



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**  
**FACULTAD DE QUÍMICA**

**ALTERACIÓN EN LOS NIVELES DEL RECEPTOR PARA LA**  
**ADENOSINA A<sub>3</sub> EN HÍGADO DE RATA ALIMENTADA CON**  
**FRUCTOSA**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS**  
**(BIOQUÍMICAS)**

**PRESENTA:**

**CARLOS ACOSTA TRUJILLO**

**TUTOR:**

**ENRIQUE PIÑA GARZA FACULTAD DE MEDICINA UNAM**

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTORAL:**

**DR. ENRIQUE PIÑA GARZA, FACULTAD DE MEDICINA, UNAM**

**DR. JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM**

**DR. SALVADOR URIBE CARVAJAL, INSTITUTO DE FISIOLÓGIA**  
**CELULAR, UNAM**

**MÉXICO, D.F. ABRIL 2013**



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.

## Dedicatoria.

A las personas que son importantes en mi vida: Isidra, Guillermo, Jenny, Antonio, J. Guillermo, Arturo y Ana Rosa, por su apoyo en este proyecto.

# ALTERACIÓN EN LOS NIVELES DEL RECEPTOR PARA LA ADENOSINA A<sub>3</sub> EN HÍGADO DE RATA ALIMENTADA CON FRUCTOSA

## RECONOCIMIENTOS

Esta tesis de maestría se realizó bajo la dirección del Dr. Enrique Piña Garza en el laboratorio de Bioquímica, en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dr. Enrique Piña Garza	Facultad de Medicina, UNAM
Dr. José Pedraza Chaverri	Facultad de Química, UNAM
Dr. Salvador Uribe Carvajal	Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Se reconoce la asesoría técnica de la Dra. Raquel Guinzberg Perrusquía en los experimentos de bioquímica y perfusión de hígado.

Se reconoce la asesoría técnica de la Dra. Magdalena Vilchis Landeros en los experimentos de biología molecular.

El proyecto fue apoyado parcialmente por CONACYT (166733) y PAPIIT (IN218112). Durante los estudios de maestría goce de una beca otorgada por CONACYT para la realización de la presente tesis.

Esta tesis fue defendida en examen presentado el día 10 de abril del 2013.

El Jurado de Examen Doctoral estuvo constituido por:

Presidente	Dr. Rolando Efraín Hernández Muñoz	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Vocal	Dra. María Cristina Fernández Mejía	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Vocal	Dr. Antonio Díaz Cruz	Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM
Vocal	Dr. Marco Antonio Juárez Oropeza	Facultad de Medicina, UNAM
Secretario	Dr. Rafael Villalobos Molina	Unidad de Investigación en Biomedicina, UNAM

## Contenido

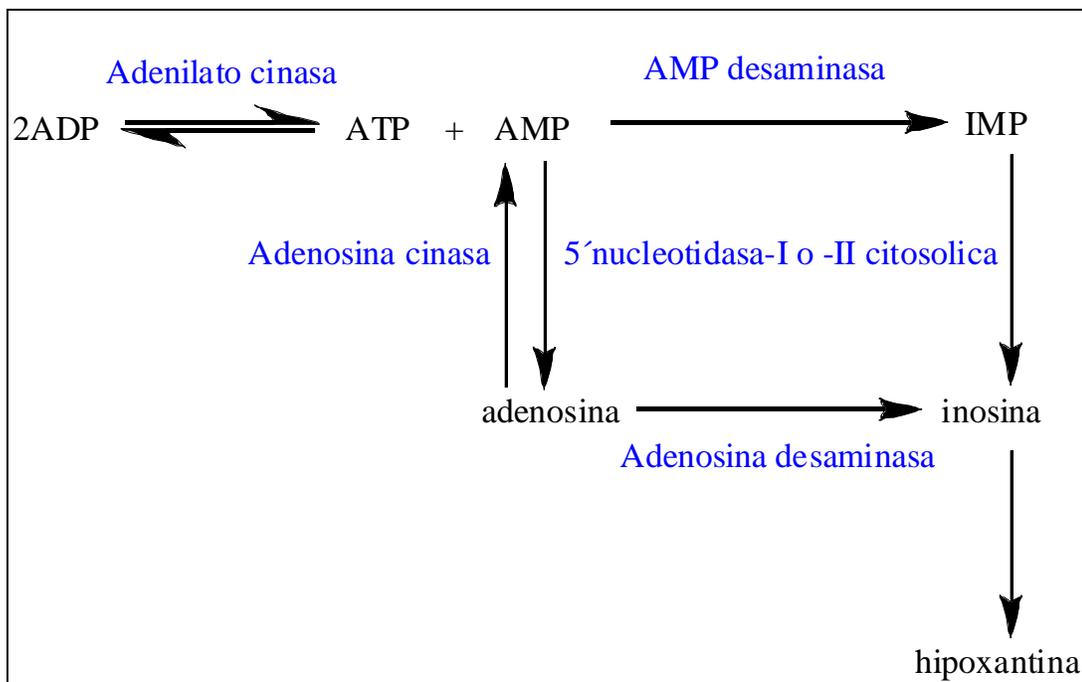
Dedicatoria.....	II
RECONOCIMIENTOS.....	- 1 -
ANTECEDENTES.....	- 3 -
Adenosina y sus receptores.....	- 3 -
Fructosa de la dieta.....	- 5 -
Metabolismo de la fructosa.....	- 5 -
Efectos hormonales de la fructosa.....	- 7 -
Inosina y el receptor de adenosina A <sub>3</sub> en hígado.....	- 8 -
La fructosa eleva los niveles de Inosina.....	- 8 -
HIPÓTESIS.....	- 12 -
OBJETIVOS.....	- 12 -
DISEÑO EXPERIMENTAL.....	- 12 -
MÉTODOS.....	- 12 -
Obtención de hígado de rata.....	- 12 -
Muestras de sangre.....	- 13 -
Hígado perfundido.....	- 13 -
Medición de metabolitos.....	- 13 -
Aislamiento del ARN de tejido hepático.....	- 13 -
Cuantificación y pureza del ARN.....	- 13 -
Síntesis de cDNA a partir de ARNm.....	- 13 -
Diseño de oligonucleótidos para la técnica de PCR en tiempo real.....	- 14 -
PCR en tiempo real.....	- 14 -
Métodos estadísticos.....	- 14 -
RESULTADOS.....	- 14 -
DISCUSIÓN.....	- 23 -
CONCLUSIÓN.....	- 27 -
REFERENCIAS.....	- 28 -

## **ANTECEDENTES.**

### **Adenosina y sus receptores.**

La adenosina es un nucleósido de purina y es intermediario en la vía degradativa del adenosín trifosfato (ATP) (esquema 1). La adenosina se forma en las células a partir del adenosín monofosfato (AMP) o de la degradación de la S-adenosilhomocisteína. El AMP intracelular se deriva hacia adenosina por una nucleotidasa específica, la 5'-nucleotidasa [1, 2]. Esta enzima tiene dos formas, la cN-I y la cN-II, la primera degrada el AMP a adenosina y la segunda degrada el inosín monofosfato (IMP) a inosina [3]. Además, la adenosina se degrada a inosina por la adenosina desaminasa o se fosforila hacia AMP por la adenosina cinasa [1, 2].

La adenosina extracelular es transportada al interior de la célula en donde es rápidamente fosforilada por la adenosina cinasa ( $K_m=100\text{nM}$ ) [4], o degradada a inosina por la adenosina desaminasa, que es un proceso con menor afinidad ( $K_m=20\text{-}100\mu\text{M}$ ) [5, 6]. La adenosina desaminasa, pero no la adenosina cinasa, se encuentra también en el espacio extracelular [6]. Cuando las concentraciones intracelulares de adenosina son muy altas, la adenosina sale de la célula por difusión [7].



Esquema 1. Metabolismo de los nucleótidos intracelulares

En el sistema nervioso central la adenosina disminuye la liberación de neurotransmisores y la actividad locomotora, produce sedación, hiperalgesia y es anticonvulsivante. En el sistema cardiovascular produce vasodilatación, vasoconstricción, bradicardia, un efecto inotrópico positivo e inhibición de la agregación plaquetaria. En el riñón disminuye el filtrado glomerular y funciona como anti-diurético e inhibe la liberación de renina. En el sistema respiratorio produce bronco constricción, bronco dilatación, secreción de moco y depresión respiratoria. En el sistema gastrointestinal inhibe la secreción de ácido gástrico [8]. En el hígado aumenta la ureogénesis, la glucogenólisis y la gluconeogénesis [9-11]. Las acciones opuestas de la adenosina en un mismo sistema, descritas en párrafos anteriores, se deben a la activación de diferentes receptores de la adenosina presentes en las membranas plasmáticas [8]. Estos receptores se identificaron como purino receptores, y se clasifican como receptores  $P_1$  y  $P_2$ , teniendo los primeros mayor afinidad por la adenosina y por el AMP, y son los responsables de la modulación de la actividad de la adenilil ciclasa; mientras que los  $P_2$  tienen mayor afinidad por el ATP y el ADP [2, 12]. Actualmente los receptores  $P_1$ , específicos para la adenosina, se subdividen basándose en sus características de unión del ligando y las respuestas bioquímicas obtenidas por su activación, en cuatro subtipos:  $A_1$ ,  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$  y  $A_3$  [12].

La clonación de los receptores de adenosina se inició en 1989 con el aislamiento de los cDNAs del "receptor huérfano", denominados RDC7 y RDC8 [13]. Posteriormente se

confirmó que el RDC7 y el RDC8 codifican al receptor A<sub>1</sub> [14] y al receptor A<sub>2</sub> [15], respectivamente. Los receptores de adenosina pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a las proteínas G y se caracterizan por siete dominios transmembranales, de aproximadamente de 22 a 25 aminoácidos hidrofóbicos [16]. Se considera que el lado intracelular de estos receptores, particularmente las regiones de las asas intracelulares 3-4 y 5-6 y la porción carboxilo terminal, interaccionan con la proteína G acopladora [17].

En hígado de rata se han detectado los ARNm que codifican para los cuatro subtipos de receptores de adenosina, si bien en humano se detectó que el ARNm del receptor de adenosina A<sub>3</sub> está presente en mayor cantidad [18-20]. Además, en hígado de ratas se han encontrado concentraciones de adenosina de 0.01 µM [21]; mientras que en plasma y suero son de 2.4 µM [22] y 8.0 µM [23] respectivamente.

Se sabe que en hepatocitos aislados de rata, la adenosina en concentraciones micro molares estimula la glucogenólisis [9], la gluconeogénesis [10] y la ureogénesis [11].

De los cuatro subtipos de receptores para la adenosina, el receptor A<sub>3</sub> es el único que en el hígado es estimulado, además de la adenosina, por la inosina.

#### Fructosa de la dieta.

La fructosa es un monosacárido que se encuentra presente en todas las frutas y vegetales. La fructosa forma parte del disacárido sacarosa, que está compuesta de una molécula de glucosa unida a una molécula de fructosa mediante el enlace glucosídico α 1-2.

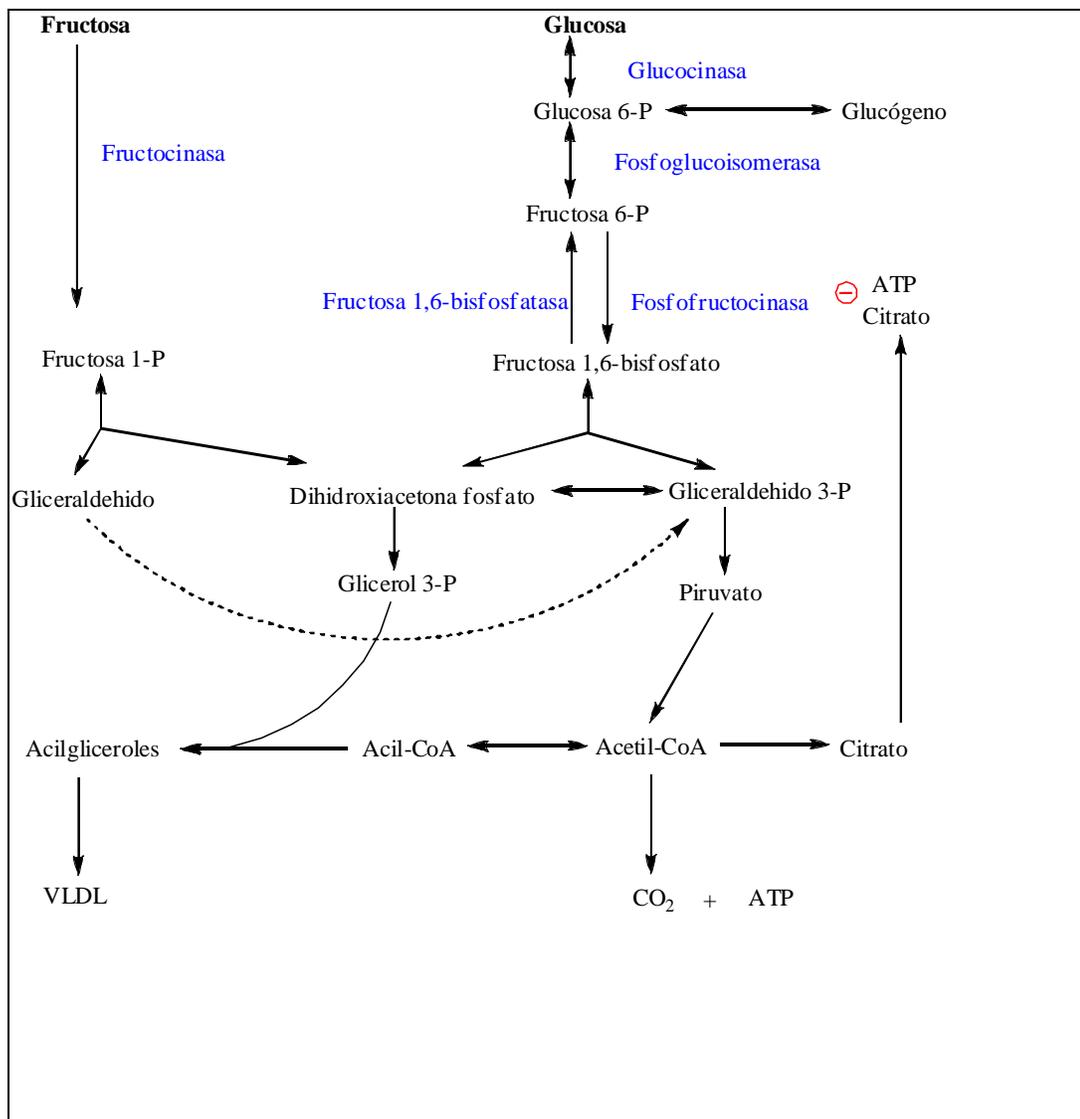
Por su bajo costo y mayor poder dulcificante, la fructosa es usada comercialmente como sustituto edulcorante en la elaboración de postres, condimentos y bebidas carbonatadas [24, 25].

#### Metabolismo de la fructosa.

El metabolismo de la fructosa difiere del de la glucosa y ocurre a través de un mecanismo insulino-independiente. Seguido de la ingestión, la fructosa es rápidamente absorbida por el enterocito vía transportador de glucosa específico para fructosa, GLUT5 [26], y después pasa a torrente sanguíneo por el transportador GLUT2 [27, 28]. En el hígado (esquema 2) la fructosa se fosforila por la fructocinasa, para formar fructosa 1-fosfato (fructosa 1-P), la cual se convierte a los intermediarios de 3 carbonos de gliceraldehído, la dihidroxiacetona fosfato y el gliceraldehído 3-fosfato (gliceraldehído 3-P). Una porción de estos intermediarios pueden entrar a la vía gluconeogénica para ser convertidos a glucosa o metabolizados, para formar lactato o el glicerol de los triglicéridos.

Uno de los pasos limitantes de la célula sobre el metabolismo de la glucosa involucra la fosforilación de fructosa 6-fosfato (fructosa 6-P) a fructosa 1,6-bisfosfato (fructosa 1,6-bisP), el cual es catalizado por la fosfofructocinasa I. Esta reacción es negativamente regulada por citrato y ATP, los cuales inhiben alostéricamente a la fosfofructocinasa I, por lo mismo previene la glucólisis dentro de la célula hepática [29]. El metabolismo hepático de la glucosa y la fructosa se unen cuando se forman los intermediarios de 3 carbonos fosfatados. Dado que la fructosa puede pasar la reacción paso limitante de la fosfofructocinasa, los intermediarios derivados de la fructosa pueden entrar a la vía glucolítica río abajo de la enzima. Al acumularse estos intermediarios, pueden ser convertidos a glicerol 3-fosfato para la síntesis de los triglicéridos. La transformación del piruvato en acetil coenzima A (acetil CoA), a través de la piruvato deshidrogenasa, permite la lipogénesis *de novo* y la formación de ácidos grasos de cadena larga, los cuales se pueden esterificar para formar triglicéridos [30]. Por lo tanto, el consumo de altos niveles de fructosa funciona como fuente no regulada para la producción de triglicéridos. Es importante destacar que al no estar regulada la vía del metabolismo de la fructosa, puede ocasionar una disminución importante en la concentración de ATP en las células del hígado [31], ya que se utiliza para fosforilar a la fructosa.

La disminución en la poza de ATP en las células aumenta la poza de ADP, que en condiciones normales es re-fosforilado en la cadena respiratoria para regenerar el ATP. Si el consumo de fructosa es cuantitativamente importante, la re-fosforilación del ADP se detiene cuando la célula hepática agota su reserva disponible de ión fosfato. Este hecho llega a observarse cuando los sujetos experimentales consumen cantidades importantes de fructosa [32, 33].



Esquema 2. Catabolismo de la glucosa y la fructosa en la célula hepática.

### Efectos hormonales de la fructosa.

Los efectos promovidos por la molécula de fructosa, al incidir sobre distintos tejidos glandulares, son diferentes a los efectos que desencadena la glucosa al incidir sobre los mismos tejidos.

Después de la ingestión de fructosa, la oleada de insulina no ocurre por 2 razones. Primero, el páncreas no contiene los transportadores de la fructosa GLUT5 [34], lo que limita la entrada de fructosa al páncreas. Segundo, la fructosa no estimula la liberación del péptido inhibidor gástrico [35-37], el cual induce la secreción de insulina. A diferencia de la glucosa,

los niveles de leptina, una hormona que señala saciedad, no se incrementa después del consumo de fructosa [37, 38]. Se reporta que la alimentación con fructosa a largo plazo incrementa los niveles de leptina en ratas [39, 40], lo cual, en este contexto puede indicar el desarrollo de resistencia a la insulina [24]. La fructosa también incrementa la adiponectina en plasma [39, 41], una hormona producida por tejido adiposo que regula la homeostasis de la glucosa. Del mismo modo, el aumento en la adiponectina circulante indica resistencia a esta hormona, ya que sus efectos benéficos, como aumento de la sensibilidad a la insulina y la reducción en la presión sanguínea, no se observaron en las ratas alimentadas con fructosa [39, 41].

### Inosina y el receptor de adenosina $A_3$ en hígado.

En hepatocitos aislados de rata, el estímulo con adenosina o inosina incrementa las velocidades de operación de 3 de sus principales vías metabólicas: glucogenólisis, gluconeogénesis y ureogénesis [9-11]. Aunque ambos nucleósidos se encuentran en suero y pueden ser efectivos para activar estas vías metabólicas, existe evidencia que sugiere una acción predominante de la inosina respecto a la adenosina en la estimulación hepática de las 3 vías metabólicas, a través de la activación del receptor  $A_3$  de la adenosina, debido a que la concentración de la inosina es más alta en suero y la concentración es 25 veces mayor que la adenosina en perfusado de hígado aislado [42, 43]. Recuérdese, además, que en el humano el receptor  $A_3$  de la adenosina es el más expresado de los receptores hepáticos para la adenosina [19, 44-46].

Además, la alta actividad de la enzima adenosina desaminasa que se encuentra en suero de rata favorece la conversión de la adenosina a inosina. El incremento en las tres vías metabólicas ocasionado por inosina se bloquea por un antagonista de los receptores  $A_3$ . En contraste, al bloquear los receptores  $A_1$ ,  $A_{2A}$  y  $A_{2B}$ , no se modifica el efecto ocasionado por la inosina [43]. Por lo tanto, los receptores  $A_3$  parecen ser el blanco de la inosina para la estimulación de éstas vías en los hepatocitos.

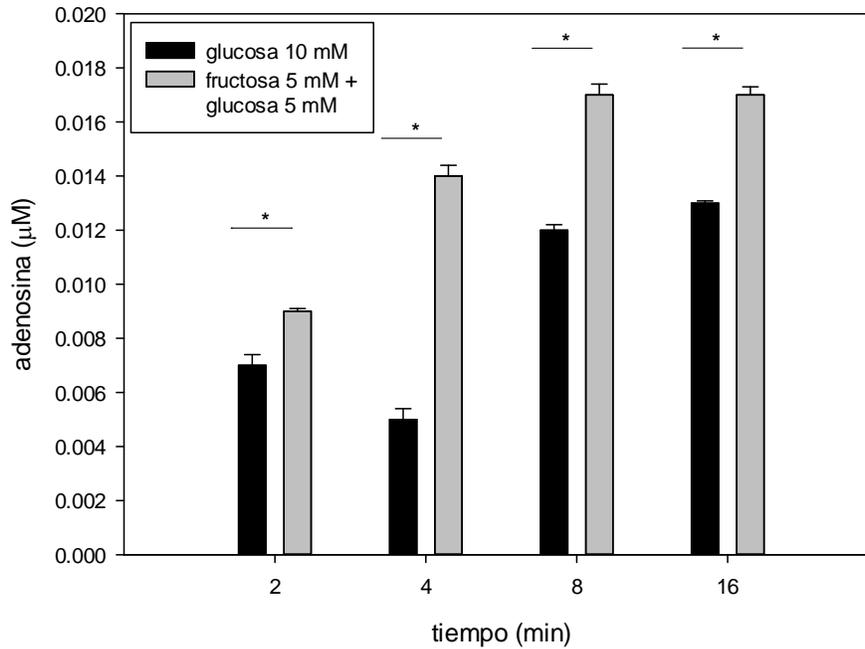
### La fructosa eleva los niveles de Inosina.

En experimentos previos, realizados por la Dra. Guinzberg de nuestro grupo de trabajo, se encontró que al perfundir hígado de rata con una solución que contiene glucosa 5 mM y fructosa 5 mM, las concentraciones de adenosina e inosina fueron mayores en el perfusado con la solución de glucosa 5 mM y fructosa 5 mM a diferencia de un hígado perfundido con glucosa 10 mM (Figs. 1 y 2).

Desde que se reportó que los receptores de adenosina están involucrados en la regulación de glucosa hepática y metabolismo del glucógeno [47, 48], los cambios en la expresión de los receptores de adenosina pueden ser un factor importante que module el metabolismo intermedio en el hígado.

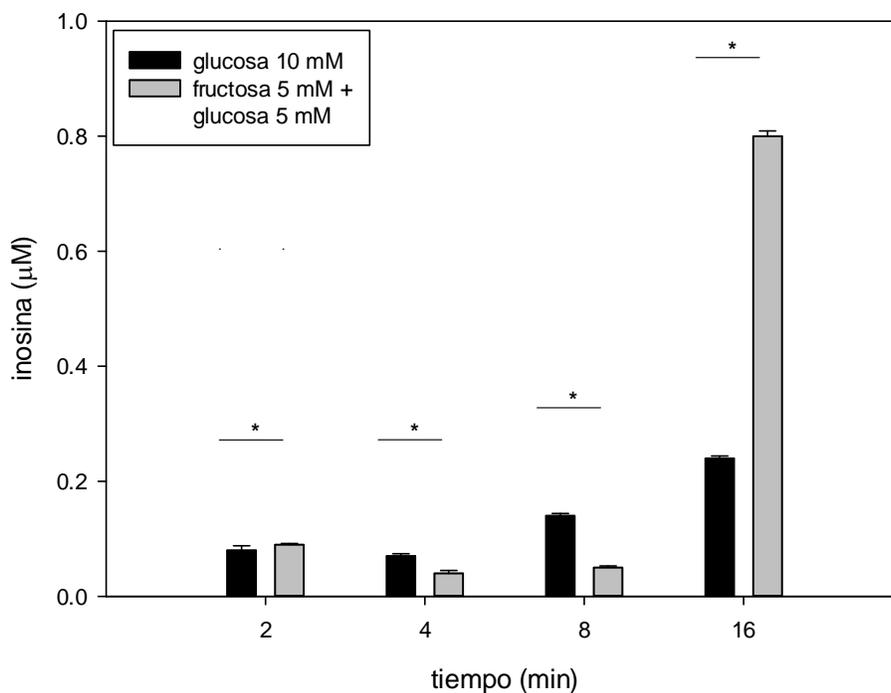
En el contexto anterior, se ha reportado que en el riñón de rata con diabetes, los niveles de ARNm del receptor de adenosina  $A_1$  están incrementados 1.7 y 2.8 veces en corteza y medula, respectivamente [49]. De igual manera, pero en miocitos de corazón de ratas diabéticas, se encontró que el ARNm del receptor de adenosina  $A_3$  estaba 60% elevado en comparación al de una rata sin diabetes [50]. En otro experimento donde se indujo la diabetes con estreptozotocina en ratas, se encontró un incremento de 2 y 1.8 veces en el ARN mensajero de los receptores de adenosina  $A_{2A}$  y  $A_3$ , respectivamente, acompañado de un incremento de 2 y 1.6 veces, respectivamente en la proteína de los receptores, mientras que para el ARN mensajero de  $A_{2B}$  decreció 40% y la proteína del receptor cayó 60% en hígado [51].

### Concentración de adenosina en perfusado



**Figura 1. Concentración de adenosina en perfusado de hígado de rata.** Se aislaron hígados de rata y se perfundieron (en sistema abierto) con una solución Krebs-Ringer a la que se le adicionó glucosa 10 mM y otra solución con glucosa 5 mM mas fructosa 5 mM, el perfusado se recolecto al minuto 2, 4, 8 y 16 para posteriormente medir el nucleósido. Los valores están reportados como la media  $\pm$  el error estándar. Se aplicó la prueba *t*-Student desapareada para evaluar las diferencias entre los dos grupos (n=4). La diferencia significativa se estableció con  $P < 0.05$ .

## Concentración de inosina en perfusado



**Figura 2. Concentración de inosina en perfusado de hígado de rata.** Se aislaron hígados de rata y se perfundieron (en sistema abierto) con una solución Krebs-Ringer a la que se le adicionó glucosa 10 mM y otra solución con glucosa 5 mM mas fructosa 5 mM, el perfusado se recolecto al minuto 2, 4, 8 y 16 para posteriormente medir el nucleósido. Los valores están reportados como la media  $\pm$  el error estándar. Se aplicó la prueba *t*-Student desapareada para evaluar las diferencias entre los dos grupos (n=4). La diferencia significativa se estableció con  $P < 0.05$

Todo lo anterior llevó a formular la siguiente hipótesis de trabajo.

## HIPÓTESIS

El aumento en el consumo de fructosa eleva la concentración sanguínea de inosina y como consecuencia, disminuye el ARNm del receptor para la adenosina A<sub>3</sub> en el hepatocito de rata.

## OBJETIVOS

Evaluar el cambio en la concentración de inosina en el suero y en el perfusado de hígado de ratas alimentadas con exceso de fructosa.

Cuantificar el ARNm del receptor para la adenosina A<sub>3</sub> en hepatocitos de ratas control y alimentadas con exceso de fructosa.

## DISEÑO EXPERIMENTAL

Se utilizaron 30 ratas macho Wistar de 1 mes de edad alimentadas con alimento comercial *ad libitum*, de las cuales 15 fueron alimentadas con fructosa al 30% en agua de bebida y las otras 15 se utilizaron como control. Se dividieron en 5 grupos de 6 ratas cada uno (3 problema y 3 control), las ratas del grupo 1 se sacrificaron, sin previo ayuno, al primer mes de consumo de fructosa, las del grupo 2 al 2° mes y así sucesivamente hasta el 5° mes de consumo de fructosa.

A todas las ratas se les tomó muestra de sangre para determinar las concentraciones de adenosina e inosina en suero, y después se obtuvo una muestra del tejido hepático que se congeló con nitrógeno líquido para, posteriormente, aislar el ARNm para la técnica de PCR en tiempo real. El hígado restante se perfundió con solución Krebs-Ringer durante 10 minutos (35 ml/min), y después de este tiempo se tomó una muestra del perfusado para determinar la concentración de adenosina e inosina.

## MÉTODOS

### Obtención de hígado de rata

El hígado se aisló de las ratas por técnicas quirúrgicas, en combinación con la anestesia, se utilizaron los fármacos aprobados por la NOM-062-ZOO-1999 (ketamina y

xylazina, 75 mg/kg + 10 mg/kg, i.p.), y se realizó la eutanasia por exanguinación. Se incidió sobre el abdomen por la línea media para llegar a la cavidad abdominal y poder obtener una muestra de tejido hepático, que fue inmediatamente congelada en nitrógeno líquido para preservar el tejido hasta su uso.

### Muestras de sangre

Las muestras de sangre proveniente de la vena hepática se tomaron durante el aislamiento del hígado, una vez obtenida la muestra (200 µl) se mezcló con 10 µl de EDTA (15%), 3 µl de EHNA y 3 µl de dipiridamol para minimizar el metabolismo de la adenosina e inosina [52, 53], inmediatamente después se centrifugó a 1700 g, a 4°C durante 10 min. El sobrenadante fue separado y se congeló a -70°C hasta la cuantificación de la adenosina y la inosina.

### Hígado perfundido

El modelo de hígado de rata perfundido se utilizó en los experimentos. Se colocó una cánula en la vena porta, por la que se perfundió la solución Krebs-Ringer-Bicarbonato (NaCl 120 mM, KCl 5.7 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2 mM, NaHCO<sub>3</sub> 12 mM) después de 10 min (35 ml/min) de perfusión en sistema cerrado se tomó una muestra del perfusado, la cual se procesó igual que las de sangre para minimizar el metabolismo de la adenosina e inosina y se congeló hasta su uso para medir la concentración de los nucleósidos

### Medición de metabolitos

La inosina y la adenosina se midieron en suero y perfusado, por ensayo enzimático en espectrofotómetro de doble haz [54]. La determinación de la concentración de glucosa se hizo en el perfusado de hígado con el método de Fales [55]

### Aislamiento del ARN de tejido hepático

De la muestra de hígado congelado se obtuvo una porción de ~30 mg y se aisló el ARN con el kit SV Total RNA Isolation System de Promega.

### Cuantificación y pureza del ARN

Una vez aislado el ARN del tejido hepático se cuantificó en un equipo Nanodrop.

### Síntesis de cDNA a partir de ARNm

Para la síntesis de cDNA se aisló 2 µg de ARN con la relación de absorción a 280/260 nm, superior a 1.8 que es lo mínimo para utilizarlo en el PCR de tiempo real. Se incubó el ARNm con la enzima transcriptasa reversa en presencia de dNTP y

oligonucleótidos de deoxi-timina, para que la enzima sintetice DNA (cDNA) utilizando como molde el ARNm.

#### Diseño de oligonucleótidos para la técnica de PCR en tiempo real

Los oligonucleótidos utilizados fueron los reportados [56], los cuales se analizaron con el software oligo7. Además, se probaron los oligonucleótidos (gen constitutivo y gen de interés) a diferentes concentraciones de cDNA (1:5, 1:25, 1:125 y 1:625) para confirmar la eficiencia de éstos.

#### PCR en tiempo real

Se utilizó un termociclador de placa de 96 pozos de la marca Applied Biosystems con el kit Quantitect SYBR Green de Qiagen.

Las condiciones del termociclador fueron las sugeridas por el fabricante.

Se realizó una cuantificación relativa utilizando al gen Arbp y  $\beta$ -actina como constitutivo.

Los datos obtenidos se trabajaron con el método  $2(-\Delta\Delta CT)$ , conveniente para analizar el cambio relativo en la expresión de un gen en los experimentos con PCR en tiempo real [57, 58].

#### Métodos estadísticos

Los valores están reportados como la media  $\pm$  el error estándar. Se aplicó la prueba *t*-Student desapareada para evaluar las diferencias entre los dos grupos. La diferencia significativa se estableció con  $P < 0.05$ .

## RESULTADOS.

El promedio del peso corporal de las ratas control y tratadas se resume en la tabla 1. En el grupo que consumió fructosa se reportaron los pesos más bajos, aunque el análisis estadístico no marcó diferencia significativa entre el grupo control y el grupo que consumió fructosa.

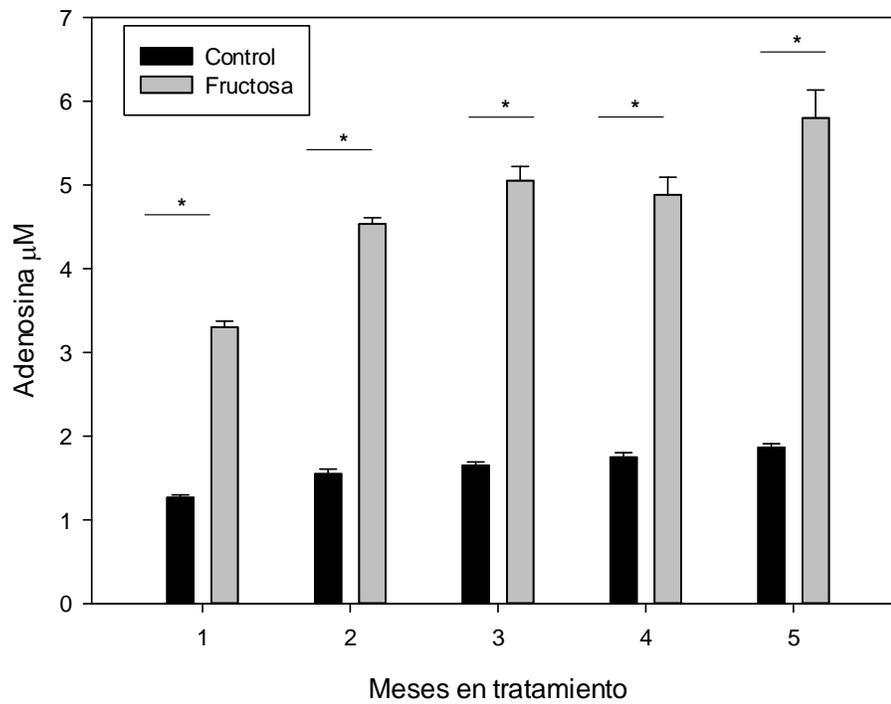
En el análisis del suero se encontró que la concentración de adenosina aumentó más del doble ( $P < 0.001$ ), desde el primer mes en que las ratas fueron sometidas al tratamiento con fructosa (Fig. 3). Además, se observó que el aumento en la cifra de adenosina en suero, registrada en los animales con fructosa, es progresivo de manera que a los 5 meses de tratamiento se ha elevado a 3 veces el valor del animal control (Fig. 3).

	CONTROL		FRUCTOSA	
<b>Tiempo de tratamiento (meses)</b>	<i>Promedio (g)</i>	<i>Error E.</i>	<i>Promedio (g)</i>	<i>Error E.</i>
2	331	18.0	273	27.6
3	419	15.5	374	27.6
4	463	22.9	394	45.0
5	494	6.0	430	86.2

**Tabla 1. Peso promedio de las ratas del grupo control y las que consumieron fructosa al 30% en el agua de bebida.**

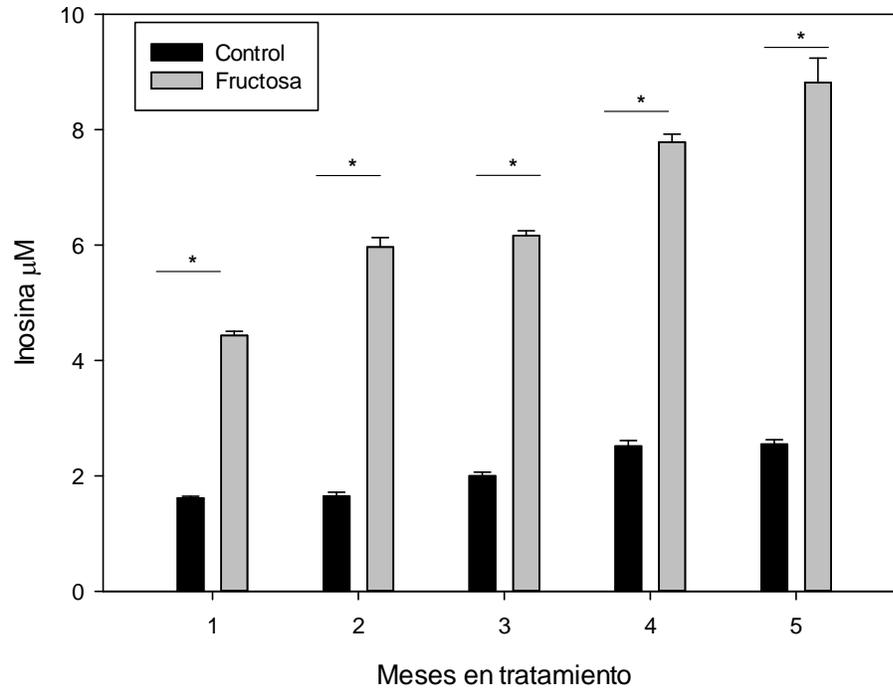
En el caso de los valores de inosina en el suero de las ratas, se observa que las cifras basales de inosina en las ratas control es el doble de la registrada para la adenosina (Fig. 4), lo cual concuerda con datos previos de la literatura, algunos publicados por nuestro grupo de trabajo [59]. Desde el primer mes del tratamiento de las ratas con fructosa se observa, en comparación con las ratas control, elevación de 2.7 veces en la concentración de inosina en suero, cifra que al igual que la adenosina, muestra tendencia a subir con el tiempo de tratamiento, y a los 5 meses ya es 3.5 veces mayor que el valor de inosina obtenida en las ratas control (Fig. 4).

Concentración de adenosina en suero.



**Figura 3. Concentración micromolar de la adenosina en el suero de las ratas del grupo control y del grupo con fructosa al 30% en el agua de bebida.**

### Concentración de inosina en suero.



**Figura 4. Concentración micromolar de la inosina en el suero de las ratas del grupo control y del grupo con fructosa al 30% en el agua de bebida.**

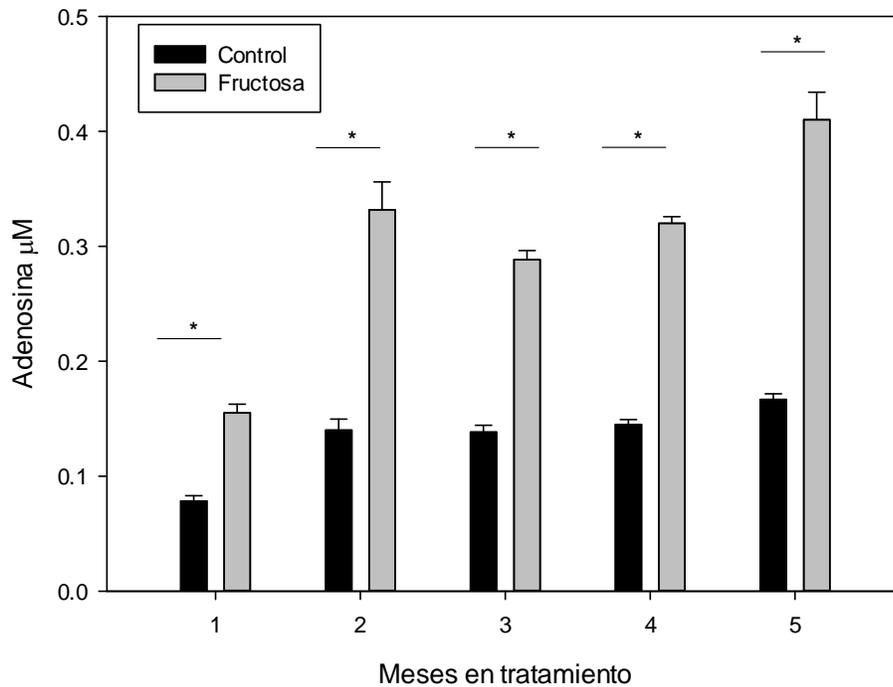
La presencia de adenosina en el perfusado de las ratas que recibieron fructosa siempre es, cuando menos, dos veces mayor a las cifras de adenosina liberada por los hígados perfundidos de las ratas control (Fig. 5). Aquí también, como en el caso del suero, la administración de la fructosa a lo largo del tiempo muestra respuestas cada vez más grandes, mientras que la liberación de adenosina al mes de recibir la fructosa es del doble, a los 5 meses ya es 2.5 veces mayor.

La liberación de inosina en el perfusado de los hígados control y los tratados con fructosa, reflejan lo observado al medir las concentraciones de inosina en suero. La cantidad de inosina liberada al líquido de perfusión, en general, es mayor que la de adenosina. Este hecho es cuantitativamente claro en las ratas mantenidas con fructosa en el agua de bebida por un período de 5 meses, cuando la inosina liberada es 3 veces mayor de lo observado al final del primer mes de dieta, y llega a ser 7 veces mayor a lo observado al quinto mes de iniciado el experimento en ratas control con agua (Fig. 6).

Nótese que en los experimentos de perfusión de los hígados se omitió la glucosa, fructosa o algún otro sustrato oxidable. Lo anterior sugiere que la inclusión de fructosa en la bebida promueve un ajuste metabólico en el hígado de la rata, que lo hace responsable de liberar mayor cantidad de adenosina e inosina.

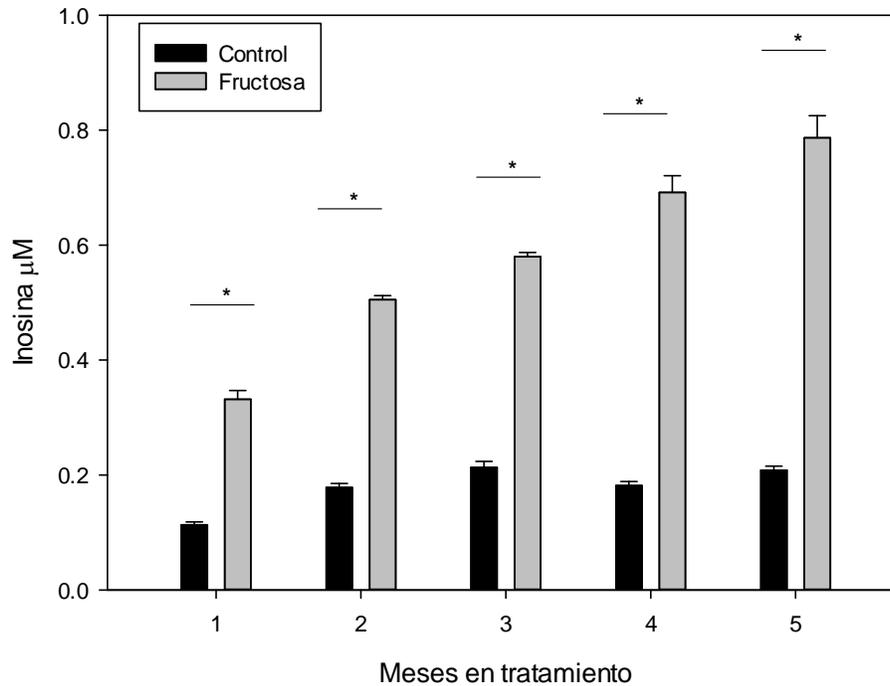
El siguiente experimento consistió en cuantificar la glucosa liberada por el hígado de las ratas sometidas a la dieta con fructosa. Los resultados indican que se libera más glucosa de los hígados perfundidos, de ratas que recibieron fructosa en el agua de bebida (Fig. 7). Dada la ausencia de sustratos oxidables en la solución a perfundir, la información obtenida sugiere que la glucosa presente en el perfusado proviene de la hidrólisis de glucógeno hepático.

### Concentración de adenosina en perfusado.



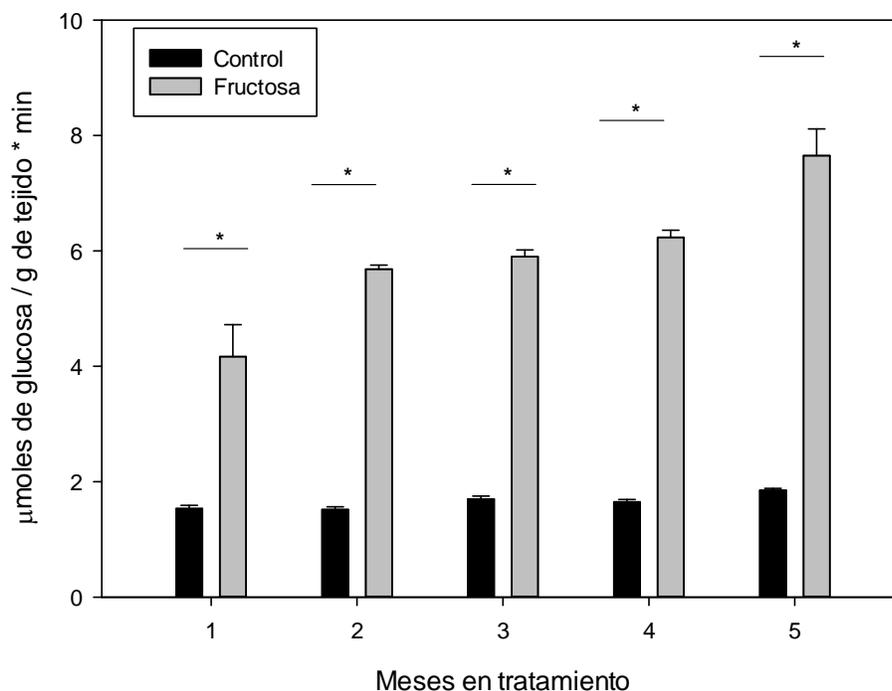
**Figura 5. Concentración micromolar de la adenosina en el perfusado de hígado de las ratas del grupo control y del grupo con fructosa al 30% en el agua de bebida. El hígado se perfundió con una solución Krebs-Ringer durante 10 minutos (35 ml/min), y después de este tiempo se tomó una muestra del perfusado para determinar la concentración de adenosina.**

### Concentración de inosina en perfusado.



**Figura 6. Concentración micromolar de la inosina en el perfusado de hígado de las ratas del grupo control y del grupo con fructosa al 30% en el agua de bebida. El hígado se perfundió con una solución Krebs-Ringer durante 10 minutos (35 ml/min), y después de este tiempo se tomó una muestra del perfusado para determinar la concentración de inosina.**

### Concentración de glucosa en perfusado.



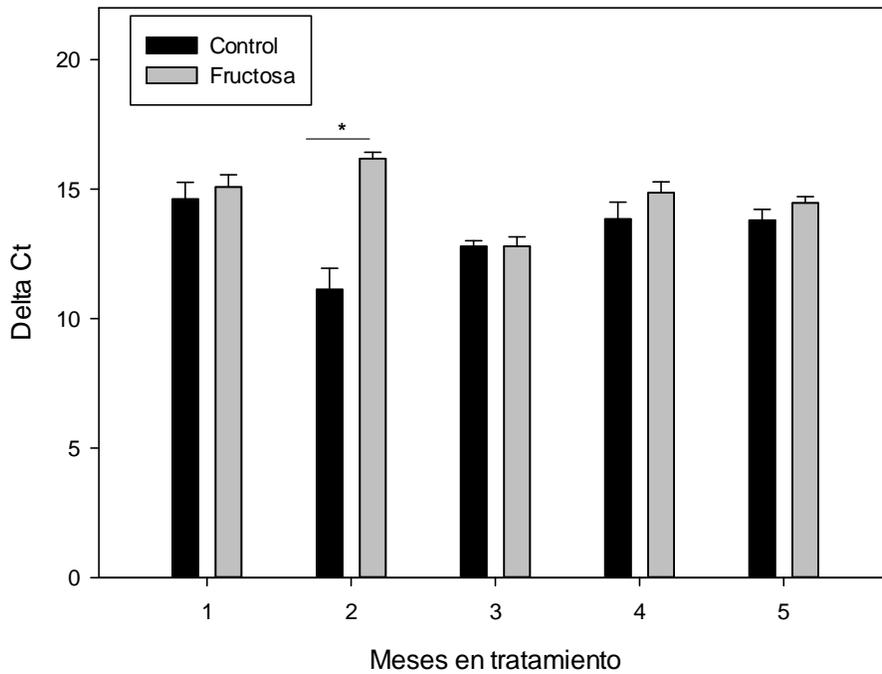
**Figura 7. Concentración micromolar de glucosa en perfusado de hígado de las ratas del grupo control y del grupo con fructosa al 30% en el agua de bebida.** El hígado se perfundió con una solución Krebs-Ringer durante 10 minutos (35 ml/min), después de este tiempo se tomó una muestra del perfusado para determinar la concentración de glucosa. Al final, se pesó el hígado para determinar el contenido de glucosa por gramo de tejido perfundido.

Para el estudio del receptor de la adenosina  $A_3$  se utilizaron 2 genes constitutivos para la técnica de PCR en tiempo real, el gen de  $\beta$ -actina y el de la fosfoproteína ribosomal acídica (Arbp).

Al utilizar el gen Arbp como constitutivo, se encontró que el ARNm del receptor de la adenosina  $A_3$  tuvo diferencia ( $P < 0.001$ ) para el segundo mes de dieta (Fig. 8), donde la expresión del ARNm del receptor  $A_3$  disminuyó 33 veces con respecto al control; al hacer el análisis del receptor de la adenosina  $A_3$  utilizando como gen constitutivo  $\beta$ -actina, se obtuvo un

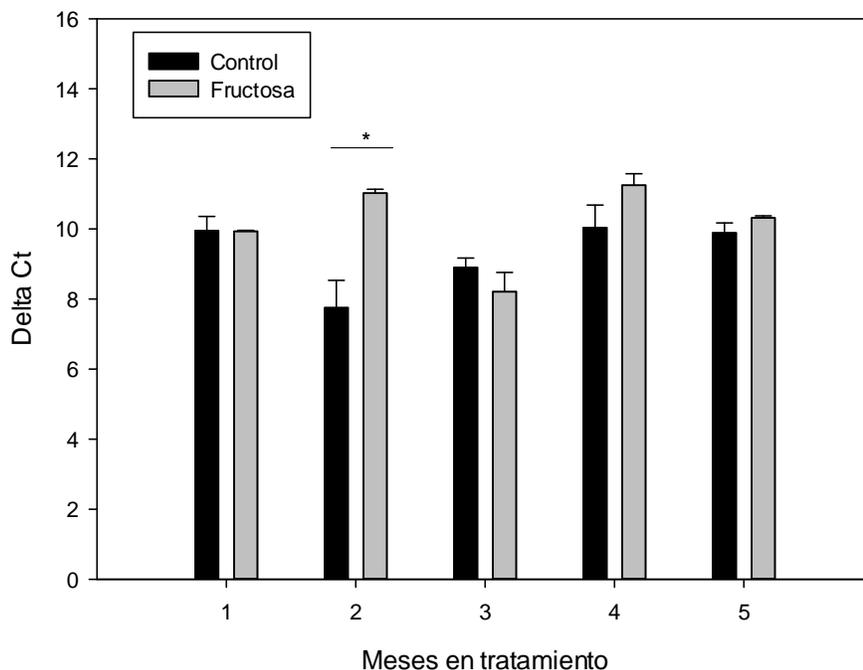
resultado similar con igual diferencia ( $P < 0.001$ ) en el segundo mes de dieta (Fig. 9), solo que la expresión del ARNm del receptor  $A_3$  disminuyó 9.6 veces.

Diferencial de Ct del receptor  $A_3$  usando Arbp como constitutivo.



**Figura 8. Diferencial de Ct del receptor de la adenosina  $A_3$  utilizando Arbp como gen constitutivo.** Un valor alto de  $\Delta Ct$  significa baja expresión del gen del receptor de la adenosina.

Diferencial de Ct del receptor  $A_3$  usando  $\beta$ -actina como constitutivo.



**Figura 9. Diferencia de Ct del receptor de la adenosina  $A_3$  utilizando  $\beta$ -actina como gen constitutivo.** Un valor alto de  $\Delta$ Ct significa baja expresión del gen del receptor de la adenosina.

## DISCUSIÓN

Los resultados contenidos en esta tesis pueden analizarse en dos etapas: en la primera, lo relativo a los cambios metabólicos ocasionados por la administración de fructosa al 30% en el agua de bebida, y en la segunda etapa los posibles ajustes en la síntesis de ARNm de los receptores de la adenosina, en un intento de explicar los cambios metabólicos observados.

Es indudable que el exceso de fructosa en la dieta de las ratas provocó una mayor concentración en suero de los nucleósidos estudiados, la adenosina y la inosina. Además, una vez que se extrajo el hígado de las ratas con dieta alta en fructosa y se perfundió en ausencia de una fuente de carbono, se sostiene en ese hígado la condición observada mientras estaba *in vivo*, esto es, la de liberar mayores cantidades de adenosina e inosina en

el líquido del perfusado. Hay que hacer notar que no es necesaria la fructosa en el líquido de perfusado para que continúe liberándose más adenosina y, sobre todo, más inosina de los hígados (Figs. 5 y 6). Esto es, el hígado afectado por la dieta con exceso de fructosa, está programado durante cierto tiempo para mantener ese ajuste metabólico.

Si bien en este trabajo no se midieron los valores de ATP hepático, la literatura al respecto es abundante y concluyente: la administración de un exceso de fructosa en la dieta disminuye la poza hepática de ATP [31-33, 60], debido a que la fructosa es rápidamente fosforilada por la enzima fructocinasa utilizando ATP, lo que conlleva a un incremento del ADP y AMP, y por otra parte ocasiona un decremento en la concentración de fósforo inorgánico; mientras la concentración de fósforo inorgánico disminuye, la enzima adenosina desaminasa es activada, además la alta concentración de su sustrato (AMP), evidentemente favorece el catabolismo de los nucleótidos de adenina [61]. Sin embargo, un proceso menos estudiado es el conjunto de consecuencias y ajustes que suceden en el hígado, y en el organismo, debido a la baja en la poza del ATP hepático. Estudios previos en nuestro laboratorio [59] y en otros laboratorios [54, 62] muestran que la falta transitoria de oxígeno promueve la salida de adenosina a la circulación por los órganos afectados, muy probablemente debido al abatimiento en la poza celular de ATP. Por consiguiente, en los hígados de ratas con exceso de fructosa en la dieta, la adenosina y la inosina liberadas al exterior de las células tienen su origen en la menor poza de ATP descrita por numerosos autores, que se convierte en ADP, que al no ser fosforilada se transforma sucesivamente en AMP, adenosina e inosina. Ambos nucleósidos, adenosina e inosina no se almacenan y salen de la célula. Llama la atención que no existen estudios sobre las consecuencias de la mayor concentración circulante de esos nucleósidos, sobre todo, cuando es bien conocida la presencia de receptores a la adenosina en numerosas estirpes celulares [19, 20, 45].

Una consecuencia por la mayor concentración de adenosina e inosina en la circulación, se ha estudiado por nuestro grupo de trabajo y se analizó en esta tesis. En el trabajo previo [59], encontramos que la estimulación *in vivo* de los receptores A<sub>3</sub> de la adenosina en el hígado de rata, provocada por inosina y adenosina liberadas en mayor cantidad por el propio hígado, elevó la glucogenólisis hepática y aumentó la formación de glucosa, que es liberada a la sangre donde eleva su concentración.

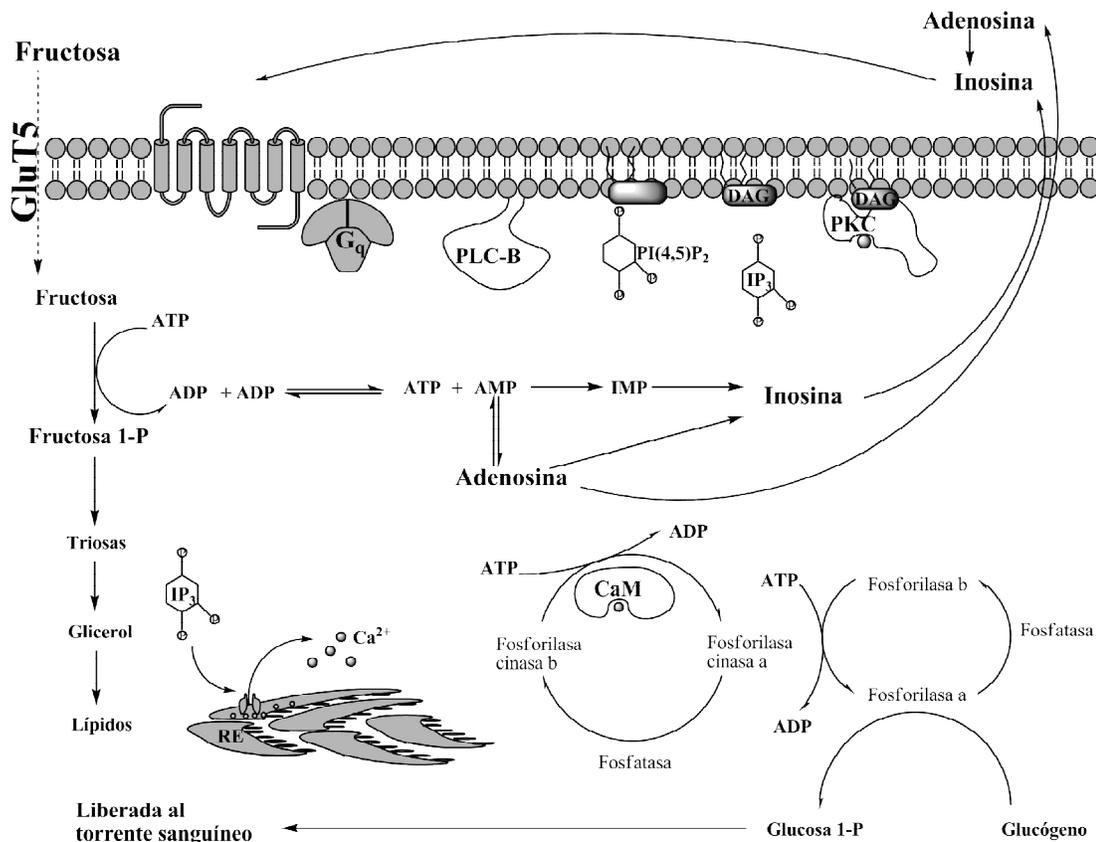
Los datos obtenidos en la presente tesis describen que los hígados, de ratas que bebieron fructosa al 30%, liberan al perfusado el doble de glucosa que los hígados de rata control (Fig. 7). Es conveniente agregar que en las ratas con fructosa en la dieta, este monosacárido pudo contribuir a sintetizar más glucógeno hepático, en comparación a la que sucede en la rata control, y con ello, al estimular el receptor A<sub>3</sub> de la célula hepática rica en glucógeno, aumenta la posibilidad de liberar mayor cantidad de glucosa. Un resumen de lo

discutido hasta aquí se incluye en la figura 10. En esa figura, todo apunta a que el receptor  $A_3$  de la adenosina en el hígado, el único de los 4 receptores hepáticos de la adenosina que es activado por la inosina [59], puede ser la clave para entender mejor el esquema propuesto. Lo anterior adquiere mayor relevancia si recordamos que la inhibición *in vivo* del receptor  $A_3$  de la adenosina en el hígado, ocasionada por la administración de un antagonista selectivo para ese receptor, impide la hiperglucemia observada por la inosina y la adenosina liberadas a la circulación por el propio hígado [59].

En este proyecto evaluamos el impacto del consumo de fructosa en la expresión del receptor para la adenosina  $A_3$  en hígado de rata. Los resultados obtenidos muestran que se encontró cambio en la expresión solo en el segundo mes de consumo de fructosa y que en los demás grupos no hubo ningún cambio aparente. Se puede sugerir que en estas células se disminuyeran los niveles de ARNm del receptor para bloquear el estímulo constante por parte de la inosina al receptor  $A_3$ , pero después la célula regresa a sus niveles de ARNm normales como si se adaptara al estímulo o como si hubiera un tipo de regulación en otro punto de la señalización. Para poder dilucidar esto es conveniente ampliar el proyecto en el tiempo de los 2 meses de consumo de fructosa y evaluar no cada mes, sino cada 15 días para ver en qué momento empieza a disminuir los niveles de ARNm y en qué momento regresan al nivel basal.

La importancia de conocer la regulación de los receptores de la adenosina, y en especial el  $A_3$ , es por el metabolismo de la glucosa, dado que el consumo de fructosa en ratas es un modelo de síndrome metabólico y este se caracteriza por glucemia alta, la regulación de glucosa en sangre por parte del hígado es un punto clave para entender este síndrome. Si la célula hepática regula los receptores  $A_3$ , en algún punto de la vía de señalización, la salida de glucosa al torrente sanguíneo se verá disminuida, aun cuando esté presente el estímulo de la inosina.

Por otra parte, no se encontraron cambios en los niveles de ARNm, pero no significa que el receptor no esté regulado de algún otro modo, ya sea por fosforilaciones en el receptor, secuestro del receptor en membranas, o procesos enzimáticos que terminen o disminuyan la señalización del receptor.



**Figura 10. Metabolismo de la fructosa en el hígado.** La fructosa entra a la célula por transportadores GluT5 y es rápidamente fosforilada, esto provoca una baja en la poza de ATP por secuestro del fosforo inorgánico y un aumento de AMP y ADP que es catabolizado hacia adenosina e inosina, estos nucleósidos salen de la célula y activan al receptor A3, este receptor se encuentra acoplado a la proteína  $G_q$  que activa a la fosfolipasa C- $\beta$  (PLC-B) y esta actúa sobre el fosfatidil inositol 4,5-bisfosfato (PI (4,5) $P_2$ ) para degradarlo en diacilglicerol (DAG) y en inositol 1,4,5-trifosfato ( $IP_3$ ), este último actúa sobre los canales de  $Ca^{2+}$  del retículo endoplasmico (RE) y el DAG activa la proteína cinasa dependiente de  $Ca^{2+}$  (PKC). El  $Ca^{2+}$ , liberado por los canales del retículo endoplásmico hacia el citosol, se une a los sitios alostericos de la PKC y de la calmodulina (CaM), una vez activa la CaM fosforila a la fosforilasa cinasa b para activarla y que esta a su vez fosforile a la fosforilasa b para activarla y que esta última hidrolize al glucógeno en glucosa 1-P y finalmente liberar glucosa al torrente sanguíneo. Además la fructosa fosforilada es utilizada para la síntesis de lípidos a través de la formación de glicerol.

## CONCLUSIÓN

Uno de los objetivos del trabajo fue evaluar la existencia de un cambio en la expresión del receptor de la adenosina  $A_3$ , a nivel de ARNm, que pudiera contrarrestar la estimulación constante por la inosina, debido al aumento en su concentración circulante. Dicho cambio sólo se observó en el grupo tratado por 2 meses, pero no en los demás grupos. Este resultado no era el esperado, ya que si la concentración de inosina aumenta conforme aumenta el tiempo de dieta, esperábamos que la cantidad de ARNm del receptor  $A_3$  fuera inversamente proporcional a la concentración de inosina. Por otra parte, los resultados obtenidos nos permiten sugerir que al no regularse los receptores de la adenosina, a nivel del ARNm, debe existir aumento en la actividad del receptor, dado que la glucosa en perfusado aumentó con el tiempo de dieta. Es de suponer que la glucosa liberada por el hepatocito podría provenir de glucogenólisis, por lo que sería muy importante cuantificar el contenido de glucógeno hepático de ratas alimentadas con fructosa, en comparación con el de las ratas control, para definir si el aumento de glucosa encontrado en perfusado se debe a un exceso de glucógeno, o bien a un aumento en la gluconeogénesis; lo cual ayudaría a confirmar la idea de que el receptor de la adenosina  $A_3$  mantiene aumentada su actividad.

## REFERENCIAS

1. Fox, I.H. and W.N. Kelley, *The role of adenosine and 2'-deoxyadenosine in mammalian cells*. Annu Rev Biochem, 1978. **47**: p. 655-86.
2. Olsson, R.A. and J.D. Pearson, *Cardiovascular purinoceptors*. Physiol Rev, 1990. **70**(3): p. 761-845.
3. Sala-Newby, G.B., et al., *Distinct roles for recombinant cytosolic 5'-nucleotidase-I and -II in AMP and IMP catabolism in COS-7 and H9c2 rat myoblast cell lines*. J Biol Chem, 2000. **275**(16): p. 11666-71.
4. Spychala, J., et al., *Cloning of human adenosine kinase cDNA: sequence similarity to microbial ribokinases and fructokinases*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(3): p. 1232-7.
5. Arch, J.R. and E.A. Newsholme, *The control of the metabolism and the hormonal role of adenosine*. Essays Biochem, 1978. **14**: p. 82-123.
6. Lloyd, H.G. and B.B. Fredholm, *Involvement of adenosine deaminase and adenosine kinase in regulating extracellular adenosine concentration in rat hippocampal slices*. Neurochem Int, 1995. **26**(4): p. 387-95.
7. Fredholm, B.B., et al., *International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors*. Pharmacol Rev, 2001. **53**(4): p. 527-52.
8. Collis, M.G. and S.M. Hourani, *Adenosine receptor subtypes*. Trends Pharmacol Sci, 1993. **14**(10): p. 360-6.
9. Watson, S. and D. Girdlestone, *TiPS on nomenclature*. Trends Pharmacol Sci, 1995. **16**(1): p. 15-6.
10. Libert, F., et al., *Selective amplification and cloning of four new members of the G protein-coupled receptor family*. Science, 1989. **244**(4904): p. 569-72.
11. Libert, F., et al., *The orphan receptor cDNA RDC7 encodes an A1 adenosine receptor*. EMBO J, 1991. **10**(7): p. 1677-82.
12. Maenhaut, C., et al., *RDC8 codes for an adenosine A2 receptor with physiological constitutive activity*. Biochem Biophys Res Commun, 1990. **173**(3): p. 1169-78.
13. Olah, M.E., H. Ren, and G.L. Stiles, *Adenosine receptors: protein and gene structure*. Arch Int Pharmacodyn Ther, 1995. **329**(1): p. 135-50.
14. Ostrowski, J., et al., *Mutagenesis of the beta 2-adrenergic receptor: how structure elucidates function*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1992. **32**: p. 167-83.
15. Stehle, J.H., et al., *Molecular cloning and expression of the cDNA for a novel A2-adenosine receptor subtype*. Mol Endocrinol, 1992. **6**(3): p. 384-93.
16. Salvatore, C.A., et al., *Molecular cloning and characterization of the human A3 adenosine receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(21): p. 10365-9.
17. Dixon, A.K., et al., *Tissue distribution of adenosine receptor mRNAs in the rat*. Br J Pharmacol, 1996. **118**(6): p. 1461-8.
18. Arnold, S.T. and R.L. Cysyk, *Adenosine export from the liver: oxygen dependency*. Am J Physiol, 1986. **251**(1 Pt 1): p. G34-9.

19. Pillwein, K., H.N. Jayaram, and G. Weber, *Effect of ischemia on nucleosides and bases in rat liver and hepatoma 3924A*. *Cancer Res*, 1987. **47**(12): p. 3092-6.
20. Rustum, Y.M., *High-pressure liquid chromatography. I. Quantitative separation of purine and pyrimidine nucleosides and bases*. *Anal Biochem*, 1978. **90**(1): p. 289-99.
21. Gonzalez-Benitez, E., et al., *Regulation of glycogen metabolism in hepatocytes through adenosine receptors. Role of Ca<sup>2+</sup> and cAMP*. *Eur J Pharmacol*, 2002. **437**(3): p. 105-11.
22. Zentella de Pina, M., et al., *"Hormone-like" effect of adenosine and inosine on gluconeogenesis from lactate in isolated hepatocytes*. *Life Sci*, 1989. **45**(23): p. 2269-74.
23. Guinzberg, R., et al., *Effect of adenosine and inosine on ureagenesis in hepatocytes*. *Biochem J*, 1987. **245**(2): p. 371-4.
24. Elliott, S.S., et al., *Fructose, weight gain, and the insulin resistance syndrome*. *Am J Clin Nutr*, 2002. **76**(5): p. 911-22.
25. Daly, M.E., et al., *Dietary carbohydrates and insulin sensitivity: a review of the evidence and clinical implications*. *Am J Clin Nutr*, 1997. **66**(5): p. 1072-85.
26. Rutledge, A.C. and K. Adeli, *Fructose and the metabolic syndrome: pathophysiology and molecular mechanisms*. *Nutr Rev*, 2007. **65**(6 Pt 2): p. S13-23.
27. Corpe, C.P., C.F. Burant, and J.H. Hoekstra, *Intestinal fructose absorption: clinical and molecular aspects*. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 1999. **28**(4): p. 364-74.
28. Douard, V. and R.P. Ferraris, *Regulation of the fructose transporter GLUT5 in health and disease*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2008. **295**(2): p. E227-37.
29. Havel, P.J., *Dietary fructose: implications for dysregulation of energy homeostasis and lipid/carbohydrate metabolism*. *Nutr Rev*, 2005. **63**(5): p. 133-57.
30. Mayes, P.A., *Intermediary metabolism of fructose*. *Am J Clin Nutr*, 1993. **58**(5 Suppl): p. 754S-765S.
31. Latta, M., et al., *Metabolic depletion of ATP by fructose inversely controls CD95- and tumor necrosis factor receptor 1-mediated hepatic apoptosis*. *J Exp Med*, 2000. **191**(11): p. 1975-85.
32. Karczmar, G.S., et al., *Regulation of hepatic inorganic phosphate and ATP in response to fructose loading: an in vivo 31P-NMR study*. *Biochim Biophys Acta*, 1989. **1012**(2): p. 121-7.
33. Gaby, A.R., *Adverse effects of dietary fructose*. *Altern Med Rev*, 2005. **10**(4): p. 294-306.
34. Curry, D.L., *Effects of mannose and fructose on the synthesis and secretion of insulin*. *Pancreas*, 1989. **4**(1): p. 2-9.
35. Ganda, O.P., et al., *Metabolic effects of glucose, mannose, galactose, and fructose in man*. *J Clin Endocrinol Metab*, 1979. **49**(4): p. 616-22.

36. Rayner, C.K., et al., *Effects of intraduodenal glucose and fructose on antropyloric motility and appetite in healthy humans*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2000. **278**(2): p. R360-6.
37. Teff, K.L., et al., *Dietary fructose reduces circulating insulin and leptin, attenuates postprandial suppression of ghrelin, and increases triglycerides in women*. J Clin Endocrinol Metab, 2004. **89**(6): p. 2963-72.
38. Adams, S.H., et al., *Metabolic and endocrine profiles in response to systemic infusion of fructose and glucose in rhesus macaques*. Endocrinology, 2008. **149**(6): p. 3002-8.
39. Roglans, N., et al., *Impairment of hepatic Stat-3 activation and reduction of PPARalpha activity in fructose-fed rats*. Hepatology, 2007. **45**(3): p. 778-88.
40. Lee, Y.C., et al., *Plasma leptin response to oral glucose tolerance and fasting/re-feeding tests in rats with fructose-induced metabolic derangements*. Life Sci, 2006. **78**(11): p. 1155-62.
41. Kamari, Y., et al., *Metabolic stress with a high carbohydrate diet increases adiponectin levels*. Horm Metab Res, 2007. **39**(5): p. 384-8.
42. Rubio, R. and R.M. Berne, *Localization of purine and pyrimidine nucleoside phosphorylases in heart, kidney, and liver*. Am J Physiol, 1980. **239**(6): p. H721-30.
43. Guinzberg, R., et al., *Inosine released after hypoxia activates hepatic glucose liberation through A3 adenosine receptors*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2006. **290**(5): p. E940-51.
44. Fishman, P., et al., *Pharmacological and therapeutic effects of A(3) adenosine receptor agonists*. Drug Discov Today, 2011.
45. Ralevic, V. and G. Burnstock, *Receptors for purines and pyrimidines*. Pharmacol Rev, 1998. **50**(3): p. 413-92.
46. Sajjadi, F.G. and G.S. Firestein, *cDNA cloning and sequence analysis of the human A3 adenosine receptor*. Biochim Biophys Acta, 1993. **1179**(1): p. 105-7.
47. Hoffer, L.J. and J.M. Lowenstein, *Effects of adenosine and adenosine analogues on glycogen metabolism in isolated rat hepatocytes*. Biochem Pharmacol, 1986. **35**(24): p. 4529-36.
48. Buxton, D.B., et al., *Stimulation of glycogenolysis and vasoconstriction by adenosine and adenosine analogues in the perfused rat liver*. Biochem J, 1987. **248**(1): p. 35-41.
49. Pawelczyk, T., et al., *Region-specific alterations of adenosine receptors expression level in kidney of diabetic rat*. Am J Pathol, 2005. **167**(2): p. 315-25.
50. Grden, M., et al., *Altered expression of adenosine receptors in heart of diabetic rat*. J Physiol Pharmacol, 2005. **56**(4): p. 587-97.
51. Grden, M., et al., *Diabetes-induced alterations of adenosine receptors expression level in rat liver*. Exp Mol Pathol, 2007. **83**(3): p. 392-8.
52. Dornand, J., J.C. Bonnafous, and J.C. Mani, *Purification and properties of 5'-nucleotidase from lymphocyte plasma membranes*. Eur J Biochem, 1978. **87**(3): p. 459-65.

53. Shryock, J.C., et al., *A new method of sampling blood for measurement of plasma adenosine*. Am J Physiol, 1990. **258**(4 Pt 2): p. H1232-9.
54. Olsson, R.A., *Changes in content of purine nucleoside in canine myocardium during coronary occlusion*. Circ Res, 1970. **26**(3): p. 301-6.
55. Fales, F.W., *The aerobic assimilation of glucose by yeast cells*. J Biol Chem, 1960. **235**: p. 1255-7.
56. Novak, I., S.E. Hede, and M.R. Hansen, *Adenosine receptors in rat and human pancreatic ducts stimulate chloride transport*. Pflugers Arch, 2008. **456**(2): p. 437-47.
57. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. Methods, 2001. **25**(4): p. 402-8.
58. Schmittgen, T.D. and K.J. Livak, *Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method*. Nat Protoc, 2008. **3**(6): p. 1101-8.
59. Cortes, D., et al., *Evidence that endogenous inosine and adenosine-mediated hyperglycaemia during ischaemia-reperfusion through A3 adenosine receptors*. Auton Autacoid Pharmacol, 2009. **29**(4): p. 157-64.
60. Brosnan, M.J., et al., *Phosphocreatine protects ATP from a fructose load in transgenic mouse liver expressing creatine kinase*. Am J Physiol, 1991. **260**(6 Pt 1): p. C1191-200.
61. Maenpaa, P.H., K.O. Raivio, and M.P. Kekomaki, *Liver adenine nucleotides: fructose-induced depletion and its effect on protein synthesis*. Science, 1968. **161**(3847): p. 1253-4.
62. Kekesi, V., et al., *Pericardial concentrations of adenosine, inosine and hypoxanthine in an experimental canine model of spastic ischaemia*. Clin Sci (Lond), 2002. **103 Suppl 48**: p. 198S-201S.