

Universidad Nacional Autónoma de México
FACULTAD DE QUIMICA



T E S I S

MODULACION TIROCIDEA DE LA RESPUESTA
HEPATICA A DIFERENTES AGENTES HORMONALES

S U S T E N T A N T E
SOLEDAD MARIA TERESA HERNANDEZ SOTOMAYOR

C A R R E R A
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

A Ñ O
1 9 8 3



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

I. Introducción	1
II. Materiales y Métodos	14
III. Resultados	20
IV. Discusión	37
V. Bibliografía	41

I. INTRODUCCION

1. GENERALIDADES

1.1 Hormonas y su importancia.

Una hormona es un mensajero químico, producido por una glándula, que va a ser transportada por el torrente sanguíneo hacia el sitio de acción o célula blanco.

Las hormonas junto con el sistema nervioso central son los responsables de la integración de los procesos que permiten el funcionamiento normal de los mamíferos. Por consiguiente la síntesis, secreción, efectos fisiológicos, mecanismo de acción y destino metabólico de las hormonas son temas significativos para el conocimiento de los fenómenos reguladores y de control del metabolismo intermediario.

1.2 Tipos de hormonas de acuerdo a su sitio de acción celular.

Podemos dividir a las hormonas arbitrariamente de acuerdo a su sitio de acción celular en:

- a) aquellas que tienen la capacidad de entrar a la célula como las hormonas sexuales y los glucocorticoides y,
- b) las que actúan a nivel de la membrana plasmática como las catecolaminas y las hormonas peptídicas.

En general, las hormonas que son permeables a la membrana plasmática ejercen su acción en un período de tiempo largo (horas-días), y tienen receptores en el citosol o a nivel del núcleo y su efecto lo ejercen alterando la expresión del genoma, modificándose así la síntesis de proteínas, (fig.I.1).

Algunas de estas hormonas, como las hormonas tiroideas y los glucocorticoides además de sus propios efectos tienen la capacidad de alterar la respuesta celular a ciertas hormonas del segundo grupo (efecto llamado permisivo).

El segundo grupo de hormonas actúan más rápidamente, (en cuestión de segundos) y su mecanismo de acción lo ejercen uniéndose a receptores específicos localizados en la cara externa de la membrana plasmática, el complejo hormona-receptor está acoplado a un sistema transductor también localizado en la membrana plasmática, que promueve la señal a través de la generación o liberación de otra sustancia efectora o segundo mensajero intracelular que actúa alterando la velocidad de rutas enzimáticas ya establecidas, (fig. I.1).

El efecto permisivo de las hormonas de acción larga puede realizarse al modificar el número de receptores en la membrana, la afinidad de la hormona por su receptor, el mecanismo de acoplamiento entre el complejo hormona-receptor y el sistema transductor o la acción directa del segundo mensajero.

1.3 Mecanismos de acción de hormonas que actúan en la membrana plasmática.

Se conocen dos mecanismos generales de transducción hormonal: uno bien caracterizado a través del sistema adenilato ciclasa utilizando 3', 5'-monofosfato cíclico de adenosina (AMP_c) como segundo mensajero y otro recién postulado que actúa provocando un recambio en la membrana de la

poza de fosfatidilinositol (PI), una entrada de Ca^{2+} extracelular y movilización de los depósitos de Ca^{2+} intracelular.

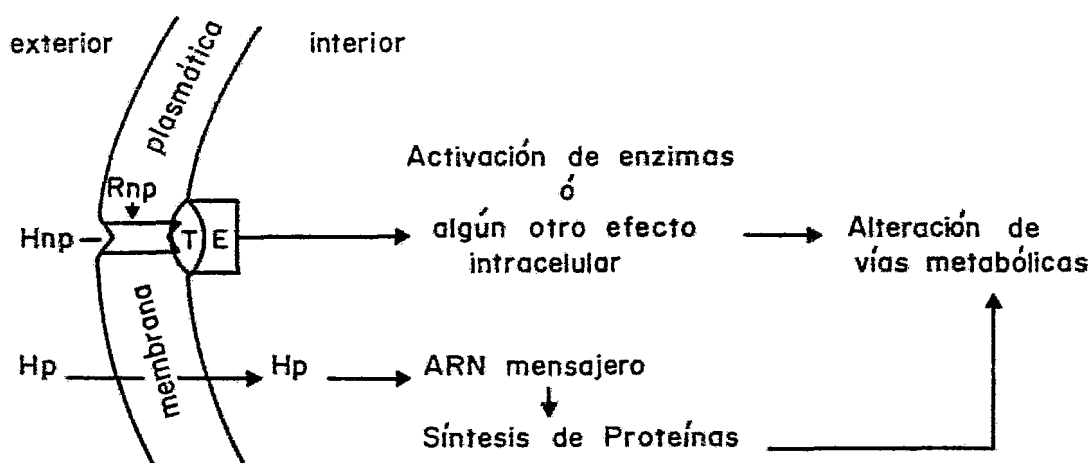


Fig. I.1 SITIOS DE ACCION HORMONAL. Hormona permeable (Hp), Hormona no permeable (Hnp), Receptor específico para Hnp (Rnp), Sistema transductor (T), Sistema efector (E).

1.3.1 Sistema AMP cíclico.

En este sistema la interacción hormona receptor provoca la estimulación o inhibición de la adenilato ciclasa, enzima que se encarga de la conversión de ATP en AMPc en el interior de la célula (1), (fig. I.2).

Sin embargo, por estudios recientes (2,3) se sabe que dichos receptores y la adenilato ciclasa forman parte de un complejo integrado también por una proteína capaz de activar o inhibir a la adenilato ciclasa y que contiene un sitio de unión a GTP, por consiguiente aunque no en todos los casos, la respuesta inmediata a la interacción hormona-receptor se inicia con la formación de un complejo oligomérico que controla la actividad de la unidad

catalítica de la adenilato ciclasa, (fig. I.2).

Las modificaciones en los niveles de AMPc son detectados (por ley de acción de masas) por una serie de enzimas llamadas proteín cinasas (PK), (4). Estas PK estan formadas por dos tipos de subunidades, unas de reconocimiento del AMPc o reguladoras y otras con actividad catalítica. Al elevarse los niveles de AMPc las subunidades reguladoras se asocian con este nucleótido cíclico liberándose las subunidades catalíticas, las cuales se activan por este proceso y desencadenan una cascada de fosforilaciones de enzimas reguladoras que resultan en cambios tales como estimulación de la glucogenolisis (activación de la fosforilasa) o inhibición de la glucogénesis (inhibición de la glucógeno sintetasa). Al disminuir los niveles de AMPc el nucleótido cíclico se disocia de las subunidades catalíticas deteniéndose el proceso. Las enzimas reguladoras vuelven a su actividad basal al ser atacadas por fosfatasas específicas.

1.3.2 Sistema PI-Ca²⁺.

En este sistema se cree que el recambio de fosfatidilinositol en la membrana plasmática la vuelve permeable a la entrada de Ca²⁺ extracelular, y que además provoca un movimiento de Ca²⁺ intracelular hacia el citosol provocando respuestas celulares como la activación de la fosforilasa b quinasa dependiente de Ca²⁺ (5,6), y de otras proteín cinasas dependientes de Ca²⁺ resultando los efectos fisiológicos provocados por la hormona, (fig. I.2).

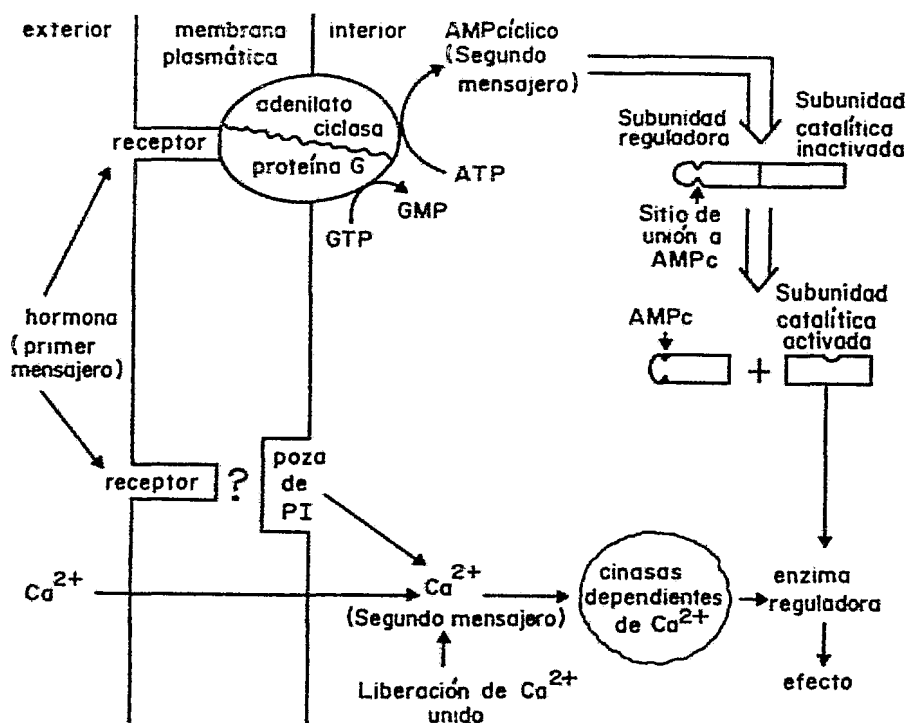


FIG. 1.2. MECANISMOS DE ACCIÓN DE HORMONAS QUE ACTÚAN EN LA MEMBRANA PLASMÁTICA.

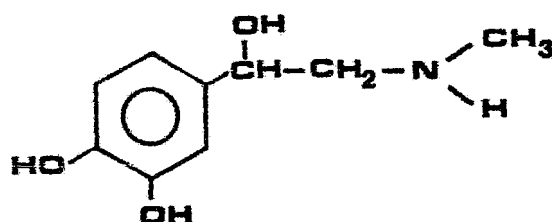
En el presente trabajo se estudiará el efecto que el estado tiroideo tiene sobre la capacidad de la célula hepática de responder a una serie de hormonas, que actúan por diferentes mecanismos de acción, para evaluar así la respuesta general de la célula.

Antes de profundizar en el problema de modulación tiroidea se mencionará brevemente las propiedades generales de las hormonas a estudiar.

2. HORMONAS ESPECÍFICAS A ESTUDIAR.

2.1 Epinefrina.

La epinefrina es secretada por la médula suprarrenal, las células cromafines y las fibras simpáticas posganglionares. Estructuralmente pertenece al grupo de las catecolaminas, está formada por el grupo catecol y una cadena alifática, la etil, metil, amina, que tiene en la posición β un grupo hidróxilo.



EPINEFRINA

Se sabe que la epinefrina es agonista de los cuatro tipos de receptores adrenérgicos conocidos hasta la fecha α_1 , α_2 , β_1 y β_2 . Los receptores β parecen ser isorreceptores, ya que ambos (β_1 y β_2) actúan activando a la adenilato ciclasa, incrementando por consiguiente los niveles intracelulares de AMPc. En cambio los subtipos de receptores α adrenérgicos actúan de diferente manera: el α_2 inhibe a la adenilato ciclasa disminuyendo los niveles de AMPc y el α_1 parece estar asociado al sistema Ca^{2+} -PI, (7).

En general los receptores α producen vasoconstricción, y los β vasodilatación y aumento de la frecuencia cardiaca. La epinefrina parece ser la hormona de las grandes urgencias que además de los efectos cardia-

cos estimula el metabolismo y el riego sanguíneo para los músculos esqueléticos.

La principal acción de esta hormona en hígado es la regulación del metabolismo de carbohidratos, estimulando la gluconeogénesis y la glucogenólisis e inhibiendo la glucogénesis, aunque también actúa sobre otras vías metabólicas como la ureogénesis. Los efectos anteriores se pueden deber a la interacción de los receptores α_1 , β_1 y β_2 adrenérgicos, dependiendo este efecto de la especie, edad, tejido, etc. En hígado de rata la activación de las anteriores vías metabólicas se efectúa a través de receptores α_1 adrenérgicos (8, 9, 10).

2.2 Glucagon.

El glucagon es una hormona producida por las células α de los islotes de Langerhans del páncreas; químicamente es un polipéptido de una sola cadena de 29 aminoácidos con peso molecular de 3500.

Esta hormona tiene receptores específicos en la membrana plasmática que actúan a través del sistema adenilato ciclasa, incrementándose los niveles intracelulares de AMPc. Sin embargo, evidencias recientes sugieren que no solo el AMPc interviene en el mecanismo de transducción de la hormona sino que pueden existir otros factores, aún desconocidos, que también tengan una función importante en este sistema, (11).

El glucagon actúa principalmente en hígado y tejido adiposo, encargándose de incrementar la glucosa y los ácidos grasos en sangre; acelera la

glucogenolisis, la gluconeogénesis y la ureogénesis hepáticas (12) y la lipólisis en tejido adiposo.

2.3 Vasopresina u hormona antidiurética.

Es un octapéptido producido por las células nerviosas de los núcleos supraóptico y paraventricular del hipotálamo, luego se transporta a la neurohipófisis donde se almacena para ser excretada.

Se han sugerido dos tipos de receptores para esta hormona, uno (V_2) que actúa por una estimulación de la adenilato ciclasa (13) y otro (V_1) a través del sistema Ca^{2+} -PI, (5,6,14).

El efecto fisiológico más importante de esta hormona se ejerce sobre riñón actuando como antidiurético al acelerar la velocidad de reabsorción de agua (12).

En hígado de rata tiene la capacidad de regular el metabolismo hepático, estimulando procesos como la gluconeogénesis, la glucogenolisis y la ureogénesis, efectos que son mediados a través del tipo de receptores V_1 , y que son estrictamente dependientes de Ca^{2+} extracelular, (15,16,17).

2.4 Angiotensina II.

Angiotensina II es un octapéptido con actividad presora cuya síntesis es un proceso complejo que depende de una sustancia secretada por los riñones: la renina, la cual tiene actividad enzimática sobre el polipéptido angiotensinógeno que se secreta por el hígado. La renina corta un decapeptido

llamado angiotensina I el cual no exhibe actividad presora, sin embargo el plasma contiene una enzima, la angiotensinasa que libera un dipéptido His-Leu de la terminación carboxílica de angiotensina I dando lugar al octapéptido angiotensina II, (12).

Angiotensina II puede actuar a través de dos tipos de receptores, uno asociado a la adenilato ciclasa de manera inhibitoria (11, 18) y otro al sistema Ca^{2+} -PI, (11, 15, 16).

Además de su efecto presor que es el más importante, angiotensina II también actúa directamente en la glándula suprarrenal estimulando la secreción de aldosterona (12).

Entre los efectos metabólicos que puede tener en hígado se encuentra la capacidad de estimular la gluconeogénesis, la glucogenolisis y la ureogénesis. Su acción al igual que la de vasopresina depende de una concentración límite de Ca^{2+} extracelular. Para ambas hormonas la dosis-respuesta a PI es independiente de iones Ca^{2+} , pero no así los efectos metabólicos, (6, 11, 19).

2.5 Hormonas Tiroideas.

La glándula tiroides secreta dos hormonas: 3-5-3'-triyodotironina (T_3) y tiroxina (T_4), T_3 y T_4 son sustancias yodadas derivadas del aminoácido L-tirosina, sus síntesis es una respuesta a las señales recibidas del hipotálamo, el cual sintetiza una hormona reguladora de la liberación de tirotrópina (TRH), que mediante la estimulación de la pituitaria anterior

libera tirotropina, que va a actuar en receptores específicos en las células de la glándula tiroidea incrementando la acumulación intracelular de AMPc para estimular la producción de las hormonas tiroideas, (20).

Uno de los mecanismos de acción de las hormonas tiroideas es controlar la expresión genética. Las hormonas entran a la célula y se unen a la cromatina para estimular la transcripción, incrementándose la síntesis de proteínas. Se han identificado para la unión de las hormonas dos tipos de receptores, uno que forma parte de la membrana mitocondrial y el segundo en el citosol, cada uno de estos sitios de acción tiene una función distinta para los efectos fisiológicos y metabólicos.

Las hormonas tiroideas provocan un aumento en la velocidad del metabolismo basal y en el consumo de oxígeno, consecuencia del incremento en la velocidad de varios sistemas enzimáticos. Este incremento probablemente se deba no a una acción directa de las hormonas sobre las enzimas, sino a la estimulación de la síntesis de las proteínas involucradas.

3. MODULACION TIROIDEA DE LA RESPUESTA HORMONAL HEPATICA.

3.1 Antecedentes.

Las hormonas tiroideas además de ser fundamentales para el crecimiento normal de los mamíferos y de tener una función muy importante en el metabolismo energético, tienen la capacidad de modular la respuesta de diversos tejidos a una gran variedad de hormonas; por ejemplo en corazón de rata el hipotiroidismo aumenta el componente α adrenérgico y disminuye el componente β adrenérgico de la acción de epinefrina. Kunos postula

que este efecto se debe a que las hormonas tiroideas producen una "interconversión" de los receptores α y β adrenérgicos en el miocardio (21).

En tejido adiposo de rata se incrementa la respuesta β a las catecolaminas durante el hipertiroidismo, mientras que en el hipotiroidismo hay una marcada reducción en la habilidad de las β catecolaminas de incrementar los niveles intracelulares de AMPc, Malbon *et al.* (22) sugieren que las hormonas tiroideas no alteran la actividad catalítica de la adenilato ciclasa ni el número o la afinidad de los receptores β en tejido adiposo, sino que el efecto lo ejercen regulando el mecanismo de acoplamiento entre los receptores β y la adenilato ciclasa, y que además no se afecta la respuesta α adrenérgica.

De la misma manera que en tejido adiposo de rata, en adipocitos aislados de hamster tampoco se ven alterados los efectos α_2 adrenérgicos, mientras que la respuesta β si sufre modificaciones (23). En este tipo de tejidos las hormonas tiroideas no provocan una interconversión de los receptores α y β adrenérgicos, sino que en todos los casos la respuesta β se ve alterada sin afectar la respuesta α_1 ó α_2 adrenérgica.

3.2 Respuesta hepática.

Por el contrario al patrón de respuesta seguido durante el estado tiroideo por tejido adiposo y corazón, en hígado de rata el hipotiroidismo provoca un aumento en la respuesta β adrenérgica.

Malbon *et al.* han estudiado la activación hormonal de la glucógeno

fosforilasa en hepatocitos aislados de rata hipotiroidea, encontrando que no se altera la habilidad de la fenilefrina (un α agonista), ni de la epinefrina para activar a la enzima, mientras que la activación por isoproterenol (un β agonista), se incrementa 100% respecto al control, (24). Sin embargo, Preiksaitis y Kunos observaron que el incremento en sensibilidad al isoproterenol se ve acompañado de una disminución en sensibilidad a los α agonistas postulando que los receptores α y β adrenérgicos sufren un recambio de manera recíproca, aumentando el número de receptores β y disminuyendo los del α , (25).

A pesar de los estudios referentes al efecto de las hormonas tiroideas en la modulación de la respuesta a otras hormonas, no se ha podido postular una teoría general que lo explique, ya que en algunos casos se explicaría como la variación en el número de receptores y en otros como la alteración del sistema de acoplamiento entre los receptores y la adenilato ciclasa. No obstante existe una clara evidencia de que cualesquiera que sean los factores involucrados, el efecto es específico para cada tejido.

3.3 Objetivos del trabajo.

a) Determinar el efecto de glucagon, epinefrina, angiotensina II y vasopresina en las siguientes vías metabólicas: glucogenolisis, gluconeogénesis y ureogénesis mediante curvas dosis-respuesta en hepatocitos aislados de ratas en los tres estados tiroideos (eu, hipo e hiper tiroidismo).

b) Determinar el tipo de receptor adrenérgico, efectuando curvas dosis-respuesta a epinefrina con y sin antagonistas de los receptores α_1 y β

adrenérgicos (prazosina y propranolol respectivamente), en las condiciones citadas en (a).

c) Evaluar el mecanismo de transducción de las hormonas determinando los niveles intracelulares de AMP cíclico y el recambio de fosfatidilinositol.

d) Evaluar la respuesta intracelular a los segundos mensajeros AMP cíclico y Ca^{2+} utilizando efectores como el dibutilil AMP cíclico (Bt_2AMP_c) y el ionóforo para Ca^{2+} A-23187.

II. MATERIALES Y METODOS

1. SUSTANCIAS

Las sustancias utilizadas se obtuvieron de los siguientes laboratorios: 1-epinefrina, 1-propranolol, 1-isoproterenol, Arg-vasopresina, angiotensina II (forma humana), dibutiril AMP cíclico, 1-lactato, ornitina, glutamina, ureasa, glucosa oxidasa, peroxidasa, 6-n-propil-2-tiouracilo y triyodotironina de Sigma Chem. Co. Prazosina y glucagon de Pfizer y Eli Lilly respectivamente. El ionóforo A-23187 de Calbiochem. La colagenasa y la seroalbúmina de bovino (fracción V) de Worthington y Reheis, respectivamente. [^3H] AMP cíclico y [^{32}P] Pi de New England Nuclear.

2. ANIMALES

Se usaron ratas hembras de la raza Wistar de aproximadamente 200 g, alimentadas ad libitum con alimento para ratas Purina. El hipotiroidismo se indujo dando de beber a ratas control agua con 0.015% de 6-n-propil-2-tiouracilo de 23 a 40 días y el hipertiroidismo por administración subcutánea de 50 μg de triyodotironina/dosis 48 y 24 horas antes de cada experimento.

3. AISLAMIENTO DE HEPATOCITOS. Método de Berry and Friend (26) modificado por Tolbert et al. (14).

Los animales fueron anestesiados por inhalación de cloroformo para abrir el abdomen y poder canular la vena porta. El hígado fue lavado con buffer Krebs-Ringer-bicarbonato sin Ca^{2+} (pH=7.4) y después se perfundió recirculando por 20 minutos 30 ml de buffer Krebs-Ringer-bi carbonato y

15 mg de colagenasa. Todo el procedimiento se realizó en un aparato de perfusión a 37°C y con gaseo constante con una mezcla 95% oxígeno/5%CO₂.

El hígado se transfirió a una caja petri de plástico con un poco de buffer Krebs-Ringer-bicarbonato y albúmina al 1%, las células se dispersaron cuidadosamente con la boca de un tubo pequeño de plástico. La suspensión de células se filtró con tela de nylon y se centrifugó tres veces por un minuto a baja velocidad en una centrífuga clínica, para lavar las células se utilizó el buffer con albúmina obteniéndose 40-50 mg de células/ml (peso húmedo) en cada preparación.

La viabilidad de las células se determinó utilizando colorante azul de trypano.

4. PARAMETROS METABOLICOS

Para los tres parámetros metabólicos se incubó 1 ml de suspensión de células con las sustancias ensayadas en atmósfera 95% oxígeno/5% CO₂ en tubos de plástico tapados a 37°C y con agitación constante por 60 minutos. La incubación se termina colocando la suspensión en agua helada. Para la determinación de glucosa o urea se centrifuga la suspensión por 1 minuto en la máxima velocidad en una centrífuga clínica y del sobrenadante se toma la muestra.

4.1 Glucogenolisis.

La incubación de las células se realiza en buffer Krebs-Ringer-bicar-

bonato y albúmina al 1%. Para determinar la degradación de glucógeno, las ratas se utilizaron alimentadas ad libitum y los experimentos se realizaron entre las 8 y las 10 de la mañana. Los niveles de glucógeno en rata control fueron 4.56 ± 0.2 mg de glucógeno/100 mg de hígado, en las ratas hipotiroideas se encontró un aumento de 19% respecto al control (5.41 ± 0.2 mg de glucógeno/100 mg de hígado, $p < 0.005$ vs comida control), en las ratas hipertiroideas hay un descenso del 92% (0.38 ± 0.07 mg de glucógeno/100 mg de hígado, $p < 0.001$ vs comida control) .

La glucogenolisis se detectó ensayando glucosa en el sobrenadante tomando previamente una muestra al tiempo cero de la incubación, valor que se resta de los valores de tiempo 60.

4.2 Gluconeogénesis.

Para determinar la gluconeogénesis, las células se incubaron en buffer Krebs-Ringer-bicarbonato enriquecido con l-lactato 10 mM como sustrato. La producción de glucosa que no fue a partir de este sustrato se midió utilizando un control sin lactato, y fue aproximadamente el 15% de la producción total, valor que se restó en cada caso de los valores obtenidos con l-lactato.

Los animales utilizados se ayunaron 24 horas antes del experimento para depletar la poza de glucógeno encontrando un descenso aproximadamente de 96% respecto a ratas control comidas (0.17 ± 0.02 y 0.15 ± 0.01 mg de glucógeno/100 mg de hígado, $p < 0.001$ vs comida control, rata control ayunada y rata hipotiroidea ayunada respectivamente).

Las ratas hipertiroideas a pesar de que tienen niveles de glucógeno muy bajos sin ayunar, también se ayunaron 24 horas antes del experimento para tener a todos los animales bajo las mismas condiciones.

4.3 Ureogénesis.

El medio de incubación Krebs-Ringer-bicarbonato, albúmina 1%, glucosa 10 mM, se suplementó con glutamina 10 mM y ornitina 2 mM como sustratos para la síntesis de urea.

Los animales fueron utilizados a cualquier hora del día alimentados ad libitum.

5. METODOS ANALITICOS

5.1 Determinación de glucosa. Método de Fales (27).

Tomar una alícuota del sobrenadante de 25 ó 50 μ l directos para gluconeogénesis y 25 ó 50 μ l diluidos 1:3 para gluco'genolisis.

Añadir 0.3 ml de reactivo glucosa-oxidasa (glucosa-oxidasa 2.7 U/ml, peroxidasa de rábano 5.2 U/ml, diclorhidrato de o-diansidina 0.78 mM en buffer glicerol-fosfatos pH = 7.0), agitar y esperar 1 hora, después de este tiempo desarrollar color agregando 2.7 ml de H_2SO_4 5 N y leer en el espectofotómetro a 540 nm.

Los resultados se interpolan en una curva patrón de glucosa ($b = 0.0012$, $m = 0.0029$, $r^2 = 1.0$) y se expresan en nmoles de glucosa/mg de células (peso húmedo). La curva patrón se realiza en cada experimento.

5.2 Determinación de urea. Método de Gutman y Bergmeyer (28).

Tomar una alícuota del sobrenadante de 50 μ l, añadir 100 μ l de ureasa (2 mg/ml en solución al 50% en glicerol) y 150 μ l de buffer de fosfatos pH = 7.5, agitar y tapar, incubar 20 minutos a 37°C. Desarrollar color agregando 5 ml de solución de fenol 0.106 M-nitroprusiato 0.17 mM y 5 ml de hipoclorito de sodio 11 mM, tapar, agitar y esperar 30 minutos, leer en el espectofotómetro a 575 nm.

Las lecturas de absorbancia se interpolan en una curva patrón de urea ($b = -0.003$, $m = 0.0036$, $r^2 = 0.99$) y se expresan en nmoles de urea/mg de células (peso húmedo). La curva patrón se realiza en cada experimento.

5.3 Acumulación de AMP cíclico. Método de Gilman (29).

Para la determinación de la acumulación de AMPc, las células fueron incubadas por dos minutos en presencia de las sustancias a estudiar y teofilina 100 μ M.

La incubación fue parada con 100 μ l de HCl 2N, hervidas por 1 minuto y después enfriadas y neutralizadas con 100 μ l de NaOH 2N.

Tomar una alícuota de 20 μ l del sobrenadante y añadir 10 μ l de $[^3H]$ AMP y 10 μ l de la proteína de unión, agitar y reposar en baño de hielo por 1 hora.

El AMPc libre se separó de acuerdo al método de Brown *et al.* (30), añadiendo a la muestra anterior 0.5 ml de solución de carbono activado-albúmina (2:1) en buffer de fosfatos pH = 6.0 frío, agitando y centrifugando por 5- 10 minutos a 5000 rpm.

Vaciar el sobrenadante en viales y añadir 5 ml de líquido de centelleo (31).

5.4 Marcaje de PI.

Para el estudio de la incorporación de $[^{32}\text{P}]$ Pi en el fosfatidilinositol, las células fueron incubadas con $10 \mu\text{Ci/ml}$ $[^{32}\text{P}]$ Pi y las sustancias a estudiar por 60 minutos.

Los lípidos del tejido hepático se separaron con una mezcla de cloroformo-metanol (2:1 v/v) usando como fase acuosa KH_2PO_4 100 mM, para la separación de los fosfolípidos se usó una cromatografía en capa-fina (32), después la sílica gel fue raspada y añadida a viales con 5 ml de líquido de centelleo (31).

6. METODOS ESTADISTICOS

Los resultados presentados son el promedio de 3-6 preparaciones de células \pm el error estándar, determinándose cada punto por duplicado en cada una de las preparaciones.

Para determinar si la diferencia entre los animales controles y los experimentales era estadísticamente significativa se usó la prueba t de Student.

III. RESULTADOS

Para confirmar el estado tiroideo en las ratas se determinaron los niveles de T_3 en suero*, encontrándose para las ratas control 62 ± 9 ng/dl, mientras que la administración de T_3 por 48 h provoca una elevación a 357 ± 38 ng/dl ($p < 0.001$ vs control), y en las ratas hipotiroideas se observa una disminución a 11 ± 6 ng/dl ($p < 0.001$ vs control).

Además de los niveles de T_3 en sangre, los diferentes estados tiroideos provocan cambios tanto en la viabilidad como en el número de células, los hepatocitos aislados de ratas hipertiroideas no presentan cambio en el número de células/mg (peso húmedo) ($6.3 \pm 0.50 \times 10^4$, $7.1 \pm 0.64 \times 10^4$, ratas eutiroides e hipertiroideas respectivamente), pero si en la viabilidad de las células (90-95% en ratas eutiroides, 60-70% en ratas hipertiroideas), probablemente debido al aumento en el requerimiento de oxígeno que se presenta durante el hipertiroidismo. Por el contrario los hepatocitos de rata hipotiroidea son mucho más resistentes (viabilidad $> 95\%$) aunque el tamaño disminuye con el consiguiente aumento en el número de células/mg (peso húmedo) ($1.28 \pm 0.19 \times 10^5$, $p < 0.005$ vs control).

Las curvas dosis-respuesta para la ureogénesis comparando los agonistas adrenérgicos epinefrina (α y β) e isoproterenol (β) se presentan en la fig 3.1, Corvera y García-Sáinz reportaron previamente que la estimulación de la ureogénesis por epinefrina en hepatocitos aislados de rata eutiroides es mediada a través de receptores α_1 adrenérgicos (25), sin embargo du-

* Trabajo realizado en el Dpto. de Endocrinología del Instituto Nal. de Cardiología con la ayuda de José Luis Boyer

rante el hipotiroidismo hay un aumento de la respuesta β adrenérgica sin modificación de la α_1 adrenérgica presente en el eutiroidismo.

En el estado hipertiroideo no hay estimulación por el agonista β y la respuesta a epinefrina no se ve modificada más que en sensibilidad puesto que la curva dosis-respuesta está recorrida un orden de magnitud a la derecha con respecto al eutiroidismo.

El estudio de los antagonismos (fig. 3.2) indica que la respuesta a epinefrina esta mediada tanto en el hiper como en el eutiroidismo a través de receptores α_1 adrenérgicos, ya que se puede observar que el efecto se bloquea con el antagonista α_1 adrenérgico prazosina, mientras que el propranolol (un antagonista β adrenérgico) no lo modifica, sin embargo en el hipotiroidismo ambos receptores tienen un papel importante en la producción de urea, ya que la respuesta no se bloquea totalmente por ninguno de los dos antagonistas. Propranolol disminuye la respuesta aproximadamente 25% y prazosina aproximadamente 40%, mientras que cuando se bloquean los dos tipos de receptores si hay un abatimiento de la estimulación.

Al estudiar el siguiente parámetro metabólico, la gluconeogénesis (fig. 3.3), se observaron prácticamente los mismos resultados que en la ureogénesis, en el hipotiroidismo isoproterenol tiene un efecto mayor que en el eutiroidismo e hipertiroidismo. En la fig. 3.4 se ve que el componente principal durante la estimulación de la gluconeogénesis en el hiper y eutiroidismo es el α_1 adrenérgico, aunque el β tiene cierto efecto. Sin embargo, en el

hipotiroidismo cuando se bloquea el componente α_1 adrenérgico y epinefrina actúa solo a través del receptor β la respuesta es considerablemente mayor que en los otros estados tiroideos.

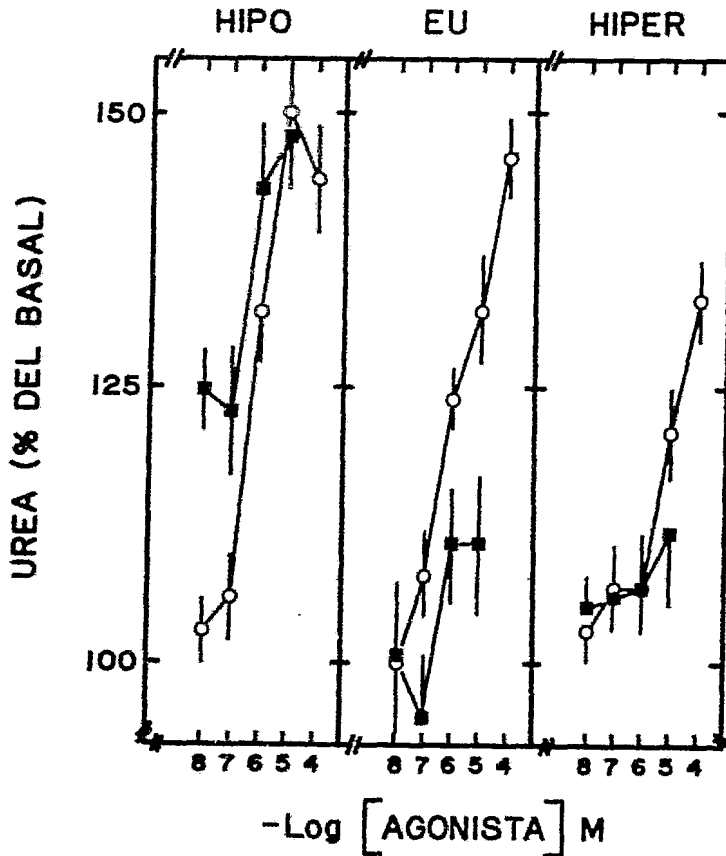


FIG. 3.1

CURVAS DOSIS-RESPUESTA PARA EL EFECTO DE EPI-NEFRINA (O—O) E ISOPROTERENOL (■—■) SOBRE LA SÍNTESIS DE UREA. Se usaron hepatocitos aislados de ratas hipotiroideas (HIPO), eutiroides (EU) e hipertiroides (HIPER). Los resultados se expresan como el porcentaje sobre el valor basal de la síntesis de urea, la cual fue 40 ± 4 , 32 ± 2 y 29 ± 4 nmol de urea/mg (peso húmedo) en células de ratas hipo, eu e hiper tiroideas respectivamente.

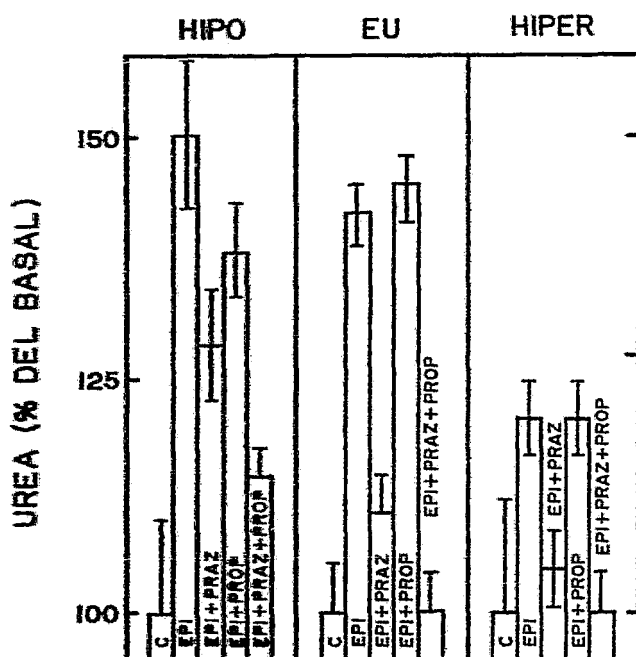


FIG. 3.2

EFFECTO DE LOS ANTAGONISTAS ADRENERGICOS SOBRE LA ESTIMULACION POR EPINEFRINA DE LA UROGENESIS. Se usaron hepatocitos aislados de ratas hipotiroideas (HIPO), eutiroides (EU) e hipertiroideas (HIPER). El efecto de la concentración máxima de epinefrina $10^{-5}M$ (EPI) se antagonizó con prazosina $10^{-5}M$ (PRAZ), propranolol $10^{-5}M$ (PROP) y con concentraciones iguales de ambos antagonistas. Los resultados se expresan como el porcentaje sobre los valores basales de la síntesis de urea presentados al pie de la fig. 3.1.

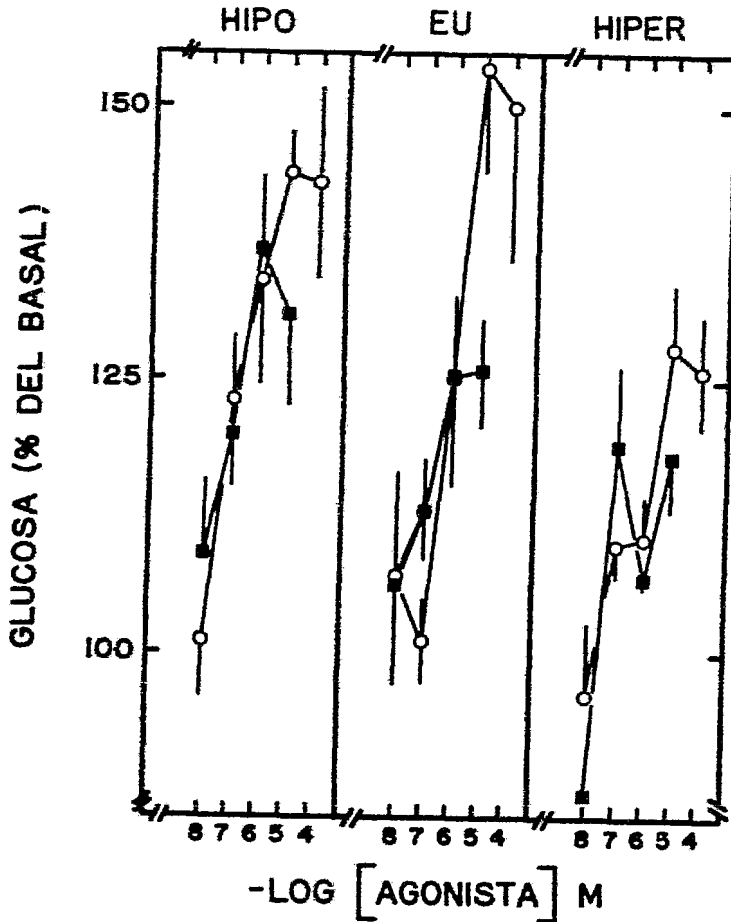


FIG. 3.3

CURVAS DOSIS-RESPUESTA PARA EL EFECTO DE EPI-NEFRINA (O-O) E ISOPROTERENOL (■-■) SOBRE LA GLUCONEOGENESIS. Se usaron hepatocitos aislados de ratas hipotiroideas (HIPO), eutiroides (EU) e hipertiroideas (HIPER). Los resultados se expresan como el porcentaje sobre los valores basales de la síntesis de glucosa a partir de lactato, los cuales fueron 29 ± 3 , 37 ± 5 , y 40 ± 4 nmoles de glucosa/mg (peso húmedo) en células de ratas hipo, eu e hipertiroideas respectivamente.

Las curvas dosis-respuesta a epinefrina e isoproterenol para la glucogenolisis se presentan en la fig. 3.5. Solo se puede observar efectos en hepatocitos de ratas hipo y eutiroides, ya que el valor basal de glucosa en hepatocitos de ratas hipertiroideas es muy pequeño ($7.0 \pm 2,67 \pm 9$ nmol glucosa/mg células (peso húmedo), ratas hiper y eutiroides respectivamente), y no se ve modificado por concentraciones máximas de sustancias como epinefrina, isoproterenol o glucagon. Para encontrar la causa de esta disminución en el valor basal de glucosa se determinaron los niveles de glucógeno en hígado, encontrándose en el hipertiroidismo un abatimiento del 92% en la poza de glucógeno respecto al control (0.38 ± 0.07 y 4.56 ± 0.10 mg/100 mg de hígado (peso húmedo) en ratas hipertiroideas y ratas control respectivamente). Además de que se ha reportado que el estado hipertiroideo está asociado con una disminución de la habilidad de los hepatocitos para responder a una variedad de hormonas glucogenolíticas, p. ejem. la activación de la glucógeno fosforilasa en respuesta a la estimulación por isoproterenol, fenilefrina, glucagon o epinefrina está disminuida en hepatocitos cuando se administra T_3 a ratas (33).

Al igual que en la gluconeogénesis, la degradación de glucógeno en el eutiroidismo se encuentra asociada además del componente α_1 adrenérgico que es el principal, al receptor β , (fig. 3.5), en la fig. 3.6, el estudio de los antagonismos demuestra que al bloquear el componente α_1 adrenérgico persiste una ligera respuesta a epinefrina, mayor que cuando se bloquean ambos receptores, sugiriendo estos datos que en el mismo tejido puede haber vías metabólicas que se regulen a través de una población heterogénea de receptores adrenérgicos, ya que unas vías son sensibles sólo a un tipo de receptor

(ureogénesis α_1), y otras pueden ser reguladas por ambos tipos de receptores siendo más sensibles a un tipo de ellos (gluconeogénesis y glucogenolisis α_1 y β).

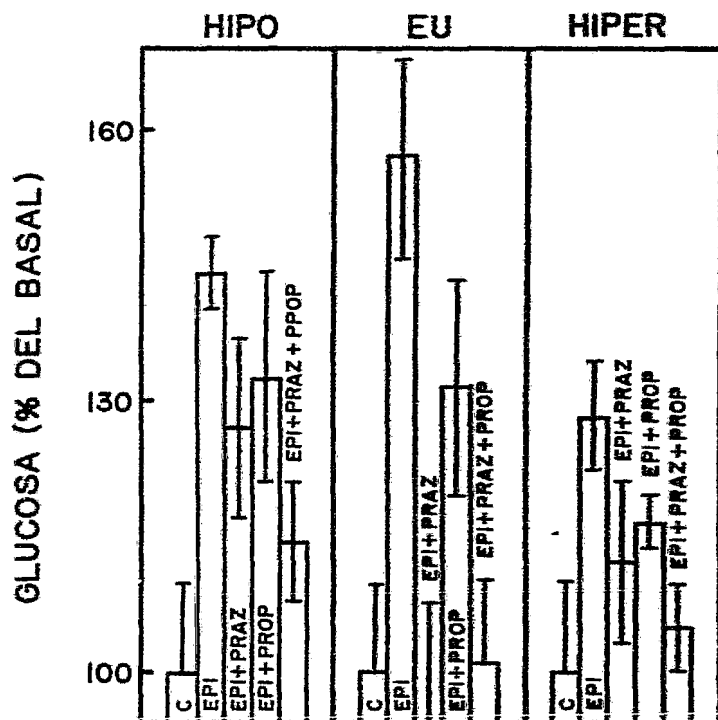


FIG. 3.4

EFECTO DE LOS ANTAGONISTAS ADRENERGICOS SOBRE LA ESTIMULACION DE LA GLUCONEOGENESIS POR EPI-NEFRINA. Se usaron hepatocitos aislados de ratas hipotiroides (HIPO), eutiroides (EU) e hipertiroideas (HIPER). Las indicaciones sobre la nomenclatura de las barras se dan en la leyenda de la fig. 3.2 y los valores basales de la síntesis de glucosa a partir de lactato en la leyenda de la fig. 3.3.

También se determinó en este parámetro el efecto del ionóforo para calcio A-23187 a concentración $10 \mu\text{M}$, para probar la respuesta intracelular a las señales del ion, encontrándose una estimulación en la producción de glucosa respecto a el valor basal de $170 \pm 10\%$ ($p < 0.001$ vs control) en el eutiroidismo, mientras que no tiene ningún efecto en el hipotiroidismo ($114 \pm 2\%$, diferencia no significativa), el ionóforo solo puede ser probado en la glucogenolisis, ya que inhibe tanto ureogénesis como gluconeogénesis.

Además del efecto del ionóforo A-23187, para valorar la respuesta de las células a hormonas que actúen a través de una movilización de Ca^{2+} se probaron los péptidos presores vasopresina y angiotensina II, las curvas dosis-respuesta se presentan en las figuras 3.7, 3.8 y 3.9 para ureogénesis, gluconeogénesis y glucogenolisis, encontrando que en los dos primeros durante el hipertiroidismo la respuesta a las dos hormonas se ve disminuida.

Durante el hipotiroidismo ni vasopresina ni angiotensina II provocan estimulación en ninguno de los tres parámetros (glucogenolisis, gluconeogénesis y ureogénesis), no obstante la curva dosis-respuesta del recambio de PI (fig. 3.10) para las dos hormonas así como para epinefrina no se modifica. Por consiguiente las células responden a vasopresina o angiotensina II hechando a andar el mecanismo de transducción, provocando el recambio de PI, pero no así para la respuesta metabólica intracelular. Es decir, estas células parecen ser refractarias a las señales por iones Ca^{2+} .

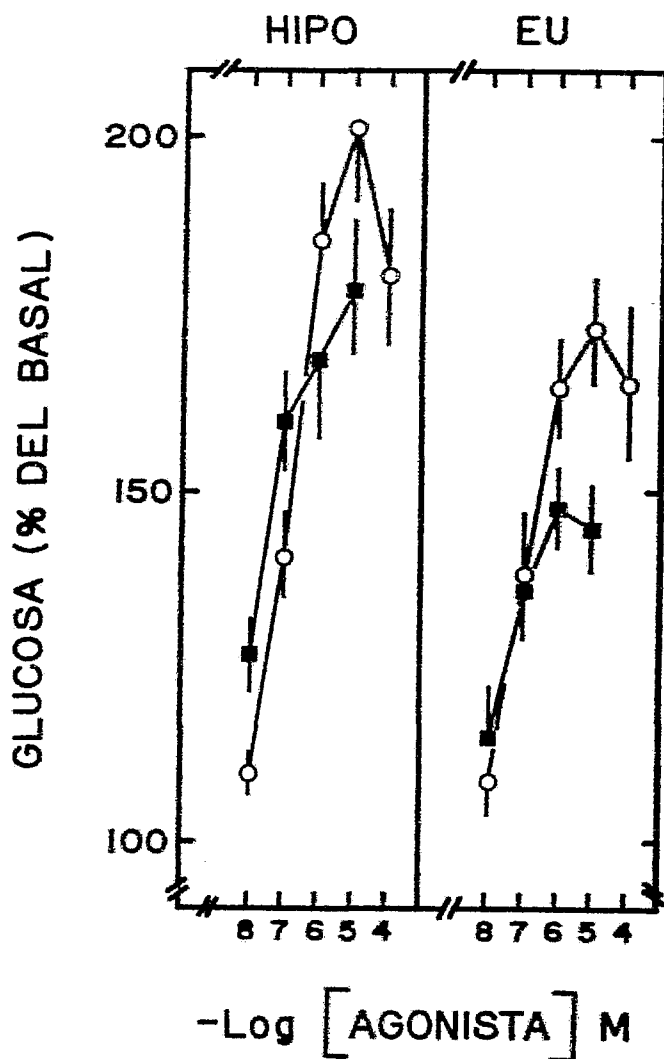


FIG. 3.5

CURVAS DOSIS-RESPUESTA PARA EL EFECTO DE EPINEFRINA (○—○) E ISOPROTERENOL (■—■) SOBRE LA GLUCOGENOLISIS. Se usaron hepatocitos aislados de ratas hipotiroideas (HIPO) y eutiroides (EU). Los resultados se expresan sobre el valor basal de la síntesis de glucosa las cuales son 57 ± 5 y 67 ± 9 nmol de glucosa/mg (peso húmedo) en células de ratas hipo y eutiroides respectivamente.

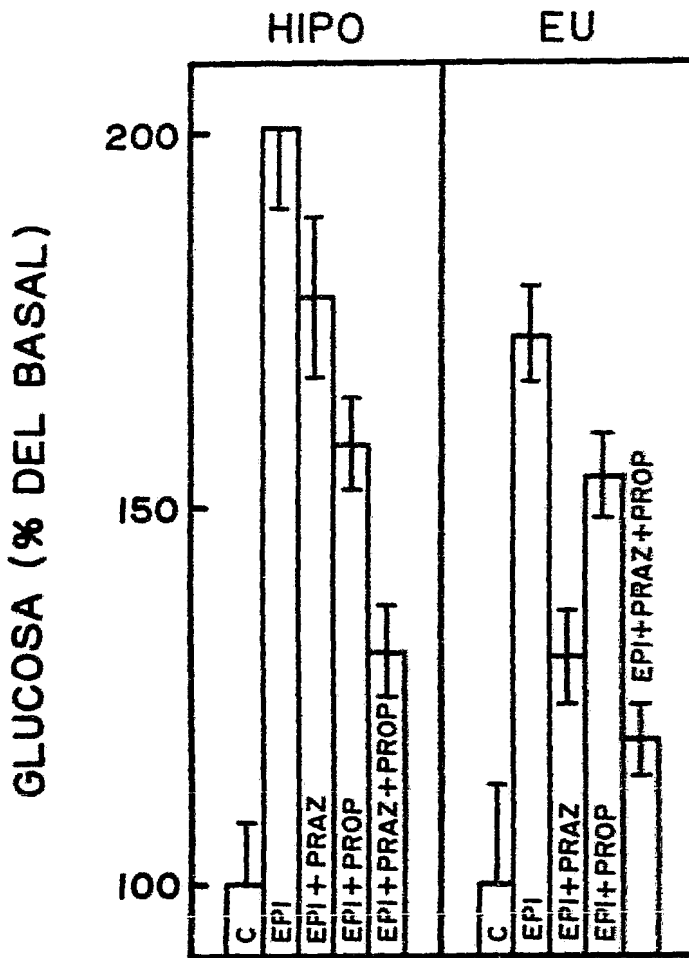


FIG. 3.6

EFEECTO DE LOS ANTAGONISTAS ADRENERGICOS SOBRE LA ESTIMULACION DE LA GLUCOGENOLISIS POR EPINEFRINA. Se usaron hepatocitos aislados de ratas hipotiroides (HIPO) y eutiroides (EU). Las indicaciones sobre la nomenclatura de las barras se dan en la leyenda de la fig. 3.2 y los valores basales de la síntesis de glucosa en la leyenda de la fig. 3.5.

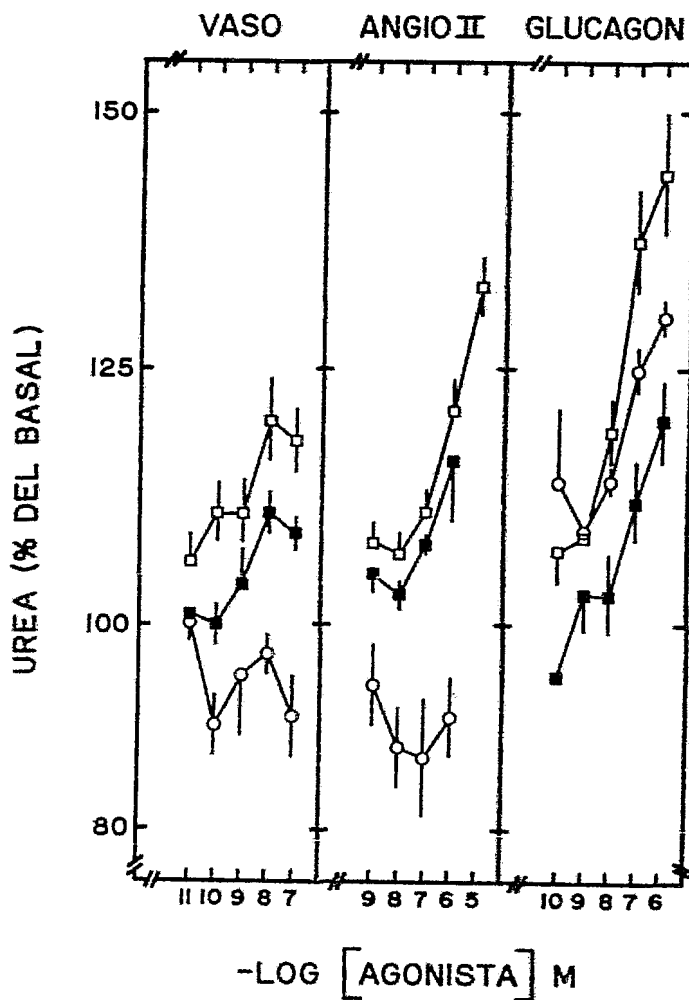


FIG. 3.7

CURVAS DOSIS-RESPUESTA PARA EL EFECTO DE VASOPRESINA (VASO), ANGIOTENSINA II (ANGIO II) Y GLUCAGON SOBRE LA UREOGENESIS. Se usaron hepatocitos aislados de ratas hipotiroideas (O-O), eutiroideas (□-□) e hipertiroideas (■-■). Los resultados se expresan como el porcentaje sobre los valores basales de la síntesis de urea presentados en la leyenda de la fig. 3.1.

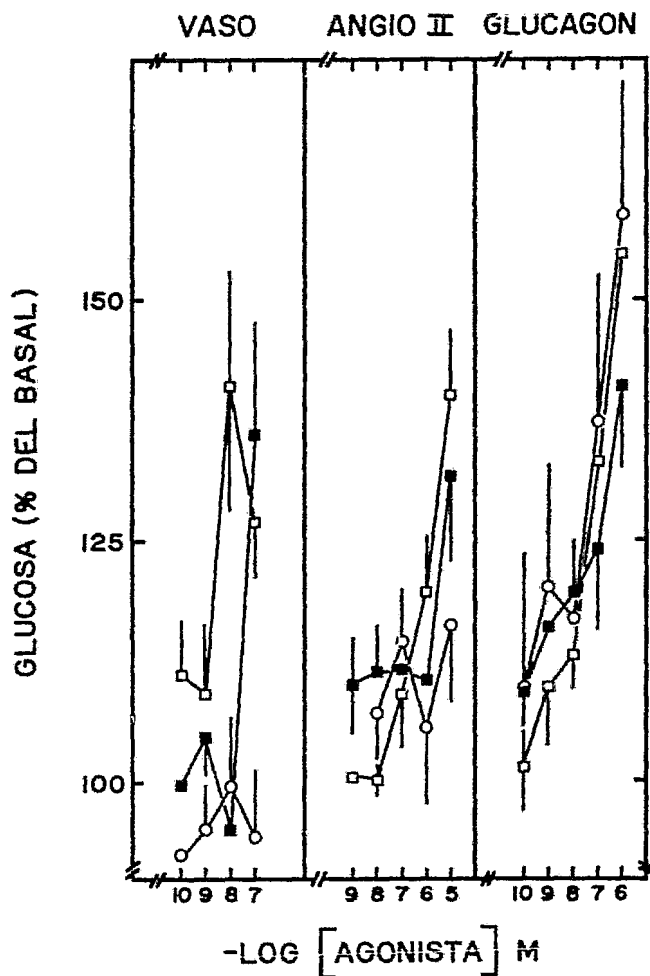


FIG. 3.8

CURVAS DOSIS-RESPUESTA PARA EL EFECTO DE VASOPRESINA (VASO), ANGIOTENSINA II (ANGIO II) Y GLUCAGON SOBRE LA GLUCONEOGENESIS. Se usaron hepatocitos aislados de ratas hipotiroideas (O-O), eutiroides (□-□) e hipertiroideas (■-■). Los valores basales de la síntesis de glucosa a partir de lactato se dan en la leyenda de la fig. 3.3.

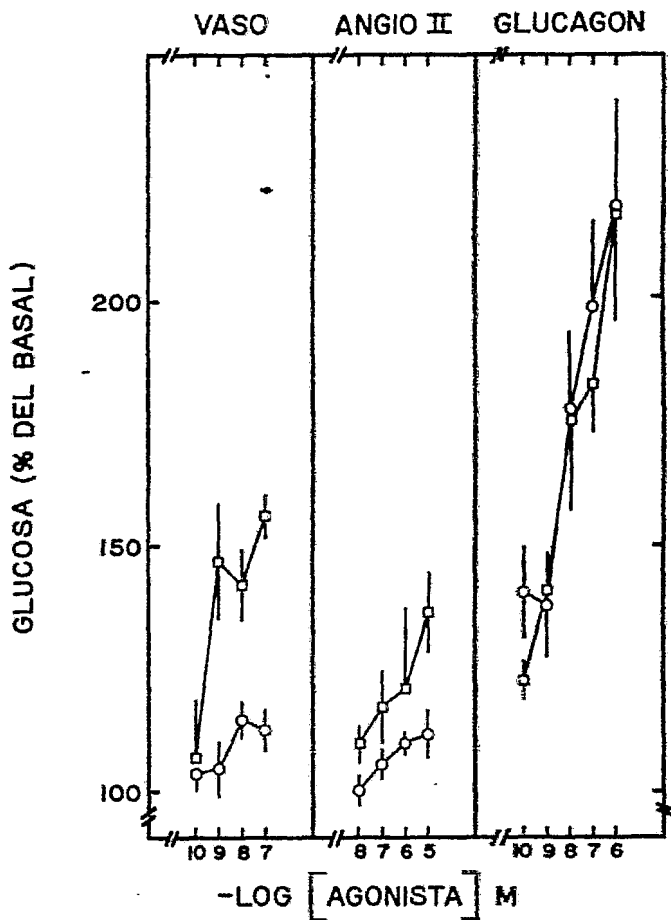


FIG. 3.9

CURVAS DOSIS-RESPUESTA PARA EL EFECTO DE VASOPRESINA (VASO), ANGIOTENSINA II (ANGIO II) Y GLUCAGON SOBRE LA GLUCOGENOLISIS. Se usaron hepatocitos aislados de ratas hipotiroideas (O-O) y eutiroides (□-□). Los valores basales de la síntesis de glucosa se dan al pie de la fig. 3.5.

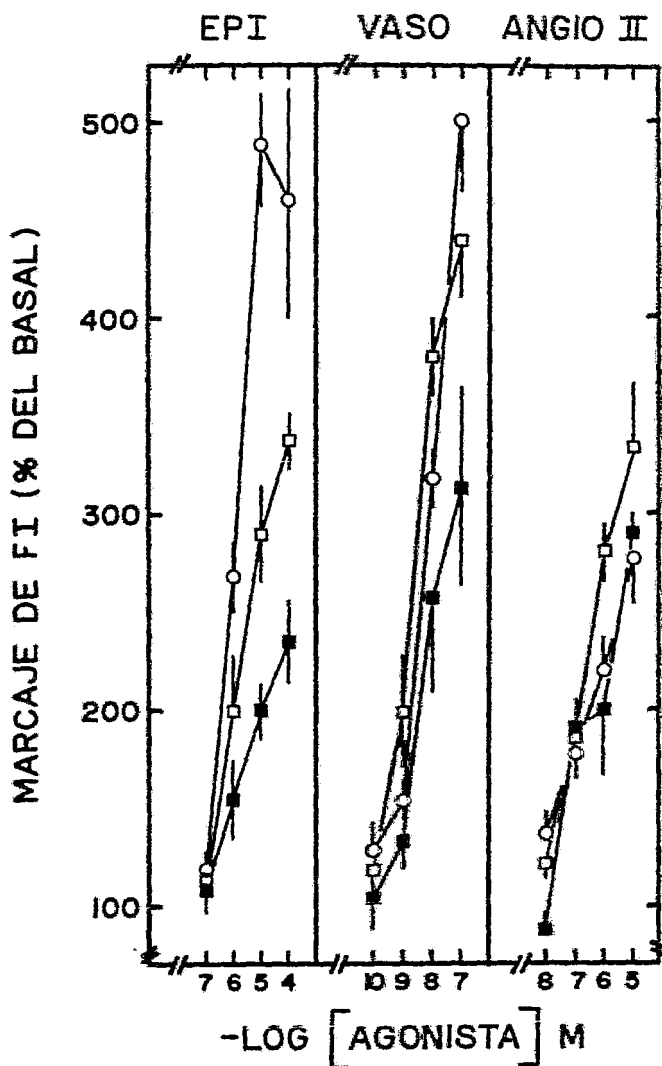


FIG. 3.10

CURVAS DOSIS-RESPUESTA PARA EL EFECTO DE EPINEFRINA (EPI), VASOPRESINA (VASO) Y ANGIOTENSINA II (ANGIO II), PARA EL MARCAJE DE FOSFATIDILINOSITOL (PI) CON $[^{32}\text{P}]$ Pi. Se usaron hepatocitos aislados de ratas hipotiroideas (○—○), eutiroides (□—□) e hipertiroideas (■—■). Los resultados se expresan como el porcentaje de los valores basales de la incorporación de $[^{32}\text{P}]$ Pi en el PI, los cuales fueron $15,770 \pm 3720$, $15,400 \pm 3500$ y 8970 ± 170 cpm/100 mg de células (peso húmedo) en ratas hipo, eu e hipertiroideas respectivamente.

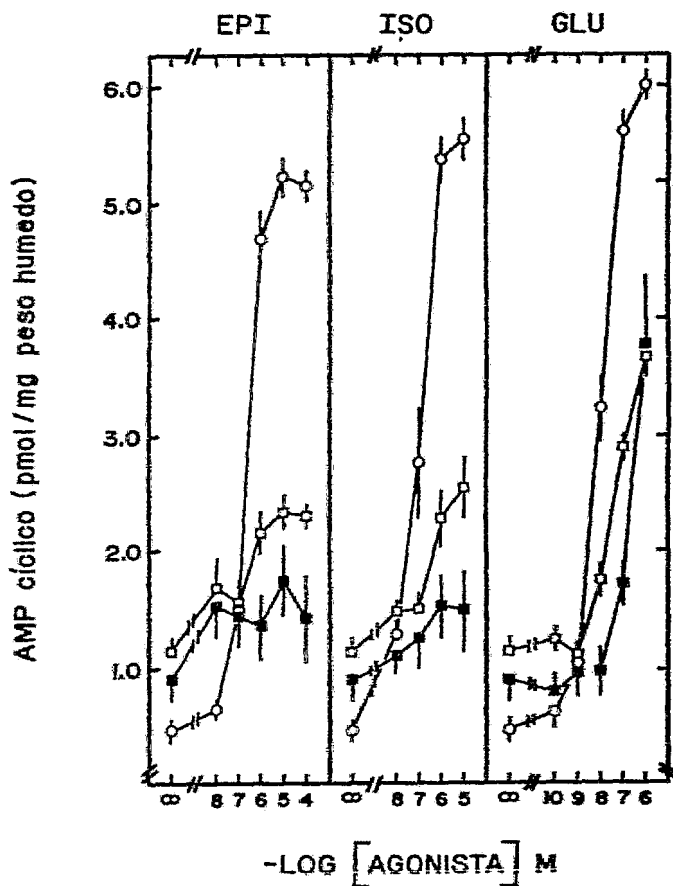


FIG. 3.11

CURVAS DOSIS-RESPUESTA PARA EL EFECTO DE EPINEFRINA (EPI), ISOPROTERENOL (ISO) Y GLUCAGON (GLU) EN LA ACUMULACION DE AMP CICLICO. Se usaron células aisladas de ratas hipotiroides (○—○), eutiroides (□—□), e hipertiroides (■—■).

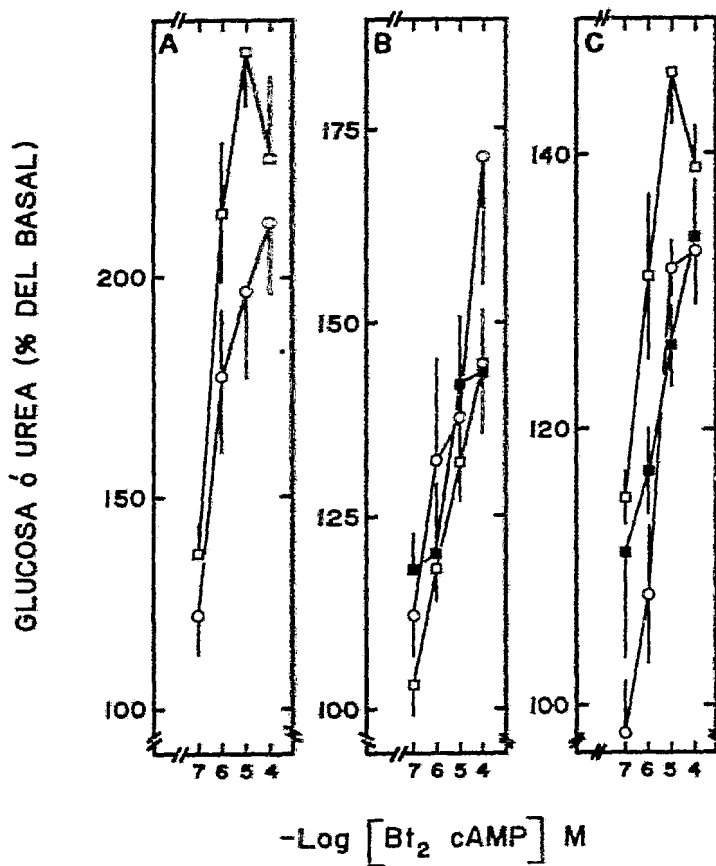


FIG. 3.12

CURVAS DOSIS-RESPUESTA PARA EL EFECTO DE DIBUTIRIL-AMP-CICLICO (Bt_2 cAMP) SOBRE LA GLUCOGENOLISIS (PANEL A), GLUCONEOGENESIS (PANEL B) Y UREOGENESIS (PANEL C). Se usaron hepatocitos aislados de ratas hipotiroidicas (○—○), eutiroidicas (□—□) e hipertiroideas (■—■). Los valores basales de la síntesis de glucosa, glucosa a partir de lactato y urea se dan en las leyendas de las figs. 3.1, 3.3, 3.5.

La magnitud de la respuesta a glucagon (fig. 3.7, 3.8 y 3.9) durante el hipertiroidismo se encuentra abatida de la misma manera que en las hormonas ensayadas. En el hipotiroidismo la respuesta a esta hormona es similar que en el eutiroidismo, inclusive en la fig. 3.7 se puede apreciar que en la ureogénesis tiene una magnitud ligeramente menor, sin embargo los niveles intracelulares de AMPc (fig. 3.11) provocados por esta hormona y por los agentes adrenérgicos isoproterenol y epinefrina sufren un incremento casi de tres veces respecto a las ratas eutiroides, de tal manera que estos resultados sugieren que pudiera haber algo más allá de la interacción hormona-receptor-adenilato ciclasa. Sin embargo la respuesta al análogo dibutiril-AMP cíclico (fig. 3.12), en la producción de urea o glucosa aunque se ve disminuida ligeramente en el hipo e hiper tiroidismo no sufre una modificación significativa respecto al eutiroidismo, por lo que en ambos estados tiroideos la respuesta intracelular al segundo mensajero no parece estar dañada.

I V. D I S C U S I O N

Estudios previos han demostrado que el estado tiroideo modula la capacidad de ciertos tejidos de responder a una variedad de hormonas, los resultados presentados en este trabajo demuestran que tanto el hiper como el hipotiroidismo alteran la respuesta hormonal hepática.

En el estado eutiroides las tres vías metabólicas estudiadas son reguladas a través de receptores α_1 adrenérgicos, sin embargo se logra observar cierta respuesta β adrenérgica en la glucogenolisis y en la gluconeogénesis, este hecho podría indicar que algunas vías metabólicas pueden ser reguladas por una población heterogénea de receptores adrenérgicos.

Mientras que en el estado eutiroides la respuesta hepática a catecolaminas es predominantemente α_1 adrenérgica, en el estado hipotiroideo esta respuesta se acompaña de una estimulación β adrenérgica de igual potencia, esto concuerda con lo reportado por Malbon (34), ya que él encuentra un aumento en el número de receptores β adrenérgicos, lo que provoca consecuentemente un incremento en la acumulación intracelular de AMPc inducido por β catecolaminas (fig. 3.11).

A pesar de que nuestros resultados y los de Malbon (33) establecen que la respuesta α_1 adrenérgica no se ve afectada en el estado hipotiroideo, Preiksaitis et al. (35) reportan que el aumento de la respuesta β adrenérgica se alterna con una disminución en la α_1 adrenérgica, sin embargo en las tres vías metabólicas estudiadas la respuesta α_1 adrenérgica es similar en el estado eu e hipotiroideo, además el recambio de PI inducido por receptores

α_1 adrenérgicos no solo no disminuye sino que es mayor que en el estado eutiroides.

Esta controversia de resultados puede ser debido a que el grupo de Malbon (24) y el nuestro induce el hipotiroidismo con un agente químico como es el 6-n-propil-2-tiouracilo por el contrario, el grupo de Preiksaitis (35) utiliza ratas tireidectomizadas tres meses antes del experimento, quizá de alguna manera el hecho de que el animal pierda no solo la capacidad de sintetizar hormonas tiroideas sino que además pierda toda la glándula tiroidea pueda hacer la diferencia en la respuesta celular.

Durante el estado hipotiroideo la respuesta a los péptidos presores vasopresina y angiotensina II se ve abatida totalmente pero no así el recambio de PI (fig. 3.10). Esto señala que los receptores para estas hormonas están presentes pero no hay respuesta a la señal del segundo mensajero. Las hormonas vasopresina y angiotensina II involucran al sistema PI- Ca^{2+} en su mecanismo de transducción (15, 16, 19, 36). Lo mismo se ha demostrado para la acción α_1 adrenérgica. El hecho de que no exista respuesta metabólica en hepatocitos de rata hipotiroidea a vasopresina ni a angiotensina II aunado a la falta de respuesta glucogenolítica al ionóforo A-23187 están en contraste con la clara respuesta a la estimulación α_1 adrenérgica.

Otro dato interesante presente en el estado hipotiroideo es la respuesta a glucagon. No obstante de proveer un aumento casi de tres veces respecto

al estado eutiroides en la acumulación intracelular de AMPc la respuesta metabólica no es paralela a la producción del segundo mensajero y aunque la respuesta al análogo Bt_2 AMPc está ligeramente disminuida respecto al eutiroidismo la razón para que la célula no responda de igual manera tanto metabólicamente como en la acumulación del AMPc a la estimulación por glucagón no es debido a que no pueda responder a la señal intracelular del AMPc sino que sólo lo puede hacer a una concentración límite y no a un exceso de él. En otras palabras, quizá un mínimo de señal (AMPc) sea suficiente para producir una respuesta máxima y elevaciones en el nivel del nucleótido cíclico más allá de este mínimo es posible que carezcan de significado metabólico.

En el hipertiroidismo se observa un patrón de respuesta similar al del estado eutiroides, los efectos metabólicos son debidos a una señal α_1 adrenérgica, pero la célula se vuelve menos sensible a los agentes adrenérgicos, sin embargo la respuesta intracelular al Bt_2 AMPc casi no se ve alterada y tampoco el valor basal para la síntesis de urea y glucosa (a partir de lactato) en este estado tiroideo, por lo tanto es probable que los cambios inducidos por las hormonas tiroideas se encuentran a nivel de la membrana plasmática.

Malbon ha reportado una disminución en el número de receptores α_1 adrenérgicos en hepatocitos de ratas hipertiroideas (33) lo que concuerda con la disminución tanto en la respuesta metabólica como en el recambio de PI, mismo hecho que se observa para las hormonas vasopresina y angiotensina II y para la acumulación de AMPc. Estos resultados sugieren que al igual que

para los receptores α_1 adrenérgicos, en general durante el hipertiroidismo pudiera existir una disminución del número de receptores hormonales, quizá como defensa de la misma célula para no incrementar más de lo que ya se ve aumentada la velocidad del metabolismo basal.

Por otro lado el hipertiroidismo está asociado con un aumento generalizado del catabolismo proteico con un balance nitrogenado negativo lo cual pudiera resultar en una disminución generalizada de receptores.

En resumen, la respuesta hormonal hepática se ve modificada por el estado tiroideo: durante el hipotiroidismo hay un aumento a la sensibilidad β adrenérgica sin disminución de la α_1 adrenérgica y una total insensibilidad a los efectos del ion Ca^{2+} . En el hipertiroidismo en general hay un descenso en la sensibilidad hormonal.

V. BIBLIOGRAFIA

1. Sutherland, E. W., Studies on the mechanism of hormone action. *Science* 177, 401-408, (1972).
2. Rodbell, M. The role of hormone receptors and GTP-regulatory proteins in membrane transduction. *Nature* 284, 17-22, (1980).
3. Cooper, D. M. F., Schlegel, W., Lin, M. S. and Rodbell, M. The fat cell adenylate cyclase system. *J. Biol. Chem.* 254, 8927-8931, (1979).
4. Walsh, D. A., Perkins, J. P., and Krebs, E. G., An adenosine 3', 5'-monophosphate-dependant protein kinase from rabbit skeletal muscle, *J. Biol. Chem.* 243, 3763-3774, (1968).
5. Fain, J. N., and García-Sáinz, J. A., Role of phosphatidylinositol turnover in α_1 and of adenylate cyclase inhibition in α_2 effects of catecholamines, *Life Sci.* 26, 1183-1194, (1980).
6. Michell, R. H., and Kirk, C. J. Why is phosphatidylinositol degraded in response to stimulation of certain receptors? *Trends Pharmacol. Sci.* 2, 86-89, (1981).
7. García-Sáinz, J. A., and Fain, J. N., Regulation of adipose tissue metabolism by catecholamines: roles of α_1 , α_2 and beta-adrenoceptors, *Trends Pharmacol. Sci.* 3, 201-203, (1982).
8. Aggerbeck, M. Gullaien, G. and Hanoune, J. Adrenergic receptors of the α_1 subtype mediates the activation of glycogen phosphorylase in normal rat liver. *Biochem. Pharmacol.* 29, 643-645, (1980).
9. Kneer, N. M., Wagner, M. J. and Lardy, H. A., Regulation by calcium of hormonal effects on gluconeogenesis. *J. Biol. Chem.* 254, 12160-

- 12168, (1979).
10. Corvera, S., and García-Sáinz, J. A., α 1-adrenoceptor activation stimulates ureogenesis in rat hepatocytes. *European Journal of Pharmacol.* 72, 387-390, (1981).
 11. Cárdenas-Tanús, R. J., Huerta-Baena, J. and García-Sáinz, J. A. Angiotensin II inhibits the accumulation of cyclic AMP produced by glucagon but not its metabolic effects, *FEBS Lett.* 143, 1-4, (1982).
 12. White, A., Handler, P., Smith, E., Hull, R., Lehman, I. R. *Principles of Biochemistry*, Mc Graw Hill Book Co., 6th ed. (1970).
 13. S. Keppens and H. de Wulf. The nature of the hepatic receptors involved in vasopressin-induced glucogenolysis, *Biochem. Biophysics Acta.* 588, 63-69, (1979).
 14. Tolbert, M. E. M., White, S. C., Aspary, K., Cutts, J. and Fain, J. N. Stimulation by vasopressin and α -catecholamines of phosphatidylinositol formation in isolated rat liver parenchymal cells. *J. Biol. Chem.* 255, 1938-1944, (1980).
 15. Keppens, S., and De Wulf, H., The activation of liver phosphorylase by vasopressin, *FEBS Lett.* 51, 29-32, (1975).
 16. Whilton P. D., Rodriguez L. M., and Hems, D. A., Stimulation by vasopressin, angiotensin and oxytocin of gluconeogenesis in hepatocyte suspensions. *Biochem. J.* 176, 893-898, (1978).
 17. Corvera, S., and García-Sáinz, J. A., Vasopressin and angiotensin II stimulated ureogenesis through increased mitochondrial citrulline production.

- Life Sci. 31, 2493-2498, (1982).
18. Jard, S., Cantau, B., and Jakobs, K. S., Angiotensin II and α -adrenergic agonists inhibit rat liver adenylate cyclase., J. Biol. Chem. 256, 2603-2606, (1981).
 19. Hems, D. A., Rodriguez L. M., and Whilton, P. D. Rapid stimulation by vasopressin, oxytocin and angiotensin II of glycogen degradation in hepatocyte suspensions. Biochem. J. 172, 311-317, (1978).
 20. Lehninger, A. L., Principles of Biochemistry, Worth Publishers Inc, (1982).
 21. Kunos, G. Thyroid hormone-dependent interconversion of myocardial α and β -adrenoceptors in the rat. Br. J. Pharmac. 59, 177-189, (1977).
 22. Malbon, C., Moreno, J. F., Cabelli, R. J., and Fain, J. N., Fat cell adenylate cyclase and β -adrenergic receptors in altered thyroid states. J. Biol. Chem. 253, 671-678, (1978).
 23. Fain, J. N., Catecholamine-thyroid hormone interactions in liver and adipose tissue, Life Sci. 28, 1745-1754, (1981).
 24. Malbon, C. C., Li, S., and Fain, J. N., Hormonal activation of glycogen phosphorylase in hepatocytes from hypothyroid rats. J. Biol. Chem. 253, 8820-8825, (1978).
 25. Preiksaitis, H. G., Kunos, G., Adrenoceptor-mediated activation of liver glycogen phosphorylase: effects of thyroid state. Life Sci. 24, 35-42, (1979).
 26. Berry, M. N., and Friend, D. S., High yield preparation of isolated rat

- liver parenchymal cells. *J. Cell. Biol.* 43, 506-520, (1969).
27. Fales, F. N. Glucose (Enzymatic) Standard Methods in Clin. Chem. 4, 101-112, (1963).
 28. Gutman, I. and Bergmeyer, H. V., Urea in Methods of Enzymatic Analysis, , ed. Hiel. Bergmeyer (Acad. Press, N.Y.) 1791-1794, (1974).
 29. Gilman, A. G. Protein binding assay for adenosine 3':5' cyclic monophosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 67, 305-312, (1970).
 30. Brown, B. L. Albano, J. C. M., Ekins R. P. Sgherzi, A. M., and Tam- pion, W., A simple sensitive saturation assay method for the measurement of adenosine 3':5' cyclic monophosphate. *Biochem. J.* 121, 561-562, (1971).
 31. Fricke, Y., Tritosol: A new solvent extraction kit based on triton X-100. *Anal. Biochem.* 65:77-80 (1975).
 32. García-Sáinz, J. L., Effect of the effect of adrenergic amines on phospholipase C activity and cyclic nucleotide synthase activity in fat cells from adipose tissue. *Int. J. Pharmacol.*, 18, 72-77 (1980).
 33. Mallat, A. G., Effect of thyroidectomy and thyroidectomy on thyroidism impairs the activity of adenylyl cyclase and cyclic adenosine monophosphate in rat hepatocytes, *J. Biol. Chem.* 255: 8692-8699, (1980).
 34. Mallat, A. G., Effect of thyroidectomy on adenylyl cyclase and beta adrenergic receptors: Increased beta adrenergic receptor number and responsiveness in the hypothyroid rat. *J. Biol. Chem.* 255, 8692-8699, (1980).
 35. Prekaya, H. G., Han, H. W., and Kunos, G., Decreased α_1 adreno- ceptor responsiveness and density in liver cells of thyroidectomized rats,

J. Biol. Chem. 257, 4321-4327, (1982).

36. Hems D. A., Whilton, P. D., and Ma, G. Y. Metabolic actions of vasopressin, glucagon and adrenalin. Biochem. Biophys. Acta, 411, 155-164, (1975).