glucosa formada por gramo de peso húmedo de hepatocitos en 45 min. \pm error estándar. Estos resultados son el promedio de cuatro experimentos realizados por duplicado con diferentes preparaciones celulares.

TABLA 2. GLUCOGENOLISIS EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE CALCIO EXTRACELULAR.

Glucogenólisis con calcio (glucosa % del control)												
[agonista]-log M	ADO	E.E. +/-	CCPA		E.E. +/-		CGS21680		E.E. +/-		APNEA	E.E. +/-
			E.E. +/-									
10	125,65	4,6+**	132,3	3,2+*	119,98	3,7+**	118,11	3,9+	131,7	3,9+	131,7	6,2+**
9	130,51	3,7+**	165,1	2,5+*	131,62	3,5+*	118,86	4,2+	147,9	4,2+	147,9	2,0+*
8	141,64	4,0+**	172,9	4,0+*	135,55	7,8+*	131,3	4,1+*	154,9	4,1+*	154,9	3,6+*
7	157,14	3,6+**	204,2	4,2+*	148,72	5,8+*	133,53	4,7+*	134,3	4,7+*	134,3	4,5+*
6	162,69	4,4+*	188,5	2,3+*	152,43	6,8+*	130,86	2,9+*	117,7	2,9+*	117,7	6,0+**
5	157,29	3,8+	200,7	2,3+*	143,6	4,5+*	127,83	5,4+**	100,98	5,4+**	100,98	6,4*
4	110,53	5,0	235,3	4,5+*	137,57	3,9+*	111,01	3,7+**	103,8	3,7+**	103,8	2,3*

Glucogenólisis sin calcio (glucosa % del control)												
[agonista]-log M	ADO	E.E. +/-	CCPA		E.E. +/-		CGS21680		E.E. +/-		APNEA	E.E. +/-
			E.E. +/-									
10	109,76	5,0**	109,7	3,2+**	104,76	3,8**	114,23	2,6+	103,4	2,6+	103,4	3,0*
9	115,11	5,0+**	141,1	3,2+*	82,92	4,7+**	112,31	2,5+	11,5	2,5+	11,5	5,0*
8	117,72	5,6+**	144,3	3,3+*	80,2	6,2+**	107,39	3,7*	11,1	3,7*	11,1	3,2+**
7	133,60	4,6+**	178,8	3,0+*	74,42	2,4+*	110,87	3,8*	87,9	3,8*	87,9	4,9+**
6	148,11	5,2+*	158,3	4,0+*	69,32	2,7+*	108,79	5,1*	78,6	5,1*	78,6	5,0+*
5	146,33	5,0+	170,4	3,5+*	63,14	5,9+*	105,21	3,2*	68,4	3,2*	68,4	6,0+*
4	96,49	4,5	177,4	4,3+*	62,85	2,3+*	95,96	4,3+*	51	4,3+*	51	6,0+*

Los resultados están expresados como porcentaje del control (62,3 ± 1,6 µmolas de glucosa formada por gramo de peso húmedo de células en 45 minutos ± error estándar). (+) P < 0,01 vs. el control; (++) P < 0,05 vs. el control; (*) P < 0,01 vs. con/sin calcio; (**) P < 0,05 vs. con/sin calcio. Adenosina (ADO).

VI.3. ACUMULACION DE AMP-CICLICO:

Estos experimentos se llevaron a cabo en ausencia de un agente estimulador de la adenilil ciclasa o en presencia de un inhibidor de la fosfodiesterasa. El nivel basal de AMPc fue 0.87 ± 0.09 pmolas de AMPc por mg de peso húmedo de células \pm error estándar, siendo el promedio de 20 experimentos realizados por duplicado con diferentes preparaciones celulares.

La estimulación con CCPA, en presencia de calcio extracelular (Fig. 20A), a concentraciones de 1 a 10 nM, resultó en una inhibición hasta del 40% ($P < 0.01$ vs. control) (Tabla 3). En ausencia de calcio extracelular (Fig. 20B) a concentraciones de 0.1 a 100 nM produjo una inhibición moderada hasta del 20% ($P < 0.05$ vs. control) (Tabla 3). A las concentraciones mencionadas existen diferencias significativas entre los dos grupos experimentales ($P < 0.05$) (Tabla 3).

La estimulación con CGS21680, en presencia de calcio extracelular (Fig. 20A), a concentraciones de 1 nM a 1 μ M, aumentó el nivel de AMPc hasta en un 45% ($P < 0.01$ vs. control) (Tabla 3). En ausencia de calcio extracelular (Fig. 20B) no modificó los niveles basales de AMPc (Tabla 3). Existen diferencias significativas entre los dos grupos experimentales ($P < 0.01$) (Tabla 3).

La estimulación con IB-MECA (Figs. 20A y 20B) inhibió los niveles de AMPc hasta en un 40% de manera dependiente de la concentración (0.1 nM - 100 μ M), sin diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos experimentales (Tabla 3).

La estimulación con APNEA, en presencia de calcio extracelular (Fig. 20A), a concentraciones de 0.1 nM a 10 μ M, resultó en un aumento de AMPc hasta el doble

por arriba de la basal ($P < 0.01$) (Tabla 3). En contraste, en ausencia de calcio extracelular (Fig. 20B) a concentraciones de 0.1 nM a 100 μ M inhibió la producción de AMPc en un 40% por debajo de la basal ($P < 0.01$) (Tabla 3). Existen diferencias significativas entre los dos grupos experimentales ($P < 0.01$) (Tabla 3).

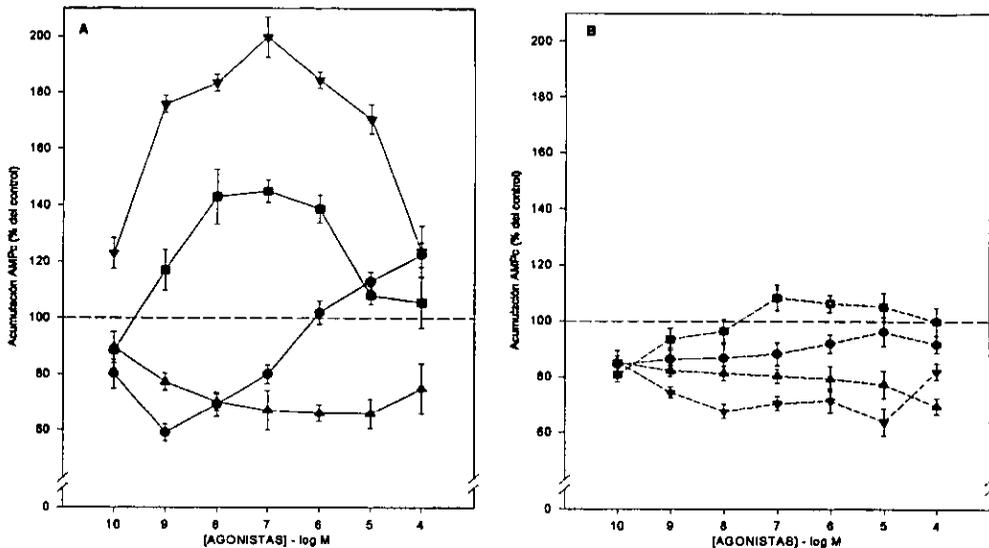


FIGURA 20. EFECTO DE LOS AGONISTAS DE LOS RECEPTORES DE ADENOSINA SOBRE LA ACUMULACION DE AMP-CICLICO. Hepatocitos aislados de ratas alimentadas fueron incubados en presencia (A) ó en ausencia (B) de calcio extracelular con los diferentes agonistas de los receptores de adenosina: CCPA (●), CGS21680 (■), IB-MECA (▲) y APNEA (▼). Los resultados están expresados como el porcentaje con respecto al control, cuyos valores fueron de 0.87 ± 0.09 pmolas de AMPc por miligramo de peso húmedo de hepatocitos \pm error estándar. Estos resultados son el promedio de cuatro experimentos realizados por duplicado con diferentes preparaciones celulares

TABLA 3. PRODUCCION DE AMP-CICLICO EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE CALCIO EXTRACELULAR.

		Producción de AMPc con calcio (AMPc % del control)							
[agonista]-log M	CCPA	E.E. +/-	CGS21680	E.E. +/-	IB-MECA	E.E. +/-	APNEA	E.E. +/-	
10	80,0	5.5++	88,5	6.5++	89,46	5.1++	123,0	10+**	
9	59,0	3.1+*	117,0	7.3+**	77,26	3.02+	175,8	9*	
8	69,2	3.0+*	143,9	9.7+*	70,00	4.34+	183,5	8*	
7	80,0	7.1++	145,0	4.0+*	67,06	3.3+**	189,7	9*	
6	101,8	3,0	138,8	5.0+*	66,03	4.18+**	184,5	9*	
5	113,1	5.2++	108,0	3,2	65,87	3.24+	170,5	8*	
4	122,4	9.0+**	105,5	9,0	74,91	4.31+	123,8	3*	

		Producción de AMPc sin calcio (AMPc % del control)							
[agonista]-log M	CCPA	E.E. +/-	CGS21680	E.E. +/-	IB-MECA	E.E. +/-	APNEA	E.E. +/-	
10	84,5	4.1++	80,8	2.6++	85,3	3.0+	85,3	5+**	
9	86,4	2.0+*	93,6	3.9**	82,3	4.0+	74,5	5*	
8	86,8	2.7+*	86,5	4.1*	81,3	5.0+	67,6	3+*	
7	88,3	2.5+	108,4	4.6*	80,4	4.1+**	70,5	5+*	
6	92,0	4.5	106,4	3.0*	79,4	3.3+**	71,5	4+*	
5	96,3	5,0	105,2	5,1	77,4	5.2+	63,8	4+*	
4	91,8	3.0**	100,0	5,0	69,6	3.1+	82,08	4+*	

Los resultados se expresan como porcentaje del control (0,87 ± 0,09 pmoles de AMPc por miligramo de peso húmedo de células ± error estándar). (+) P < 0.01 vs. control; (++) P < 0.05 vs. control; (*) P < 0.01 vs. con/sin calcio; (**) P < 0.05 vs. con/sin calcio.

Así mismo, se llevaron a cabo una serie de experimentos en la presencia de 1 μM de forskolina como agente estimulador de la adenilil ciclasa y utilizando el mismo protocolo de agonistas que los experimentos anteriores para la medición de AMPc. Tan sólo se realizó un grupo experimental en la presencia de CaCl_2 1.2 mM. Los niveles basales estimulados por forskolina fueron de 5.8 ± 1.2 pmolas de AMPc por mg de peso húmedo de células \pm error estándar.

La estimulación con CCPA (Fig. 21) inhibió la producción de AMPc hasta en un 80% ($P < 0.01$ vs. control) (Tabla 4) los niveles basales estimulados por forskolina de manera dependiente de la concentración (0.1 nM a 100 μM).

La estimulación con CGS21680 (Fig. 21) a concentraciones de 1 nM a 10 μM aumentó la producción de AMPc hasta en un 36% ($P < 0.01$ vs. control) por arriba de la basal estimulada por forskolina (Tabla 4).

La estimulación con IB-MECA (Fig. 21) inhibió la producción de AMPc hasta en un 80% ($P < 0.01$ vs. control) (Tabla 4) de manera dependiente de la concentración (0.1 nM - 100 μM).

La estimulación con APNEA (Fig. 21) aumentó hasta en un 56% ($P < 0.01$ vs. control) (Tabla 4) los niveles basales de AMPc estimulados por forskolina de manera dependiente de la concentración (0.1 nM - 100 μM).

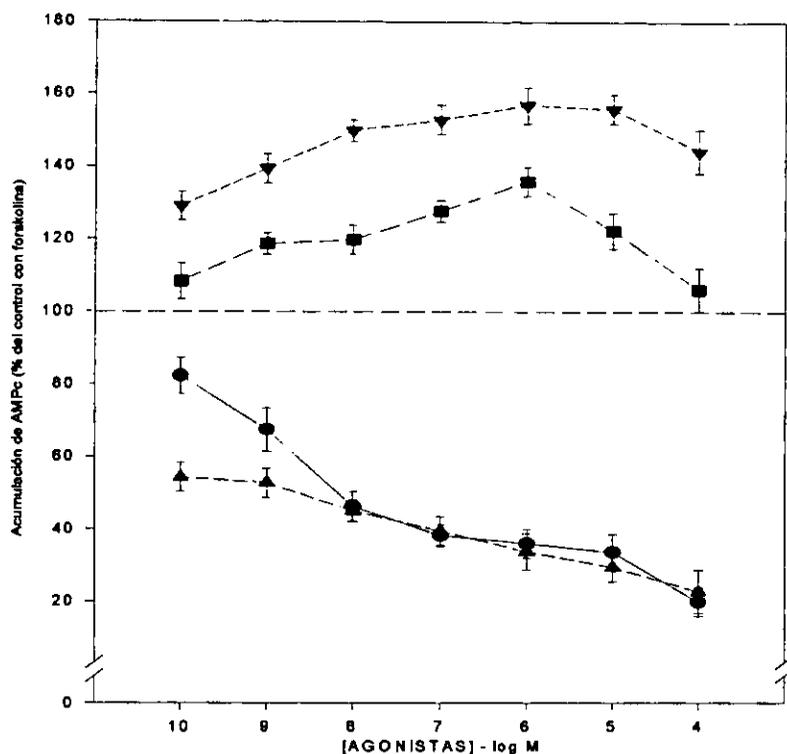


FIGURA 21. EFECTO DE LOS AGONISTAS DE LOS RECEPTORES DE ADENOSINA SOBRE LA ACUMULACION DE AMP-CICILICO, ESTIMULADO CON FORSKOLINA. Hepatocitos aislados de ratas alimentadas fueron incubados en presencia de $1 \mu\text{M}$ de forskolina para la estimulación de la adenilil ciclasa, 1.2mM de CaCl y de los diferentes agonistas: CCPA (●), CGS21680 (■), IB-MECA (▲) y APNEA(▼). Los resultados están expresados como el porcentaje con respecto al control con forskolina. Los valores control sin forskolina fueron de 0.87 ± 0.09 pmolas de AMPc por miligramo de peso húmedo de hepatocitos y los valores control con forskolina fueron 5.8 ± 1.2 pmolas de AMPc por miligramo de peso húmedo de hepatocitos \pm error estándar. Los resultados son el promedio de tres experimentos realizados por duplicado con diferentes preparaciones celulares.

TABLA 4. PRODUCCION DE AMP-CICLICO EN PRESENCIA DE 1 μ M DE FORSKOLINA.

[agonista]-log M	Producción de AMPc estimulada con Forskolina (AMPc % del control con forskolina)									
	CCPA	S.E.M. +/-	CGS21680	S.E.M. +/-	IB-MECA	S.E.M. +/-	APNEA	S.E.M. +/-		S.E.M. +/-
10	82,22	4	108,30	5*	54,30	5	129,10		5	
9	67,41	4	118,60	3	52,70	6	139,40		6	
8	46,25	3	119,70	4	45,00	4	150,00		5	
7	38,33	4	127,70	3	39,50	3	153,00		5	
6	36,11	5	136,00	4	33,80	4	157,00		4	
5	33,70	4	122,30	5	29,57	5	156,00		6	
4	20,00	6	106,00	6*	22,86	4	144,30		5	

Los resultados se expresan como porcentaje del control con forskolina ($5,8 \pm 1,2$ pmolas de AMPc por miligramo de peso húmedo de células \pm error estándar). Los datos son el promedio de tres experimentos realizados por duplicado con diferentes preparaciones celulares. Los experimentos fueron realizados en presencia de 1.2 mM de CaCl₂. (*) No existen diferencias significativas con respecto al control, el resto tiene una diferencia vs. control de $P < 0,01$.

VII

DISCUSION

VII.1 La adenosina como agente fisiológico.

Las concentraciones fisiológicas de adenosina en el espacio extracelular son del orden micromolar (1-7 μM) [19]. La adenosina es capaz de estimular a los receptores A_1 a concentraciones nanomolares, mientras que a concentraciones micromolares estimula a los receptores A_2 [76].

Zentella de Piña y cols. [31] reportaron que la adenosina estimula la gluconeogénesis, en presencia de calcio, a concentraciones de 10 nM a 100 μM . Estos datos concuerdan con los resultados reportados en este trabajo, donde se observa un aumento hasta del 56% a concentraciones de 10 nM a 10 μM de adenosina y de manera concentración dependiente (Fig. 16). Estos resultados no concuerdan con los obtenidos por Lund [77], Marchand [33] y Bartrons [34], quienes reportan que la adenosina inhibe la gluconeogénesis. Estos autores utilizaron concentraciones milimolares de adenosina y explican la inhibición de la gluconeogénesis como resultado de la conversión de adenosina hacia nucleótidos de adenina.

Londos [41], Bartrons [34], Keppens [30] y Hoffer [78] reportan que concentraciones micromolares de adenosina y de 5'-deoxi-5'-cloradenosina estimulan la glucogenólisis, en presencia de calcio. Estos datos concuerdan con los resultados obtenidos en este trabajo, donde se observa un aumento hasta del 80% a 1 μM de adenosina (Fig. 18). Sin embargo, desde concentraciones nanomolares se puede

observar estimulación de la vía. Fain y cols. [32] reportan que concentraciones milimolares de adenosina no modifican la glucogenólisis en hepatocitos de rata.

Hasta la fecha no existen estudios donde se investigue la dependencia de calcio extracelular de adenosina para estimular la gluconeogénesis y la glucogenólisis. Se ha observado que el efecto de la norepinefrina, vasopresina y angiotensina II sobre la gluconeogénesis a partir de lactato es dependiente de calcio extracelular [79]. Así mismo, el efecto de la vasopresina sobre la glucogenólisis se ve potenciado en presencia de calcio extracelular [80]. En este trabajo se observa que la gluconeogénesis, estimulada por adenosina, no depende de la presencia de calcio extracelular (Fig. 16). Mientras que, la glucogenólisis, estimulada por adenosina, se ve potenciada en presencia de calcio extracelular (Fig. 18). Tanto en la gluconeogénesis como en la glucogenólisis el efecto máximo de la adenosina se observa a 1 μ M. Por lo que la adenosina a concentraciones fisiológicas actúa como un agente hiperglucemiante.

VII.2 Gluconeogénesis.

Hasta la fecha no se han descrito estudios acerca de la gluconeogénesis con agonistas específicos para los receptores de adenosina.

La estimulación de los receptores A_{2a} con concentraciones nanomolares del agonista CGS21680 ($K_d = 15$ nM) aumenta la gluconeogénesis (Fig. 17A y B) independientemente de la presencia de calcio extracelular. Estos resultados concuerdan con los obtenidos con adenosina, la cual estimula la gluconeogénesis principalmente a concentraciones micromolares (activación de los receptores A_2) y

de igual manera independiente de la presencia de calcio extracelular (Fig. 16). El receptor A_{2a} se acopla a una proteína G_s , por medio de la cual, estimula a la adenilil ciclasa y aumenta el AMPc intracelular [41,42].

La estimulación del receptor A_1 inhibe la gluconeogénesis independientemente de la presencia de calcio extracelular (Fig. 17A y B). El receptor A_1 se acopla a una proteína G_i , por medio de la cual inhibe a la adenilil ciclasa y disminuye el AMPc intracelular [41,42].

La estimulación del receptor A_3 con el agonista IB-MECA ($K_d = 1.1$ nM) a concentraciones nanomolares estimula la gluconeogénesis independientemente de la presencia de calcio extracelular (Fig. 17A y B). De manera similar al receptor A_{2a} y a la adenosina. En contraste, a concentraciones micromolares del agonista, el receptor A_3 inhibe la gluconeogénesis (Fig. 17A y B). De manera similar al receptor A_1 , con la diferencia que el receptor A_3 depende de la presencia de calcio extracelular.

La respuesta bifásica del receptor A_3 se pudiera explicar como que a concentraciones nanomolares del agonista (IB-MECA) el receptor A_3 se une a una proteína del tipo G_q . Por medio de G_q el A_3 eleva el calcio citosólico y activa a la PKC [61,62]. En hígado de mamífero existen adenilil ciclasas del grupo 3 (Fig. 6) que pueden ser activadas por la PKC [4] y de esta manera aumentar el AMPc intracelular. En contraste, a concentraciones micromolares del agonista (IB-MECA) probablemente el receptor A_3 se une a una proteína G_i . Por medio de $G_{i\alpha}$ el receptor A_3 inhibe a la adenilil ciclasa [58-60], disminuyendo el AMPc intracelular. Esta

propuesta coincide con el modelo hipotético de diferentes estados conformacionales de un receptor (Fig. 10A) [20].

Aparentemente la gluconeogénesis, estimulada por adenosina, es principalmente a través de AMPc y por estimulación del receptor A_{2a} .

VII.3. Glucogenólisis:

Hasta la fecha no hay datos reportados en la literatura acerca de la glucogenólisis hepática y los agonistas específicos para los receptores de adenosina.

La estimulación del receptor A_1 con concentraciones del agonista CCPA ($K_d = 0.4$ nM) desde 0.1 nM hasta 0.1 μ M promueve la glucogenólisis (Fig. 19A y B). La estimulación se ve potenciada en presencia de calcio extracelular (Fig. 19A). Estos resultados concuerdan con los obtenidos con adenosina. La adenosina desde concentraciones nanomolares (activación de los receptores A_1) promueve la glucogenólisis y de igual manera su acción se ve potenciada en presencia de calcio extracelular (Fig. 18).

El receptor A_1 se acopla a una proteína G_i . Por medio de la subunidad α inhibe la adenilil ciclasa [41,42] y por medio de las subunidades $\beta\gamma$ activa a la PLC [44,45]. Probablemente la estimulación de la glucogenólisis en ausencia de calcio extracelular se deba a que el receptor A_1 es capaz de aumentar el calcio citosólico a expensas de depósitos intracelulares [50].

La estimulación del receptor A_{2a} aumenta la glucogenólisis en un 50% de manera dependiente de la presencia de calcio extracelular (Fig. 19A y B).

La estimulación del receptor A_3 con el agonista IB-MECA promueve la glucogenólisis en un 30% de manera dependiente de la presencia de calcio extracelular (Fig. 19A y B).

Aparentemente, la glucogenólisis, estimulada por adenosina, es principalmente a través de calcio y por activación del receptor A_1 . Sin embargo, no se puede descartar la participación del AMPc. Los receptores A_{2a} se acoplan a una proteína G_s , estimulan a la adenilil ciclasa [41,42] y son capaces de aumentar la glucogenólisis en un 50%. Este hecho puede explicar porqué el agonista A_1 a concentraciones micromolares (K_d para los receptores A_{2a} de $2.4 \mu\text{M}$) estimula la glucogenólisis hasta un 140%, en presencia de calcio extracelular. A estas concentraciones (micromolares) se suman los efectos de los dos receptores (A_1 y A_{2a}) (Fig. 19A).

VII.4. Acumulación de AMP-cíclico.

Es importante mencionar que no hay en la literatura estudios que investiguen la relación entre el calcio extracelular y el efecto sobre el AMPc por parte de los agonistas de los receptores de adenosina.

La estimulación de los receptores A_1 a concentraciones nanomolares del agonista ($K_d = 0.4 \text{ nM}$) inhibe el nivel de AMPc en un 40% (Fig. 20A) y el efecto

depende de la presencia de calcio extracelular (Fig. 20B). Estos resultados concuerdan con los reportados en la literatura [41,42], en presencia de calcio extracelular.

La estimulación de los receptores A_3 con el agonista IB-MECA inhibe el nivel de AMPc en un 40% (Fig. 20A) y a diferencia de los receptores A_1 es independiente de la presencia de calcio extracelular (Fig. 20B). Estos resultados concuerdan con los reportados en la literatura [58-60], en presencia de calcio extracelular. Cabe mencionar que los estudios realizados hasta la fecha con los receptores A_3 han sido sólo en células transfectadas [58-60].

La estimulación de los receptores A_{2a} a concentraciones del agonista ($K_d = 15$ nM) de 1 nM a 1 μ M aumenta el nivel de AMPc en un 45% (Fig. 20A). Esta estimulación es dependiente de calcio extracelular (Fig. 20B). Estos datos concuerdan con los reportados en la literatura [41,42], en presencia de calcio extracelular.

Debido a que la mayoría de los estudios realizados [41,42,44,58] se han hecho en presencia de forskolina, se decidió realizar una serie de experimentos en presencia de este agente estimulador de la adenilil ciclasa. Los resultados obtenidos en presencia de 1 μ M de forskolina y en presencia de $CaCl_2$ (Fig. 21) son similares a los obtenidos en ausencia de la misma (Fig. 20A).

Con los resultados obtenidos se puede suponer que en hígado de rata se coexpresan diferentes tipos de adenilil ciclasa. Probablemente exista una relación entre el subtipo de receptor de adenosina y el tipo de adenilil ciclasa.

El receptor A_1 inhibe la adenilil ciclasa por medio de una $G_{i\alpha}$ y por las $G_{i\beta\gamma}$. Este efecto inhibitorio es dependiente de calcio extracelular. Probablemente se trata de una adenilil ciclasa que pertenece al grupo 3 (Fig. 6) [4]. Este grupo es inhibido por $G_{i\alpha}$ y por un aumento de calcio citosólico a expensas del medio extracelular [4]. El aumento de calcio citosólico a expensas del medio extracelular mediado por el receptor A_1 puede deberse a que por medio de las $G_{i\beta\gamma}$ provoca un aumento de Ca^{2+} a expensas de depósitos intracelulares [50] y esta elevación de Ca^{2+} provoca la activación de una ICRC [71-73]. Probablemente de esta manera el receptor A_1 sea capaz de promover la entrada de calcio [50] en el hepatocito de rata.

El receptor A_{2a} estimula la adenilil ciclasa por medio de una G_s [41,42]. Este efecto es dependiente de la presencia de calcio extracelular (Fig. 20A y B). Probablemente se trata de una adenilil ciclasa del grupo 1 (Fig. 6) [4]. Este grupo puede ser activado por $G_{\alpha s}$ y por un aumento del calcio citosólico a expensas del medio extracelular [4]. El mecanismo por el cual el receptor A_{2a} pudiera promover la entrada de calcio en el hepatocito se desconoce, ya que en este tipo celular no existen canales de calcio sensibles a la fosforilación por PKA [56, 71-73]. Así mismo, no se ha podido comprobar si los dímeros $\beta\gamma$ de la proteína G_s pueden activar a la PLC [14,22] y de esta manera activar una ICRC [71-73].

El receptor A_3 inhibe a la adenilil ciclasa por medio de una G_i . El efecto es independiente de la presencia de calcio extracelular (Fig. 20A y B). Probablemente

se trata de una adenilil ciclasa del grupo 3 (Fig. 6) [4]. Este grupo es inhibido por la subunidad α de la proteína G_i [4].

VII.5. APNEA ¿un nuevo receptor?

El agonista APNEA se había utilizado como agonista de los receptores A_3 ($K_d = 15.5$ nM) [12,55] hasta el desarrollo de un nuevo agonista más específico, el IB-MECA ($K_d = 1.1$ nM) [12,55].

Los resultados obtenidos con APNEA son inesperados y no concuerdan con lo que se ha reportado en la literatura [58,61]. Cabe señalar que los estudios realizados con APNEA, como agonista A_3 , han sido realizados en células transfectadas únicamente.

En hepatocitos aislados de rata el agonista APNEA: (i) estimula la gluconeogénesis en un 50% (Fig. 17A); (ii) estimula la glucogenólisis en un 55% (Fig. 19A); y eleva el nivel de AMPc en un 100% (Fig. 20A). Todos estos efectos dependen de la presencia de calcio extracelular (Figs. 17B, 19B y 20B).

A partir de estos resultados tan sólo se pueden especular varias hipótesis:

a) Diferentes estados de activación del receptor A_3 , dependiendo del ligando

Basándose en el modelo propuesto por Hofman y cols. [20], donde se propone que un ligando puede modular que un receptor se acople preferencialmente a un tipo de proteína G (Fig. 10B). Probablemente el APNEA haga que el receptor A_3 se acople preferencialmente con una proteína G_q [61,62]. Eleva el calcio citosólico, activa a la PKC y puede activar a la ICRAC. De esta manera aumenta la gluconeogénesis (Fig. 2)

[2], la glucogenólisis (Fig. 3) [3] y el AMPc por medio de la activación de una adenilil ciclasa del grupo 1 (Fig. 4) [4].

b)Potenciación de la actividad del receptor A_{2a} . Debido a que el agonista APNEA es no selectivo [55], no se puede descartar la posibilidad de que pueda estar estimulando a más de un subtipo de receptor de adenosina. Se propone que puede potenciar las acciones del receptor A_{2a} , debido a que los efectos obtenidos del APNEA son similares a estos receptores, con la diferencia de que el APNEA depende en todo momento de la presencia de calcio extracelular.

c)Estimulación de un "nuevo" subtipo de receptor de adenosina. No se puede descartar la posibilidad de la existencia de un subtipo diferente de receptor de adenosina en hepatocitos de rata. En cerebro de rata se propone la existencia de un quinto subtipo de receptor de adenosina, el A_4 [38,39]. Se propone que el receptor A_4 tiene acciones similares a los receptores A_{2a} , pero con diferente localización y diferente afinidad hacia los agonistas [39].

Sin embargo, todas estas son tan sólo especulaciones. Es necesario realizar estudios posteriores con antagonistas específicos y de biología molecular para poder descartar o aprobar las hipótesis formuladas.

VIII

CONCLUSIONES

En hepatocitos aislados de rata:

La adenosina:

- ♣ La adenosina a concentraciones micromolares actúa como un agente hipergluceante.
- ♣ La adenosina no depende de calcio extracelular para estimular la gluconeogénesis.
- ♣ El calcio extracelular potencia el efecto estimulador de la adenosina sobre la glucogenólisis.

Los receptores de adenosina y las vías metabólicas:

- ♣ Se demuestra la existencia de tres subtipos de receptores de adenosina: A₁, A_{2a} y A₃.
- ♣ Principalmente el receptor A_{2a} estimula la gluconeogénesis.
- ♣ Principalmente el receptor A₁ estimula la glucogenólisis.
- ♣ El receptor A₃ participa (en menor grado que los otros 2 receptores) en la estimulación tanto de la gluconeogénesis como de la glucogenólisis.
- ♣ El agonista APNEA estimula la gluconeogénesis y la glucogenólisis.

Los receptores de adenosina y el AMPc:

- ♣ El receptor A₁ a concentraciones nanomolares inhibe el nivel de AMPc.
- ♣ El receptor A_{2a} aumenta el nivel de AMPc.

- ♣ El receptor A3 estimulado por IB-MECA inhibe el nivel de AMPc.
- ♣ El agonista APNEA aumenta el nivel de AMPc.

Dependencia de calcio:

- ♣ El efecto del receptor A2a a concentraciones nanomolares sobre la gluconeogénesis no depende de calcio extracelular.
- ♣ El efecto del receptor A2a sobre el AMPc depende de calcio extracelular.
- ♣ El efecto del receptor A1 sobre la glucogenólisis se ve potenciado por el calcio extracelular.
- ♣ El efecto del receptor A1 sobre el AMPc depende de la presencia de calcio extracelular.
- ♣ El efecto del receptor A3 sobre la gluconeogénesis y la glucogenólisis depende de la presencia de calcio extracelular.
- ♣ El efecto del receptor A3 sobre el AMPc no depende del calcio extracelular.
- ♣ Los efectos del agonista APNEA todos dependen de la presencia de calcio extracelular.

Esto denota la complejidad de las vías de transducción de señales y la intercomunicación entre ellas. Tan sólo se puede observar el producto final de la estimulación de un receptor (activación o inhibición de una vía metabólica). En este trabajo se evaluó una pequeña parte de toda una red de señales. Los resultados obtenidos permiten esclarecer un poco los mecanismos por los cuales la adenosina actúa en el hígado de mamífero y dan la base para estudios posteriores.

IX BIBLIOGRAFIA

1. MEIJER A.J., GIMPEL J.A., DELEEW G., ET AL. *J. Biolog. Chem.* **253**: 2308-20. (1978).
2. ZORZANO ANTONIO: Gluconeogénesis. En: E. Herrera, Bioquímica. Interamericana, España, primera edición. (1986).
3. STRYER LUBERT: Integración del Metabolismo. En: Lubert Stryer, Bioquímica. Tomo II. Editorial Reverté, S.A., cuarta edición, p.p. 763-781 (1995).
4. SUNHARA R.K., DESSAUER C.W., and GILMAN A.G. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **36**: 461-80 (1996).
5. FOX I.H. and KELLEY W.N. *Annu. Rev. Biochem.* **47**: 655-86 (1978).
6. COLLIS M.G. and HOURANI SUSANNA M.O. *TIPS Reviews.* **14**:360-66 (1993).
7. DAIZIEL H.H. and WESFALL D.P. *Pharmacol. Reviews.* **46**: 449-63 (1993).
8. WATSON S. and GIRLDSTONE D. *TIPS Reviews. Suppl.* 1-73 (1995).
9. LIBERT F., PARMENTIER M., LEFORT A., DINSART C., VAN SANDE J., MAEHAUT C., SIMONS M.J., DUMONT J.E., and VASSART G. *Science.* **244**: 569-72 (1989).
10. LIBERT F., SCHIFFMANN S.N., LEFORT A., PARMENTIER M., GERARD C., DUMONT J.E., VANDERHAEGEN J.J., and VASSART G. *EMBO J.* **10**: 1677-82 (1991).
11. MAENHAUT C., VAN SANDE J., LIBERT F., ABRAMOWICZ M., PARMENTIER M., VANDERHAEGEN J.J., DUMONT J.E., VASSART G., and SCHIFFMANN S. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **173**: 1169-78 (1990).
12. OLAH M.E., REN M., and STILES G.L. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **36**: 135-150 (1996).
13. OSTROWSKI J., KJELSBURG M.A., CARON M.G. and LEFKOWITZ R.J. *Annu Rev Pharmacol. Toxicol.* **32**: 167-183 (1992).
14. GUDERMANN T., KALKBRENNER F., and SCHULTZ G. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **36**: 429-59 (1996).
15. SIMON M.I., STRATHMANN M.P., and GAUTAM N. *Science.* **252**: 802-808 (1991).
16. RAY K., KUNSCH C., BONNER L.M., and ROBISHAW J.D. *J. Biol. Chem.* **270**: 21765-71 (1995).
17. CLAPHAM D.E. and NEER E.J. *Nature* **365**: 403-406 (1993).
18. IÑIGUEZ-LLUHI J., KLEUSS C., and GILMAN A.G. *Trends Cell Biol.* **3**: 230-36 (1993).

19. OLSSON R.A. and PEARSON J.D. *Physiol. Rev.* **70**: 761-815 (1990).
20. HOFMANN K.P., JÄGER S., and ERNST O.P. *Isr. J. Chem.* **50**:524-29 (1995).
21. CAMPS M., CAROZZI A., SCHNABEL P., SCHEER A., PARKER P., and GIERSCHIK P. *Nature* **60**: 684-86 (1992).
22. BIRNBAUMER L. *Cell* **71**: 1069-72 (1992).
23. PRONIN A.N. and GAUTAM N. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**: 6220-24 (1992).
24. SCHMIDT C.J., THOMAS T.C., LEVINE M.A., and NEER E.J. *J. Biol. Chem.* **267**: 13807-140 (1992).
25. UEDA N., IÑIGUEZ-LLUHI J.A., LEE E., SMRCKA A.V., ROBISHAW J.D., and GILMAN A.G. *J. Biol. Chem.* **269**: 4388-95 (1994).
26. WICKMAN K.D., IÑIGUEZ-L J.A., DAVENPORT P.A., TAUSSING R., KRAPIVINSKY G.B. *Nature.* **368**: 255-57 (1994).
27. MÜLLER S., HEKMAN M., and LOHSE M.J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 10439-43 (1993).
28. OFFERMANN S. and SCHULTZ G. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **350**: 329-38 (1994).
29. GUNZBERG., LAGUNA I., ZENTELLA A., GUZMAN R., and PIÑA E., *Biochem. J.* **245**: 371-74 (1987).
30. KEPPE S. and DE WULF H. *Biochem. Pharmacol.* **231**: 797-99 (1985).
31. ZENTELLA DE PIÑA M., DIAZ-CRUZ A., GUINZBERG P.R., and PIÑA E. *Life Sci.* **45**: 2269-74 (1989).
32. FAIN J.N. and SHEPHERD R.E. *J. Biol. Chem.* **252**: 8066-70 (1977).
33. MARCHAND J.C., LAVOINNE A., GIROZ M., and MATRAY F. *Biochimie.* **61**: 1273-82 (1979).
34. BARTRONS R., VAN SCHAFTINGEN E., and HERS H.G. *Biochem. J.* **218**: 151-53 (1984).
35. CARABAZA A., RICART M.D., GUINOVAR J.J., and CIUDAD C.J. *J. Biol. Chem.* **265**: 2724-32 (1990).
36. DIAZ A., GUINZBERG R., URIBE S., and PIÑA E. *Life Sci.* **49**: 505-10 (1991).
37. GUINZBERG R., DIAZ-CRUZ A., URIBE S., and PIÑA E. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **197**: 229-34 (1993).
38. LINDA J.C., SHILING H., STEPHEN D.H., and MATTHEW A.S. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **263**: 552-61 (1992).

39. LUTHIN D.R. and LINDEN J. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **272**: 511-18 (1995).
40. DIXON A.K., GUBITZ A.K., SIRINATHSINGHI D.J.S., RICHARDSON P.J., and FREEMAN T.C. *Brit. J. Pharmacol.* **118**: 1461-68 (1996).
41. LONDOS C., COOPER D.M.F., and WOLFF J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **77**: 2551-54 (1980).
42. VAN CLKER D., MÜLLER M., and HAMPRECHT B. *J. Neurochem.* **33**: 999-1005 (1979).
43. NANOFF C., FREISSMUTH M., TUISI E., and SCHUTZ W. *Br. J. Pharmacol* **100**: 63-68 (1990).
44. AREND L.J., HANDLER J.S., RHIM J.S., GUSOVSKY F., and SPIELMAN W.S. *Am. J. Physiol.* **256**: F1067-74 (1990).
45. GERWINS P. and FREDHOLM B.B. *J. Biol. Chem.* **267**: 16081-87 (1992).
46. HOLLINGSWOTH E.B., DE LA CRUZ R.A., and DALY J.W. *Eur. J. Pharmacol.* **122**: 45-50 (1986).
47. HILL S.J. and KENDALL D.A. *Br. J. Pharmacol.* **91**:661-69 (1987).
48. LONG C.J. and STONE T.W. *J. Pharm. Pharmacol.* **39**: 1010-14 (1987).
49. DELAHUNTY T.M., CRONIN J.J., and LINDEN J. *Biochem. J.* **255**: 69-77 (1988).
50. IREDALE P.A., ALEXANDER S.P.H., and HILL S.J. *Br. J. Pharmacol.* **111**: 1252-56 (1994).
51. ALBAR M., OKAJIMA F., TOMURA H., SHIMEGI S., and KONDO Y. *Mol. Pharmacol.* **45**: 1036-42 (1994).
52. BELARDINELLI L., SHYROCK J.C., and PELLEG A. *Coron. Artery Dis.* **12**: 1122-26 (1992).
53. STONE T.W. and BARTRUP J.T. Electropharmacology of adenosine. In *Adenosine in the Nervous System*, ed. T Stone, **8**: 173-92. London/San Diego: Academic. 218 pp. (1991).
54. ROBLES-FLORES M., ALLENDE G., PIÑA E., and GARCIA-SAINZ A. *Biochem. J.* **312**: 763-67 (1995).
55. OLAH M.E. and STILES G.L. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **35**: 581-606 (1995).
56. KLEPPISCH T. and NELSON M.T. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**: 12441-45 (1995).
57. YAKEL J.L., WARREN R.A., REPPERT S.M., and NORTH R.A. *Mol. Pharmacol.* **43**: 277-80 (1993).

58. ZHOU Q.-Y., LI C., OLAH M.E., JOHNSON R.A., STILES G.L., and CIVELLI O. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**: 7432-36 (1992).
59. LINDEN J., TAYLOR H.E., ROBEVA A.S., TUCKER A.L., STEHLE J.H., et al. *Mol. Pharmacol.* **44**: 524-32 (1993).
60. SALVATORE C.A., JACOBSON M.A., TAYLOR H.E., LINDEN J., and JOHNSON R.G. *Natl. Acad. Sci. USA.* **90**: 10365-69 (1993).
61. PALMER T.M., GETTYS T.W., and STILES G.L. *J. Biol. Chem.* **270**: 16895-902 (1995).
62. PALMER T.M., BENOVIC J.L., and STILES G.L. *J. Biol. Chem.* **270**: 29607-13 (1995).
63. KAWABE J., IWAMI T.E., OHNO S., KATADA T., UEDA Y., et al. *J. Biol. Chem.* **269**: 16554-58 (1994).
64. COOPER D.M.F., YOSHIMURA M., ZHANG Y., CHIONO M., and MAHEY R. *Biochem. J.* **297**: 437-40 (1994).
65. IWAMI G., KAWABE J., EBINA T., CANNON P.J., HOMEY C.J., and ISHIKAWA Y. *J. Biol. Chem.* **270**: 12481-84 (1995).
66. FEDERMAN A.D., CONKLIN B.R., SCHRADER K.A., REED R.R., and HENRY R.B. *Nature* **356**: 159-61 (1992).
67. PUTNEY J.W. Jr. *Cell* **75**: 199-201 (1993).
68. BERRIDGE M.J. *Nature*. **361**: 315-25 (1993).
69. RANDRIAMAMPITIA C. and TSIEN R.Y. *Nature*. **364**: 809-14 (1993).
70. KIM H.Y., THOMAS D., and HANLEY M.R. *J. Biol. Chem.* **270**: 9706-8 (1995).
71. HOTH M. and PENNER R. *Nature*. **355**: 353-56 (1992).
72. BERRIDGE M.J. *Biochem. J.* **312**: 1-11 (1995).
73. HOTH M., FASOLATO C., and PENNER R. *Ann NY Acad. Sci.* 198-209 (1995).
74. RFRRY M N and FRIFND D S. *J. Cell. Biol.* **43**: 506-20 (1969).
75. FALES F.W. *Stand. Methods Clin. Chem.* **4**: 101-12 (1963).
76. DALY J.W. *J. Med. Chem.* **25**: 197-207 (1982).
77. LUND P.N., CORNELL N.W., and KREBS H.A. *Biochem. J.* **152**: 593-99 (1975).
78. HOFFER L.J. and LOWENSTEIN J.M. *Biochem. Pharmacol.* **35**: 4529-36 (1986).
79. KNEER N.M. and LARDY H.A. *Arch. Biochem. Biophys.* **225**: 187-95 (1983).
80. STUBBS M., KIRK C.J., and HEMS D.A. *FEBS Letters* **69**: 199-202 (1976).