

5
2ej 11261
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO



FACULTAD DE MEDICINA

"EL PAPEL DE LA ADENOSINA EN LA REGULACION
DEL METABOLISMO ENERGETICO CELULAR"

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRIA EN CIENCIAS BIOMEDICAS
(BIOQUIMICA)

QUE PRESENTA EL
MEDICO CIRUJANO
ROGER GUTIERREZ JUAREZ

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

1. INTRODUCCION

1.1. LA ADENOSINA

Existe información abundante acerca del papel que desempeña el nucleósido adenosina en la regulación de diversos procesos celulares en los mamíferos. Muchos de esos efectos dependen de la interacción de la adenosina con receptores membranales, en tanto que para otros casos, no se ha demostrado en forma consistente un mecanismo de esa naturaleza; se trataría más bien de efectos intracelulares del nucleósido. Hasta el momento se ha descrito la caracterización de dos tipos de receptores para la adenosina, acoplados a la adenilato ciclasa, denominados A₁ y A₂, que son inhibitorio y activador, respectivamente [1-5]. En la mayoría de las células en las que se encuentran éstos, los receptores, se hallan asociados al sistema de la adenilato ciclasa por medio de la proteína G: (G inhibitoria) o de la G_s (G estimuladora) según que el receptor sea inhibitorio o activador. Sin embargo, hay datos que hacen suponer que en algunos tejidos los receptores para la adenosina se encuentran acoplados con sistemas de transducción diferentes a la adenilato ciclasa [6]. Por ejemplo, se han descrito para la adenosina: a) efectos sobre canales iónicos de la membrana plasmática (canales para K⁺ y para Ca²⁺ en miocardio); b) efectos sobre el metabolismo del fosfatidilinositol (sistema nervioso); c) efectos independientes

del AMPc sobre el metabolismo de los adipocitos; d) efectos independientes del AMPc sobre la liberación de neurotransmisores; y e) otros efectos aparentemente independientes del AMPc, como la liberación de mediadores de las células cebadas de la rata [6].

Los receptores para la adenosina se encuentran ampliamente distribuidos en los diferentes tejidos en los que son responsables de diversos efectos metabólicos y, generalmente, no se da el caso de que en un mismo tejido o línea celular se encuentren los dos tipos de receptores (A₁ y A₂) [3-4]. No obstante, existe un informe sobre la presencia de ambos receptores en adipocitos de rata, que se evidencian mediante el uso de la toxina pertussis como instrumento de estudio [7]. La Tabla I muestra algunos ejemplos de los efectos del nucleósido mediados por receptores.

Además de esos dos receptores se ha descrito un tercer sitio con el que puede interaccionar la adenosina y que se localiza aparentemente en la subunidad catalítica de la adenilato ciclasa. Al unirse a este sitio, denominado sitio P (porque requiere que esté intacta la fracción purina del nucleósido) la adenosina inhibe la producción de AMPc [1]. No obstante, algunos autores han sugerido como agonista natural de este sitio al 2'-desoxiadenosina-3'-monofosfato (dAMP) más bien que la adenosina [8].

TABLA I. DISTRIBUCION DE LOS RECEPTORES PARA LA ADENOSINA*.

Receptores A ₁		Receptores A ₂	
Sitio	Efecto fisiologico	Sitio	Efecto fisiologico
Cerebro	Sedación, inhibición de la liberación de neurotransmisores	Cerebro	Modula la liberación de neurotransmisores
Adipocito	Inhíbe la lipólisis	Plaquetas	Inhíbe la agregación
Testículo	Se desconoce	Músculo liso	Relajación
Corazón	Suprime la contractilidad, inhibe la actividad de los nodos sinoatrial (SA) y atrioventricular (AV)	Riñón	Vasoconstricción? Antidiuresis?
		Hígado	Estimulación de la gluconeogénesis

*Modificada de Stiles, G. L. [3].

1.2. LA ADENOSINA Y LOS ERITROCITOS

Entre los efectos de la adenosina que no dependen de receptores se encuentra uno que no está suficientemente explicado y que consiste en el aumento en las concentraciones de nucleótidos de adenina en sangre de ratas después de la administración intraperitoneal del nucleósido [9]. En el estudio *in vivo* en el que se describió ese efecto sobresale el aumento en la concentración de ATP (29%), ADP (67%) y AMP (43%) junto con una disminución en la concentración de fosfato inorgánico del 22% (P_i). Por ser los nucleótidos metabolitos fundamentalmente

intracelulares se sugirió que el fenómeno representaba un efecto de la adenosina sobre los eritrocitos, que son las células más abundantes en la sangre; tal sugerencia pudo ser confirmada en el mismo estudio. En efecto, al repetir los experimentos, pero realizando ahora todas las determinaciones en extractos de eritrocitos aislados (no incubados) inmediatamente después de obtener la sangre, se observan cambios esencialmente idénticos a los encontrados en esta última; de acuerdo con los autores, la contribución de los leucocitos fue insignificante. Sin embargo, el trabajo no explica en forma completa a través de cuál(es) mecanismo(s) la adenosina produce el aumento en la poza de nucleótidos de adenina, particularmente en el caso del ATP.

Una primera explicación al aumento observado en la poza de nucleótidos consiste en que la adenosina ingresa a la célula y es sucesivamente fosforilada hasta el nivel trifosfato. Sin embargo, el aumento en el ATP como resultado exclusivamente de la fosforilación directa de la adenosina, por medio de la adenosina cinasa (AK) primero y de la adenilato cinasa (ATK) después, no parece ser el más factible, en virtud de que se trataría de un proceso energéticamente muy costoso, que favorecería un catabolismo acelerado de ATP y que requeriría de muy altas concentraciones de adenosina como precursor del nucleótido [10]. Así, en el trabajo citado [9] se encuentra que los nucleótidos que más se elevan son el AMP y el ADP. Una parte del ATP producido

puede provenir de fosforilación sucesiva del nucleósido, pero no puede descartarse una participación de la glucólisis como generador de ATP, pues los eritrocitos dependen energéticamente de esa vía. Es claro que una activación de la vía glucolítica no aumentaría la concentración total de nucleótidos, pero sí podría acelerar la fosforilación del ADP formado a partir del nucleósido exógeno. En apoyo de esta idea recuérdese que en el multicitado estudio se observa una disminución en la poza de fosfato inorgánico (Pi). En este contexto, son posibles por lo menos, dos explicaciones alternativas o una combinación de ellas: 1) la adenosina estimula la actividad glucolítica mediante su conversión a AMP; y/o 2) la estimulación de la glucólisis es llevada a cabo directamente por la adenosina.

Al respecto, se han publicado ya estudios en los que se demuestra la capacidad de la adenosina para estimular la glucólisis en los eritrocitos de bovino [11-12]. En esos trabajos se observa una estimulación máxima del 30% en la actividad glucolítica de eritrocitos aislados e incubados en presencia de concentraciones de adenosina del orden milimolar. Sin embargo, resulta bastante difícil tratar de asignarle un papel fisiológico a ese efecto pues la concentración de nucleósido utilizada es muy elevada. De acuerdo a diversos estudios [13-15], la concentración intersticial de adenosina va de 1 a 10 μM , y en la sangre de algunos lechos vasculares la concentración del nucleósido no llega

a 1 μM . Además, hay un estudio que indica que en la circulación general la concentración de adenosina varía durante el día en la rata y es más alta entre las 8 de la mañana y las 8 de la noche, cuando se aproxima a 1 μM ; este mismo patrón circádico también ocurre en el hígado [13]. Así, sólo en condiciones patológicas, se observan concentraciones más altas del nucleósido, como es el caso de la deficiencia hereditaria de la enzima adenosina desaminasa [16]. En alteraciones más comunes, como la hipoxia que se produce durante el infarto miocárdico, se ha observado que la concentración del nucleósido puede llegar a ser hasta de 100 μM y este nivel sólo se alcanza en el intersticio miocárdico pues la adenosina es rápidamente captada y metabolizada por el endotelio vascular local [17]. Permanece entonces abierta la pregunta de si la adenosina, a concentraciones fisiológicas, es capaz de modificar la actividad glucolítica en los eritrocitos.

La glucólisis es la vía metabólica más estudiada de cuantas se han descrito. Se conocen todas las reacciones que ocurren y cómo se regula el flujo metabólico a través de ella [18]. La actividad de esta vía es fundamental para la manutención energética de células sin mitocondrias y de células aeróbicas en condiciones de hipoxia o anoxia. En células con mitocondrias en condiciones de oxigenación adecuada, la glucólisis representa la etapa "preparativa" en la degradación de la glucosa para la extracción máxima de energía en el ciclo de Krebs y en la

fosforilación oxidativa. En los eritrocitos, la glucólisis tiene una desviación (ciclo de Rapaport y Luebering) en la cual se genera el 2,3-bisfosfoglicerato (2,3-BPG) que actúa como un efector alostérico de la hemoglobina, al disminuir su afinidad por el oxígeno. El 2,3-BPG alcanza una concentración inusualmente alta en esas células, alrededor de 2 mM. Por la acción de una fosfatasa, el 2,3-BPG se convierte en 3PG que continúa a través de la vía, pero al costo de un ATP que se ha dejado de producir. Las reacciones de la vía glucolítica en los eritrocitos se muestran en la Figura 1.

Todos los criterios clásicos y aún la moderna teoría de control metabólico [19] hacen recaer el peso de la regulación en las enzimas hexocinasa y fosfofructocinasa-1 (principalmente la segunda): ambas enzimas tienen el mayor coeficiente de control de flujo. El coeficiente de control de flujo indica la importancia que tiene una enzima o un grupo de enzimas en el control del flujo metabólico a través de una vía. Todas las enzimas contribuyen al control de la vía y la suma de sus coeficientes de control de flujo debe dar un valor de 1. Entre más cercano a uno es el coeficiente de una enzima, más determinante es ésta del flujo a través de la vía.

La fosfofructocinasa-1 (PFK-1) es la enzima que cataliza la fosforilación de la fructosa 6-fosfato para formar la fructosa 1,6-bisfosfato, a diferencia de la fosfofructocinasa-2 (PFK-2) que

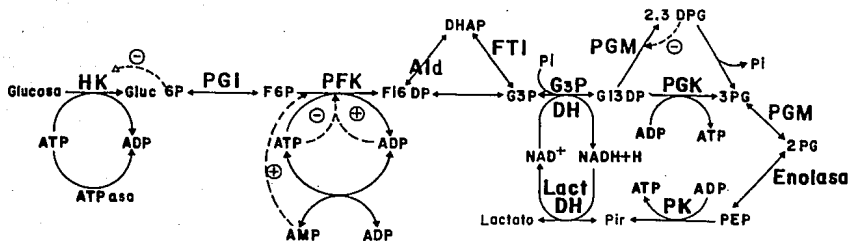


Figura 1. LA GLUCOLISIS EN EL ERITROCITO. Abreviaturas: HK = Hexocinasa, PGI = Fosfoglucoisa isomerasa, PFK = Fosfofructocinasa-1, Ald = Aldolasa, FTI = Fosfotriososa isomerasa, G3PDH = Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa, BPGM = Bisfosfoglicerato mutasa, PGK = Fosfoglicerato cinasa, PGP = Fosfoglicerato fosfatasa, PGM = Fosfoglicerato mutasa, PK = Piruvato cinasa, LactDH = Lactato deshidrogenasa.

es la responsable de la formación de la fructosa 2,6-bisfosfato, a partir del mismo precursor monofosfatado. La PFK-1 ha sido también, como la glucólisis, ampliamente estudiada [20-23]. Se trata de una enzima alostérica del tipo K que tiene características físico-químicas similares en la mayoría de las células de los mamíferos [20]. La PFK-1 de eritrocitos humanos está compuesta por dos subunidades no idénticas de peso molecular 80 000 y 85 000 (subunidades E y M, respectivamente) y tiende a formar conglomerados que resultan de la unión de varios dímeros de subunidades M alrededor de un núcleo compuesto de subunidades tipo E [20]. Los eritrocitos de rata contienen dímeros formados por dos isoenzimas denominadas B₁ y AB₁ [20]. Los moduladores que se ha sugerido que tienen un papel importante *in vivo* son los siguientes: 1. Activadores: fructosa 2,6-bisfosfato, Mg²⁺, K⁺, NH₄⁺, P_i (fosfato inorgánico), glucosa 1,6-bisfosfato, AMP, SO₄²⁻ y el aumento de la temperatura; 2. Inhibidores: ATP, 2,3-bisfosfoglicerato, fosfoenolpiruvato, citrato y el aumento en la concentración de H⁺ (Fig. 2) [21-23].

Las características generales de la regulación de la PFK-1 son las siguientes [20-24]:

1. Inhibición por una concentración alta de ATP.
2. Inhibición por citrato a una concentración alta de ATP (sin importancia en el caso de los eritrocitos).
3. Inhibición por ATP contrarrestada por P_i, AMP,

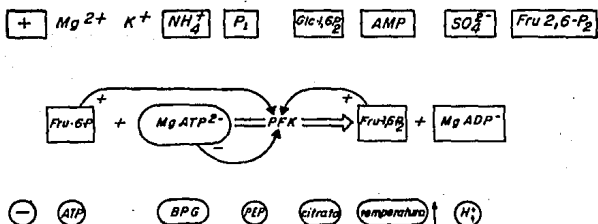


Figura 2. RESUMEN ESQUEMATICO DE LOS EFECTORES DE LA FOSFOFRUCTOCINASA-1 (PFK-1). + = efectores positivos; - = efectores negativos. PFK = PFK-1.

fructosa 6-P, fructosa-1,6-bis-P y fructosa-2,6-bis-P.

4. Cooperatividad en la unión de fructosa 6-P. Los efectores negativos disminuyen la afinidad por la fructosa 6-P y los efectores positivos la aumentan.

Aparentemente, bajo condiciones fisiológicas en los hepatocitos, la actividad de la PFK-1 es mínima y sólo se mantiene gracias a la presencia de la fructosa 2,6-bisfosfato (el más potente activador) y del AMP [24]. La concentración de fructosa 2,6-bisfosfato, a su vez, depende de la actividad de las enzimas fosfofructocinasa-2 y fructosa 2,6-bisfosfatasa, cuyas actividades residen en una sola proteína. Las enzimas mencionadas se encuentran finalmente sometidas a regulación por modificación covalente (fosforilación y desfosforilación) dependiente de hormonas [20,25]. Este último mecanismo no parece ser importante en el caso de los eritrocitos y, en consecuencia, la participación de la fructosa 2,6-bisfosfato en estas células es, en consecuencia, aparentemente insignificante como se discutirá después [26].

Así pues, queda por explorar la posibilidad de que la adenosina estimule a la glucólisis mediante un mecanismo intracelular, posiblemente a través de su interacción directa con la PFK-1, sin que ocurran cambios en la concentración de fructosa 2,6-bisfosfato o AMP. La factibilidad de este mecanismo está apoyada por el hecho de que la interacción no covalente más

conocida de la adenosina es justamente su unión con proteínas: los receptores de membrana para la adenosina.

En función de esta hipótesis de trabajo, los presentes experimentos se diseñaron para: 1) definir a través de cuál (es) mecanismo (s) la adenosina exógena, a concentraciones en el intervalo micromolar, produce una estimulación de la glucólisis en los eritrocitos de rata; y 2) definir si la adenosina, a concentraciones fisiológicas modifica la actividad de la glucólisis.

1.3. LA ADENOSINA Y EL CORAZON

Entre los efectos más interesantes de la adenosina están los que produce en la fisiología cardiovascular (Fig. 3). Es significativo el hecho de que fueron cardiovasculares los efectos de la adenosina descritos por Drury y Szent-Gyorgy, quienes estudiaron por primera vez los efectos del nucleósido sobre tejidos de mamíferos [27]. En la actualidad está bien documentada la capacidad de la adenosina endógena y exógena para producir vasodilatación coronaria y disminución en la velocidad de conducción de impulsos eléctricos (efecto dromotrópico negativo), en la frecuencia de contracción (efecto cronotrópico negativo) y en la fuerza de contracción (efecto inotrópico negativo) en preparaciones de corazón aislado perfundido de rata y de cobayo [17, 27-28]. En esas mismas preparaciones se demostró que la

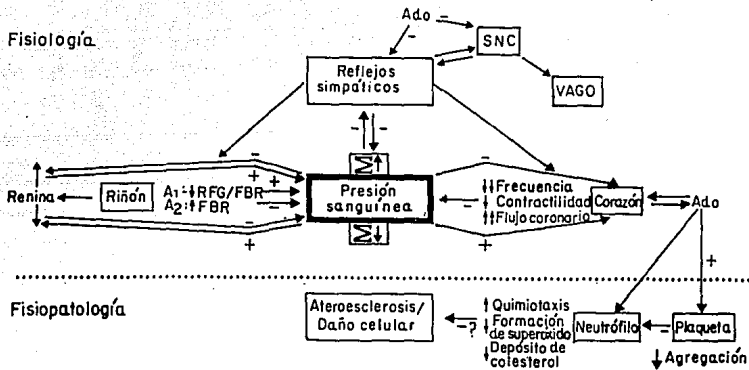


Figura 3. DIAGRAMA DE LOS EFECTOS HEMODINAMICOS DE LA ADENOSINA. Ado = Adenosina. las flechas verticales indican aumentos o disminuciones en los parámetros señalados.

hipoxia y la isquemia estimulan la liberación de adenosina hacia la circulación coronaria por parte del miocardio con el consiguiente efecto vasodilatador local [28-29] que podría ser un mecanismo protector durante la isquemia. Antes de revisar el posible efecto benéfico de la adenosina sobre el miocardio isquémico es necesario tener una idea del metabolismo energético del corazón bajo condiciones normales y durante la hipoxia y la isquemia.

En el corazón normal la demanda energética está determinada por la actividad mecánica que, a su vez, determina la actividad respiratoria mitocondrial; esto es, el consumo de oxígeno y de sustratos oxidables. Además, la concentración plasmática de ciertas hormonas (epinefrina, insulina, tiroxina) modifica la actividad metabólica del miocardio. El músculo cardíaco normal obtiene energía a partir de la oxidación mitocondrial de diversos sustratos; sin embargo, utiliza primordialmente ácidos grasos libres (AGL) aunque también puede utilizar cantidades importantes de glucosa y lactato y, en menor proporción, piruvato y cuerpos cetónicos (acetoacetato y β -hidroxibutirato) y pequeñas cantidades de aminoácidos. La oxidación completa de esas moléculas rinde energía en la forma de ATP, el cual es utilizado principalmente para la contracción cardíaca y la manutención de los gradientes iónicos transmembranales. No se puede dejar de mencionar al fosfato de

creatina (CP) que funciona como un "reservorio" de fosfato de alta energía, de utilización inmediata, para periodos cortos de aumento en la demanda energética miocárdica. El CP puede donar su fosfato al ADP para formar ATP.

Todo lo anterior significa que el músculo cardiaco es estrictamente aeróbico y señala la importancia de la maquinaria metabólica mitocondrial para el adecuado funcionamiento del corazón. De hecho, las mitocondrias constituyen hasta el 35% del volumen del músculo cardiaco. Por esto, el tejido miocárdico es uno de los más grandes consumidores de oxígeno que se conocen, pues extrae entre el 65 y el 75% del oxígeno de la sangre arterial. En reposo, el corazón consume entre 7 y 10 ml de O₂ por 100 g de tejido por minuto. Este alto consumo de O₂ se explica por la intensa actividad metabólica y se ha propuesto que dicho consumo depende fundamentalmente de seis factores divididos en dos grupos, como sigue:

Determinantes principales

1. Tensión intramiocárdica o tensión de la pared (ca. presión x volumen).
2. Estado inotrópico (contractilidad).
3. Frecuencia cardíaca.

Determinantes secundarios.

4. Trabajo externo (carga x acortamiento).
5. Requerimientos basales de oxígeno.

6. Energía de activación eléctrica.

Diversos estudios han demostrado la liberación de adenosina a consecuencia de la isquemia [28-29]. La salida de adenosina del miocardio isquémico hacia la circulación coronaria tendría entonces efectos benéficos sobre las células cardiacas al mejorar el riego sanguíneo y consecuentemente la oxigenación, que estarían comprometidos por la isquemia. Además, los efectos dromotrópico, cronotrópico e inotrópico negativos contribuirían a disminuir la demanda de oxígeno local, pues se sabe que al disminuir el trabajo mecánico y eléctrico del miocardio, disminuye también su requerimiento energético [30]. Todos estos factores tenderían a hacer menos sensible al miocardio al daño inducido por la isquemia. En resumen, la adenosina contribuiría de manera importante a producir las adaptaciones fisiológicas y metabólicas en el miocardio que lo capacitarían para tolerar mejor la isquemia y limitar así el daño celular.

Desde el punto de vista metabólico, sería importante definir los cambios que se esperaría que ocurrieran como consecuencia de la isquemia y cómo tendría que modificarse el metabolismo bajo la influencia de la adenosina para lograr las condiciones energéticas menos desfavorables y limitar el daño celular. La disminución del riego sanguíneo (isquemia) trae como principales consecuencias: 1) la disminución en la oferta de nutrimentos (oxígeno, ácidos grasos libres, glucosa, aminoácidos),

y 2) la acumulación de diversos productos del metabolismo.

La limitación en la oferta de oxígeno produce una disminución en la producción de ATP ya que, del total de ATP que se produce en el miocardio, el 90% proviene de la fosforilación oxidativa mitocondrial, y el 10% restante es aportado por la fosforilación a nivel del sustrato que ocurre en la glucólisis y el ciclo de Krebs, y mediante la transferencia del fosfato del CP al ADP por la creatina fosfocinasa (CPK) [31]. La mayor parte de los estudios de hipoxia e isquemia miocárdica indican que la caída del nivel de CP correlaciona mejor que el nivel de ATP con el deterioro del estado funcional del corazón en etapas tempranas de isquemia [30-34], por lo que el nivel de ATP es un indicador tardío del daño miocárdico [31, 35]. El bloqueo de la actividad oxidativa mitocondrial por la deficiencia de oxígeno produce, inicialmente, una importante activación de la glucólisis, la cual constituye, en estas condiciones, la única posibilidad para la obtención de ATP aunque con un rendimiento muy bajo (2 moles de ATP por mol de glucosa en comparación con 38 moles de ATP por mol de glucosa en condiciones normales de oxigenación) [30-34]. La activación de la glucólisis se manifiesta como un aumento en la producción de lactato. Como consecuencia de la activación de la glucólisis, en presencia de un flujo miocárdico bajo y limitación de oxígeno, comienza a aumentar la relación $NADH/NAD^+$ lo que, más tarde, puede inhibir la actividad glucolítica [31]. Como se sabe,

la conversión de piruvato en lactato evita que ocurra dicha inhibición.

Otros dos fenómenos que están relacionados con el daño celular isquémico miocárdico son el aumento del Ca^{2+} intracelular [30, 34] y la acumulación de diversos productos del metabolismo, entre los cuales se ha sugerido como importantes al lactato [34] y a los ácidos grasos como el oléico y sus ésteres de coenzima A y carnitina [31, 33].

Vary y cols. [31] han sugerido que el daño isquémico se produce por una cascada de sucesos que comenzaría con la acumulación de productos metabólicos consecuencia de la disminución del metabolismo oxidativo y del flujo sanguíneo coronario. De los diversos productos que se acumulan los más notables son: Pi, ADP, AMP, y los productos de degradación de los nucleótidos de adenina (adenosina, inosina, hipoxantina). El aumento del NADH mitocondrial, inhibe la β -oxidación de los ácidos grasos lo que produce un aumento en el nivel de acil CoA y de acil carnitina. La magnitud de este aumento es proporcional a la concentración exógena de ácidos grasos. Esos ésteres (acil CoA y acil carnitina) actúan como detergentes que dañan la membrana plasmática. La oxidación de piruvato a acetil CoA y la oxidación mitocondrial de NADH se bloquean por la falta de oxígeno. En consecuencia, el NADH citosólico aumenta y el piruvato producido en la glucólisis se convierte en lactato, que se acumula al no

poder abandonar el tejido. El H^+ (derivado del lactato) que normalmente sería neutralizado a H_2O por el metabolismo oxidativo también se acumula produciendo acidosis local. En etapas avanzadas del suceso isquémico, estos cambios en el metabolismo de los carbohidratos conducen a un bloqueo en la generación de ATP en la glucólisis. El aumento del AMP citosólico derivado del ATP acelera su posterior degradación a adenosina, la cual escapa de la célula y probablemente es responsable de la pérdida neta de nucleótidos de adenina y la incapacidad para restablecer el nivel de ATP con la reoxigenación en la hipoxia cardiaca experimental. La disminución del ATP se asocia a, y puede ser responsable de, la pérdida irreversible de otras funciones celulares como la contractilidad, el control del volumen celular, las bombas iónicas, y las reacciones de síntesis.

Finalmente, es importante mencionar que se ha involucrado a los radicales libres derivados del oxígeno (RLO) en la producción del daño celular que ocurre durante la etapa en la que se restablece el flujo sanguíneo al tejido [36]. La participación de los RLO en el daño tisular postisquémico pudo confirmarse mediante estudios en los que se probó el efecto de fármacos antioxidantes sobre el daño miocárdico postisquémico [37-38].

Se ha propuesto que el daño por RLO resulta de la activación de una proteasa por el aumento del calcio la cual, por

proteólisis limitada de la enzima xantina oxidasa, genera una enzima oxidasa que, a su vez, produce RLO al actuar sobre la hipoxantina producida por la degradación del ATP que ocurre durante la hipoxia (Fig. 4) [36, 39].

Ya que las células miocárdicas de los mamíferos dependen energéticamente de la oxidación aeróbica de los combustibles celulares (carbohidratos, ácidos grasos, aminoácidos), en condiciones de hipoxia o de anoxia, la única vía metabólica capaz de producir energía es la glucólisis (Fig. 1). En estas condiciones existe una desventaja desde el punto de vista energético: se produce 18 veces menos ATP por mol de glucosa que en condiciones de adecuada oxigenación. La consecuencia directa sería un compromiso importante de la oferta de energía, más por la falta de oxígeno que por la limitación en la entrada de glucosa, ya que el glucógeno miocárdico puede proporcionar sustrato oxidable durante periodos cortos de tiempo. Por otro lado, la acumulación de lactato contribuiría a una condición de acidosis local dañina para el miocardio. *In vivo*, la adenosina liberada por efecto de la hipoxia al mejorar el flujo sanguíneo aumentaría la oferta de oxígeno, ayudaría a disminuir la acumulación de lactato y, por sus efectos sobre la fisiología cardíaca (ver arriba), disminuiría el requerimiento energético celular. Es decir, mejoraría el balance energético entre la oferta y la demanda. Es importante no pasar por alto en esta discusión el antecedente ya

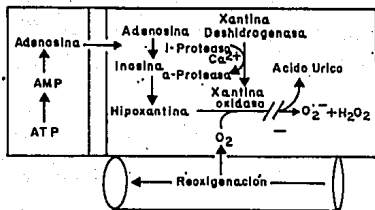


Figura 4. ESQUEMA QUE ILUSTRAS EL PAPEL DE LA XANTINA OXIDASA EN EL DAÑO ISQUEMICO MIOCARDICO POR RADICALES LIBRES DERIVADOS DEL OXIGENO (RLO) DURANTE LA REPERFUSION. i-Proteasa = Proteasa inactiva; a-Proteasa = Proteasa activa.

mencionado de que la adenosina puede elevar la poza de nucleótidos de adenina en eritrocitos [9], ya que, según se discutió para el caso de esas células, tal efecto podría representar una activación de la glucólisis. La importancia que semejante acción de la adenosina tendría, en términos energéticos, para el caso del miocardio isquémico es innegable.

Por último, debe valorarse cuidadosamente el potencial terapéutico de la adenosina en situaciones de hipoxia isquémica como en el caso de los problemas de infarto agudo del miocardio, o la situación más artificial y controlable de las cirugías de corazón en las que es necesario inducir un paro cardiaco con soluciones especiales llamadas cardiopléjicas [27, 35].

Con el fin de determinar si la adenosina es capaz de estimular la actividad glucolítica en un modelo de hipoxia cardiaca experimental se estudiaron los efectos del nucleósido en la recuperación posthipóxica y la actividad glucolítica del corazón aislado perfundido de cobayo utilizando, como un primer paso, indicadores bioquímicos y fisiológicos simples. La utilidad del sistema de corazón aislado y perfundido de roedores para el estudio de la hipoxia y de la isquemia ha sido ya establecida plenamente [32].

2. MATERIALES Y METODOS

El amortiguador ácido 3-(N-morfolino)-2 hidroxipropanosulfónico (MOPSO), las enzimas, las coenzimas, la adenosina, la DEAE-Sephacell, la fructosa 6-fosfato y el ATP se obtuvieron de Sigma Chemical Co.; los inhibidores eritro-9-(2-hidroxi-3-nonil)adenina (EHNA) y 5'-yodotubercidina (ITU) provinieron de Burroughs Wellcome. Los demás reactivos fueron de grado analítico de Merck (México). Las determinaciones de metabolitos se llevaron a cabo en un espectrofotómetro Zeiss PM6 (West Germany), en tanto que la actividad de la PFK-1 se midió en un espectrofotómetro Gilford acoplado a un registrador y con temperatura controlada de 25 °C; otros detalles se señalan en los párrafos correspondientes.

2.1. ERITROCITOS

2.1.1. Experimentos *in vivo*

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar, con peso entre 150 y 180 g. Los animales fueron ayunados durante 16 horas con ingesta de agua *ad libitum*. Posteriormente se les administró por vía intraperitoneal solución salina al 0.9% o adenosina (100 mg/kg de peso) disuelta en solución salina isotónica. Los animales fueron sacrificados por decapitación, 30 minutos después del tratamiento, ya que a ese tiempo se observó el aumento máximo en

los niveles de nucleótidos de adenina inducido por el nucleósido [9]; se obtuvieron muestras de sangre con las que se prepararon extractos mezclándolas con ácido perclórico 0.6 N. Las proteínas precipitadas se separaron por centrifugación y se midieron los metabolitos en los sobrenadantes neutralizados con K_2CO_3 5 M. Para las determinaciones en los eritrocitos aislados se centrifugó la sangre para separar las células inmediatamente después de obtener las muestras; se lavaron las células 3 veces con solución salina isotónica. Los eritrocitos fueron luego homogenizados con ácido perclórico 0.6 N, se centrifugaron y se conservó el sobrenadante que se neutralizó con K_2CO_3 5 M y se utilizó para las determinaciones de metabolitos. Es importante enfatizar que estos eritrocitos no fueron incubados. En esas muestras se llevaron a cabo las determinaciones siguientes: glucosa por el método de Bergmeyer y cols. [40]; glucosa 6-fosfato y fructosa 6-fosfato según lo reportado por Lang y Michal [41]; fructosa 1,6-bisfosfato, dihidroxiacetona fosfato y gliceraldehído 3-fosfato por el procedimiento de Michal y Beutler [42]; 3-fosfoglicerato según Czok [43]; 2,3-bisfosfoglicerato por el método de Krimsky [44]; piruvato, fosfoenolpiruvato y 2-fosfoglicerato según el procedimiento de Czok y Lampracht [45]; y lactato de acuerdo con lo reportado por Gutmann y Wahlefeld [46].

Todos los métodos utilizados son espectrofotométricos y se basan en la aparición o desaparición de NADH (medido por la absorbancia a 340 nm). Como se trata de métodos de punto final, se toma una lectura a tiempo cero y luego se registra el cambio en la absorbancia después de añadir las enzimas apropiadas hasta que la lectura se estabiliza, lo que indica que la reacción se ha completado. Para los cálculos solamente se toma en cuenta la diferencia entre la lectura inicial (tiempo cero) y la final. Para todos los metabolitos se obtuvo una curva patrón con el objeto de valorar el funcionamiento de los métodos. Además, en todas las series de determinaciones se añadió siempre un estándar de concentración alta que permitió comprobar que en las muestras biológicas la reacción terminaba cuando todavía quedaba un exceso de los componentes de la mezcla de medición.

2.1.2. Experimentos *in vitro*

2.1.2.1. Eritrocitos incubados

Se obtuvieron muestras de sangre por decapitación de ratas macho Wistar sin tratamiento y se aislaron los eritrocitos por centrifugación. Las células fueron lavadas 3 veces en un medio isotónico a pH 7.4 con la siguiente composición (mM): NaCl 140, KCl 4.7, CaCl₂ 2.5, MgCl₂ 1.2 y KH₂PO₄ 1.2. Posteriormente, los eritrocitos fueron resuspendidos en el mismo medio hasta lograr un hematocrito de 25%. Muestras de 1.5 ml de esta suspensión de eritrocitos fueron mezcladas en pequeños matraces Erlenmeyer con un volumen igual de un medio de incubación a pH 7.4 que contenía el amortiguador MOPSO (50 mM) y glucosa (5 mM) además de los componentes previamente mencionados para el medio isotónico; la osmolaridad se ajustó reduciendo la concentración de NaCl. Se probó el efecto de la adenosina a las concentraciones de 1 y 10 μ M en presencia o ausencia de eritro-9-(2-hidroxi-3-nonil)adenina (EHNA) 8 μ M y 5'-yodotubercidina (ITU) 2 μ M para inhibir a las enzimas adenosina desaminasa y adenosina cinasa, respectivamente [47-48]. Las incubaciones se llevaron a cabo a 37 °C, hasta por 90 minutos, con agitación constante, en un incubador metabólico tipo Dubnoff. A diferentes tiempos se tomaron muestras de 0.5 ml y se procesaron de la misma manera descrita en la sección anterior para la medición de piruvato y lactato como indicadores de la actividad glucolítica por los métodos ya mencionados [45-46].

2.1.2.2. Purificación parcial de la PFK-1

También se probó el efecto de la adenosina (1 y 10 μM) sobre la PFK-1 de eritrocitos de rata. Para llevar a cabo estos experimentos se preparó una fracción parcialmente purificada de acuerdo con el método de Layzer [49] y que corresponde al paso de DEAE-celulosa del procedimiento citado. Se obtuvo sangre por decapitación de varias ratas Wistar macho y se colectó en tubos con EDTA como anticoagulante. Se separaron los eritrocitos mediante centrifugación a 3 500 x g y después de desechar el plasma se lavaron las células 3 veces en solución salina isotónica. Posteriormente, los paquetes de eritrocitos fueron hemolizados utilizando un sonicador Soniprep 150. El hemolizado se centrifugó a 15 000 x g durante 30 minutos para sedimentar y eliminar las membranas y obtener una preparación (fracción citosólica) no viscosa que se aplicó a una columna de DEAE-Sephacell (Sigma) equilibrada con un amortiguador de KH_2PO_4 10 mM a pH 8. La columna se lavó con el mismo buffer y luego se aplicó un gradiente lineal de fuerza iónica con KH_2PO_4 desde 10 hasta 500 mM. La enzima se eluyó, totalmente libre de hemoglobina, y luego se concentró con un concentrador y una membrana de Amicon. Debido a los métodos de obtención, esta preparación estaba libre de las actividades de adenosina desaminasa y adenosina cinasa. La actividad de la enzima se midió espectrofotométricamente mediante el uso del sistema acoplado que se describe más adelante (Fig. 5).

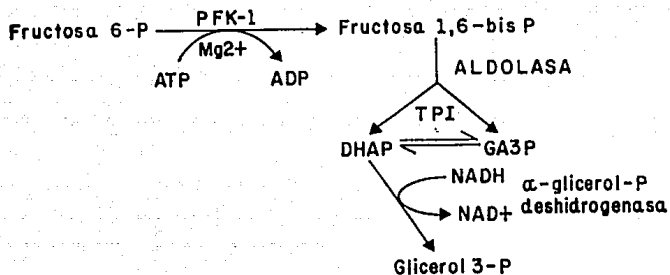


Figura 5. REACCIONES DEL SISTEMA ACOPLADO PARA LA MEDICION DE LA ACTIVIDAD DE LA FOSFOFRUCTOCINASA-1 (PFK-1). TPI = Triosa-fosfato isomerasa.

Las determinaciones de proteína se realizaron con el método de Bradford utilizando como patrón albúmina sérica bovina [50]. La Tabla II muestra los datos de la purificación.

TABLA II. PURIFICACION PARCIAL DE LA PFK-1 DE ERITROCITOS DE RATA.

Etapa	Actividad Total (UI) ^a	Proteína Total (mg)	Actividad Específica (UI/mg)	Pureza (Veces)	Rendimiento (%)
1. Hemolizado	14.26	1 584	0.009	1	100
2. DEAE-celulosa	12.92	12	1.045	116	90

^aUI, unidad internacional. Una UI transforma 1 μ mol de FBP/min a 25 °C, a pH 8.

La actividad de la PFK-1 se midió siguiendo la desaparición de NADH a 340 nm en el sistema acoplado con aldolasa, triosafosfato isomerasa y α -glicerofosfato deshidrogenasa, a 25 °C. En la Figura 5 se ilustran las reacciones que sirven de base a esta determinación. La composición de la mezcla de reacción se muestra en la Tabla III. En todos los experimentos se tuvo cuidado de que la mezcla de enzimas de acoplamiento no fuera el factor limitante de la velocidad de la reacción. Se calcularon los valores de K_m aparente y V_{max} para la fructosa 6-fosfato y el ATP, con un programa de ajuste de ecuaciones para computadora personal [51-52].

TABLA III. COMPOSICION DE LA MEZCLA DE REACCION PARA EL ENSAYO DE LA ACTIVIDAD DE LA PFK-1.

Substancia	Concentración para medir la dependencia con respecto a:	
	Fructosa 6-P	ATP
	mM	
Tris HCl pH 8	40	40
Fructosa 6-P	Variable*	1
ATP	0.2	Variable**
MgCl ₂	1.22	1.22
NADH	0.2	0.2
Aldolasa	exceso	exceso
Triosafosfato isomerasa	exceso	exceso
α-glicerofosfato deshidrogenasa	exceso	exceso

* Hasta 1 mM.

** Hasta 1 mM.

2.2. CORAZON

Se utilizaron cobayos machos de 650-850 g de peso, los cuales fueron descerebrados mediante un golpe en la base del cráneo para posteriormente abrir el tórax, extraer el corazón y perfundirlo en forma retrógrada por la técnica de Langendorff que consiste en colocar una cánula en la aorta por arriba de la válvula y hacer pasar una solución mediante un aparato de perfusión. El medio de perfusión fue solución de Ringer-Krebs bicarbonato adicionada con glucosa (10 mM) a pH 7.4, 37 °C, y equilibrada con una mezcla de O₂/CO₂ (95%/5%) para el control o N₂/CO₂ (95%/5%) para la condición de hipoxia. La adenosina se agregó en los casos convenientes a la concentración de 10⁻⁵ M. La

frecuencia cardiaca se mantuvo constante mediante el uso de un estimulador Grass S 88 que enviaba pulsos eléctricos de 10 a 15 V a 4 Hz (240 ciclos x min). La presión de perfusión se midió a través de un transductor de presión conectado a la aorta. El estado de la contractilidad del corazón se determinó a través del registro de la fuerza de contracción bajo 3 diferentes condiciones de carga intraventricular, mediante la colocación de un globo de látex en el ventrículo izquierdo conectado a un transductor de presión. El volumen del globo se varió inyectándole agua para obtener una carga intraventricular mínima (0), media (1/2) y máxima (1) elegidas arbitrariamente. La frecuencia de estimulación del marcapaso, la presión de perfusión, el desarrollo de presión intraventricular y su primera derivada con respecto al tiempo (dP/dt) fueron registradas con un polígrafo Grass 7 C. Se colectaron muestras de perfusado en ácido perclórico frío (concentración final 1 N), las cuales se neutralizaron con K_2CO_3 5 M, se descartó el precipitado y se utilizó el sobrenadante para determinación de lactato y piruvato por los métodos espectrofotométricos ya citados [45, 46]. El protocolo de cada experimento era el siguiente: una vez estabilizada la preparación de corazón aislado se la sometía a 15 minutos de perfusión con la solución control (fase de control) seguida de 15 minutos de perfusión con las condiciones a probar (fase de prueba) y, finalmente, a otros 15 minutos de perfusión con las condiciones

iniciales (fase de recuperación).

3. RESULTADOS

3.1. ERITROCITOS

3.1.1. Experimentos *in vivo*

Los niveles de los intermediarios de la glucólisis se encuentran modificados en sangre total y en eritrocitos a los 30 minutos de la administración de adenosina (Tablas IV y V).

La Tabla IV muestra los cambios inducidos por la adenosina en sangre total (Tabla IV). En este caso, la glucosa 6-fosfato (G6P) no cambia, la fructosa 6-fosfato (F6P) baja un poco y la fructosa 1,6-bisfosfato (FBP) está aumentada 2.5 veces. Las triosas cambian en sentidos opuestos, la dihidroxiacetona fosfato (DHAP) aumenta al doble en tanto que el gliceraldehído 3-fosfato (GA3P) disminuye ligeramente; el 3-fosfoglicerato (3PG) no cambia y el 2-fosfoglicerato (2-PG) aumenta poco más del 50%. El fosfoenolpiruvato (PEP) sufre un cambio notable pues disminuye hasta la tercera parte del control. Piruvato (PIR) y lactato (LAC) aumentan, pero sólo este último alcanza el doble del valor control y la relación PIR/LAC disminuye un poco (28%). En resumen, los cambios más importantes son: el aumento en la FBP, la DHAP y el LAC, junto con la disminución en el PEP.

En el caso de eritrocitos aislados (no incubados, Tabla V) se observan cambios similares aunque no iguales. La glucosa (G) y la G6P no cambian, pero, al igual que en sangre total, la FBP

aumenta 2.5 veces. Las 2 triosas, DHAP y GA3P, disminuyen un poco, a diferencia de lo que pasa en la sangre. El nivel del metabolito más abundante en los eritrocitos, el 2,3-bisfosfoglicerato (BPG), no cambia por efecto del nucleósido; como tampoco cambian el 3PG y el 2PG. El PEP no cambia, a diferencia de lo que ocurre en sangre total en donde este metabolito disminuye notablemente por efecto de la adenosina. Finalmente, PIR y LAC se modifican en sentidos opuestos: el primero disminuye ligeramente en tanto que el segundo aumenta un 30%. En este caso, la relación PIR/LAC disminuye un 50%. Resumiendo, los principales cambios debidos a la adenosina son los siguientes: aumento en la FBP y en el lactato.

TABLA IV. EFECTO DE LA INYECCION INTRAPERITONEAL DE ADENOSINA SOBRE LOS NIVELES DE LOS INTERMEDIARIOS DE LA GLUCOLISIS EN EXTRACTOS DE SANGRE TOTAL DE RATA^a

Metabolito	Control	Experimental
G6P	26.6±2.4	22.2±3.1
F6P	17.4±3.1	12.2±1.5
FBP	13.2±1.4	44.9±7.2
DHAP	15.8±1.7	33.0±3.6
G3P	11.0±1.6	7.4±1.9
3PG	35.5±5.0	32.9±6.0
2PG	6.0±1.0	10.0±2.0
PEP	57.0±6.0	20.0±4.0
PIR	21.4±3.8	34.3±3.5
LAC	730.0±42	1 660.0±163
PIR/LAC	0.029	0.021

^aLos resultados están expresados en nmoles/ml, y representan el promedio ± el error estándar de 6 experimentos.

TABLA V. EFECTO DE LA INYECCION INTRAPERITONEAL DE ADENOSINA SOBRE LOS NIVELES DE LOS INTERMEDIARIOS DE LA GLUCOLISIS EN EXTRACTOS DE ERITROCITOS AISLADOS DE RATA^a

Metabolito	Control	Experimental
G	2.6±0.4	2.6±0.3
G6P	22.3±3.4	27.8±2.0
F6P	5.6±0.5	7.0±0.7
FBP	12.5±1.1	45.2±4.4
DHAP	31.5±5.5	20.1±1.0
G3P	8.3±1.6	5.5±0.1
BPG	2 410.0±160	2 200.0±180
3PG	35.5±5.0	32.9±6.0
2PG	3.2±0.4	3.6±0.3
PEP	3.3±0.4	3.2±0.6
PIR	7.3±1.0	5.2±0.4
LAC	137.0±20	183.0±24
PIR/LAC	0.053	0.028

^aLos resultados están expresados en nmoles/ml, y representan el promedio ± el error estándar de 6 experimentos.

Por último, no debe dejar de mencionarse que aunque existe similitud en el perfil de los cambios inducidos por la adenosina en los dos sistemas, sangre total y eritrocitos aislados (no incubados), también se observan diferencias importantes en el caso de algunos metabolitos. Mientras que en sangre total la DHAP aumenta notablemente, en eritrocitos disminuye ligeramente. El 2PG está aumentado en sangre total y no cambia en eritrocitos. Por su parte, el PEP que disminuye notablemente en sangre no se modifica en los eritrocitos. En sangre aumenta un poco el PIR, pero disminuye ligeramente en los eritrocitos. El LAC aumenta en los

dos sistemas, pero más notablemente en sangre total (>100%) que en eritrocitos (<50%). Pero aún existen otras diferencias entre los enfoques, los niveles absolutos de algunos metabolitos bajo condiciones similares no son comparables. En la condición control, la concentración de DHAP está aumentada, en tanto que están disminuidos los niveles de F6P, GA3P, 2PG, PEP, PIR y LAC en los eritrocitos, con respecto a los niveles en sangre total. Para la condición experimental se observa el mismo perfil de diferencias, excepto para la DHAP que está disminuida. Es particularmente importante señalar la notable caída en el nivel de PEP, PIR y LAC. En otras palabras, el sólo hecho comparar las determinaciones realizadas en eritrocitos aislados con las efectuadas en sangre total arroja las diferencias mencionadas. Como se enfatizará en la discusión, probablemente los factores más importantes que se deban considerar para explicar estos cambios sean: 1) el hecho de que, necesariamente, se invierte más tiempo para aislar y lavar los eritrocitos, y 2) la ausencia de glucosa en el buffer de aislamiento y lavado de las células (este carbohidrato sí se encuentra en la sangre originalmente).

3.1.2. Experimentos *in vitro*

3.1.2.1. Eritrocitos incubados

En eritrocitos incubados en presencia de los inhibidores EHNA e ITU se observó un aumento del 80% en la producción de

lactato con adenosina $1 \mu\text{M}$ (Fig. 6). Ese efecto no se observó en ausencia de los inhibidores del metabolismo de la adenosina. Una concentración más alta de adenosina ($10 \mu\text{M}$) no produjo el cambio observado con la concentración de $1 \mu\text{M}$, por lo que no puede hablarse de un efecto dependiente de la dosis. Por otro lado, esos inhibidores enzimáticos no modifican por sí solos la producción de lactato. La producción de piruvato se mantuvo prácticamente constante en la mayoría de las condiciones probadas. Por su parte la relación PIR/LAC descendió casi a la mitad (0.036) por efecto de la adenosina en presencia de los inhibidores; pero con adenosina sola dicha relación tuvo un valor de 0.067 y sin adenosina fue 0.063. Hay que hacer notar que la disminución en el valor de la relación PIR/LAC se debió esencialmente a un aumento en la producción de lactato pues la concentración de piruvato se mantuvo semejante a la del control.

3.1.2.2. PFK-1 parcialmente purificada

La adenosina también produjo cambios en la PFK-1 parcialmente purificada de eritrocitos de rata. La K_m aparente de la enzima por la fructosa 6-fosfato disminuyó en un 24% en tanto que no hubo modificación significativa en la V_{max} (Tabla VI). No se observaron efectos importantes de la adenosina en los mismos indicadores anteriores, medidos para el ATP. La adenosina tampoco modifica la actividad de las enzimas del sistema de acoplamiento

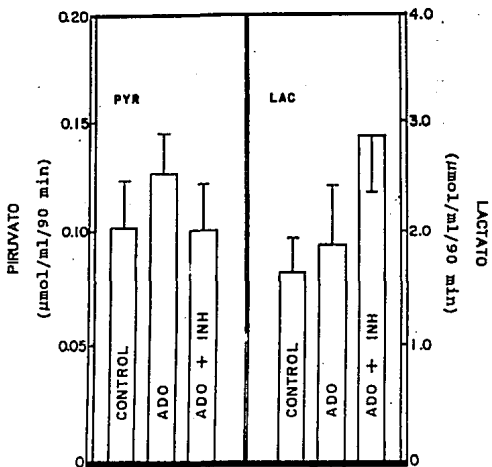


Figura 6. PRODUCCION DE PIRUVATO Y LACTATO EN ERITROCITOS DE RATA INCUBADOS. Control = sin adiciones; ADO = Adenosina 1 μ M; ADO + INH = adenosina 1 μ M + EHNA 8 μ M/ITU 2 μ M. Las barras representan el promedio \pm la desviación estandar de 4-6 experimentos. Para detalles experimentales ver Sección 2.1.2.1.

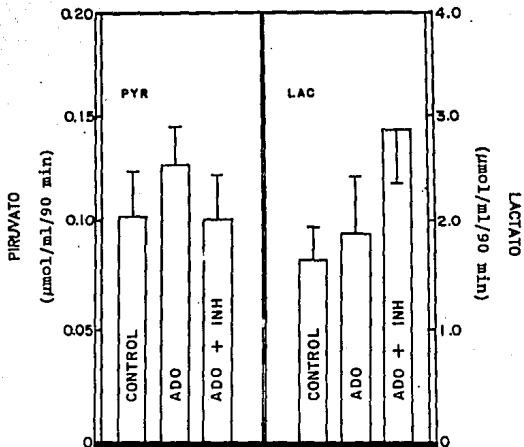


Figura 6. PRODUCCION DE PIRUVATO Y LACTATO EN ERITROCITOS DE RATA INCUBADOS. Control = sin adiciones; ADO = Adenosina 1 μM; ADO + INH = adenosina 1 μM + EHNA 8 μM/ITU 2 μM. Las barras representan el promedio ± la desviación estándar de 4-6 experimentos. Para detalles experimentales ver Sección 2.1.2.1.

(aldolasa, triosafosfato isomerasa y α -glicerofosfato deshidrogenasa, Fig. 5) como pudo observarse en experimentos adicionales. Las enzimas alóstericas del tipo K, cuando se activan, muestran modificaciones en la K_m aparente, como en el presente caso; de hecho, en términos porcentuales, la activación de la PFK-1 observada en estos experimentos es similar a la producida por otros efectores de la enzima como el 2,3-bisfosfoglicerato y el fosfoenolpiruvato [21-23].

TABLA VI. EFECTO DE LA ADENOSINA SOBRE LA PFK-1 DE ERITROCITOS DE RATA.

Adenosina μ M	F6P		ATP	
	K_m	V_{max}	K_m	V_{max}
Nada ^a	0.015	29.4	0.058	38.6
1	0.011	28.9	0.054	32.2

^aLos valores del control están expresados como sigue: K_m =mM y V_{max} =nmoles/10 min.

3.2. CORAZON

La frecuencia cardiaca se mantuvo constante (240 latidos x min) durante todas las condiciones probadas con objeto de controlar esta variable que interviene de manera importante en la determinación de la actividad metabólica del corazón. Esta

precaución es necesaria debido a que la adenosina (endógena o exógena) tiene, como se ha visto, un efecto cronotrópico negativo, es decir, disminuye la frecuencia cardíaca. Si no se evita la disminución de la frecuencia de contracción, la actividad metabólica del corazón disminuye y no permite observar los efectos de la adenosina sobre el metabolismo cardíaco.

En los experimentos que a continuación se describen se utilizó la secuencia de condiciones siguiente (para más detalles ver la sección 2.2): 1) perfusión en condiciones basales (fase de control), 2) perfusión en condiciones de prueba (fase de prueba: hipoxia, adenosina, hipoxia + adenosina), y 3) nueva perfusión en condiciones basales (fase de recuperación). Cada fase duró 15 minutos. La Figura 7 muestra la hoja de registro de un protocolo típico.

En todos los experimentos en los que se utilizó, la adenosina produjo una vasodilatación coronaria que se manifestó como una disminución en la presión de perfusión, ya que el flujo coronario se mantuvo constante (Fig. 7). Un efecto similar se observó en los experimentos de hipoxia en ausencia de adenosina exógena y muy probablemente se debe a la liberación del nucleósido por parte del miocardio hipóxico.

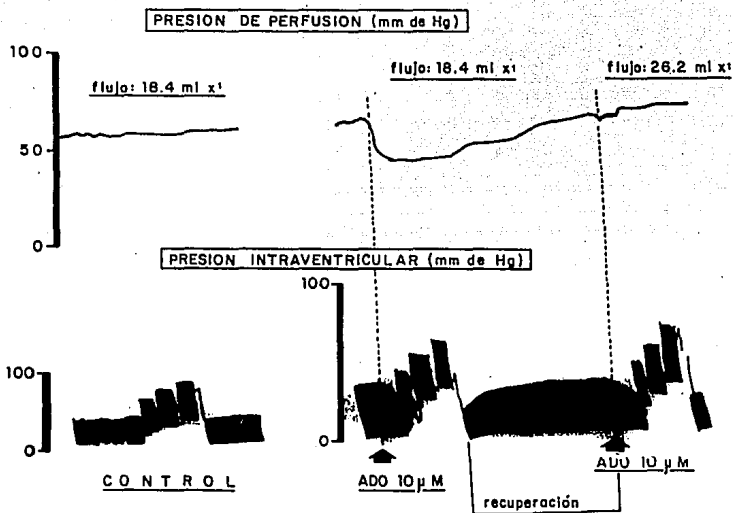


Figura 7. DIAGRAMA DEL REGISTRO DE UN PROTOCOLO TIPICO DE PERFUSION DE CORAZON DE COBAYO. ADO = adenosina; ml x' = mililitro por minuto.

3.2.1. Cambios en la contractilidad.

Es importante recordar que el estado contráctil del corazón se midió mediante la determinación del porcentaje de recuperación con respecto al valor inicial de la primera derivada del desarrollo de presión con respecto al tiempo (dP/dt), después de la fase de prueba. Este índice refleja la velocidad de acortamiento de las fibras musculares cardíacas. Recuérdese además que la fuerza de contracción se midió bajo 3 condiciones diferentes de carga intraventricular: mínima (0), media (1/2) y máxima (1).

Durante la fase hipóxica y en los experimentos en los que se añadió adenosina exógena, la fuerza de contracción disminuyó, así también como su primera derivada con respecto al tiempo (dP/dt ; ver Sección 2.2). En la Figura 8 se puede observar la curva de desarrollo de presión a diferente carga ventricular; claramente se muestra cómo la adenosina disminuye la fuerza de contracción ventricular. En condiciones de normoxia, el dP/dt recuperó su valor inicial cuando se suspendió la infusión de adenosina; en condiciones de hipoxia el porcentaje de recuperación del dP/dt fue mayor durante la fase de reoxigenación (98%) cuando había adenosina 10 μM en la fase hipóxica que cuando ésta no estaba presente (78%).

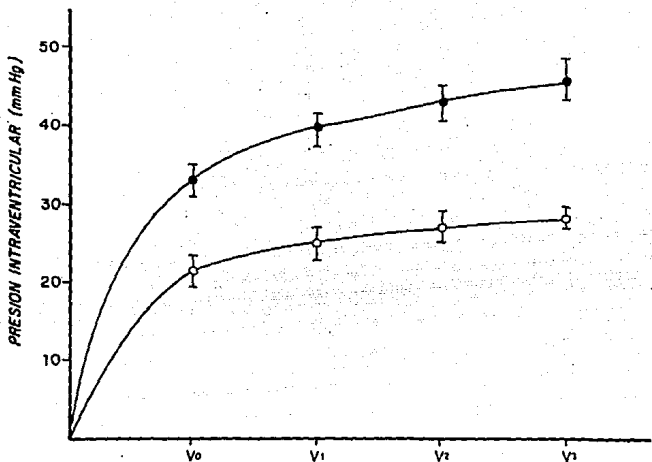


Figura 8. CURVA DE DESARROLLO DE PRESION INTRAVENTRICULAR EN CORAZON DE COBAYO. V₀, V₁, V₂, V₃ representan volúmenes intraventriculares crecientes. Los círculos negros representan el control y los blancos representan el efecto de adenosina 10 μ M. Cada punto representa el promedio \pm la desviación estándar de 6 experimentos.

3.2.2. Efecto de la adenosina sobre la producción de piruvato y lactato en normoxia.

La Figura 9 muestra la producción de piruvato y lactato en corazón de cobayo en condiciones de adecuada oxigenación y bajo diferentes condiciones de carga ventricular (ver Sección 2.2). Cada barra representa una diferente carga ventricular ascendente indicada arbitrariamente como 0, 1/2 y 1 (carga mínima, media y máxima, respectivamente). En el caso del piruvato se observa que su producción no varía en forma significativa con las diferentes cargas ventriculares ni bajo el efecto de adenosina 10 μM . En contraste, la producción de lactato se modifica de forma importante y en relación directa con la carga de trabajo bajo la acción de la adenosina. Debe hacerse notar que este efecto de la adenosina es transitorio puesto que los valores de lactato regresan, incluso un poco por debajo de las cifras iniciales al suspender la administración del nucleósido. Lo anterior se refleja en la relación PIR/LAC para cada condición que aparece en la parte superior de la Figura 9 y las siguientes. La adenosina tiende a producir una ligera disminución de ese cociente el cual sube al suspender el nucleósido y se mantiene un poco elevado todavía 15 minutos después (última barra). Obsérvese que la relación PIR/LAC se mantiene alta a expensas de una disminución en la producción de LAC sin cambios en el PIR.

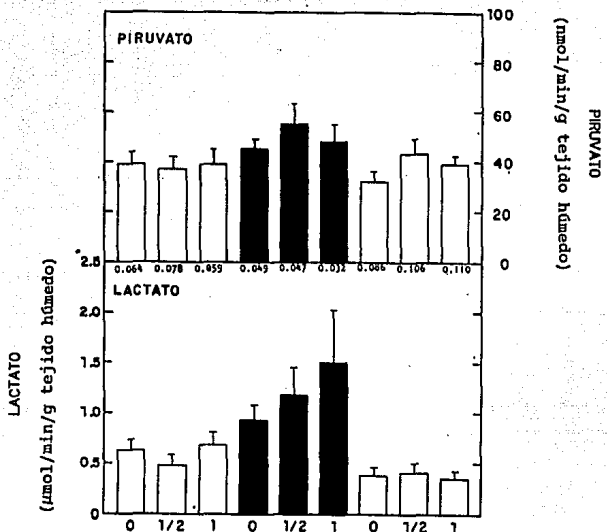


Figura 9. EFECTO DE LA ADENOSINA SOBRE LA PRODUCCION DE PIRUVATO Y LACTATO EN CONDICIONES DE NORMOXIA. Las determinaciones se efectuaron en el perfusado; los valores están expresados en nmoles/min/g de tejido húmedo para el piruvato, y en μmoles/min/g de tejido húmedo para el lactato. Cada barra representa el promedio de 4-6 experimentos ± el error estándar. Los números 0, 1/2 y 1 representan cargas (volúmenes) intraventriculares crecientes. Las primeras 3 barras representan la fase de prueba y las 3 últimas pertenecen a la fase de recuperación. Los números que se encuentran en la parte superior del recuadro del lactato, son las relaciones PIR/LAC para cada condición. Ver sección 2.2 para mayores detalles.

3.2.3. Efecto de la hipoxia sobre la producción de piruvato y lactato.

En la Figura 10 puede verse que la producción de piruvato no se altera en forma importante por efecto de la hipoxia. Sin embargo, se observa una disminución paulatina de ese metabolito al aumentar la carga de trabajo ventricular durante la hipoxia. El perfil de producción basal de piruvato se recupera cuando se restablece la oxigenación. Como se esperaba, la producción de lactato se elevó notablemente durante el período hipóxico, y esta elevación fue independiente de la carga ventricular. Al restablecer las condiciones de normoxia, la producción de lactato regresa a los valores iniciales. La relación PIR/LAC disminuye claramente durante el período hipóxico y se recupera al restablecer la oxigenación y, en este caso, la disminución de ese cociente es más importante que la producida por la adenosina.

3.2.4. Efecto de la adenosina sobre la producción de piruvato y lactato en condiciones de hipoxia.

La producción de piruvato sufre una ligera elevación durante la hipoxia en presencia de adenosina $10 \mu\text{M}$ como puede verse en la Figura 11; dicha elevación desaparece cuando se

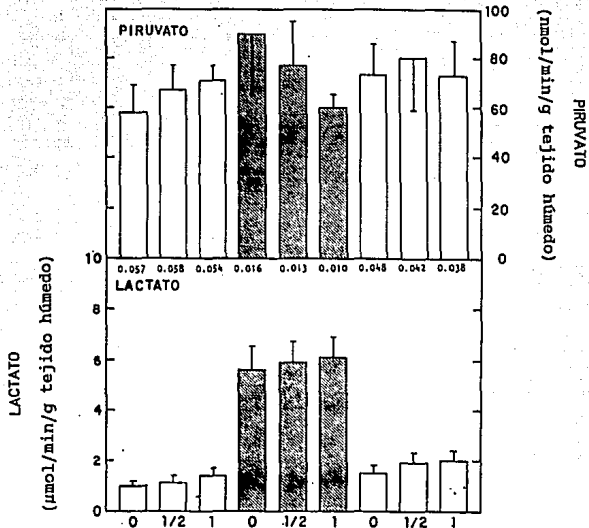


Figura 10. EFECTO DE LA HIPOXIA SOBRE LA PRODUCCION DE PIRUVATO Y LACTATO. Las determinaciones se efectuaron en el perfusado; los valores están expresados en nmoles/min/g de tejido húmedo para el piruvato, y en μ moles/min/g de tejido húmedo para el lactato. Cada barra representa el promedio de 4-6 experimentos \pm el error estándar. Los números 0, 1/2 y 1 representan cargas (volúmenes) intraventriculares crecientes. Las primeras 3 barras representan la fase de control, las siguientes 3 (sombreadas) representan la fase de prueba y las 3 últimas pertenecen a la fase de recuperación. Los números que se encuentran en la parte superior del recuadro del lactato, son las relaciones PIR/LAC para cada condición. Ver sección 2.2 para mayores detalles. Obsérvese que la escala para el lactato es diferente que la de la Figura 9.

restablecen las condiciones de adecuada oxigenación. Por su parte, la producción de lactato se eleva bajo el efecto de la hipoxia en presencia del nucleósido; sin embargo, dicha elevación es claramente menor a la que se observa en condiciones de hipoxia en ausencia de la adenosina. El nucleósido bloqueó parcialmente el aumento en la producción de lactato inducido por la hipoxia. A pesar de este bloqueo parcial en la producción de lactato, la relación PIR/LAC disminuye tanto como en la hipoxia sin adenosina en la que si bien se produce más lactato también ocurre un leve aumento en el nivel de piruvato.

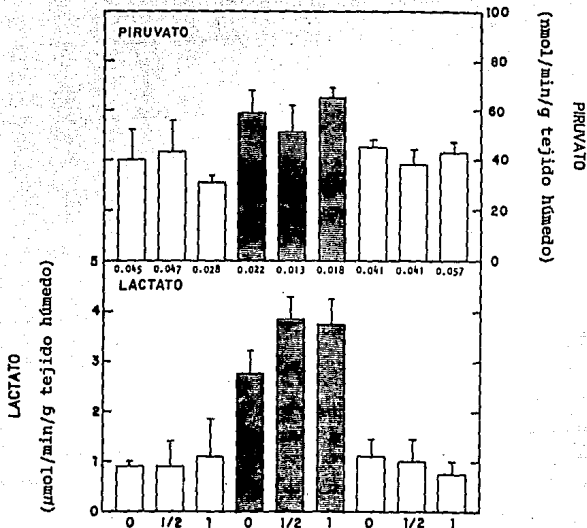


Figura 11. EFECTO DE LA ADENOSINA SOBRE LA PRODUCCION DE PIRUVATO Y LACTATO EN CONDICIONES DE HIPOXIA. Las determinaciones se efectuaron en el perfusado; los valores están expresados en nmoles/min/g de tejido húmedo para el piruvato, y en μmoles/min/g de tejido húmedo para el lactato. Cada barra representa el promedio de 4-6 experimentos ± el error estándar. Los números 0, 1/2 y 1 representan cargas (volúmenes) intraventriculares crecientes. Las primeras 3 barras representan la fase de control, las siguientes 3 (sombreadas) representan la fase de prueba y las 3 últimas pertenecen a la fase de recuperación. Los números que se encuentran en la parte superior del recuadro del lactato, son las relaciones PIR/LAC para cada condición. Ver sección 2.2 para mayores detalles. Obsérvese que la escala para el lactato es diferente que la de la Figura 10.

4. DISCUSION

4.1. ERITROCITOS

Los resultados de estudios previos y de este trabajo en eritrocitos muestran que la adenosina modifica el metabolismo energético celular. Ya se ha señalado en la sección 1.2 cómo el aumento en la concentración de ATP producido *in vivo* por la adenosina puede ser atribuido en parte a una acción del nucleósido sobre la glucólisis. En este trabajo se observa que la adenosina estimula la actividad de la vía glucolítica, como lo indica el notable aumento en la fructosa 1,6-bisfosfato y el lactato, producto final de la vía, después de la inyección intraperitoneal de adenosina. Los eritrocitos dependen energéticamente de la glucólisis, y oxidan el NADH que se produce reduciendo el piruvato a lactato, con lo cual se regenera el NAD^+ requerido en el paso de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa para que la vía continúe funcionando. Estas células son entonces consumidoras de glucosa y formadoras de lactato. Sin embargo, la glucólisis no es la única vía que consume glucosa en los eritrocitos; existe otra vía que utiliza glucosa: la vía de los fosfatos de pentosa (vía de las pentosas o del fosfogluconato). Esta vía no cumple funciones energéticas importantes sino que produce el NADPH necesario para mantener en estado reducido al glutatión, el cual a su vez es esencial para la conservación de la estructura y función de los

4. DISCUSION

4.1. ERITROCITOS

Los resultados de estudios previos y de este trabajo en eritrocitos muestran que la adenosina modifica el metabolismo energético celular. Ya se ha señalado en la sección 1.2 cómo el aumento en la concentración de ATP producido *in vivo* por la adenosina puede ser atribuido en parte a una acción del nucleósido sobre la glucólisis. En este trabajo se observa que la adenosina estimula la actividad de la vía glucolítica, como lo indica el notable aumento en la fructosa 1,6-bisfosfato y el lactato, producto final de la vía, después de la inyección intraperitoneal de adenosina. Los eritrocitos dependen energéticamente de la glucólisis, y oxidan el NADH que se produce reduciendo el piruvato a lactato, con lo cual se regenera el NAD^+ requerido en el paso de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa para que la vía continúe funcionando. Estas células son entonces consumidoras de glucosa y formadoras de lactato. Sin embargo, la glucólisis no es la única vía que consume glucosa en los eritrocitos; existe otra vía que utiliza glucosa: la vía de los fosfatos de pentosa (vía de las pentosas o del fosfogluconato). Esta vía no cumple funciones energéticas importantes sino que produce el NADPH necesario para mantener en estado reducido al glutatión, el cual a su vez es esencial para la conservación de la estructura y función de los

eritrocitos. En resumen, los eritrocitos dependen energéticamente de la glucólisis y los cambios encontrados en el perfil de los intermediarios glucolíticos por efecto del nucleósido le pueden ser atribuidos directamente a esta vía, si bien la vía del fosfogluconato puede producir intermediarios que ingresen a la glucólisis (fructosa 6-fosfato, gliceraldehído 3-fosfato) y que podrían contribuir a la producción de energía. En todo caso esta contribución sería minoritaria ya que sólo aproximadamente el 10% de la glucosa consumida por el eritrocito ingresa a la vía del fosfogluconato [53].

Aparte del aumento en la concentración de FDP y LAC que se observa en sangre total y en eritrocitos aislados por efecto de la adenosina hay otros cambios que merecen atención. El tratamiento con el nucleósido modifica de manera diferencial el nivel de 3 intermediarios glucolíticos, la DHAP, el PEP y el PIR, según se trate de sangre total o de eritrocitos. Por otro lado, el solo hecho de cambiar del primero al segundo sistema, produce cambios en los niveles basales de los 3 metabolitos mencionados y además en el 2PG y el LAC. Para explicar estos cambios, no parece factible atribuir a la adenosina un efecto diferencial en los dos sistemas; es más probable que se trate de un trastorno ocasionado por el cambio súbito en las condiciones metabólicas cuando se aíslan los eritrocitos. Entre estos cambios está el hecho de que el buffer de lavado para los eritrocitos es simplemente NaCl al

0.9%; esto significa que las células pasan, en forma rápida, de un ambiente en el que están expuestas a una concentración de glucosa de entre 5 y 10 mM (sangre) a otro en el que ese carbohidrato no se encuentra presente (solución salina). Posiblemente este estado de privación de glucosa tenga alguna relación con la caída en el nivel de los intermediarios glucolíticos a partir del 2PG que se acentúa en el PEP y que se sigue observando en el PIR y el LAC en los eritrocitos. De cualquier forma, debe tratarse de algo más complejo puesto que los metabolitos por arriba del 2PG casi no cambian o hasta se elevan, como es el caso, ya señalado, de la DHAP. Así, los cambios más importantes se observan en los metabolitos más inestables, DHAP y PEP. Hay que hacer notar además que la relación piruvato/lactato se afecta poco por efecto de la adenosina en sangre total (0.029 vs 0.021) mientras que disminuye de 0.053 a 0.028 en eritrocitos aislados. Más adelante se retomará este punto.

Como se describió en la introducción, la mayoría de los criterios para determinar el paso, o los pasos, limitantes en la actividad de la glucólisis, señalan a la PFK-1 como la principal enzima involucrada. Los resultados de este estudio sugieren que la adenosina es capaz de activar la vía glucolítica justamente a través de la estimulación de la enzima PFK-1 como lo indica el importante aumento observado en el nivel de fructosa 1,6-bisfosfato, producto de esa enzima, y el aumento en el

lactato, producto final de la vía. Bajo las condiciones intracelulares normales, en el mecanismo de activación no puede descartarse la participación del AMP, pero también se ha presentado evidencia de que la adenosina, *per se*, aumenta la K_m aparente de la PFK-1 para la fructosa 6-fosfato. Además, en general, el perfil de cambios que produce el nucleósido en las concentraciones de los intermediarios de la glucólisis es similar al que se observa en otros modelos de activación glucolítica como el de anoxia descrito por Lagunas y Gancedo [54] en el que también se encuentra aumentada la actividad de la PFK-1.

Es importante señalar que, en los experimentos *in vivo*, no se observaron cambios importantes en la concentración de 2,3-bisfosfoglicerato el cual, dada su alta concentración en los eritrocitos (aproximadamente 2 mM), podría aumentar la producción de lactato si la adenosina promoviera su degradación a 3-fosfoglicerato. Como se sabe (Fig. 1), este fenómeno conduciría a la pérdida de un enlace de fosfato de alta energía por cada molécula de 2,3-bisfosfoglicerato degradada, hecho que no está de acuerdo con la observación de que la adenosina puede mantener [13] o incluso aumentar la carga energética celular [9].

Todos los cambios *in vivo* encontrados en la glucólisis, por efecto de la adenosina, ocurren en los eritrocitos, ya que la mayoría de los metabolitos de la vía no difunden a través de las membranas plasmáticas, por lo que sería insostenible pretender que

proviene de otros tejidos, salvo en el caso, claro está, del lactato y el piruvato, que sí difunden. Esto podría explicar la observación de que en las determinaciones en sangre total el aumento de lactato es muy importante mientras que en los eritrocitos aislados (no incubados) el aumento de ese metabolito se sigue observando pero es mucho menor, probablemente debido a que durante el procedimiento de aislamiento de las células gran parte del lactato se perdió al eliminar el plasma y con los sucesivos lavados. Independientemente de esto, el aumento de lactato pudo observarse también en los experimentos con eritrocitos aislados e incubados con adenosina y los inhibidores ITU y EHNA, lo que ratifica la capacidad de estas células para responder al nucleósido. Por lo menos, con respecto a la concentración de lactato detectada en la sangre total, en eritrocitos aislados (no incubados) el porcentaje que aún permanece es de 18.8% para el control y 11% para el animal tratado con adenosina. Ambos porcentajes están en el mismo orden de magnitud, pero existe una diferencia de casi el 8% que, de tomarse en cuenta, podría ser explicada, en principio, por una disminución en la permeabilidad de la membrana para el lactato; sin embargo, se requerirían más datos para apoyar esta hipótesis. En este trabajo hay 2 resultados que reforzarían esta idea: la disminución ya mencionada de la relación PIR/LAC (0.053 vs 0.028) que ocurre en eritrocitos no incubados sin que se registre una variación

importante en la concentración de piruvato (Tabla V), y la disminución de la relación Pir/Lac (0.063 vs 0.036) en eritrocitos incubados con adenosina y los inhibidores de su metabolismo. Desde otro punto de vista, tampoco debe descartarse el hecho de que el aumento del lactato en sangre total puede también estar reflejando la respuesta de otras células al nucleósido, pues si bien este último es rápidamente captado por los eritrocitos, una parte del mismo alcanza al hígado, al cerebro, etc.

No sobra subrayar que en los experimentos con eritrocitos incubados, la presencia de la adenosina queda asegurada por la adición del nucleósido junto con los inhibidores de las enzimas adenosina cinasa y adenosina desaminasa. Además, el uso de estos inhibidores (ITU y EHNA) permite definir de manera más precisa el papel de la adenosina al eliminar la formación de productos derivados de la adenosina exógena que pudieran activar la glucólisis, como el AMP, producto de la adenosina cinasa.

Si bien hasta ahora los ligandos que contienen adenosina y que se ha demostrado que, bajo condiciones fisiológicas, son moduladores de la PFK-1 son únicamente el AMP y el ATP (y bajo condiciones especiales el ADP) no debe causar extrañeza la existencia de un dominio proteico (en la PFK-1) capaz de recibir a la adenosina. No hay una razón importante para suponer que el caso de los receptores para la adenosina como proteínas capaces de ligar al nucleósido sea único. De hecho, cuando se describieron

los primeros efectos de la adenosina en los sistemas biológicos no se preveía el gran número de acciones del nucleósido que estaba por describirse y que dependían de receptores cuya existencia era ubicua. Aún más, la subunidad catalítica de la enzima adenilato ciclasa contiene un dominio que puede ligar al nucleósido, sin la intervención de la proteína G_i , produciendo una inhibición en la producción de AMP cíclico, como ya se mencionó al principio [1, 55]. Esta ciclasa tiene como sustrato al ATP que es también uno de los sustratos de la PFK-1.

Además de esas acciones intracelulares de la adenosina, en algunas células, como los hepatocitos, se han descrito efectos de la adenosina sobre el metabolismo de los carbohidratos dependientes de los receptores de la membrana. Por ejemplo, en un estudio [56] se encontró que la adenosina promovía una disminución en la concentración de fructosa 2,6-bisfosfato (principal activador de la PFK-1) por lo que se esperaba no una estimulación de la glucólisis sino una inhibición, si bien los autores no llevan a cabo mediciones de la actividad glucolítica. En este caso, los cambios inducidos por la adenosina se correlacionaban con una disminución en los niveles de AMPc y, consecuentemente, la activación de la fructosa 2,6-bisfosfatasa. Sin embargo, la participación de un mecanismo similar (mediado por receptores para adenosina) aunque en sentido inverso, es decir, un aumento en la concentración de fructosa 2,6-bisfosfato promovido por la

adenosina, en el caso de los eritrocitos es poco probable ya que no se han descrito receptores para el nucleósido en sus membranas. Por otro lado, aunque en los eritrocitos se ha detectado la presencia de la enzima PFK-2 (responsable de la síntesis de fructosa 2,6-bisfosfato) [57] sólo bajo condiciones excepcionales su actividad sería lo suficientemente alta como para producir cantidades detectables de ese potente activador de la PFK-1 como lo han informado Sobrino y colaboradores [26].

De acuerdo con lo anterior, la adenosina podría ocupar un sitio entre los moduladores fisiológicos de la glucólisis puesto que a la concentración de $1 \mu\text{M}$ el nucleósido produce activación de la vía y de la enzima PFK-1. Se sabe además que existen variaciones diurnas en la concentración de este nucleósido de purina [13] y esas variaciones llegan a alcanzar la concentración de $1 \mu\text{M}$ o un poco más, por lo que podrían afectar la actividad glucolítica en algunas células, entre ellas los eritrocitos. Aún más, si el efecto activador de la adenosina no se circunscribe a los eritrocitos sino que es más general, se puede pensar en el posible efecto benéfico que se produciría en tejidos que bajo ciertas condiciones dependieran energéticamente de la glucólisis; tal es el caso del miocardio isquémico en el que además se sabe que la hipoxia y la isquemia promueven un aumento en la liberación de adenosina [28-29], lo que a su vez produce una vasodilatación coronaria que mejoraría el flujo sanguíneo local.

En la sección 4.2 se discuten los resultados de experimentos realizados como un primer paso en la valoración de esa última posibilidad.

Se requieren más estudios para precisar el verdadero papel de la adenosina en la regulación del metabolismo energético dependiente de los carbohidratos en células de mayor complejidad como los hepatocitos o los cardiomiocitos. Quedan también por estudiar los detalles de la interacción de la adenosina con la PFK-1 y sus posibles interacciones directas con otras proteínas, por ejemplo, la enzima PFK-2.

4.2. CORAZON

La abundante información existente permite atribuirle a la adenosina un papel importante en la regulación del funcionamiento del aparato cardiovascular. Su efecto vascular más conocido es la vasodilatación; sobre el músculo cardíaco mismo, la adenosina ejerce efectos dromotrópico, cronotrópico e inotrópico negativos.

Por otro lado, los cambios en la concentración de adenosina en el miocardio durante la isquemia transitoria que ocurre normalmente durante la sístole ventricular y durante la isquemia patológica, como la que conduce al infarto agudo del miocardio, junto con el conocimiento de que la adenosina es un precursor de la síntesis de ATP, han conducido a formular la

pregunta de qué papel juega el nucleósido en el daño isquémico al miocardio.

En base a los efectos cardiovasculares conocidos de la adenosina se ha sugerido que ésta podría limitar el daño celular producido por la hipoxia y la isquemia dada su capacidad para producir vasodilatación coronaria y disminución de la fuerza de contracción. Como se mencionó en la introducción, el primer mecanismo mejoraría el riego sanguíneo coronario, en tanto que el segundo disminuiría la demanda miocárdica de oxígeno. Desde el punto de vista bioquímico, la pérdida de nucleótidos (en forma de adenosina y sus derivados) productos de la degradación del ATP podría limitarse agregando adenosina exógena. Ciertamente todos estos mecanismos podrían contribuir a limitar el daño celular pero en este trabajo se sugiere además otro mecanismo que consiste en la capacidad de la adenosina para activar a la glucólisis (véase la sección anterior) que en el caso de las células miocárdicas en ausencia de oxígeno es, como ya se sabe, la única vía metabólica capaz de producir ATP. Una activación de la glucólisis junto con los otros efectos que produce el nucleósido daría a éste un papel importante en la limitación del daño celular posthipóxico. Los resultados de este trabajo muestran que la recuperación de la función contráctil (medida como $\frac{1}{2}$ del dP/dt inicial) después de un periodo de hipoxia se conserva mejor (98%) cuando está presente adenosina exógena durante el periodo de hipoxia, que cuando el

nucleósido no se adicionó (78%). Por otra parte, en condiciones de adecuada oxigenación, la adenosina induce un aumento en la producción de lactato, lo que podría indicar una activación de la vía glucolítica. Sin embargo, en condiciones de hipoxia ese efecto de la adenosina no se observa; al contrario, bajo estas condiciones el nucleósido bloquea parcialmente el aumento en la producción de lactato asociado a la hipoxia. Aún así, la recuperación de la contractilidad fue favorecida por el nucleósido. El bloqueo parcial del aumento en la producción de lactato podría deberse a la disminución de la fuerza de contracción inducida por el nucleósido, tanto el liberado endógenamente en respuesta a la hipoxia como el que se agregó exógenamente. Este último factor (fuerza de contracción) es uno de los que determinan el requerimiento energético del miocardio como se estudió en la sección 1.3 (contractilidad). En todo caso, esta disminución del lactato en el líquido efluente durante la hipoxia en presencia de adenosina, no parece depender de una acumulación tisular de este metabolito ya que la relación PIR/LAC desciende al mismo nivel que en la hipoxia sola. No obstante, no puede descartarse que haya un pequeño cambio en la permeabilidad no sólo para el lactato sino también para el piruvato, de manera tal que se detectan menores concentraciones de ellos en el efluente (Figs. 10 y 11). Hay que decir que semejante retención de metabolitos sería dañina para el miocardio al disminuir el pH intracelular.

En resumen, no queda suficientemente claro que la adenosina estimule la glucólisis durante la hipoxia cardiaca, pero sí que ayuda a conservar en buenas condiciones la función contráctil del corazón. Es posible que estudios más finos que la simple medición de la producción de lactato y piruvato muestren algún efecto de la adenosina sobre la glucólisis. Este asunto merece atención dado que el efecto benéfico de la adenosina observado en este trabajo necesariamente debe resultar de cambios metabólicos conducentes a mejores condiciones energéticas y que, con los experimentos realizados no se detectaron con claridad.

Se puede hablar además de la participación de la adenosina desde otros puntos de vista. Por ejemplo, se ha propuesto que durante la isquemia prolongada el catabolismo de los nucleótidos de adenina, particularmente del ATP, avanza hasta la formación de adenosina la cual difunde hacia el intersticio y luego abandona el corazón al restablecerse el flujo normal con lo que se pierde una cantidad importante de este precursor del ATP [35]. De acuerdo con lo anterior, el daño ocurre por una incapacidad del miocardio para restablecer sus condiciones energéticas normales debido a un déficit del nucleósido precursor. Si este fuera el caso, la adición de adenosina al medio de perfusión de un corazón durante una intervención quirúrgica proveería el nucleósido faltante. Recuérdese para comprender lo anterior que las cirugías de corazón abierto (trasplantes, plastia

de válvulas, etc.) necesariamente involucran un periodo de isquemia. De hecho, una buena parte de las complicaciones postoperatorias en estos casos están relacionadas con esa isquemia transitoria.

Otra idea dice que un aumento en la concentración del ión calcio originado por la isquemia, induce una transformación estructural en la enzima xantina oxidasa que al actuar sobre los productos de degradación del ATP, como la adenosina que luego se transforma en xantina, promueve la formación de radicales libres derivados del oxígeno [37]. Algunos autores inclusive han tratado de demostrar que el uso de atrapadores o dispersadores de los radicales libres derivados del oxígeno (como las enzimas superóxido dismutasa y catalasa) disminuyen el daño celular isquémico en el miocardio [38]. Así, en la primera de las explicaciones mencionadas (déficit de adenosina), la adición de adenosina exógena sería benéfica para el miocardio isquémico, en tanto que en la segunda (RLO) sería cierto lo contrario. A pesar de todo, la adenosina ha mostrado ser de utilidad para la preservación de órganos como el riñón para un futuro trasplante [58], lo cual parece indicar que el papel del nucleósido como fuente de radicales libres no es de primera importancia.

5. CONCLUSIONES

En conclusión, los resultados de este trabajo indican que la adenosina, a concentración fisiológica, puede modificar el metabolismo energético celular. En los eritrocitos de la rata el nucleósido estimula la actividad de la vía glucolítica al parecer por una activación de la enzima PFK-1. En el corazón aislado de cobayo en hipoxia (cuando la glucólisis es la única vía capaz de funcionar) el nucleósido más bien inhibe la actividad glucolítica, lo cual se asocia con una mejor recuperación de la función contráctil cuando se restablece la oxigenación normal. No está claro cómo es que ocurre esto último, pero el efecto fisiológico es benéfico, por lo que se puede pensar en la adenosina como un componente de las soluciones (cardiopléjicas) que se utilizan para preservar el tejido miocárdico. Los efectos de la adenosina sobre el metabolismo energético en los sistemas estudiados parecen desviar el balance oferta/demanda en favor de la oferta. Finalmente, los resultados indican que la adenosina puede tener un efecto sobre la permeabilidad membranal al lactato y, posiblemente, al piruvato [59].

6. BIBLIOGRAFIA

1. Londos, C., Wolff, J. y Cooper, D. M. F. (1983) Adenosine receptors and adenylate cyclase interactions, en R. M. Berne, T. W. Rall y R. Rubio (eds.): Regulatory Function of Adenosine. Martinus Nijhoff Publishers, The Hague/Boston/London. pp. 17-32.
2. Olsson, R. A. (1983) Adenosine receptors on vascular smooth muscle, en R. M. Berne, T. W. Rall y R. Rubio (eds.): Regulatory Function of Adenosine. Martinus Nijhoff Publishers, The Hague/Boston/London. pp. 33-47.
3. Stiles, G. L. (1986) Adenosine receptors: structure, function and regulation. TIPS 7, 486-490.
4. Stiles, G. L. (1990) Adenosine receptors and beyond: Molecular mechanisms of physiological regulation. Clin. Res. 38, 10-18.
5. Williams, M. (1990) Adenosine receptors: An historical perspective, en M. Williams (ed.): Adenosine and Adenosine Receptors. The Humana Press, Clifton (New Jersey). pp. 1-15.
6. Cooper, D. M. F. y Caldwell, K. K. (1990) Signal transduction mechanism for adenosine, en M. Williams (ed.): Adenosine and Adenosine Receptors. The Humana Press, Clifton (New Jersey). pp. 105-141.
7. García-Sáinz, J. A. y Torner, M. L. (1985) Rat fat-cells have three types of adenosine receptors (R_a, R_i and P). Biochemical. J. 232, 439-443.
8. Legrand, A. B., Narayanan, T. K., Ryan, U. S., Aronstam, R. S. y Catravas, J. D. (1989) Modulation of adenylate cyclase activity in cultured bovine pulmonary arterial endothelial cells. Biochem. Pharmacol. 38, 423-430.
9. Martínez-Valdez, H., Madrid-Marina, V. y Piña, E. (1982) In vivo effect of adenosine on adenine nucleotides and inorganic phosphate in rat blood. Life Sci. 30, 191-197.
10. Henderson, J. F., Zombor, G., Burrige, P. W., Barankiewicz, G. y Smith, C. M. (1979) Relationships among purine nucleoside metabolism, adenosine triphosphate catabolism, and glycolysis in human erythrocytes. Can. J. Biochem. 57, 873-878.
11. Seider, M. J. y Kim, H. D. (1979) Cow red blood cells. I. Effect of purines, pyrimidines, and nucleosides in bovine red cell glycolysis. Am. J. Physiol. 236, C255-C261.

12. Seider, M. J. y Kim, H. D. (1979) Cow red blood cells. II. Stimulation of bovine red cell glycolysis by plasma. *Am. J. Physiol.* 236, C262-C267.
13. Chagoya de Sánchez, V., Hernández-Muñoz, R., Díaz-Muñoz, M., Villalobos, R., Glender, W., Vidrio, S., Suárez, J. y Yáñez, L. (1983) Circadian variations of adenosine level in blood and liver and its possible physiological significance. *Life Sci.* 33, 1057-1064.
14. Belloni, F. L., Rubio, R. y Berne, R. M. (1984) Intracellular adenosine in isolated rat liver cells. *Pflügers Arch* 400, 106-108.
15. Churchill, P. C. y Bidani, A. K. (1990) Adenosine and renal function, en M. Williams (ed.): *Adenosine and Adenosine Receptors*. The Humana Press, Clifton (New Jersey). pp. 335-380.
16. Fox, I. H. (1983) Clinical expression of block of purine nucleotide degradation, en R. M. Berne, T. W. Rall y R. Rubio (eds.): *Regulatory Function of Adenosine*. Martinus Nijhoff Publishers, The Hague/Boston/London. pp. 235-247.
17. Belardinelli, L., West, A., Ceampton, R. y Berne, R. M. (1983) Chronotropic and dromotropic effects of adenosine, en R. M. Berne, T. W. Rall y R. Rubio (eds.): *Regulatory Function of Adenosine*. Martinus Nijhoff Publishers, The Hague/Boston/London. pp. 377-398.
18. Rapoport, T. A., Heinrich, R. y Rapoport, S. M. (1976) The regulatory principles of glycolysis in erythrocytes *in vivo* and *in vitro*. *Biochem. J.* 154, 449-469.
19. Moreno Sánchez, R. (1985) Teoría de control metabólico. *Mensaje Bioquímico* 8, 97-143.
20. Uyeda, K (1978) Phosphofructokinase. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 48, 193-244.
21. Kühn, B., Jacobasch, G., Gerth, C. y Rapoport, S. M. (1974) Kinetic properties of the phosphofructokinase from erythrocytes of rats and rabbits. 1. The influence of potassium and ammonium ions and of inorganic phosphate. *Eur. J. Biochem.* 43, 437-442.
22. Kühn, B., Jacobasch, G., Gerth, C. y Rapoport, S. M. (1974) Kinetic properties of the phosphofructokinase from erythrocytes of rats and rabbits. 2. The influence of effectors under nearly cellular conditions. *Eur. J. Biochem.* 43, 443-450.

23. Otto, M., Heinrich, R., Kühn, B. y Jacobasch, G. (1974) A mathematical model for the influence of fructose 6-phosphate, ATP, potassium, ammonium and magnesium on the phosphofructokinase from rat erythrocytes. *Eur. J. Biochem.* 49, 169-178.
24. Hue, L. y Rider, M. H. (1987) Role of fructose 2,6-bisphosphate in the control of glycolysis in mammalian tissues. *Biochem J.* 245, 313-324.
25. Lederer, B. y Hers, H. G. (1984) On the mechanism by which noradrenaline increases the activity of phosphofructokinase in isolated rat adipocytes. *Biochem. J.* 217, 709-714.
26. Sobrino, F., Rider, M. H., Gualberto, A. y Hue, L. (1987) Fructose 2,6-bisphosphate in rat erythrocytes. Inhibition of fructose 2,6-bisphosphate synthesis and measurement by glycerate 2,3-bisphosphate. *Biochem. J.* 244, 235-238.
27. Mullane, K. M. y Williams, M. (1990) Adenosine and cardiovascular function, en M. Williams (ed.): *Adenosine and Adenosine Receptors*. The Humana Press, Clifton (New Jersey). pp. 289-333.
28. Berne, R. M., Winn, H. R., Knabb, R. M., Ely, S. W. y Rubio, R. (1983) Blood flow regulation by adenosine in heart, brain, and skeletal muscle, en R. M. Berne, T. W. Rall y R. Rubio (eds.): *Regulatory Function of Adenosine*. Martinus Nijhoff Publishers, The Hague/Boston/London. pp. 293-317.
29. Schrader, J. (1983) Metabolism of adenosine and sites of production in the heart, en R. M. Berne, T. W. Rall y R. Rubio (eds.): *Regulatory Function of Adenosine*. Martinus Nijhoff Publishers, The Hague/Boston/London. pp. 133-156.
30. Schlant, R. C. (1978) Metabolism of the heart, en Hurst, J. W., Logue, R. B., Schlant, R. C. y Wenger, N. K. (eds.) *The heart, arteries and veins*. McGraw-Hill, New York. pp. 107-118.
31. Vary, T. C., Reibel, D. K. y Neely, J. R. (1981) Control of energy metabolism of heart muscle. *Ann. Rev. Physiol.* 43, 419-430.
32. De Leiris, J. Harding, D. P. y Pestre, S. (1984) The isolated perfused rat heart: a model for studying myocardial hypoxia or ischaemia. *Basic Res. Cardiol.* 79, 313-321.
33. Piper, H. M. y Das, A. (1986) The role of fatty acids in ischemic tissue injury: difference between oleic and palmitic acid. *Basic Res. Cardiol.* 81, 373-383.

34. Neely, J. R. y Grotyohann, L. W. (1984) Role of glycolytic products in damage to ischemic myocardium. Dissociation of adenosine triphosphate levels and recovery of function of reperfused ischemic hearts. *Circ. Res.* 55, 816-824.
35. Pasque, M. K. y Wechsler, A. S. (1984) Metabolic intervention to affect myocardial recovery following ischemia. *Ann. Surg.* 200, 1-12.
36. Halliwell, B. y Gutteridge, J. M. C. (1989) Free radicals in biology and medicine. Clarendon Press, Oxford. pp. 438-447.
37. Shlafer, M., Kane, P. F., Wiggins, V. Y. y Kirsh, M. M. (1982) Possible role for cytotoxic oxygen metabolites in the pathogenesis of cardiac ischemic injury. *Circulation* 66 (Suppl 1), 85-92.
38. Shlafer, M., Kane, P. F. y Kirsh, M. M. (1982) Superoxide dismutase plus catalase enhances the efficacy of hypothermic cardioplegia to protect the globally ischemic, reperfused heart. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 83, 830-839.
39. Simpson, P. J., Fantone, J. C. y Lucchesi, B. R. (1988) Myocardial ischemia and reperfusion injury: oxygen radicals and the role of the neutrophil, en B. Halliwell (ed.) *Oxygen radicals and tissue injury*. The Upjohn Company/FASEB, Maryland. pp. 63-77.
40. Bergmeyer, H. U., Bernt, E., Schmidt, F. y Stock, H. (1974) D-Glucose. Determination with hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase, en H. U. Bergmeyer (ed.): *Methods of Enzymatic Analysis*. Academic Press, New York. pp. 1196-1201.
41. Lang, G. y Michal, G. (1974) D-Glucose-6-phosphate and D-fructose-6-phosphate, en H. U. Bergmeyer (ed.): *Methods of Enzymatic Analysis*. Academic Press, New York. pp. 1238-1242.
42. Michal, G. y Beutler, H. O. (1974) D-Fructose-1,6-diphosphate, dihydroxyacetone phosphate and D-glyceraldehyde-3-phosphate, en H. U. Bergmeyer (ed.): *Methods of Enzymatic Analysis*. Academic Press, New York. pp. 1314-1319.
43. Czok, R. (1974) D-Glycerate-3-phosphate, en H. U. Bergmeyer (ed.): *Methods of Enzymatic Analysis*. Academic Press, New York. pp. 1424-1428.
44. Krinsky, I. (1964) D-2,3-Diphosphoglycerate, en H. U. Bergmeyer (ed.): *Methods of Enzymatic Analysis*. Academic Press, New York. pp. 238-240.

45. Czok, R. y Lamprecht, W. (1974) Pyruvate, phosphoenolpyruvate and D-glycerate-2-phosphate, en H. U. Bergmeyer (ed.): Methods of Enzymatic Analysis. Academic Press, New York. pp. 1446-1451.
46. Gutmann, I. y Wahlefeld, W. A. (1974) L-(+)-Lactate. Determination with lactate dehydrogenase and NAD, en H. U. Bergmeyer (ed.): Methods of Enzymatic Analysis. Academic Press, New York. pp. 1464-1468.
47. Henderson, J. F., Brox, L., Zombor, G., Hunting, D. y Lomax, C. A. (1977) Specificity of adenosine deaminase inhibitors. Biochem Pharmacol. 26, 1967-1972.
48. Achterberg, P. W., Stroeve, R. J. y De Jong, J. W. (1986) Myocardial adenosine cycling rates during normoxia and under conditions of stimulated purine release. Biochem. J. 235, 13-17.
49. Layzer, R. (1975) Phosphofructokinase from human erythrocytes, en W. A. Wood (ed.) Carbohydrate metabolism. Methods in Enzymology Vol XLII. Academic Press, New York. pp 110-115.
50. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248-254.
51. Atkins, L. (1973) A simple digital-computer program for estimating the parameters of the Hill equation. Eur. J. Biochem. 33, 175-180.
52. Wilkinson, G. N. (1961) Statistical estimation in enzyme kinetics. Biochem. J. 80, 324-332.
53. Hillman, R. C. y Finch, C. A. (1987) El eritrocito. El Manual Moderno, México, D. F. p. 14.
54. Lagunas, R. y Gancedo, C. (1983) Role of phosphate in the regulation of the Pasteur effect in *Saccharomyces cerevisiae*. Eur. J. Biochem. 137, 479-483.
55. Minocherhomjee, A. M., Selfe, S., Flowers, N. J. y Storm, D. R. (1987) Direct interaction between the catalytic subunit of the calmodulin-sensitive adenylate cyclase from bovine brain with ¹²⁵I-labeled wheat germ agglutinin and ¹²⁵I-labeled calmodulin. Biochemistry 26, 4444-4448.
56. Bartrons, R., Van Schaftingen, E. y Hers, H. G. (1984) The ability of adenosine to decrease the concentration of fructose 2,6-bisphosphate in isolated hepatocytes. A cyclic AMP-mediated effect. Biochem. J. 218, 157-163.

57. Heylen, A., Van Schaftingen, E. y Hers, H. G. (1982) The stimulation of phosphofructokinase from human erythrocytes by fructose 2,6-bisphosphate. FEBS Letters 143, 141-143.

58. Southard, J. H., Rice, M. J. y Belzer, F. O. (1985) Preservation of renal function by adenosine-stimulated ATP synthesis in hypothermally perfused dog kidneys. Cryobiology 22, 237-242.

59. Gutiérrez-Juárez, R., Castrejón-Sosa, M., Blancas-Torres, P. G., Martínez-Valdez, H., Píña, E. y Madrid-Marina, V. (1991) Activating effect of adenosine on rat erythrocyte glycolysis. Int. J. Biochem. (en prensa).

7. APENDICE

La mayor parte de los resultados de los experimentos *in vivo* e *in vitro* en eritrocitos y sangre total y de la enzima PFK-1 han sido aceptados para publicación en la revista International Journal of Biochemistry. Los autores y el título de ese trabajo son como sigue:

GUTIERREZ-JUAREZ, R., Castrejón-Sosa, M., Blancas-Torres, P. G., Martínez-Valdez, H., Piña, E. y Madrid-Marina, V. (1991) Activating effect of adenosine on rat erythrocyte glycolysis.

En la página siguiente se reproduce la carta de aceptación dirigida a uno de los coautores (V. M. M.) de ese trabajo.



Dr. V. Madrid-Marina
Dept de Bioquimica
Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autonoma de Mexico
Apartado Postal 70-159
Mexico DF 04510
M E X I C O

26 May 1991

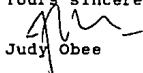
Dear Dr Madrid-Marina

"Activating effect of adenosine on rat erythrocyte glycolysis"

I have the referees report on your paper.
They recommend that it should be accepted for publication.
It will be sent to Press this week.
Papers are usually published seven months from the receipt of the
manuscript.
The page proofs are sent out five months from receipt of
the manuscript.

In any future correspondence concerning this manuscript
PLEASE QUOTE REFERENCE NUMBER IJB 326.

Yours sincerely



Judy Obee

pp Gerald Kerkut