



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

155
2e3

FACULTAD DE CIENCIAS

ESTUDIO SOBRE LA MODULACION DE LAS
MESTILACIONES POR ADENOSINA EN
HIGADO Y SANGRE DE RATA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A :

MA. DE LOURDES SANCHEZ SEVILLA



MEXICO, D. F.



1995

FACULTAD DE CIENCIAS
EMOCION ESCOLAR

FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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.

TESIS SIN PAGINACION

COMPLETA LA INFORMACION



INSTITUTO NACIONAL DE
VALORES
MORALES

SEÑOR(A) VALERIA ARRIBARRA IV
 Licenciada en Psicología, Examen Profesional
 Facultad de Ciencias
 Presente

Los abajo firmantes, comunicamos a Usted, que habiendo revisado el trabajo de Tesis que realizó con la pasante(s) Ma. de Lourdes Sánchez Sevilla,

con número de cuenta 7853002-1 con el Título:

"Estudio sobre la modulación de las metilaciones por Adenosina en hígado y sangre de rata"

Otorgamos nuestro Voto Aprobatorio y consideramos que a la brevedad deberá presentar su Examen Profesional para obtener el título de Bióloga.

GRADO	NOMBRE(S)	APELLIDOS COMPLETOS	FIRMA
Dr. en C.	Victoria	Chagoya de Sánchez.	
Director de Tesis M. en C.	Claudia	González Espinosa.	
M. en C.	Pablo Jorge	Suárez Munguía.	
Dr.	Agustín	Chávez Zamora.	
Suplente Biólogo	Julio	Prieto Sagredo.	
Suplente			

A G R A D E C I M I E N T O S

ESTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL INSTITUTO DE FISILOGIA CELULAR DE LA U.N.A.M., BAJO LA DIRECCION DE LA DRA. VICTORIA CHAGOYA DE SANCHEZ A QUIEN AGRADEZCO SU APOYO Y PACIENCIA PARA - LA ELABORACION DE ESTA TESIS.

TAMBIEN AGRADEZCO AL DR. JORGE SUAREZ Y AL DR. MAURICIO DIAZ POR SU CONSEJO Y ASESORAMIENTO, SIN EL CUAL NO HUBIERA SIDO POSIBLE ESTE TRABAJO.

D E D I C A T O R I A

A MI MADRE, MI ABUELITA Y A MI HERMANA
POR SU APOYO Y CONSEJO EN LA FORMACION
DE MI VIDA.

A MI ESPOSO POR SU PACIENCIA, COMPREN-
SION Y AMOR.

A TODAS LAS PERSONAS QUE CON SU CARIÑO
Y AMISTAD HAN CONTRIBUIDO A MI FELICI-
DAD A LO LARGO DE MI VIDA.

G R A C I A S

RESUMEN

Anteriormente se han reportado variaciones diarias de la adenosina (Ado) en diversos tejidos de la rata. El papel fisiológico de estos cambios con el fotoperíodo es desconocido al momento. La adenosina está involucrada en el metabolismo de la S-adenosilmetionina (SAM), que es el compuesto que dona grupos metilos en las reacciones de metilación, y su producto la S-adenosilhomocisteína (SAH), que al no ser hidrolizada por la enzima S-adenosilhomocisteína-hidrolasa (SAH-H) se acumula e inhibe las reacciones de metilación.

Pensamos que las variaciones diarias en la concentración de la adenosina podrían modular la actividad de las reacciones de metilación por lo que en este trabajo se exploraron, por técnicas convencionales, las concentraciones a lo largo del día de adenosina, S-adenosilmetionina, S-adenosil homocisteína (SAH) y de los fosfolípidos de las membranas de hígado y de sangre, de las ratas sometidas a un fotoperíodo de 12:12 de luz-oscuridad. Como también se midió la actividad de sustrato de la enzima (SAH-H), modulable por este sistema.

Los resultados indican que existen variaciones diarias de adenosina similares a las reportados anteriormente (44).

El aumento en la concentración de la adenosina durante la noche coincide con una baja actividad de la SAH-H y puede causar la acumulación de SAH que fue observada en coincidencia con concentraciones altas del nucleósido.

Un ejemplo de compuestos susceptibles de ser metilados por el SAM son los fosfolípidos. En este trabajo se encontró que presentan un patrón de cambios a lo largo del día similar al reportado anteriormente. Cuando se calculó el índice de metilación por la relación SAM/SAH y se comparó con el obtenido por la relación FC/FE, se observó un patrón similar a lo largo del día lo que sugiere que existe relación entre éstos dos parámetros y que la adenosina podría modular la metilación de fosfolípidos controlando la concentración de SAH por medio de la regulación de la enzima que la hidroliza.

INDICE

I.- ANTECEDENTES GENERALES	1
1.- La adenosina como un arma para el estudio del metabolismo intermedio	1
2.- Acciones de la adenosina.	3
a).- Efectos cardiovasculares.	3
b).- Efectos sobre acciones hormonales.	4
c).- Efectos sobre el sistema nervioso.	4
d).- Efecto sobre el AMP cíclico.	5
e).- Efectos citotóxico y de inmunosupresión	5
f).- Efectos metabólicos.	6
II.- ANTECEDENTES ESPECIFICOS.	6
1.- Formación de S-adenosilmetionina	6
2.- Degradación de S-adenosilmetionina.	8
3.- Metilación de fosfolípidos por S-adenosilmetionina.	8
a).- Localización de fosfolípidos en la membrana plasmática.	8
b).- Acción de las metil-transferasas.	10
c).- Flip flop de los fosfolípidos	10
d).- Efecto de las metilaciones en la fluidez de membrana.	12
e).- Efecto de las metilaciones sobre la adenilato ciclasa.	12
f).- Otros compuestos metilados por S-adenosilmetionina.	12
III.- IMPORTANCIA DEL CICLO CIRCADICO	14
IV.- HIPOTESIS	18
V.- OBJETIVO	18
VI.- METODO EXPERIMENTAL	19
1.- Preparación de las muestras en extracto perclórico	19

2.- Cuantificación de SAM, SAH y Ado	19
a).- Procesamiento de muestras en una precolumna de Sep-pak C 18.	19
b).- Determinación de SAM, SAH y Ado. en HPLC	20
3.- Identificación de productos	21
4.- Determinación de fosfolípidos.	21
a).- Extracción de fosfolípidos	21
b).- Separación de fosfolípidos por cromatografía.	21
c).- Revelado de la placa.	22
d).- Ensayo de Ames.	22
5.- Determinación de SAH-H	22
VI.- RESULTADOS	23
VII.-DISCUSION	36
VIII.- REFERENCIAS	38

INTRODUCCION :

I.- ANTECEDENTES GENERALES:

La adenosina es un nucleósido de purina, que constituye una molécula precursora de nucleótidos de adenina, como Adenosín monofosfato (AMP), Adenosín difosfato (ADP), Adenosín trifosfato (ATP) y Adenosín monofosfato cíclico (AMPc), necesarios para el metabolismo energético y en la constitución de coenzimas y material genético.

Una de las vías de formación de adenosina es a partir de la desfosforilación del AMP, por medio de fosfatasas y de la 5' nucleotidasa; otra vía es por la degradación de la S-adenosilhomocisteína (SAH) catalizada por la enzima S-adenosilhomocisteína hidrolasa SAH-H.

La adenosina se encuentra en cantidades pequeñas dentro de la célula, y se forma dentro de ella, o entra por difusión facilitada, por medio de un acarreador que media la captación de pirimidín y purín nucleósidos.

Este nucleósido puede ser removido de las células por medio de su liberación directa al medio extracelular, por medio de síntesis de nucleótidos de adenina o por la degradación de productos de purina. La conversión de adenosina a inosina o a nucleótidos de adenina, dentro de las células está regulada por las actividades de las enzimas adenosín deaminasa y adenosín quinasa respectivamente. (Fig 1)

1.-LA ADENOSINA COMO UN ARMA PARA EL ESTUDIO DEL METABOLISMO INTERMEDIO:

La adenosina tiene una gran actividad fisiológica cuyas concentraciones se encuentran en los límites de 10^{-6} M. Cuando se inyecta por vía intraperitoneal a dosis de 7.5×10^{-4} M, se llega a alcanzar un nivel hasta de cien veces mayor que el fisiológico normal. Con éstas

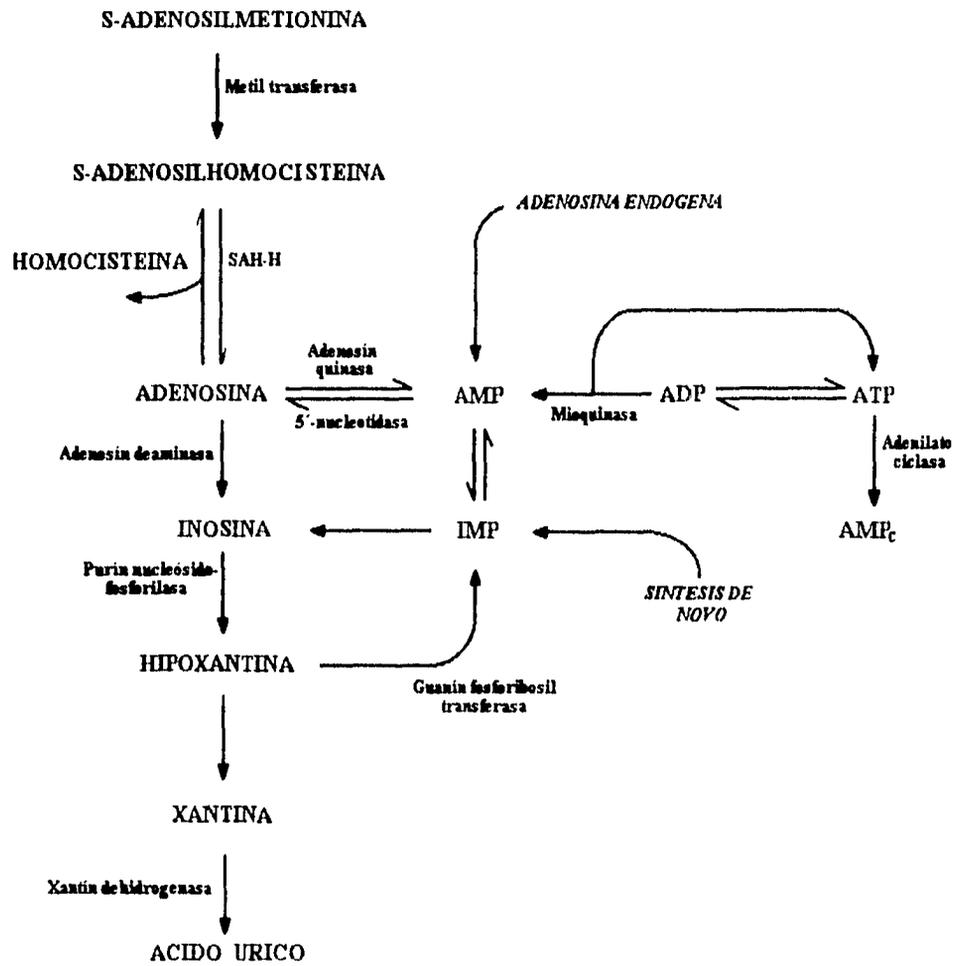


FIG.1: Vías de formación y degradación de adenosina.

concentraciones farmacológicas ha sido posible detectar puntos de regulación metabólica, por esta razón se ha considerado a la adenosina como un arma para el estudio del metabolismo intermedio (1).

La importancia fisiológica de esta molécula se manifiesta por la diversidad de eventos biológicos y bioquímicos en que participa.

Tales acciones son a nivel de diferentes órganos, a continuación se mencionan algunos de ellos:

2.- ACCIONES DE LA ADENOSINA

a) - Efectos cardiovasculares:

Se han descritos efectos farmacológicos desde 1929 (2), donde la adenosina bloquea la conducción auriculoventricular, baja la presión arterial, produce vasodilatación coronaria y sistémica, aumenta el flujo coronario (3), produce fibrilación auricular; posteriormente Rubio y Berne (4-5), proponen que esta sustancia también regula el flujo sanguíneo en el músculo esquelético y en el cerebro.

En el tejido miocárdico sometido a hipoxia se libera adenosina la cual produce la reducción en la resistencia coronaria, aumentando así, el flujo coronario. La aplicación de la adenosina a las aurículas aisladas de la rata produce efectos cronotrópicos e inotrópicos negativos (6). En el cerebro la adenosina es un potente dilatador de arteriolas cuando se aplica directamente a la superficie cerebral.

Presenta un efecto cronotrópico negativo sobre el nodo senoauricular (SA), bloquea la conducción a través del nodo auriculoventricular (AV). Acorta el período refractario funcional (PRF) del miocardio auricular y la prolongación del PRF, del nodo AV. Disminuye la contractilidad miocárdica en general. Promueve la fase de relajación y aumenta la capacitancia de las cámaras cardíacas. La acción farmacológica de un bolo de adenosina intravenosa, en el corazón dura aproximadamente 20 seg., ya que es rápidamente metabolizada (49).

b).- Efecto sobre acciones hormonales:

La adenosina tiene un efecto estimulador sobre la secreción de glucagon (7) y la hormona de crecimiento, inhibe la secreción de insulina bajo estímulo de glucosa (8) y estimula la síntesis de algunas hormonas, como la hormona de crecimiento, esteroides y prolactina (9). Modifica la acción metabólica de otras hormonas como es la de inhibir la lipólisis inducida por la adrenalina (10), la hormona adrenocorticotrópica (ACTH), la hormona de crecimiento y la hormona tirotrópica. Por otro lado inhibe la glucogenólisis inducida por adrenalina y glucagon en hepatocitos aislados (11). La adenosina estimula la esteroidogénesis, en las glándulas adrenales y en las células de Leyding (8). Incrementa la eritropoyesis y la secreción de histamina por células cebadas (6).

c).- Efecto en el sistema nervioso :

Se le ha asignado a la adenosina un papel de neurotransmisor y de depresor de los nervios de la corteza cerebral, ya que existen neuronas purinérgicas conteniendo vesículas de algunos neurotransmisores, constituidos esencialmente por adenosina y ATP, que al vaciarse en el espacio presináptico vierten al mismo tiempo el neurotransmisor y la purina, como lo ha reportado previamente Burnstock (12).

Posee también un efecto depresor en el sistema nervioso periférico y antagoniza los efectos analgésicos de la morfina

A nivel de la membrana se produce hiperpolarización y modulaciones de ruido de membrana por la aplicación iontoforética de la adenosina y la estimulación del tejido vascular o nervioso simpáticos, causan la liberación de adenosina y sus metabolitos. También se le ha asignado recientemente un papel hipnogénico (13).

d) .- Efecto de los niveles de AMP cíclico:

Este nucleósido aumenta los niveles de AMPc en músculo de miocardio, plaquetas y disminuye la concentración de este mismo en adipocitos, hígado y cerebro de rata.

Los efectos de la concentración de AMPc están relacionados con la presencia de un receptor específico para la adenosina que se encuentra en la membrana celular (15). La adenosina presenta un doble efecto ya que en algunos tejidos decrece y en otros aumenta la cantidad de AMPc.

Los receptores purinérgicos se clasifican en dos grupos principales: P₁, que son los que reconocen a la adenosina y posiblemente al monofosfato de adenosina y los receptores P₂, que reconocen al trifosfato de adenosina y al difosfato de adenosina. Además existen receptores específicos para la adenosina, que se clasifican en dos grupos principales: A₁, que inhiben a la enzima adenilato ciclasa y los A₂, que estimulan la actividad de dicha enzima al igual que los del tipo P₁.(8).

e) .- Efectos citotóxicos y de inmunosupresión:

La adenosina presenta efectos tóxicos en cultivos de células de mamífero y en bacterias en un rango de concentración de 1-1000 mM, inhibe el crecimiento de fibroblastos, linfocitos humanos, linfosarcomas de células T y en células de ovario de hámster chino

Los inhibidores de la adenosina deaminasa, potencian el bloqueo de la transferencia de monocitos a macrófagos, la inhibición de linfocitos mediante citólisis y la linfoblastogénesis mediada por mitógeno (11).

Los efectos citotóxicos son debidos principalmente a la inhibición de la síntesis de pirimidina, alteraciones en el metabolismo de fosforribosil pirofosfato, e impidiendo metilaciones de tal manera que hay fallas en la fisiología celular y en la transferencia de la información genética (6).

0) .- Efectos Metabólicos:

Se ha usado á este nucleósido como arma metabólica para evidenciar algunos puntos en la regulación del metabolismo de carbohidratos, lípidos y en el metabolismo energético. Se ha reportado por Chagoya y cols. (16-17), la acción de la adenosina en la inhibición de la acumulación del glucógeno hepático inducida por el cortisol, en el efecto glucogénico y lipogénico en hígado y tejido adiposo respectivamente (18). Su efecto en la glucógeno sintetasa de hígado de ratas normales, diabéticas y en presencia de cortisol (19). Dentro de sus acciones metabólicas en el hígado destaca el aumento de la carga energética del hepatocito (20), que junto con la inhibición en la activación citoplasmática de los ácidos grasos y su consecuente oxidación (21), permite demostrar *in vivo*, la regulación del metabolismo celular por la carga energética, ya que al aumentar ésta, aumentan los procesos que utilizan energía, como la síntesis de glucógeno y se inhiben las secuencias metabólicas que van a formar ATP como es la oxidación de los ácidos grasos.

II.- ANTECEDENTES ESPECIFICOS:

El nucleósido de adenina S-adenosilmetionina (SAM) es el compuesto activado del aminoácido metionina, de alta energía, que confiere gran labilidad al grupo metilo, que por medio de metiltransferasas dona grupos CH₃ a otros compuestos susceptibles de metilación. El SAM se considera como el principal compuesto donador de metilos en el metabolismo de mamíferos.

1.- FORMACION DE S-ADENOSILMETIONINA:

El S-adenosilmetionina se forma como un intermediario en la síntesis de Acetil-coenzima-A, a partir de metionina, Fig. 2; donde se observa que la molécula del aminoácido metionina es

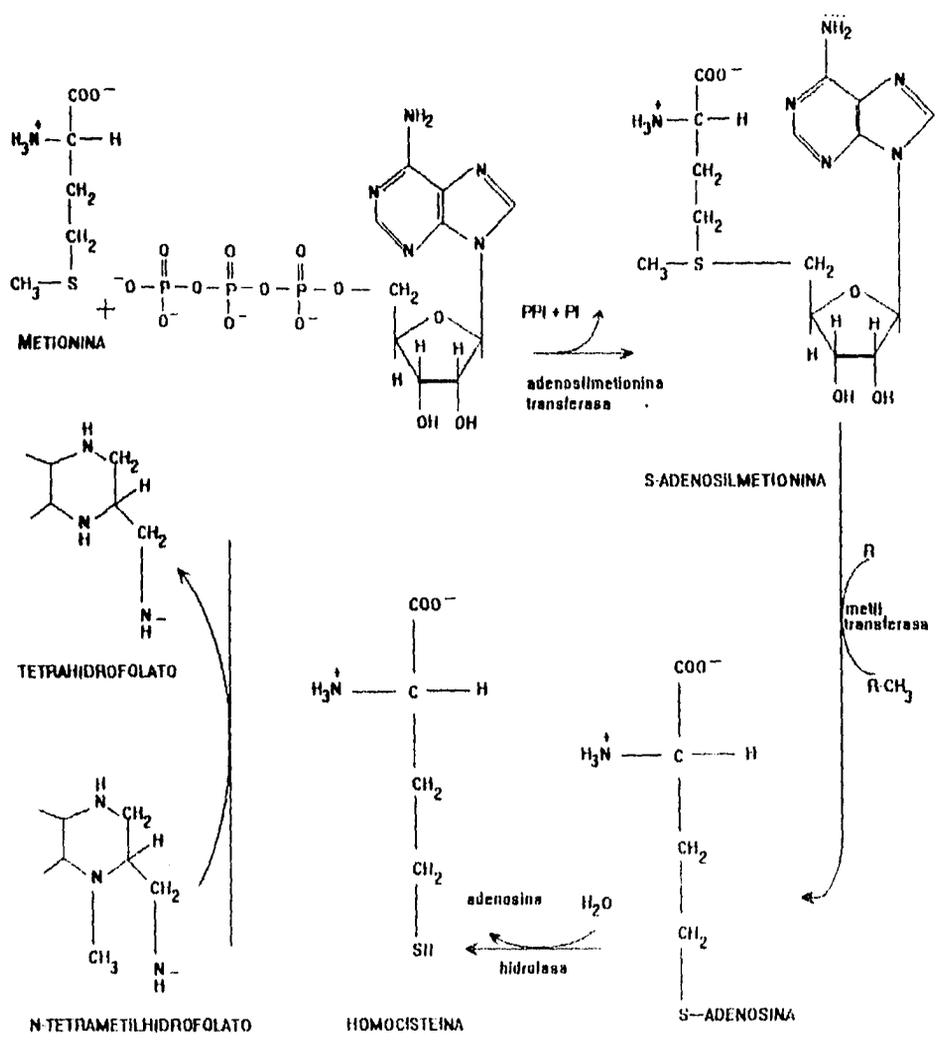


FIG. 2: Rutas de formación de s-adenosilmetionina.

activada por una enzima del hígado y se requiere de adenosín trifosfato, de fósforo inorgánico y de pirofosfato, dando como resultado una molécula capaz de donar grupos de metilos en otras reacciones metabólicas del organismo.(22).

2 .- DEGRADACION DE S-ADENOSILMETIONINA:

Se considera que las concentraciones de SAM, sintetizadas son utilizadas en las reacciones de transmetilación; esto ocurre por medio de las enzimas S-adenosilmetil-transferasas específicas a cada sustancia dando lugar a compuestos metilados y a formación de S-adenosilhomocisteina (SAH), siendo este un compuesto que actúa como fuerte inhibidor de las enzimas metilantes (23-27). La reacción, puede continuar por medio de la acción de la enzima S-adenosilhomocisteína-hidrolasa, que hidroliza el SAH, para dar lugar a la formación de homocisteína y adenosina. Fig. 3, debido a su acción reversible puede participar indirectamente para controlar, las metilaciones al aumentar los niveles celulares de SAH (28), lo cual implica el control de un número considerable de funciones celulares, incluyendo acoplamiento de excitación, secreción y la transducción de eventos mediados por receptores, todas estas funciones relacionadas con las funciones de metilación (29).

3 .-METILACIONES DE FOSFOLIPIDOS POR S-ADENOSILMETIONINA.

a).- Localización de fosfolípidos en la membrana plasmática.

La membrana plasmática está formada por una bicapa de lípidos dispuesta asimétricamente con la región hidrofóbica hacia la cara externa e interna de la membrana y la región hidrofílica hacia la parte media de la bicapa. Las proteínas forman parte constitutiva de la membrana siendo estas integrales y periféricas.

La composición tanto de los lípidos como de las proteínas en la membrana varía de

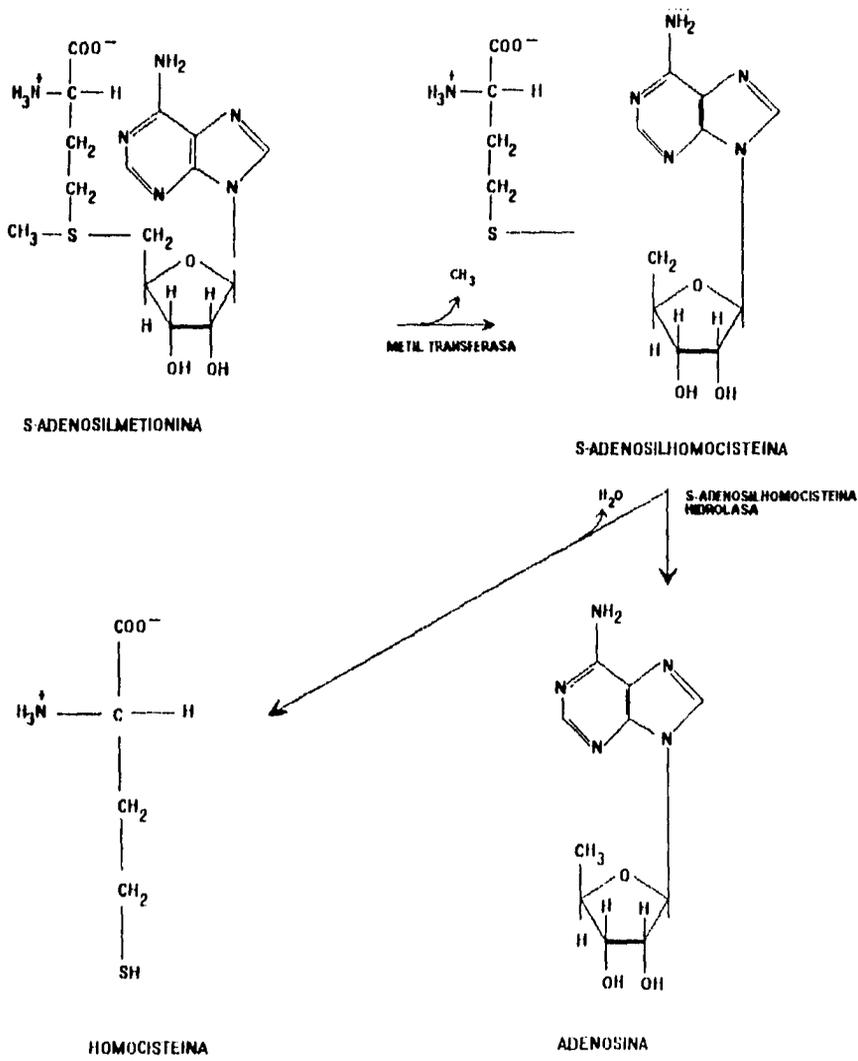


FIG. 3: Reacción química de transmetilación y formación de adenosina.

acuerdo a su clasificación dentro de la escala evolutiva, tejido u orgánulo en un tipo determinado de célula así como de la función especializada que realice.

La membrana plasmática varía en cuanto a la distribución de los fosfolípidos ya que presenta fosfatidilcolina y esfingomielina en la capa externa de la membrana y fosfatidilserina, fosfatidilinositol y fosfatidiletanolamina, confinada en la cara interna de la membrana plasmática (31).

b).- Acción de las metil-transferasas.

El proceso de transmetilación de fosfatidiletanolamina (FE) a fosfatidilcolina (FC) es a través de la acción de fosfatidilmetil-transferasa 1 (FMT 1), que se encuentra en la cara citosólica de la membrana que cataliza la adición de un grupo metil al FE; esto sucede en presencia de Mg^{+} , y a pH de 7.5 y con K_m baja (Fig. 4).

La segunda enzima, fosfatidilmetil-transferasa 2 (FMT 2) presente en la cara externa de la membrana, cataliza la adición subsecuente de dos moléculas de CH_3 , para formar FC, dicha reacción tiene lugar a pH de 10.5, siendo independiente de Mg^{+} , con K_m alta, puede ser diferentemente solubilizada por sonicación (31).

c).- Flip flop de los fosfolípidos.

Los fosfolípidos de la membrana se encuentran en constante movimiento en condiciones normales, teniendo un desplazamiento lateral de los componentes de la membrana y un desdoblamiento de las cadenas acilo, existe también un movimiento que está restringido denominado de difusión transbicapa o de flip flop el cual es el movimiento de un lipido desde una cara de la bicapa hacia la otra. Este movimiento necesita que el grupo de cabeza del lipido, que es polar y puede estar cargado, deje su entorno acuoso y pase al interior hidrofóbico de la bicapa, este proceso tiene una gran variación positiva de energía libre (muy endergónico).

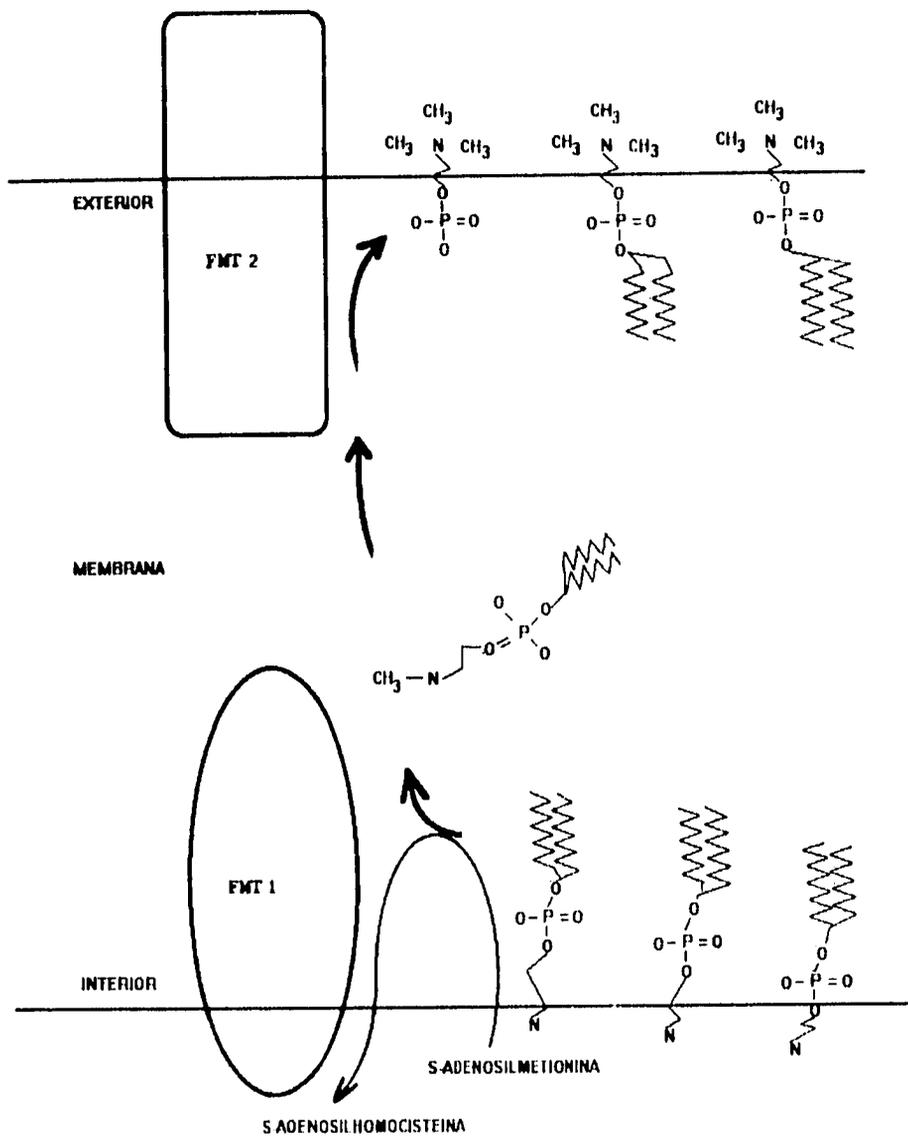


FIG. 4: Transmetilación de fosfatidiletanolamina a fosfatidilcolina por medio de S-adenosilmetionina.

d).- Efecto de las metilaciones en la fluidez de la membrana.

La subsecuente metilación de FE a FC incrementa el grado de fluidez de la membrana con el reacomodamiento vectorial rápido de los fosfolípidos, al cambiar la configuración real de la bicapa afectan otros procesos de la célula, como son el flujo de iones, exocitosis y fusión celular. Esto se ha demostrado con estudios efectuados con Conavalina y por medio de polarización fluorescente (31).

e).- Efecto de las metilaciones sobre la adenilato ciclasa.

Al producirse un aumento de la fluidez de la membrana, es afectada la distribución de las proteínas, produciendo movilidad de éstas, por lo tanto las proteínas receptoras pueden acoplarse con la adenilato ciclasa. Parece que el primer evento es la activación de los receptores que se encargan de activar, las metil-transferasas para efectuarse las metilaciones en la membrana de los fosfolípidos (31). La activación de la adenilato ciclasa por agonistas se ha demostrado que es independiente de la fluidez de membrana (31). Los β -receptores que se encuentran en el exterior de la membrana son móviles y flotan en la membrana.

f).- Otros compuestos metilados por S-adenosilmetionina.

Existe una amplia variedad de compuestos importantes en procesos metabólicos y genéticos, susceptibles de ser metilados por medio de SAM, como ejemplo tenemos a las proteínas que al ser metiladas llevan a cabo funciones de quimotaxis (31), también presentan este tipo de reacciones enzimáticas como la proteína carboxilasa, citocromo c, e histonas. De igual forma se encuentra metilando a los ácidos nucleicos (DNA, RNA, RNAi, RNAr). Fig 5

Algunas hormonas como las catecolaminas, son receptoras del grupo metil del SAM, así

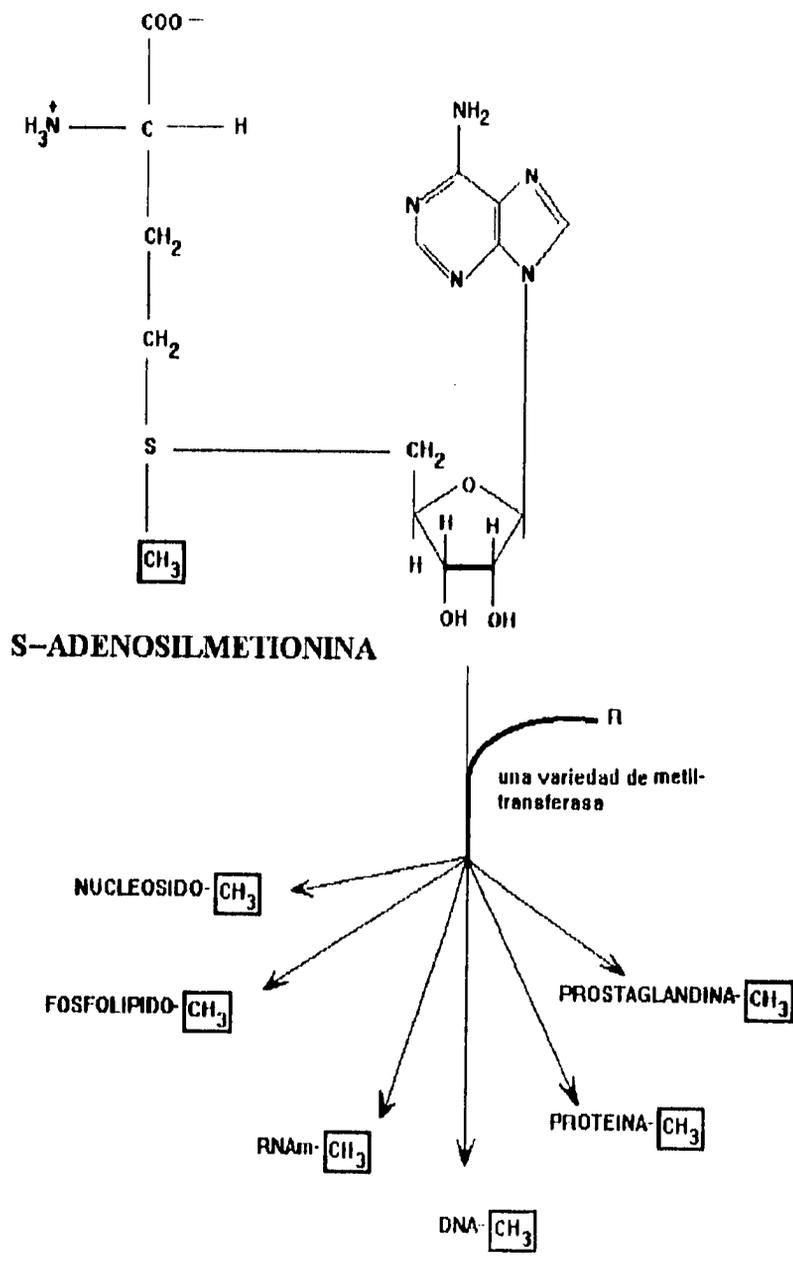


FIG. 5: Compuestos susceptibles de ser metilados por S-adenosilmetionina.

también como las políamidas.

III.- IMPORTANCIA DEL CICLO CIRCADICO:

Los ritmos endógenos se caracterizan por conservar sus oscilaciones independientemente de los factores externos cuando se estudian en aislamiento, fuera de sus condiciones naturales. Esta ritmicidad se conserva con algunas variaciones ligeras pero aún significativas, denominándose a este proceso oscilación espontánea de la ritmicidad conocida como ciclo circádico ó circadiano, que son periodos cercanos a las 24 Hs. de igual manera también existen ciclos circanuales, circalunales etc. Ya a mediados de los 30', Erwin Bünning demostró la dependencia genética del período de ritmo en oscilación espontánea. Presentando pequeñas oscilaciones en individuos de una especie pero con diferencias significativas en individuos de otra especie. Determinando un periodo característico para cada especie. Sus experimentos clásicos muestran que el apareamiento de sujetos con diferente periodicidad inducía en los descendientes que se presentara un periodo intermedio predecible.

Otra característica de oscilación espontánea es el fenómeno de compensación de temperatura observado por Pittendrigh en la eclosión de la Drosófila, ésta se mantiene relativamente constante aún a pesar de que existan variaciones de temperatura que afecten la cinética de procesos enzimáticos, sugiriendo que a nivel metabólico existen sistemas específicos que compensan los efectos de la variación de la temperatura.

La iluminación ambiental también afecta la oscilación espontánea, de tal manera que esta disminuye conforme la intensidad de la luz aumenta en especies diurnas de invertebrados, peces, reptiles y aves, lo opuesto se observa en especies nocturnas. En mamíferos de especies diurnos y nocturnos presentan un alargamiento de la oscilación espontánea al aumentar la intensidad de la luz.

En el periodo de 24 Hs. la oscilación espontánea no depende de los fenómenos relacionados con la rotación terrestre. Alternativamente se han planteado que existen ciclos

geofísicos cercanos a la rotación terrestre pero con diferente tiempo. En el caso de la ritmicidad circádica actualmente se considera que depende de fenómenos ambientales no identificados, no existiendo ninguna evidencia.

Evolutivamente Colin Pittendrigh considera que en un principio el organismo reaccionaba a las condiciones ambientales y posteriormente este fué capaz de generar sus propias respuestas ambientales, explicando las semejanzas entre los ciclos ambientales y los biológicos y las diferencias dependiendo de las características particulares de cada uno de los organismos para adaptarse al medio ambiente.

En condiciones naturales la ritmicidad biológica no manifiesta su oscilación espontánea, ya que presenta una relación estrecha temporal con las variaciones cíclicas del ambiente geofísico, a este fenómeno se le conoce como Sincronización y cuya importancia radica en permitir el ajuste o adecuación del tiempo biológico con el geofísico.

Algunos estímulos ambientales pueden considerarse como estímulos sincronizadores de los ritmos endógenos, como son la luz, temperatura, disponibilidad del alimento y señales sociales. La variación de iluminación del ciclo día-noche presenta la mayor estabilidad en su período y fase, lo que lo hace más predecible y considerada como la señal principal de sincronización ambiental, al menos en los organismos epigeos.

Considerando el concepto de reloj biológico como un sistema orgánico capaz de generar un orden temporal en las actividades del organismo implicando la capacidad del sistema para oscilar con un período regular, así como la capacidad de usar dichas oscilaciones como una referencia temporal interna. Permitiendo la interacción adecuada en el dominio temporal entre el organismo y su ambiente. Existe controversia en cuanto a considerar al reloj biológico como una estructura orgánica en particular que actúa como un marcapasos imponiendo fase y período a procesos orgánicos (Pittendrigh o Aschof), o como un conjunto de interacciones de múltiples procesos fisiológicos oscilatorios con estructuras específicas limitadas al ajuste de fase entre los diversos procesos (Halberg ó Reinberg)

A diferencia de los mecanismos de regulación homeostáticos cuyas alteraciones se

acompañan de graves trastornos e incluso la muerte, las alteraciones de los mecanismos de regulación temporal (cronostáticos) producen trastornos menos aparentes aunque no menos graves. Se puede considerar además de la función de cronostasia en el reloj biológico que participan en la regulación de otras funciones en las que la medición del tiempo (o más propiamente de los ciclos orgánicos) participan. Por ejemplo la estimación del fotoperíodo ambiental, relevante en el proceso de reproducción estacional y de hibernación; la orientación espacial guiada por la posición de las estrellas, de importancia en la migración de las aves, los procesos cognitivos relacionados a la medición del tiempo (memoria temporal) y en general todos los procesos orientados a la adaptación del individuo a su nicho temporal.

Se han identificado estructuras que cumplen con los requisitos de un reloj biológico, en Drosophila melanogaster un gen llamado *per*, cuyo producto controla el período de ritmicidad biológica. Existe también un control a nivel de sistema como en el caso del ganglio cerebral en la polilla, los ojos en la aplesia, la glándula pineal en las aves o el núcleo supraquiasmático en los mamíferos.

En cada uno de ellos se ha podido comprobar que dicha estructura tiene capacidad para imponer el período y la fase de la ritmicidad biológica en los diversos fenómenos estudiados. Existen sistemas basados en una organización de oscilador potencial o retroalimentación negativa, cuyo funcionamiento lleva implícito un orden temporal (impuesto por el ambiente) de los eventos que regula, siendo importante su participación ya que se ha observado la persistencia de los ritmos circádicos después de la supresión de algunas estructuras como la glándula pineal en aves o el núcleo supraquiasmático en mamíferos, cuando se les somete a períodos ambientales de luz-obscuridad, podría ser esta ritmicidad una respuesta a estímulos exógenos.

Varios estudios han demostrado que la interferencia en el funcionamiento de diversos sistemas fisiológicos no son capaces de alterar la organización temporal global del organismo, salvo en aquellas estructuras consideradas marcapaso, y la lesión de estas últimas no son capaces de producir organismos totalmente arrítmicos. Sugiriendo una estructura multioscilaria jerárquica del sistema que pudiera depender de la oscilación temporal o retroalimentación

negativa. Se presenta en sistemas orientados a mantener constante la salida de este sistema, cuyas oscilaciones son atenuadas y fácilmente perturbable en periodo y fase. La oscilación de los llamados marcapaso parece ser en si misma la salida regulada del sistema, y esta oscilaciones son autosostenidas y las perturbaciones del periodo y fase son compensadas por mecanismos aparentemente homeostáticos.

Dada la actividad fisiológica tan importante que tiene la adenosina y la observación de que su concentración es muy baja, surgió la pregunta de como podía actuar fisiológicamente esta sustancia, si solo se acumulaba en condiciones de hipoxia y de estrés. Por lo que se pensó que posiblemente a ciertas horas del día se elevara su concentración, con esta idea se estudiaron las variaciones de adenosina y sus derivados durante las 24 horas del día. Encontrándose una ritmicidad que se observa de 2-4 A.M., en sangre e hígado (26), el significado fisiológico que se propuso para estos cambios, es el mantenimiento de la homeostasis intracelular; sin embargo, dada la multiplicidad de acciones fisiológicas, pensamos que podía actuar en otros procesos.

IV.- HIPOTESIS

Debido a que la adenosina está considerada como un modulador fisiológico, que tiene influencia en diferentes e importantes acciones sobre los diversos compuestos que interaccionan dentro del organismo y partiendo de que su ruta de formación es a través de la degradación de SAH, se pensó que la concentración de adenosina, debía estar regulando la formación de SAH que es un potente inhibidor de las metilaciones dependientes de SAM y por lo tanto a diferentes productos metilados.

V.- OBJETIVO

El objetivo de este trabajo consistió en medir las concentraciones de adenosina, SAM, SAH, e índice de metilación a través de las 24 Hs. del día, y estudiar la correlación de otros parámetros, entre ellos los fosfolípidos y SAH-H, así como su influencia sobre la metilación de fosfolípidos, durante el período luz-oscuridad.

VI.- METODO EXPERIMENTAL

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar, con un peso aproximado de 140-160 gs, las cuales fueron adaptadas a un ciclo natural de luz-obscuridad (12:12) durante 4 semanas previas al estudio. Al realizar el experimento se tomaron todas las precauciones necesarias para evitarles el estrés.

Se sacrificaron 5 ratas para cada tiempo seleccionado. Cada 4 Hs. a partir de las 08:00 a las 20:00 Hs. y cada 2 Hs. desde las 20:00 a las 06:00 Hs (44).

Las muestras biológicas ensayadas fueron de hígado y de sangre. Los parámetros experimentales y las técnicas que se emplearon para ello fueron las siguientes:

1.- PREPARACION DE LA MUESTRA EN EXTRACTO PERCLORICO

Aproximadamente 150-200 mg. de hígado fue extraído lo más rápido posible y se homogeneizó con un Ultraturrex, en dos volúmenes de solución fría 0.4 M de HClO_4 . Las muestras se centrifugaron a 9,000 rpm. durante 10 minutos a 4°C. Posteriormente se decantó y se congeló en nitrógeno líquido, para ser utilizado después en la cuantificación de SAM, SAH y adenosina, por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).

Para las muestras de sangre el procedimiento fue básicamente el mismo, utilizando 2 ml de sangre en 4 ml de ácido perclórico, agitándose en un vortex.

2.- CUANTIFICACION DE SAM, SAH Y ADENOSINA:

a).- Procesamiento de muestras en una columna Sep-pak C 18.

La muestra anteriormente obtenida se neutraliza con 4M de KOH, y se centrifuga por 15

min. a 9,000 rpm, precipitándose el $KClO_4$. Posteriormente el sobrenadante es purificado, a través de un cartucho de Sep-Pak C 18.

Para tal proceso primeramente el cartucho es activado con 4 ml de metanol grado HPLC, y después con 4 ml de agua bidestilada y 0.2 ml de CH_3COOH , 0.175 M, todo lo anteriormente filtrado es desechado. A continuación se pasa 1) 1 ml de CH_3COOH , 0.175 M, siendo en ésta fracción donde se extrae el SAM. y 2) El SAH y la adenosina son eluidos por medio de 1 ml de la mezcla de 25% de CH_3OH y 0.175 M de CH_3COOH . Se utiliza la mezcla de 1) y 2) para el estudio en HPLC (45).

b).- Determinación de S-adenosilmetionina, S-adenosil-

homocisteína y Adenosina en HPLC.

La separación de nucleósidos se lleva a cabo en un aparato de cromatografía líquida de alta resolución, utilizando una columna μ bondapak C-18, de fase reversa (de 30 cm. x 3.9 cm de diámetro interno). Este sistema fue primeramente lavado con 20 ml de metanol grado HPLC al 30% y con un flujo de 1 ml por min., después se le pasan aproximadamente 20 ml de buffer de heptano sulfonato de sodio 5 mM, a pH de 3.5 y con flujo de 2 ml por min., hasta obtener una buena línea basal. Este buffer constituye la fase móvil de la cromatografía

Para la determinación se utilizó 20 μ l, en el caso del hígado y 100 μ l en la sangre de la solución final filtrada por el Sep-pak C 18. La presión soportada por la columna se mantuvo en un rango 3000-3500 psi. la elución fué monitoriada por un detector de absorbancia a 250 nm, conectado a un graficador.

3.- IDENTIFICACION DE PRODUCTOS.

Anterior a la separación en el HPLC, de las muestras problema, se efectuaron determinaciones de los estándares de cada uno de los nucleósidos en estudio, para observar su tiempo de elución y posteriormente cuantificar la cantidad de SAM, SAH y Ado, por medio del área bajo la curva del pico obtenido, y comparándola con la que se obtuvo del estándar. De tal manera que la Adenosina eluyó a los 7 min. el SAH a los 9 min. y el SAM a los 21 min.

4.- DETERMINACION DE FOSFOLIPIDOS.

a).-Extracción de fosfolípidos:

Para la obtención de los fosfolípidos, se toma una alícuota de sangre previamente heparinizada al momento de colectarla, debido a que la mayor parte de los lípidos se encuentran unidos a proteínas, se coloca en un vial con reactivo de Folch (46), que es una mezcla de cloroformo y metanol 2:1, la cual va a desnaturalizar las proteínas, extrayendo los lípidos, durante 24-48 Hs. Después de este periodo la muestra es filtrada y dializada contra agua bidestilada durante 24 Hs para eliminar la parte soluble en agua, al cabo de las cuales se aspira el exceso de agua y se reconstituye en 4 ml de metanol y se deja evaporar totalmente.

b).- Separación de fosfolípidos por cromatografía:

Esta separación se realiza por medio de una placa de sílice de gel, en la que se aplican 25 µl de la muestra reconstituida en 0.2 ml de cloroformo, aplicándose a 1 cm. de distancia del borde de la placa, en pequeñas gotas para ocupar la menor área posible, y se coloca en la cámara de cromatografía, con fase de amoníaco, agua, metanol, cloroformo, 1:1:14:16 (47).

c).- Revelado de la placa:

La placa cromatográfica es revelada dentro de una cámara saturada con Iodo, y los fosfolípidos obtenidos coloreados de amarillo por el revelado, fueron raspados de la superficie y colectados en viales a los que se les agregó 0.6 ml de ácido perclórico al 70 % y se hidrolizó durante 1h. a 150°C; después se agregan 5 ml de agua bidestilada y se centrifuga para quitar la sílice de gel, a 5 rpm. durante 15 min. y el sobrenadante es decantado.

d).- Ensayo de Ames:

Del sobrenadante anterior se toma una alícuota de 0.45 ml en un tubo de ensayo y se le agrega 0.9 ml de molibdato de amonio, al 0.42 % y 0.15 ml de ácido ascórbico al 10 %, se agitan y se dejan incubar durante 1 H a 37°C ó 25 min. a 45°C y después se lee a 820 nm de longitud de onda en un espectrofotómetro Zeiss. Todas las mediciones se efectuaron en celdillas de cuarzo de 1 ml de capacidad y con paso de luz de 1 cm (48).

5.- DETERMINACION DE S-ADENOSILHOMOCISTEINA -HIDROLASA:

Una muestra de hígado fue homogeneizada con 9 volúmenes de 0.25 M, de sacarosa y centrifugado por un minuto en una microfuga Eppendorf, y el sobrenadante fue utilizado para la determinación de la actividad de la enzima. Esta reacción fue iniciada con la adición de 100-300 mg. de enzima preparada en un medio conteniendo una concentración saturante del sustrato, la actividad fue seguida por el decremento de absorción a 250 nm, en un espectrofotómetro de doble haz.

VII.- RESULTADOS

I.- MEDICIONES EN HIGADO

a).- Variaciones diarias de adenosina.

El comportamiento diario de la adenosina es mostrado en la fig. 6 (panel A), en donde observamos que en el hígado se presentan dos picos de adenosina, uno máximo hacia las 02:00 Hs. cuya concentración es de 53 nmoles/g de tejido (tej.). También se observó otro pico hacia las 12:00 Hs. del día con una concentración de 40 nmoles/g. de tej.

b).- Niveles de concentración de SAM:

Como se puede observar en la fig. 6 (panel B), en la gráfica donde se muestran las concentraciones durante el día, se observa un pico de SAM a las 12:00 Hs. y otro a las 02:00 Hs. ambos de 100 nmoles/g de tej. Si se compara con la gráfica de adenosina se puede ver que tiene básicamente el mismo comportamiento bimodal a lo largo del día.

c).- Niveles de concentración de SAH.

Los resultados obtenidos de las muestras de hígado demuestran la presencia de un pico de SAH, de una concentración de 12.5 nmoles/g de tej. a las 02:00 Hs. coincidiendo con la concentración máxima de adenosina en la madrugada; esto se demuestra en la fig. 6 (panel C).

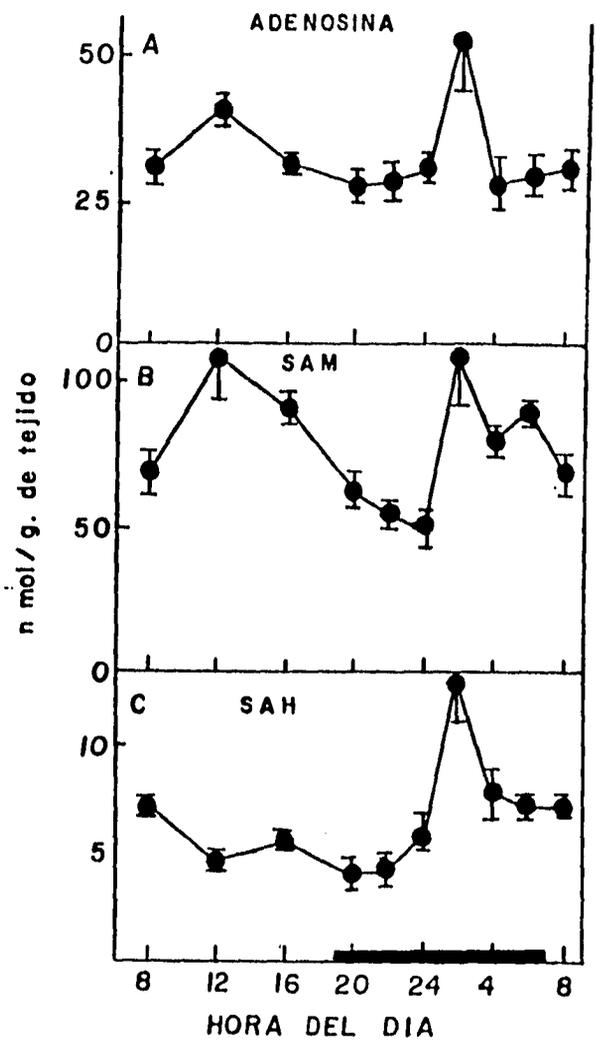


FIG. 6: Variaciones durante el día de los nucleósidos de adenina. La barra negra en todas las gráficas indican el período de oscuridad.

d).- Índice de metilación:

La relación existente entre SAM/SAH, denominado índice de metilación, nos indica la cantidad de SAM degradada a SAH, por medio de las reacciones de metilación, podemos observar que en comparación con la gráfica de adenosina, el índice de metilación es bajo cuando la concentración de adenosina está en niveles altos, como lo es a las 02:00 Hs. (fig. 7).

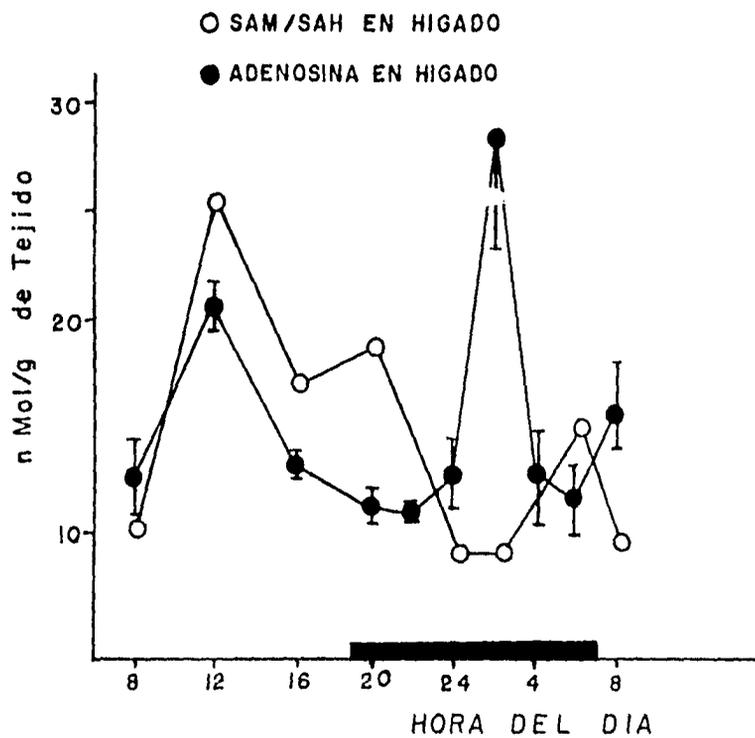


FIG. 7: Relación entre el índice de metilación SAM/SAH (O), y los niveles de Ado (●) durante el día.

c).- Niveles de S-adenosilhomocisteina-Hidrolasa:

La fig. 8, nos muestra el comportamiento de la S-adenosilhomocisteina-hidrolasa, que es la enzima encargada de degradar a la SAH en adenosina y homocisteina. Podemos observar que en el transcurso de las 24 hs. presenta dos picos elevados de actividad, uno a las 16:00 Hs. y el otro a las 04:00 Hs. ambos se encuentran desplazados después de la aparición de los picos de adenosina reportados.

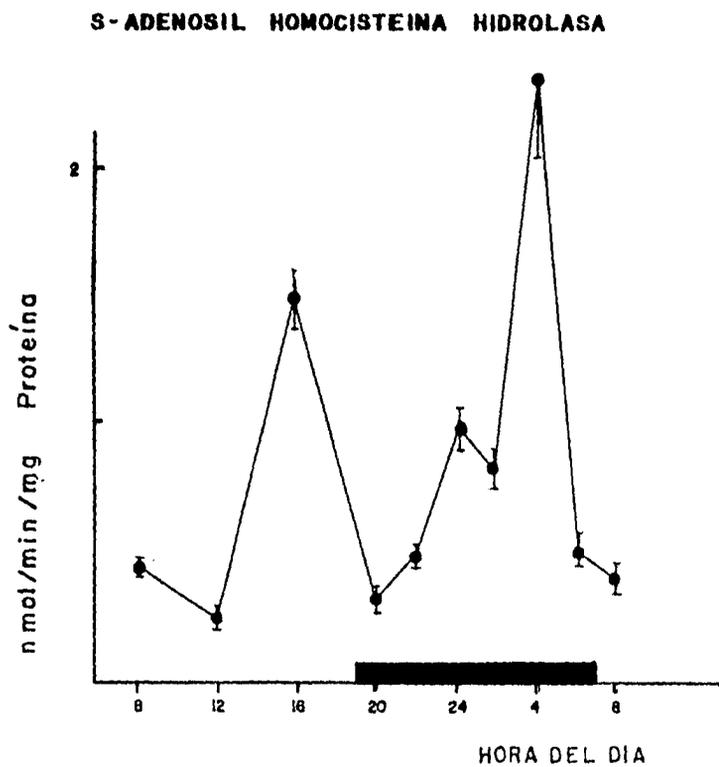


FIG. 8: Actividad de la enzima S-adenosilhomocisteina hidrolasa durante el día.

f).- Niveles de fosfolípidos:

Los resultados de las muestras de los fosfolípidos en hígado, se muestran en la tabla 1, y en la fig. 9, en ella encontramos que fosfatidiletanolamina (panel D) y cardiopina (panel A) se mantienen constantes a través del día, en cambio fosfatidilinositol (panel B) muestra un aumento hacia las 20:00-24:00 Hs. Fosfatidilserina (panel E) se eleva entre las 16:00-24:00 Hs. y fosfatidilcolina se mantiene alta de las 16:00-20:00 Hs, lo cual nos indica que fosfatidilcolina (panel C) se mantiene bajo cuando los niveles de adenosina están elevados.

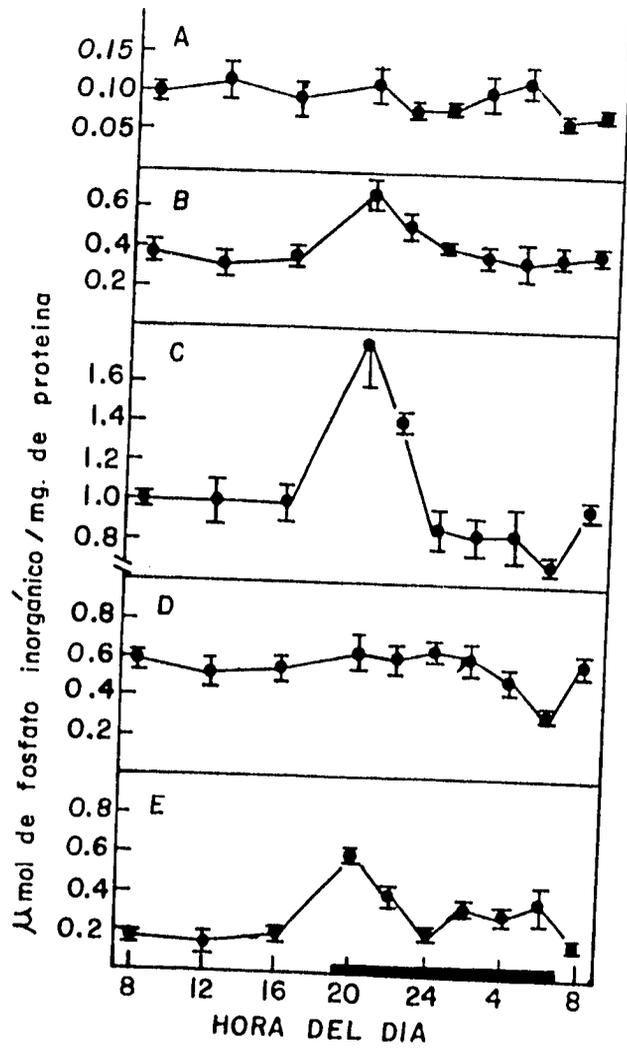


FIG. 9: Relación de la variación de los fosfolípidos en hígado durante las 24 Hs. del día.

g).- Índice de metilación en fosfolípidos:

En la fig. 10 mostramos la gráfica del índice de metilación calculado por la relación FC/FE observando que se presenta un pico máximo entre las 16:00-20:00 Hs. descendiendo inmediatamente a valores mínimos en las horas de alta concentración de adenosina. Existe paralelismo entre el índice de metilación calculado con estos fosfolípidos y el calculado por la relación SAM/SAH.

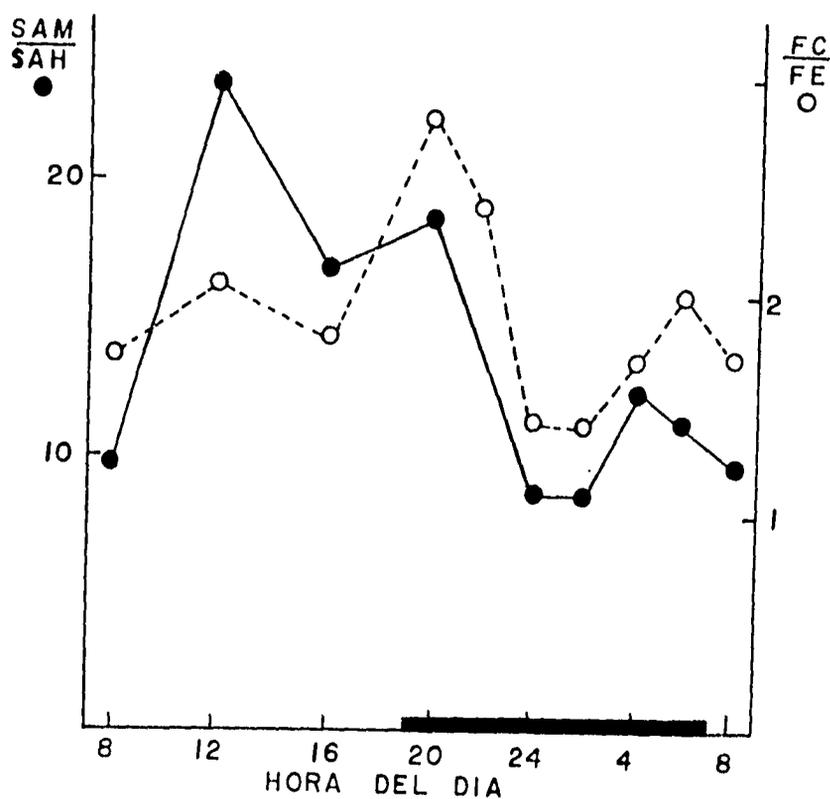


FIG: 10; Comparación del índice de metilación de SAM/SAH (●) con el índice de metilación FC/FE (○).

11.- MEDICIONES EN SANGRE:

a).- Concentración de adenosina:

El comportamiento de la adenosina en sangre es parecido al de este nucleósido en hígado, teniendo una elevación a las 12:00 Hs. con una concentración de 40 nmoles/g de tej. y otro pico a las 02:00 Hs. de una concentración de 82 nmoles/g de tej. Estos resultados concuerdan con lo reportado anteriormente (44) fig. 11 (panel A).

b).- Concentración de S-adenosilmetionina:

Observe en la fig. 11 (panel B), la gráfica de concentración del SAM que presenta un pico hacia las 02:00 Hs, con una concentración de 25 nmoles/g de tej. manteniéndose constante las siguientes horas del día.

c).- Concentración de S-adenosilhomocisteina:

El nivel de SAH, se mantiene constante en concentraciones bajas, la mayor parte del día; presentando un pico de máxima actividad a las 02:00 Hs. que coincide con el pico de adenosina, esto se observa en la fig. 11 (panel C).

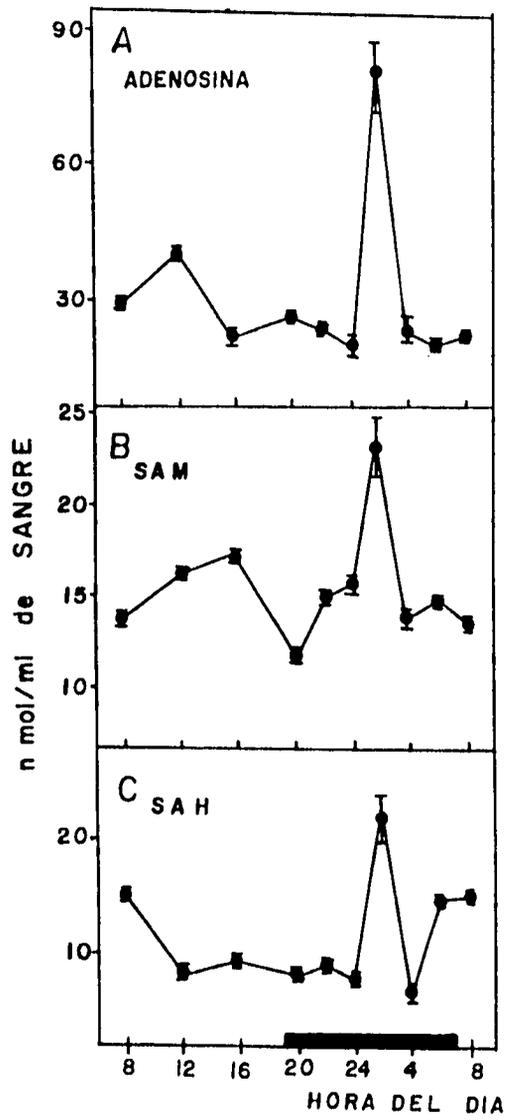


FIG. 11: Relación de los nucleósidos de adenina en sangre durante el transcurso del día.

d).- Indice de metilación:

En la fig. 12, podemos observar la gráfica que nos muestra el proceso de metilación, dependiendo de SAM, y vemos que estos niveles se mantienen altos la mayor parte del día con excepción de las 02:00 Hs. que es cuando la adenosina está alta.

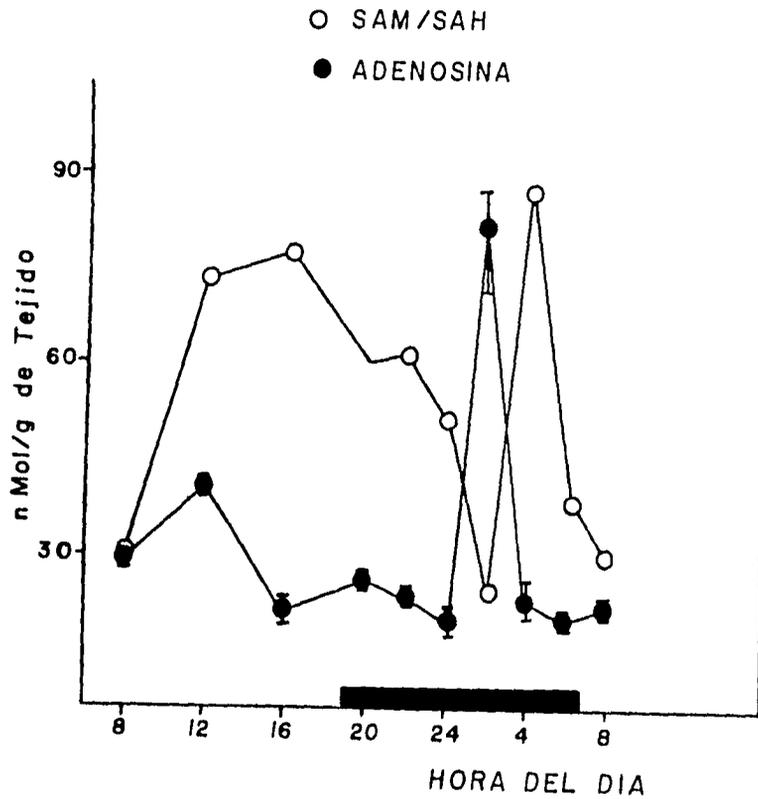


FIG. 12: Comparación del índice de metilación de SAM/SAH (O), y Ado (●) en sangre durante las 24 Hs. del día.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

e).- Fosfolípidos en sangre:

De acuerdo a la tabla 2, Fig. 13 podemos ver que los fosfolípidos existentes en la sangre, que son: fosfatidilserina (panel D) y fosfatiletanolamina (panel B), se mantiene constante durante las 24 Hs. fosfatidilinositol (panel C) presenta un aumento hacia las 06:00 Hs. fosfatidilcolina (panel A) tiene un aumento entre las 04:00 y 06:00 Hs. El error estandar en cada uno de los puntos medidos es muy pequeño, por lo cual no se representa en las gráficas.

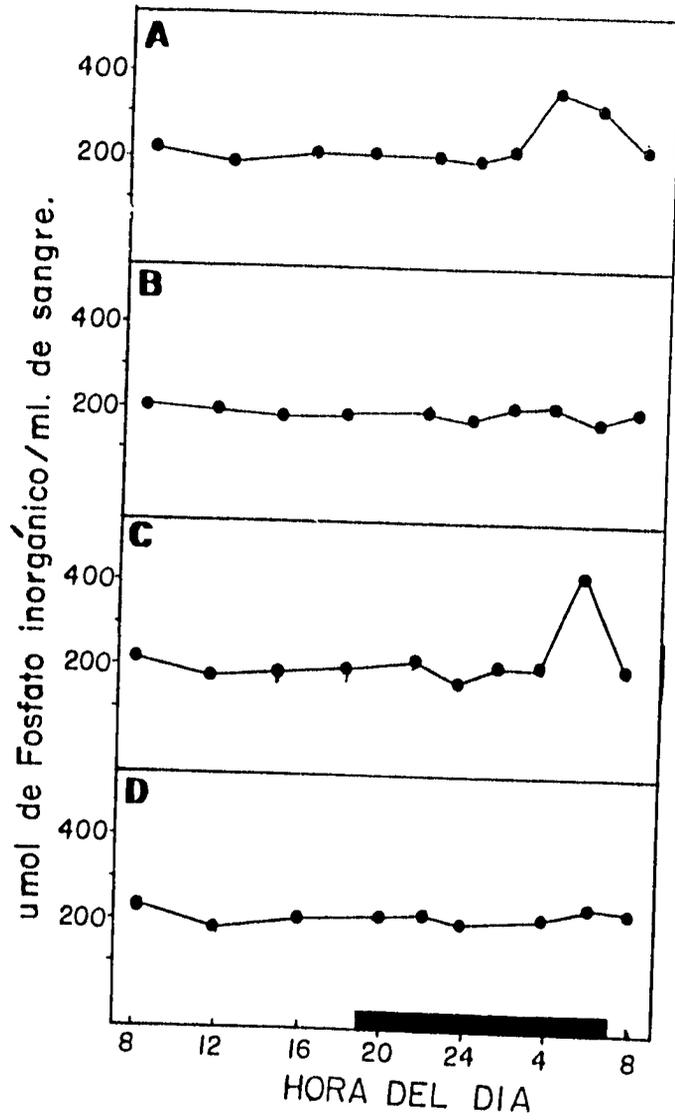


FIG. 13: Variación de los fosfolípidos en sangre durante el día.

	fosfatidil serina	fosfatidil inositol	fosfatidil etanolamina	fosfatidil colina
08:00	244.1±14	212.4±14	210±3.6	227.6±9.6
12:00	197.7±0.9	192.9±0.9	200.6±1.9	195±0.6
16:00	212.8±0.8	197.8±3.6	195.2±1.7	209.3±7.3
20:00	205.7±8.5	203.7±5	208.7±5	204.5±2.8
22:00	229.2±17	208.5±4.2	202.6±2.2	209.8±10.8
24:00	204.0±8.9	186.0±21	196.1±1.5	201.0±2.4
02:00	212.2±0.8	204.5±3.4	222.3±12	225.4±0.8
04:00	231.4±12	204.5±3.7	226.0±9.4	374.5±6.8
06:00	247.7±21	417.8±8.2	192.4±3.8	344.7±19.5

Tabla No. I: Valores de la concentración de fosfolípidos en sangre, durante el ciclo de 24 hs.
Nota: Los valores están expresados en μg de fosfato/ ml de sangre total.

η.- Índice de metilación:

La fig. 14, muestra la gráfica de los valores resultantes del cociente entre FC/FE, los cuales se mantienen constantes durante el día en concentraciones bajas, incrementándose la actividad metilante hacia las 04:00-06:00 Hs. para descender posteriormente a las 08:00 Hs. Comparando los índices de metilación de fosfolípidos FC/FE y SAM/SAH, solo coinciden en el horario de 2-8 horas.

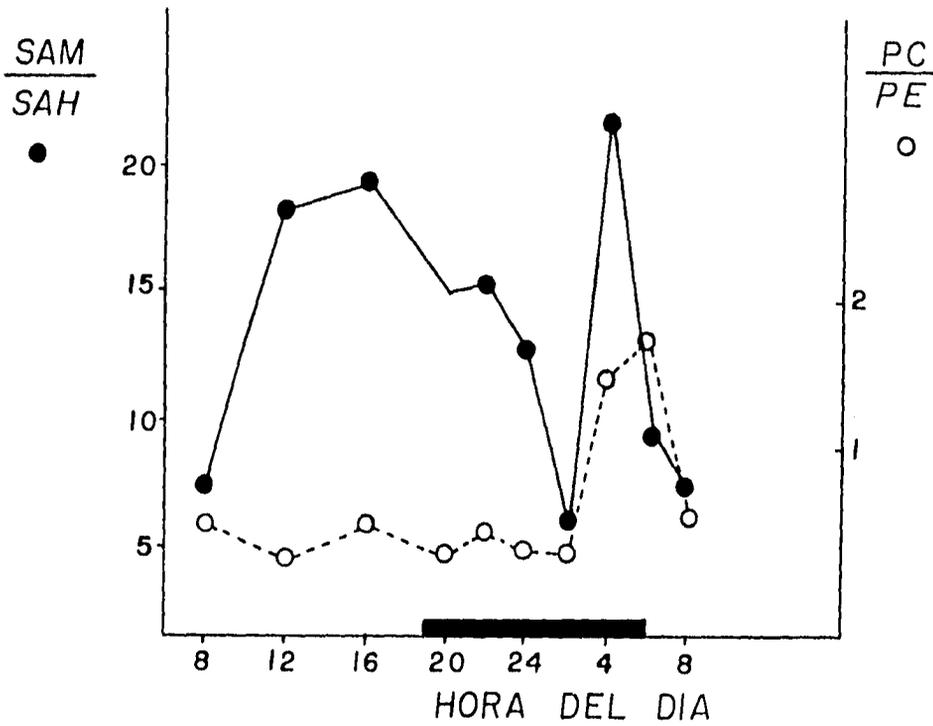


FIG. 14: Relación entre el índice de metilación SAM/SAH (●) y el coeficiente de metilación FC/FE (○) en sangre durante el día.

VIII.-DISCUSION

Se ha demostrado anteriormente en este laboratorio (44) que la concentración de adenosina en estado estacionario, la cual depende del equilibrio entre la síntesis, la degradación y la utilización, varía en ciertas horas del día, resultando en una acumulación de adenosina.

En este estudio se encontraron resultados similares a los observados anteriormente en cuanto a las variaciones en las concentración de adenosina (44). Estas oscilaciones han sido explicadas como consecuencia de variaciones en la actividad de las enzimas que metabolizan a la adenosina, las cuales dan una concentración en equilibrio diferente (53). En este trabajo solo medimos la actividad de la S-adenosil-homocisteina hidrolasa. Esta enzima por su baja actividad en condiciones fisiológicas, no representa una fuente importante de adenosina para explicar los cambios encontrados en la concentración del nucleósido, sin embargo la SAH-H puede ser una señal determinante en los procesos de metilación, ya que es la enzima encargada de remover a su sustrato, la SAH, que se sabe es un potente inhibidor de la mayoría de las metil-transferasas dependientes de SAM (26). La SAH-H cataliza una reacción de equilibrio cuya constante de equilibrio está desplazada hacia la síntesis de SAH (54) pero la remoción de los productos de la reacción en el sentido hidrolítico, adenosina y homocisteina, a ciertas horas del día, previene la acumulación de SAH (Fig. 6C y 11C). Por otro lado, durante la noche es donde la actividad de la SAH-H es baja y que podría ser el resultado de la alta concentración de adenosina, se encontró una alta concentración de SAH (Fig. 8 y 6 panel A y C).

La SAM presenta dos picos a lo largo del día que coinciden con los picos de la adenosina. Un hecho interesante es que el pico de SAH solo se presentó durante la noche, coincidiendo con los picos de adenosina y SAM. Esto indicaría que la actividad metilante se lleva a cabo principalmente en el día y en la noche se vería inhibida por la acumulación de

SAH (ver fig. 6).

Los sustratos para las reacciones de metilación son de diversa naturaleza, tales como material genético, proteínas o fosfolípidos. En este trabajo estudiamos el comportamiento de los fosfolípidos durante el día y la noche. Se encontró que el ritmo en 24 hrs. fué similar al reportado anteriormente (50). Si calculamos el índice de metilación, (es un parámetro que nos indica la actividad de las reacciones de metilación) por la relación FC/FE, y lo comparamos al calculado por la relación SAM/SAH, encontramos similitud en el patrón de comportamiento a lo largo del día en el hígado (fig. 9) y sangre (fig. 14). Esto sugiere que el flujo de metilación a partir de SAM, estaría involucrado en la metilación de FE. En apoyo a esta idea, existe un reporte que indica que la relación SAM/SAH controla la actividad de la metil-transferasa de S-adenosil-L-metionina /Fosfolípido. De lo anterior podemos concluir que dado el paralelismo que existe en el comportamiento a lo largo del día entre SAM y adenosina, es posible que el nucleósido juegue un papel modulador de las metilaciones por SAM. Esto podría darse por las oscilaciones en la concentración de adenosina (dados por el equilibrio en su síntesis, degradación y utilización) que a su vez inhibirían a la SAH-H, causando la acumulación del SAH que inhibiría las reacciones de metilación.

En este trabajo se exploraron hígado y sangre, sin embargo el fenómeno podría ser general en todos los tejidos del organismo.

IX.- REFERENCIAS

1. Chagoya de Sánchez V. (1981) Temas selectos de fisiología celular C.I.F.C. UNAM. Editores: A. Peña, R. Tapia y Drucher-Colín. pag. 51- 68.
2. Drury, A. N. and Szent-györgy, A (1929) The physiological activity of adenine compounds with especial reference of their action upon.
3. Berne, R.M. (1963) Cardiac nucleotides in hipoxia: Possible role in regulation of coronary Flow. Am. J. Physiol. 204: 317-322.
4. Dobson, J.G., Rubio, R. and Berne, R.M. (1971) Role of adenine nucleotides, adenosine and inorganic phosphate in the regulation of skeletal muscle blood flow. Circ. Res. 29: 375-384.
5. Rubio R., Berne R.M., Bockman, E.L. and Curnish, R.R. (1975) Relationship between adenosine concentration and oxigen supply in rat brain. Am. J. Physiol. 228: 1896-1902
6. Berne, R.M., Rall, T. and Rubio R. (1983) Regulatory funtion of adenosine, Martinus Nijhoff Publishers. U.S.A.
7. Weir, G.C., Knowton, S.D. and Martin, D. B. (1975) Nucleotide and nucleoside stimulation of glucagon secretion. Endocrinology, 97:932-936.
8. Suárez, J., Valles, V.E. and Chagoya de Sánchez, V. (1987) Int.J. Biochem. Vol 19 (1):85-88.
9. Hill, M.K. and MacLeod, R.M. (1976) Dibutyl cyclic AMP, adenosine and guanosine blockade of the dopamine, ergocryptine and apomorphine inhibition of prolactin release in vitro Endocrinology, 99: 1612-1617.
10. Dole, V.P. (1961) Effect of nucleic metabolites on lipolysis in adipose tissue. J. Biol. Chem. 236: 3125-3130
11. Fox, Irving. H. (1978) The role of adenosine and 2'-deoxyadenosine in mammalina cell, Ann Rev. Biochem. 47: 655-686.
12. Burnstock, G. (1972) Purinergic nerves. Pharmacol. Rev. 24: 509-581.
13. Haulica, I. (1973) Preliminary data on the possible hipnogenic role of adenosine Neurochem. J.21:701-702.

14. London, C. and Wolff, J. (1977) Two distinct adenosine-sensitive sites on adenylate cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:5482-5485.
15. Fain, J.N. and Shepherd, R.D. (1977) Adenosine, cyclic AMP metabolism, and glycogenolysis in rat liver cell. *J. Biol. Chem.* 252:8066-8070.
16. Chagoya de Sánchez V., Hamabata, A. and Laguna, J. (1967) Inhibition of gluconeogenic effects of cortisol by nucleotides and related substances. In *Nat. Cancer Ins Monograph*. Vol. 27. Stulberg, M.P. (Ed) USA, p p. 61-69.
17. Chagoya de Sánchez V., Briones, R. and Piña, E. (1971) *Biochem. Pharmacol.* 20: 2535-2541.
18. Chagoya de Sánchez V. y Piña, E. (1972) Adenosine, a glucogenic and lipogenic compound. *FEBS letters* 19: 331-334.
19. Chagoya de Sánchez V., Brunner A., Sánchez, M.E., López, C. and Piña, E. (1974) Utilization of adenosine as a tool in studies on the regulation of liver glycogen biosynthesis. *Arch. Biochem. Biophys.* 160: 145-150.
20. Chagoya de Sánchez V., Brunner A. and Piña, E. (1972) *In vivo* modification of energy charge in the liver cell. *Biochem Biophys. Res. Common.* 46: 1441-1445.
21. Chagoya de Sánchez V., Alvarez-Grau, P., Jiménez, B., Villalobos, M.R. and Piña, E., (1977) Regulation of fatty acid oxidation by adenosine at the level of its extramitochondrial activation. *Biochem. Biophys. Res. Common.* 76: 804-812.
22. Lehninger, A., Nelson, D. and Cox, M. (1993) *Principles of biochemistry* 2nd edn. Edit. Worth Publishers. Inc., New York. p.p.523-525.
23. Hurwitz, J., Gold, M. and Anders, J. (1964) *J. Biol. Chem.* 239: 3474-3482.
24. Zappia, V., Zidek-Cwick, C. R. and Schlenk, F. (1969) *J. Biol. Chem.* 244: 4499-4509.
25. Akamatsu, Y. and Law, J.H. (1970) *J. Biol. Chem.* 245: 709-713.
26. Deguchi, T. and Barchas, J. (1971) *J. Biol. Chem.* 246: 3175-3181
27. Pegg, A. E. (1971) *FEBS Lett* 16: 13-16.
28. Baldessarini, R.J. (1975) *J. Neurochem.* 12:41-67.
29. Cantoni, G. I. (1975) Biological methylation: Selected aspects. *Neurochem.* 14: 435-451.

30. Walker, R. D. and Duerre, J. A. (1975) *Can J. Biochem* 53: 312-319
31. Crews, F. T. (1982) *International Rev. of Neurobiol.* 23: 141- 162.
32. Roberts, S. K. de F. (1965) Significance of endocrines and central nervous system in circadian rhythms. *Circadian Clocks* (ed. J. Aschoff) Amsterdam: North Holland Publishing, Co., pp. 198-213.
33. Rothman, B. and Strumwasser, F. (1973) Aflatoxin B1 blocks the circadian rhythms in the isolated eye of *Aphysia*. *Fed. Proc.* 32:365.
34. Sheving, L. E., Halberg, F. and Pauly, J. E. (1974) *Chronobiology*. Igaku Shoin. Ltd. Tokyo.
35. Sheving, L. E. and Pauly, J. E. (1967) Effects of adrenalectomy, adrenal medullectomy and Hypophysectomy of the daily mitotic rhythm in the corneal epithelium of the rat. *The cellular Aspects of biorhythms* v. Mayersbach, H. Ed. Springer, Berlin, pp. 167-174.
36. Schawar, R. C. (1971) Circadian testicular periodicity in the European starling in the absence of photoperiodic change. *Biochronometry*, M. Menaker, Ed. National Academy Sciences, Washington D. C., pp. 428-447.
37. Agren, G., Wilander, O. and Jorpes, E. (1931) Cyclic changes in the glycogen content of the liver and muscle of rats and mice. *Biochem. J.* 25: 777-785.
38. Stahle, J. (1949) Effects of adrenalectomy on the diurnal rhythm on the liver glycogen. *Acta Endocrinol.* 2: 128-142.
39. Halberg, F., vissher, M.B. and Bittner, J.J. (1971) Eosinophil rhythm in mice. Range of occurrence effects of illumination, feeding and adrenalectomy. *Am. J. Physiol.* 124:109-124.
40. Forobic, V., Forovic, C. and Petrovic, V. (1956) La thyroid et le rhythm nyctheméral. *Compt. Rend. Soc. Biol. Paris*, 150: 1249-1251.
41. Andrews, R.V. and Folk, G.E. Circadian metabolic patterns in cultured hamster adrenal glands. *Comp. Biochem. Physiol.* 11: 303-309
42. Sietson, M. H. and Watson-whitmyre, M. (1976) Nucleus supraquiasmaticus: The biological clock in the hamster? *Science* 191: 197-199.
43. Ibuka, N. and Kawamura, H. (1975) Loss of circadian rhythms in the sleep-wakefulness cycle

in the rat by supra-chiasmatic nucleus lesions. *Brain research* 96: 76-81

44. Chagoya de Sanchez V., Hernandez-Muñoz R., Diaz-Muñoz M., Villalobos, R., Glender, W., Vidrio, S., Suárez, J. and Yáñez, L. (1983) Circadian variations of adenosine level in the blood and liver and possible physiological significance. *The Nat. 31*: 195-197

45. Casanovi, G., Bardeci, C. C. and David M. M. (1969) Purification of phospholipids by means of the column reaction. *J. Biol. Chem.* 244: 754-756

46. Folch, J., Lees, M. and Sloane S. G. H. (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226: 497-509

47. Gacia-Sáinz, J. A. and Fain, J. N. (1980) Effect of insulin, catecholamines and calcium ions on phospholipid metabolism isolated white fat cell. *Biochem. J.* 186: 781-789

48. Emes, L. (1960) Analysis of phosphate in a lipid sample from animal tissue. *J. Biol. Chem* 235: 769-775.

49. Suárez, J. y Pastelin, G. (1992) La adenosina y el corazón. *Quehacer cardiológico* 2 (2) 10-12

50. Barnum, C. P., Jardetzky, C.D. and Halberg, F. (1958) Time relation among metabolic and morphologic 24-hour changes in mouse liver. *Am. J. Physiol.* 195, 301-310.

51. Gharib, A., Sarda, N., Chabannes, B., Cronenberger, L. and Pacheco, H. (1982) The regional concentrations of S-adenosyl L-methionine, S- adenosyl-L-homocysteine, and adenosine in rat brain. *J. Neurochem.* 38, 810-815.

52.-Olsson R. M. (1970) Changes in content of purine nucleoside in canine myocardium during coronary occlusion *Circulation Res.* 26: 301-306.

53.- Chagoya de Sánchez, V., Hernández, M., Sánchez, L., Vidrio, S., Yáñez, L. and Suárez, J. (1991) Twenty-four-hour changes of S-adenosylmethionine, S-adenosylhomocysteine, adenosine and their metabolizing enzymes in rat liver; possible physiological significance in phospholipid methylation. *Int. J. Biochem.* Vol. 23 (12): 1439-1443.

54.-de la Haba, G. and Catoni, G. L. (1959) The enzymatic synthesis of S-adenosyl-L-homocysteine from adenosine and homocysteine. *J. Biol. Chem.* 234: 603-608.