

11261

1984
1

T E S I S

"REGULACION HORMONAL DE LA UREOGENESIS"

PRESENTADA POR LA MEDICA CIRUJANA
SILVIA CORVERA BEHAR

PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
(BIOLOGIA MOLECULAR)

1984

FALLA DE CR GEN



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.

C O N T E N I D O

INTRODUCCION	PG.
El Ciclo de la Urea	1
Mecanismos de Regulación de Vías Metabólicas	6
Regulación de la Ureogénesis	10
Efectos hormonales sobre el hígado.....	15
Mecanismos de Acción Hormonal.....	18
Modulación Hormonal de la Ureogénesis	25
ASPECTOS METODOLOGICOS	28
TRABAJOS PUBLICADOS	(Se anexan)
DISCUSION	33

EL CICLO DE LA UREA.

La importancia de las proteínas en la dieta de los vertebrados radica en que éstas, además de su valor energético, son fuente de aminoácidos. Los aminoácidos dentro del organismo, están sujetos a una serie compleja de reacciones metabólicas, que pueden ser agrupadas en tres categorías:

1. Incorporación de aminoácidos a proteínas tisulares.
2. Síntesis de compuestos nitrogenados tales como bases púricas, catecolaminas, creatina, etc.
3. Catabolismo, es decir, oxidación del aminoácido hasta CO_2 , y eliminación del nitrógeno.

La magnitud relativa de cada uno de estos procesos varía en función de los requerimientos fisiológicos y del estado nutricional del organismo (1); Así, durante el crecimiento y desarrollo de un animal, la proporción de aminoácidos incorporados a proteínas y a otros compuestos, predominará sobre la utilizada en obtener energía por medio de la oxidación. Esto -- siempre y cuando el aporte calórico proporcionado por los otros elementos de la dieta, tales como carbohidratos y lípidos, sea suficiente y balanceado.

En el caso de un organismo adulto, la proporción de aminoácidos incorporados a proteínas es menor que en el organismo en crecimiento, y depende de múltiples factores como edad, sexo, embarazo, lactancia, etc. Si el aporte protéico de la dieta de un adulto es mayor que su requerimiento, la proporción de aminoácidos degradados hasta CO_2 aumenta. La proporción de aminoácidos degradados también se ve afectada por la ingesta calórica.

Cuando el aporte calórico de la dieta es insuficiente para cubrir las necesidades del organismo, la degradación de aminoácidos aumenta y con esto la excreción de NH_4 . El catabolismo de aminoácidos también se ve muy aumentado en ciertas condiciones patológicas, como son las quemaduras o los traumatismos extensos, los síndromes intestinales de malabsorción o en el estado canceroso.

Es evidente que el destino de los aminoácidos de la dieta puede ser muy variable, y está sujeto a múltiples mecanismos de control. El principal (o único) controlador del metabolismo de los aminoácidos en los vertebrados es el hígado. Este es un monitor de la cantidad y tipo de aminoácidos ingeridos en la dieta, y ajusta el metabolismo de estos compuestos a los requerimientos fisiológicos del organismo (1).

El catabolismo de los aminoácidos conlleva la producción de amonio libre. Este compuesto es extremadamente tóxico, por lo cual su concentración en sangre debe ser cuidadosamente regulada. Una vez más, el hígado es el principal órgano involucrado en la detoxificación del amonio. A través de la evolución han surgido distintos mecanismos cuyo fin es eliminar del organismo el amonio producido a consecuencia del catabolismo de los aminoácidos (2). En los vertebrados acuáticos, el amonio es excretado directamente a su ambiente acuoso. En estos animales, denominados amoniotélicos, el amonio derivado de los diversos aminoácidos se convierte en glutamina a partir de amonio y glutamato y a expensas de ATP. La enzima que lleva a cabo esta reacción es la glutamino sintetasa. El amonio, en forma de glutamina (no tóxica) es transportado del hígado hasta los tubulos renales, en donde mediante una reacción de hidrólisis catalizada por la glutaminasa, es liberado directamente hacia la orina.

Los reptiles terrestres y las aves, son seres uricotelicos; es decir, que excretan nitrógeno en forma de ácido úrico, mediante una serie compleja de reacciones en donde el anillo púrico es sintetizado a partir de múltiples precursores, entre ellos amonio (2).

En la mayoría de los vertebrados terrestres, el amonio es excretado en forma de urea. La biosíntesis de la urea se lleva a cabo en el hígado, y está constituida por las reacciones esquematizadas en la figura 1. La síntesis de urea se inicia a partir de CO_2 y amonio. Las primeras dos enzimas, la carbamilfosfato sintetasa (CFS) y la ornitín transcarbamilasa (OTC) se localizan dentro de la mitocondria, mientras que las otras tres enzimas -arginínosuccinato sintetasa, argíninosuccinasa y arginasa- son citoplasmicas. La N-acetilglutamato sintetasa no está directamente involucrada en la biosíntesis de la urea, pero cataliza la síntesis del N-acetil glutamato, un cofactor esencial para la actividad de la carbamil fosfato sintetasa (3).

La carbamil fosfato sintetasa está localizada en la matriz mitocondrial. Cataliza una reacción compleja, esencialmente irreversible, en donde se conjuntan una molécula de NH_4 , una de CO_2 y dos de ATP para formar un compuesto altamente inestable que es el carbamil fosfato.

El carbamil fosfato transfiere el grupo carbamilo a otra molécula, la ornitina, en una reacción catalizada por la segunda enzima mitocondrial, la OTC. El producto de esta reacción es un compuesto llamado citrulina, el cual sale de la mitocondria hacia el citosol para iniciar la porción citoplásmica del ciclo de la urea.

La primera reacción citoplásmica del ciclo es la condensación del grupo amino de una molécula de aspartato con el grupo carbamilo de la citrulina, en presencia de ATP, para dar argíninosuccinato. La enzima que

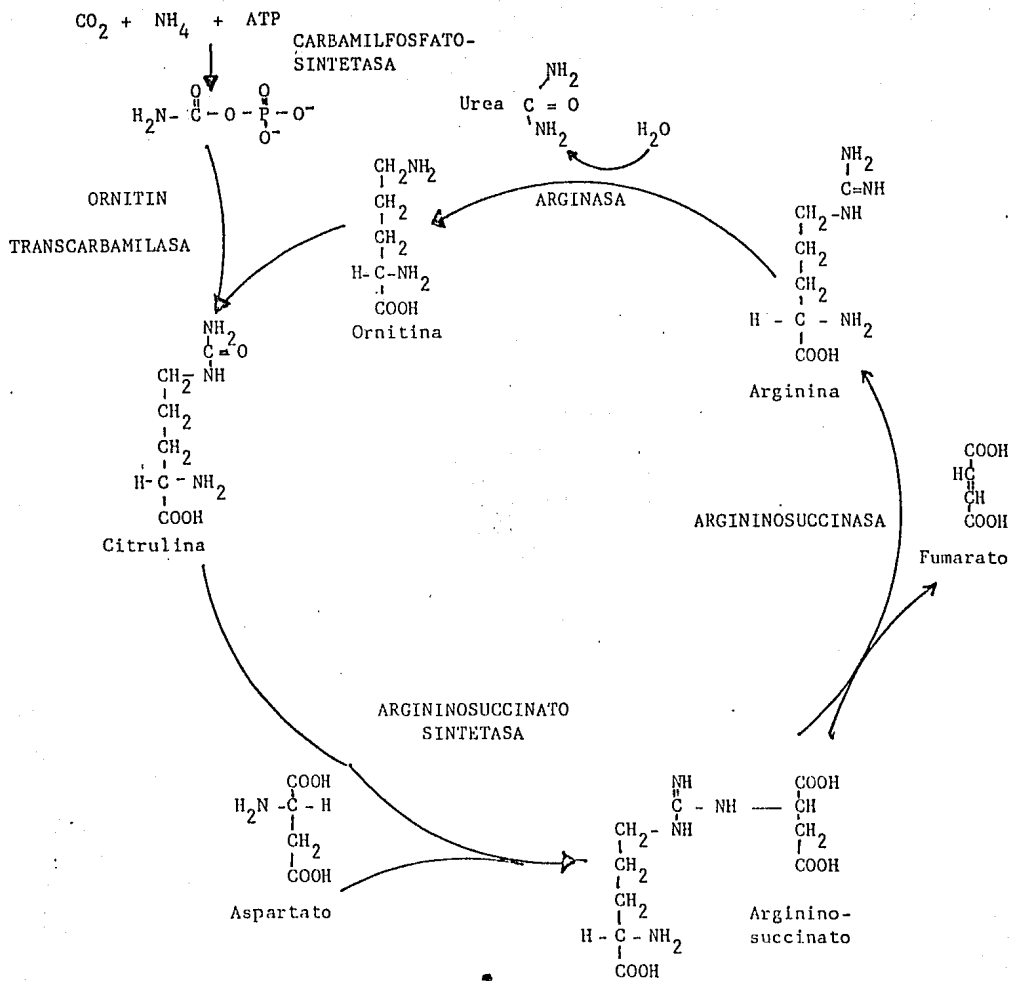


Fig. 1.- Reacciones del Ciclo de la Urea.

cataliza esta reacción es la arginiosuccinato sintetasa (ASS) (2).

La siguiente reacción, es una reacción de eliminación catalizada por la arginiosuccinato liasa, que da como productos a la arginina y al fumarato. Este último regresa al ciclo de Krebs, mientras que la arginina, sustrato de la última enzima del ciclo de la urea, la arginasa, es hidrolizada a urea y ornitina. La urea es excretada como tal, mientras que la ornitina puede ser reciclada (2).

La elucidación del mecanismo de biosíntesis de urea por Krebs y Henseleit en 1932, marcó una etapa fundamental en el desarrollo del pensamiento bioquímico. Por primera vez, la biosíntesis de un compuesto se explicó en términos de reacciones químicas identificadas en el sistema biológico apropiado. Anteriormente, se pretendía que la explicación de los eventos biosintéticos en los organismos vivos podía ser inferida a partir de las propiedades químicas de los reactantes. Además, el trabajo de Krebs y Henseleit fue la clave que permitió entender como estaban organizados los procesos metabólicos celulares. Por otro lado y quizá como hecho de enorme trascendencia en el pensamiento bioquímico, se establece un "ciclo" de reacciones en las cuales la concentración catalítica de uno de los intermediarios es suficiente para mantener el flujo funcional a través de una vía metabólica (4).

La actividad del ciclo de la urea debe variar continuamente, en proporción directa a la cantidad de aminoácidos que son oxidadas hasta CO_2 , produciendo amonio libre. En condiciones fisiológicas en las cuales esta cantidad aumenta, la actividad del ciclo de la urea puede llegar a ser limitante, dando como consecuencia la acumulación de amonio. Esto sugiere que las enzimas del ciclo de la urea no funcionan continuamente al máximo de su capacidad. Los mecanismos que impiden la actividad enzimática máxima

son importantes, pues también impiden que todo el amonio presente en la célula sea drenado hacia la formación de carbamil fosfato. Esto tendría como consecuencia que la síntesis de otros compuestos nitrogenados tales como piridinas, glutamato y aminoácidos no esenciales se inhibiera por completo.

Se reconoce, entonces, que el flujo a través del ciclo de la urea en condiciones normales debe estar limitado. Sin embargo, son necesarios mecanismos de regulación que permitan aumentar eficientemente este flujo en condiciones metabólicas que así lo requieran. Los mecanismos generales de regulación metabólica que operan en animales pluricelulares, a los cuales está sujeta la vía de síntesis de urea, se describen brevemente a continuación.

MECANISMOS DE REGULACION DE VIAS METABOLICAS

La adaptación de un organismo a su medio externo, y el mantenimiento de su homeostasis son fenómenos que demandan una flexibilidad metabólica considerable. Esta flexibilidad se logra mediante cambios en el flujo de metabolitos a través de las distintas vías presentes en el organismo. Estos cambios son producto de modificaciones en la actividad o cantidad de una o varias de las enzimas que los constituyen, actividades que son limitantes bajo condiciones normales. Estas enzimas, y por lo tanto el flujo a través de las vías, pueden ser reguladas a distintos niveles (6,7). En el primer nivel, la regulación estaría dada por la velocidad de reacción de la enzima, en función de la concentración intracelular de protones pH , del sustrato de la reacción, de cationes requeridos por la enzima, como podrían ser

Ca^{++} , Mg^{++} , Fe^{++} , etc. o de coenzimas. Las fluctuaciones en las concentraciones de estos elementos en la vecindad de cualquier enzima pueden producir cambios en la actividad de la misma. En el segundo nivel, los cambios de actividad se ejercen sobre ciertas enzimas especializadas, cuyas propiedades catalíticas se ven modificadas por dos tipos de mecanismos: El primero consiste en la activación o inhibición de la enzima por efecto de la unión no covalente de un metabolito específico a un sitio - distinto al sitio catalítico, fenómeno conocido como alosterismo. Los metabolitos que modulan la actividad de la enzima pueden ser los productos finales de una vía metabólica a la cual pertenece la enzima (retroinhibición), o incluso son los sustratos de la misma. El segundo mecanismo consiste en la modificación de la actividad catalítica de la enzima mediante una modificación covalente en su estructura, que a su vez está catalizada por otras enzimas. Estas modificaciones covalentes a menudo cambian la K_m de la enzima por su sustrato, la constante de activación para algún activador o la constante de inhibición para algún inhibidor. La modificación covalente, más que un mecanismo de activación o inhibición de la enzima es un mecanismo que media la transición de la enzima de un estado a otro, en los cuales responde de manera diferente a la concentración de sustratos y moléculas moduladoras. Se conocen dos tipos de modificación covalente involucradas en la regulación de actividades enzimáticas: la fosforilación y la adenilación. Se reconoce actualmente que el mecanismo principal de control de los eventos intracelulares por estímulos fisiológicos externos es la modificación de la actividad enzimática por fosforilación.

En un tercer nivel de regulación metabólica, está el control ejercido por la cantidad total de enzima presente en la célula. Esta cantidad

resulta del balance entre la velocidad de degradación y la velocidad de síntesis de la enzima; esta última a su vez depende del control de la transcripción del gen y de la síntesis de la proteína. Diversos metabolitos al igual que diversas hormonas son capaces de modificar la actividad transcripcional en zonas específicas del genoma.

En organismos pluricelulares, los cuales son producto de la acción coordinada de cúmulos de células altamente diferenciadas, existe un cuarto nivel de regulación metabólica, que es la regulación neuro-endócrina. El sistema neuro-endocrino coordina o integra la acción de los órganos en conjunto, en función de las necesidades del organismo en su relación con el medio externo. Este nivel de regulación intercelular es una extensión de los mecanismos de regulación intracelular, que ha surgido a través de la evolución (7).

El sistema endocrino funciona por medio de un conjunto de señales químicas. Estas señales informan a un grupo de células del estado de otro grupo de células dentro del organismo, y suscitan automáticamente, una respuesta en ellas. Estas señales se llaman hormonas, y son un conjunto grande de moléculas que varían tanto en composición química, como en el tipo de respuesta que producen en las células que afectan (8).

Químicamente, las hormonas pueden ser clasificadas en tres grupos: las hormonas esteroides, derivadas del colesterol, que son de naturaleza lipídica, las hormonas peptídicas y las hormonas derivadas de aminoácidos como las hormonas tiroideas y las catecolaminas.

Las hormonas, como conjunto, producen una variedad grande de efectos sobre las células con las que interaccionan. Los efectos celulares de una hormona pueden ser clasificados en función del tiempo que transcurre entre la interacción de ésta con su receptor, y la manifestación del

efecto hormonal. En otras palabras, hay efectos hormonales cuya latencia es de segundos o minutos, como serían la movilización de Ca^{++} producida por epinefrina, la acumulación de AMP cíclico por glucagon y la consecuente estimulación de la glucogenólisis por estas hormonas. Otros efectos hormonales se producen después de tiempos de latencia más prolongados, de horas o días, como sería la estimulación de la síntesis de transaminasas en el hígado producida por glucocorticoides, o la estimulación de la síntesis de DNA y los efectos mitogénicos de la insulina y los factores de crecimiento.

Los efectos tardíos de las hormonas generalmente involucran cambios en la masa y composición de la célula. Estos cambios generalmente son producto de un aumento en la síntesis de proteínas, e involucran aumentos en la transcripción de genes específicos y en la síntesis de RNA mensajero y proteínas. El tiempo de latencia del efecto hormonal refleja en cierta manera algo del mecanismo por el cual la hormona ejerce su acción. Así, por ejemplo, el mecanismo de acción de las hormonas esteroideas involucra su penetración a través de la membrana plasmática, y su asociación con receptores solubles localizados en el citoplasma (8). Los esteroideos activan al receptor de tal forma que el complejo hormona-receptor se fija a la cromatina nuclear. Esto produce la fijación de la RNA polimerasa a sitios específicos del genoma y aumento de la transcripción de genes. El RNA mensajero formado dicta la síntesis de las proteínas para las cuales codifica, y éstas a su vez producen efectos sobre la célula. Todo este proceso se lleva a cabo en horas o días después del estímulo hormonal, y perdura hasta que los productos (RNAm, proteína) son degradados.

Es evidente, que la acción de estas hormonas produce cambios importantes en la masa y en la composición química de la célula. El mecanismo

de acción de hormonas cuyo tiempo de latencia es corto contrasta marcadamente: estas hormonas, que en general son de naturaleza peptídica o derivados de aminoácidos como las catecolaminas, no penetran al interior de la célula, sino que activan receptores específicos localizados sobre la cara externa de la membrana plasmática (8). La activación de estos receptores produce una señal intracelular, empleando lo que es conocido como un "mecanismo de transducción". La señal intracelular generada o "segundo mensajero", de alguna manera modifica la actividad de enzimas ya presentes en el interior de la célula. Estos procesos se llevan a cabo en segundos o minutos después la interacción inicial de la hormona, y perdura sólo mientras el estímulo hormonal permanezca presente. A diferencia de las hormonas esteroides, la acción de las hormonas peptídicas y de las catecolaminas no depende de un cambio en la masa o composición celular, sino que depende de modificaciones en la cinética de enzimas preexistentes en la célula.

En general, es posible afirmar que el sistema endocrino, media las necesidades adaptativas crónicas del organismo por medio de cambios en la composición celular inducidas por hormonas de acción lenta, y las necesidades adaptativas a situaciones agudas y transitorias mediante cambios en la dinámica celular inducidos por hormonas de acción rápida.

REGULACION DE LA UROGENESIS

La síntesis de urea, al igual que todos los procesos metabólicos en los organismos pluricelulares, está sujeta a los cuatro niveles de regulación metabólica que fueron delineados previamente. Los pasos enzimáticos involucrados en la formación de urea a partir de citrulina y en la for

mación de citrulina a partir de bicarbonato y amonio fueron dilucidados por Sarah Ratner, Philip P. Cohen y F. Lipman en las décadas de 1940 y 1950. La purificación de las respectivas enzimas sucedió inmediatamente después, y con ello el estudio de las propiedades físicas, estequiometría, cinética, mecanismos de reacción, y mecanismos de regulación de cada una de ellas.

La vía completa de síntesis de urea involucra reacciones enzimáticas tanto en el citoplasma como en la mitocondria, que son sujetas a control por la concentración de sus sustratos, activadores e inhibidores. Además, la bicompartimentalización de las enzimas del ciclo de la urea hace que sea necesario el transporte de metabolitos a través de la membrana mitocondrial. Existe un gran número de estudios que intentan identificar los pasos limitantes en la vía de la síntesis de urea. Se ha analizado el papel de la disponibilidad de ATP (9), disponibilidad de equivalentes reductores (10,11) niveles de diversos iones (12); actividades de los sistemas de transporte de aniones localizados en la membrana mitocondrial (10), y disponibilidad de sustratos del ciclo en la regulación del mismo (13). Estos estudios han demostrado que la síntesis de urea depende en gran medida de la concentración disponible de ATP, y de el estado de oxidación-reducción de piridin nucleótidos en compartimentos celulares específicos que a su vez altera la concentración de metabolitos y su transporte a través de la membrana mitocondrial.

La mayoría de estos estudios, han sido realizados utilizando concentraciones saturantes de ciertos sustratos, y, en muchas ocasiones, inhibidores metabólicos. Estos estudios no permiten conocer cuales de estos factores influyen sobre el flujo a través del ciclo de la urea *in vivo*.

Diversos estudios, basados en la cuantificación de la síntesis de urea y citrulina en hepatocitos y de la síntesis de citrulina por mitocondrias aisladas, han demostrado que bajo condiciones fisiológicas la velocidad de síntesis de urea se ve limitada por la actividad de la carbamilo fosfato sintetasa (CFS) (5).

Las propiedades de la carbamilo fosfato sintetasa son importantes desde el punto de vista de la regulación metabólica, y han hecho de esta enzima el candidato principal para paso limitante-regulador de la síntesis de urea. Varios estudios han demostrado que entre 20 y 30% del total de proteína de la matriz mitocondrial está compuesta por CFS (5).

La actividad de la carbamilo fosfato sintetasa (CFS) se ve limitada por la concentración de N-acetil glutamato (AGA), activador alostérico por el cual la enzima tiene un requerimiento absoluto (14) (ninguna de las otras enzimas del ciclo parece requerir de activadores alostéricos u otros cofactores). La activación por AGA se asocia a cambios en la conformación y estructura de la enzima. Además de AGA la CFS requiere Mg^{++} libre, y su actividad puede ser afectada por sus sustratos (ATP , HCO_3^- y NH_3) y ciertos iones (Ca^{++}) (5, 12).

Los aspectos más estudiados en la regulación del ciclo de la urea han sido los cambios adaptativos que involucran cambios en la cantidad de las enzimas del ciclo. Estos estudios han sido realizados principalmente en dos sistemas; el primero es el hígado de rata sujeta a variaciones en la cantidad de proteína de la dieta. Schimke (15), demostró que la cantidad total de enzimas involucradas en la síntesis de urea aumenta en proporción directa a la cantidad de proteína presente en la dieta. Además de las cinco enzimas que forman parte del ciclo, la actividad acetil glutamato sintetasa y por tanto el nivel de AGA aumenta en proporción a

la proteína ingerida. La cantidad de las enzimas del ciclo de la urea, también aumenta durante el ayuno prolongado y bajo otras condiciones fisiológicas que son acompañadas por degradación y movilización de proteínas periféricas. Otro sistema muy estudiado es el de la inducción de las enzimas del ciclo de la urea durante la transición de amoniotelismo a ureotelismo en rana catesbeiana (3). El hígado del renacuajo de la rana catesbeiana, durante la metamorfosis es sujeto de grandes cambios moleculares y en los organelos subcelulares. La transición del renacuajo del amoniotelismo al ureotelismo es uno de los eventos bioquímicos más tempranos y de mayor importancia en la preparación de este organismo para la vida terrestre como rana adulta. Durante esta transición ocurre la inducción de la síntesis concentrada de las cinco enzimas del ciclo de la urea y de la acetil glutamato sintetasa (3).

Este fenómeno de adaptación al ureotelismo durante la metamorfosis natural, también ha constituido uno de los primeros estudios de la regulación endocrina del ciclo de la urea (16). Durante las décadas de los sesenta y setenta, se estudió el efecto de la tioxina sobre los niveles de las enzimas del ciclo durante la metamorfosis. Los cambios marcados en la actividad de la carbamil fosfato sintetasa durante la metamorfosis natural e inducida hicieron de esta enzima un marcador útil de los efectos primarios de la tioxina. Estos estudios demostraron por primera vez en la historia de la bioquímica, la síntesis de novo de una enzima específica como respuesta a la acción de dicha hormona (16).

Es necesario enfatizar que además de la síntesis de carbamil fosfato sintetasa en respuesta a la tiroxina, hay un aumento concentrado en la actividad de otras enzimas involucradas en el ciclo. Ha sido demostrado que el aumento en la actividad de la ornitín transcarbamilasa durante la

estimulación hormonal es debida a la síntesis de novo de un precursor extramitocondrial y de su transporte hacia el interior de la mitocondria, de manera análoga a lo observado para la carbamil fosfato sintetasa (16).

En otros anfibios, la exposición a hormonas tiroideas debe preceder o acompañar el tratamiento con glucocorticoides para lograr obtener un incremento en los niveles de carbamil fosfato sintetasa (17).

También ha sido estudiado el papel de estas dos hormonas, tiroxina y glucocorticoides sobre la actividad de las enzimas del ciclo de la urea en mamíferos. En el feto de la rata, existe un aumento en la cantidad de carbamil fosfato sintetasa y de arginasa inducido por hormonas tiroideas, que se ve incrementado para la administración simultánea de corticosteroides. En estos organismos, la hipofisectomía produce un decremento en la actividad enzimática (17). En animales adultos, la hipofisectomía aumenta la actividad de la carbamil-fosfato sintetasa y de la ornitín transcarbamilasa, sin modificar la actividad de las otras enzimas del ciclo. Este aumento de actividad es contrareestado con la administración de hormona del crecimiento (18).

Estos estudios de regulación endocrina del ciclo de la urea enfocan principalmente aquellos efectos hormonales que producen cambios en los niveles totales de las enzimas del ciclo.

El aumento en la cantidad total de enzima es un mecanismo de adaptación importante y de regulación del ciclo de la urea. Sin embargo, se da con tiempos de latencia muy prolongados, haciendolo ineficiente como mecanismo de regulación inmediato que responda a eventos metabólicos súbitos y transitorios.

El mantenimiento de la homeostasis en el organismo requiere de mecanismos mediante los cuales las vías metabólicas, tales como la ureo-

génesis, puedan ser controladas de manera inmediata y transitoria. Uno de estos mecanismos es la regulación por hormonas de acción rápida, que permite la adaptación del organismo a eventos metabólicos súbitos y transitorios. La regulación del ciclo de la urea por hormonas capaces de producir efectos de corta duración, afectando la cinética de las enzimas más que sus niveles totales no ha sido ampliamente estudiada.

EFECTOS HORMONALES SOBRE EL HIGADO

En la sección que se presenta a continuación, se pretende ilustrar la importancia que puede tener la acción rápida de cuando menos cuatro hormonas, la epinefrina, el glucagon, la vasopresina y la angiotensina II, en la modulación del metabolismo en situaciones agudas.

Quizás el ejemplo más claro de la modulación hormonal rápida del metabolismo hepático en función de requerimientos homeostáticos inmediatos del organismo es el del sistema glucoregulador (19). El sistema glucoregulador mantiene la constancia en la concentración de glucosa del medio interno, através de la relación de dos hormonas peptídicas, la insulina y el glucagon y através de las señales neuroendocrinas que controlan la concentración relativa de estas hormonas.

El funcionamiento normal del cerebro humano requiere del aporte de aproximadamente 6 gramos por hora de glucosa. La supervivencia y el avance evolutivo depende de un sistema que garantice que estos requerimientos energéticos del sistema nervioso sean satisfechos tanto en condiciones basales como en periodos de stress. El mantenimiento de los niveles constantes de glucosa en sangre independientemente del grado de utilización de ésta, depende de la acción coordinada de la insulina y el glucagon,

los cuales controlan el eflujo y el influjo de glucosa hacia la sangre respectivamente (19).

En condiciones basales, aproximadamente el 75% de la producción de glucosa por el hígado está mediada por la acción del glucagon. Esta cantidad es suficiente para suplir al cerebro con los requerimientos energéticos basales. En situaciones de stress como la lucha o la fuga, surge una actividad muscular intensa, la cual aumenta grandemente la utilización de glucosa por este tejido. Este consumo acelerado rápidamente produciría hipoglicemia si la glucosa consumida no fuese inmediatamente reemplazada. En estas circunstancias, el sistema nervioso asume el control de la producción de glucosa mediante la secreción de otra hormona, la epinefrina. Esta catecolamina estimula la secreción de glucagon por los islotes pancreáticos (el cual a su vez estimula la producción de glucosa por el hígado) e inhibe la secreción de insulina previendo la entrada de la glucosa a tejidos insulina-sensibles como son el tejido adiposo y el hígado.

Además del control indirecto que ejerce la epinefrina a través de los niveles de glucagon e insulina, esta hormona es capaz de actuar directamente sobre la célula hepática estimulando la producción de glucosa. Existen otras situaciones de stress distintas a la lucha o fuga, una de las cuales es la hipovolemia. Una hemorragia grande puede producir choque hipovolemico como consecuencia de la pérdida masiva de volumen circulante. En estas circunstancias, el flujo sanguíneo al cerebro se ve reducido, y con él, el aporte de glucosa. La supervivencia depende de mecanismos que permitan un aporte adecuado de glucosa a un sistema nervioso hipoperfundido. Uno de estos mecanismos es la secreción de un nonapeptido conocido como hormona antidiurética o vasopresina. Esta hormona

es secretada exponencialmente ante pérdidas mayores de 10% en el volúmen extracelular (20). Las concentraciones resultantes de vasopresina son su ficientes para ejercer un efecto antidiurético sobre el riñón y un efecto presor directo sobre la vasculatura periférica y de esta forma, mante ner la presión sanguínea bajo situaciones de hipovolemia. A las concentraciones de vasopresina que se obtienen bajo estas circunstancias, esta hormona produce un efecto directo sobre la célula hepática, estimulando la producción de glucosa por el hígado.

La disminución en la presión de perfusión producida por la pérdida del volúmen extracelular resultante de una hemorragia, es un potente estímulo que desencadena la acción del sistema renina-angiotensina (21). La renina, no es en sí misma una hormona, sino una enzima que cataliza la formación de un grupo de hormonas activas, las angiotensinas. El sustrato de la renina es una γ globulina producida por el hígado llamada angiotensinógeno. Este es roto por la renina, produciendo un decapeptido llamado angiotensina I. A su vez, este decapeptido es sustrato de otra enzima, la dipeptidil-dipeptidasa, cuyo producto es un octapeptido activo llamado angiotensina II.

La angiotensina II es el agente vasoconstructor más potente que se conoce. Tiene una acción constructora directa sobre el músculo liso de la pared vascular (21). El resultado de la aplicación de dosis fisiológicas de angiotensina II es un aumento en el flujo sanguíneo hacia el sistema nervioso central.

Esta hormona también actúa sobre la célula hepática através de receptores específicos, estimulando la producción de glucosa por el hígado. La modulación rápida que estas hormonas ejercen sobre el metabolismo hepático, en coordinación con los efectos que ejercen sobre otros sistemas

tales como el vascular, es fundamental para el mantenimiento de la homeostasis del organismo.

MECANISMOS DE ACCION HORMONAL

Diversas hormonas son capaces de modular el metabolismo hepático; entre éstas las más conocidas y mejor estudiadas son el glucagon y la epinefrina. También han sido estudiados algunos efectos de la vasopresina, la angiotensina II y la oxitosina (22). En la mayoría de los estudios que han sido realizados se ha enfocado el efecto glucogenolítico de estas hormonas. Es conocido que todas ellas aumentan la degradación de glucógeno hepático a través de aumentos en la cantidad de fosforilasa a en este tejido. Estos estudios también han demostrado que los mecanismos moleculares mediante los cuales estas hormonas producen el aumento en la cantidad de fosforilasa a varían, dependiendo del tipo de hormona y del tipo de receptor que la hormona active (Fig. 2). En esta sección se pretende revisar someramente la información que se tiene acerca del mecanismo de acción de cuatro hormonas previamente mencionadas.

En general, las hormonas que son capaces de producir efectos rápidos sobre la célula reaccionan con receptores específicos localizados en la cara externa de la membrana plasmática. Esta interacción produce la acumulación de algún metabolito intracelular, conocido como segundo mensajero. Los eventos moleculares que suceden entre la interacción hormona-receptor y la acumulación del segundo mensajero constituyen el "mecanismo de transducción" del receptor. Un mensajero intracelular cuya existencia ha sido claramente demostrada es el AMP cíclico (AMPC). Este nucleótido se acumula en respuesta a la acción de varias hormonas polipep-

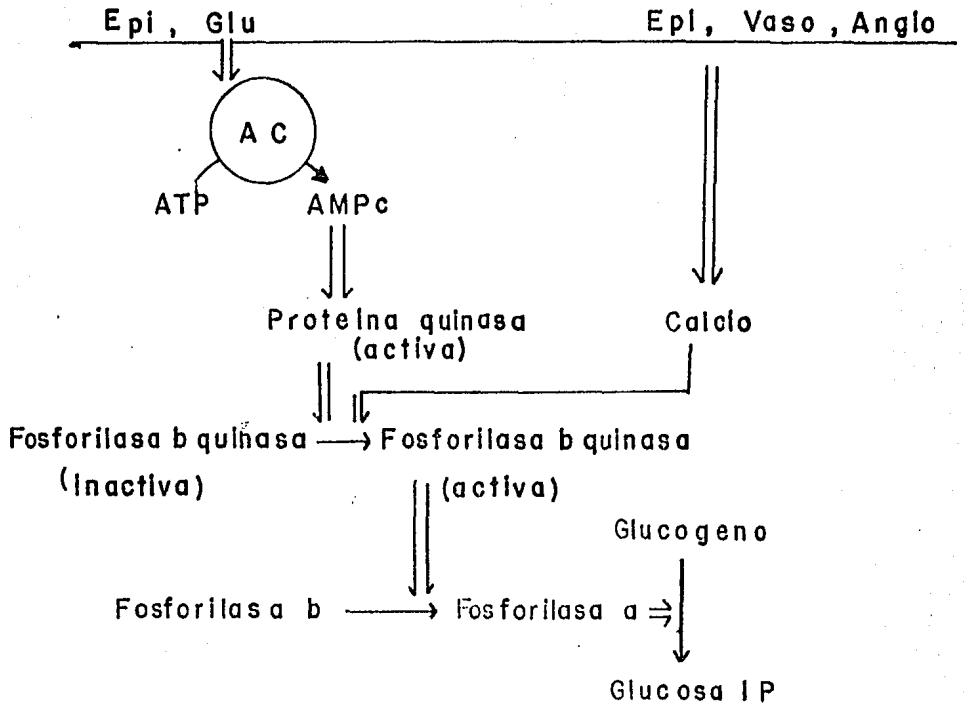


Fig. 2.- Esquema de la activación de la glucogenólisis por hormonas que actúan a través de Calcio o de AMP cíclico.

tídicas, y de algunas catecolaminas. El papel biológico del AMP cíclico fue descubierto por Sutherland y colaboradores al estudiar los efectos del glucagon y de la epinefrina en preparaciones de hígado. Estos investigadores demostraron la existencia de un factor termoestable capaz de estimular la glucogenólisis, que se acumulaba bajo la influencia de estas hormonas (7). Este factor fue identificado como AMP cíclico. La elucidación del mecanismo a través del cual el AMP cíclico es capaz de estimular la glucogenólisis fue un evento fundamental en la comprensión de la acción hormonal. El AMPc es capaz de activar una protein kinasa, la cual fosforila a la fosforilasa *b* kinasa convirtiéndola a una forma más activa (fig. 2). Esta enzima a su vez fosforila a la glucogeno fosforilasa *b* convirtiéndola a glucógeno fosforilasa *a*, que es la forma más activa de la enzima. Esta, en presencia de fosfato inorgánico, degrada el glucógeno y forma glucosa 1-P. Actualmente se reconoce que la fosforilación de proteínas es el principal mecanismo mediante el cual los eventos bioquímicos intracelulares, son controlados por estímulos externos (23).

La enzima que cataliza la formación de AMP cíclico a partir de ATP es la adenilato ciclasa, la cual se encuentra localizada en la cara interna de la membrana plasmática. El sistema a través del cual la actividad de la adenilato ciclasa es modificada por hormonas está constituido por lo menos por tres elementos: (1) Un receptor específico para la hormona; (2) un complejo protéico que acopla a este receptor con la subunidad catalítica de la ciclasa, cuya actividad está regulada por nucleótidos de guanina; (3) la subunidad catalítica de la ciclasa.

Los datos existentes muestran que el mecanismo primario a través del cual el glucagon ejerce sus efectos en sus células blanco es el de

activación del sistema adenilato ciclasa (7).

La epinefrina y la norepinefrina son las dos catecolaminas que existen en el organismo. La epinefrina funciona como una hormona circulante que es liberada por la médula suprarrenal, mientras que la norepinefrina funciona principalmente como neurotransmisor, siendo liberado por las terminales sinápticas noradrenérgicas. Ambas catecolaminas interaccionan con receptores específicos, de los cuales existen dos tipos primarios, los α adrenérgicos y los β adrenérgicos (24). La identificación inicial de estos dos subtipos de receptores se basó en estudios fisiológicos realizados por Ahlquist en una época en la cual los receptores adrenérgicos podían ser descritos únicamente en términos de la respuesta efectora: se observó que ciertos efectos adrenérgicos tales como vasoconstricción, dilatación de la pupila o excitación del músculo uterino eran estimuladas con mayor potencia por epinefrina, después por norepinefrina y muy pobremente por isoproterenol, un análogo sintético de las catecolaminas naturales. Sin embargo, otros efectos tales como vasodilatación, estimulación del músculo cardíaco e inhibición de la actividad uterina eran estimuladas con mayor potencia por isoproterenol, después por epinefrina y más pobremente por norepinefrina. Estas variaciones en la potencia relativa de los agonistas empleados se atribuyó a una diferencia bioquímica en el receptor involucrado en la mediación de estos efectos. Al primer subtipo se le denominó α y al segundo, β (24).

En estudios posteriores, ha sido posible identificar a los receptores directamente y no a través de las respuestas celulares que evocan. Esto se ha logrado mediante el empleo de agonistas y antagonistas selectivos marcados radioactivamente. Los estudios de ligamiento de estos radioligandos a células o membranas aisladas han sido útiles en la identi-

ficación, cuantificación y estudio de la regulación de los receptores adrenérgicos en tejidos animales (25).

Del conjunto de estudios fisiológicos y de ligamiento ha surgido la clasificación actual de los receptores adrenérgicos en cuatro subclases; α_1 , α_2 , β_1 y β_2 cuya presencia y número varía según el tipo celular y el estado fisiológico del organismo.

Los receptores adrenérgicos también pueden ser distinguidos con base en el mecanismo por el cual transmiten la señal de la hormona al interior de la célula, es decir, el mecanismo de transducción. Los receptores β adrenérgicos, tanto β_1 como β_2 actúan a través del sistema adenilato ciclasa, y de manera similar a la descrita para el glucagon, activan a la enzima produciendo una acumulación intracelular de AMPc (Fig. 3).

Los receptores α_2 adrenérgicos también actúan a través del sistema adenilato ciclasa pero de manera opuesta al de las aminas β adrenérgicas y del glucagon, es decir inhiben la actividad de la enzima; la estimulación del receptor α_2 adrenérgico puede contrarrestar la acción de los receptores que activan a la adenilato ciclasa (26). A diferencia de los receptores β_1 , β_2 y α_2 , los receptores α_1 no guardan ninguna relación aparente con el sistema adenilato ciclasa. La naturaleza del "segundo mensajero" producido bajo la activación del receptor α_1 adrenérgico se desconoce a la fecha, pero existe gran cantidad de evidencia experimental involucrando al calcio como mediador de las acciones α_1 adrenérgicas (27). Es conocido que la estimulación del receptor produce una elevación marcada en la concentración de calcio libre en el citoplasma de varios tipos celulares. La elevación en la concentración de este ion puede producir la activación de varias protein kinasas dependientes de calcio, una de las cuales es la fosforilasa b kinasa (Fig. 2)(28). Mediante este meca-

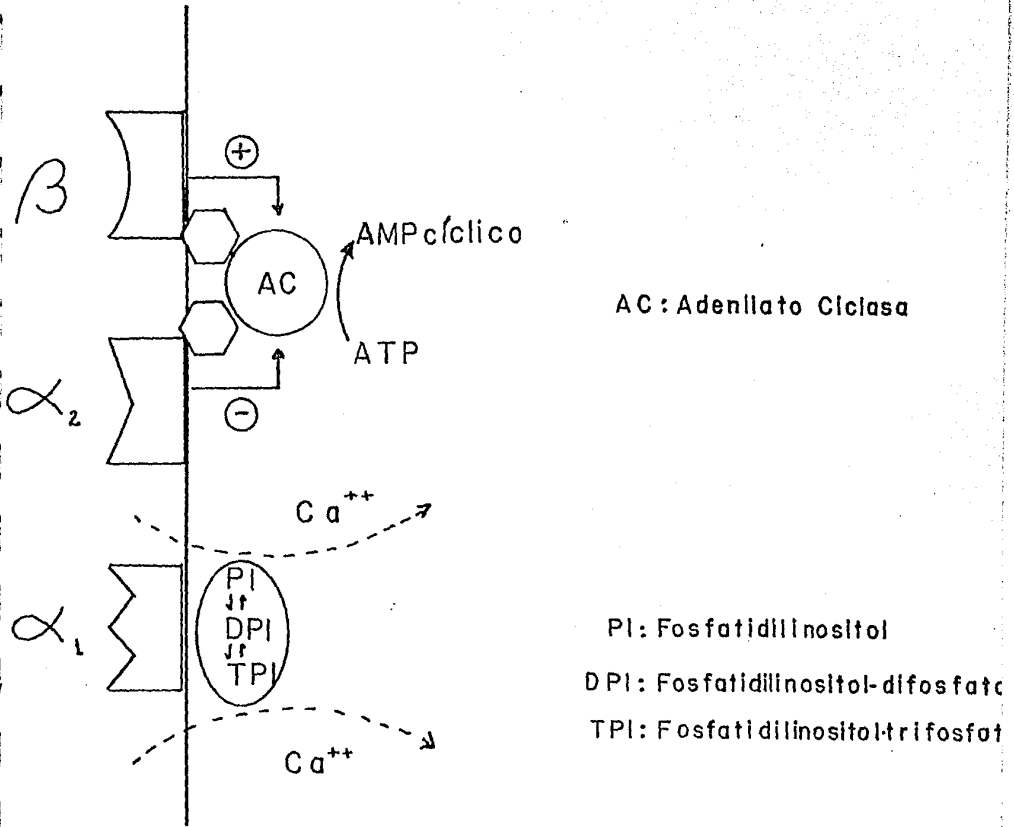


Fig. 3.- Esquema de los mecanismos de transducción asociados a los receptores adrenérgicos.

nismo la activación tanto de receptores β adrenérgicos como de receptores de tipo α_1 conduce a la estimulación de la glucogenolisis en hepatocitos. El mecanismo por medio del cual la estimulación α_1 adrenérgica produce el aumento en la concentración de calcio es desconocido. Sin embargo, existe evidencia que asocia el aumento de calcio con una rápida degradación, seguida de resíntesis, de tres fosfoinosítidos de la membrana celular, el fosfatidilinositol, el fosfatidilinositol 4 bi fosfato y el fosfatidilinositol 4,5 trifosfato. El producto de hidrólisis del fosfatidilinositol 4,5 trifosfato, el inositol 1,4,5 trifosfato podría mediar la liberación de calcio de compartimentos intracelulares tales como la mitocondria o el retículo endoplásmico. Esta hipótesis está sujeta a comprobación experimental (29).

La vasopresina, al igual que las catecolaminas, es capaz de actuar sobre sus células blanco a través de más de un tipo de receptor. Esta hormona produce un aumento en la permeabilidad de los túbulos colectores del riñón, por medio de receptores asociados en forma activatoria a la adenilato ciclasa (30). Los receptores de vasopresina en el músculo liso vascular y en el hígado no están asociadas a la adenilato ciclasa. En estos tejidos la vasopresina parece actuar aumentando los niveles intracelulares de calcio, mediante un mecanismo de transducción similar al de las aminas α_1 adrenérgicas (31).

Existe evidencia que sugiere que los efectos de la angiotensina II también pudiesen estar mediadas a través de dos tipos de receptores distintos. Esta hormona es capaz de atenuar la acumulación de AMP cíclico producida por glucagon en hepatocitos, y también es capaz de aumentar los niveles citoplasmáticos de calcio a través de un mecanismo similar al de las aminas α_1 adrenérgicas y la vasopresina, asociado al recambio de los

polifosfoinosítidos de la membrana plasmática (32,33).

MODULACION HORMONAL DE LA UREOGENESIS

La mayor parte de los estudios sobre los efectos de estas hormonas en el hígado se han avocado a las acciones glucogenolíticas de ellas, específicamente a la activación de la fosforilasa del glucógeno. Sin embargo, la producción de glucosa por el hígado puede estar proporcionada por dos mecanismos. Uno es la glucogenólisis y el otro es la síntesis de glucosa a partir de sustratos distintos a los carbohidratos mediante el proceso de gluconeogenesis. Este proceso cobra gran importancia en condiciones en las cuales hay una rápida depleción del glucógeno hepático, como podrían ser un ayuno de más de 12 horas, o situaciones de stress agudo como las descritas previamente. Bajo estas condiciones, el aporte de glucosa al sistema nervioso está proporcionado por la síntesis de este carbohidrato a partir de tres fuentes fundamentales; el glicerol, el ácido láctico y los aminoácidos producidos en la degradación de proteínas.

Los efectos gluconeogénicos del glucagón, la epinefrina la vasopresina y la angiotensina II han sido descritos (34). Sin embargo, el mecanismo a través del cual estas hormonas estimulan las enzimas limitantes en la vía gluconeogénica no se conoce de una manera tan precisa como el mecanismo de estimulación de la glucogenólisis.

La estimulación de la gluconeogenesis a partir de aminoácidos tiene como consecuencia inmediata un incremento en la cantidad de amonio libre formado a partir de la deaminación de estos precursores. La cantidad de urea formada aumenta en este tipo de condiciones fisiológicas en las -

cuales es necesaria una movilización de aminoácidos de las proteínas periféricas hacia el hígado. De aquí se hace aparente que los procesos que conducen a una estimulación de la gluconeogenesis deben producir una estimulación paralela del flujo a través del ciclo de la urea. La estimulación de la ureogenesis por el glucagon y la epinefrina ha sido documentada(35,36). Sin embargo, no se conoce el papel de hormonas tales como la vasopresina o la angiotensina II en la actividad de la vía ureogénica. El mecanismo a través del cual estas hormonas estimulan los pasos limitantes de la ureogenesis es desconocido.

La presente tesis está constituida por cuatro publicaciones. Como puede apreciarse todos estos trabajos confluyen en un interés general amplio: conocer la regulación hormonal de la ureogénesis, los mecanismos involucrados en dicha regulación y los mecanismos de acción de estas hormonas. En el primer trabajo se caracteriza cual de los distintos subtipos de receptores adrenérgicos presentes en el hígado media la estimulación de la síntesis de urea producida por la epinefrina, en el animal adulto. Los subtipos de receptores adrenérgicos que median las respuestas metabólicas a la epinefrina pueden variar en función de diversos factores. En el segundo trabajo se describe como la edad del animal es un factor que influye en el subtipo de receptor involucrado en la estimulación de la ureogenesis por epinefrina. En el tercer trabajo, se describen por primera vez los efectos ureogénicos de los dos péptidos vasopresores, la vasopresina y la angiotensina II. Se analiza el papel del calcio en la producción de los efectos ureogénicos del glucagon, de la epinefrina y de los dos péptidos vasopresores. Se localiza en la mitocondria uno de los sitios de estimulación de la vía ureogénica, en virtud de que las cuatro hormonas estudiadas producen un incremento en la capacidad de sín-

tesis de citrulina por estos organelos.

En el cuarto trabajo, se identifica a la glutaminasa mitocondrial como una de las enzimas involucradas en la estimulación hormonal de la ureogenesis.

ASPECTOS METODOLOGICOS

En general, los experimentos fueron realizados empleando hepatocitos aislados de ratas hembras de la cepa Wistar. Las células obtenidas fueron incubadas en presencia o ausencia de los agentes cuyos efectos se estudiaron. Los parámetros cuantificados en los cuatro trabajos fueron: 1) producción de urea a partir de glutamina; 2) acumulación de AMP cíclico; 3) marcaje de fosfatidilinositol con $^{32}\text{(P)}\text{P}_i$; 4) Producción de citrulina en mitocondrias aisladas de células; 5) Actividad de glutaminasa mitocondrial.

A continuación se detallan los métodos empleados:

Aislamiento de las células: Los hepatocitos fueron aislados empleando la técnica enzimática descrita por Berry y Friend en 1969 (37). El fundamento de esta técnica consiste en exponer al máximo los espacios intercelulares del hígado a la acción de la colagenasa, la cual degrada gran parte de los elementos adhesivos presentes entre células. Esto se logra por medio de la infusión continua, a través de la vena porta, de un medio salino amortiguado en el cual se encuentra disuelta la colagenasa. El medio empleado en estos experimentos fue el Krebs-Ringer bicarbonato, constituido por NaCl 120 mM, KCl 4.75 mM, KH_2PO_4 1.2 mM, MgSO_4 1.2 mM, NaHCO_3 12 mM y CaCl_2 1.27 mM, ajustado a pH 7.4 a 37°C equilibrado con O_2/CO_2 (95% / 5%).

Este medio, con colagenasa, es recirculado hasta que la consistencia del hígado se vuelve blanda, y éste se desintegra fácilmente al presionarlo con una espátula. El tejido dispersado se filtra a través de una malla de nylon, y la suspensión de células así obtenida se centrifuga a baja velocidad. El sobrenadante se descarta y las células se resuspenden en

medio fresco suplementado con albumina bovina al 1%.

El aparato que se utiliza para la perfusión se muestra en la fig. 4. Está constituido por tres recipientes de vidrio, de doble pared, una bomba de recirculación de agua, una bomba peristáltica y tubería de hule y tygon.

Producción de Urea por células aisladas: Alicuotas de la suspensión de hepatocitos fueron agregadas a tubos de plástico en los cuales se encontraba Ringer Krebs suplementado con albumina 1%, y con glutamina, ornitina y glucosa para dar una concentración final de 10, 2 y 10 mM respectivamente. Los agentes cuyos efectos fueron estudiados también se agregaron desde el inicio de las incubaciones. Los tubos fueron tapados e incubados en un baño de agitación a 37°C, durante 60 minutos. Al final de la incubación, la urea producida fue cuantificada mediante la técnica descrita por Gutman y Bergmeyer (38). Esta técnica consiste en incubar alicuotas del sobrenadante de las células en presencia de ureasa, con lo cual se obtiene la hidrólisis de la urea presente, dando una cantidad proporcional de amonio. Este es cuantificado mediante la técnica colorimétrica basada en la reacción de Berthelot, en la cual se forma azul de indofenol.

Acumulación de AMP cíclico: Las células fueron incubadas durante 2 minutos en presencia o ausencia de los agentes estudiados en el mismo medio descrito anteriormente suplementado con Teofilina. Esta metilxantina inhibe la actividad de la fosfodiesterasa, enzima que rompe el AMP cíclico, y permite que los niveles alcanzados por el nucleótido se mantengan por tiempos más prolongados. El AMP cíclico fue determinado en extractos ácidos

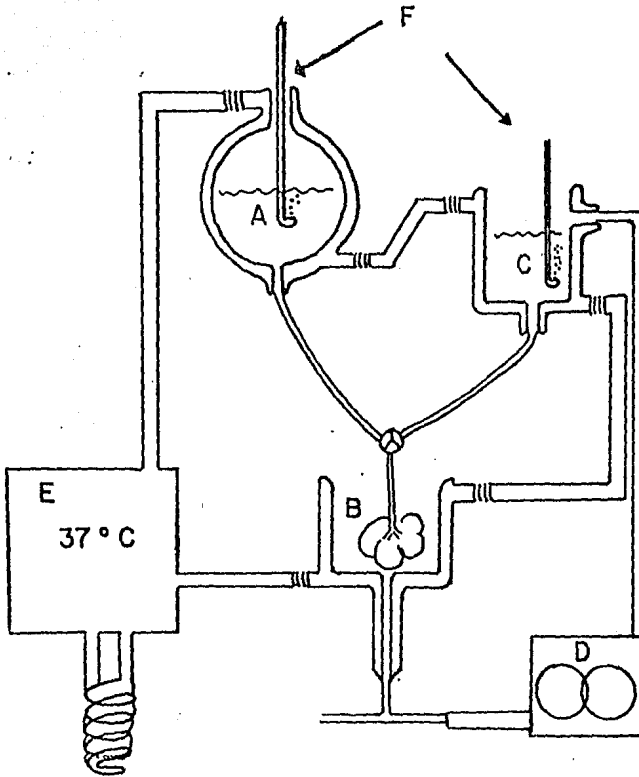


Fig. 4.- Aparato de perfusión empleado para el aislamiento de células.

En el recipiente de doble pared A contiene Ringer Krebs libre de Ca^{++} con lo cual se perfunde inicialmente el hígado aislado, que se coloca en el recipiente B. El medio se desecha después de su paso por el hígado. Después se continúa la perfusión con Ringer Krebs con Ca^{++} y colagenasa contenido en el recipiente C. Este se recircula mediante una bomba peristáltica (D). La temperatura se mantiene mediante la recirculación de agua a 37°C por la doble pared de los recipientes. Los medios se mantienen saturados de O_2/CO_2 mediante burbujeo (F).

neutralizados de las suspensiones celulares. La técnica empleada fue la descrita por Brown (39), basada en un ensayo de saturación de los sitios específicos para AMP cíclico presentes en la proteína kinasa. La magnitud del desplazamiento del pegado de una cantidad conocida de [3 H]AMPc por el AMP cíclico presente en los extractos, es una medida de la cantidad de AMP cíclico presente.

Marcaje de fosfatidilinositol : Los efectos de los agentes estudiados sobre la incorporación de [32 P]Pi a fosfatidilinositol fue estudiada. Las células se incubaron durante 60 minutos en el medio descrito previamente suplementado con [32 P]Pi. Al final de la incubación, los lípidos celulares fueron extraídos con cloroformo: metanol (2:1). Los distintos fosfolípidos fueron separados mediante cromatografía en placa fina (40). La cantidad de fosforo incorporado a cada fosfolípido se cuantificó contando la radioactividad presente en el polvo de Silica gel de cada mancha empleando un contador de centelleo.

Síntesis de citrulina por mitocondrias : Para estudiar los efectos de los agentes empleados sobre la capacidad de síntesis de citrulina por las mitocondrias, se empleó un extracto mitocondrial crudo preparado a partir de hepatocitos aislados.- Las células fueron incubadas en presencia o ausencia de las hormonas durante 10 minutos. Al final de esta incubación, las suspensiones se centrifugaron, se descartó el sobrenadante y las células se lavaron con un medio constituido por Manitol 250 mM, Tris-HCl 20 mM y EGTA 1 mM pH 7.4 a 4°C. El extracto crudo de mitocondrias se obtuvo homogenizando suavemente las células en presencia de digitonina, diluyendo y centrifugando los homogenados a baja velocidad. Menos del 10%

de la actividad de enzimas citoplasmicas permanece en el precipitado, que a su vez muestra un enriquecimiento de actividad enzimática mitocondrial (41). Alicuotas de esta preparación mitocondrial se incubaron a 25°C pH 7.4 durante 10 minutos en un medio conteniendo como fuentes de amonio NH_4Cl 10 mM o glutamina 10 mM según lo indicado en cada experimento. La cantidad de citrulina formada fue cuantificada en extractos ácidos neutralizados de la suspensión de mitocondrias, empleando el método colorimétrico descrito por Ceriotti y Gazaniga, modificado por Prescott y Jones (42).

Actividad de glutaminasa mitocondrial : La actividad de glutaminasa fue medida en preparaciones crudas de mitocondrias aisladas de células que fueron incubadas por 10 min en presencia o ausencia de los agentes estudiados. La técnica de aislamiento de mitocondrias usada fue la descrita previamente. La actividad de glutaminasa fue estimada mediante la cuantificación del glutamato producido a partir de glutamina durante 10 minutos, por alicuotas del extracto mitocondrial incubadas en un medio conteniendo glutamina 20 mM. Después de la incubación, el glutamato formado fue cuantificado mediante la técnica enzimática descrita por Bernt y Bergmeyer (43). En esta técnica, el glutamato es sometido a la acción de la deshidrogenasa glutámica, con la consecuente formación de NADH. La cantidad de NADH formada se estima midiendo el cambio de densidad óptica a 340 mμ.

Short communication

α_1 -ADRENOCEPTOR ACTIVATION STIMULATES UREOGENESIS IN RAT HEPATOCYTES

SILVIA CORVERA * and J. ADOLFO GARCÍA-SÁINZ **, ***

*Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina and ** Departamento de Bioenergética, Centro de Investigaciones en Fisiología Celular; Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-600, México 20, D.F.

Received 6 May 1981, accepted 12 May 1981

S. CORVERA and J.A. GARCÍA-SÁINZ, α_1 -Adrenoceptor activation stimulates ureogenesis in rat hepatocytes, European J. Pharmacol. 72 (1981) 387-390.

Epinephrine produced a dose-dependent stimulation of ureogenesis. Epinephrine action was unaffected by the β -adrenergic antagonist propranolol but was blocked by the α -adrenergic antagonists prazosin and yohimbine. Prazosin was approximately 3 orders of magnitude more potent than yohimbine, indicating that the adrenoceptor involved in this action is of the α_1 -subtype.

α_1 -Adrenoceptors Ureogenesis Hepatocytes

1. Introduction

It has been found that epinephrine stimulates ureogenesis in isolated hepatocytes through an α -adrenergic mechanism (Titheradge and Haynes, 1980). α -Adrenergic receptors have been divided into α_1 - and α_2 -subtypes, according to the order to potency of selective agonists and antagonists (Berthelson and Pettinger, 1977) and more recently by their association to specific effector systems (Fain and García-Sáinz, 1980; García-Sáinz et al., 1980). Prazosin and yohimbine have been the most useful agents for the pharmacological demarcation of α_1 - and α_2 -adrenergic receptors and actions. Prazosin is approximately 3 orders of magnitude more potent at α_1 - than at α_2 -adrenoceptors whereas yohimbine is more potent at α_2 -adrenoceptors (Berthelson and Pettinger, 1977; Aggerbeck et al., 1980; García-Sáinz et al., 1980; Hoffman et al.,

1980). Adrenoceptors of the α_1 -subtype are not linked to adenylate cyclase whereas α_2 -adrenoceptors are linked to the cyclase in an inhibitory fashion (Fain and García-Sáinz, 1980; García-Sáinz et al., 1980). α_1 -Adrenergic actions seem to involve in their mechanism of signal transduction the turnover of phosphatidylinositol and changes in the cytoplasmic concentration of calcium (Fain and García-Sáinz, 1980; García-Sáinz et al., 1980). α_2 -Adrenergic actions seem to be mediated by a decrease in cyclic AMP (Fain and García-Sáinz, 1980; García-Sáinz et al., 1980). Both α_1 - and α_2 -adrenoceptor subtypes have been detected in rat hepatocytes (Hoffman et al., 1980). The present data indicate that α_1 -adrenergic receptors are involved in the stimulation of ureogenesis by epinephrine in rat hepatocytes.

2. Materials and methods

L-Epinephrine, yohimbine HCl and urease (type 3) were obtained from Sigma Chemical Co. Bovine serum albumin (fraction V, lot U

*** To whom correspondence should be sent: Apartado Postal 70-600, México 20, D.F., México.

13707) and collagenase (lot 40C190) were obtained from Reheis Chemical Co. and Worthington, respectively. Prazosin was a generous gift from Pfizer Inc.

Female Wistar rats (180-200 g) fed ad libitum were used. Hepatocytes were isolated by the method of Berry and Friend (1969) as modified by Tolbert et al. (1980). Hepatocytes were suspended in Krebs Ringer bicarbonate buffer at pH 7.4, saturated with O_2/CO_2 (95%-5%), at 37°C and supplemented with 1% albumin, 10 mM glucose, 10 mM glutamine, 10 mM malate and 2 mM ornithine. Aliquots of the cell suspension (0.5 ml containing 35-40 mg of cells wet weight) were added to plastic tubes containing 0.5 ml of the suspending medium and the agents to be tested. Cells were incubated for 60 min in a water bath shaker at 37°C under an O_2/CO_2 (95%-5%) atmosphere. The incubation was stopped by adding perchloric acid (final concentration 6% w/v). Extracts were neutralized and assayed for urea (Gutman and Bergmeyer, 1974).

3. Results

The time course of the epinephrine effect on urea production was examined. The results described below are the means \pm S.E.M. of duplicates from 3 cell preparations. The basal amount of urea was 4.65 ± 0.15 nmol/mg of cells wet weight. After 20 min of incubation there was a significant ($P < 0.001$) stimulation of ureogenesis by epinephrine (10^{-5} M), 10.57 ± 0.26 compared to 12.59 ± 0.29 nmol/mg of cells wet weight, control cells and cells stimulated by epinephrine respectively. Epinephrine stimulation of ureogenesis was greater at 30 min (13.85 ± 0.23 compared to 18.60 ± 0.77 nmol/mg of cells wet weight, control cells and cells stimulated by epinephrine respectively, $P < 0.001$) and at 60 min (30.92 ± 0.19 compared to 42.05 ± 0.93 nmol/mg of cells wet weight, control cells and cells stimulated by epinephrine respectively, $P < 0.001$). All further experiments were carried

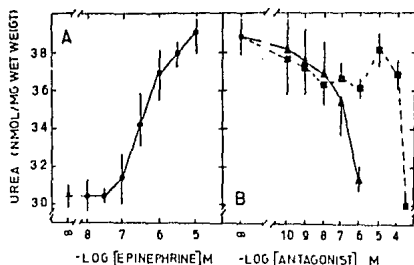


Fig. 1. Panel A. Dose-response curve for epinephrine action on ureogenesis. Hepatocytes were incubated for 60 min in the absence (star) or presence (circles) of different concentrations of epinephrine. Results are given as the means and vertical lines represent the S.E.M. of triplicates from 3-6 cell preparations. Panel B. Inhibition of epinephrine stimulation of ureogenesis by α -adrenergic antagonists. Hepatocytes were incubated for 60 min with epinephrine $10 \mu M$ (circle) and different concentrations of prazosin (triangles, solid line) or yohimbine (squares, broken line). Results are given as the means and vertical lines represent the S.E.M. of triplicates from 5-7 cell preparations.

out for 60 min. The effect of epinephrine on urea production was dose-dependent (fig. 1). The stimulation produced by $10 \mu M$ epinephrine was not affected by the β -adrenergic

TABLE 1

Effect of epinephrine and adrenergic antagonists on urea production in isolated rat hepatocytes. Hepatocytes were incubated for 60 min. Results are expressed as the means \pm S.E.M. of triplicates from 5-7 cell preparations.

Addition	Urea (nmol/mg of cells wet weight)
None	30.37 ± 0.66
Epinephrine 10^{-5} M	38.73 ± 1.08
Epinephrine 10^{-5} M + propranolol 10^{-5} M	39.81 ± 0.98
Epinephrine 10^{-5} M + prazosin 10^{-6} M	31.26 ± 0.78
Epinephrine 10^{-5} M + yohimbine 3×10^{-4} M	30.72 ± 0.92
Propranolol 10^{-5} M	29.91 ± 2.40
Prazosin 10^{-6} M	31.77 ± 0.90
Yohimbine 3×10^{-4} M	28.11 ± 0.55

antagonist propranolol (table 1) but was inhibited by the α -adrenergic antagonists prazosin and yohimbine (fig. 1 and table 1). Prazosin was approximately three orders of magnitude more potent than yohimbine (fig. 1). Prazosin (10^{-6} M) and yohimbine (3×10^{-4} M) were without effect on basal urea production (table 1).

4. Discussion

Both α_1 - and α_2 -adrenoceptors seem to be present in rat hepatocytes (Hoffman et al., 1980). α_1 -Adrenoceptors represent approximately 80% of the total α -adrenergic receptors in this cell (Hoffman et al., 1980). Prazosin and yohimbine are selective antagonists for α_1 - and α_2 -adrenoceptors respectively (Berthelson and Pettinger, 1977; Hoffman et al., 1980). The present results suggest that the α -adrenoceptors involved in the stimulation of ureogenesis by epinephrine are of the α_1 -subtype.

Our results are similar to those of Tolbert et al. (1980) who found that prazosin was much more potent than yohimbine in inhibiting the stimulation of phosphatidylinositol labelling due to epinephrine. They are also consistent with the data of Hoffman et al. (1980) and Aggerbeck et al. (1980) who found that prazosin was approximately 3 orders of magnitude more potent than yohimbine in blocking the activation of phosphorylase by epinephrine. Furthermore, Kneer et al. (1980) reported that prazosin inhibited the stimulation of gluconeogenesis by epinephrine at concentrations similar to those required to block the stimulation of ureogenesis by the hormone.

It has been proposed that α_1 -adrenoceptors act through calcium signalling, whereas α_2 - and β -adrenoceptors act through adenylate cyclase, in inhibitory and stimulatory fashions respectively (Fain and García-Sáinz, 1980). Knowledge of the nature of the receptor involved, together with information on their respective association with distinct effector

systems, suggests possible mechanism(s) by which hormonal stimulation of metabolic pathways may be accomplished. The results reported here suggest that modifications in the cytosol calcium concentration may be of importance in the modulation of urea biosynthesis in rat hepatocytes.

Other actions of epinephrine such as stimulation of glycogenolysis (glycogen phosphorylase activation) (Aggerbeck et al., 1980; Hoffman et al., 1980) gluconeogenesis (Kneer et al., 1980) and labelling of phosphatidylinositol (Tolbert et al., 1980) are also mediated by activation of α_1 -adrenoceptors. No metabolic action due to activation of α_2 -adrenoceptors in hepatocytes has been reported yet and their physiological significance remains uncertain.

Acknowledgements

This research was partially supported by a grant from 'Fondo de Estudios e Investigaciones Ricardo J. Zevada'. The authors want to thank Dr. E. Hong and Dr. E. Piña for the generous gifts of some of the substances used in these studies.

References

- Aggerbeck, M., G. Guellaen and J. Hanoune, 1980, Adrenergic receptor of the α_1 -subtype mediates the activation of glycogen phosphorylase in normal rat liver, *Biochem. Pharmacol.* 29, 643.
- Berry, M.N. and D.S. Friend, 1969, High yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells, *J. Cell. Biol.* 43, 506.
- Berthelson, S. and W.A. Pettinger, 1977, A functional basis for the classification of α -adrenergic receptors, *Life Sci.* 21, 595.
- Fain, J.N. and J.A. García-Sáinz, 1980, Role of phosphatidylinositol turnover in α_1 - and adenylate cyclase inhibition in α_2 -effects of catecholamines, *Life Sci.* 26, 1183.
- García-Sáinz, J.A., B.B. Hoffman, S. Li, R.J. Lefkowitz and J.N. Fain, 1980, Role of α_1 -adrenoceptors in the turnover of phosphatidylinositol and of α_2 -adrenoceptors in the regulation of cyclic AMP accumulation in hamster adipocytes, *Life Sci.* 27, 953.

- Gutman, I. and H.U. Bergmeyer, 1974, Urea in: *Methods of Enzymatic Analysis*, ed. H.U. Bergmeyer (Academic Press, New York) p. 1791.
- Hoffman, B.B., T. Michel, D.M. Kilpatrick, R.J. Lefkowitz, M.E.M. Tolbert, H. Gilman and J.N. Fain, 1980, Agonist versus antagonist binding to α -adrenergic receptors, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77, 4569.
- Kneer, N.M., M.J. Wagner and H.A. Lardy, 1979, Regulation by calcium of hormonal effects on gluconeogenesis, *J. Biol. Chem.* 254, 12160.
- Titheradge, M.A. and R.C. Haynes, 1980, The hormonal stimulation of ureogenesis in isolated hepatocytes through increases in mitochondrial ATP production, *Arch. Biochem. Biophys.* 201, 44.
- Tolbert, M.E.M., A.C. White, K. Aspry, J. Cutts and J.N. Fain, 1980, Stimulation by vasopressin and α -catecholamines of phosphatidylinositol formation in isolated rat liver parenchymal cells, *J. Biol. Chem.* 255, 1938.

Short communication

STIMULATION OF UREOGENESIS THROUGH α_1 - and β -ADRENOCEPTORS IN JUVENILE RAT HEPATOCYTES

SILVIA CORVERA *, JUDITH HUERTA-BAHENA * and J. ADOLFO GARCÍA-SÁINZ **¹

* Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina and ** Departamento de Bioenergética, Centro de Investigaciones en Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-600, 04510, México, D.F., México

Received 9 June 1982, accepted 14 June 1982

S. CORVERA, J. HUERTA-BAHENA and J.A. GARCÍA-SÁINZ, *Stimulation of ureogenesis through α_1 - and β -adrenoceptors in juvenile rat hepatocytes*, European J. Pharmacol. 82 (1982) 89-91.

The adrenoceptors involved in the stimulation of ureogenesis by epinephrine in hepatocytes from young rats were studied. It was found that both α_1 - and β -adrenoceptors are involved in this stimulation. This is in contrast with the results obtained using hepatocytes from older animals in which the effect is of pure α_1 -adrenergic nature. Our results indicate that there are age-dependent modifications in hepatic adrenergic responsiveness.

α_1 -Adrenoceptors β -Adrenoceptors Ureogenesis Age

1. Introduction

It was recently reported that the α -adrenoceptor involved in the stimulation of ureogenesis by epinephrine is of the α_1 -subtype (Corvera and García-Sáinz, 1981). It was shown that this stimulation of ureogenesis was not affected by the β -adrenergic antagonist propranolol and was completely blocked by the selective α_1 -adrenergic antagonist prazosin (Corvera and García-Sáinz, 1981). Blair et al. (1979) have reported variations in hepatic α - and β -adrenergic responsiveness with age; they found that both α - and β -adrenergic receptors are involved in the catecholamine-mediated hepatic glucose output by hepatocytes of young rats. This paper describes the involvement of β -adrenoceptors in the stimulation of urea biosynthesis by epinephrine in hepatocytes of young rats.

2. Materials and methods

l-Epinephrine, urease (type III), dl-propranolol, l-phenylephrine and l-isoproterenol were obtained

¹ To whom all correspondence should be addressed: Apartado Postal 70-600, 04510 México, D.F., México.

from Sigma Chemical Co. Bovine serum albumin (fraction V, lot U3707) and collagenase (lot 40C190) were obtained from Rebeis Chem. Co. and Worthington respectively. Prazosin was a generous gift from Pfizer, Inc.

Female Wistar rats, 27-35 day old, weighing 100-150 g, fed ad libitum were used. Hepatocytes were isolated by the method of Berry and Friend (1969) as modified by Tolbert et al. (1980). Incubations were done as previously described (Corvera and García-Sáinz, 1981), in Krebs Ringer bicarbonate buffer, supplemented with 10 mM glucose, 10 mM glutamine, and 2 mM ornithine, adjusted to pH 7.4 at 37°C, saturated with O₂/CO₂ (95%-5%). Urea was assayed in neutralized perchloric acid extracts (Gutman and Bergmeyer, 1974). Statistical significance of the differences between comparable groups was determined by the Student's t-test.

3. Results

Epinephrine stimulates urea biosynthesis in a dose-dependent fashion (Corvera and García-Sáinz, 1981). Maximal stimulation of urea bio-

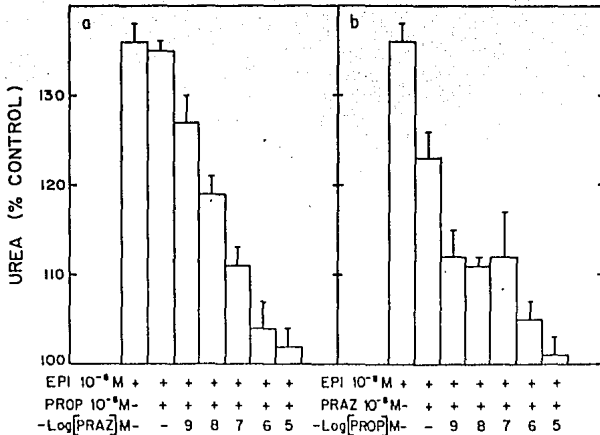


Fig. 1. Stimulation of urea biosynthesis by epinephrine and antagonism by prazosin and propranolol. Hepatocytes were incubated for 60 min in the presence or absence of adrenergic agents as indicated under each bar. Results are expressed as % of control value. The bars represent the means and vertical lines represent the S.E.M. of duplicate determinations from 3-8 cell preparations. Control production of urea was 28.8 ± 1.9 nmol/mg of cells wet weight (mean \pm S.E.M., $n=8$). Prazosin and propranolol alone were without effect on urea production but the data have been omitted for clarity. EPI, epinephrine; PROP, propranolol; PRAZ, prazosin.

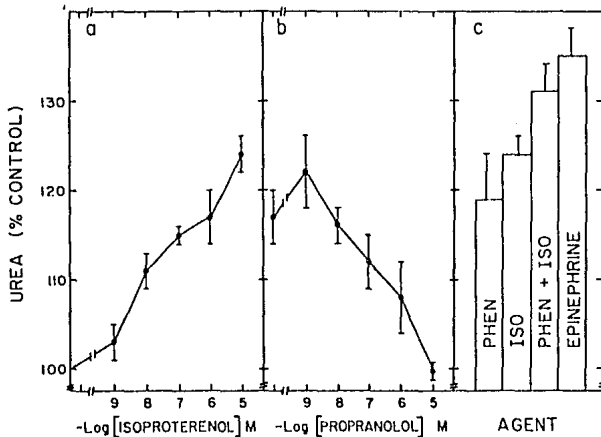


Fig. 2. Stimulation of urea biosynthesis by adrenergic agonists. Hepatocytes were incubated for 60 min in the presence or absence of adrenergic agents. Panel a: dose-response curve for isoproterenol; panel b: antagonism of isoproterenol action (10^{-6} M) by propranolol; panel c: effect of adrenergic agonists, PHEN, phenylephrine 10^{-5} M; ISO, isoproterenol 10^{-5} M; EPI, epinephrine 10^{-5} M. Other indications as in fig. 1.

synthesis by epinephrine was not significantly modified by the β -adrenergic antagonist propranolol. In the presence of propranolol (10^{-5} M), prazosin antagonized the action of epinephrine in a dose-dependent manner (fig. 1). The effect of epinephrine was completely blocked by 10^{-5} M prazosin. Prazosin alone (10^{-5} M) significantly diminished ($P < 0.001$) the effect of epinephrine, but did not abolish it, i.e., a residual 23% stimulation over control ($P < 0.005$) was observed. This residual stimulation was antagonized by propranolol in a dose-dependent fashion, being completely abolished at a concentration of 10^{-5} M (fig. 1).

The effects of the adrenergic agonists isoproterenol and phenylephrine were also studied. A dose-response curve for the β -adrenoceptor agonist, isoproterenol, is shown in fig. 2 (panel a). The effect of isoproterenol was unaffected by prazosin (data not shown) but was antagonized and completely abolished by propranolol (fig. 2 panel b). The effects produced by maximally effective concentrations of isoproterenol, epinephrine or phenylephrine were compared with the effect produced by the addition of both phenylephrine and isoproterenol (fig. 2, panel c). Phenylephrine, which preferentially stimulates α -adrenoceptors, was less effective than isoproterenol for stimulating ureogenesis. When both agents were added to the cells, the effect obtained was consistently greater than the effect of any of the agents alone, and comparable to that produced by epinephrine (fig. 2). In mature rats (> 80 days old, weighing > 200 g) prazosin completely abolished the effect of epinephrine, and isoproterenol was without effect (data not shown).

4. Discussion

The stimulation of urea biosynthesis by epinephrine in hepatocytes obtained from mature rats is a pure α_1 -adrenergic effect which is completely blocked by prazosin (Corvera and García-Sáinz, 1981). The data presented in this paper demonstrate the existence of a β -adrenergic component in the action of epinephrine on ureogenesis in hepatocytes from young rats. Although both receptors are involved in the adrenergic stimulation of ureogenesis, stimulation of the α_1 -receptor alone by epinephrine seems to be enough to elicit the

maximal response. The β -adrenergic component of epinephrine action becomes apparent only when the α_1 -receptor is blocked; this residual response is of the same magnitude as the maximal response obtained with isoproterenol. This suggests that, even in young rats where the presence of functional adrenoceptors can be demonstrated, the ureogenic effect of epinephrine is mediated primarily through the α_1 -adrenoceptor system.

Phenylephrine preferentially stimulates α -adrenoceptors although it is less effective than epinephrine. When both isoproterenol and phenylephrine were added to the cells, the effect was of similar magnitude to that produced by epinephrine. This suggests that both α_1 - and β -adrenoceptors may contribute to produce maximal adrenergic stimulation of urea biosynthesis in hepatocytes from young animals. Our data are in agreement with those of Blair et al. (1979) and support the suggestion that maturation of the rat is accompanied by loss of functional β -adrenoceptors in the liver. However, the contribution of the β -adrenoceptor system in the ureogenic response to epinephrine seems to be small.

Acknowledgements

The authors want to thank Drs. E. Piña, A. Peña and A. Cárabez for letting them use some of the equipment available in their laboratories. This work was partially supported by a Grant from the Fondo de Estudios e Investigaciones 'Ricardo J. Zevada'.

References

- Berry, M.N. and D.S. Friend, 1969, High yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells, *J. Cell. Biol.* 43, 506.
- Blair, J.B., M.E. James and J.L. Foster, 1979, Adrenergic control of glucose output and adenosine 3',5'-monophosphate levels in hepatocytes from juvenile and adult rats, *J. Biol. Chem.* 254, 7579.
- Corvera, S. and J.A. García-Sáinz, 1981, α_1 -Adrenoceptor activation stimulates ureogenesis in rat hepatocytes, *European J. Pharmacol.* 72, 387.
- Gutman, I. and H.V. Bergmeyer, 1974, Urea, in: *Methods of Enzymatic Analysis*, ed. H.U. Bergmeyer (Academic Press, New York) p. 1791.
- Tolbert, M.E.M., A.C. White, K. Aspry, J. Cutts and J.N. Fain, 1980, Stimulation by vasopressin and catecholamines of phosphatidylinositol formation in isolated rat liver parenchymal cells, *J. Biol. Chem.* 255, 1938.

VASOPRESSIN AND ANGIOTENSIN II STIMULATE UROGENESIS THROUGH INCREASED
MITOCHONDRIAL CITRULLINE PRODUCTION.

Silvia Corvera* and J. Adolfo García-Sáinz**

*Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina and **Departamento de Bioenergética, Centro de Investigaciones en Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México. Apartado Postal 70-600, 04510, México, D.F.

(Received in final form August 17, 1982)

Summary

Vasopressin, angiotensin II, glucagon and epinephrine (through a cAMP-independent, alphaadrenergic mechanism), stimulate ureogenesis in isolated rat hepatocytes. Mitochondria, isolated from hepatocytes which were previously treated with these hormones, displayed an enhanced rate of citrulline synthesis in the presence of NH_4Cl as the nitrogen source. When mitochondria were incubated with glutamine as the nitrogen source, only those mitochondria isolated from hepatocytes previously treated with epinephrine or glucagon displayed an enhanced capacity to synthesize citrulline.

When cells were incubated in the absence of extracellular calcium, the effects of vasopressin and angiotensin II on urea synthesis were abolished, whereas those of epinephrine and glucagon were only diminished. Mitochondria isolated from cells incubated under these conditions, showed that the effect of all these hormones on citrulline synthesis could still be observed. However, the effects of glucagon and epinephrine plus propranolol were larger than those of angiotensin II or vasopressin.

Phosphatidylinositol labeling was significantly increased by epinephrine, vasopressin and angiotensin II both in the absence or presence of calcium. Cyclic AMP levels were significantly increased by glucagon or epinephrine but not by vasopressin or angiotensin II. The effect of epinephrine on cyclic AMP levels was blocked by propranolol both in the absence or presence of calcium.

It is well known that catecholamines and glucagon stimulate ureogenesis in rat hepatocytes (1-3). Mitochondria isolated from hepatocytes treated with these hormones display an increased rate of citrulline synthesis (2,4). The alpha adrenoceptor involved in the stimulation of ureogenesis by epinephrine is of the alpha₁ subtype (3). Activation of alpha₁ adrenoceptors produces an increase in phosphatidylinositol turnover (5) and changes in calcium fluxes, leading to an increase in cytosolic calcium concentration (6-8). This seems to be the signalling mechanism following alpha adrenoceptor stimulation (9,10). Two vasopressor hormones, vasopressin and angiotensin II seem to share this signalling mechanism (5,11). The possibility that these two vasopressor hormones might stimulate ureogenesis through an enhanced rate of citrulline production was explored. In this paper, the stimulatory effects of vasopressin and angiotensin II on urea biosynthesis in rat hepatocytes, and on citrulline formation in mitochondria isolated from hormone-treated hepatocytes, is reported. The role of extracellular calcium in these two effects is also presented.

** to whom correspondence should be addressed.

Materials and Methods

1-Epinephrine, dl-propranolol, angiotensin II, arginine-vasopressin, urease and rotenone were obtained from Sigma Chem. Co. Glucagon was a gift from Eli Lilly. Collagenase and bovine serum albumin (fraction V) were obtained from Worthington and Reheis, respectively. [32 P]Pi (carrier free) was obtained from New England Nuclear.

Experiments were performed with female Wistar rats (200g) fed ad libitum with Purina rat chow. Hepatocytes were isolated by the method of Berry and Friend (12) as modified by Tolbert *et al* (5). Cells (40 mg wet wt.) were incubated in 1 ml Krebs Ringer bicarbonate buffer, saturated with O_2/CO_2 (95%/5%), pH 7.4 at 37°C, supplemented with 10 mM glucose, 10 mM glutamine, 2 mM ornithine and 1% bovine serum albumin. Incubations were carried out for 60 min in the presence or absence of the hormones. Urea was determined in neutralized perchloric acid extracts of the cell suspensions (13). Ammonia blanks showed a constant concentration of 10-12 nmol/mg wet wt. and did not vary under any of the conditions studied. To study the calcium dependency of the ureogenic effect of the hormones, experiments were performed with cells washed and incubated in buffer to which no $CaCl_2$ was added. EGTA was omitted in these experiments in order to avoid cell calcium depletion during the long incubation period (14). The concentration of calcium in this buffer ranged from 40 to 100 μ M (due to contamination of the reagents employed in preparing the buffer, and to cell lysis) determined by atomic absorption spectroscopy.

Mitochondrial citrulline synthesizing capacity was assayed in crude mitochondrial preparations obtained from hepatocytes previously incubated for 10 min with or without the hormones. The cell incubation buffers were as described above, but for these shorter incubations 1 mM EGTA was added to the $CaCl_2$ -free buffer. After incubation, crude mitochondrial preparations were obtained as described by Hensgens *et al* (4). Citrulline synthesis was measured in a medium (2 ml, 4-5 mg mitochondrial protein) containing 75 mM Tris/HCl, 5 mM KH_2PO_4 , 15 mM KCl, 3 mM $MgCl_2$, 16 mM $KHCO_3$, 1 mM EDTA 10 mM ornithine, 10 mM succinate, 4 μ g rotenone, 25 mM mannitol (derived from the mitochondrial suspension), and 10 mM NH_4Cl or 10 mM glutamine (indicated) pH 7.4. After 10 min. at 25°C, incubations were stopped by the addition of perchloric acid (final concentration 4%). Extracts were neutralized with K_2CO_3 and citrulline was determined by the method of Cerlotti and Gazaniga (15) as modified by Prescott and Jones (16).

Cyclic AMP was determined in cells plus medium 2 min after the addition of the hormones and assayed by the method of Gilman (17). Free cyclic AMP was separated from bound cyclic AMP by charcoal adsorption as described by Brown *et al* (18).

In the studies of phosphatidylinositol labeling, cells were incubated for 60 min in the media described above for the study of ureogenesis, supplemented with 10 μ Ci/ml of [32 P]Pi. Cell lipids were extracted with chloroform/methanol (2:1) and phospholipids were separated by one dimension thin-layer chromatography (19). Radioactivity was counted in silica gel scrapings of each phospholipid. Protein was determined by the method of Lowry, with bovine serum albumin as standard (20). Statistical testing of comparable groups was performed by paired t analysis.

Results

The dose-response curves for the effect of vasopressin, angiotensin II, epinephrine and glucagon on urea biosynthesis are shown in figure 1. In the presence of extracellular calcium, all the hormones stimulated urea biosynthesis; glucagon was the most effective, followed by epinephrine. Vasopressin and angiotensin II were less effective. In the absence of extracellular calcium, the effects of glucagon and epinephrine were smaller but still significant, whereas the effects of vasopressin and angiotensin II were totally abolished.

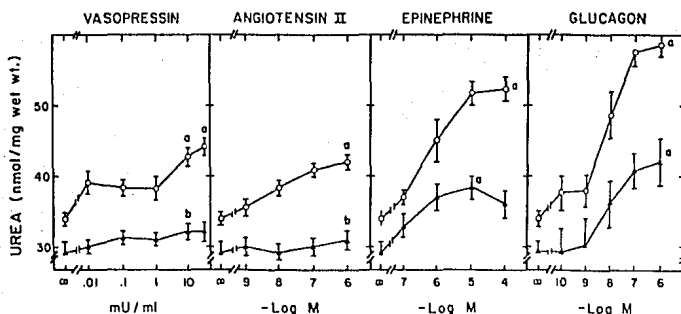


FIG. 1

EFFECTS OF VASOPRESSIN, ANGIOTENSIN II, EPINEPHRINE AND GLUCAGON ON UREA PRODUCTION BY ISOLATED HEPATOCYTES.

Hepatocytes (40 mg wet wt.) were incubated for 60 min with different concentrations of the hormones in buffer containing 1.3 mM CaCl_2 (○—○) or buffer to which no CaCl_2 was added (△—△). Plotted are the means, and vertical lines represent S.E.M. of duplicate incubations from 3-6 cell preparations. a) $p < .001$ v.s. control b) not significant v.s. control.

The citrulline synthesizing capacity of mitochondria isolated from cells which were incubated in the presence of extracellular Ca^{++} and maximally effective doses of the hormones, were studied. All the hormones produced an enhancement in mitochondrial citrulline synthesizing capacity, which was clearly observed when mitochondria were incubated with 10 mM NH_4Cl as the nitrogen source (fig. 2, left panel). The hormones produced stimulations of similar magnitude ($\approx 50\%$ increases over control rates; $p < .025$ for angiotensin II v.s. control, $p < .005$ for vasopressin, epinephrine or glucagon v.s. control), in contrast to their effects on ureogenesis. Direct addition of the hormones to isolated mitochondria was without effect on citrulline synthesis.

When NH_4Cl was substituted by 10 mM glutamine as the nitrogen source, the rates of citrulline synthesis were much lower ($\approx 20\%$ of the rates observed in the presence of NH_4Cl). Under these conditions citrulline synthesis by mitochondria from cells treated with the indicated agents was as follows: control 14.3 ± 1.8 ; vasopressin 16.6 ± 2.9 ; angiotensin II 17.5 ± 2.3 ; epinephrine + propranolol 25.5 ± 2.0 and glucagon 24.2 ± 3.4 nmol. mg protein $^{-1}$. 10min $^{-1}$ (results are the means \pm S.E.M. of 3 determinations in duplicate). Only mitochondria isolated from cells treated with epinephrine or glucagon showed significant enhancement of citrulline synthesis ($p < .01$ for epinephrine v.s. control, $p < .05$ for glucagon v.s. control). When the cells were incubated in the absence of calcium (plus 1 mM EGTA) all hormones enhanced mitochondrial citrulline synthesis from NH_4Cl although to a lesser extent than that observed when the cells were incubated in the presence of calcium. Under these conditions, (cells incubated in the absence of calcium) the effectiveness of the hormones for stimulating citrulline synthesis varied (figure 2, right panel).

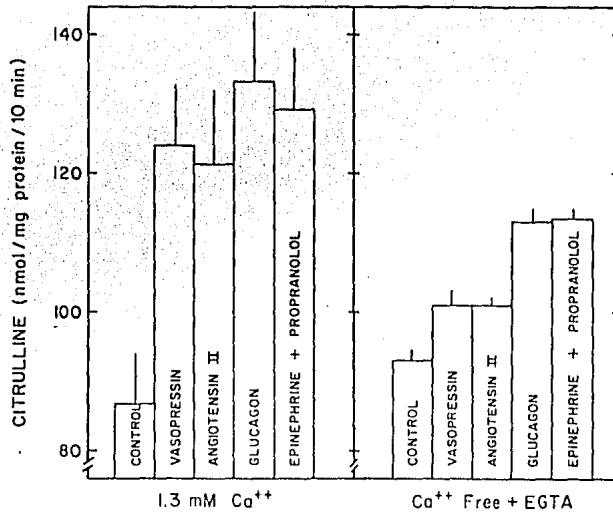


FIG. 2

EFFECT OF HORMONAL STIMULATION OF HEPATOCYTES ON CITRULLINE SYNTHESIS FROM NH_4Cl BY ISOLATED MITOCHONDRIA.

Mitochondria were isolated from cells which were incubated for 10 min in the presence or absence of extracellular calcium and in the presence of the hormones indicated on each bar. Concentrations employed were: 10 mU/ml vasopressin, 10^{-6} M angiotensin II, 10^{-5} M epinephrine, 10^{-7} M glucagon and 1 mM EGTA. Citrulline synthesis from NH_4Cl was measured over a 10 min period as described under Materials and Methods. Bars represent means, and vertical lines represent S.E.M. of duplicate incubations from 3-6 cell preparations.

The effects of glucagon and of epinephrine + propranolol were identical ($\approx 21\%$ stimulation, $p < .001$ v.s. control in both cases) whereas the effects of vasopressin and angiotensin II were smaller ($\approx 10\%$ stimulation) but still significant ($p < .05$ for vasopressin v.s. control and $p < .01$ for angiotensin II v.s. control). No accumulation of citrulline in cells treated with the vasopressor hormones in the absence of extracellular calcium was detected (data not shown).

The effect of maximal doses of the hormones on the labeling of phosphatidylinositol with radioactive phosphate was studied. Vasopressin, angiotensin II and epinephrine increased the labeling of this phospholipid in the presence of extracellular calcium (3-fold, 4-fold and 3-fold respectively). This increase in phosphatidylinositol labeling was also observed in the absence of extracellular calcium, although it was of smaller magnitude (2-fold, 3-fold and 2-fold respectively). Glucagon had no effect on this parameter.

Neither vasopressin nor angiotensin II produced consistent changes in cyclic AMP levels. Epinephrine produced a 2-fold increase in the levels of the cyclic nucleotide, but this effect was blocked by propranolol both in the presence and absence of extracellular calcium. It is important to note here that the stimulation of ureogenesis by epinephrine is not affected by propranolol (3) but is blocked by the α_1 adrenergic antagonist prazosin (3). As expected, glucagon produced a 10-fold increase in the levels of the cyclic nucleotide.

Discussion

The participation of α_1 adrenoceptors in the stimulation by epinephrine of urea biosynthesis suggested the possibility that other hormones, with similar transduction mechanism(s) might also stimulate this metabolic pathway.

α_1 adrenergic amines, vasopressin and angiotensin II stimulate glycogenolysis (21, 22) and gluconeogenesis (23) through cyclic AMP- independent mechanisms which involve phosphatidylinositol turnover and calcium fluxes (5, 9, 10). The stimulation by vasopressin and angiotensin II of urea biosynthesis in isolated hepatocytes is presented in this paper. Independence of the ureogenic effect of the hormones from cyclic AMP and association with phosphatidylinositol labeling was observed under our conditions.

The stimulation of ureogenesis by epinephrine and glucagon seems to be associated to an increased rate of citrulline synthesis, which is observed in subsequently isolated mitochondria (2,4). Vasopressin and angiotensin II also produce a stable enhancement of mitochondrial citrulline synthesizing capacity.

Most metabolic effects of vasopressin and angiotensin II are suppressed in the absence of extracellular calcium (5, 11, 24, 25). This absolute calcium dependency of the vasopressor hormones is also observed in their effect on urea biosynthesis. However, mitochondria isolated from hepatocytes treated with the vasopressor hormones in the absence of extracellular calcium, showed an enhanced citrulline synthesizing capacity, suggesting that hormonal signals are generated under these conditions. In whole cells, the increase in phosphatidylinositol labeling produced by these hormones is also observed in the absence of extracellular calcium. Although this evidence is indirect, it is consistent with the proposed role of phosphatidylinositol turnover in the signalling mechanism(s) for epinephrine (α_1), vasopressin and angiotensin II (26). Extracellular calcium seems to be required for the full expression of the effects of vasopressin and angiotensin II, and to a lesser extent for those of epinephrine (α_1) and glucagon.

When cells are incubated with the hormones in the absence of extracellular calcium, the magnitude of the stimulation of citrulline synthesis from NH_4Cl observed in isolated mitochondria is different for each hormone; this may indicate that factors may be generated through the activation of α_1 adrenoceptors which are not produced through the activation of the receptors for the vasopressor hormones. In the presence of extracellular calcium, there is a variation in the magnitude of the effects of vasopressin, angiotensin II, epinephrine and glucagon on urea production. However, citrulline synthesis from NH_4Cl as the nitrogen source, by mitochondria isolated from hepatocytes treated with these hormones, is of similar magnitude. When glutamine is used as the nitrogen source, citrulline production is much lower, and only the mitochondria isolated from cells previously treated with glucagon or epinephrine show enhanced rates of citrulline synthesis. These results suggest that the activity of mitochondrial glutaminase could be rate-limiting for the synthesis of citrulline, and that both glucagon and epinephrine + propranolol may stimulate glutaminase activity, whereas vasopressin and angiotensin II do not seem to do so. Stimulation by glucagon of mitochondrial glutaminase activity in liver cells has already been reported (27,28).

All the hormones tested stimulate mitochondrial citrulline synthesis from NH_4Cl . These data suggest that glutaminase activation is not the only site of action of epinephrine and glucagon on urea biosynthesis, and that other changes

in mitochondrial activity, involving the systems used for the synthesis of citrulline, are at least partially responsible for the actions of vasopressin, angiotensin II, glucagon and epinephrine on urea biosynthesis.

Acknowledgements

The authors want to thank Drs. E. Píña, A. Peña, A. Cárabez and V. Chagoya de Sánchez for letting them use some of the equipment available in their laboratories and Mrs. Guadalupe Ramírez for typing the manuscript. This research was partially supported by a Grant from CONACYT (ICCRNAL 800637).

References

- 1.- L.E. MALLETT, J.H. EXTON and C.R. PARK, *J. Biol. Chem.* 244 5713-5723 (1969)
- 2.- M.A. TITHERADGE and R.C. HAYNES, *Arch. Biochem. Biophys.* 201 44-55 (1980)
- 3.- S. CORVERA and J.A. GARCIA-SAINZ, *Eur. J. Pharmacol.* 72 387-390 (1981)
- 4.- H.E.S.J. HENSGENS, A.J. VERHOEVEN and A.J. MEIJER, *Eur. J. Biochem.* 107 197-205 (1980)
- 5.- M.E.M. TOBERT, A.C. WHITE, K. ASPRY, J. CUTTS and J.N. FAIN, *J. Biol. Chem.* 255, 1938-1944 (1980)
- 6.- E. MURPHY, K. COLL, T.L. RICH and J.R. WILLIAMSON, *J. Biol. Chem.* 255 6600-6608 (1980)
- 7.- P.F. BALCKYORE, J.P. DELHAYE and J.H. EXTON, *J. Biol. Chem.* 254 6945-6950 (1979)
- 8.- J. POGGIOLI, B. BERTHON and M. CLARET, *FEBS Lett.* 115 243-246 (1980)
- 9.- J.N. FAIN and J.A. GARCIA-SAINZ, *Life Sci.* 26 1183-1194 (1980)
- 10.- J.A. GARCIA-SAINZ, B.B. HOFFMAN, S. LI, R.J. LEFKOWITZ and J.N. FAIN, *Life Sci.* 27 953-961 (1980)
- 11.- J.C. GARRISON, M.K. BORLAND, V.A. FLORIO and D.A. TWIBLE, *J. Biol. Chem.* 254 7147-7156 (1979)
- 12.- M.N. BERRY and D.S. FRIEND, *J. Cell. Biol.* 43 506-520 (1969)
- 13.- I. GUTMAN and H.U. BERGMAYER, *Methods of enzymatic analysis* p. 1791 Academic Press, New York. (1974)
- 14.- T.M. CHAN and J.H. EXTON, *J. Biol. Chem.* 252 8645-8651 (1977)
- 15.- G. CERIOTTI and A. GAZANIGA, *Clin. Chim. Acta.* 16 436-440 (1967)
- 16.- L.N. PRESCOTT and M.E. JONES, *Anal. Biochem.* 32 408-419 (1969)
- 17.- A.C. GILMAN, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 67 305-312 (1970)
- 18.- B.L. CROWN, J.D.M. ALBANO, R.P. ERINS, A.M. SCHERZI and W. TAMPION, *Biochem. J.* 121 561-562 (1971)
- 19.- J.A. GARCIA-SAINZ and J.N. FAIN, *Mol. Pharmacol.* 18 72-77 (1980)
- 20.- O.H. LOWRY, N.J. ROSENBERG, A.L. FARS and R.J. RANDALL, *J. Biol. Chem.* 193 265-275 (1951)
- 21.- M. AGGERBECK, G. GUELLAEN and J. HANOURE, *Biochem. Pharmacol.* 29 643-645 (1980)
- 22.- B.B. HOFFMAN, T. MICHEL, D.M. KILPATRICK, R.J. LEFKOWITZ, M.E.M. TOBERT, H. GILMAN and J.N. FAIN, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 4569-4573 (1980)
- 23.- N.M. KNEER, M.J. WAGNER and H.A. LARDY, *J. Biol. Chem.* 254 12160-12168 (1979)
- 24.- S. KEPPENS and H. DE WOLF, *FEBS Lett.* 51 29-32 (1975)
- 25.- D.A. HEMS, L.M. RODRIGUES and P.D. WHITTON, *Biochem. J.* 172 311-317 (1978)
- 26.- R.H. MICHELL, *Biochim. Biophys. Acta* 415, 81-147 (1975)
- 27.- S.K. JOSEPH and J.D. MCGIVAN, *Biochim. Biophys. Acta* 543 16-28 (1978)
- 28.- J.H. LACEY, N.M. BRADFORD, S.K. JOSEPH and J.D. MCGIVAN, *Biochem. J.* 194 29-33 (1981)

Hormonal stimulation of mitochondrial glutaminase

Effects of vasopressin, angiotensin II, adrenaline and glucagon

Silvia CORVERA*† and J. Adolfo GARCÍA-SÁINZ‡

*Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, and ‡Departamento de Bioenergética, Centro de Investigaciones en Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-600, 04510, México City, México

(Received 21 December 1982/Accepted 12 January 1983)

Adrenaline (through α_1 adrenoceptors), vasopressin and angiotensin II stimulate mitochondrial glutaminase activity. This stimulation probably contributes to the ureogenic effect of these hormones. The activity of the enzyme is sensitive to Ca^{2+} depletion. A role of Ca^{2+} in hormonal modulation of glutaminase activity is suggested.

Stimulation of ureogenesis from glutamine by vasopressin, angiotensin II and adrenaline (through α_1 adrenoceptors) has been reported (Corvera & García-Sáinz, 1981, 1982). This stimulation is accompanied by an enhanced rate of citrulline synthesis by mitochondria isolated from hormone-treated hepatocytes (Corvera & García-Sáinz, 1982; Titheradge & Haynes, 1980). Interestingly, the magnitude of the stimulation of urea synthesis by the hormones was different (glucagon > adrenaline > angiotensin II \gg vasopressin), whereas their effects on citrulline synthesis by isolated mitochondria were nearly identical when NH_4Cl was used as the nitrogen source. However, when glutamine was used instead of NH_4Cl , mitochondria isolated from cells treated with adrenaline or glucagon displayed an enhancement in citrulline-synthesizing capacity, whereas no clear effect was observed with mitochondria isolated from cells treated with vasopressin or angiotensin II (Corvera & García-Sáinz, 1982). These data raised the possibility that the activity of mitochondrial glutaminase could be affected to different extents by the hormones. Stimulation of the activity of this enzyme by glucagon has previously been demonstrated (Lacey *et al.*, 1981). In the present paper, the effects of vasopressin, angiotensin II and adrenaline on the activity of mitochondrial glutaminase are reported. Unlike glucagon, these hormones seem to act through cyclic AMP independent, Ca^{2+} -dependent, mechanisms. Thus the role of extracellular Ca^{2+} in modulating the basal and hormonally stimulated activities of this enzyme are also shown.

Materials and methods

L-Adrenaline, [arginine] vasopressin, angiotensin II, rotenone and L-propranolol were obtained from Sigma Chemical Co. Collagenase was obtained from Worthington, and bovine serum albumin (fraction V) from Reheis. Glucagon was generously given by Eli Lilly. Other reagents used were of the best quality available.

Female Wistar rats, weighing approx. 200 g, fed *ad libitum* were employed. Hepatocytes were isolated by the method of Berry & Friend (1969) as modified by Tolbert *et al.* (1980). Hepatocytes (60 mg wet wt./ml) were incubated for 10 min with maximally effective doses of the hormones (10 munits of vasopressin/ml, 1 μ M-angiotensin II, 10 μ M-adrenaline + 10 μ M-propranolol, and 0.1 μ M-glucagon) in Krebs-Ringer bicarbonate buffer, supplemented with 10 mM glucose, 10 mM glutamine, 2 mM ornithine and 1% bovine serum albumin, saturated with O_2/CO_2 (19:1), pH 7.4 at 37°C. Ca^{2+} and EGTA were added as noted in the Results section. Incubations were ended by centrifuging the cells for 20 s at top speed in a clinical centrifuge; the medium was discarded and the cells were washed once with ice-cold mitochondria isolation medium, which consisted of 250 mM-mannitol, 20 mM-Tris/HCl and 1 mM-EGTA, pH 7.4. A crude mitochondrial preparation was obtained from the cell pellets as described by Hengens *et al.* (1980). Glutaminase activity was measured as the production of glutamate from glutamine during 10 min, in a medium containing 20 mM-glutamine, 75 mM-Tris/HCl, 15 mM-KCl, 5 mM- K_2HPO_4 , 16 mM- $KHCO_3$, 10 mM-succinate, 3 mM- $MgCl_2$, 5 μ g of rotenone/ml, 25 mM-mannitol and 0.1 mM-EGTA (derived from the

† To whom reprint requests should be addressed.

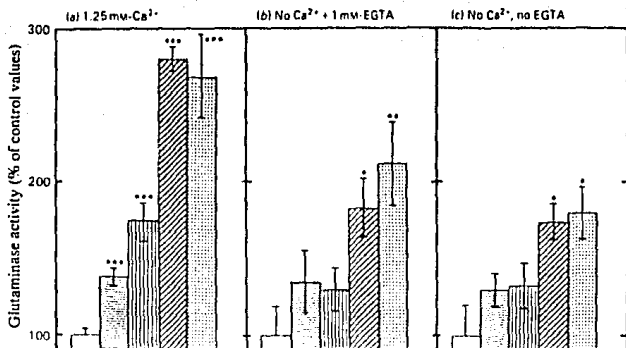


Fig. 1. Hormonal stimulation of glutaminase of mitochondria isolated from cells incubated with different concentrations of Ca^{2+}

Hepatocytes were incubated with maximally effective doses of the indicated hormones (\square , control; \square , vasopressin; \square , angiotensin II; \square , adrenaline + propranolol; \square , glucagon) and various concentrations of Ca^{2+} : (a) 1.25 mM- Ca^{2+} ; (b) no Ca^{2+} , plus 1 mM-EGTA; (c), no Ca^{2+} , no EGTA. Mitochondria were then isolated and glutaminase activity was measured as described in the text. Results are expressed as percentages of control values, which were: (a) 61.6 ± 6 , (b) 17.3 ± 2 and (c) 33.2 ± 5 nmol of glutamate/10 min per mg of protein. Values plotted are the means, and vertical lines represent s.e.m. of duplicate incubations from three to five cell preparations. Statistical significance versus control is indicated: * $P < 0.01$, ** $P < 0.005$, *** $P < 0.001$.

mitochondrial suspension) at 25°C, pH 7.4. The concentration of rotenone used completely inhibits the metabolism of glutamate (Joseph & McGivan, 1978). Glutamate was assayed enzymically (Bernt & Bergmeyer, 1974) in neutralized HClO_4 extracts of the mitochondrial suspension. Protein was determined by the method of Lowry *et al.* (1951), with bovine serum albumin as standard.

Results

Stimulation of mitochondrial glutaminase activity in mitochondria isolated from cells treated with vasopressin, angiotensin II, adrenaline plus propranolol, or glucagon is presented in Fig. 1(a). Although all the hormones produced a significant stimulation, glucagon and adrenaline were considerably more effective than the vasopressor peptides. The stimulation produced by adrenaline was completely blocked by low concentrations (1 μM) of the α_1 adrenergic antagonist prazosin (results not shown). The dependency of the hormonal effects on extracellular Ca^{2+} was studied by using mitochondria isolated from cells washed in buffer prepared without Ca^{2+} and incubated in this buffer supplemented with 1 mM-EGTA. The results obtained are presented in Fig. 1(b). Under these conditions, both glucagon and adrenaline stimulated glutaminase activity, whereas neither vasopressin nor angio-

Table 1. Basal glutaminase activity of mitochondria isolated from cells incubated with different concentrations of Ca^{2+}

Hepatocytes were incubated as described in the Materials and methods section with the additions indicated below. Mitochondria were then isolated and glutaminase activity was measured as described in the text. Results are the means \pm s.e.m. for duplicate incubations from three cell preparations.

Additions (mM)		Glutaminase activity (nmol of glutamate/10 min per mg of protein)
EGTA	CaCl_2	
---	1.25	61.6 ± 6
---	---	33.2 ± 5
1	---	17.3 ± 2
1	1.25	49.6 ± 5
1	2.50	50.2 ± 2
1	5	52.9 ± 8
1	10	35.8 ± 6

tensin II produced significant effects. However, the basal activity of the enzyme was much lower than when Ca^{2+} was present during the cell incubation. The variations in the basal activity of mitochondrial glutaminase at different Ca^{2+} concentrations in the cell incubation buffer were studied, and the results are presented in Table 1. The highest basal activity was observed when cells were incubated in the presence of 1.25 mM- Ca^{2+} . When Ca^{2+} was omitted from the cell incubation buffer (which resulted in a

Ca^{2+} concentration of 10–100 μM owing to contamination of the reagents used to prepare the buffer, and to cell lysis) the activity decreased to approx. 53% of this value. When 1 mM-EGTA was added to this Ca^{2+} -free medium, the basal glutaminase activity fell to only approx. 28% of the value obtained in the presence of 1.25 mM- Ca^{2+} . The addition of CaCl_2 to these cells re-established the activity of the enzyme in subsequently isolated mitochondria. These results indicate that cell Ca^{2+} depletion modifies the activity of mitochondrial glutaminase. To study the requirements for extracellular Ca^{2+} for hormonal stimulation of glutaminase activity, hepatocytes that were incubated in the absence of Ca^{2+} but without EGTA were used.

The results are shown in Fig. 1(c); in these experiments glucagon and adrenaline significantly stimulated glutaminase activity, and, although vasopressin and angiotensin II produced in some experiments a slight increase in the activity of the enzyme, the effect was not reproducible.

Discussion

Hormonal stimulation of ureogenesis seems to involve modulation at several steps of this metabolic pathway; stimulation of mitochondrial glutaminase by glucagon has been reported (Lacey *et al.*, 1981). In the present paper, the stimulation of this enzyme by adrenaline (through α_1 -adrenoceptors), vasopressin and angiotensin II is presented. The metabolic effects of vasopressin, angiotensin II and α_1 -adrenergic agonists seem to be related to Ca^{2+} fluxes through the plasma membrane and release of this ion from internal stores, including mitochondria (Blackmore *et al.*, 1982). After this release, mitochondria, isolated from hepatocytes treated with α_1 -adrenergic amines, display enhanced rates of Ca^{2+} uptake and prolonged retention of this ion (Taylor *et al.*, 1980). Our data suggest that the activity of mitochondrial glutaminase is sensitive to the mitochondrial Ca^{2+} concentration. Thus the possibility exists that the effects of the hormones on the activity of the enzyme might be mediated by the changes in mitochondrial ionic fluxes. This interpretation is supported by the marked decrease in the activity of the enzyme when cells were incubated with no Ca^{2+} and 1 mM-EGTA, which decreases intracellular Ca^{2+} stores. When Ca^{2+} was added back to the incubation buffer, the activity of the enzyme returned to near-normal values. This, however, does not rule out the possibility that Ca^{2+} depletion may result in changes in the concentration of other ions (Lardy & Merryfield, 1981) or metabolites in the environment of the enzyme which might themselves modulate its activity.

Joseph *et al.* (1981) found no effect of EGTA on the activity of the mitochondrial glutaminase when

the chelator is added directly to the mitochondria. Our experiments are not comparable, since we studied the effects of EGTA in whole cells, whereas they studied the effect on isolated mitochondria. The possible existence of cytosolic factors that modulate Ca^{2+} efflux from liver mitochondria (Fleschner *et al.*, 1982) further stresses this difference. The stimulation of mitochondrial glutaminase may be partially responsible for the effects of the hormones on urea biosynthesis from glutamine. Both glutaminase activity and urea synthesis are strongly stimulated by adrenaline and glucagon, and to a less extent by vasopressin and angiotensin II. Also, the extracellular Ca^{2+} requirements for the stimulation of mitochondrial glutaminase by the hormones are similar to those observed for the stimulation of urea synthesis from glutamine (Corvera & Garcia-Sáinz, 1982). However, factors besides glutaminase activation also participate in hormonal stimulation of ureogenesis by vasopressin, angiotensin II, adrenaline and glucagon; this is evidenced by the enhanced citrulline synthesis from NH_4Cl by mitochondria isolated from hormone-treated hepatocytes. In summary, glucagon, adrenaline, vasopressin and angiotensin II stimulated the activity of liver mitochondrial glutaminase; this stimulation seems to contribute to the ureogenic action of these hormones. A role of Ca^{2+} in the hormonal stimulation of this enzyme is suggested.

We thank Mrs. Guadalupe Ramirez for typing the manuscript. This research was partially supported by Grant ICCBNAL 800 637 from CONACyT.

References

- Bernt, E. & Bergmeyer, H. U. (1974) in *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer, H. U., ed.), vol. 4, pp. 1704–1708, Academic Press, New York
- Berry, M. N. & Friend, D. S. (1969) *J. Cell Biol.* **44**, 506–520
- Blackmore, P. S., Hughes, B., Shuman, F. A. & Exton, J. H. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 190–197
- Corvera, S. & Garcia-Sáinz, J. A. (1981) *Eur. J. Pharmacol.* **72**, 387–390
- Corvera, S. & Garcia-Sáinz, J. A. (1982) *Life Sci.* **31**, 2493–2498
- Fleschner, C. R., Pershadsingh, H. A., Vorbeck, M. L., Long, J. W. & Martin, A. (1982) *FEBS Lett.* **141**, 45–48
- Hensgens, H. E. S. J., Verhoeven, A. J. & Meijer, A. J. (1980) *Eur. J. Biochem.* **107**, 197–205
- Joseph, S. K. & McGivan, J. D. (1978) *Biochem. J.* **176**, 837–844
- Joseph, S. K., McGivan, J. D. & Meijer, A. J. (1981) *Biochem. J.* **194**, 35–41
- Lacey, J. H., Bradford, N. M., Joseph, S. K. & McGivan, J. D. (1981) *Biochem. J.* **194**, 29–33
- Lardy, H. A. & Merryfield, M. L. (1981) *Curr. Top. Cell Regul.* **18**, 243–254

- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265-275
- Taylor, W. M., Prpic, V., Exton, J. H. & Bygrave, F. L. (1980) *Biochem. J.* 188, 443-450
- Titheradge, M. A. & Haynes, R. C. (1980) *Arch. Biochem. Biophys.* 201, 44-55
- Tolbert, M. E. M., White, A. C., Aspry, K., Cutts, J. & Fain, J. N. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 1938-1944

DISCUSION

La epinefrina es capaz de producir una marcada estimulación en la síntesis de urea por hepatocitos aislados de rata. En este tipo de células, se han identificado tres tipos de receptores adrenérgicos utilizando la técnica directa de pegado específico con radioligandos selectivos (25). Se han identificado los receptores β adrenérgicos, mediante el uso de un antagonista selectivo, el dihidroalprenolol. Estos estudios muestran que existe un solo tipo de receptor β adrenérgico, en hígado que corresponde al subtipo β_2 . El número de sitios específicos en membranas de hígado de ratas adultas es de aproximadamente 100 fmolas/mg de proteína (25). Se han identificado dos subtipos de receptor α adrenérgico, en membranas de hígado de rata. Utilizando [^3H]prazosina como radioligando selectivo para los receptores de tipo α_1 , y [^3H]yohimbina para los receptores α_2 , se ha encontrado que el número de sitios α_1 adrenérgicos es de aproximadamente 700 fmol/mg mientras que el número de sitios α_2 es de alrededor de 200 fmol/mg (44). Estos estudios claramente muestran que el subtipo de receptor predominante en el hígado de rata adulta es el α_1 .

Los receptores de tipo α_1 representan cerca del 80% del total de sitios α adrenérgicos. La estimulación de estos receptores está estrechamente asociada a efectos adrenérgicos tales como la activación de la fosforilasa y la entrada de calcio a la célula (45).

El efecto estimulador de la epinefrina sobre la síntesis de urea, en la rata adulta es bloqueado completamente con antagonistas α adrenérgicos, pero no es modificado por el antagonista β adrenérgico, propranolol.

El antagonista α_1 adrenérgico, prazosina, es capaz de bloquear el efecto de epinefrina a concentraciones >100 veces menores que el antagonista α_2 adrenérgico, yohimbina (ver primer trabajo). Esto claramente demuestra - que el receptor adrenérgico involucrado en la estimulación de la ureogénesis en la rata adulta es de tipo α_1 . A diferencia de lo encontrado empleando ratas adultas, en hepatocitos aislados de ratas jóvenes, la estimulación de la ureogenesis por epinefrina no es bloqueada totalmente por prazosina. La estimulación residual observada en presencia del antagonista α_1 es bloqueada por el antagonista β adrenérgico propranolol. Además en presencia de una concentración alta de propranolol, el efecto ureogénico sí puede ser totalmente bloqueado con concentraciones crecientes de prazosina. Esto indica que en la rata joven, la estimulación de la ureogenesis por epinefrina puede estar mediado tanto por receptores de tipo α_1 adrenérgico como por receptores de tipo β (ver trabajo 2).

Estos datos demuestran que la densidad y el subtipo de receptor adrenérgico en un tejido es susceptible de ser modificada por distintas condiciones fisiológicas, concretamente la edad del animal es uno de los factores que pueden influir sobre los receptores adrenérgicos involucrados en la modulación del metabolismo hepático.

El conocimiento del subtipo de receptor involucrado en la mediación de los efectos adrenérgicos es importante, por el hecho de que cada subtipo de receptor se encuentra asociado a un mecanismo de transducción diferente. El receptor α_1 adrenérgico no está asociado a la adenilato ciclasa, sino que su estimulación produce cambios importantes en la citoestasis del calcio (26). Esto sugiere que este ion de alguna manera pudiere estar regulando la velocidad de flujo a través del ciclo de la urea en la célula. La estimulación de la ureogenesis por epinefrina puede estar me-

diada a través de dos mecanismos distintos, uno asociado a cambios en la citoestasis del calcio, desencadenado por la estimulación de los receptores α_1 adrenérgicos, y otro asociado a la estimulación de la adenilato ciclasa desencadenado por la estimulación de los receptores β adrenérgicos. La importancia relativa de estos dos mecanismos en la mediación de los efectos de la epinefrina depende de las condiciones fisiológicas del animal y de la influencia de éstas sobre la población de receptores adrenérgicos en el hígado.

La identificación del receptor α_1 adrenérgico como el involucrado en la estimulación de la ureogenesis por epinefrina en la rata adulta hizo surgir la pregunta de si otras hormonas, con mecanismos de transducción similares al del receptor α_1 adrenérgico también pudieran ser capaces de estimular la síntesis de urea.

Los dos péptidos vasopresores, vasopresina y angiotensina II, parecen actuar mediante un mecanismo de transducción similar al de las aminas α_1 adrenérgicas. Es decir, estos péptidos no alteran los niveles basales de AMP cíclico en hepatocitos de rata, pero al igual que la epinefrina (α_1) estimulan el recambio de fosfatidilinositol e inducen una elevación en los niveles citoplásmicos de calcio (46).

El glucagon es capaz de estimular la producción de urea en hepatocitos de rata. La acciones de glucagon, a diferencia de las acciones α_1 adrenérgicas, son mediadas a través de la activación de la adenilato ciclasa, produciendo una acumulación de AMP cíclico y la consecuente activación de las protein kinasas AMP cíclico-dependientes. Los receptores β adrenérgicos parecen actuar de una manera similar al glucagon, es decir, asociados activatoriamente a la adenilato ciclasa.

Se realizaron experimentos con el propósito de estudiar sistemáticamente los efectos de las tres hormonas cuyo mecanismo de transducción está asociado al recambio de fosfatidilinositol y a la elevación de calcio citoplásmico, es decir los efectos α_1 adrenérgicos* de vasopresina y de angiotensina II, y de los efectos del glucagon, cuyo mecanismo de transducción está asociado a la adenilato ciclasa.

La síntesis de urea se estudió utilizando glutamina como fuente de amonio. La concentración de este aminoácido en el plasma es mucho más alta que la de cualquier otro, y la síntesis de glutamina es el mecanismo principal mediante el cual órganos distintos al hígado logran una detoxificación inicial del amonio formado (2). También ha sido observado que la glutamina es uno de los mejores substratos para la síntesis de urea tanto *in vivo* como en preparaciones de hígado (13). Los pasos involucrados en la biosíntesis de urea a partir de glutamina han sido estudiados en hígado perfundido (13). El metabolismo de este aminoácido se inicia con su transporte hacia el interior de la célula, el cual no parece ser un paso limitante en su metabolismo. La glutamina es degradada por alguna de dos isoenzimas de glutaminasa presentes en el hígado, una dependiente y otra independiente de fosfatos. La acción de esta enzima da como producto glutamato y amonio. En presencia de ornitina el amonio es inmediatamente convertido en urea. En el hígado perfundido, la urea es formada en cantidades equivalentes a la glutamina consumida (13). En las condiciones de los experimentos presentados en los trabajos realizados con hepatocitos

* Para estudiar los efectos α_1 adrenérgicos se utilizó epinefrina siempre en presencia de propranolol 10^{-5} M para bloquear totalmente cualquier efecto β adrenérgico.

aislados, la síntesis de urea fue lineal por lo menos durante 60 minutos de incubación en presencia de glutamina y ornitina (ver trabajo 1). Bajo estas condiciones, las cuatro hormonas estudiadas producen una estimulación potente de la síntesis de urea (ver trabajo 3). La estimulación es dependiente de la concentración de la hormona, y saturable en un rango de 2 a 3 órdenes de magnitud. La efectividad de las hormonas para estimular la síntesis de urea fue variable; la estimulación producida por glucagon fue un poco mayor que la producida por epinefrina, y estas fueron considerablemente mayores a la estimulación producida por los péptidos vasopresores.

El hecho de que tres hormonas que producen cambios en la citoestasis del calcio sean capaces de producir una estimulación de la síntesis de urea, sugiere que este ion juega un papel en la regulación de la actividad de esta vía metabólica. Con el fin de conocer más acerca del papel del calcio en la modulación del ciclo de la urea y en el mecanismo de acción de las hormonas estudiadas, se realizaron experimentos en los cuales el calcio fue omitido del medio de incubación. Bajo estas condiciones se observó que la producción basal de urea disminuye significativamente. Esto indica la presencia de un sitio sensible a calcio localizado en algún paso entre la captación de glutamina por la célula y la formación de urea. Bajo estas condiciones, no fue posible detectar un efecto estimulador de la síntesis de urea por los péptidos vasopresores. Sin embargo, tanto el glucagon como la epinefrina produjeron una estimulación significativa de la síntesis de urea en ausencia de calcio.

La inhibición del efecto ureogénico de los péptidos vasopresores pero no del efecto α_1 pudiera indicar la existencia de factores adicionales en el mecanismo de transducción α_1 adrenérgico, que no están presentes

en las acciones de vasopresina y angiotensina II.

Con el fin de localizar el sitio sensible a calcio en el proceso de síntesis de urea a partir de glutamina, además del origen del bloqueo del efecto ureogénico de la vasopresina y la angiotensina II, se estudiaron los efectos hormonales, tanto en presencia como en ausencia de calcio, sobre 1) el recambio de fosfatidilinositol 2) La acumulación de NH_4 intracelular; 3) La acumulación de citrulina intracelular.

Los efectos de estas hormonas sobre el recambio de fosfatidilinositol, medido como resíntesis, fueron analizadas. Las tres hormonas produjeron fuerte estimulación de la incorporación de [^{32}P]Pi a fosfatidilinositol tanto en presencia como en ausencia de calcio. Esto indica que los efectos hormonales sobre el metabolismo de este fosfolípido no son secundarios a la movilización de calcio, sino que son un evento primario que probablemente precede y quizás produce los cambios de permeabilidad membranar al calcio.

La acumulación intracelular de amonio fue estudiada con el fin de detectar la sensibilidad de la CFS al calcio y a los efectos hormonales. Tanto en presencia como en ausencia de calcio, el amonio total intracelular permaneció en niveles basales (Fig. 5). Lo mismo fue observado cuando los niveles intracelulares de citrulina fueron cuantificados (Fig. 5). Estos datos sugieren que ni la actividad basal de la CFS ni el de la ASS, (que son dos de las enzimas que pueden ser limitantes para la síntesis de urea a partir de glutamina) son fuertemente dependientes de la presencia de calcio.

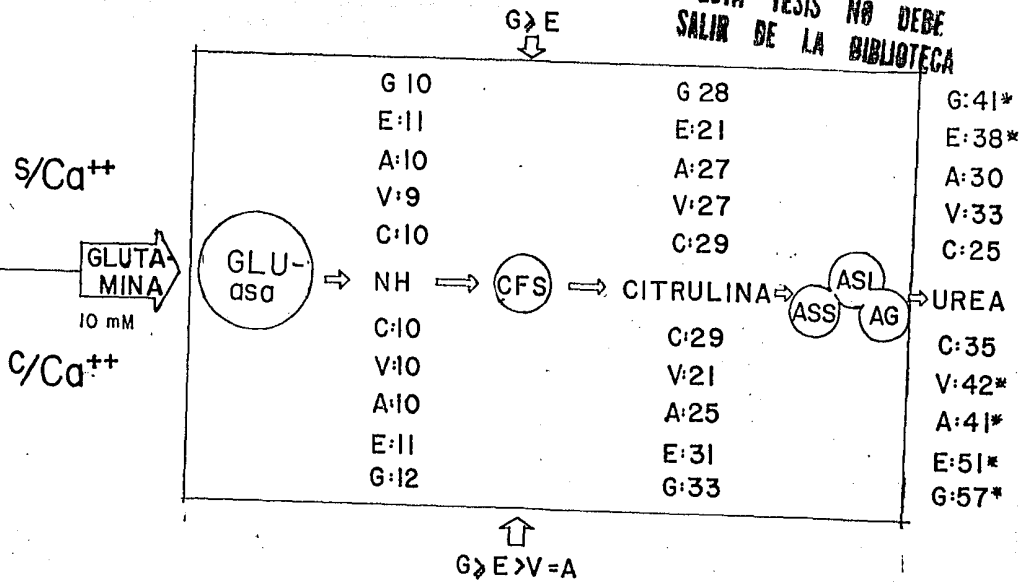


Fig. 5.- Esquema de los pasos involucrados en la Síntesis de Urea a partir de Glutamina, y los efectos de las Hormonas sobre algunos de los Intermediarios del Ciclo.

Los valores presentados están expresados en nmolas por mg de peso húmedo, y corresponden a las concentraciones de los metabolitos después de 60 minutos de incubación en ausencia (C) o presencia de las hormonas indicadas, a las siguientes concentraciones: Vasopresina (V) 10 mu/ml; angiotensina II (A) 10^{-5} M; epinefrina (E) 10^{-5} M; glucagon 10^{-7} M (G). La parte superior del esquema corresponde a los datos obtenidos en ausencia de calcio, y la parte inferior a los obtenidos en presencia de este ion. Los asteriscos indican valores significativamente distintos al control (ver trabajos). La efectividad relativa con la cual las hormonas producen los efectos estimulatorios también se indica.

Anteriormente ha sido reportado que la estimulación de hepatocitos aislados o hígado intacto por glucagon, produce cambios a nivel mitocondrial, que se traducen en un aumento en la actividad energética de las mitocondrias aisladas (36,41). Las funciones mitocondriales que se encuentran estimuladas incluyen la carboxilación del piruvato, la actividad de deshidrogenasa succínica, la fosforilación oxidativa, el potencial de membrana, el gradiente de protones, y la síntesis de citrulina (36). En el tercer trabajo, se presentan experimentos realizados con el fin de conocer si las hormonas calcio dependientes eran capaces de producir un cambio similar en la actividad mitocondrial, con una estimulación en la capacidad de las mitocondrias de sintetizar citrulina, y los efectos del calcio sobre este parámetro.

En estos experimentos, se incubaron células en presencia y ausencia de calcio con las concentraciones efectivas máximas de las cuatro hormonas estudiadas. Después de 10 minutos de incubación, las mitocondrias fueron aisladas e incubadas en presencia de NH_4 , ornitina y succinato como sustrato respiratorio. Bajo estas condiciones, la actividad de la ornitina transcarbamilasa es más de veinte veces mayor que la de la CFS (41), por lo que la cantidad de citrulina producida es función directa de la actividad de esta última enzima. El estudio de los efectos del calcio y de las hormonas sobre la CFS es relevante en virtud de que esta enzima ha sido propuesta como el paso regulador principal del flujo a través del calcio de la urea. Los resultados obtenidos (Fig. 6) muestran que la actividad basal de la CFS no se ve disminuída por la ausencia de calcio. Esto confirma lo sugerido en los estudios con células íntegras, en las

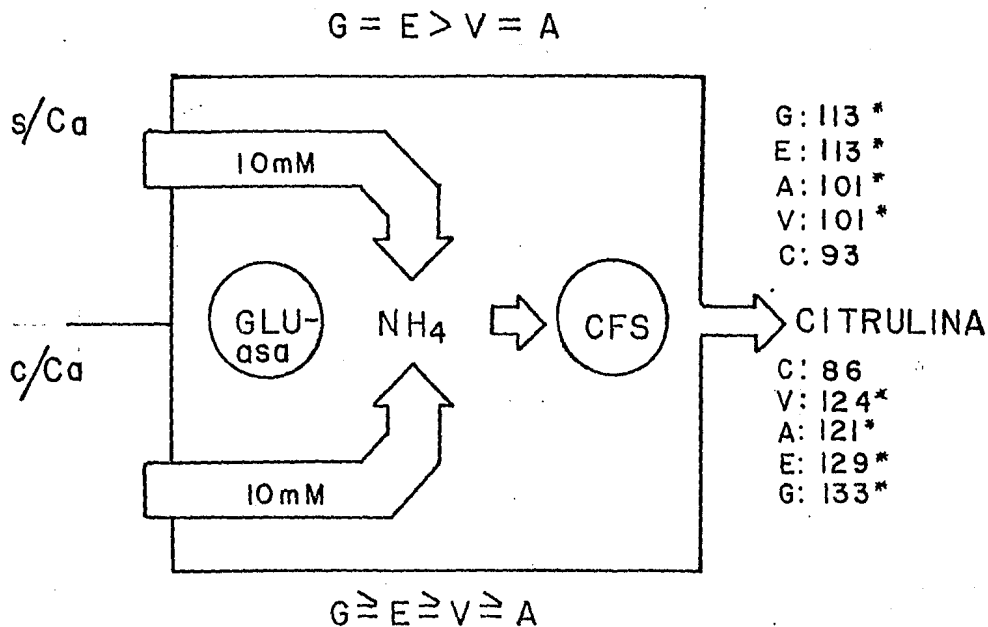


Fig. 6.- Esquema de la Formación de Citrulina a partir de NH_4 .

Los valores están expresados en nmolas de citrulina/mg de proteína mitocondrial obtenidos después de 10 minutos de incubación del extracto mitocondrial, obtenido a partir de células incubadas con las hormonas como se indica en el pie de la figura 5.

cuales no se observó una acumulación de NH_4 en ausencia de calcio.

La incubación de las células con las cuatro hormonas estudiadas produjo un aumento marcado en la actividad de la CFS en las mitocondrias subsecuentemente aisladas. Es interesante notar que las cuatro hormonas estudiadas fueron igualmente efectivas en la producción de este aumento en la capacidad citrulinogénica mitocondrial. Esto contrasta con los efectos de las hormonas sobre la síntesis de urea, donde el glucagon y la epinefrina son marcadamente más efectivos que vasopresina y angiotensina II. Esto pudiera indicar que el glucagon y la epinefrina estimulan en un sitio adicional al de los péptidos vasopresores, y otra vez señala una diferencia entre los mecanismos de acción α_1 adrenérgicos y de vasopresina y angiotensina II. Cuando las células fueron incubadas en ausencia de calcio, las cuatro hormonas fueron capaces de producir aumentos en la capacidad citrulinogénica de las mitocondrias aisladas, aunque de una magnitud significativamente menor que cuando las células fueron incubadas con calcio. Estos datos muestran que aunque la actividad basal de la CFS no depende de la presencia de calcio, la magnitud de estimulación de la actividad enzimática por las hormonas sí está influenciada por este ion. Esto sugiere que los efectos hormonales no se ejercen directamente sobre la CFS, sino sobre otros factores que modulan la actividad de esta enzima, como pudiera ser la disponibilidad de ATP o del activador alostérico N-acetil glutamato. Aunque no puede ser excluida la primera posibilidad, es poco probable en virtud de que, bajo las condiciones de aislamiento de mitocondrias que fueron empleadas en estos experimentos, los cambios que las hormonas inducen en los parámetros energéticos mitocondriales son muy pequeños (47). Es posible que las cuatro hormonas produzcan un aumento en los niveles de N-acetil glutámico, y que este efecto sea sensible

a cambios en la concentración de calcio. Es interesante notar que a pesar de que en ausencia de calcio extracelular no es posible detectar una estimulación de la síntesis de urea por vasopresina o angiotensina II, la medición directa de la actividad de la CFS, si permite observar un efecto de estas hormonas bajo estas condiciones (Fig. 6). Esto indica que aún en ausencia de calcio, estas hormonas generan una señal intracelular; el calcio parece ser necesario para amplificar este efecto. También cabe no tar que en ausencia de calcio, la estimulación de la capacidad citrulinogénica mitocondrial producida por epinefrina y glucagon es mayor que la estimulación por vasopresina y angiotensina II, lo cual nuevamente sugiere la presencia de un sitio adicional involucrado en los efectos de epinefrina y glucagon.

Cuando la capacidad citrulinogénica mitocondrial fue evaluada sustituyendo al NH_4 por glutamina como fuente de nitrógeno, se observó que la síntesis de citrulina disminuyó a un valor de solo ~20% del observado en presencia de NH_4 (Fig. 7). Esto claramente indica que la degradación de la glutamina es un paso limitante para la síntesis de citrulina (y por lo tanto de urea) a partir de este aminoácido. Cuando las células fueron incubadas con las hormonas, y se estudió la capacidad citrulinogénica mitocondrial a partir de glutamina, solamente se detectaron efectos estimulatorios de epinefrina y glucagon y no de vasopresina o angiotensina II. (Fig. 7). Esto puede deberse a que la actividad limitante de la glutaminasa mitocondrial da lugar a un flujo basal muy bajo a través de la CFS, con lo cual los efectos de vasopresina y angiotensina II sobre esta enzima se vuelven difíciles de detectar. Estos datos apoyan la posibilidad de que la epinefrina y el glucagon actúen sobre dos sitios distintos mientras que los péptidos vasopresores actúen preferentemente sobre un sitio;

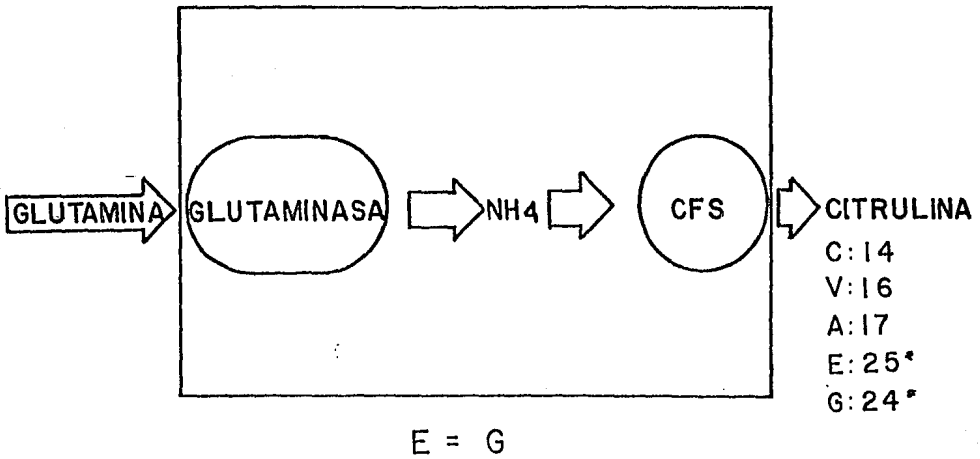


Fig. 7.- Esquema de la Formación de Citrulina a partir de Glutamina.

Las indicaciones son las mismas que las del pie de la figura 6.

es decir, epinefrina y glucagon estimulan fuertemente las actividades de la CFS y de la glutaminasa mitocondrial, mientras que vasopresina y angiotensina II estimulan preferentemente la actividad de la CFS.

Se realizaron experimentos con el propósito de estudiar de una manera directa los efectos hormonales sobre la actividad de la glutaminasa mitocondrial. En estos experimentos se emplearon concentraciones más altas de glutamina que las utilizadas en los experimentos de citrulinogénesis, y se cuantificó el glutamato producido. Los resultados de estos experimentos (Fig. 8) muestran que la actividad basal de la glutaminasa es fuertemente dependiente de la presencia de calcio: la actividad enzimática en ausencia de calcio es solo 25% del valor en presencia de este ion. Esto explica la disminución en la síntesis basal de urea a partir de glutamina observada en hepatocitos aislados incubados en ausencia de calcio extracelular.

En presencia de calcio, las cuatro hormonas estudiadas produjeron estimulación de la actividad de glutaminasa mitocondrial; sin embargo, los efectos de epinefrina y glucagon fueron de una magnitud mucho mayor que los de vasopresina y angiotensina II. En ausencia de calcio, la actividad basal de la glutaminasa se encontró disminuída. Sin embargo, los efectos estimulatorios de la epinefrina y el glucagon pudieron ser detectados, mientras que los efectos de vasopresina y angiotensina II no pudieron ser observados. Estos datos sugieren que el sitio adicional de estimulación por la epinefrina es la glutaminasa mitocondrial.

En resumen, los datos presentados sugieren que existen cuando menos dos sitios involucrados en la modulación hormonal de la ureogénesis en los cuales el calcio puede jugar un papel. Uno de éstos, es la actividad de la CFS; aunque la actividad basal de esta enzima no parece depender de calcio, la magnitud de la estimulación hormonal de esta enzima si depende

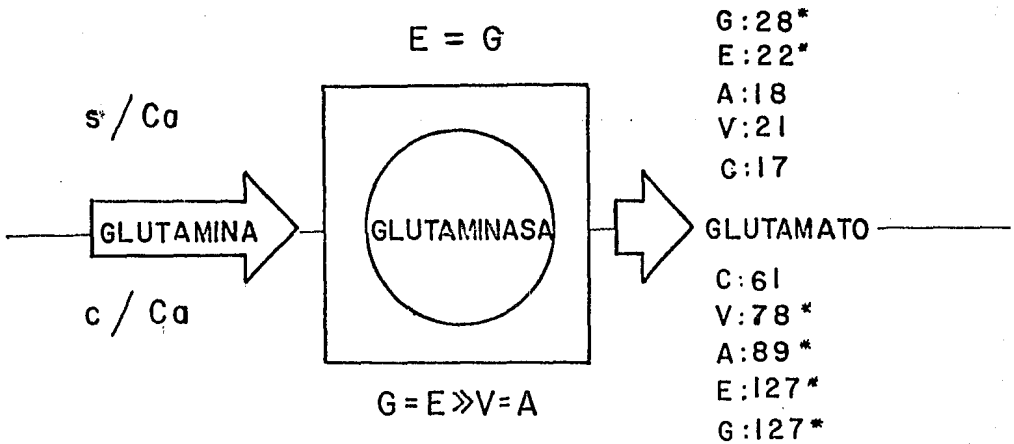


Fig. 8.- Esquema de la Estimulación de la Glutaminasa Mitocondrial.

Los valores están expresados en nmolas de glutamato/mg de proteína mitocondrial. Las otras indicaciones son como las del pie de la Fig. 6.

de este ion. Tanto epinefrina, glucagon, vasopresina y angiotensina influyen sobre la actividad de esta enzima, quizás a través de cambios calcio-dependientes en los niveles de N-acetilglutamato. El otro sitio identificado es la glutaminasa mitocondrial. Esta enzima es factor limitante en la síntesis de urea a partir de glutamina, y su actividad basal depende de calcio; sin embargo, la estimulación hormonal de la enzima no depende de este ion, es decir, tanto en presencia como en ausencia de calcio, la epinefrina y el glucagon estimulan fuertemente la actividad de la enzima, mientras que los péptidos vasopresores ejercen un efecto muy pobre.

En conclusión, los datos sugieren : 1) que el receptor involucrado en la estimulación de la ureogénesis por epinefrina es de tipo α_1 adrenérgico. 2) Que los péptidos vasopresores, vasopresina y angiotensina II son capaces de estimular el ciclo de la urea. 3) Que todas estas hormonas producen aumentos estables en la capacidad citrulinogénica mitocondrial. 4) Que el calcio juega un papel importante en la modulación del ciclo de la urea y en la mediación de los efectos hormonales sobre esta vía. 5) Que la estimulación α_1 adrenérgica y por glucagon de la síntesis de urea se localiza en dos sitios: la actividad de la CPS y la actividad de la glutaminasa mitocondrial. 6) Que la estimulación de la ureogénesis por vasopresina y angiotensina II se localiza fundamentalmente en un sitio, la actividad de la CFS, y por esto es más dependiente de la presencia de calcio. Por último 7) que en el mecanismo de transducción α_1 adrenérgico participan factores adicionales a los involucrados en las acciones de los péptidos vasopresores.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Munro, H.N. y Crim, M.C. (1980) "The proteins and amino acids" en "Modern Nutrition is Health and Disease" [Goodhart R.S. y Shills, M. E. eds.] Lea and Febiger, Philadelphia, pg. 51-98.
- 2.- Lehninger, A. (1975) "Oxidative degradation of amino-acids" en "Biochemistry" Worth Publishers, Inc. N.Y. pg. 559-584.
- 3.- Cohen, P.P. (1981) "The ornithine-urea cycle; biosynthesis and Regulation of Carbamyl phosphate synthetase I and ornithine trans-carbamylase" en "Current topics in cellular regulation", vol. 18, [Estabrook, R.W. y Srere, P. eds.] Academic Press, N.Y. pg. 1-17.
- 4.- Fruton, J.S. (1972) "Urea synthesis and protein metabolism" en "Molecules and Life" John Wiley and Sons, Inc. N.Y. pg. 424-444.
- 5.- Meijer, A.J. (1979) "Regulation of carbamyl-phosphate synthase (ammonia) in liver in relation to urea cycle activity." "Trends in Biochem. Sci." 4, 83-86.
- 6.- Lehninger, A. (1975) "Metabolic and Energy Transfer Pathways: a survey of intermediate metabolism" en "Biochemistry" Worth Publishers Inc. N.Y. pg. 363-384.
- 7.- Rasmussen, H. (1974) "Organization and control of endocrine systems" en "Textbook of Endocrinology" [Williams, R.H., ed.] W. B. Saunders, Co. Philadelphia pg. 1-30.
- 8.- Baxter, J.D. y MacLeod, K.M. (1980) "Molecular basis for hormone action" en "Metabolic control and Disease" [Bondy P.K. y Rosenberg, L.E. eds.] W.B. Saunders Co. Philadelphia pg. 104-149.

- 9.- Wanders, E.J.A., Van Woerkam, G.M., Nootboom, R.F., Meyer, A.J. y Tager, J.M. (1981) "Relationship between the rate of citrulline synthesis and Bulk changes in the intramitochondrial ATP/ADP ratio in rat liver mitochondria" *Eur. J. Biochem.* 113, 295-302.
- 10.- Meijer, A.J., Gimpel, J.A., Deleeuw, C.A., Tager, J.M. y Williamson, J.R. (1975) "Role of anion translocation across the mitochondrial membrane in the regulation of urea synthesis from ammonia by isolated rat hepatocytes" *J. Biol. Chem.* 250, 7728-7738.
- 11.- Petcu, L.G. y Plaut, G.W.E. (1980) "NADP-specific isocitrate dehydrogenase in regulation of urea synthesis in rat hepatocytes" *Biochem. J.* 190, 581-592.
- 12.- Meijer, A.J., Van Woerkom, G.M., Steinman, R. y Williamson, J.R. (1981) "Inhibition by Ca^{++} of carbamoylphosphate synthetase (Ammonia)" *J. Biol. Chem.* 256, 3443-3446.
- 13.- Saheki, T. y Katunuma, N. (1975) "Analysis of Regulatory factors for Urea Synthesis by isolated perfused rat liver." *J. Biochem.* 77, 659-669.
- 14.- Shigesada, K., Aoyagi, K. y Tatibana, M. (1978) "Role of Acetylglutamate in ureotelism; variations in acetylglutamate level and its possible significance in control of urea synthesis in mammalian liver." *Eur. J. Biochem.* 85, 385-391.
- 15.- Schinke, R.T. (1962) *J. Biol. Chem.* 237, 459-468.
- 16.- Cohen, P.P., Brucker, R.F. y Morris, S.M. (1978) "Aspects of Thyroid hormone action" en "Hormonal Proteins and Peptides" [Li, C.H. ed.] Academic Press, N.Y. p. 273-381.

- 17.- Lamers, W.H. y Mooren, P.G. (1980) "Role of Thyroid hormones in the Normal and glucocorticosteroid hormone-induced evolution of Carbamoyl-phosphate synthase (ammonia) and arginase activity in perinatal rat liver." *Biol. Neonate* 37, 264-284.
- 18.- Palckar, A. C., Collip, P.J. y Maddaiah, V.T. (1981) "Growth hormone and rat liver mitochondria effects on urea cycle enzymes". *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 100, 1604-1610.
- 19.- Unger, R.H. (1981) "The milieu Interieur and the Islets of Langrhans" *Diabetología* 20, 1-11.
- 20.- Hays, R.M. (1980) "Agents affecting the renal conservation of water" en "The pharmacological basis of therapeutics" [Goodman-Gilman, A., Goodman, L.S. y Gilman, A. eds.] Macmillan Publishing Co. N.Y. pg. 916-925.
- 21.- Douglas, W.W. (1980) "Polypeptides-angiotensin, plasma kinins and others" en "The pharmacological basis of therapeutics" [Goodman-Gilman, A., Goodman, L.S. y Gilman, A., eds.] Macmillan Publishing Co. N.Y. pg. 647-664.
- 22.- Hems, D.A., Rodríguez, L.M. y Whitton, P.D. (1978) "Rapid Stimulation by Vasopressin, Oxytocin and Angiotensin II of glycogen degradation in hepatocyte suspensions" *Biochem. J.* 172, 311-317.
- 23.- Cohen, P. (1982) "The role of protein phosphorylation in neural and hormonal control of cellular activity." *Nature* 296, 613-620.
- 24.- Ahlquist, R.P. (1980) "Historical perspective classification of adrenoceptors" *J. Auton. Pharmac.* 1, 101-106.
- 25.- Hoffman, B.B. y Lefkowitz, R.J. (1980) "Radioligand binding studies of adrenergic receptors: new insights into molecular and physiological regulation" *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 20, 581-608.

- 26.- Fain, J.N. y García-Sáinz, J.A. (1980)"Role of phosphatidylinositol turnover in α_1 and of adenylate cyclase inhibition in α_2 effects of catecholamines" Life Sciences 26, 1183-1194.
- 27.- Assimacopoulos-Jeannet, F.D., Blackmore, P.F. y Exton, J.H. (1977)
"Studies on alpha-adrenergic activation of hepatic glucose output.
Studies on the role of calcium in a adrenergic activation of phosphorylase"
J. Biol. Chem. 252, 2662-2669.
- 28.- Blackmore, P.F. y Exton, J.H. (1981)" α_1 -adrenergic stimulation of Ca^{++} mobilization without phosphorylase activation in hepatocytes from phosphorylase b kinase -deficient *gsd/gsd* rats". Biochem. J. 198, 379-383.
- 29.- Michell, R.H. (1975)"Inositol phospholipids and cell surface receptor function". Biochem. Biophys. Acta 415, 81-147.
- 30.- Takhar, A.P.S. y Kink, C.J. (1981)"Stimulation of inorganic phosphate incorporation into phosphatidylinositol in rat thoracic aorta mediated through V_1 -vasopressin receptors". Biochem. J. 194, 167-172.
- 31.- Thomas, A.P., Marks, J.S., Coll, K.E. y Williamson, J.R. (1983)
"Quantitation and Early kinetics of inositol lipid changes induced by Vasopressin in Isolated and cultured hepatocytes". J. Biol. Chem. 258, 5716-5725.
- 32.- Campanile, C.P., Crane, J.K., Peach, M.J. y Garrison, J.C. (1982)
"The hepatic angiotensin II receptor: characterization of the membrane-binding site and correlation with physiological response in hepatocytes". J. Biol. Chem. 257, 4951-4958.
- 33.- Crane, J.K., Campanile, C.P. y Garrison, J.C. (1982)"The hepatic angiotensin II receptor: Effect of guanine nucleotides and interaction with cyclic AMP production". J. Biol. Chem. 257, 4959-4965.

- 34.- Lardy, H.A., Kneer, N. y Wernette, M.E. (1983) "Regulation of gluconeogenesis by catecholamines, vasopressin and angiotensin. en Isolation, Characterization and Use of Hepatocytes." [Harris, R.A. y Cornell, N.W. eds.] Elsevier Biochemical, N.Y. pg. 445-454.
- 35.- Mallette, L.E., Exton, J.H. y Park, C.R. (1969) "Effects of glucagon on Aminoacid transport and utilization in the perfused rat liver". J. Biol. Chem. 244, 5724-5728.
- 36.- Titheradge, M.A. y Haynes, R.C. (1980) "The hormonal stimulation of ureogenesis in isolated hepatocytes through increases in mitochondrial ATP production". Arch. Biochem. Biophys. 201, 44-50.
- 37.- Berry, M.N. y Friend, D.S. (1969) "High yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells". J. Cell. Biol. 43, 506-520.
- 38.- Gutman, I. y Bergmeyer, H.U. (1974) "Urea" en "Methods of Enzymatic analysis" [H. U. Bergmeyer, ed.] Academic Press, N.Y. p. 1791-1793.
- 39.- Brown, B.L., Albano, J.D.M., Ekins, R.P. y Sgherzi, A.M. (1971) "A Simple and Sensitive Saturation Assay method for the measurement of Adenosine 3':5'-cyclic monophosphate". Biochem. J. 121, 561-562.
- 40.- García-Sáinz, J.A. y Fain, J.N. (1980) "Effect of adrenergic amines on phosphatidylinositol labeling and glycogen synthase activity in Fat cells from euthyroid and Hypothyroid rats". Mol. Pharmacol. 18, 72-77.
- 41.- Hensgens, H.E.S.J., Verhoeven, A.J. y Meijer, A.J. (1980) "The relationship between intramitochondrial N-Acetyl-glutamate and activity of Carbamoyl-Phosphate synthetase (ammonia)". Eur. J. Biochem. 107, 197-205.
- 42.- Prescott, L.M. y Jones, M.E. (1969) "Modified methods for the determination of Carbamyl aspartate". Analytical Biochem. 32, 408-419.

- 43.- Bernt, E. y Bergmeyer, H.U. (1974) L-Glutamate. en "Methods of Enzymatic Analysis" H.U.[Bergmeyer, ed.] Academic Press,N.Y. p. 1705-1708
- 44.- Hoffman, B.B., Dukes, D.F. y Lefkowitz, R.J. (1981)"Alpha-adrenergic receptors in liver membranes: delineation with subtype selective radioligands". Life Sciences, 28, 265-272.
- 45.- El-Refai, M.F., Blackmore, P.F. y Exton, J.H. (1979)"Evidence for two α -adrenergic binding sites in liver plasma membranes". J. Biol. Chem. 254, 4375-4386.
- 46.- Tolbert, M.E.M., White, A.C., Aspry, K. Cutts, J. y Fain, J.N. (1980) "Stimulation by vasopressin and α catecholaminas of phosphatidylinositol formation in isolated rat liver parenchymal cells". J. Biol. Chem. 255, 1938-1942.
- 47.- Siess, E.A., Fahimi, F.M. y Wieland, O.H. (1981)"Evidence that glucagon stabilizes rather than activates mitochondrial functions in rat liver. Hoppe-Seyler's Z." Physiol. Chem. 362, 1643-1651.