



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

LA HIPERGLUCEMIA DURANTE LA ISQUEMIA-
REPERFUSIÓN ES ESTIMULADA POR LA
INOSINA A TRAVÉS DEL RECEPTOR HEPÁTICO
A₃ DE ADENOSINA

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

DANIEL EDGAR CORTÉS PÉREZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. ENRIQUE PIÑA GARZA

MÉXICO, D.F.

OCTUBRE, 2008



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.


Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 4 de Agosto de 2008, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** del alumno **DANIEL EDGAR CORTÉS PÉREZ** con número de cuenta **98322778** con la tesis titulada **"La hiperglucemia durante la isquemia-reperusión es estimulada por la inosina a través del receptor hepático A₂ de adenosina"**, realizada bajo la dirección del **DR. ENRIQUE PINA GARZA**:

Presidente: DRA. MARTHA FRANCO GUEVARA
Vocal: DR. RAFAEL VILLALOBOS MOLINA
Secretario: DR. ENRIQUE PIÑA GARZA
Suplente: M. C. B. EDMUNDO CHAVEZ COSSIO
Suplente: DRA. MARÍA CRISTINA FERNÁNDEZ MEJÍA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 18 de Septiembre de 2008.


Dr. Juan Núñez Farfán
Coordinador del Programa

c. c. p. Expediente del interesado.

RECONOCIMIENTOS

- A CONACYT por el apoyo económico a través de la beca número 202606.
- A mi tutor: Dr. Enrique Piña Garza por brindarme la libertad de pensamiento y enseñarme el compromiso de la investigación.
- A mi comité tutorial: Dra. María Cristina Fernández Mejía y a la Dra. Martha Franco Guevara, por sus constantes aportaciones durante el desarrollo de proyecto.
- A mi jurado: Dr. Rafael Villalobos Molina y Dr. Edmundo Chávez Cossio.
- Al apoyo por parte del proyecto DGAPA IN201208, UNAM.

DEDICATORIA

- A mi madre, quien me enseñó todos los valores que poseo hasta el día de hoy.
- A mi padre por brindarme su tiempo cuando lo he necesitado.
- A mi hermana, quien me ha brindado de su ser para yo poder seguir nutriendo el mío.
- En general, a mi familia nuclear, que siempre me han apoyado, y me han permitido ser cuanto yo he querido ser, sin prejuicios, sin atavíos y sin presiones sociales. Por entender que mi amor por la medicina se fragua desde el banco de un laboratorio.
- Al Dr. Enrique Piña Garza, quien fue el que hace algunos años me condujo al fértil campo de la ciencia, a él quien me ha apoyado incondicionalmente a lo largo de la licenciatura y de la maestría, a él que lo considero mi padre putativo en la investigación.
- A la Dra. Raquel Guinzberg quien me brindó todos sus conocimientos para poder afianzar los míos propios, siempre con una gran sonrisa, misma que proviene de una amistad que ella extiende incluso fuera de las puertas del laboratorio.
- Al Dr. Antonio Díaz quien de igual manera, siempre me ha brindado buenos consejos, excelentes observaciones, diferentes perspectivas y lecciones tanto de trabajo como de vida.
- A la Dra. Magdalena Vilchis por soportar mis dispersiones en el laboratorio, por enseñarme con suma paciencia.
- A Linda por brindarme su amistad incoercible la cual necesite durante este tiempo, sobre todo al final. Todas la gente debería tener un amigo como tu; eso haría mejor a las personas, eso haría mejor a este mundo.
- A Jim por estar ahí cuando en su momento, necesite de su ayuda.
- A toda la gente que me ha aportado algo dentro o fuera del laboratorio y que fueron necesarias para que este proyecto se llevara a término.
- Al amor que llevo en el corazón, la facultad de medicina; a mi gran amor, la UNAM forjadora de libres albedríos.

CONTENIDO

1. LISTA DE ABREVIATURAS	iii
2. RESUMEN	1
3. ABSTRACT	3
4. INTRODUCCIÓN	5
4.1 Adenosina	5
4.1.1 Estructura química	5
4.1.2 Síntesis <i>de novo</i> y reutilización	5
4.1.3 Degradación	7
4.2 Inosina	8
4.3 Transportadores de membrana	10
4.4 Receptores de adenosina	11
4.4.1 Señalización mediada por los receptores de adenosina	12
4.4.2 Funciones de los receptores de adenosina	15
4.5 Isquemia – Reperusión	19
5 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	22
6 HIPÓTESIS	24
7 OBJETIVOS	24
8 MATERIAL Y MÉTODOS	25
9 RESULTADOS	27
9.1 Uso de anticoagulante o coctel de inhibición durante el muestreo	27
9.2 Concentración de inosina, adenosina y glucosa en plasma durante la I-R	29
9.3 Concentración de inosina, adenosina y glucosa tras varios periodos de isquemia y subsecuente reperusión.....	31
9.4 Correlación entre los nucleósidos y la glucosa en plasma	33
9.5 Liberación de glucosa hepática durante la I-R en presencia de antagonistas para los AdoR	35
9.6 Liberación de glucosa hepática durante la I-R permitiendo únicamente la activación de uno de los subtipos de AdoR	36
9.7 Liberación de glucosa hepática durante la I-R en presencia de antagonistas	

adrenérgicos	38
10 DISCUSIÓN	40
11 CONCLUSIONES.....	45
12 REFERENCIAS	46

1. LISTA DE ABREVIATURAS

ADA	Adenosina desaminasa
AdoR	Receptor de adenosina
ADP	Adenosina difosfato
AdrR	Receptor adrenérgico (a adrenalina)
AK	Adenosin cinasa
ALOXAZINA	Benzo[<i>g</i>]pteridina-2,4(1 <i>H</i> ,3 <i>H</i>)-diona
AMP	Adenosina 5'-monofosfato
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
AP	Fosfatasa alcalina
APRTasa	Adenosina fosforribosil transferasa
ATP	Adenosina trifosfato
CCPA	2-cloro- N ⁶ ciclopentil adenosina
CE-C	Cloroetilclonidina
CGS21680	2- <i>p</i> -(2-Carboxietil)fenetilamino-5'-N- etilcarboxamidoadenosine
CHA	N ⁶ Ciclohexil adenosina
CI-IB-MECA	2-Cloro- N ⁶ -(3-iodobenzil)-adenosina-5'-N- metiluronamida
CNT	Transportadores concentradores de nucleósidos

CPA	N ⁶ ciclopentil adenosina
CPT	8-ciclopentil-1,3-dimetil xantina
CREB	Elemento de unión en respuesta a AMPc
CSC	cloroestirilcafeína
DMSO	Dimetil sulfóxido
DPCPX	8-ciclopentil-1,3-dipropil xantina
DPMA	N ⁶ -[2-(3,5-dimetoxifenil)-2(2-metilfenil)-etil]adenosina
ENT	Transportadores equilibradores de nucleósidos
E-5'NT	5' ectonucleotidasa. CD73
E-NTPDasa	Ecto-nucleótido trifosfato desforilasa. CD39
ERK	Cinasa regulada por señales extracelulares
ERO	Especies reactivas de oxígeno
GPCR	Receptores acoplados a proteínas G
GRK	Cinasa de GPCR
HE-NECA	2-hexinil NECA
HGPRTasa	hipoxantina-guanina fosforribosil transferasa
HIF-1α	Factor inducible por hipoxia-1 alfa
IMP	Inosina 5'-monofosfato
I-R	Isquemia-Reperfusión

MAPK	Cinasa de la proteína activada por mitógeno
MEK-1	Cinasa de la cinasa de la proteína activada por mitógeno
MIF	Factor inhibitorio de la migración de los macrófagos
MRS 1191	3-Etil-5-benzil-2-metil-4-feniletinil-6-fenil-1,4-(±)-dihidropiridina-3,5-dicarboxilato
MRS 1220	9-Cloro-2-(2-furanil)-5-((fenilacetil)amino)-[1,2,4]triazolo[1,5-c]quinazolina
MRS 1523	3-propil-6-etil-5-[(etiltio)carbonil]-2 fenil-4-propil-3-piridine carboxilato
MRS 1754	8-[4-[[4-Cianofenil]carbamoilmetil]oxi]fenil]-1,3-di(n-propil)xantina
NBTI	Nitrobenziltioinosina
NECA	5'-(N-etilcarboxamido) adenosina
NMDA	N-metil-D-aspartato
NOS	Sintasa de óxido nítrico
PI3K	Fosfatidil inositol 3 cinasa
PKB	Proteína cinasa B
PKC	Proteína cinasa C
PLC	Fosfolipasa C
PNP	Fosforilasa de nucleósidos de purina

PPI	Pirofosfato inorgánico
RBL	Leucemia basofílica de rata
RISK	Cinasa de salvamento de daño por reperfusión
SCH 58261	7-(2-feniletil)-5-amino-2-(2-furil)-pirazol-[4,3-e]-1,2,4-triazol[1,5-c]pirimidina
TNF-α	Factor de necrosis tumoral – alfa
WNT	Apócope del ingles: Wingless + INT-1
WRC057	8-(N-metilisopropil)amino-N ⁶ -(5'-endohidroxi-endonorbornil)-9-metiladenina

2. RESUMEN

Se sabe que durante situaciones de estrés existen mecanismos hormonales que acondicionan a los sistemas celulares y finalmente al organismo, a enfrentar dicho proceso. Uno de los cambios más importantes es la hiperglucemia. Clásicamente se considera la liberación de epinefrina como *conditio sine qua non* para que dicha hiperglucemia se presente; sin embargo, pese a que el dogma ha sido establecido, existen datos experimentales que demuestran una escasa correlación entre ambas variables. Por su parte, la adenosina y la inosina a través de los receptores de adenosina (AdoR); son compuestos que han demostrado poseer una participación importante en la regulación de procesos fisiológicos y patológicos muy variados. Ambos nucleósidos son capaces de promover la gluconeogénesis, la glucogenólisis y la ureogénesis en el hígado. Paralelamente, el fenómeno patológico conocido como Isquemia-Reperusión (I-R) es de enorme interés pues se presenta frecuentemente en el quehacer médico. Durante la I-R aparecen indicadores de estrés los cuales pueden ser hormonales (epinefrina), y metabólicos (hiperglucemia y resistencia a la insulina); a su vez, grandes cantidades de nucleósidos son liberados al espacio extracelular. El objetivo de este trabajo, fue precisar la participación de la adenosina y la inosina en la señalización responsable de provocar la hiperglucemia que ocurre durante la I-R. Ratas Wistar se sometieron a anestesia y a un proceso de isquemia al ligar por varios periodos de tiempo la aorta y cava abdominal a nivel infrarrenal; posteriormente, se liberó la oclusión para dar paso a la reperusión. Previo al proceso, algunos animales se trataron vía intraperitoneal con diferentes antagonistas selectivos para cada uno de los receptores para adenosina y epinefrina aquí estudiados. Se tomaron muestras sanguíneas previo, durante y posterior a la isquemia para medir adenosina, inosina y glucosa en plasma. Durante la isquemia (hasta 60 min) los valores de los compuestos endógenos medidos aumentaron moderadamente. Sin embargo, 5 minutos de isquemia seguidos por 2 minutos de reperusión fueron suficientes para permitir un incremento de 100% de los nucleósidos en plasma respecto al control y de 23% para la glucemia. 60 minutos de isquemia más 10 de reperusión incrementaron la glucemia al doble y para adenosina e inosina 3.3 y 2.7 veces respectivamente. La elevación de la glucemia está asociada al aumento de los nucleósidos con una correlación lineal de $r^2 = 0.839$. La hiperglucemia alcanzada a los 10 minutos de reperusión, tras 60 minutos de isquemia, se vio inhibida en un 0, 25, 33, 45 y 100 % al utilizar antagonistas

selectivos para los receptores de adenosina (AdoR), y los receptores adrenérgicos (AdrR): A_{2B} AdoR, A_{2A} AdoR, α_{1B} AdrR, A_1 AdoR, and A_3 AdoR respectivamente. Con lo anterior se propone que la inosina-adenosina liberadas durante la I-R, activan los receptores hepáticos A_3 de adenosina y favorecen la liberación de glucosa hepática de manera dependiente a su concentración. Por tanto, su participación de ambos nucleósidos en trastornos hiperglucémicos como la I-R, es de considerarse.

3. ABSTRACT

It is well known that under stress situations there are hormonal mechanisms promoting endurance to the cellular systems, and finally to the whole organism, to better confront the adverse environment. One of the most important responses to stress condition is hyperglycemia. The epinephrine stress-induced release is classically considered as the *conditio sine qua non* for the hyperglycemia existence, so the dogma had been established; nonetheless current experimental data demonstrate a low correlation between both variables. On the other side, adenosine and inosine through adenosine receptors (AdoR); are compounds that have shown to be able to regulate several and different important physiological and pathological processes. Both nucleosides are capable to promote glycogenolysis, gluconeogenesis and ureogenesis in the liver. On the other hand, the stress phenomenon that is known as Ischemia-Reperfusion (I-R) plays a key role in medicine due to the frequent incidence of this pathology in the medical practice. During I-R, stress indicators appear, they could be hormonal (epinephrine) and metabolic (hyperglycemia and insulin resistance); at the same time, large quantities of inosine and adenosine are liberated to the extracellular space. The objective of this work is to determinate the inosine and adenosine participation in the signaling that promotes hyperglycemia during I-R. Male Wistar rats were anesthetized; aorta and abdominal cava were ligated for different periods of time to provoke ischemia; after that, ligation was released to achieve the reperfusion time. Previously to this process, some animals where treated with different adenosine and adrenaline receptors antagonists. Blood samples were obtained prior, during and after the ischemia lap in order to measure adenosine, inosine and glucose in plasma. Throughout the ischemia (as far as 60 min), the values of these endogen compounds increase mildly. Just five minutes of ischemia and two minutes of reperfusion are sufficient to augment 100% the concentration of both nucleosides and 23% for the glycemia respect the control value. 60 min of ischemia and 10 min of reperfusion boost the glycemia at twice the basal value and for inosine and adenosine 3.2 and 2-fold respectively. A linear positive correlation corresponding to a r^2 as high as 0.839 between nucleosides and glucose plasma was calculated. The hyperglycemia observed after 60 minutes of ischemia plus 10 minutes of reperfusion was inhibited when using AdoR antagonist and adrenaline receptor (AdrR) antagonist. Glucose hepatic release was diminished 0, 25, 33, 45 and 100 % when

A_{2B} AdoR, A_{2A} AdoR, α_{1B} AdrR, A_1 AdoR, and A_3 AdoR where blocked respectively. It is proposed that inosine and adenosine output throughout I-R, reach the hepatic A_3 AdoR and promote the glucose release as a function of these nucleosides concentration. Therefore, the adenosine and inosine participation in hyperglycemic conditions such I-R must be considered.

4. INTRODUCCIÓN

4.1 ADENOSINA

4.1.1 Estructura química

La adenosina es un nucleósido, formado por una base purínica; la adenina, unida covalentemente a un azúcar; la ribosa (ribofuranosa), mediante un enlace β -N₉ glucosídico, desplazando un grupo hidroxilo del carbono 1' de la pentosa y un hidrógeno de la base (**fig. 1**).

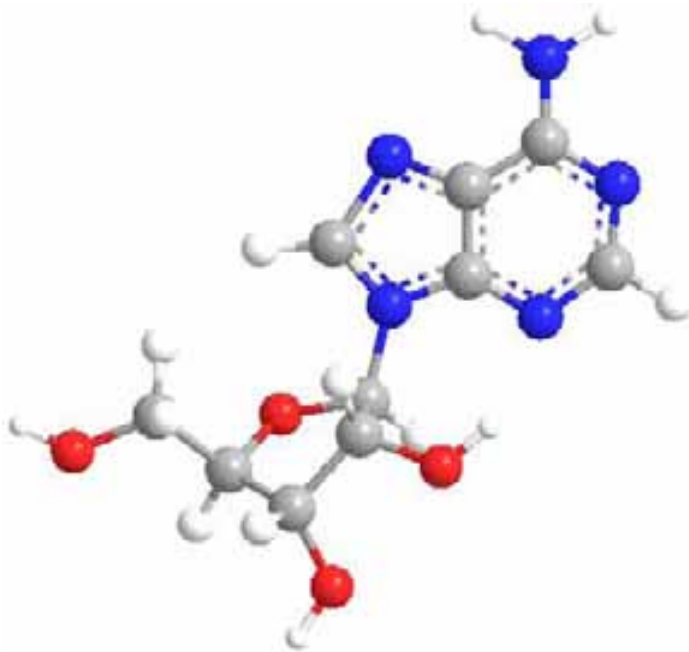


Figura 1. Adenosina. Purina con un grupo amino en el carbono 6. Gris: carbono, blanco: hidrógeno, rojo: oxígeno, azul: nitrógeno.

La adenosina forma parte de una gran cantidad de diferentes compuestos importantes en la fisiología celular: cofactores, moléculas energéticas, intermediarios metabólicos y moléculas informáticas como los ácidos nucleicos, etc.

Su formación puede ser *de novo* o reciclada a través de la “vía de la reutilización”

4.1.2 Síntesis *de novo* y reutilización

La síntesis de adenosina *de novo* se da a partir de la ribosa-5-fosfato, derivada de la vía de las pentosas de fosfato, para formar la porción de la ribosa. En la integración de la base participan los aminoácidos glicina, aspartato y glutamina; así como el CO₂ y el folato (**fig. 2**) [1-4]. A través de 10 reacciones intermedias (en eucariontes superiores), se llega al producto que es la Inosina 5'-monofosfato (IMP), el cual es precursor tanto de derivados de la adenosina como de la guanosina. EL IMP a través de 2 enzimas más, la adenilosuccinato sintetasa [5] y posteriormente la adenilosuccinasa (también llamada adenilosuccinato liasa) [6] forman adenosina 5'-monofosfato (AMP). Dicho nucleótido posteriormente es defósforilado para formar el nucleósido adenosina.

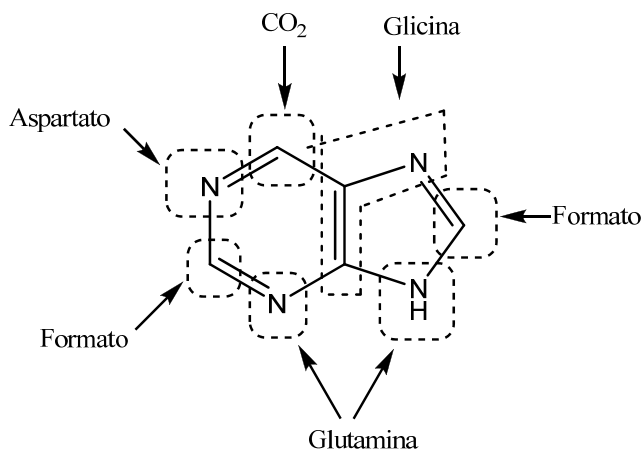


Figura 2. Origen de los átomos de la molécula de base purina.

Las vías de recuperación de adenosina incluyen a la enzima hipoxantina-guanina fosforribosil transferasa (HGPRTasa) para dar IMP a partir de hipoxantina [7, 8]; o a partir de adenina para dar AMP a través de adenosina fosforribosil transferasa (APRTasa)[8, 9].

Sin embargo, la mayor cantidad de adenosina que se encuentra ubicada tanto intracelular como extracelularmente (extra e intravascular) tiene como origen el catabolismo de adenosina trifosfato (ATP) [10]; éste forma adenosina difosfato (ADP) y fosfato inorgánico (P_i) tras la hidrólisis del enlace fosfodiéster de alta energía; a AMP y P_i y posteriormente, a adenosina y P_i. Estas reacciones pueden realizarse: 1) de manera espontánea, 2) acoplado a otra reacción enzimática endérgica o 3) a la hidrólisis producida por la 5' nucleotidasa [11] si es que el sustrato se encuentra en el citoplasma; si el nucleótido se encuentra en el espacio extracelular, entonces es catalizada por la

5' ectonucleotidasa (E-5'NT o CD73); enzima acoplada a la cara externa de las membranas celulares, y ubicada en casi todo el organismo [12]. En el último de los casos, la hidrólisis puede ser realizada por otras enzimas más inespecíficas; entre ellas se encuentran, la ectonucleósido trifosfato difosforilasa (E-NTPDasa) que forma directamente adenosina a partir de ATP y la ectonucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa (E-NPP) que remueve un pirofosfato (PP_i) del ATP o del ADP. Incluso la fosfatasa alcalina (PA) puede catalizar directamente la producción de adenosina utilizando como sustrato ya sea AMP, ADP o ATP [13].

La vía del metabolismo de azufre, que es utilizada en la desmetilación del folato, la metilación del DNA, y el metabolismo de la metionina, es una fuente más de adenosina. La S-adenosil-homocisteína es hidrolizada por la S-adenosil-homocisteína-hidrolasa para dar lugar a homocisteína y adenosina [14].

4.1.3 Degradación

La adenosina es degradada rápidamente; su vida media es muy corta y puede ser desde 1 hasta 9 segundos [15]; esto es debido a la actividad de la enzima adenosina desaminasa (ADA) [16]. Dicha enzima se encuentra en la cara externa de la membrana celular de todas las células de mamífero [12]. La ADA cataliza la desaminación del C-6 para dar como productos NH_3 e inosina en su forma ceto (**fig.3**). Sin embargo, la adenosina cinasa (AK) [17] es una enzima aun más activa que la ADA y que puede favorecer la fosforilación de la adenosina; la cual ya como AMP, puede llegar hasta ATP por la acción de otras cinasas.

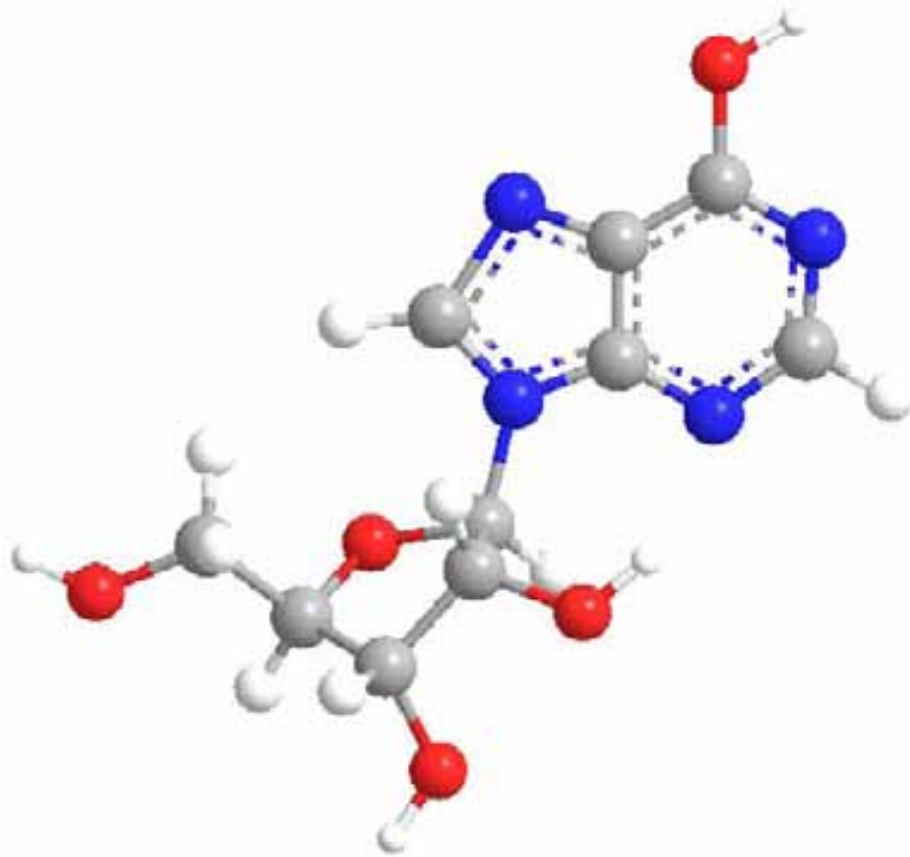


Figura 3 Inosina. A diferencia de la adenosina, la inosina posee en el carbono 6 un grupo ceto; el hidrógeno del grupo hidroxilo puede tautomerizarse con el nitrógeno 1. Gris: carbono, blanco: hidrógeno, rojo: oxígeno, azul: nitrógeno.

4.2 INOSINA

La inosina puede provenir tanto de la desaminación de la adenosina como de la defosforilación del IMP. Sobre la inosina puede actuar la fosforilasa de nucleósidos de purina (PNP) [18], siguiente enzima en el proceso catabólico de las purinas dando como producto una ribosa y una hipoxantina. Esta última forma xantina y finalmente ácido úrico mediante la acción de la xantina oxidasa. La hipoxantina puede ser reutilizada por la HGPRTasa como ya se mencionó (**fig. 4**).

Figura 4. Metabolismo de la adenosina y la inosina. 1.17.3.2 xantina oxidasa, 2.4.2.1 fosforilasa de nucleósidos de purina, 2.4.2.7 adenosina fosforribosil transferasa , 2.4.2.8 hipoxantina (guanina) fosforribosil transferasa, 2.7.1.20 adenosina kinasa (AK), 2.7.1.73 inosina kinasa, 2.7.4.3 adenilil kinasa, 3.1.3.1 fosfatasa alcalina , 3.1.3.5 5'-nucleotidasa, 3.1.4.1 ectonucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa, 3.2.2.1 nucleosidasa de purinas, 3.2.2.2 inosina nucleosidasa, 3.2.2.7 adenosina nucleosidasa, 3.3.1.1 S-adenosil homocisteína hidrolasa, 3.5.4.2 adenina desaminasa, 3.5.4.4 adenosina desaminasa , 3.5.4.6 AMP desaminasa, 3.6.1.5 ectonucleósido trifosfato difosforilasa, 4.3.2.2 adenilosuccinato liasa, 6.3.4.4 adenilosuccinato sintasa.

4.3 TRANSPORTADORES DE MEMBRANA

Los nucleósidos, nucleótidos y nucleobases requieren de transportadores específicos en la membrana celular para su translocación y utilización interna y/o externa. Dada la importancia de estos compuestos, la existencia de esta familia de transportadores en las membranas celulares data desde los protozoarios hasta los humanos; e inclusive, un ancestro relacionado en bacterias llamado NupC [19]. En los eucariontes existen dos familias no filogenéticamente relacionadas; los transportadores equilibradores de nucleósidos (ENT), y los transportadores concentradores de nucleósidos (CNT) (ver tabla 1). Los primeros, son transportadores de difusión pasiva al utilizar el gradiente de concentración de dicho nucleósido como fuerza motora; en el caso de los CNT utilizan el mecanismo de transporte activo secundario por cotransporte (sinporte), utilizando casi siempre Na^+ como ión proveedor del gradiente motriz, aunque en algunas ocasiones puede ser Li^+ o H^+ . Existen 4 subtipos de ENT que a su vez pueden ser divididos en sensibles o no sensibles al bloqueador nitrobenziltioinosina (NBTI). La familia de CNT posee también 3 subtipos; aunque, recientemente se ha sugerido la existencia de 3 más; pese a ello, no se han encontrado las proteínas para estos transportadores. Aunque no existen estudios cristalográficos de los transportadores, se dispone de información sobre su topología. Los ENT son proteínas que forman un canal que consta de 11 pases transmembranales con el extremo amino terminal en el citoplasma y el carboxilo en el espacio extracelular, poseen varios sitios de glucosilación importantes que determinan la especificidad para el sustrato. Los CNT forman un canal de 13 α -hélices transmembranales y poseen la misma ubicación celular de sus extremos que los ENT; aunque, los CNT poseen más sitios de glucosilación [20]. Se sabe además, que aunque los transportadores se expresan constitutivamente según la estirpe celular, su expresión puede ser modulada, principalmente, por los mismos nucleósidos e incluso por la glucosa; así como por varias hormonas como son la triyodotironina, el glucagon y la insulina. En el caso de la insulina, la activación de la expresión del ENT2 se da a través de la fosfoinosítido 3 cinasa (PI3K), de manera independiente de las cinasas de proteínas dependientes de mitógeno (MAPK). La supresión de la expresión de CNT2 se da a través de MEK-1 (cinasa de MAPK) [21]. Se ha demostrado también que la glucosa aumenta la expresión y la actividad de ENT1 mediante la actividad de la sintasa de óxido nítrico (NOS), la proteína cinasa C (PKC) y de las MAPK [22, 23].

Tabla 1. TRANSPORTADORES DE NUCLEÓSIDOS [19, 20]			
SUBTIPO DE TRANSPORTADOR	EXPRESIÓN	SUSTRATO	Km PARA ADENOSINA
ENT1	Ubicuo, abundante en eritrocitos	Nucleósidos de purinas y pirimidinas	≈40 μM
ENT2	Ubicuo, muy abundante en músculo esquelético	Nucleósidos de purinas y pirimidinas y algunas nucleobases	≈140 μM
ENT3	Ubicuo, preferentemente intracelular, probablemente en lisosomas	Nucleósidos de purinas y pirimidinas y algunas nucleobases	≈1.9 mM
ENT4	Ubicuo	Adenosina, cationes orgánicos incluyendo monoaminas	
CNT1	yeyuno, riñón, hígado, cerebro	Nucleósidos de pirimidina y adenosina	V _{max} para adenosina es baja. Ki para el transporte de uridina es ≈50 μM
CNT2	Ampliamente distribuido, muy abundante en riñón e intestino delgado	Nucleósidos de purinas y uridina	≈ 8 μM
CNT3	Ampliamente distribuido, muy abundante en intestino delgado, médula ósea, tráquea, páncreas y glándula mamaria	Nucleósidos de purinas y pirimidinas	≈ 15 μM

4.4 RECEPTORES DE ADENOSINA

Los receptores de adenosina (AdoR) son los iniciadores de la transducción de las señales promovidas por adenosina e inosina del medio extracelular, al interior de la célula. Son receptores que se encuentran conservados entre todos los vertebrados [24, 25]. Los AdoR pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G (GPCR), proteínas integrales de membrana que poseen 7 dominios transmembranales con el extremo amino terminal orientado en el espacio extracelular, y el carboxilo; a su vez, en el citoplasma. Existen 4 subtipos de AdoR: A₁, A_{2A}, A_{2B} y A₃. El ligando natural para los receptores es la adenosina; sin embargo, otro ligando natural como la inosina puede unirse a A₃ AdoR y activarlo [26]; posiblemente, otros receptores puedan ser activados por la inosina como el A₁ y A_{2B} AdoR [27, 28]. Estos receptores se han clonado de varias

especies, se encuentran mejor conservados entre los mamíferos; sin embargo, AdoR A₃ es el que presenta mayor divergencia pues cuenta con tan solo un 70% de identidad entre el de humano y el de rata; inclusive, los sitios de unión a los factores putativos de expresión que se encuentran en los roedores, no se encuentran en el humano; esto podría indicar que la expresión del receptor está regulada de manera diferente entre estas especies. Los receptores son glicoproteínas donde los azúcares se unen a varias asparaginas. Todos los receptores de adenosina; excepto A_{2A}, poseen un sitio de palmitoilación cerca del extremo carboxilo[29].

Los receptores pueden modificar su expresión debido a estímulos mediados por su propio ligando, o por condiciones que promueven la liberación del ligando, como lo es la hipoxia. En este último caso, se sabe que la hipoxia puede favorecer la expresión del receptor A_{2B} mediante el factor inducible por hipoxia 1 α (HIF-1 α), uniéndose al sitio promotor del gen del AdoR AdoR A_{2B} [30]. Los glucocorticoides pueden favorecer la expresión de AdoR A₁ a través del promotor B de este gen en células DDT₁ MF-2, así como en cerebro. Sin embargo, no se conoce un elemento de respuesta canónica a glucocorticoides en este gen [31].

La estructura proteica tridimensional exacta de los AdoR se desconoce; sin embargo, se han creado modelos tridimensionales basados en el análisis cristalográfico de la bacteriorrodopsina y posteriormente de un GPCR, la rodopsina. Recientemente se ha completado el análisis del primer GPCR humano, el receptor adrenérgico β -2 [32]. Ahora se sabe que los residuos de glutamato, en la segunda vuelta extracelular, son importantes en el reconocimiento del ligando; e igualmente importantes, son los residuos cargados negativamente en esta y otras regiones de la proteína [31].

Actualmente existen un conjunto de agonistas y antagonistas sumamente selectivos y potentes para cada uno de los receptores; aunque, en el caso de A_{2B} AdoR no se cuenta con un agonista específico; recientemente existen nuevos compuestos que prometen cumplir esta función [33]. Clásicamente las xantinas han sido los antagonistas para estos receptores; empero, el AdoR A₃ es insensible a la inhibición por este tipo de compuestos. Los actuales antagonistas para este receptor derivan de dihidropiridinas, y flavonoides [34]. Cabe señalar que estos agonistas y antagonistas no poseen la misma selectividad y potencia para activar o inactivar, el mismo subtipo de receptor en diferentes especies.

4.4.1 Señalización mediada por los receptores de adenosina

Se sabe que la señalización por los AdoR es a través de proteínas G, y la mediación subsecuente de adenilil ciclasa; sin embargo, existen paralelamente otras vías de señalización. El AdoR A₁ inhibe la adenilil ciclasa [35], y a su vez activa también la fosfolipasa C (PLC) [36]. Esto puede dar lugar a la activación de canales de potasio y/o a la inhibición de canales de calcio [31]. La vía de la proteína cinasa regulada por señales extracelulares (ERK) puede ser activada para promover el preconditionamiento mediado por el AdoR A₁ y por fosfoinosítidos. El AdoR A_{2A} activa proteínas G_s o en ocasiones G_{olf}, proteína similar a G_s [37]. Este receptor puede desencadenar la activación de la PLC; así como de fosfoinosítidos. El AdoR A_{2B} se acopla también a proteínas G_s [38] y aumenta la producción de fosfoinosítidos. La vía del ácido araquidónico puede ser activada también por ese receptor [39]. Adenosina a través de la activación de este receptor puede favorecer la entrada de calcio y promover la vasodilatación [40]. El AdoR A₃ inhibe la producción de AMPc, moviliza calcio, activa la PLC y los canales de potasio [41]. Los efectos antitumorales de este receptor parecen estar mediados por la vía de señalización de la WNT (del inglés: wingless signaling pathway), y la vía de la fosfatidil-Inositol 3 cinasa (PI3K) - proteína cinasa B (PKB) [41].

Los AdoR, al igual que otros GPCR, pueden desensibilizarse e internalizarse a través de las GPCR cinasas (GRK); siendo el AdoR A₃, el más rápido en desensibilizarse [42].

La asociación de los receptores con diferentes tipos de proteínas G así como de las diferentes vías de señalización, debe de entenderse e interpretarse con suma cautela, sin perder de vista que algunas de las interacciones anteriores han sido estudiadas en células transfectadas.

Los compuestos derivados de la señalización de los AdoR pueden interactuar con otros receptores como los de histamina, bradicinina y ATP. Estas interacciones se dan a nivel de las proteínas G. Específicamente, el AdoR A₁ activa a la proteína G_i y el dímero βγ liberado interactúa con la subunidad α_{q/11} derivada de la activación de alguno de los receptores mencionados [31]. Existen otro tipo de interacciones como los encontrados entre el receptor para adenosina A₁ y para dopamina D₁; y entre el sistema glutamatérgico y el de adenosina. La activación del receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) induce la salida de adenosina al espacio extracelular [43]. Por su parte, las neuronas presinápticas estimuladas con adenosina disminuyen la liberación de glutamato [31]. AdoR A_{2A} puede interactuar con el receptor D₂ para dopamina; e incluso, se ha observado su dimerización [44-46].

Tabla 2. Características de los receptores de adenosina				
	A ₁ AdoR	A _{2A} AdoR	A _{2B} AdoR	A ₃ AdoR
Estructura	Humano 326 aa Rata 326 aa	Humano 410 aa Rata 409 aa	Humano 328 aa Rata 332 aa	Humano 318 aa Rata 320 aa
Agonistas	CPA, CCPA, CHA, NECA	CGS21680, DPMA, HE-NECA, NECA	NECA (no específico)	CI-IB-MECA, NECA, HE-NECA
Antagonistas	CPT, DPCPX, WRC0571	SCH-58261, CSC	Aloxazina, MRS 1754, XAC	MRS 1220, MRS 1191, MRS 1523
Proteína G a la que se acoplan	G _i Activa PKC Puede aumentar los fosfoinosítidos a través de fosfolipasa C	G _s	G _s Puede relacionarse a la señalización de fosfoinosítidos vía G _q	G _i Puede movilizar calcio. Activa PKC Pueden formar fosfoinosítidos a través de fosfolipasa D
Funciones fisiológicas	Inhibición de la lipólisis, bradicardia, hiperpolarización, acondicionamiento, antinociocepción; sueño-vigilia; disminución del flujo renal	Antiagregante plaquetario, Vasodilatación, Acondicionamiento, reforzamiento y recompensa	Control de la movilidad intestinal, inmunomodulación, degranulación de mastocitos, reforzamiento recompensa	Acondicionamiento, degranulación de mastocitos. Glucogenólisis, gluconeogénesis.
Expresión	Varias regiones del cerebro, médula espinal, ojo, glándula adrenal, atrio. Músculo esquelético, hígado, riñón, adipocitos, tracto intestinal y respiratorio,	Bazo, timo, leucocitos, plaquetas, Corazón, pulmón, vasos sanguíneos Hígado	Colon, vejiga. Pulmón, vasos sanguíneos, ojo, eminencia media, mastocitos. Hígado, glándula adrenal, ovario, riñón, adipocitos,	Testículo, mastocitos, Encéfalo, pulmón, bazo. Hígado, tiroides, glándula adrenal, bazo, corazón, riñón, intestino,

CPA: N⁶ ciclopentil adenosina. CCPA: 2-cloro- N⁶ ciclopentil adenosina. CHA: N⁶ Ciclohexil adenosina. DPCPX: 8-ciclopentil-1,3-dipropil xantina. CPT: 8-ciclopentil-1,3-dimetil xantina. WRC057: 8-(N-metilisopropil)amino-N⁶-(5'-endohidroxi-endonorbornil)-9-metiladenina. CGS21680: 2-*p*-(2-Carboxietil)fenetilamino-5'-N-etilcarboxamidoadenosina. DPMA: N⁶-[2-(3,5-dimetoxifenil)-2(2-metilfenil)-etil]adenosina. NECA: 5'-(N-etilcarboxamido) adenosina. HE-NECA: 2-hexinil-NECA. SCH 58261: 7-(2-feniletil)-5-amino-2-(2-furil)-pirazol-[4,3-*e*]-1,2,4-triazol[1,5-*c*]pirimidina. CSC: cloroestiril cafeína. Aloxazina: Benzo[*g*]pteridina-2,4(1*H*,3*H*)-diona. MRS 1754: 8-[4-(((4-Cianofenil)carbamoilmetil)oxi)fenil]-1,3-di(n-propil)xantina. MRS1220: 9-Cloro-2-

(2-furanil)-5-((fenilacetil)amino)-[1,2,4]triazolo[1,5-c]quinazolina. MRS1191: 3-Etil-5-benzil-2-metil-4-feniletinil-6-fenil-1,4-(±)-dihidropiridina-3,5-dicarboxilato. MRS1523: 3-propil-6-etil-5-[(etiltio)carbonil]-2-fenil-4-propil-3-piridine carboxilato. CI-IB-MECA: 2-Cloro- N⁶-(3-iodobenzil)-adenosina-5'-N-metiluronamida

4.4.2 Funciones de los receptores de adenosina

La adenosina es un nucleósido que normalmente se encuentra en concentraciones de decenas a cientos en el orden nanomolar. Su formación se ve aumentada por varios tipos de estrés celular como puede ser la I-R, la hipoxia-anoxia, la disminución de sustratos oxidables, los neurotransmisores, el óxido nítrico, la radiación, lesión por radicales libres y en general cualquier proceso que aumente la relación demanda/aporte de energía [31]. Al ocurrir lo anterior puede aumentar la concentración de adenosina e inosina hasta 100 veces el valor basal [47, 48]. La adenosina formada intracelularmente es principalmente por sobrecarga de trabajo celular; y alcanzará el medio extracelular por medio de los ENT; sin embargo, tras algún tipo de lesión celular, o en algunos estados fisiológicos (como el encontrado en los túbulos renales) el ATP puede salir directamente y convertirse en adenosina través de ecto-ATPasas, ecto-fosfodiesterasas, CD39 y CD73. Como ejemplo; tras un mismo estímulo lesivo como puede ser la deprivación metabólica, las neuronas liberan preferentemente adenosina y las células gliales nucleótidos, que después formarán adenosina en el espacio extracelular. La adenosina a su vez es transformada por la ADA para formar inosina ($K_m = 20-100 \mu M$) y por la AK para dar AMP ($K_m = 100 nM$); estas enzimas son las principales encargadas de metabolizar a este nucleósido; siendo, como su K_m lo demuestra, más importante la AK [49].

En el espacio extracelular, la adenosina y la inosina se acoplan a los AdoR; las concentraciones basales de adenosina son suficientes para unirse y activar los receptores A_{1} , A_{2A} , y A_{3} , sin embargo; el receptor A_{2B} que es de baja afinidad, requiere de concentraciones suprafisiológicas, solo encontrados en condiciones patológicas como las ya mencionadas. La inosina por su parte, aunque menos estudiada ha demostrado participar en la activación de los AdoR; específicamente A_{3} . Algunos otros autores han mostrado que la inosina puede incluso unirse a otros receptores como son el A_{1} y el A_{2B} [27, 28]. La liberación de inosina al espacio extracelular se da bajo las mismas circunstancias que de adenosina.

La participación de estos nucleósidos es tan amplia, como amplia es la distribución de sus receptores. En el ojo, durante procesos como son el glaucoma y el síndrome de pseudoexfoliación, AdoR A₃ es sobre-expresado; asimismo, se reporta un aumento en la concentración de la inosina *in vitro* [50].

Existe también una amplia cantidad de literatura sobre las acciones de estos nucleósidos en la función renal. Al igual que en otros tejidos, la caída de las pozas de ATP precede a la elevación de la adenosina, la inosina e incluso la hipoxantina. Lo anterior induce la vasoconstricción de las arteriolas aferentes y por tanto la disminución de la tasa de filtrado glomerular [51, 52]. Se ha observado también que la secreción de renina es controlada por adenosina, [51, 53] EL uso de agonistas y antagonistas para el AdoR A₁ promueven o inhiben estas acciones respectivamente [54, 55]. La absorción y resorción de electrolitos también está controlada por los AdoR, desde el túbulo renal proximal hasta los túbulos colectores. AdoR A₁ favorece la reabsorción de Na⁺, HCO₃⁻ y PO₄³⁻ en el túbulo contorneado proximal [56] y la inhibe en la rama ascendente del asa de Henle [57]. En el túbulo contorneado distal, a través de los AdoR A₁ y A₂ se favorece el transporte de Ca⁺⁺ [58].

Los receptores de adenosina participan en la protección contra la I-R; aunque contradictorios, el uso de agonistas para los AdoR A₁, A_{2A} [59, 60], antagonistas para el AdoR A₃ [59] y el uso de inhibidores no específicos, como teofilina, previenen la lesión ocasionada por dicha I-R. El aumento de epinefrina promueve la liberación de adenosina en el ojo, lo que a su vez favorece la hipotensión intraocular y previene la lesión ocasionada por la isquemia local [61].

En el sistema nervioso, interviene en procesos tan variados como la enfermedad de Parkinson, la nocicepción, el sueño-vigilia, el reforzamiento y la recompensa [19, 41]. La adenosina modula la liberación de neurotransmisores como ya se mencionó; la inosina liberada tras la hipoxia, regula la respiración a través de la médula ventrolateral [62]. La inosina es también un potente neuroprotector; en ratas sometidas a isquemia cerebral en las que les fue administrado inosina, mostraron disminución del área de infarto comparado contra los controles; además, la administración de inosina impidió la pérdida de habilidades motoras, lo cual es de suma trascendencia clínica. En este estudio anterior, el mecanismo por el cual actúa inosina pudo ser dilucidado pues al usar un antagonista selectivo para AdoR A₃, la protección mediada por este

nucleósido no se observó[63]. Los efectos de adenosina/inosina son mediados rápidamente por las vías de señalización desencadenadas por los receptores; pero, pueden inducir la activación de factores de transcripción y estabilización de otros componentes como el factor inducido por hipoxia 1 α (HIF-1 α) impidiendo la apoptosis de neuronas cerebelares de la granulosa; en este caso, sin HIF-1 α , la protección se ve abolida [64]. Dicha protección contra la lesión en neuronas también abarca el daño axonal, pues al ser seccionados éstos, inosina favorece la neuritogénesis probablemente a través de la activación de la N-cinasa [65]. En situaciones donde existe daño celular, como es el caso de la hipoxia; la apoptosis y la necrosis pueden ser inhibidas al estimular las células con adenosina, inosina o guanosina, y éstas a su vez actúan a través de la vía p42/44 MAPK [66].

En cultivos de cardiomiocitos de ratas neonatas se observó que la inducción de la muerte celular programada inducida por angiotensina II, puede ser inhibida total o parcialmente por la activación específica de los receptores A₁ y A₃ para adenosina respectivamente[67].

Los tejidos más demandantes de oxígeno y que por tanto son los más sensibles al cese abrupto en su aporte, aumentan su supervivencia al activar la vía de señalización purinérgica, como en los cardiomiocitos [66]. En el corazón, algunas enfermedades crónicas inducen una hipertrofia patológica, sobrecarga y fallo del miocardio; la adenosina impide el daño por la exposición prolongada a catecolaminas, reduce la producción de endotelina-1 y disminuye la activación del sistema renina-angiotensina-aldosterona; la estimulación continua del AdoR A₁ inhibe la hipertrofia provocada por la constricción transversal de la aorta [68]. La administración intravenosa de adenosina (*Adenocard*™) disminuye el dromotropismo y cronotropismo; efecto usado en el tratamiento de la taquicardia supraventricular paroxística; esta acción farmacológica es mediada por el AdoR A₁ [41]. Por su parte, la inosina posee efectos sobre la actividad cardiaca. La administración de inosina, directamente en la cavidad atrial derecha de perros anestesiados, aumentó la fuerza contráctil y el flujo sanguíneo circunflejo, sin aumentar la presión arterial sistémica ni la frecuencia cardiaca [69].

La teofilina, un antagonista inespecífico de los AdoR ha mostrado ser capaz de modular los procesos inflamatorios y de broncoconstricción en el asma. El AdoR A₃ parece poseer propiedades proinflamatorias a diferencia del AdoR A₁ que es anti-inflamatorio. Estas acciones sobre las células

inmunológicas que arriban al pulmón, pueden ser manipuladas para conveniencia del paciente asmático [70].

Otro de los varios tejidos que está regulado por la señalización purinérgica es el adiposo. Altos niveles de ácidos grasos libres en plasma; debido, a una lipólisis elevada son factores que favorecen la resistencia a la insulina y detrimentan la señalización de esta hormona. La activación del AdoR A₁ en modelos experimentales en rata disminuye los niveles de triglicéridos en sangre, ácidos grasos libres y abate la resistencia a la insulina [71].

Se sabe que varios de los efectos producidos por muchos de los factores iniciadores del daño celular terminan en algún tipo de estrés oxidativo. Radiación, compuestos químicos, hipoxia, reperfusión, son solo algunos de ellos. La prevención de las lesiones provocadas por las especies reactivas de oxígeno (ERO) mediante el uso de los sistemas purinérgicos ha sido estudiada. El estrés oxidativo demostrado por la presencia de lipoperoxidación provocada por el agente antineoplásico cisplatino, induce la sobre-expresión del AdoR A₁, lo que sugiere una relación entre el estado redox de la célula y las vías de señalización purinérgicas [72]. La exposición de células de Sertoli cultivadas en presencia de H₂O₂ induce un aumento en la liberación de inosina; esta por su parte, disminuye la lipoperoxidación [73]. Parte de las acciones citoprotectoras del par adenosina-inosina son dependientes de la activación de las enzimas antioxidantes. En la línea celular de leucemia basofílica de rata (RBL) la estimulación del AdoR A₃ aumenta la actividad de las enzimas superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa y glutatión reductasa, lo que se vio reflejado en la disminución en la lipoperoxidación; lo anterior, parece ser mediado por la fosforilación de la PKC [74].

Durante la I-R varias vías de señalización son activadas, en los últimos años se ha volcado la vista hacia la señalización a través de AdoR. Los receptores A₁ y A₃ para adenosina favorecen la citoprotección y el preconditionamiento, fenómeno por el cual, las células que son sometidas a un periodo de isquemia/hipoxia no letal son capaces de soportar un nuevo evento que sin la estimulación del primero ocasionaría la muerte celular. En un tejido isquémico pueden alcanzarse concentraciones sumamente altas de inosina que previenen la lesión al inhibir la producción de citocinas proinflamatorias, como son TNF- α , MIP-2 e IL-6 [27]. Algunas de las actividades protectoras de estos nucleósidos durante situaciones de estrés como la hipovolemia, hipoxia, o

choque séptico, están mediadas por un aumento de la actividad de la bomba de Na^+/K^+ dependiente de ATP, impidiendo así el daño osmótico debido a la depleción de energía para mantener en funcionamiento dicha bomba [75, 76].

La participación de la adenosina y la inosina abarca incluso la regulación de vías metabólicas energéticas tan importantes como son la lipólisis (como se mencionó anteriormente), la glucogenólisis, la glucólisis, la biosíntesis de urea e incluso modulan las hormonas que regulan estas vías como la insulina [77, 78]. En hepatocitos aislados de rata, la adenosina y la inosina estimulan la producción de urea de forma dosis-dependiente [79]. Todos los AdoR son capaces de estimular la biosíntesis de urea, mediante la señalización vía el AMPc aunque en algunos casos, también es necesaria la participación de Ca^{++} [79, 80]. La adenosina y la inosina también estimulan la liberación de sustratos oxidables como la glucosa a través de su acoplamiento con los cuatro AdoR para el caso de la adenosina y a través de AdoR A_3 para la inosina [24, 81]. Hirada y cols. por su parte, han demostrado que el uso de un nuevo antagonista para el AdoR $\text{A}_{2\text{B}}$ inhibe la producción de glucosa estimulada por el agonista *N*-etilcarboxiamidoadenosina (NECA) en cultivo de células primarias de hepatocitos, y corroborado en ratones con diabetes tipo 2 al ser capaz de inducir hipoglucemia [82] El AdoR $\text{A}_{2\text{B}}$ parece ser el involucrado en la respuesta glucogenolítica y gluconeogénica por parte de la vía purinérgica [83]; sin embargo, el no haber explorado otros receptores como el AdoR A_3 ; y haber utilizado agonistas poco selectivos para cada subtipo de receptor impiden clarificar el hecho. Estudios con el uso del antagonista no selectivo para los AdoR, pentoxifilina, demostró que en personas sanas, este medicamento inhibe la producción hepática de glucosa sin cambios en las hormonas contrarreguladoras. En pacientes diabéticos tipo 2, la administración de aminofilina produjo una disminución de la glucemia asociada al aumento de la liberación de insulina al torrente sanguíneo [84].

4.5 ISQUEMIA-REPERFUSIÓN

La isquemia-reperfusión (I-R) es el proceso en el cual hay un cese del flujo sanguíneo a cierto tejido u órgano (isquemia) con la consecuente deprivación de nutrientes como oxígeno (hipoxia), glucosa, aminoácidos, etc. La falta de estos nutrientes finalmente ocasionará la muerte celular; sin embargo, el restablecimiento del flujo sanguíneo (reperfusión), pese a lo que la lógica más

simplista podría decir, puede ocasionar el llamado daño por reperfusión [85]. La I-R es uno de los tipos de lesión celular más frecuente en la clínica. La causa más común de la isquemia es la obstrucción de un vaso sanguíneo aunque puede ser incluso por hipovolemia. La isquemia como tal es más deletérea que la hipoxia debido a que esta última condición aun puede producir energía por medio de la vía glucolítica; cuando en la isquemia se acaba el oxígeno disponible y los metabolitos de la glucólisis anaerobia se acumulan por la falta de flujo, sobreviene un daño mayor [86]. Dependiendo del tiempo de isquemia la lesión puede o no ser reversible en función del metabolismo de cada tejido. Mientras aumenta el tiempo de la isquemia, las estructuras celulares se dañan, el genoma sufre lesión y acontece principalmente la necrosis; aunque, la apoptosis puede tener cierto papel en el proceso de muerte celular debido a la salida de señales proapoptóticas de las mitocondrias de las células lesionadas [87]. Si se restablece el flujo sanguíneo con oportunidad, las células se recuperaran, pero por otro lado existe el área llamada de “penumbra”, que son células que aun no sufren necrosis pero que paradójicamente la reperfusión del flujo termina por destruirlas. Uno de los primeros indicios de la disminución energética por dicha isquemia-hipoxia, es la formación de adenosina e inosina y su aparición en el espacio extracelular [24].

Dentro de los primeros cambios morfológicos de la isquemia, se encuentra la inflamación de los lisosomas y de las mitocondrias que puede observarse incluso en los primeros 20-30 minutos. El decremento del ATP lleva a la pérdida del funcionamiento de las bombas iónicas de membrana; y con ello, la pérdida del gradiente electroquímico natural de toda célula (eléctricamente excitable o no). Esto permite la entrada de calcio, lo que conlleva a mayor daño celular, fuga de enzimas y digestión proteica. Al final, la necrosis da lugar a las “figuras de mielina”; componente fosfolipídico de la necrosis, que pueden o no calcificarse, ser fagocitada y/o formar fibrosis [87, 88].

EL mecanismo por el cual se da la lesión por reperfusión no es único y aun se debaten algunas de sus causas. Uno de los principales y más conocidos, es que tras el reabastecimiento de oxígeno se generan abundantes ERO ya sea de un metabolismo parenquimal alterado, del endotelio o de leucocitos infiltrados. La formación de anión superóxido (O_2^*) radical hidroxilo (OH^*) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) produce lipoperoxidación, daño al DNA y afecta la función proteica; favorece la formación del poro de transición de permeabilidad mitocondrial, lo que impide una recuperación de los niveles de ATP [85].

La I-R promueve la inflamación, ésta última aunque es un proceso natural y coadyuvante en muchas situaciones, puede desbordarse y producir un daño colateral. De tal forma que, la liberación de citocinas atrae polimorfonucleares que favorecen el daño; hay activación del complemento, depósito de anticuerpos y lesión celular [89]. Por su parte existen algunos mecanismos que disminuyen el daño por reperfusión como: atrapadores de radicales libres, anticuerpos contra el complemento y restitución del flujo sanguíneo de manera pulsada, fenómeno conocido como postcondicionamiento [90].

Otro mecanismo recientemente descubierto es a través de la vía de señalización denominada cinasa de salvamento del daño por reperfusión (RISK, por sus siglas en inglés) [91]. Esta vía activa proteínas como son PI-3K, Akt, MAPK, ERK, p70, cinasa de glucógeno sintasa beta (GSK β) y finalmente modula el poro de transición de permeabilidad mitocondrial [92]. Esta cascada de supervivencia puede ser activada por los receptores para adenosina y opioides [92]. En 1987 Olafsson demostró por primera vez que la adenosina es capaz de favorecer la supervivencia y disminuir la zona de infarto hasta en un 75% tras la oclusión de la arteria coronaria izquierda descendente [93]. Estos efectos parecen estar mediados por los AdoR A_{2A} y A₃ [94, 95]. Los opioides por su parte parecen activar estas vías a través de los receptores κ y δ [96].

5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La aparición de hiperglucemia es un fenómeno habitual en diferentes situaciones de estrés y es un componente de la denominada respuesta sistémica a la lesión. Los ejemplos de estrés y su respuesta son muy variados: trauma múltiple [97], cirugía mayor [98], quemaduras [99], cualquier enfermedad severa [100] e I-R [24]. Empero, todos ellos poseen características comunes desencadenadas por el sistema inmune, endocrino y el resto de los aparatos y sistemas. Como se mencionó anteriormente, todos ellos comparten la aparición de hiperglucemia y aunado a ello, la resistencia a la insulina [101]. Esta alteración aumenta el desgaste sistémico; favorece la oxidación celular al inducir lipoperoxidación; disminuye el efecto protector del preconditionamiento; aumenta la lesión ocasionada por I-R previo a la isquemia renal; y en general, aumenta la morbi-mortalidad de los que se encuentran en esta condición [102-108]. Recientemente se ha observado que en gran medida, la hiperglucemia que se encuentra en este tipo de trastornos es debido principalmente a un aumento en la producción de glucosa hepática y en menor grado a una falta de captación por parte de los tejidos periféricos [97]. El control de este trastorno metabólico puede mejorar la supervivencia y el pronóstico de estos pacientes. El mantener la glucemia dentro de valores de 80 a 110 mg/dL (4.4 a 6.1 mmol/L) tras la administración de insulina acorta el proceso patológico y disminuye la inflamación sistémica [106]. Esto ha sido probado en varios órganos y condiciones [109] [110]. La acción benéfica del tratamiento con insulina en estas patologías es debida directamente a su acción hipoglucemiante y no a sus otros efectos no relacionados directamente con el control glucémico. Lo anterior sugiere que en las patologías que cursan con hiperglucemia, el mecanismo ideal para combatirlo es disminuir la glucemia directamente a través de la supresión de su producción.

Las condiciones de estrés desencadenan la liberación de epinefrina por parte de las células cromafines de la médula suprarrenal y ésta a su vez, provoca liberación de la glucosa al torrente sanguíneo; proviniendo principalmente del hígado, y de manera mucho menos importante de otros órganos (como el riñón). Este es el dogma que prevalece hasta nuestros días; aunque, algunas otras hormonas como: vasopresina, angiotensina II, cortisol, dopamina, glucagon, y norepinefrina han hecho su aparición en escena bajo la premisa de que en situaciones patológicas

(y algunas en situaciones fisiológicas), poseen cierto control de la glucemia [99, 111-118]. Sin embargo, la literatura apoya el hecho de que estas hormonas no correlacionan con la glucemia, sus valores se modifican minoritariamente o incluso no lo hacen [99, 115-119]. Empero, la epinefrina es la principal hormona que se sabe hasta ahora es la encargada de mediar la hiperglucemia en estado de estrés agudo. Frayn y cols., investigaron los cambios de la glucosa y la epinefrina en paciente lesionados; pese a que la epinefrina correlacionó con la severidad de la lesión, la correlación fue baja para el binomio epinefrina – glucosa ($r^2 = 0.4$) [111]. Frayn y cols. [117], Childs y cols. [99], y Rand y cols. [120] han mostrado resultados similares en diversos modelos de estrés e hiperglucemia.

Como se mencionó, la adenosina e inosina son liberadas durante situaciones de estrés, entre ellas, la I-R. Estos nucleósidos expulsados de las células en respuesta a la depleción de ATP, pueden alcanzar órganos blanco vía torrente sanguíneo, tener la oportunidad de activar los AdoR y estimular la respuesta específica de la estirpe celular que posea al receptor. Los nucleósidos son liberados rápidamente de órganos como el músculo esquelético [121]. Independientemente se sabe también que el hígado; por su parte, libera inmediatamente glucosa en respuesta a la presencia de adenosina e inosina [24]; estos dos, son de los órganos más importantes en el metabolismo sistémico de los nucleósidos [122]. Pese a lo anterior, no se ha estudiado el papel que podrían desempeñar estos nucleósidos como reguladores de la glucemia en fenómenos como son la I-R; o si alguno de estos nucleósidos liberados por algún tejido hipóxico, podría alcanzar algún otro órgano periférico y modificar su actividad; es decir, poseer una función hormonal. Basado en lo anterior, se espera que la adenosina y la inosina sean las encargadas (al menos en parte) de la respuesta hiperglucémica observada iterativamente en la I-R. Dado que el principal candidato de dicha hiperglucemia es la epinefrina, se evaluará la participación de ésta, en el proceso aquí referido.

6. HIPÓTESIS

La adenosina y la inosina, generadas durante la isquemia del músculo esquelético y liberadas durante su reperfusión, activan los receptores hepáticos para adenosina, promueven la liberación de glucosa del hígado y así son responsables de la hiperglucemia durante la I-R.

7. OBJETIVOS

- Conocer las concentraciones de adenosina e inosina en el torrente sanguíneo tras ser liberadas por el proceso de I-R en la pelvis, cola y extremidades inferiores de rata
- Determinar la participación de la adenosina y la inosina en la producción hepática de glucosa que sustenta la hiperglucemia durante la I-R en la pelvis, cola y extremidades inferiores de rata
- Determinar el grado de participación del sistema adrenérgico en la hiperglucemia durante la I-R en la pelvis, cola y extremidades inferiores de rata
- Definir el subtipo de receptor hepático específico por el cual adenosina y/o inosina promueven la hiperglucemia

8. MATERIALES Y MÉTODOS

Modelo experimental: Se utilizaron ratas Wistar macho de 160-180 g, alimentadas *ad libitum*. Para su experimentación, los animales fueron anestesiados con ketamina y xilazina con una posología de 1 y 0.1 mg/kg peso corporal, respectivamente, cada 30 minutos. Se realizó una laparotomía; la aorta y cava abdominal fueron expuestas tanto en el grupo control como en el experimental; en este último grupo se disecaron y ligaron ambos vasos a nivel infrarrenal; a partir de ese momento se da inicio al periodo de isquemia con duración de 5 a 60 minutos dependiendo el experimento en particular. Al término de éste, se procedió a liberar la ligadura para dar paso al periodo de reperfusión. Todos los experimentos en animales fueron realizados de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana sobre especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999) y aprobado por el comité institucional de ética de esta Facultad.

Muestreo sanguíneo: Con ayuda de una jeringa con aguja calibre 31G que contenía el anticoagulante EDTA 10 µl (15%) o el "coctel de inhibición"; se tomaron 200 µl de sangre ya sea en la vena hepática o en la cava abdominal, de acuerdo a cada experimento. Se centrifugaron inmediatamente a 5000 RPM a 4°C; el plasma fue separado y conservado a -70°C hasta su posterior utilización en la medición de los metabolitos. EL coctel de inhibición está diseñado para bloquear el metabolismo de la adenosina [123]. Este coctel consta del mismo EDTA el cual es además un inhibidor de la E-5'-NT [124] más: 3 µl, 20 mM de eritro-9-(2-hidroxi-3-nanil) adenina hidrociorada (EHNA), un inhibidor de la ADA [125]; y 3µl, 20 mM de dipiridamol, un inhibidor de algunos de los transportadores de membrana de los nucleósidos [126] (todos obtenidos de SIGMA-ALDRICH Inc., St Louis, MO, USA).

Medición de los metabolitos: La glucosa fue medida por el método de la glucosa oxidasa de acuerdo a Fales [127]. A las muestras se les agregó glucosa oxidasa, peroxidasa y ortodiansidina en un buffer de fosfatos. La glucosa en presencia de la enzima y de oxígeno es oxidada a D-glucono-1,5-lactona con la producción adicional de peróxido de hidrógeno; este último, en presencia de la oxidasa, oxida al colorante que posteriormente es determinado en un espectrofotómetro a 540 nm tras la adición de H₂SO₄.

La adenosina y la inosina fueron medidas por el ensayo enzimático en espectrofotómetro de doble rayo por el método descrito por Olsson [128]. Brevemente, el plasma fue tratado con HClO₄ 0.6

M, las alícuotas del sobrenadante fueron neutralizadas a pH 7.2 con K_2CO_3 , 5M. Después de 10 minutos, 50 a 100 μ L de las muestras se llevaron a un volumen de 3 ml con HCl-Tris EDTA 0.1 M, pH 7.4, HNa_2PO_4 , 3 mM de EDTA. Adenosina e inosina fueron medidas por espectrofotometría a una absorbancia de 293 nm en presencia de adenosina desaminasa y nucleósido fosforilasa respectivamente.

Uso de antagonistas: Todos los antagonistas se administraron intraperitonealmente después de anestesiar a los animales. Las dosis administradas están consignadas en la tabla 3. Dimetil sulfoxido (DMSO) como vehículo para los antagonistas de AdoR.

Tabla 3. Antagonistas utilizados en este trabajo				
Nombre	VS	K_i (nmoles/L)	Dosis (por kg de peso corporal)	Referencia
Cloro estiril clonidina (CEC)	Selectivo e irreversible para el $AdR\alpha_{1B}$	10	10 mg	[129]
CGS 15943	No selectivo	$A_1 = 1$ $A_{2A} = 3.5$ $A_{2B} = 4.4$ $A_3 = 95$	2 mg	[130, 131]
DPCPX	Selectivo para A_1 AdoR	0.69	20 μ g	[132]
CSC	Selectivo para A_{2A} AdoR	54	175 μ g	[133]
Aloxazina	Selectivo para A_{2B} AdoR	14	0.5 mg	[134]
MRS 1220	Selectivo para A_3 AdoR	14	40 μ g	[29]

Análisis estadístico: Se utilizó la regresión lineal simple y múltiple para evaluar la correlación entre los nucleósidos vs glucosa. Para evaluar la diferencia entre los diferentes grupos se realizó una prueba de ANOVA de dos vías con la prueba de Tuckey como análisis *PostHoc*. Se consideró la existencia de diferencia estadística entre los grupos cuando una $P < 0.001$. Todos los experimentos se efectuaron por duplicado.

9. RESULTADOS

9.1 USO DE ANTICOAGULANTE O COCTEL DE INHIBICIÓN DURANTE EL MUESTREO

En condiciones basales se comparó el uso del coctel de inhibición contra solo anticoagulante en la toma de las muestras sanguíneas. El coctel de inhibición está diseñado para impedir el metabolismo de la adenosina, al bloquear varios de los procesos clave como son: la desaminación de la adenosina, la defosforilación del AMP y la movilización al citoplasma de este nucleósido. Sin embargo, no hay disponible un compuesto que inhiba el metabolismo de la inosina. Debido a que ambos compuestos han de medirse en este trabajo, es necesario evaluar como habrá de afectar el bloqueo del metabolismo e uno de ellos en la medición de ambos. El uso del coctel en condiciones basales (tiempo 0), incrementó en un 10% la concentración de ambos nucleósidos respecto a la solución que contiene solo EDTA (**fig. 5**); aunque, no significativamente. Al someter a los animales a 60 minutos de isquemia más 10 de reperusión (70 min totales), se produjo un aumento importante de ambos nucleósidos respecto al control; 6.5 veces para inosina y 6.1 veces para adenosina, cuando únicamente se usó EDTA. Cuando en este mismo ensayo las muestras fueron procesadas en presencia del coctel de inhibidores, ambos nucleósidos aumentaron; aunque, la significancia estadística fue mucho mayor para adenosina ($P < 0.001$) que para inosina ($P = 0.055$); esto debido a que dicho coctel de paro fue diseñado para bloquear únicamente la depuración de adenosina y no así de inosina. Si se desean comparar las concentraciones de adenosina *versus* inosina tendrá que ser bajo las mismas condiciones; inhibiendo el metabolismo de ambos o de ninguno para poder realizar las comparaciones. Debido a lo anterior, a que en un estado basal las concentraciones de los nucleósidos casi no cambian al usar el coctel de inhibición, y a que ambos valores se encuentran en rangos reportados anteriormente por otros autores [135], los siguientes experimentos se realizaron solo en presencia de EDTA.

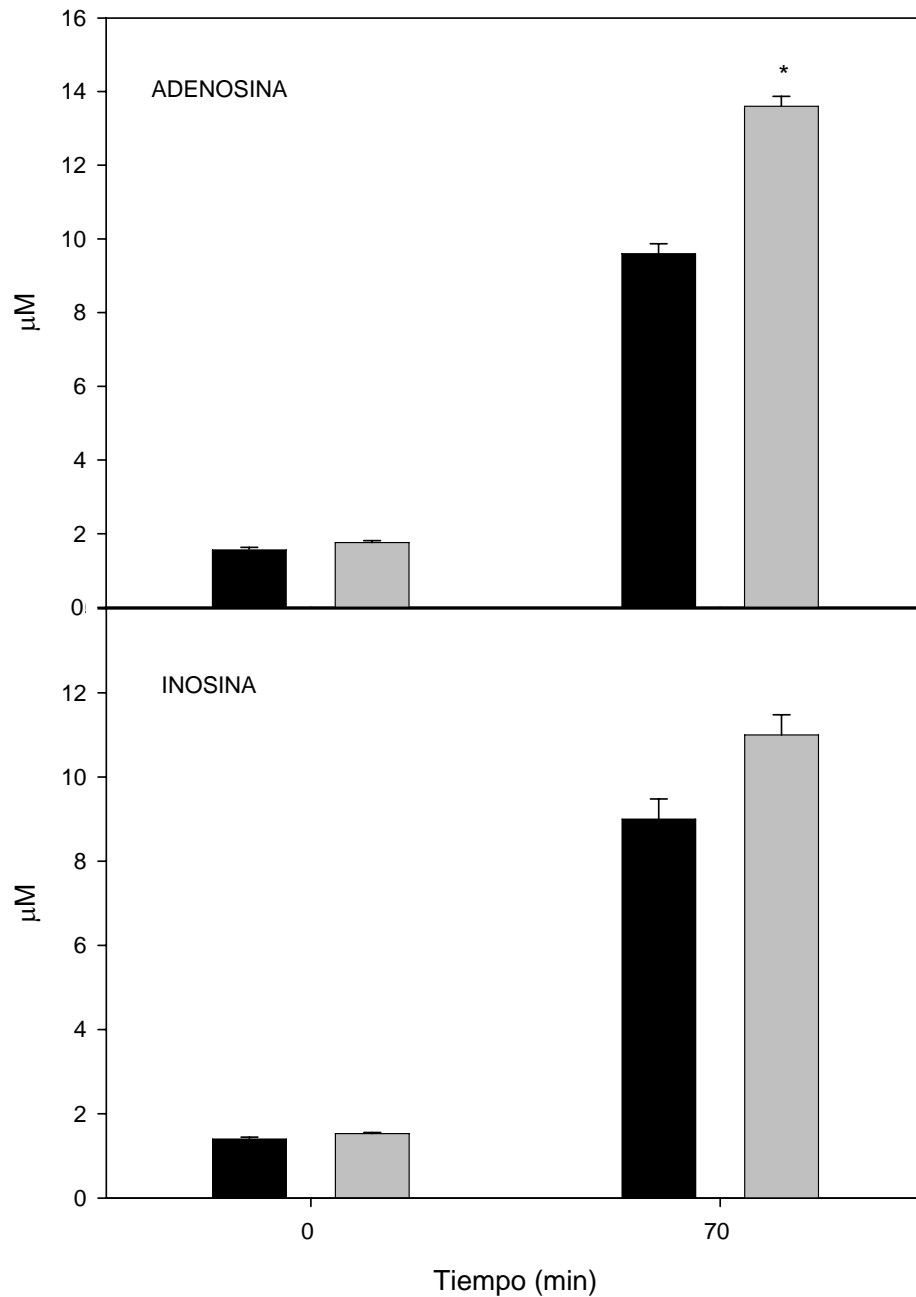


Figura 5. Concentración de adenosina e inosina en presencia del coctel de inhibición. Las muestras se obtuvieron antes de la isquemia (tiempo 0) y 10 minutos después de iniciada la reperusión tras 60 minutos de isquemia (70 min) en presencia de: solamente EDTA (■), o coctel de inhibición (▒). Valores en promedio \pm ES de tres experimentos independientes realizados por duplicado. * $P < 0.001$ respecto a la muestra con EDTA del mismo tiempo.

9.2 CONCENTRACIÓN DE INOSINA, ADENOSINA Y GLUCOSA EN PLASMA DURANTE LA I-R

Inicialmente se determinó la concentración de inosina y adenosina en plasma de ratas no sometidas a ningún protocolo experimental, salvo al mismo procedimiento de anestesia; esto, para determinar sus niveles basales. La inosina y la adenosina tuvieron valores de 1.60 ± 0.05 y 1.36 ± 0.03 $\mu\text{mol/L}$ ($n = 3$) respectivamente (**fig. 6**). Estos valores obtenidos de ratas en estado basal, no son diferentes de los obtenidos antes de realizar la isquemia (tiempo cero) y extraídos de la vena hepática, lugar donde se tomaron el resto de las muestras.

Al primer minuto de haber realizado la isquemia, hubo un aumento en la concentración de los nucleósidos de 2,2 veces respecto al grupo control; esta concentración fue en decremento hasta convertirse en no significativa y alcanzar el valor del grupo control a los 60 minutos de isquemia. Inmediatamente después de tomar la muestra de los 60 minutos, se procedió a realizar la liberación de la ligadura para dar paso a la reperfusión. Un minuto después (61 minutos continuos), la inosina y la adenosina alcanzaron valores aún más altos 8.1 ± 0.2 y 7.6 ± 0.5 $\mu\text{mol/L}$ y a los 7 minutos de reperfusión (67 continuos) 9.3 ± 0.1 y 8.7 ± 0.3 $\mu\text{mol/L}$ respectivamente. Se estudió la respuesta glucémica en este mismo experimento y no se observaron cambios con significancia estadística a lo largo del periodo de isquemia; no es sino hasta el momento de dar paso a la reperfusión que la glucemia aumenta significativamente, 16.86 ± 1.5 y 20.98 ± 1.67 mmol/L a los 61 y 67 minutos respectivamente (**fig. 6**).

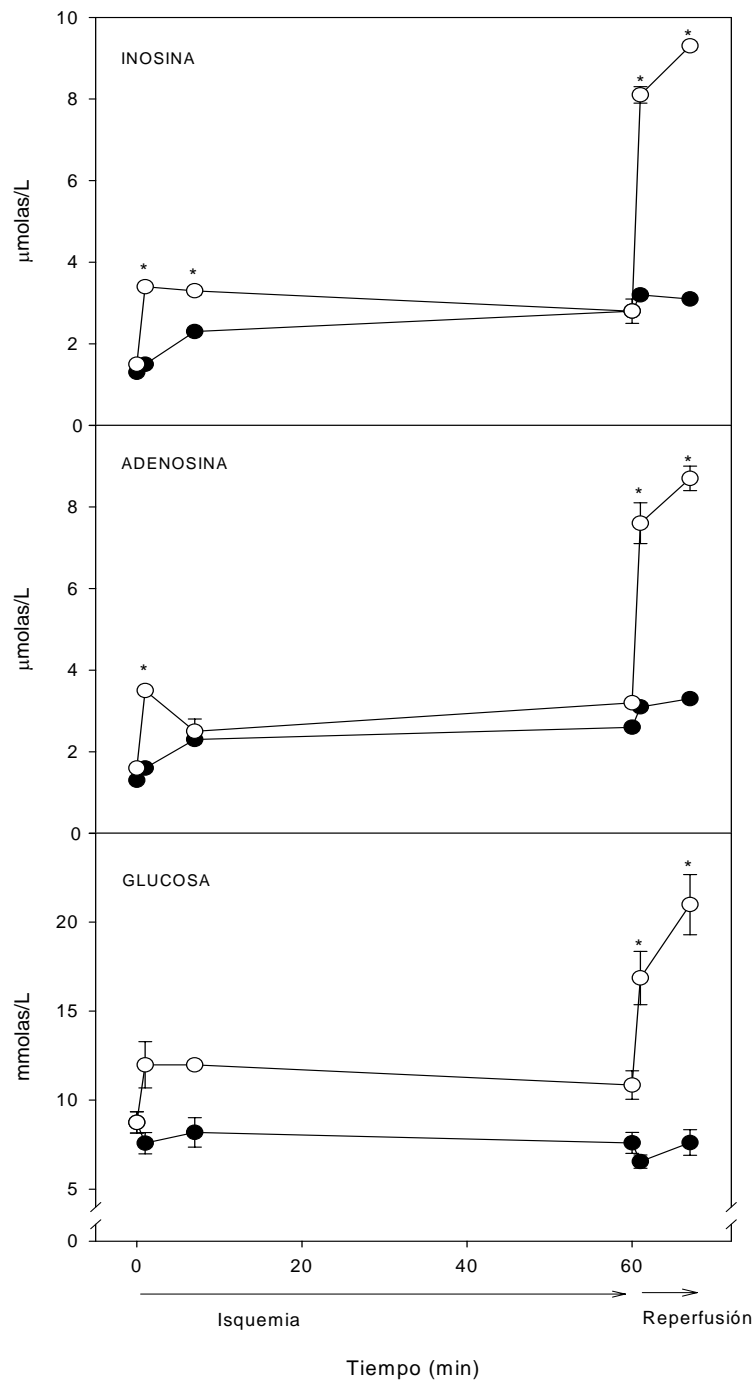


Figura 6 Concentración de inosina, adenosina y glucosa en plasma de ratas sometidas a I-R. Las muestras se obtuvieron a los tiempos 0, 1, 7, 60, 61, y 67 minutos después de iniciado el ensayo. Grupo control (●), grupo sometido a I-R (○). En el grupo de I-R se mantuvieron a las ratas en isquemia durante 60 minutos e inmediatamente después se procedió a la reperfusión. Valores en promedio \pm ES de tres experimentos independientes realizados por duplicado. * $P < 0.001$ respecto al control del mismo tiempo.

9.3 CONCENTRACIÓN DE INOSINA, ADENOSINA Y GLUCOSA TRAS VARIOS PERIODOS DE ISQUEMIA Y SUBSECUENTE REPERFUSIÓN

Para caracterizar la dependencia de la liberación de nucleósidos respecto al tiempo de isquemia, se procedió a variar el tiempo de isquemia desde 5 hasta 60 minutos; y se tomaron muestras de sangre a los 2 y 10 minutos de reperfusión (**fig. 7**). A diferencia del experimento anterior, solo se realizaron 3 muestreos y por tanto, la mitad de la cantidad de sangre fue extraída en cada uno de los animales de experimentación. La medición de los nucleósidos se realizó en la vena cava inferior (**figs. 7a y 7b**), y en la vena hepática (**figs. 7c y 7d**); para comparar los resultados, previo y posterior a su paso por el hígado. Con tan solo 5 minutos de isquemia, las concentraciones de cualquiera de los dos nucleósidos se triplicaron durante la reperfusión. No existieron cambios mayores al aumentar la isquemia hasta los 20 minutos; sin embargo, a los 40, 50 y 60 minutos de isquemia, se aumentaron sustancial y progresivamente la concentración de los nucleósidos en plasma. Aunque en casi cualquier tiempo de isquemia, la concentración de inosina y adenosina es mayor a los 10 minutos de reperfusión, es en los primeros 2 minutos de reperfusión donde se da la mayor elevación en su concentración en función del tiempo de reperfusión. Dichas elevaciones fueron significativamente mayores para inosina que para adenosina, alcanzando valores de hasta 8.42 ± 0.05 $\mu\text{mol/L}$ para inosina, mientras que el valor máximo para adenosina fue de 5.8 ± 0.3 $\mu\text{mol/L}$ (ambos a los 10 minutos de reperfusión). Es también de notar que tanto inosina como adenosina mostraron una concentración similar si las muestras eran extraídas ya sea de la vena cava inferior o de la vena hepática.

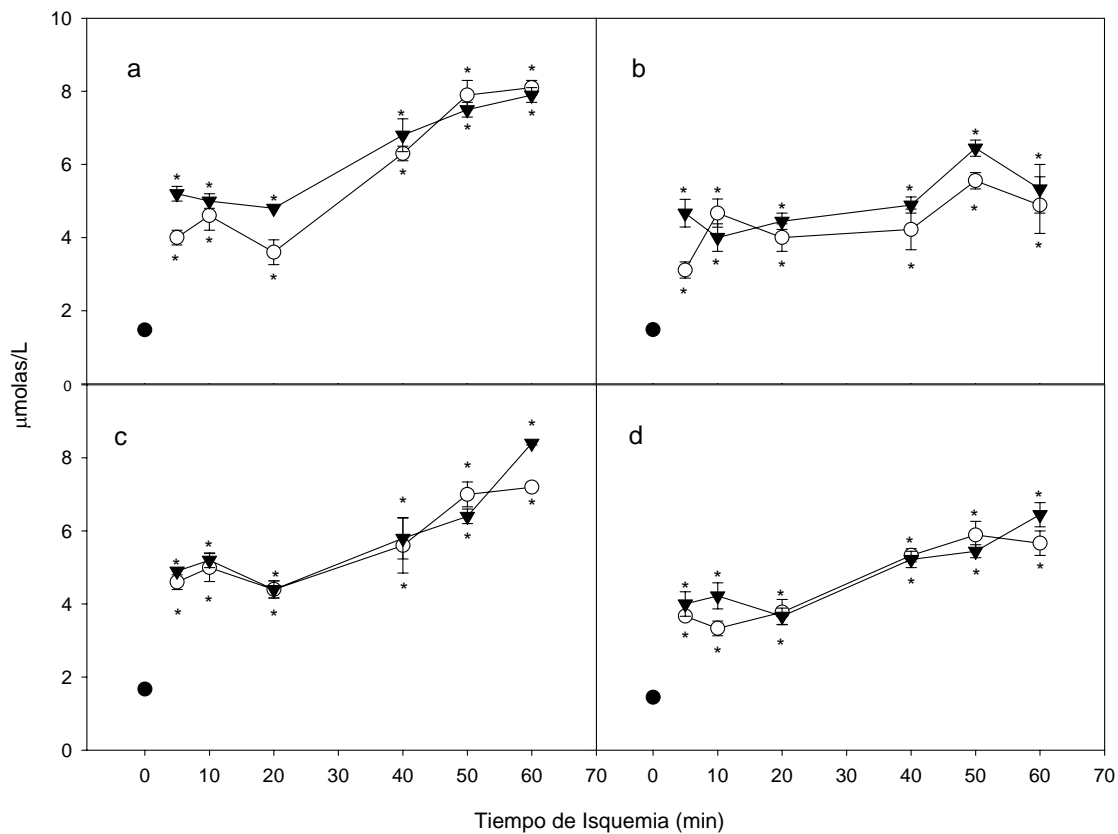


Figura 7. Concentración de los nucleósidos durante la isquemia en función del tiempo de I-R. En cada caso se tomó una muestra al inicio del procedimiento antes de realizar la isquemia (●), posteriormente se procedió a realizar la isquemia según el tiempo que indica el eje de las abscisas, y nuevamente se tomaron muestras a los dos (○) y diez 10 (▼) minutos de reperusión. En a, concentraciones de inosina obtenidas de la vena cava inferior; b, concentraciones de adenosina obtenidas de la vena cava inferior; c, concentraciones de inosina obtenida de la vena hepática; d, concentraciones de adenosina obtenida de la vena hepática. Los valores representan el promedio \pm ES de tres experimentos independientes realizados por duplicado. * $P < 0.001$ respecto al control.

Simultáneamente a la medición de los nucleósidos se cuantificó la glucosa en plasma de la vena hepática (**fig. 8**); y así como con los nucleósidos; el aumentar el tiempo de isquemia provocó un aumento de la glucemia durante la reperusión de manera bifásica; es decir, un cambio menor de 5 a 20 minutos y creciente de los 40 a 60 minutos. Igualmente se observó una mayor liberación de glucosa durante los primeros 2 minutos de reperusión que a los 10.

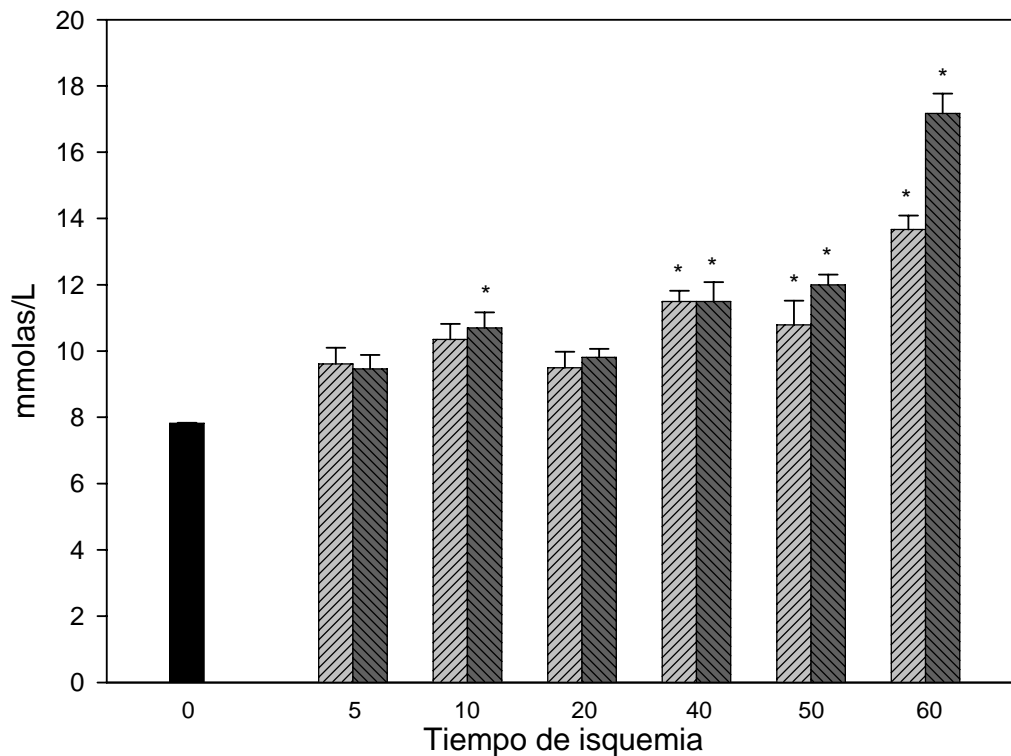


Figura 8. Concentración de glucosa en plasma durante la ischemia tras varios periodos de I-R. En cada caso se tomó una muestra al inicio del procedimiento antes de realizar la ischemia (■), posteriormente se procedió a realizar la ischemia según lo indica el eje de las abscisas, y nuevamente se tomaron muestras a los dos (▨) y diez 10 (▩) minutos de reperfusion. Los valores representan el promedio ± ES de tres experimentos independientes realizados por duplicado. * $P < 0.001$ respecto al control.

9.4 CORRELACIÓN ENTRE LOS NUCLEÓSIDOS Y LA GLUCOSA EN PLASMA

Dado que existe cierta asociación entre la elevación de los nucleósidos y de la glucosa, se realizó un análisis formal de la correlación. Se analizaron los resultados de la figura 6 representados por la **fig. 9a** y por otro lado los datos de la figura 7 y 8 representados por la **fig. 9b**. En ambos casos se obtuvo una correlación positiva; en el primero de ellos, se obtuvieron los siguientes datos: la asociación inosina-glucosa $r^2 = 0.787$; adenosina-glucosa $r^2 = 0.742$; y para ambos nucleósidos-glucosa $r^2 = 0.81$. Para la figura 9b inosina- glucosa $r^2 = 0.808$; adenosina-glucosa $r^2 = 0.409$, ambos

nucleósidos $r^2 = 0.839$. Existe una mayor correlación para la inosina con la glucosa que con la adenosina, (fig. 9b).

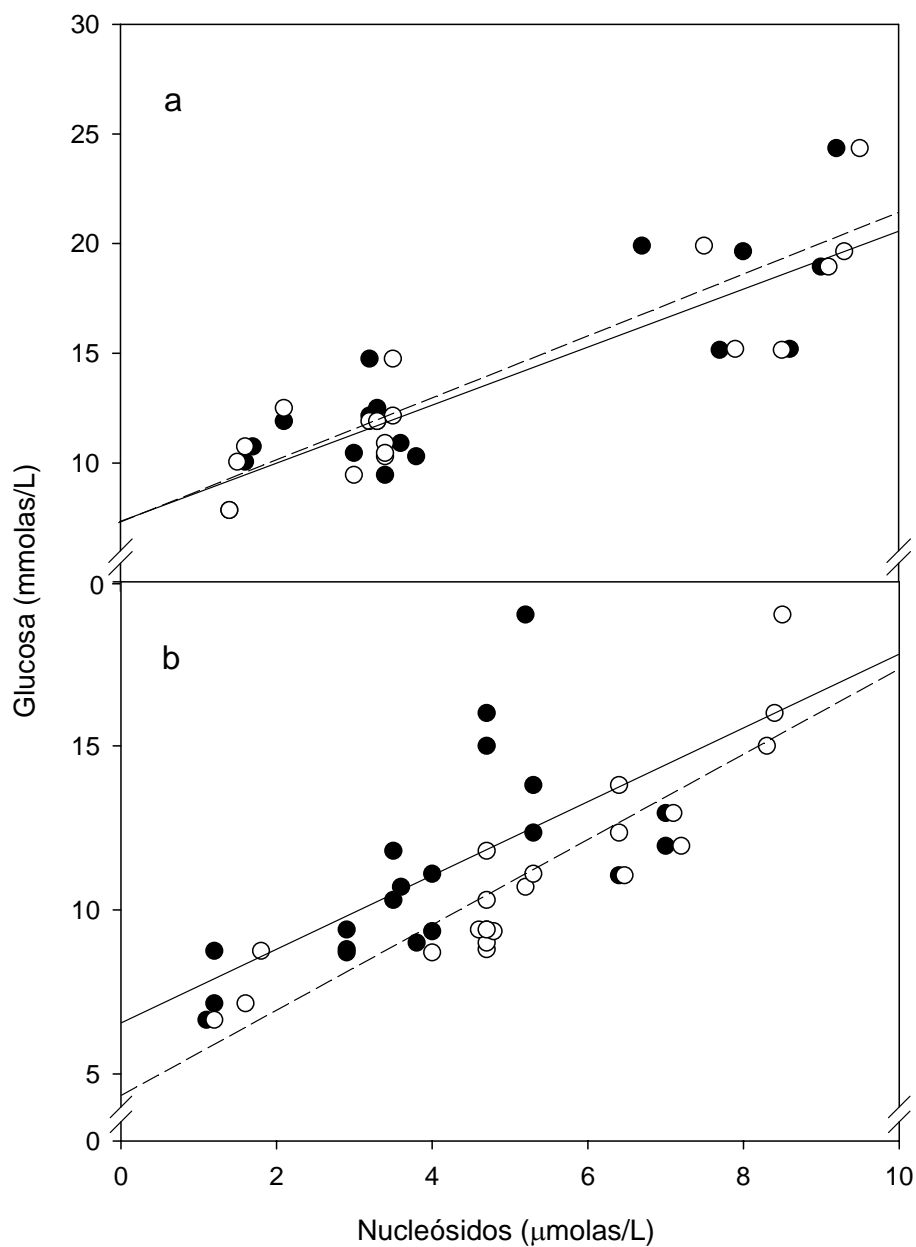


Figura 9. Correlación lineal entre adenosina-glucosa e inosina-glucosa. En a; valores obtenidos de los mismos experimentos de la figura 6; b, valores obtenidos de las figuras 7 y 8. Inosina-glucosa (○----○); adenosina-glucosa (●—●).

9.5 LIBERACIÓN DE GLUCOSA HEPÁTICA DURANTE LA I-R EN PRESENCIA DE ANTAGONISTAS PARA LOS AdoR.

Se constató que la adenosina y la inosina se elevan tras un proceso de isquemia. En la literatura se ha reportado que ambos nucleósidos, pueden promover la liberación de glucosa hepática a través de la activación de los AdoR [24]. Como se observó con anterioridad, la glucemia está fuertemente relacionada a la concentración de nucleósidos; sin embargo, ello no indica que la elevación de los nucleósidos sea la causalidad de la hiperglucemia; sino, solo la presencia de una estrecha asociación entre ambos. Para aclarar este punto, se decidió usar antagonistas selectivos para los AdoR en el modelo de I-R aquí estudiado. Si el aumento de la glucosa es mediada por la activación de los AdoR como consecuencia de un incremento inicial de la inosina y la adenosina; *ergo*, al inhibir los receptores hepáticos no se presentará la hiperglucemia. De esta manera se puede, incluso, determinar que subtipo de receptor específico es el encargado de mediar la señalización celular promotora de elevar la glucemia.

Los animales fueron sometidos a 60 minutos de isquemia. Debido a que la hiperglucemia más importante se da durante los primeros minutos de la reperfusión (fig. 1), y para disminuir el número de muestreos, solo se tomaron muestras durante la reperfusión (**fig. 10**). El control positivo mostró, como en los experimentos anteriores, que la I-R induce hiperglucemia al aumentar los valores de 8.9 ± 0.9 hasta valores de 19.9 ± 1.3 mmolas/L en su punto máximo (7 minutos de reperfusión) y manteniéndose en 17.7 ± 1.5 aún a los 17 minutos. Al usar el inhibidor no selectivo de los AdoR (CGS15943), se alcanzó una inhibición del 80% respecto al control. Se obtuvo una inhibición del 100, 45, 25 y 0% al utilizar los antagonistas selectivos para los receptores de adenosina A_3 , A_1 , A_{2A} , y A_{2B} respectivamente. Incluso el bloqueo del AdoR A_3 disminuye los niveles de glucosa más allá del basal, aunque de manera no significativa. Por tanto, existe una participación de estos receptores en la respuesta hiperglucémica desencadenada por la I-R.

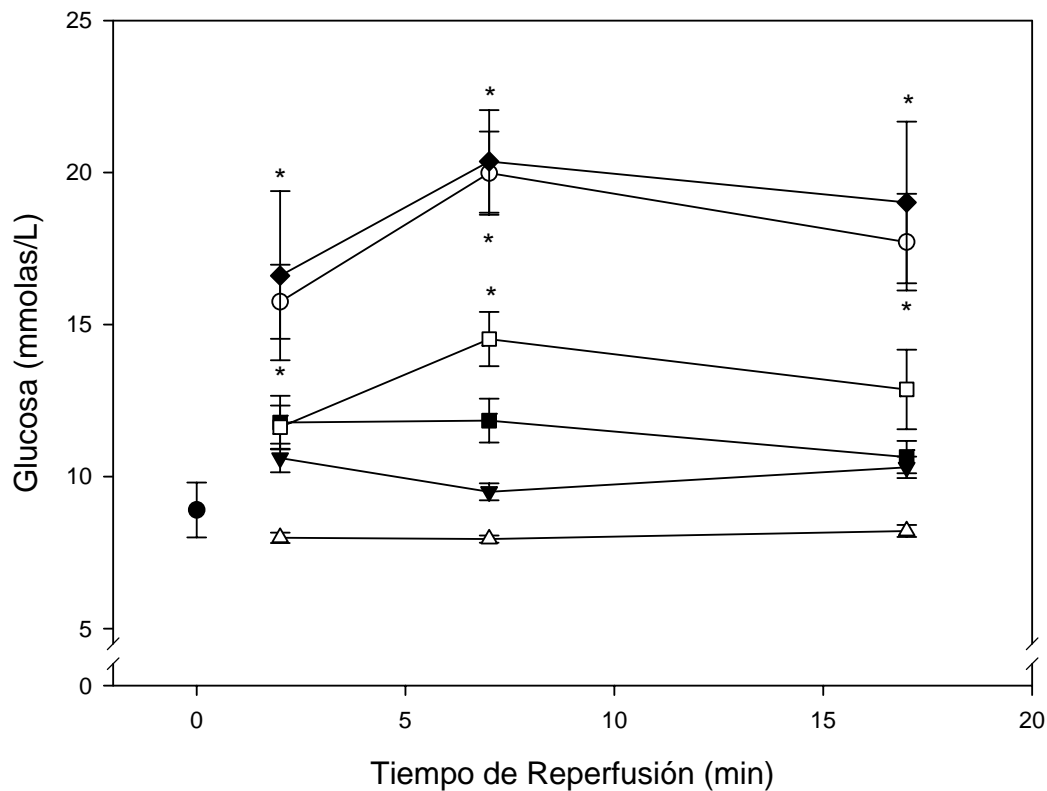


Figura 10. Liberación de glucosa hepática durante la reperfusion tras 60 minutos de isquemia en presencia de antagonistas de los AdoR. Las muestras se tomaron de la vena hepática a los 2, 7 y 17 minutos de reperfusion. Valor basal previo a la isquemia (●); control positivo (sin antagonista alguno) (○); en presencia de: Aloxazina, antagonista AdoR A_{2B} (◆); CSC, antagonista AdoR A_{2A} (□); DPCPX, antagonista AdoR A₁ (■); CGS 15943, antagonista AdoR no selectivo (▼); y MRS 1220, antagonista AdoR A₃ (△). Valores representan el promedio ± ES de tres experimentos independientes realizados por duplicado. * $P < 0.001$ respecto al control.

9.6 LIBERACIÓN DE GLUCOSA HEPÁTICA DURANTE LA I-R PERMITIENDO ÚNICAMENTE LA ACTIVACIÓN DE UNO DE LOS SUBTIPOS DE AdoR.

Para comprobar los resultados previos se realizó un experimento complementario al anterior. Bajo el mismo protocolo de 60 minutos de isquemia y posterior determinación de la glucemia durante la reperfusion; se buscó determinar la participación de cada subtipo de AdoR al bloquear con los mismo antagonistas (tabla 3), tres de los cuatro subtipos y dejar libre uno de ellos en cada grupo experimental; éste, estará disponible para su activación por el ligando; para así, modificar la glucemia. Al permitir la activación del AdoR A₃, la hiperglucemia se presentó de manera idéntica a

la observada en el control positivo; es decir el ligando, inosina y adenosina pudieron actuar en este receptor plenamente. Respuestas parciales se obtuvieron al dejar abiertos los receptores A₁ y A_{2A} para adenosina. Cuando se dejó abierto el AdoR A_{2B} y se bloquearon el resto de los subtipos receptores, la hiperglucemia se abatió completamente (**fig. 11**).

Se hicieron experimentos con el uso del vehículo DMSO (utilizado para disolver a todos los antagonistas AdoR) en el que se no hubo modificaciones respecto a los controles (fig. 11)

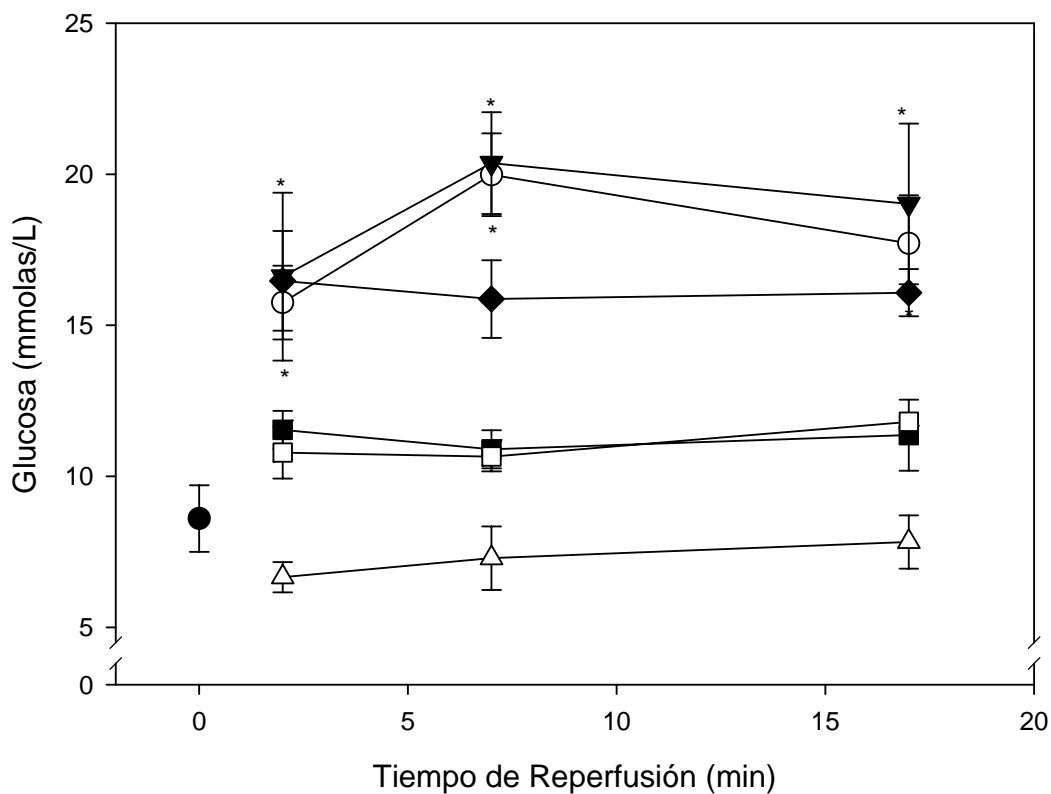


Figura 11. Determinación de la hiperglucemia durante la reperfusion después del bloqueo de tres de los cuatro AdoR. Las muestras se tomaron de la vena hepática a los 2, 7 y 17 minutos de reperfusion. Valor basal previo a la isquemia (●); control positivo (sin antagonista alguno) (○); dejando libre únicamente al subtipo: AdoR A₃ al aplicar DPCPX, CSC y Aloxafina (▼); AdoR A₁ al aplicar CSC, Aloxafina y MRS1220 (□); AdoR A_{2A} al aplicar DPCPX, Aloxafina y MRS1220 (■); y AdoR A_{2B} al aplicar DPCPX, CSC y MRS1220 (△). I-R solo en presencia del disolvente DMSO (◆). Los valores representan el promedio ± ES de tres experimentos independientes realizados por duplicado. * $P < 0.001$ respecto al control.

9.7 LIBERACIÓN DE GLUCOSA HÉPÁTICA DURANTE LA I-R EN PRESENCIA DE ANTAGONISTAS ADRENÉRGICOS

Como se observa en los experimentos detallados en el párrafo previo, la participación purinérgica es cuantitativamente importante; empero, es de todos sabido que el sistema adrenérgico es primordial en la activación de las vías gluconeogénicas y glucogenolíticas en momentos de estrés [136]. La idea original de Cannon respecto a la aparición de la hiperglucemia establece que es mediada por la liberación de epinefrina y la posterior activación de sus receptores hepáticos (citado en [137]). Tal propuesta es debatible bajo la luz de la literatura actual (véase introducción). Para estudiar que tanta participación tiene el sistema adrenérgico en la hiperglucemia provocada por la I-R, se hizo el mismo protocolo experimental descrito para inhibir los receptores de adenosina; empleando esta vez, un antagonista irreversible del AdrR α_1 . Este receptor es el encargado de transducir la señal para la liberación de glucosa en hepatocitos de ratas jóvenes [138]. En el grupo sometido únicamente a laparotomía sin I-R, no se observaron cambios en la concentración de glucosa a lo largo del experimento; un grupo similar pero con la adición del inhibidor seleccionado, CEC, mostró un ligero aumento en la glucemia solo durante la reperfusión (no estadísticamente significativo) y no así en el periodo de isquemia (**fig. 12**). El control positivo, promovió la hiperglucemia de manera similar a lo reportado en la figura 6; un aumento durante el periodo de isquemia pero, mucho mayor durante la reperfusión. Es de notar que este aumento se da en los primeros minutos de la reperfusión, que alcanza su máximo (20.98 ± 1.6 mmolas/L) a los 7 minutos de reperfusión (67 minutos continuos) y que esta hiperglucemia permanece por al menos 30 minutos. Cuando al grupo bajo I-R fue tratado con CEC, dicha hiperglucemia se vio reducida significativamente en un 33%. Pese a la importante reducción al inhibir el AdrR α_1 , la inhibición total de la liberación de glucosa al bloquear el AdoR A_3 indica una mayor participación de este último en la hiperglucemia desencadenada por la I-R.

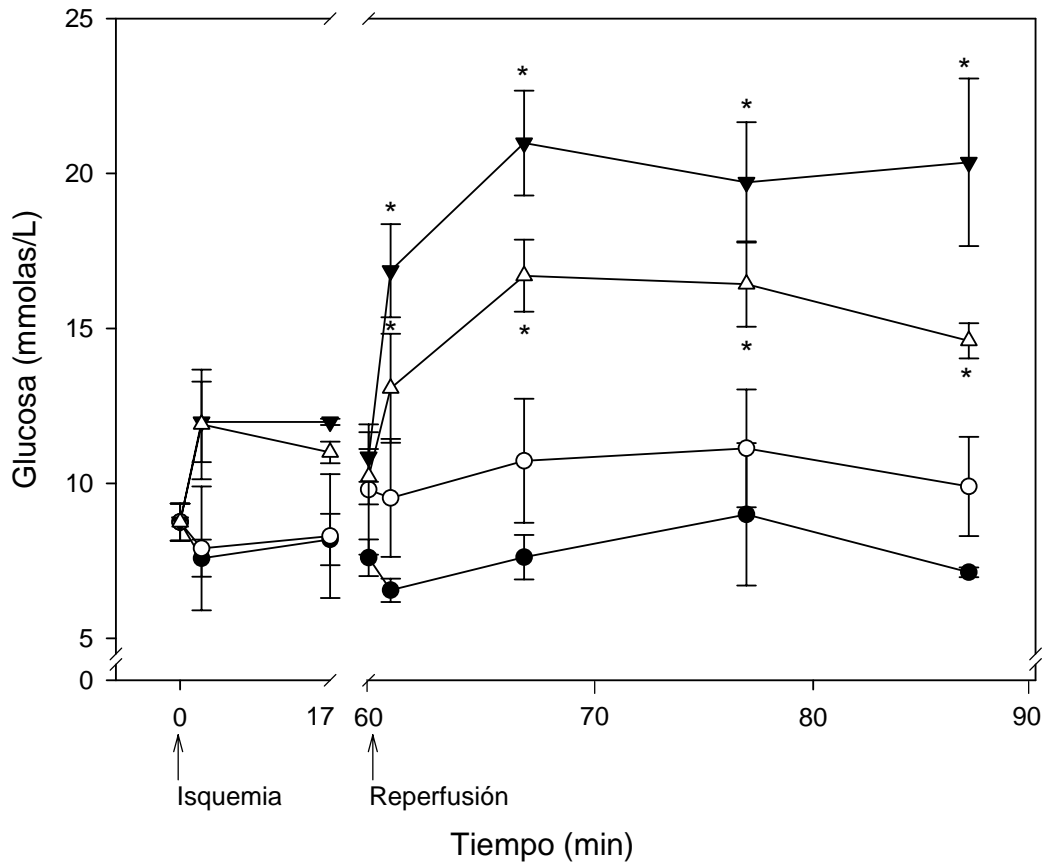


Figura 12. Liberación de glucosa hepática durante la reperfusion tras 60 minutos de ischemia en presencia del antagonista para el α_1 AdrR. Las flechas indican el tiempo de inicio del periodo de ischemia y el de reperfusion. Control negativo, ratas sometidas a laparotomia sin I-R (●). Ratas sometidas a laparotomia sin I-R pero con CE-C (○). Control positivo, grupo con 60 minutos de ischemia y posterior reperfusion (▼). Grupo con I-R más la adición de CE-C (Δ). Muestras tomadas al tiempo 0, 1, 7, 60, 61, 67, 77 y 87 minutos. Valores representan el promedio \pm ES de tres experimentos independientes realizados por duplicado. * $P < 0.001$ respecto al control negativo en su mismo tiempo.

10. DISCUSIÓN

El trabajo aquí realizado muestra otra de las aristas que tiene el sistema de señalización purinérgico; en este caso, sobre el metabolismo de la glucosa, una arista que poco a poco ha empezado a mostrar tener relevancia. En este estudio se demuestra la participación de la señalización purinérgica en la hiperglucemia desencadenada por la I-R. Se observa que la adenosina e inosina aumentan en plasma durante la reperfusión de manera dependiente al tiempo de isquemia realizado; y de igual manera, la glucosa. Esta elevación en la concentración de los nucleósidos posee una correlación lineal con la elevación de la glucemia; y, el Ador A₃ es un importante regulador en la glucemia durante los procesos de estrés como lo es la I-R.

Mucho se ha discutido sobre el uso o no de los cocteles de inhibición. Existen varias mezclas de ellos, con inhibidores de todos los tipos; sin embargo, la mayoría se enfoca en bloquear solo algunos de los pasos clave. Uno de estos puntos específicos es la salida o entrada de los nucleósidos a la célula; no obstante, el dipiridamol, que puede inhibir al ENT1 humano (ubicuo e importante en el transporte de estas purinas), es incapaz de inhibir al homólogo de rata. El ENT2 y el ENT3 ya sea de humano o de rata son igualmente insensibles. En el caso de los CNT, ninguno de ellos es inhibido por el dipiridamol [20].

La adenosina desaminasa ha sido etiquetada como la principal responsable del depuramiento de la adenosina en el medio extracelular; no obstante; no es la única responsable. El bloqueo de ENT1 (humano) sensible al dipiridamol, aumenta las concentraciones de adenosina sustancialmente [19]. De igual manera, el bloqueo de la enzima AK, aumenta la concentración de adenosina 30 veces; en tanto, el bloqueo de la ADA solo la aumenta al doble, esto se debe en parte a que esta última posee una afinidad menor para adenosina que la primera [139]. Pese a ello, algunos trabajos en los que se cuantifica adenosina en sangre, no incluyen un inhibidor de la AK en sus cocteles de inhibición.

Existen además otras enzimas importantes que modifican la concentración de adenosina en plasma; como son, las ectonucleotidasas (CD73) las ectoATPasas, ecto-fosfodiesterasas y NTPDasas (ver figura 4). Todas ellas pueden modificar los valores de adenosina sin que los metabolitos de los que proviene o que forma (ATP, ADP, AMP, inosina), tengan que entrar al citosol.

En algunos trabajos donde se miden no solo las concentraciones de la adenosina sino también de otros metabolitos relacionados con ella como la inosina, la hipoxantina, el ácido úrico, el orótico, el AMP, etc., no utilizan este coctel [140-142]. Hacer interpretaciones de todos o algunos de estos metabolitos mientras el metabolismo de uno es inhibido y el de los otros no; es cuando menos, controversial.

La enzima más importante en el metabolismo de la inosina es la PNP. Esta enzima pese a que su ubicación es citosólica [12], determina de manera importante la concentración de inosina en sangre pues su inhibición favorece la acumulación de este nucleósido en este fluido [143]. Probablemente las enzimas citosólicas del metabolismo de la adenosina también jueguen un papel importante en su depuración plasmática.

Como se expuso en los resultados, el coctel de inhibición solo modifica durante la reperfusión las concentraciones de adenosina y no así de inosina. Como uno de los propósitos del presente trabajo es la comparación entre ambos compuestos; dicha comparación debe ser sometida a las mismas variables, y a falta de un inhibidor de la PNP, los experimentos se realizaron sin usar el coctel de inhibición. Pese a lo anterior, los resultados presentados son concluyentes, pues todos los aumentos de las concentraciones de adenosina e inosina durante la reperfusión son estadísticamente significativos con $P < 0.001$.

El valor basal de glucosa en todos los grupos se encontró alrededor de 7.23 ± 0.50 mmolas/L ($n = 3$). Este concentración, un poco más alta de lo esperado, parece deberse a que los experimentos se realizaron en ratas alimentadas y aún con bolo alimenticio en el tracto digestivo; esto, asociado al estrés quirúrgico, que como se comentó desencadena una respuesta hiperglucémica, pueden ser las causantes del nivel basal ligeramente aumentado. De hecho, se puede observar que a mayor manipulación quirúrgica del animal, mayor es la liberación de los nucleósidos.

La elevación de los nucleósidos precede a la hiperglucemia. Los experimentos de la fig. 6 revelan que pese a que en los grupos controles hay un aumento de ambos nucleósidos del 77% a los 7 minutos y de hasta 2.5 veces a los 67 minutos, la glucosa permanece inalterada, esto parece mostrar la existencia de un umbral en la concentración de nucleósidos en plasma para que éstos puedan activar la liberación de glucosa, dicho umbral parece situarse alrededor de $4 \mu\text{mol/L}$. Es notorio que el aumento más evidente en la concentración de estos tres metabolitos se registra

dos minutos después de iniciada la reperfusión. La capacidad que tienen adenosina e inosina sobre la regulación de la glucemia muestra ser de rápida acción; en el momento que se elevan los nucleósidos en sangre (siempre y cuando hayan pasado dicho umbral), desencadenan inmediatamente la liberación de glucosa.

Como se observa en la figura 7, la liberación de nucleósidos está en función del tiempo de isquemia al que sea sometido el tejido muscular esquelético. Con tan solo 5 minutos de isquemia, y después de 2 minutos de reperfusión, la inosina y la adenosina se elevaron de 1.47 ± 0.01 y 1.33 ± 0.01 a valores de 4.6 ± 0.2 y 3.3 ± 0.3 $\mu\text{mol/L}$ respectivamente. Este aumento de ambos nucleósidos, y principalmente de inosina, es suficiente para aumentar la glucemia, desde 7.6 ± 0.01 , a un valor de 9.6 mmol/L . El resto de los valores de glucosa también se eleva al aumentar el tiempo de isquemia, debido a la disminución en la relación producción/gasto de ATP ocasionado por la isquemia. En todos los casos, el mayor aumento tanto de la glucemia como de los nucleósidos se da en el primer par de minutos de la reperfusión, lo que indica un rápido acarreo del sistema circulatorio de los nucleósidos y una rápida respuesta hepática. En este mismo experimento no existen diferencias estadísticas entre las muestras obtenidas de la vena hepática *versus* la cava abdominal; pese al paso de la sangre por el hígado donde los nucleósidos habrán de unirse a sus receptores hepáticos para desencadenar la liberación de glucosa. Esto podría ser indicativo de un estado de recambio o dinamismo constante de estos nucleósidos en sangre; es decir, aunque la vida media de determinado compuesto sea corta (segundos), la degradación del metabolito está equilibrada con una formación igualmente rápida; esto hasta que las condiciones no cambien de fondo; v. gr. la modificación en la expresión y actividad de determinada enzima del metabolismo de la adenosina; o por el contrario; el restablecimiento de las pozas energéticas, con un restitución de la concentración de ATP a partir de la reutilización de adenosina e inosina por las vías de reciclaje. En relación a las concentraciones plasmáticas de adenosina *versus* inosina; sí se presentaron diferencias, siendo en todos los casos mayor la concentración para esta última. Lo anterior indica la tendencia de la adenosina hacia la producción de inosina.

El patrón de liberación de adenosina, inosina y glucosa es similar; hecho que queda demostrado al realizar con el análisis de correlación lineal. En general, la correlación lineal de inosina-glucosa fue más alta que para adenosina-glucosa. Para la fig. 9a, $r^2 = 0.787$ y $r^2 = 0.742$; para la fig. 9b la diferencia es estadísticamente significativa, $r^2 = 0.808$ y $r^2 = 0.409$. Estas diferencias pueden

deberse al diferente estado hemodinámico entre los dos grupos de animales. Esto se demuestra al observar que la adenosina, la inosina y la glucosa alcanzan valores más altos en los experimentos correspondientes a la fig. 9a respecto a los obtenidos en la fig. 9b. En los primeros, se extrajo un total de 1.2 ml de sangre para poder obtener 6 muestras; en el segundo caso, solo se tomó una serie de 3 muestras y por tanto 0.6 ml de sangre. Al extraer mayor cantidad de volumen sanguíneo en los animales de la fig. 9a, parece lógico suponer que se agrava el estado hemodinámico de este grupo de animales; por tanto, están sometidos a mayor estrés que al que se le extrajo menor volumen sanguíneo; en consecuencia aumenta la respuesta sistémica, para el caso que nos concierne; más nucleósidos y más glucosa liberada. Nótese también que en este trabajo cualquier correlación lineal simple o múltiple, (exceptuando adenosina-glucosa en fig. 9b), es mas fuerte que la correlación reportada por Frayn y cols., para el dúo epinefrina-glucosa ($r^2 = 0.4$) [111]. Apréciase que estas correlaciones poseen un gran significado estadístico debido a que son procesos multifactoriales realizados *in vivo*.

Previamente existe el reporte de que la hiperglucemia que se presenta en los procesos de estrés sistémico cursa con resistencia a la insulina y aumento en la producción endógena de glucosa. La producción endógena parece ser más importante que la resistencia a la insulina para que se manifieste la hiperglucemia [97, 144, 145]. Aunado a lo anterior, en trabajos previos realizados por este equipo de investigación y otros; se mostró que la adenosina y la inosina son capaces de estimular la producción endógena de glucosa al promover la gluconeogénesis y la glucogenólisis [81, 83]. Con los experimentos presentados en las figuras 10 y 11 se demuestra que el mecanismo de señalización de este proceso es mediado a través de los AdoR, específicamente tras la activación del AdoR A₃. El bloqueo total de este subtipo de receptor inhibe la hiperglucemia; fenómeno característico de la I-R. Cuando A₃ es el único AdoR libre (fig. 11), la inosina y adenosina producidas por la isquemia y liberadas por la reperfusión activan este receptor y promueven la hiperglucemia de la misma manera que sin el uso de algún antagonista. Cabe aclarar que el principal receptor al cual se une inosina es el AdoR A₃; no así adenosina el cual puede acoplarse a cualquiera de los 4 subtipos de receptores. Por tanto, los datos son concluyentes respecto a la participación del AdoR A₃ en la hiperglucemia inducida por I-R.

Al aplicar el modelo anterior pero con el antagonista adrenérgico (fig. 12), queda demostrada que la función de la epinefrina en promover la hiperglucemia durante periodos de estrés esta

supeditada a la acción de nucleósidos como la inosina y la adenosina. El bloqueo del receptor AdrR α_{1B} solo disminuye en un 33% la liberación de glucosa hepática, en tanto para el AdoR A_3 , la inhibición es del 100%.

Se sugiere que el sistema purinérgico, es el principal encargado de mediar la hiperglucemia estimulada por I-R; sin embargo, pese a que el bloqueo del AdoR A_3 inhibe totalmente la hiperglucemia, la epinefrina también puede hacerlo (aunque solo parcialmente). Esto indica que ambos sistemas de señalización se encuentran de algún modo relacionados. Es sabido que existen receptores de diferentes familias que actúan sinérgicamente; y que el bloqueo de uno de ellos, abole la respuesta totalmente pese a que el otro receptor aún se encuentre disponible y su ligando presente [31]. Por ejemplo, se sabe que el AdoR A_1 interactúa sinérgicamente con el AdrR α_1 para incrementar el flujo de Ca^{++} inducido por acetilcolina en células ciliares [146]. En condiciones basales, inosina y adenosina poseen una concentración relativamente alta comparada con la de epinefrina; esta concentración basal es capaz de activar constitutivamente a todos los receptores de adenosina (excepto AdoR A_{2B}). En el caso del experimento de la figura 10, el bloqueo del AdoR A_3 impide la acción de la inosina y la adenosina sobre este, y por tanto se inhibe la liberación de glucosa en un 100%; sin embargo, en este mismo experimento, donde no está bloqueado el receptor adrenérgico que aumenta en un 33% la glucemia, la epinefrina endógena no es capaz de elevar la concentración de glucosa en sangre. Esto puede deberse a la interdependencia de estos dos receptores. Dicha dependencia es inequitativa pues el receptor adrenérgico depende más del de adenosina que a la inversa.

11. CONCLUSIONES

Se concluye que: 1) la isquemia provocada por la ligadura de la arteria y vena cava abdominal promueve la liberación de inosina y adenosina de los tejidos afectados; 2) y que la cantidad de nucleósidos liberados estará en función del tiempo de dicha isquemia. Así mismo: 3) durante la reperfusión, estos nucleósidos vía sanguínea pueden alcanzar otros órganos y modular su actividad; en el caso del hígado, estimular la liberación de glucosa a través del AdoR A₃; siendo aún más importante incluso que la acción de la epinefrina y que; 4) el efecto regulador de estos nucleósidos y sus antagonistas sobre la glucemia en los procesos de estrés sistémico puede ser de importancia fisiológica y clínica.

REFERENCIAS

1. Buchanan, J.M. and D.W. Wilson, *Biosynthesis of purines and pyrimidines*. *Fed Proc*, 1953. **12**(2): p. 646-50.
2. Buchanan, J.M., *Biosynthesis of the purines*. *J Cell Physiol Suppl*, 1951. **38**(Suppl. 1): p. 143-71.
3. Hartman, S.C. and J.M. Buchanan, *The biosynthesis of the purines*. *Ergeb Physiol*, 1959. **50**: p. 75-121.
4. Hartman, S.C. and J.M. Buchanan, *Nucleic acids, purines, pyrimidines (nucleotide synthesis)*. *Annu Rev Biochem*, 1959. **28**: p. 365-410.
5. Davey, C.L., *Synthesis of adenylosuccinic acid in preparations of mammalian skeletal muscle*. *Nature*, 1959. **183**(4666): p. 995-6.
6. Carter, C.E. and L.H. Cohen, *The preparation and properties of adenylosuccinase and adenylosuccinic acid*. *J Biol Chem*, 1956. **222**(1): p. 17-30.
7. Remy, C.N., W.T. Remy, and J.M. Buchanan, *Biosynthesis of the purines*. VIII. *Enzymatic synthesis and utilization of alpha-5-phosphoribosylpyrophosphate*. *J Biol Chem*, 1955. **217**(2): p. 885-95.
8. Kornberg, A., I. Lieberman, and E.S. Simms, *Enzymatic synthesis of purine nucleotides*. *J Biol Chem*, 1955. **215**(1): p. 417-27.
9. Flaks, J.G., M.J. Erwin, and J.M. Buchanan, *Biosynthesis of the purines*. XVI. *The synthesis of adenosine 5'-phosphate and 5-amino-4-imidazolecarboxamide ribotide by a nucleotide pyrophosphorylase*. *J Biol Chem*, 1957. **228**(1): p. 201-13.
10. Zimmermann, H., *Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides*. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2000. **362**(4-5): p. 299-309.
11. Segal, H.L. and B.M. Brenner, *5'-Nucleotidase of rat liver microsomes*. *J Biol Chem*, 1960. **235**: p. 471-4.
12. Moriwaki, Y., T. Yamamoto, and K. Higashino, *Enzymes involved in purine metabolism--a review of histochemical localization and functional implications*. *Histol Histopathol*, 1999. **14**(4): p. 1321-40.
13. Fields, R.D. and G. Burnstock, *Purinergic signalling in neuron-glia interactions*. *Nat Rev Neurosci*, 2006. **7**(6): p. 423-36.
14. Kresnowati, M.T., et al., *When transcriptome meets metabolome: fast cellular responses of yeast to sudden relief of glucose limitation*. *Mol Syst Biol*, 2006. **2**: p. 49.
15. Moser, G.H., J. Schrader, and A. Deussen, *Turnover of adenosine in plasma of human and dog blood*. *Am J Physiol*, 1989. **256**(4 Pt 1): p. C799-806.
16. Powell, J.F. and J.R. Hunter, *Adenosine deaminase and ribosidase in spores of Bacillus cereus*. *Biochem J*, 1956. **62**(3): p. 381-7.
17. Lindberg, B., H. Klenow, and K. Hansen, *Some properties of partially purified mammalian adenosine kinase*. *J Biol Chem*, 1967. **242**(3): p. 350-6.
18. Agarwal, R.P. and R.E. Parks, Jr., *Purine nucleoside phosphorylase from human erythrocytes*. IV. *Crystallization and some properties*. *J Biol Chem*, 1969. **244**(4): p. 644-7.
19. King, A.E., et al., *Nucleoside transporters: from scavengers to novel therapeutic targets*. *Trends Pharmacol Sci*, 2006. **27**(8): p. 416-25.

20. Podgorska, M., K. Kocbuch, and T. Pawelczyk, Recent advances in studies on biochemical and structural properties of equilibrative and concentrative nucleoside transporters. *Acta Biochim Pol*, 2005. **52**(4): p. 749-58.
21. Sakowicz, M., A. Szutowicz, and T. Pawelczyk, Differential effect of insulin and elevated glucose level on adenosine transport in rat B lymphocytes. *Int Immunol*, 2005. **17**(2): p. 145-54.
22. Aguayo, C., et al., Equilibrative nucleoside transporter 2 is expressed in human umbilical vein endothelium, but is not involved in the inhibition of adenosine transport induced by hyperglycaemia. *Placenta*, 2005. **26**(8-9): p. 641-53.
23. Montecinos, V.P., et al., Regulation of adenosine transport by D-glucose in human fetal endothelial cells: involvement of nitric oxide, protein kinase C and mitogen-activated protein kinase. *J Physiol*, 2000. **529 Pt 3**: p. 777-90.
24. 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.
25. Fredriksson, R. and H.B. Schioth, The repertoire of G-protein-coupled receptors in fully sequenced genomes. *Mol Pharmacol*, 2005. **67**(5): p. 1414-25.
26. Jin, X., et al., Inosine binds to A3 adenosine receptors and stimulates mast cell degranulation. *J Clin Invest*, 1997. **100**(11): p. 2849-57.
27. Hasko, G., M.V. Sitkovsky, and C. Szabo, Immunomodulatory and neuroprotective effects of inosine. *Trends Pharmacol Sci*, 2004. **25**(3): p. 152-7.
28. Gomez, G. and M.V. Sitkovsky, Differential requirement for A2a and A3 adenosine receptors for the protective effect of inosine in vivo. *Blood*, 2003. **102**(13): p. 4472-8.
29. Linden, J., Molecular approach to adenosine receptors: receptor-mediated mechanisms of tissue protection. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2001. **41**: p. 775-87.
30. Kong, T., et al., HIF-dependent induction of adenosine A2B receptor in hypoxia. *Faseb J*, 2006. **20**(13): p. 2242-50.
31. Fredholm, B.B., et al., International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev*, 2001. **53**(4): p. 527-52.
32. Rasmussen, S.G., et al., Crystal structure of the human beta2 adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature*, 2007. **450**(7168): p. 383-7.
33. Beukers, M.W., I. Meurs, and A.P. Ijzerman, Structure-affinity relationships of adenosine A(2B) receptor ligands. *Med Res Rev*, 2006. **26**(5): p. 667-98.
34. Baraldi, P.G., et al., A(3) adenosine receptor ligands: history and perspectives. *Med Res Rev*, 2000. **20**(2): p. 103-28.
35. van Calker, D., M. Muller, and B. Hamprecht, Adenosine regulates via two different types of receptors, the accumulation of cyclic AMP in cultured brain cells. *J Neurochem*, 1979. **33**(5): p. 999-1005.
36. Tawfik, H.E., et al., Role of A1 adenosine receptors in regulation of vascular tone. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005. **288**(3): p. H1411-6.
37. Kull, B., P. Svenningsson, and B.B. Fredholm, Adenosine A(2A) receptors are colocalized with and activate g(olf) in rat striatum. *Mol Pharmacol*, 2000. **58**(4): p. 771-7.
38. Peakman, M.C. and S.J. Hill, Adenosine A2B-receptor-mediated cyclic AMP accumulation in primary rat astrocytes. *Br J Pharmacol*, 1994. **111**(1): p. 191-8.
39. Donoso, M.V., et al., A2B adenosine receptor mediates human chorionic vasoconstriction and signals through arachidonic acid cascade. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005. **288**(5): p. H2439-49.

40. Cheng, K.T., et al., *CNGA2 channels mediate adenosine-induced Ca²⁺ influx in vascular endothelial cells*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008. **28**(5): p. 913-8.
41. Jacobson, K.A. and Z.G. Gao, *Adenosine receptors as therapeutic targets*. *Nat Rev Drug Discov*, 2006. **5**(3): p. 247-64.
42. Olah, M.E. and G.L. Stiles, *The role of receptor structure in determining adenosine receptor activity*. *Pharmacol Ther*, 2000. **85**(2): p. 55-75.
43. Hoehn, K., C.G. Craig, and T.D. White, *A comparison of N-methyl-D-aspartate-evoked release of adenosine and [3H]norepinephrine from rat cortical slices*. *J Pharmacol Exp Ther*, 1990. **255**(1): p. 174-81.
44. Childs, E., et al., *Association between ADORA2A and DRD2 Polymorphisms and Caffeine-Induced Anxiety*. *Neuropsychopharmacology*, 2008.
45. Ferre, S., et al., *Adenosine receptor heteromers and their integrative role in striatal function*. *ScientificWorldJournal*, 2007. **7**: p. 74-85.
46. Ferre, S., et al., *Adenosine A1-A2A receptor heteromers: new targets for caffeine in the brain*. *Front Biosci*, 2008. **13**: p. 2391-9.
47. Rudolphi, K.A., et al., *Adenosine and brain ischemia*. *Cerebrovasc Brain Metab Rev*, 1992. **4**(4): p. 346-69.
48. Latini, S., et al., *Extracellular adenosine concentrations during in vitro ischaemia in rat hippocampal slices*. *Br J Pharmacol*, 1999. **127**(3): p. 729-39.
49. Cohen, M.V. and J.M. Downey, *Adenosine: trigger and mediator of cardioprotection*. *Basic Res Cardiol*, 2007.
50. Schlotzer-Schrehardt, U., et al., *Selective upregulation of the A3 adenosine receptor in eyes with pseudoexfoliation syndrome and glaucoma*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2005. **46**(6): p. 2023-34.
51. Arend, L.J., et al., *Elevation of intrarenal adenosine by maleic acid decreases GFR and renin release*. *Kidney Int*, 1986. **30**(5): p. 656-61.
52. Arend, L.J., C.I. Thompson, and W.S. Spielman, *Dipyridamole decreases glomerular filtration in the sodium-depleted dog. Evidence for mediation by intrarenal adenosine*. *Circ Res*, 1985. **56**(2): p. 242-51.
53. Arend, L.J., et al., *Adenosine-induced decrease in renin release: dissociation from hemodynamic effects*. *Am J Physiol*, 1984. **247**(3 Pt 2): p. F447-52.
54. Franco, M., P.D. Bell, and L.G. Navar, *Effect of adenosine A1 analogue on tubuloglomerular feedback mechanism*. *Am J Physiol*, 1989. **257**(2 Pt 2): p. F231-6.
55. Kawabata, M., T. Ogawa, and T. Takabatake, *Control of rat glomerular microcirculation by juxtaglomerular adenosine A1 receptors*. *Kidney Int Suppl*, 1998. **67**: p. S228-30.
56. Cai, H., et al., *Effect of KW-3902, a novel adenosine A1 receptor antagonist, on sodium-dependent phosphate and glucose transport by the rat renal proximal tubular cell*. *Life Sci*, 1994. **55**(10): p. 839-45.
57. Burnatowska-Hledin, M.A. and W.S. Spielman, *Effects of adenosine on cAMP production and cytosolic Ca²⁺ in cultured rabbit medullary thick limb cells*. *Am J Physiol*, 1991. **260**(1 Pt 1): p. C143-50.
58. Hoenderop, J.G., et al., *Adenosine-stimulated Ca²⁺ reabsorption is mediated by apical A1 receptors in rabbit cortical collecting system*. *Am J Physiol*, 1998. **274**(4 Pt 2): p. F736-43.
59. Lee, H.T. and C.W. Emala, *Protective effects of renal ischemic preconditioning and adenosine pretreatment: role of A(1) and A(3) receptors*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2000. **278**(3): p. F380-7.

60. Okusa, M.D., et al., Selective A2A adenosine receptor activation reduces ischemia-reperfusion injury in rat kidney. *Am J Physiol*, 1999. **277**(3 Pt 2): p. F404-12.
61. Crosson, C.E. and M. Petrovich, Contributions of adenosine receptor activation to the ocular actions of epinephrine. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1999. **40**(9): p. 2054-61.
62. Gourine, A.V., et al., Adenosine release in nucleus tractus solitarii does not appear to mediate hypoxia-induced respiratory depression in rats. *J Physiol*, 2002. **544**(Pt 1): p. 161-70.
63. Shen, H., et al., Inosine reduces ischemic brain injury in rats. *Stroke*, 2005. **36**(3): p. 654-9.
64. Zur Nedden, S., B. Tomaselli, and G. Baier-Bitterlich, HIF-1 alpha is an essential effector for purine nucleoside-mediated neuroprotection against hypoxia in PC12 cells and primary cerebellar granule neurons. *J Neurochem*, 2008.
65. Cook, D.J., I. Kulbatski, and C.H. Tator, Inosine reverses the inhibitory effects of the L-type Ca²⁺ channel antagonist, DM-BODIPY-dihydropyridine, on neuritogenesis in an in vitro rat superior cervical ganglia axotomy model. *Neurosci Lett*, 2004. **358**(2): p. 75-8.
66. Tomaselli, B., et al., Purine nucleoside-mediated protection of chemical hypoxia-induced neuronal injuries involves p42/44 MAPK activation. *Neurochem Int*, 2005. **46**(7): p. 513-21.
67. Goldenberg, I., et al., Adenosine protects against angiotensin II-induced apoptosis in rat cardiocyte cultures. *Mol Cell Biochem*, 2003. **252**(1-2): p. 133-9.
68. Liao, Y., et al., Activation of adenosine A1 receptor attenuates cardiac hypertrophy and prevents heart failure in murine left ventricular pressure-overload model. *Circ Res*, 2003. **93**(8): p. 759-66.
69. Jones, C.E., et al., Positive inotropic response to inosine in the in situ canine heart. *Am J Physiol*, 1977. **233**(4): p. H438-43.
70. Tilley, S.L. and R.C. Boucher, A1 antagonism in asthma: better than coffee? *J Clin Invest*, 2005. **115**(1): p. 13-6.
71. Dhalla, A.K., et al., Antilipolytic activity of a novel partial A1 adenosine receptor agonist devoid of cardiovascular effects: comparison with nicotinic acid. *J Pharmacol Exp Ther*, 2007. **321**(1): p. 327-33.
72. Bhat, S.G., Z. Nie, and V. Ramkumar, Cisplatin up-regulates adenosine A(1) receptors in rat testes. *Eur J Pharmacol*, 1999. **382**(1): p. 35-43.
73. Gelain, D.P., et al., Extracellular inosine is modulated by H₂O₂ and protects sertoli cells against lipoperoxidation and cellular injury. *Free Radic Res*, 2004. **38**(1): p. 37-47.
74. Ramkumar, V., D.M. Hallam, and Z. Nie, Adenosine, oxidative stress and cytoprotection. *Jpn J Pharmacol*, 2001. **86**(3): p. 265-74.
75. Darlington, D.N. and D.S. Gann, Inosine infusion prevents mortality in endotoxic shock. *J Trauma*, 2005. **59**(6): p. 1432-5; discussion 1435.
76. Darlington, D.N. and D.S. Gann, Purine nucleosides stimulate Na/K ATPase, and prolong survival in hemorrhagic shock. *J Trauma*, 2005. **58**(5): p. 1055-60.
77. Bottini, N., et al., Type 2 diabetes and the genetics of signal transduction: a study of interaction between adenosine deaminase and acid phosphatase locus 1 polymorphisms. *Metabolism*, 2004. **53**(8): p. 995-1001.
78. Capito, K. and C.J. Hedekov, Inosine-stimulated insulin release and metabolism of inosine in isolated mouse pancreatic islets. *Biochem J*, 1976. **158**(2): p. 335-40.
79. Guinzberg, R., et al., Effect of adenosine and inosine on ureagenesis in hepatocytes. *Biochem J*, 1987. **245**(2): p. 371-4.

80. Guinzberg, R., et al., In rat hepatocytes, different adenosine receptor subtypes use different secondary messengers to increase the rate of ureagenesis. *Life Sci*, 2006. **79**(4): p. 382-90.
81. 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.
82. Harada, H., et al., 2-Alkynyl-8-aryl-9-methyladenines as novel adenosine receptor antagonists: their synthesis and structure-activity relationships toward hepatic glucose production induced via agonism of the A(2B) receptor. *J Med Chem*, 2001. **44**(2): p. 170-9.
83. Yasuda, N., et al., Functional characterization of the adenosine receptor contributing to glycogenolysis and gluconeogenesis in rat hepatocytes. *Eur J Pharmacol*, 2003. **459**(2-3): p. 159-66.
84. Corssmit, E.P., et al., Pentoxifylline inhibits basal glucose production in humans. *J Appl Physiol*, 1994. **77**(6): p. 2767-72.
85. Anaya-Prado, R., et al., Ischemia/reperfusion injury. *J Surg Res*, 2002. **105**(2): p. 248-58.
86. Kumar, V., et al., *Robbins and Cotran pathologic basis of disease*. 7th ed. 2005, Philadelphia: Elsevier/Saunders. xv, 1525 p.
87. Hou, S.T. and J.P. MacManus, Molecular mechanisms of cerebral ischemia-induced neuronal death. *Int Rev Cytol*, 2002. **221**: p. 93-148.
88. Sheridan, A.M. and J.V. Bonventre, Cell biology and molecular mechanisms of injury in ischemic acute renal failure. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2000. **9**(4): p. 427-34.
89. Riedemann, N.C. and P.A. Ward, Complement in ischemia reperfusion injury. *Am J Pathol*, 2003. **162**(2): p. 363-7.
90. Zhao, Z.Q. and J. Vinten-Johansen, Postconditioning: reduction of reperfusion-induced injury. *Cardiovasc Res*, 2006. **70**(2): p. 200-11.
91. Hausenloy, D.J. and D.M. Yellon, New directions for protecting the heart against ischaemia-reperfusion injury: targeting the Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK)-pathway. *Cardiovasc Res*, 2004. **61**(3): p. 448-60.
92. Gross, G.J. and J.A. Auchampach, Reperfusion injury: does it exist? *J Mol Cell Cardiol*, 2007. **42**(1): p. 12-8.
93. Olafsson, B., et al., Reduction of reperfusion injury in the canine preparation by intracoronary adenosine: importance of the endothelium and the no-reflow phenomenon. *Circulation*, 1987. **76**(5): p. 1135-45.
94. Schlack, W., et al., Adenosine A2-receptor activation at reperfusion reduces infarct size and improves myocardial wall function in dog heart. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1993. **22**(1): p. 89-96.
95. Ge, Z.D., et al., Cl-IB-MECA [2-chloro-N6-(3-iodobenzyl)adenosine-5'-N-methylcarboxamide] reduces ischemia/reperfusion injury in mice by activating the A3 adenosine receptor. *J Pharmacol Exp Ther*, 2006. **319**(3): p. 1200-10.
96. Peart, J.N., E.R. Gross, and G.J. Gross, Opioid-induced preconditioning: recent advances and future perspectives. *Vascul Pharmacol*, 2005. **42**(5-6): p. 211-8.
97. Thorell, A., et al., Intensive insulin treatment in critically ill trauma patients normalizes glucose by reducing endogenous glucose production. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004. **89**(11): p. 5382-6.
98. Strommer, L., et al., Skeletal muscle insulin resistance after trauma: insulin signaling and glucose transport. *Am J Physiol*, 1998. **275**(2 Pt 1): p. E351-8.
99. Childs, C., et al., Glucose metabolism in children during the first day after burn injury. *Arch Emerg Med*, 1990. **7**(3): p. 135-47.

100. Langouche, L., et al., *Effect of intensive insulin therapy on insulin sensitivity in the critically ill. J Clin Endocrinol Metab*, 2007. **92**(10): p. 3890-7.
101. Kohl, B.A. and C.S. Deutschman, *The inflammatory response to surgery and trauma. Curr Opin Crit Care*, 2006. **12**(4): p. 325-32.
102. Ling, P.R., R.J. Smith, and B.R. Bistrian, *Acute effects of hyperglycemia and hyperinsulinemia on hepatic oxidative stress and the systemic inflammatory response in rats. Crit Care Med*, 2007. **35**(2): p. 555-60.
103. Stegenga, M.E., et al., *Hyperglycemia enhances coagulation and reduces neutrophil degranulation, whereas hyperinsulinemia inhibits fibrinolysis during human endotoxemia. Blood*, 2008.
104. Hansen, H.R., et al., *Hyperglycemia accelerates arterial thrombus formation and attenuates the antithrombotic response to endotoxin in mice. Blood Coagul Fibrinolysis*, 2007. **18**(7): p. 627-36.
105. Stevens, R.D., et al., *Neuromuscular dysfunction acquired in critical illness: a systematic review. Intensive Care Med*, 2007. **33**(11): p. 1876-91.
106. Miranda-Ruiz, R. and J.A. Castanon-Gonzalez, *[Hyperglycemia in critically ill patients: clinical implications for treatment]. Cir Cir*, 2004. **72**(6): p. 517-24.
107. Das, U.N., *Insulin in sepsis and septic shock. J Assoc Physicians India*, 2003. **51**: p. 695-700.
108. Hirose, R., et al., *Transient hyperglycemia affects the extent of ischemia-reperfusion-induced renal injury in rats. Anesthesiology*, 2008. **108**(3): p. 402-14.
109. Donnelly, M., et al., *Modulation of the glycemic response using insulin attenuates the pulmonary response in an animal trauma model. J Trauma*, 2007. **63**(2): p. 351-7.
110. Nagamizo, D., et al., *Tight glycemic control by insulin, started in the preischemic, but not postischemic, period, protects against ischemic spinal cord injury in rabbits. Anesth Analg*, 2007. **105**(5): p. 1397-403, table of contents.
111. Frayn, K.N., et al., *The relationship of plasma catecholamines to acute metabolic and hormonal responses to injury in man. Circ Shock*, 1985. **16**(3): p. 229-40.
112. Heath, D.F., *Glucose, insulin and other plasma metabolites shortly after injury. J Accid Emerg Med*, 1994. **11**(2): p. 67-77.
113. Oswald, G.A., et al., *Determinants and importance of stress hyperglycaemia in non-diabetic patients with myocardial infarction. Br Med J (Clin Res Ed)*, 1986. **293**(6552): p. 917-22.
114. Sedowofia, K., et al., *The systemic stress response to thermal injury in children. Clin Endocrinol (Oxf)*, 1998. **49**(3): p. 335-41.
115. Strommer, L., et al., *Effect of carbohydrate feeding on insulin action in skeletal muscle after surgical trauma in the rat. Nutrition*, 2001. **17**(4): p. 332-6.
116. Thorell, A., et al., *Insulin resistance after abdominal surgery. Br J Surg*, 1994. **81**(1): p. 59-63.
117. van Kooten, F., et al., *Hyperglycemia in the acute phase of stroke is not caused by stress. Stroke*, 1993. **24**(8): p. 1129-32.
118. White, R.H., et al., *Hormonal and metabolic responses to glucose infusion in sepsis studied by the hyperglycemic glucose clamp technique. JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 1987. **11**(4): p. 345-53.
119. Ljungqvist, O., et al., *Glucose infusion instead of preoperative fasting reduces postoperative insulin resistance. J Am Coll Surg*, 1994. **178**(4): p. 329-36.

120. Rand, J.S., et al., Acute stress hyperglycemia in cats is associated with struggling and increased concentrations of lactate and norepinephrine. *J Vet Intern Med*, 2002. **16**(2): p. 123-32.
121. Tominaga, S., et al., Adenosine release during early and sustained exercise of canine skeletal muscle. *Am J Physiol*, 1980. **238**(2): p. H156-63.
122. Sharma, R.J., A.R. Fernando, and J.R. Griffiths, Inosine metabolism in the rat. *Biochem J*, 1982. **208**(3): p. 839-44.
123. Franco, M., et al., Adenosine regulates renal nitric oxide production in hypothyroid rats. *J Am Soc Nephrol*, 1999. **10**(8): p. 1681-8.
124. Dornand, J., J.C. Bonnafeous, and J.C. Mani, Purification and properties of 5'-nucleotidase from lymphocyte plasma membranes. *Eur J Biochem*, 1978. **87**(3): p. 459-65.
125. Muraoka, T., et al., Automated enzymatic measurement of adenosine deaminase isoenzyme activities in serum. *Anal Biochem*, 1990. **187**(2): p. 268-72.
126. Thorn, J.A. and S.M. Jarvis, Adenosine transporters. *Gen Pharmacol*, 1996. **27**(4): p. 613-20.
127. FW, F., Glucose (enzymatic). *Stand Methods Clin Chem*, 1963. **4**: p. 101-112.
128. Olsson, R.A., Changes in content of purine nucleoside in canine myocardium during coronary occlusion. *Circ Res*, 1970. **26**(3): p. 301-6.
129. Takanashi, M., I. Norota, and M. Endoh, Potent inhibitory action of chlorethylclonidine on the positive inotropic effect and phosphoinositide hydrolysis mediated via myocardial alpha 1-adrenoceptors in the rabbit ventricular myocardium. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 1991. **343**(6): p. 669-73.
130. Kim, Y.C., X.D. Ji, and K.A. Jacobson, Derivatives of the triazoloquinazoline adenosine antagonist (CGS15943) are selective for the human A3 receptor subtype. *J Med Chem*, 1996. **39**(21): p. 4142-8.
131. Ongini, E., et al., Comparison of CGS 15943, ZM 241385 and SCH 58261 as antagonists at human adenosine receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 1999. **359**(1): p. 7-10.
132. Haleen, S.J., R.P. Steffen, and H.W. Hamilton, PD 116,948, a highly selective A1 adenosine receptor antagonist. *Life Sci*, 1987. **40**(6): p. 555-61.
133. Jacobson, K.A., et al., 8-(3-Chlorostyryl)caffeine (CSC) is a selective A2-adenosine antagonist in vitro and in vivo. *FEBS Lett*, 1993. **323**(1-2): p. 141-4.
134. Liang, B.T. and B. Haltiwanger, Adenosine A2a and A2b receptors in cultured fetal chick heart cells. High- and low-affinity coupling to stimulation of myocyte contractility and cAMP accumulation. *Circ Res*, 1995. **76**(2): p. 242-51.
135. Traut, T.W., Physiological concentrations of purines and pyrimidines. *Mol Cell Biochem*, 1994. **140**(1): p. 1-22.
136. Lehninger, A.L., D.L. Nelson, and M.M. Cox, *Lehninger principles of biochemistry*. 4th ed. 2005, New York: W.H. Freeman. 1 v. (various pagings).
137. White, A., *Principles of biochemistry*. 3d ed. 1964, New York: Blakiston Division, McGraw-Hill. xiv, 1106 p.
138. Torres-Marquez, M.E., R. Villalobos-Molina, and J.A. Garcia-Sainz, Alpha 1-adrenoceptor subtypes in aorta (alpha 1A) and liver (alpha 1B). *Eur J Pharmacol*, 1991. **206**(3): p. 199-202.
139. Cohen, M.V. and J.M. Downey, Adenosine: trigger and mediator of cardioprotection. *Basic Res Cardiol*, 2008. **103**(3): p. 203-15.

140. Jabs, C.M., et al., Adenosine, inosine, and hypoxanthine/xanthine measured in tissue and plasma by a luminescence method. *Clin Chem*, 1990. **36**(1): p. 81-7.
141. Uematsu, T., et al., Pharmacokinetics and tolerability of intravenous infusion of adenosine (SUNY4001) in healthy volunteers. *Br J Clin Pharmacol*, 2000. **50**(2): p. 177-81.
142. Giannattasio, S., et al., Simultaneous determination of purine nucleotides, their metabolites and beta-nicotinamide adenine dinucleotide in cerebellar granule cells by ion-pair high performance liquid chromatography. *Brain Res Brain Res Protoc*, 2003. **10**(3): p. 168-74.
143. Bantia, S., et al., In vivo and in vitro pharmacologic activity of the purine nucleoside phosphorylase inhibitor BCX-34: the role of GTP and dGTP. *Immunopharmacology*, 1996. **35**(1): p. 53-63.
144. Kasper, D.L. and T.R. Harrison, *Harrison's principles of internal medicine*. 16th ed. 2005, New York: McGraw-Hill, Medical Pub. Division. xxvii, [2750] p.
145. Shaw, J.H. and R.R. Wolfe, An integrated analysis of glucose, fat, and protein metabolism in severely traumatized patients. *Studies in the basal state and the response to total parenteral nutrition*. *Ann Surg*, 1989. **209**(1): p. 63-72.
146. Farahbakhsh, N.A. and M.C. Cilluffo, Synergistic increase in Ca²⁺ produced by A1 adenosine and muscarinic receptor activation via a pertussis-toxin-sensitive pathway in epithelial cells of the rabbit ciliary body. *Exp Eye Res*, 1997. **64**(2): p. 173-9.