

Efecto de algunos derivados fisiológicos de la adenina sobre la secreción de ácido en glándulas gástricas aisladas de conejo*

L. F. Ainz**, C. E. Gil-Rodrigo, R. Gómez, M. Malillos, D. Requejo y J. M. Gandarias

Departamento de Fisiología
Facultad de Medicina y Odontología
Universidad del País Vasco (UPV-EHU)
48080 Bilbao (España)

(Recibido el 5 de enero de 1989)

L. F. AINZ, C. E. GIL-RODRIGO, R. GOMEZ, M. MALILLOS, D. REQUEJO and J. M. GANDARIAS. *Effect of Some Physiological Adenine Derivatives on Acid Secretion in Isolated Rabbit Gastric Glands*. Rev. esp. Fisiol., 45 (3), 281-286, 1989.

The physiological adenine derivatives, adenosine (ADO), adenosine 5'-monophosphate (AMP), adenosine 5'-diphosphate (ADP) and adenosine 5'-triphosphate (ATP) at concentrations ranging from 10 μ M to 1 mM caused concentration-related modifications on gastric H⁺ secretion, as measured by the aminopyrine accumulation method, in resting and histamine-stimulated rabbit gastric glands. In resting glands, ADO caused significant concentration-related increases of the basal H⁺ secretion, whereas no changes were obtained in response to the other purines tested. In histamine-stimulated glands, ADO and AMP caused concentration-related potentiation of the histamine-raised H⁺ secretory rate, while ATP and ADP induced graded inhibition. The results suggest the involvement of purinergic mechanisms in the physiological regulation of the gastric acid secretory process.

Key words: Purinergic mechanisms, Acid secretion, Rabbit gastric glands.

Existe una amplia base experimental en apoyo del importante papel desempeñado por la histamina, la acetilcolina y la gastrina en la regulación fisiológica de la secreción gástrica de ácido (20). Además de estos tres agentes, se han descrito otras sustancias que influyen notablemente sobre dicho proceso y se ha propuesto su participación como posibles moduladores

fisiológicos de la función gastrosecretora (20). En este sentido y en base a estudios realizados en preparaciones de estómago íntegro aislado de rata, GANDARIAS *et al.* (8, 9) han propuesto que los nucleósidos y nucleótidos de purina, compuestos que ejercen potentes acciones extracelulares en una variada gama de sistemas fisiológicos (4), participan en el control de la secreción gástrica de ácido. La información disponible acerca del efecto de las purinas sobre la secreción gástrica de ácido resulta escasa y contradictoria. Algunos estudios recien-

* Trabajo subvencionado en parte por el Departamento de Salud del Gobierno Vasco.

** A quien debe dirigirse la correspondencia.

tes realizados en su mayor parte con preparaciones *in vivo* o supraepiteliales, refieren resultados diversos; así por ejemplo, se ha descrito que la adenosina y sus análogos provocan inhibición (10-12, 22), estimulación que desaparece por vagotomía o empleando atropina (16), inhibición y estimulación dependiendo de la presencia o no de bloqueantes adrenérgicos y colinérgicos (8) o de la concentración (13) y, finalmente, también se ha descrito que carecen de efecto sobre la secreción gástrica de ácido (17). Algo similar parece ocurrir con el ATP y sus análogos estructurales (8, 13, 14, 21).

El objeto del presente trabajo ha sido estudiar el efecto producido por los derivados fisiológicos de la adenina: ADO*, AMP, ADP y ATP sobre la secreción de ácido en una preparación subepitelial, glándulas gástricas aisladas de conejo, en la que la ausencia de la mayor parte de los mecanismos neurohumorales, presentes *in vivo* o en preparaciones supraepiteliales, evita los inconvenientes de la variedad de efectos referidos en los trabajos antes citados. Puesto que en este tipo de preparación subepitelial las variaciones en la secreción de ácido no se pueden medir directamente, los cambios en la secreción se han evaluado indirectamente utilizando el método de la acumulación de la base débil (¹⁴C)-aminopirina (19).

Material y Métodos

Se han empleado conejos de raza «New Zealand», machos y hembras de 2,5 a 4 kg. Los animales se mantuvieron en condiciones ambientales adecuadas y con acceso libre a comida y bebida hasta el comienzo del experimento. Una vez sacrificado el animal mediante dislocación cer-

vical se procedía a la perfusión del estómago siguiendo la técnica descrita por BERGLINDH y OBRINK (2). Las soluciones tamponadas para la perfusión del estómago, la disgregación de las glándulas y la posterior incubación (medio respiratorio), así como el procedimiento general de experimentación, se llevaron a cabo de acuerdo con la descripción de SACK y SPENNEY (19). Las tasas de acumulación de AP correspondientes a los niveles de secreción de ácido obtenidos en cada caso, se evaluaron en forma de relación entre AP atrapada en el interior de las glándulas y AP remanente en el medio respiratorio (Rap), es decir $Rap = AP \text{ intraglandular} / AP \text{ medio}$, para lo cual se aplicó la expresión (19):

$$Rap = \text{pellet cpm} / (2 \mu\text{l/mg}) \cdot (\text{mg peso seco}) \cdot (\text{medio cpm/ml})$$

Con el fin de normalizar los valores de secreción de H⁺, la respuesta secretora o Rap se expresa como cociente respecto de la secreción basal o lo que es lo mismo, en forma de tanto por uno respecto de la basal:

$$CRap = Rap (\text{agente}) / Rap (\text{basal})$$

La viabilidad de las glándulas se comprobaba mediante tinción con azul de tripan y observación al microscopio antes y después de la incubación, obteniéndose rendimientos superiores al 90 %. Además del control microscópico se realizaba un control funcional de modo que en todos los lotes experimentales de glándulas obtenidas de animales diferentes se procedía a examinar la capacidad de respuesta secretora mediante elaboración de curvas concentración-respuesta al secretagogo histamina (1 μM a 100 μM), desechándose las preparaciones glandulares que no respondieron a la histamina. Todos los experimentos se realizaron por triplicado, el promedio de los tres valores obtenidos con cada muestra en un experimento fue considerado como dato único. Los resultados indican, por tanto, la media ± e.s.m. de un número de datos (n) que se

* Abreviaturas: Adenosina (ADO); adenosina 5'-monofosfato (AMP); adenosina 5'-difosfato (ADP); adenosina 5'-trifosfato (ATP) y (¹⁴C)-aminopirina (AP).

corresponde con el número de animales diferentes utilizados. El tratamiento estadístico de los datos se verificó empleando el parámetro *t* de Student para datos no apareados.

Los agentes utilizados han sido: histamina, adenosina, adenosina 5'-monofosfato, adenosina 5'-difosfato y adenosina 5'-trifosfato, de Merck.

Resultados

Los valores promedio de la relación de acumulación de AP (Rap) obtenidos en las condiciones experimentales del presente trabajo fueron: $30,47 \pm 1,84$ para glándulas basales (control de la secreción basal, $n = 80$) y $54,31 \pm 3,69$; $81,84 \pm 5,24$; $108,23 \pm 7,19$ y $119,92 \pm 7,17$ para glándulas estimuladas con histamina (control de la secreción estimulada, $n = 80$) en concentraciones de 1, 3, 10 y 100 μM , respectivamente. Por su parte, los valores

medios normalizados (CRap) de secreción obtenidos con esa secuencia de concentraciones de histamina fueron: $1,77 \pm 0,05$; $2,69 \pm 0,10$; $3,57 \pm 0,15$ y $4,18 \pm 0,18$ (para cada valor, $n = 80$).

En los ensayos realizados sobre secreción basal en glándulas no estimuladas, se probaron las cuatro purinas ADO, AMP, ADP y ATP en concentraciones idénticas desde 10 μM hasta 100 μM . En esta situación, la ADO provocó un incremento considerable de la secreción basal de H⁺ (fig. 1a). Las respuestas secretoras guardaban relación con la concentración de ADO, siendo significativas ($p < 0,05$) a todas las concentraciones estudiadas. Estos resultados indican que la ADO despliega una notable actividad secretagoga en glándulas gástricas; la concentración intermedia 100 μM alcanzó cotas próximas al 40 % de la inducida por una concentración equivalente 100 μM (la máxima empleada) de histamina. El resto de las purinas ensayadas no modificó signifi-

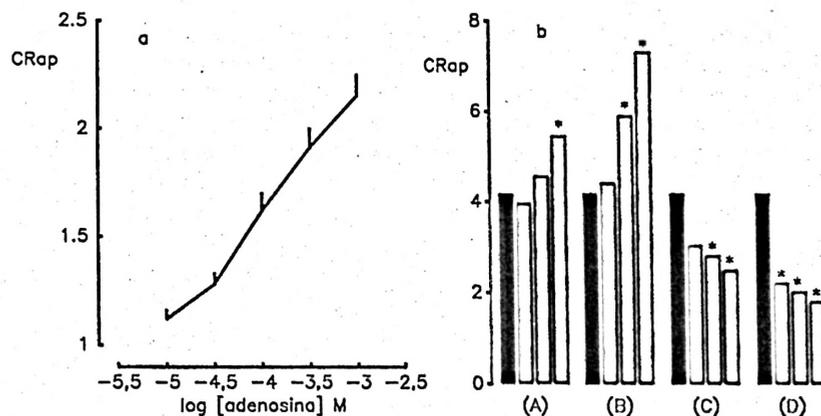


Fig. 1. Efecto de la Adenosina (ADO), Adenosina 5'-monofosfato (AMP), Adenosina 5'-difosfato (ADP) y Adenosina 5'-trifosfato (ATP) sobre la secreción de H⁺ en glándulas gástricas aisladas de conejo. a) Glándulas no estimuladas, acción de la ADO (10 μM a 1 mM) sobre la secreción basal de ácido. Cada punto es la media para $n = 23$. Las barras verticales muestran los errores estándar. b) Glándulas estimuladas con histamina 100 μM (■, control). Los grupos de columnas señalados con las letras (A), (B), (C) y (D) muestran los efectos producidos por AMP (10 μM , 100 μM y 1 mM), ADO (10 μM , 30 μM y 100 μM), ADP (10 μM , 100 μM y 1 mM) y ATP (10 μM , 100 μM y 1 mM), respectivamente. La altura de las columnas es la media de al menos cuatro experimentos. * $p < 0,05$, respecto al control histamina.

cativamente la tasa de secreción basal de ácido.

En glándulas estimuladas con histamina 100 μM , la ADO (10 μM a 100 μM) y el AMP (10 μM a 1 mM) provocaron incrementos hasta niveles significativos de la tasa de secreción de H^+ elevada por histamina, en contrapartida el ATP (10 μM a 1 mM) y el ADP (10 μM a 1 mM) indujeron efectos opuestos a los de la ADO y el ADP descendiendo significativamente la secreción de H^+ estimulada por histamina. El efecto estimulador de la ADO fue más potente que el del AMP y el efecto inhibitor del ATP resultó más potente que el del ADP (fig. 1b).

Discusión

Los resultados aquí presentados apoyan la propuesta de que las purinas ensayadas despliegan importantes efectos sobre la secreción de H^+ en glándulas gástricas aisladas de conejo (9). De las actividades observadas, cabe considerar dos grupos: uno, integrado por ADO y AMP, que promueve estimulación de la secreción de ácido, y otro, constituido por ATP y ADP, que promueve inhibición, siendo el orden de potencia en cada caso $\text{ADO} > \text{AMP}$ y $\text{ATP} > \text{ADP}$.

Los resultados obtenidos con la ADO y el AMP no concuerdan con algunos resultados contradictorios referidos en estudios con preparaciones *in vivo* o supraepiteliales. En ellos se ha descrito que la ADO o sus análogos inhiben (10, 12, 22), estimulan por vía vagal (16), inhiben y estimulan según ciertas condiciones experimentales (8, 13) o no afectan (17) la secreción gástrica de ácido. Esta disparidad de resultados parece explicable en base a las notables diferencias experimentales existentes. Sin embargo, nuestros resultados también están en desacuerdo con los obtenidos por otros utilizando el método de acumulación de AP y preparaciones subepiteliales (11, 17), en donde se ha en-

contrado que la ADO inhibe la secreción de H^+ en perros (11), no la modifica en ratas (17) y la estimula en conejos (el presente trabajo), según esto, parece que el efecto de la ADO sobre la secreción de ácido depende de la especie animal empleada.

En cuanto a los resultados obtenidos con ATP y ADP, concuerdan con los referidos en mucosa gástrica de rana (14, 21), pero no con los descritos en algunas preparaciones supraepiteliales de mamíferos en las que se ha indicado un moderado efecto estimulador (8) y ausencia de efecto (13), para el ATP. La influencia del ATP sobre la secreción de ácido en glándulas gástricas aisladas ha sido objeto de estudio por otros autores, pero desde un punto de vista metabólico (1), donde las glándulas eran sometidas a un tratamiento permeabilizante con objeto de facilitar la incorporación del ATP al interior de las glándulas. Como era de esperar, bajo esas condiciones el ATP eleva la secreción de H^+ , probablemente activando la H^+/K^+ ATPasa.

A pesar de estas diferencias y de acuerdo con nuestros resultados, parece clara la participación de mecanismos purinérgicos en el control de la secreción gástrica de ácido. Se ha propuesto (3) la existencia de dos tipos principales de receptores purinérgicos: purinoceptores P_1 y P_2 . Según BURNSTOCK (3) la ADO y AMP actúan con mayor potencia sobre purinoceptores P_1 (orden de potencia $\text{ADO} > \text{AMP}$), mientras que el ATP y ADP son más potentes sobre purinoceptores P_2 (orden de potencia $\text{ATP} > \text{ADP}$). Estudios posteriores han permitido establecer una nueva subdivisión de los purinoceptores en los subtipos R_i o A_1 y R_a o A_2 para el purinoceptor P_1 y en los subtipos P_{2x} y P_{2y} para el purinoceptor P_2 (5, 25).

Como puede apreciarse, nuestros resultados se ajustan al criterio general sobre mecanismos purinérgicos postulado por BURNSTOCK (3, 4).

Los purinoceptores P_1 parecen estar co-

nectados con el sistema de la adenilato ciclasa de modo que la ocupación de éstos conduce a la inhibición a través del subtipo Ri/A₁ o a la estimulación a través del subtipo Ra/A₂ de la adenilato ciclasa con el consiguiente descenso o aumento del nivel intracelular de AMP cíclico (4, 25). En este sentido, se ha descrito la existencia de correlación entre aumento del nivel de AMPc en tejido gástrico y estimulación de la secreción de H⁺ en respuesta a la histamina y algún otro secretagogo (6, 7, 15, 18). Por otro lado, los purinoceptores P₂ parecen relacionados con la producción de prostaglandinas, sustancias que despliegan efectos inhibidores sobre la secreción gástrica de ácido (23, 24). Estas consideraciones están siendo objeto de estudio en nuestro laboratorio mediante experimentos con inhibidores selectivos, metilxantinas, de purinoceptores P₁ y con indometacina, conocido inhibidor de la síntesis de prostaglandinas. Los resultados preliminares muestran que las metilxantinas ensayadas reducen significativamente las respuestas secretoras de la ADO, mientras que la indometacina reduce significativamente el efecto inhibidor del ATP sobre la secreción de H⁺ (observaciones no publicadas). Estos datos preliminares apoyan los resultados aquí descritos y sugieren la intervención de purinoceptores P₁, probablemente subtipo Ra/A₂, en el efecto de la ADO y sus derivados y de los purinoceptores P₂ en el efecto inhibidor del ATP y sus derivados.

Los resultados obtenidos apoyan la idea de que las purinas participan activamente en la regulación fisiológica del proceso de secreción gástrica de ácido y sugieren que los cambios en la secreción de H⁺ en respuesta a la ADO, AMP, ADP y ATP son mediados por purinoceptores presentes en las glándulas gástricas.

Resumen

La adenosina (ADO), adenosina 5'-monofosfato (AMP), adenosina 5'-difosfato (ADP) y adenosina

5'-trifosfato (ATP), a concentraciones entre 10 μM y 1 mM inducen modificaciones concentración-dependientes sobre la secreción de H⁺, medida por el método de acumulación de aminopirina, en glándulas gástricas aisladas de conejo. En glándulas basales la ADO causa incrementos significativos y concentración-dependientes de la secreción basal de H⁺, el resto de las purinas ensayadas no la modifica. En glándulas estimuladas con histamina la ADO, y en menor proporción el AMP, provoca potenciación concentración-dependiente de la tasa de secreción de H⁺ elevada por la histamina. El ATP, y en menor cuantía el ADP, induce una inhibición progresiva a medida que se aumenta la concentración. Estos resultados sugieren la participación de mecanismos purinérgicos en la regulación fisiológica del proceso de secreción gástrica de ácido.

Palabras clave: Mecanismos purinérgicos, Secreción ácida, Glándulas gástricas de conejo.

Bibliografía

1. Berglinth, T. H.: *Ann. Rev. Physiol.*, 46, 377-392, 1984.
2. Berglinth T. H. y Obrink, K. J.: *Acta Physiol. Scand.*, 96, 150-159, 1976.
3. Burnstock, G.: En «Cell Membrane Receptors for Drugs and Hormones» (Straub, R. W. y Bolis, L., eds.). Raven Press, Nueva York, 1978, pp. 107-118.
4. Burnstock, G. y Buckley, N. J.: En «Methods in Pharmacology» (Paton, D. M., ed.). Plenum Publ. Corp., Londres, 1985. Vol. 6, pp. 193-212.
5. Burnstock, G. y Kennedy, C.: *Gen. Pharmac.*, 16, 433-440, 1985.
6. Chew, C. S., Hersey, S. J., Sachs, G. y Berglinth, T.: *Am. J. Physiol.*, 238, G312-G320, 1980.
7. Forte, J. G., Machen, T. E. y Obrink, K. J.: *Ann. Rev. Physiol.*, 42, 111-126, 1980.
8. Gandarias, J. M., Ainz, L. F., Gil-Rodrigo, C. E., Goiriena, J. J., Gómez, R. y Martínez, I.: *Rev. esp. Fisiol.*, 41, 83-88, 1985.
9. Gandarias, J. M., Ainz, L. F., Gil-Rodrigo, C. E., Martínez, I. y Goiriena, J. J.: VII Reunión Nal. Asoc. Esp. Farmacól., Salamanca 1982 (Resumen), pp. 196.
10. Gerber, J. G., Fadul, S., Payne, N. A. y NIES, A. S. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 231, 109-113, 1984.

11. Gerber, J. G., Nies, A. S. y Ann Payne, N.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 233, 623-627, 1985.
12. Glavin, G. B. Westerberg, V. S. y Geiger, J. D.: *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 65, 1182-1185, 1987.
13. Heldsinger, A. A., Vinik, A. I. y Fox, I. H.: *J. Pharmacol. Exp. Ther. D.*, 237, 351-356, 1986.
14. Kidder, G. W.: *Am. J. Physiol.*, 221, 421-426, 1971.
15. Mardh, S., Song, Y. H., Carlsson, C. y Bjorkman, T.: *Acta Physiol. Scand.*, 131, 589-598, 1987.
16. Puurunen, J., Aittakumpu, R. y Tanskanen, T.: *Acta Pharmacol. Toxicol.*, 58, 265-271, 1986.
17. Puurunen, J., Ruoff, H. J. y Schwabe, U.: *Pharmacol. Toxicol.*, 60, 315-317, 1987.
18. Sachs, G. y Berglindh, T.: En «Physiology of the Gastrointestinal Tract» (Johnson, L. R., ed.). Raven Press, Nueva York, 1981, pp. 567-602.
19. Sack, J. y Spenney, J. G.: *Am. J. Physiol.*, 243, G313-G319, 1982.
20. Sanders, M. J. y Soll, A. H.: *Ann. Rev. Physiol.*, 48, 89-101, 1986.
21. Sanders, S. S., Butler, C. F., O'Callaghan, J. y Rehm, W. S.: *Am. J. Physiol.*, 230, 1688-1694, 1976.
22. Scarpignato, C., Tramacere, R., Zappia, L. y Del Soldato, P.: *Pharmacology*, 34, 264-268, 1987.
23. Soll, A. H.: *J. Clin. Invest.*, 65, 1222-1229, 1980.
24. Soll, A. H. y Walsh, J. H.: *Ann. Rev. Physiol.*, 41, 35-53, 1979.
25. Williams, M.: *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 27, 315-345, 1987.