

11261

20/12

REGULACION HORMONAL DE LA
UREOGENESIS EN HEPATOCITOS AISLADOS

TESIS

PRESENTADA LA MEDICO CIRUJANA

RAQUEL GUINZBERG FERRUSQUIA

PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRIA EN CIENCIAS BIOMEDICAS
(BIOLOGIA MOLECULAR)

1989

FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

CONTENIDO

INTRODUCCION-----	1
REGULACION HORMONAL-----	2
EPINEFRINA-----	3
GLUCAGON-----	5
CICLO DE LA UREA-----	11
REGULACION DEL CICLO DE LA UREA---	15
REGULACION HORMONAL DEL CICLO DE--	
LA UREA-----	18
ADENOSINA-----	19
HIPOTESIS-----	22
ASPECTOS METODOLOGICOS-----	24
RESULTADOS-----	27
CONCLUSION-----	36
BIBLIOGRAFIA-----	38
ARTICULO-----	42

INTRODUCCION

Entre las características fundamentales de los organismos pluricelulares destaca su capacidad de dar una respuesta global a un estímulo dado y se han hecho innumerables esfuerzos para estudiar dicha integración.

En los mamíferos, de manera general, la regulación de las grandes vías metabólicas se ejerce a través de dos mecanismos principales, uno de respuesta lenta que incluye el ajuste en la síntesis de enzimas y otro en la que la respuesta es de las enzimas pre-existentes. Una de las vías metabólicas más importantes, cuya integración y regulación es insuficientemente conocida es el de la síntesis de la urea en los mamíferos. Esta tesis se refiere al estudio de algunos aspectos de la regulación, de instalación inmediata en la síntesis de la urea por el hígado de la rata. Los antecedentes importantes que se han descrito son: la participación del N-acetil glutamato como efector alostérico de la carbamil fosfato sintetasa I, el papel de la L-arginina como activador alostérico de la N-acetil glutamato sintetasa I, la regulación de la síntesis de citrulina dada por la disponibilidad de la ornitina y el efecto de las diferentes hormonas (glucagon, epinefrina) sobre la velocidad de síntesis de la urea.

En el presente trabajo se presenta el efecto de algunos factores metabólicos que influyen sobre el ciclo de la urea, y se estudió en detalle la influencia que tienen los nucleósidos adenosina e inosina sobre la velocidad de síntesis de urea en hepatocitos aislados de rata, así como las interrelaciones que muestran, en la velocidad de síntesis de urea, la acción de los nucleósidos anotados y las hormonas ureogénicas glucagon y epinefrina.

REGULACION HORMONAL

El sistema endócrino está formado por glándulas que sintetizan mensajeros químicos u "hormonas", transportadas por la sangre en cantidades minúsculas hasta determinados órganos, los cuales constituyen sus blancos u objetivos, donde regulan una gran variedad de actividades fisiológicas y metabólicas. Las hormonas de los mamíferos son clasificadas desde el punto de vista químico en tres tipos:

- a) hormonas esteroideas, derivadas del colesterol y de naturaleza lipídica (estrógenos y testosterona, etc.).
- b) hormonas peptídicas (glucagon, adrenocorticotrópica, etc.).
- c) hormonas derivadas de aminoácidos (tiroideas, catecolaminas, etc.).

También pueden ser clasificadas las hormonas en función del tiempo de latencia en el que actúan. Es decir el tiempo que transcurre entre la interacción de la hormona con su receptor y la manifestación del efecto hormonal. El tiempo de latencia es variable, y puede ser de segundos o minutos, hasta tiempos de latencia más prolongados de horas o días. El mecanismo de acción de las hormonas cuyo tiempo de latencia es corto varía notablemente en comparación con las de tiempo de latencia largo. Generalmente, las hormonas con una corta latencia para responder no penetran al interior de la célula, y su acción consiste en activar los receptores específicos que se encuentran localizados sobre la cara externa de la membrana plasmática (1).

Para las hormonas cuyo tiempo de latencia es largo, el mecanismo de acción incluye su penetración a través de la membrana plasmática y su asociación con receptores solubles localizados en el citoplasma ocasionando

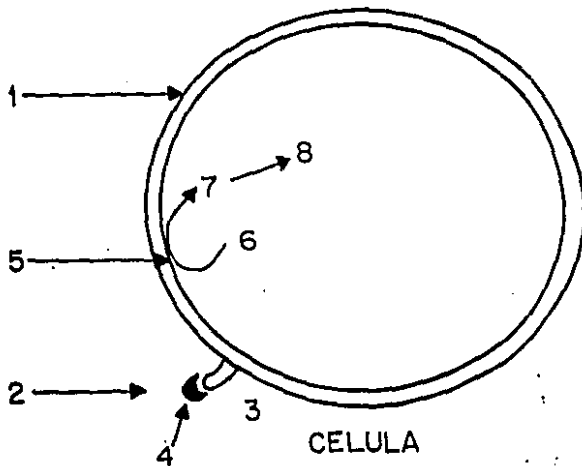
cambios en la masa y composición de la célula (1) Fig. 1.

De aquí que puede afirmarse que el sistema endócrino media las necesidades adaptativas crónicas del organismo por cambios en la composición celular, inducidos por hormonas de acción lenta, y las necesidades adaptativas a situaciones agudas y transitorias, por cambios en la dinámica celular inducidos por hormonas de acción rápida.

EPINEFRINA

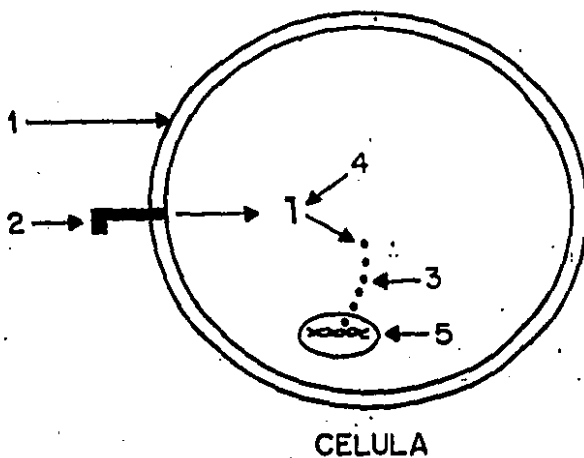
La epinefrina es capaz de producir efectos rápidos sobre la célula. Uno de los efectos más comunes es el que produce la epinefrina sobre un heterogéneo tipo de células, disparando una serie de respuestas que prepara el organismo vertebrado para "luchar o huir". Dentro de estas respuestas se tiene el aumento en la presión sanguínea, el incremento en el ritmo cardíaco y el rendimiento del corazón, el relajamiento del músculo liso y la contracción de otros tejidos musculares. Además, estimula la glucogenólisis hepática y la lipólisis en el tejido adiposo. La epinefrina funciona como una hormona circulante que es liberada por la médula suprarrenal, es una catecolamina, que para obtener las respuestas arriba indicadas, interacciona con receptores específicos, de los cuales existen, cuando menos en los hepatocitos, dos tipos primarios, los receptores α - y los receptores β -adrenérgicos. Los receptores adrenérgicos son también distinguidos en base al mecanismo por el cual transmiten la señal de la hormona al interior de la célula, es decir el mecanismo de transducción. Los receptores β 1 y 2 actúan a través del sistema adenilato ciclasa, y de manera similar a la descrita para el glucagón, activan a la enzima produciendo una acumulación intracelular de AMPc. Los receptores α 2 adrenérgicos también actúan a

HORMONAS DE TIEMPO DE LATENCIA CORTA



- 1 - Membrana plasmática
- 2 - Estímulo
- 3 - Receptor
- 4 - Hormona
- 5 - Adenilato ciclasa
- 6 - ATP
- 7 - AMPc
- 8 - Proceso metabólico

HORMONAS DE TIEMPO DE LATENCIA LARGA



- 1 - Membrana plasmática
- 2 - Estímulo
- 3 - Hormona
- 4 - Receptor
- 5 - Núcleo

FIG. 1 REPRESENTACION ESQUEMATICA DEL MECANISMO DE ACCION DE LAS HORMONAS.

través del sistema adenilato ciclasa pero de manera opuesta a las aminas β adrenérgicas y del glucagon, es decir inhiben la actividad de la enzima; y la estimulación del receptor $\alpha 2$ adrenérgico, puede contrarrestar la acción de los receptores que activan a la adenilato ciclasa. Se propone que las acciones $\alpha 1$ adrenérgicas son mediadas por un recambio en el metabolismo del fosfatidilinositol (fosfolípido de la membrana celular). Este recambio se inicia con la hidrólisis del fosfolípido, por una fosforilasa, convirtiéndose en inositol-1-P y diacilglicérido. El diacilglicérido es fosforilado a ácido fosfatídico y regenera, tras de dos pasos enzimáticos, al fosfatidilinositol. Este recambio del fosfatidilinositol es el punto clave en la citostasis del calcio, el cual puede ser acoplador en el sistema *estimulación efecto* o sea como segundo mensajero. Es decir este fenómeno que modifica la homeostasis de los iones de calcio, y estos iones *per se* juegan un papel importante. La movilización de los iones de calcio en el hígado de rata, inducido por hormonas dependientes de calcio, se explica no solo en términos de la inhibición de la enzima ATPasa dependiente de calcio, localizada en la membrana celular, sino que el flujo de calcio parece ser debido a la movilización de este catión de los organelos intracelulares hacia el citosol (2).

Exton y colaboradores (1977) presentan evidencias experimentales que indican la presencia de calcio libre en el citoplasma, de varios tipos celulares, en respuesta a algunas hormonas como el glucagon, la epinefrina, etc.

GLUCAGÓN

El glucagon, es una hormona polipeptídica del páncreas, secretada a la

sangre por las células alfa de los islotes de Langerhans. En estudios recientes se ha demostrado la existencia de una cantidad importante de esta hormona en las células alfa del estómago, en porciones extrahepáticas de las vías gastrointestinales, y en pequeñas cantidades, en el cerebro de mamífero, con la posibilidad de que en este último actúe como neurotransmisor (3).

Se conocen los efectos que produce el glucagón sobre el metabolismo. Esta hormona ejerce su acción en el hígado de acuerdo a los requerimientos homeostáticos del organismo. Es uno de los componentes principales en el sistema glucorregulador, el cual va a mantener en equilibrio la concentración de glucosa del medio interno, ejerce dicho equilibrio con la participación de la insulina por medio de señales neuroendócrinas (4). En condiciones basales el 75% de la producción de glucosa por el hígado está mediada por la acción del glucagón (4).

En situaciones de emergencia se produce una actividad muscular intensa, y da como consecuencia el incremento en la utilización de glucosa por el tejido, en este caso el sistema nervioso asume el control de la producción de glucosa mediante la secreción de la epinefrina. Esta hormona estimula la secreción de glucagón por los islotes pancreáticos, estimula a su vez la producción de glucosa por el hígado, inhibe la secreción de insulina y previene la entrada de glucosa a los tejidos insulino sensibles (tejido adiposo e hígado). En general el glucagón ejerce su efecto catabólico facilitando la movilización de nutrientes desde su depósito e inhibe los procesos anabólicos, es decir, actúa como una hormona de necesidad de energía.

Un efecto característico del glucagón, en el hígado, es el de estimular la producción de glucosa a través de la inhibición en la síntesis

de glucógeno, un incremento en la glucogenólisis y una mayor gluconeogénesis.

Una de las acciones del glucagón es la estimulación directa de la secreción de insulina por las células beta, que ha servido como base para la descripción de un sistema de *retroalimentación negativa*, entre la insulina y el glucagón, mientras que éste estimula la secreción de insulina (4).

La elucidación del mecanismo a través del cual el glucagón es capaz de estimular la glucogenólisis fue de gran importancia para la comprensión del mecanismo de la acción hormonal. El glucagón aumenta los niveles hepáticos de AMP cíclico (AMPc), el cual a su vez es capaz de activar una enzima llamada proteína cinasa como un eslabón más en el llamado *fenómeno de cascada* (Fig. 2). El AMPc se forma a partir de ATP con liberación de pirofosfato, en una reacción catalizada por la enzima adenilato ciclasa, la cual se encuentra en muchos tejidos animales, a nivel de la cara interna de la membrana plasmática (5).

La actividad de esta enzima es dependiente de magnesio y está constituida por:

- a) un receptor específico
- b) un complejo protéico que acopia a este receptor con la subunidad catalítica de la ciclasa, cuya actividad está regulada por los nucleósidos de guanina, y
- c) la subunidad catalítica de la enzima ciclasa.

La unión de la hormona, en este caso el glucagón, a su receptor provoca un cambio de conformación local en la membrana que origina la activación de la adenilato ciclasa, con lo que se eleva la concentración del AMPc. A su vez, el AMPc así formado se une a la subunidad reguladora de una proteína cinasa, de la que libera a la subunidad catalítica en forma activa, la cual

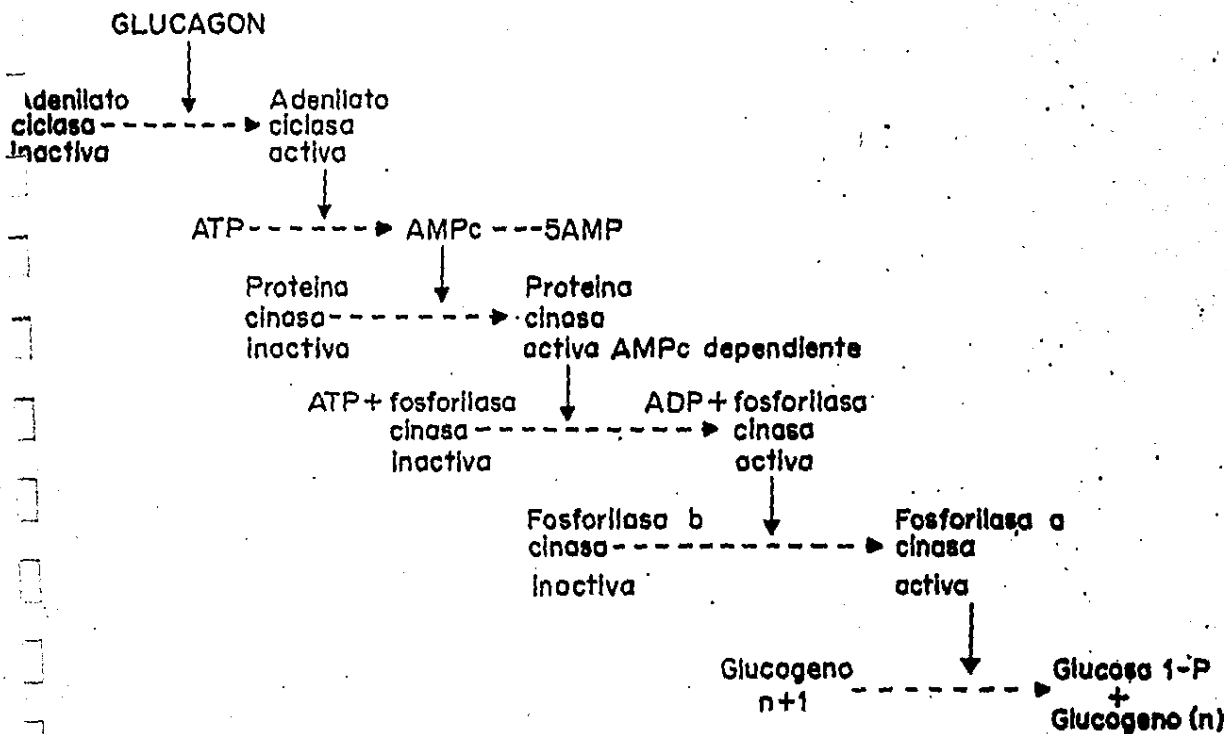


FIG. 2 MECANISMO DE TRANSDUCCION DE LA SEÑAL DEL GLUCAGON.

fosforila, a expensas de ATP, y en presencia de calcio a diversas enzimas. La fosforilación de las enzimas por el mecanismo descrito es uno de los principales sistemas celulares para regular la actividad de enzimas clave de las diversas vías metabólicas.

Se conoce que la aceleración de la glucogenólisis hepática por el glucagon es el resultado de un incremento en la actividad de la fosforilasa "a", una de las enzimas fosforiladas y así activada por acción de la proteína cinasa. A su vez la fosforilasa cinasa fosforila a la glucógeno fosforilasa "b", convirtiéndola en glucógeno fosforilasa "a" que es la forma más activa de la enzima, capaz de catalizar la degradación del glucógeno a glucosa 1-fosfato, a partir de la cual se forma glucosa 6-fosfato y después la glucosa libre de la sangre.

El glucagon parece tener un papel importante en la disminución de la actividad de la enzima hidroximetilglutaril CoA reductasa (HMG-CoA reductasa), y por lo tanto, una disminución en la síntesis hepática del colesterol (8).

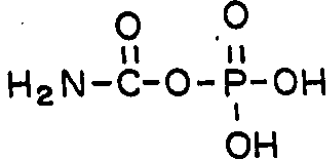
El glucagon, además de estimular la gluconeogénesis, estimula también la síntesis de urea; el mecanismo mediante el cual se lleva a cabo la estimulación de la síntesis de urea aún no está completamente dilucidado (9).

Se ha descrito que el glucagon produce una aceleración de la proteólisis hepática, simultáneamente con la inhibición de la síntesis proteica en el mismo órgano. Aparentemente se retrasa la terminación de las cadenas polipeptídicas en los ribosomas, por lo que se ha sugerido la acción de la hormona a nivel de la elongación o de la terminación de las cadenas polipeptídicas. El efecto neto de estas dos acciones independientes de la hormona es incrementar el reservorio hepático de aminoácidos, favoreciendo



Carbamil
fosfato
sintetasa

- (+) N-acetil glutamato sintetasa
- (+) N-actil glutamato
- (+) Magnesio
- (+) arginina
- (-) calcio
- (-) potasio



Carbamil fosfato

- (+) Modulación positiva
- (-) Modulación negativa

FIG. 3. MODELO DE LA REGULACION DE LA PRIMER ENZIMA DEL CICLO DE LA UREA.

así la formación de urea y proporcionando precursores para la gluconeogénesis.

CICLO DE LA UREA

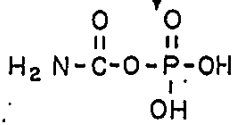
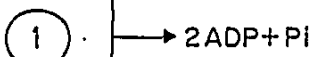
El estudio del ciclo de la urea ha desempeñado un papel importante en el desarrollo de la bioquímica. Con él se introdujo por primera vez el concepto de *ciclo metabólico*, fue uno de los primeros ejemplos de procesos compartimentalizados y su análisis ilustró la adaptación del metabolismo al entorno e impulsó la investigación bioquímica comparada.

La urea fue descubierta en 1773 por Rouelle, al evaporar una muestra de orina en presencia de etanol (10). Fourcroy y Vauquelin en 1798 fueron los primeros en utilizar el término de urea. En 1823 Prevost y Dumas realizaron experimentos de análisis elemental y encontraron que existía urea en sangre (10). Woehler, químico alemán, en 1828, demostró la formación de urea a partir de cianato de amonio calentado (10).

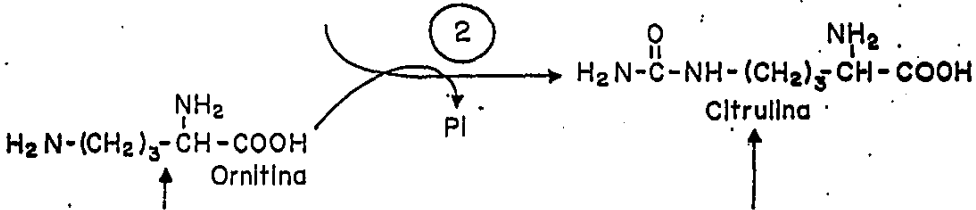
Krebs y Henseleit en 1932 demostraron las etapas principales del ciclo de la urea a partir de su observación de que con la adición de pequeñas cantidades de ornitina o de arginina estimulaban catalíticamente la producción de amonio en cortes de hígado (11). Investigaciones posteriores efectuadas en el laboratorio de Cohen y Hayano, establecieron los detalles de las etapas enzimáticas en la síntesis de la urea.

En la mayoría de los vertebrados terrestres el amonio es excretado en forma de urea. La síntesis de la urea se lleva a cabo en el hígado, y esta constituida por las reacciones esquematizadas en la Fig.4.

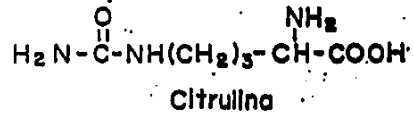
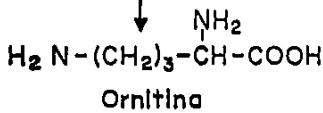
La síntesis de la urea se inicia a partir de bicarbonato, dos moléculas de ATP y amonio. Las dos primeras enzimas del ciclo de la urea son la



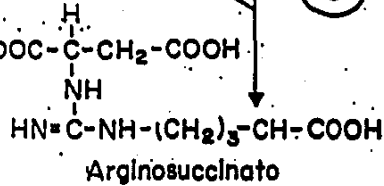
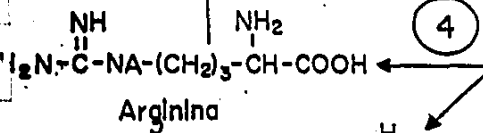
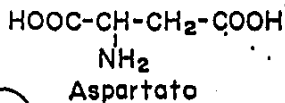
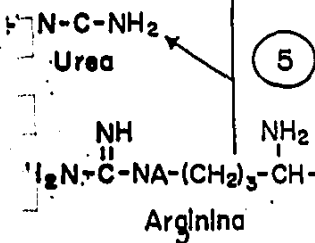
Carbamil Fosfato



Mitocondr



Citosol



Enzimas participantes en el ciclo: 1- = Carbamil fosfato sintetasa, 2- = Ornitrin transcarbamilasa, 3- = Arginosuccinato sintetasa, 4- = Arginosuccinasa, 5- = Arginasa.

FIG. 4 CICLO DE LA UREA.

BIBLIOTECA CENTRAL

carbamil fosfato sintetasa I (CFS-I) y la ornitintrascarbamilasa (OTC) localizadas dentro de la mitocondria, mientras que las otras tres enzimas se localizan en el citoplasma, y son la arginosuccinato sintetasa, la argino succinasa y la arginasa.

Existe otra enzima, la N-acetilglutamato sintetasa, de localización mitocondrial, la cual no interviene directamente en el ciclo de la urea, sin embargo parece ser muy importante para su regulación (12).

La enzima carbamil fosfato sintetasa I esta presente en la matriz mitocondrial del higado de animales ureotéticos, representa el 20% del total de la proteina de la mitocondria. La CFS-I se ha encontrado, ademas en cantidades bajas, pero metabólicamente activas, en la mucosa intestinal de animales ureotéticos (12).

La CFS-I cataliza la formación de un mol de carbamilfosfato, dos moles de ADP y un mol de fosfato inorgánico a partir de un mol de amonio, un mol de bicarbonato y dos moles de ATP.

La CFS-I requiere como cofactor obligatorio el N-acetil glutamato; la enzima es totalmente dependiente de la presencia de este, ademas de requerir iones de magnesio, cobalto, potasio y calcio para su óptima actividad.

Los estudios iniciales sobre el efecto que produce el N-acetilglutamato se llevaron a acabo en preparaciones crudas de higado y se observó la necesidad de un cofactor derivado del glutamato para la activación de la enzima CFS-I (13).

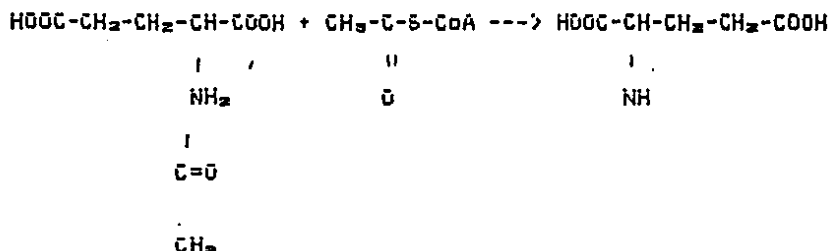
Después de realizar ensayos con diferentes análogos del N-acetilglutamato (NAG) se encontró que este último es el mas activo de todos .

La reacción enzimática para la síntesis de N-acetilglutamato es la siguiente:

Glutamato

Acetil-CoA

N-Acetilglutamato



En el hígado de los mamíferos, la N-acetil glutamato sintetasa y el N-acetilglutamato se encuentra en forma predominante en la matriz mitocondrial. A su vez, la N-acetil glutamato sintetasa es activada fuertemente por concentraciones pequeñas de arginina, aunque la sensibilidad a este aminoácido puede depender de la situación nutricional (14). Aunque se desconoce el significado fisiológico y la importancia funcional de esta activación se sabe que la administración de arginina, *in vivo*, incrementa la concentración de N-acetilglutamato en el hígado (15) Fig.3.

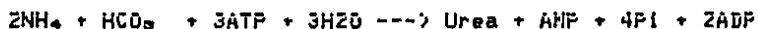
El siguiente paso en el ciclo de la urea es la transferencia del grupo carbamilo del carbamil fosfato a otra molécula, la ornitina, en una reacción catalizada por la segunda enzima mitocondrial del ciclo, la ornitintrancarbamilasa (OTC).

El producto de esta reacción es el aminoácido citrulina, el cual abandona la matriz mitocondrial y pasa al citosol en donde tiene lugar la condensación del grupo amonio de una molécula de aspartato con el grupo carbamilo de la citrulina, en presencia de ATP, para formar el arginosuccinato, catalizada por esta reacción por la arginosuccinato sintetasa (ASS). Se forma además en esta reacción pirofosfato, que al ser hidrolizado, por una pirofosfatasa, forma fosfato inorgánico y desplaza el

equilibrio de la reacción a la formación del arginosuccinato.

La siguiente reacción es catalizada por la arginosuccinato liasa, la cual convierte al arginosuccinato en arginina y fumarato; la arginina así formada es el precursor inmediato de la urea, mientras que el fumarato eventualmente retorna al conjunto de intermediarios del ciclo de los ácidos tricarbóxicos. La última reacción del ciclo es catalizada por la arginasa, la cual a partir de la arginina y con la introducción de una molécula de agua forma la urea y regenera la ornitina; dicha reacción tiene lugar en el citosol. La urea es excretada como tal, mientras que la ornitina puede ser recirculada (12) Fig.4.

La ecuación global del ciclo de la urea es la siguiente:



Como se discutirá más adelante, el ciclo de la urea que se lleva a cabo en el hígado de animales ureotéticos, convierte los niveles potencialmente tóxicos de amoníaco en un metabolito no tóxico, como lo es la urea.

REGULACION DEL CICLO DE LA UREA

La síntesis de la urea como todos y cada uno de los procesos metabólicos importantes llevados a cabo en organismos pluricelulares, está sujeta a diferentes niveles de regulación metabólica.

Se han analizado las propiedades físicas estequiométricas y cinéticas de las enzimas purificadas que catalizan las diversas reacciones del ciclo de la urea.

Además se han hecho varios estudios acerca del mecanismo de la reacción.

y la regulación de cada una de ellas. Como ya se mencionó, la vía completa de síntesis de urea incluye reacciones enzimáticas presentes tanto en el citoplasma como en la mitocondria, que están sujetas a control por la concentración de sustratos, activadores, inhibidores, etc.

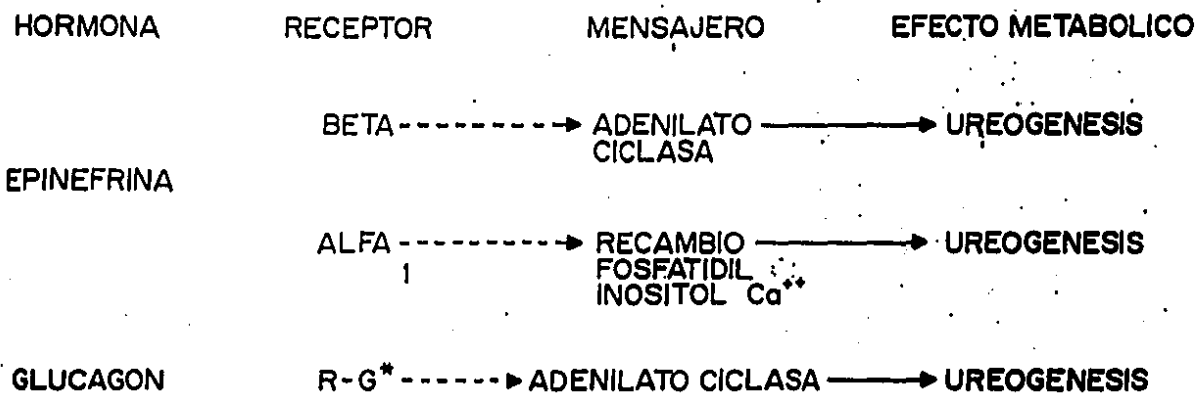
Existe un gran número de estudios que intentan identificar el o los pasos limitantes en la vía de la síntesis de la urea.

Se ha analizado: la disponibilidad de equivalentes reductores (16), la disponibilidad de ATP (17), los niveles de los diferentes iones y la actividad de sistemas de transporte de aniones localizados en la membrana mitocondrial (16), la disponibilidad de sustratos en la regulación del mismo (18), etc.

En los hepatocitos aislados se ha encontrado que bajo condiciones fisiológicas, la síntesis de la urea se ve limitada por la actividad de la primera enzima del ciclo, la CFS-I (19).

Como ya se mencionó la CFS-I constituye del 20-30% de la proteína total mitocondrial y su actividad se ve limitada por la disponibilidad de su cofactor, el NAG, la enzima participa en la fijación primaria del amonio y el bicarbonato, requiere dos moles de ATP, magnesio, calcio, potasio y cobalto para su actividad máxima (23) Fig.3.

Uno de los aspectos más estudiados en el ciclo de la urea ha sido el de los cambios adaptativos por cambios en la cantidad de la enzima del ciclo. Estos estudios han sido realizados en el hígado de rata sujeta a variaciones en la cantidad de proteína en la dieta. Schinke (24), publicó que los niveles de enzimas hepáticas participantes en la biosíntesis de urea aumentan coordinadamente en función del aumento de proteína de la dieta, mientras que las ratas alimentadas con dietas libres de proteínas, pero adecuada en calorías, mostraron una disminución de todas las enzimas del ciclo, aquellas



R-G* receptor del glucagon.

FIG. 5 MODELO DEL PROBABLE MECANISMO DE TRANSDUCCION DEL GLUCAGON Y EPINEFRINA.

con ayuno prolongado tuvieron un incremento.

Además demostró Schimke que en una dieta balanceada en proteínas, la actividad de la enzima N-AGS y por lo tanto el nivel de NAG, aumenta en proporción directa a la proteína ingerida.

Recientemente Cederbaun y cols. reportaron que los cambios en la cantidad de enzimas sintetizadoras de urea, producidos por un alto contenido de proteína dietética, se deben a una mayor síntesis de sus respectivos RNAm, muy especialmente en el caso de la carbamil fosfato sintetasa I.

El conocimiento de todos los procesos moleculares que para regular la vía biosintética de la urea todavía es incompleta. Existe un interés particular para el entendimiento de los procesos que participan en la degradación de las enzimas proteolíticas y todavía queda por analizar el factor o los factores que operan para regular los niveles de las cinco enzimas de la biosíntesis de urea de una manera coordinada.

REGULACION HORMONAL DE LA BIOSINTESIS DE UREA

Los efectos hormonales sobre la biosíntesis de la urea se han estudiado en varios sistemas que incluyen el hígado de rata fetal, el hígado de feto humano, los hepatocitos aislados y las mitocondrias aisladas de hígado de rata, así como también los animales intactos.

Las hormonas estudiadas son los corticoesteroides (25), el glucagón (26,27), las hormonas de crecimiento (25), y las hormonas tiroideas (26). Gebhart y Heke (29) publicaron la acción de hormonas en hepatocitos aislados de rata; al usar cultivos de células, en monocapas, con perfusión no observaron efectos estimuladores del glucagón ni con la dexametasona sobre los niveles de las enzimas del ciclo de la urea.

En caso de la metamorfosis de los anfibios, una de las respuestas más tempranas a las hormonas tiroideas es la de la CF5-I (30), con un aumento coordinado en los niveles de la enzima e incremento en su actividad (30).

Los efectos gluconeogénicos del glucagon y la epinefrina han sido descritos (31). Sin embargo el mecanismo a través del cual estas hormonas estimulan las enzimas limitantes de esta vía no se conoce, se ha descrito la estimulación de la ureogénesis en el hígado por el glucagon y la epinefrina; (32) sin embargo es poco conocido el mecanismo a través del cual estas hormonas estimulan la ureogénesis (32).

Se ha reportado acerca de los diferentes tipos de receptores adrenérgicos que median la respuesta ureogénica en hepatocitos aislados de rata (33), la edad como un factor importante en su regulación (34), así como el papel del calcio en la producción de los efectos ureogénicos del glucagon y la epinefrina (35) Fig.5.

ADENOSINA

En fechas recientes se ha ampliado considerablemente los conocimientos sobre las funciones y las acciones patológicas del nucleósido de adenosina.

La adenosina no solo es un intermediario mas en el metabolismo de nucleótidos púricos, ya que interviene en varios procesos celulares.

Dentro de los diversos efectos metabólicos se encuentran:

a) Efectos sobre la concentración intracelular de nucleótidos de adenosina como lo es la elevación de los niveles de ATP *in vivo* e *in vitro*. La adenosina eleva los niveles de ATP celular en el animal integro sin modificar los niveles de ADP y AMP, en algunos casos se acompaña el aumento de ATP con una disminución del fosfato inorgánico (36).

b) Incremento en la relación NAD/NADH. La adenosina administrada *in vivo* incrementa hasta 7 veces la relación NAD/NADH mitocondrial sin modificar su relación en el citosol (37).

c) Acción antilipolítica de la adenosina *in vitro*. Se sabe que la adenosina tiene un efecto antilipolítico *in vivo* e *in vitro*, el cual se encuentra mediado por el efecto del nucleósido al disminuir los niveles de AMPc del adipocito (38).

d) Aumento de la actividad de la glucógeno sintetasa de hígado de rata, e incrementa la incorporación de ^{14}C -glucosa al glucógeno hepático (glucogénesis) (39). El nucleósido aumenta ó veces la incorporación de ^{14}C -alanina al glucógeno hepático (gluconeogénesis-glucogénesis).

Además, la adenosina mimetiza y potencia la estimulación de la oxidación de la glucosa producida por la insulina en tejido adiposo de rata (40).

Existe un gran interés sobre las acciones de la adenosina como hormona y como neuromodulador (41). Se han hecho esfuerzos importantes para caracterizar los receptores de adenosina.

Con base en los efectos en la actividad de la adenilato ciclasa se han clasificado los receptores de adenosina y son divididos en 2 tipos: A₁ y A₂, los cuales modulan la actividad de la enzima adenilato ciclasa (estimula o inhibe). Independientemente de la acción de la adenosina, mediada por receptores, sobre la adenilato ciclasa, la adenosina actúa sobre la enzima en un sitio regulador, denominado "F" el cual ejerce una acción inhibitoria. Este sitio se encuentra localizado en el interior de la membrana citoplasmática, formando parte de la unidad reguladora del componente catalítico (47) Fig.6. Haslam y Lynham (42) propone que la adenosina realiza un efecto bifásico en, bajas concentraciones (2-25 μM) estimula la enzima

adenilato ciclasa mientras que altas concentraciones (100 μ M) la inhiben.

Si bien algunos efectos producidos por la acción de la adenosina extracelular se encuentran correlacionados con los niveles de AMPc, como la inhibición de la agregación plaquetaria (43), la inhibición de la lipólisis, (44) la inhibición de la citólisis mediada por linfocitos (45) y la expresión del antígeno y de los receptores de la membrana de los linfocitos T (45). Existe una serie de fenómenos fisiológicos mediados por receptores de adenosina (Ado), para los cuales no ha sido posible demostrar su relación con los niveles de AMPc. Entre estos fenómenos se encuentran la acción depresora de la adenosina en ciertas neuronas del SNC, su efecto regulador del flujo sanguíneo en corazón, cerebro y músculo esquelético y su efecto vasoconstrictor en la corteza renal.

Con respecto a la acción de la adenosina en el metabolismo y fisiología de los seres vivos en especial de los mamíferos queda un gran panorama por dilucidar.

HIPOTESIS

Existe suficiente evidencia experimental sobre el papel de la adenosina como neuromodulador en el sistema nervioso central (46). La existencia de receptores de la adenosina se han encontrado en diferentes tejidos incluso en el hígado de rata (48). Además se ha señalado la existencia de 2 clases de receptores en el propio hígado (47). La presencia de tales receptores orienta hacia un posible efecto de la adenosina como hormona. Keppens y Wulf (47) han descrito una activación de la glucogeno fosforilasa, en hepatocitos aislados de rata, al ser estos estimulados por concentraciones micromolares de adenosina. El dato anterior identifica a la adenosina como "hormona" semejante al de la epinefrina y el glucagon y señala una vía metabólica específicamente estimulada por el nucleósido.

En vista de lo anterior se preguntaría ¿la adenosina es una hormona que en la glándula hepática regule otras vías metabólicas?. Entre las vías metabólicas regulables por hormonas, una de gran importancia para mantener la homeostasis, que además requiere de energía para su operación es la ureogénesis por lo tanto en este trabajo se investigó el posible efecto regulador de la adenosina sobre la ureogénesis hepática.

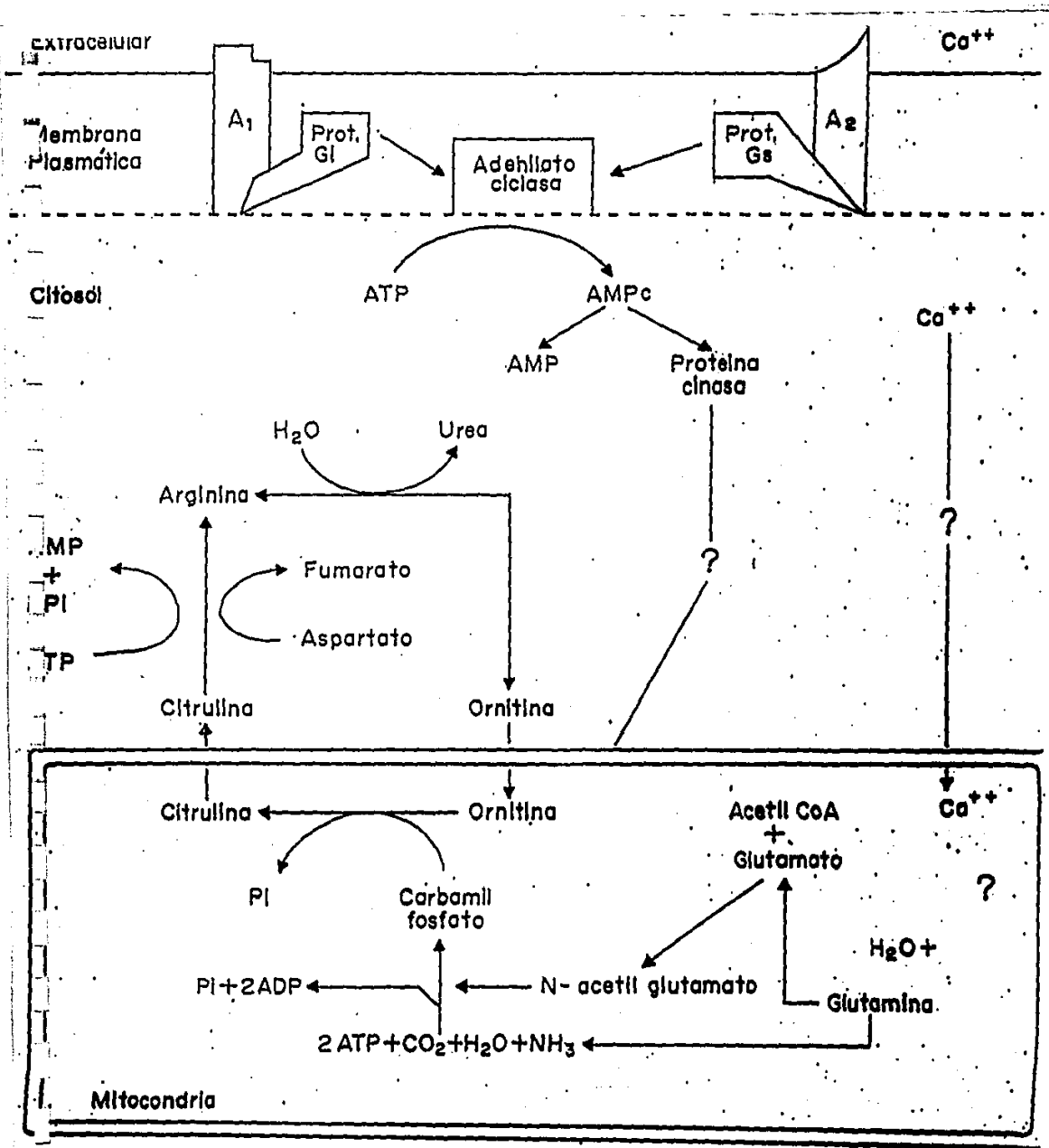


FIG. 6 REPRESENTACION ESQUEMATICA DE LAS SEÑALES DE TRANSDUCCION DE ADENOSINA EN HEPATOCITOS

MATERIAL Y METODOS

Los experimentos fueron realizados enoleando hepatocitos aislados de rata macho de la cepa Wistar. Las células obtenidas fueron incubadas en presencia o en ausencia de los diferentes agentes cuyos efectos se estudiaron.

ASLAMIENTO DE HEPATOCITOS

Los hepatocitos fueron aislados empleando la técnica descrita por Berry y Friend en 1969 (20). La técnica se basa en exponer los espacios intercelulares del hígado a la acción de la colagenasa, por medio de una infusión continua de dicha enzima a través de la vena porta.

La colagenasa es una enzima que degrada gran parte de los elementos adhesivos presentes entre las células, se recircula durante quince minutos, en un medio salino amortiguado. Es de gran importancia mantener una concentración adecuada de la enzima, ya que la colagenasa contiene además proteasas que en exceso pueden dañar la membrana citoplasmática del hepatocito.

El medio utilizado en los experimentos fue solución Ringer-Bicarbonato con la siguiente composición: NaCl 120 mM, KCl 4.75 mM, KH_2PO_4 1.2 mM, HgSO_4 1.2 mM, NaHCO_3 12 mM, CaCl_2 1.2 mM, a pH 7.4 a temperatura de 37 °C equilibrado con O_2/CO_2 (95-5%). La solución Ringer-Krebs con colagenasa es recirculada hasta que la consistencia de el 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 obtenidas se centrifuga a 2000rpm durante un minuto, el

sobrenadante se descarta y las células se resuspenden en la solución de Ringer-Krebs suplementado con albumina bovina al 1%. Se realiza la misma operación por tres veces, obteniendo así las células libres de partículas y colagenasa.

El aparato utilizado para la perfusión y aislamiento de células se muestra en la Fig.7.

Se resuspendieron los hepatocitos en Ringer-Krebs con albumina y se agregaron alícuotas de la suspensión de hepatocitos a tubos de plástico en los cuales se encontraba el Ringer-Krebs suplementado con albúmina al 1%, y con glutamina o carbonato de amonio 10 mM, ornitina 3 mM, glucosa 10 mM. Además se agregaron los agentes cuyos efectos fueron estudiados. Los tubos fueron tapados e incubados en un baño en agitación a 37 °C, durante 60 minutos.

La viabilidad de los hepatocitos fue cuantificada por la técnica de exclusión de azul de tripan. El ATP se cuantificó por el método de Lamprecht Trautschold, 1974 (22).

DETERMINACION DE UREA

Al final de la incubación la urea fue cuantificada mediante la técnica descrita por Gutman y Bergmeyer (21). Se incuban alícuotas del sobrenadante de células en presencia de ureasa, con lo cual se obtiene la hidrólisis de urea presente, dando una cantidad equimolar de amonio. El amonio es cuantificado mediante la técnica colorimétrica basada en la reacción de Berthelot, en la cual se forma azul de indofenol (12).

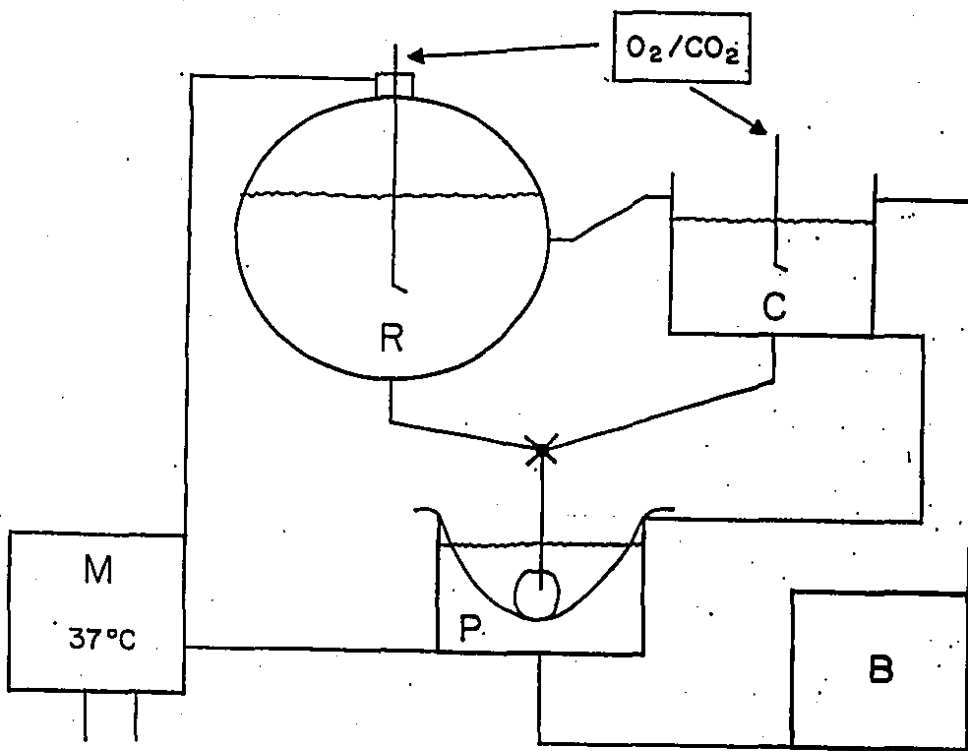


FIG.7 APARATO DE PERFUSION EMPLEADO PARA EL AISLAMIENTO DE HEPATOCITOS.

Fig.7.: Aparato de perfusión empleado para el aislamiento de hepatocitos. El recipiente R, de doble pared contiene Ringer-Krebs, con el cual el hígado aislado, perfundido y desangrado se coloca en el recipiente P. El medio es desechado después del paso por el hígado. Después se recircula con Ringer-Krebs con calcio y colagenasa contenido en el recipiente C. Esto se recircula mediante una bomba peristáltica B. La temperatura es mantenida mediante la recirculación de agua a 37°C por la doble pared de los recipientes M. Los medios se mantienen saturados de O₂/CO₂ mediante burbujeo O.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos muestran que la adenosina y la inosina producen una estimulación de la ureogénesis hepática, se realizó una curva dosis respuesta a la adenosina y a la inosina y se obtuvieron valores de K_a de 0.08 μ M y 5 μ M respectivamente (ver artículo *Effect of adenosine and inosine on ureogenesis in hepatocytes*). No mostraron ningún efecto ureogénico los siguientes derivados metabólicos de la adenosina: hipoxantina, xantina y ácido urico (Tabla 2 del artículo *Effect of adenosine and inosine on ureogenesis in hepatocytes*). En la mezcla de incubación de estos compuestos desaminados se añadió NH_4Cl a la concentración de 10 mM, con el objeto de simular la concentración de amonio obtenido por desaminación exhaustiva de la adenosina en su carbono número 2; sin embargo, se obtuvieron resultados idénticos al añadir o no el NH_4Cl .

La estimulación de la ureogénesis obtenida con adenosina documentada en la Fig.1 y la Tabla 2 del artículo, contrasta con la inhibición de la propia ureogénesis, reportada por Lund y colaboradores en 1975. En los experimentos de Lund y colaboradores (1975) se incubaron 40 mg de peso húmedo de células, provenientes de ratas ayunadas por 48 hrs. por 60 min. a 37 °C en presencia de 10 mM lactato, 1 mM oleato, 10 mM cloruro de amonio y 3 mM de ornitina. En estas condiciones experimentales se observa una inhibición del 23-65% en la síntesis de urea, cuando la adenosina se adicionó a concentraciones de 0.5 a 4 mM. Los experimentos de la tabla 3 incluyen una comparación de algunas condiciones experimentales usadas por Lund y colaboradores (1975) y por nosotros, con la intención de encontrar una explicación a las diferencias entre los resultados obtenidos por ellos y por nosotros. Así, las células se incubaron con lactato y oleato en lugar de glucosa y con cloruro de amonio en lugar de glutamina. Sin embargo la concentración de adenosina, fue mantenida en 10 μ M y no se empleó a las altas

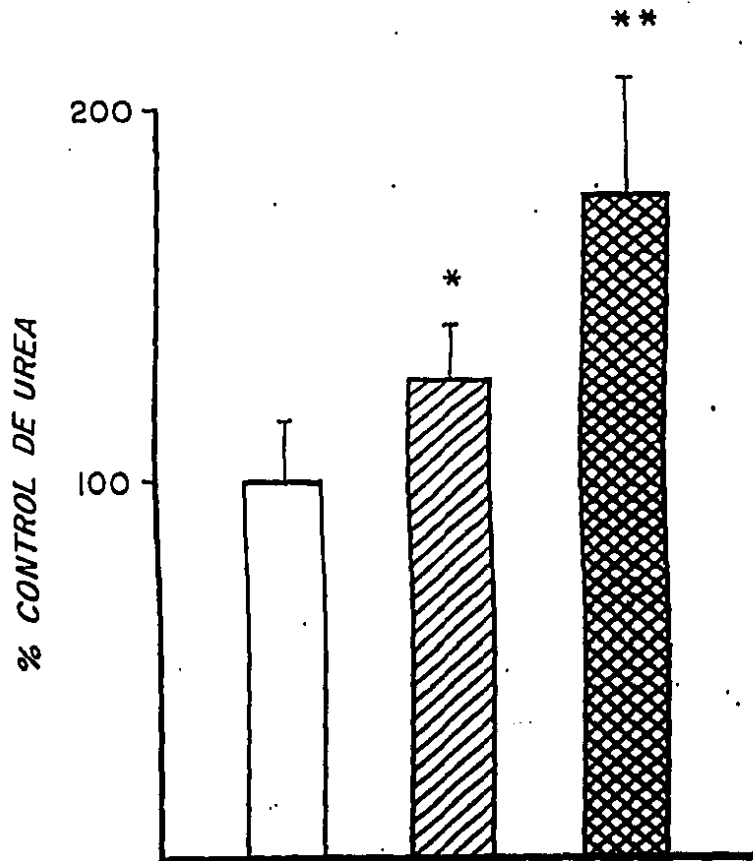


Fig. 8.

Los hepatocitos fueron incubados por 60 min en Ringer-Krebs bicarbonato, suplementado con 10 mM de glucosa, 3mM de ornitina, 10 mM de glutamina. Control; // 0.1 mM de adenosina con 1.2 mM de calcio; // 0.1 mM de adenosina sin calcio. Los resultados son expresados como porcentaje del control, el valor fue de 14.4 ± 3.4 nmoles de urea formada /60 min /mg de peso húmedo de células ($n=6$). ** $p < 0.01$.

concentraciones usadas por Lund y colaboradores (1975).

Se obtuvo la misma respuesta ureogénica a bajas concentraciones de adenosina al emplear glutamina, carbonato de amonio (tabla 3) e incluso cloruro de amonio tal como se observa en la tabla 3a.

La sustitución de la glucosa por el lactato mas oleato anula el efecto ureogénico de la adenosina, independientemente de cual sea la fuente de amonio: glutamina, carbonato de amonio (tabla 3) o cloruro de amonio (tabla 3b); además se registraron resultados similares con inosina en lugar de adenosina (tabla 3c).

Hay un aspecto que requiere información adicional. La cantidad de urea sintetizada por miligramo de peso húmedo de células, durante 60 min. y expresada en moles es de; 14.48, en la Fig.1 y en la tabla 2, 7.60 en la tabla 3 y 29.8 (n=8) en ratas alimentadas con la tercer dieta (tabla 1). Este último valor es parecido al encontrado por Lund y colaboradores (1975). En este último grupo de ratas, la adenosina produjo una estimulación en la que varió del 14 al 25%, cuando la concentración de adenosina aumentó de 0.1 μ M a 10 μ M; en tales condiciones no se modificó la poza celular de ATP. Por lo tanto, la adenosina es capaz de estimular la ureogénesis con las tres dietas comerciales usadas en este trabajo.

Como la intención de conocer el mecanismo por el cual la adenosina y la inosina estimulan la ureogénesis se estudio la capacidad de estimular la síntesis de urea por ambos nucleósidos, en presencia de glucagon o epinefrina, hormonas que para las cuales se ha descrito un efecto ureogénico.

Al mezclar la adenosina o la inosina con el glucagon se antagonizan mutuamente, respecto a la acción ureogénica que cada uno manifiesta por separado; sin embargo no se modifica la respuesta ureogénica de la

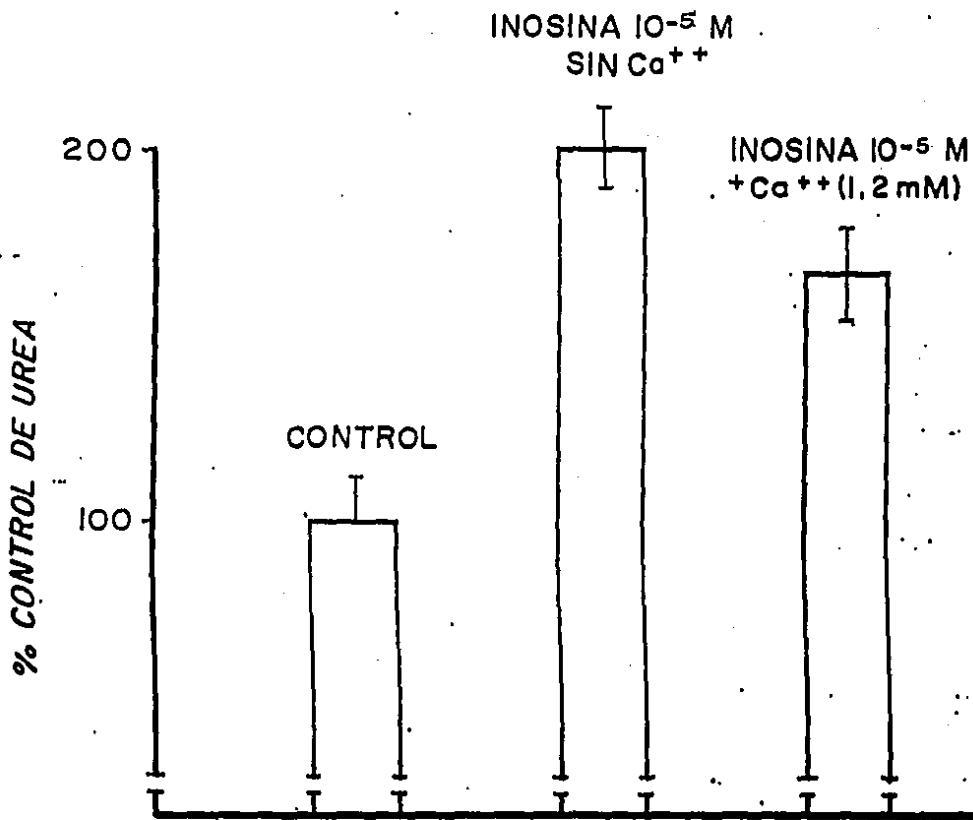


Fig. 9.

Los hepatocitos fueron incubados por 60 min en Ringer-Krebs bicarbonato, suplementada con 10 mM de glucosa, 3 mM de ornitina, 10 mM de glutamina. Los resultados son expresados como porcentaje del control, el valor fue de 14.4 ± 3.1 nmoles de ura formada /60 min /mg de peso húmedo de células (n=6).

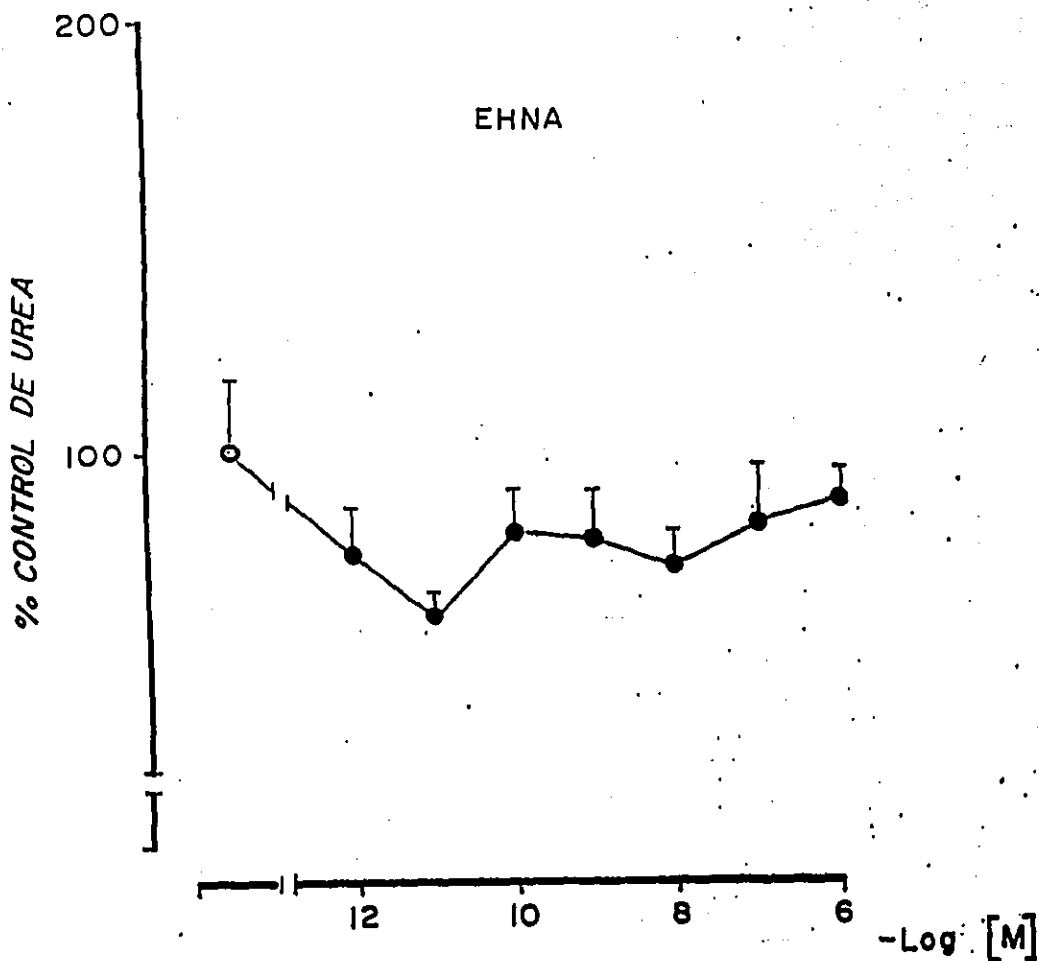


Fig. 10.

Los hepatocitos fueron incubados por 60 min en Ringer-Krebs bicarbonato, a pH 7.4 suplementado con 10 mM de glucosa, 10 mM de glutamina, 3 mM de ornitina. control; o diferentes concentraciones de EHNA. Los resultados son expresados como porcentaje del control, el valor fue de 14.4 ± 3.1 nmoles de urea liberada /60 min /mg de peso húmedo de células (n=4).

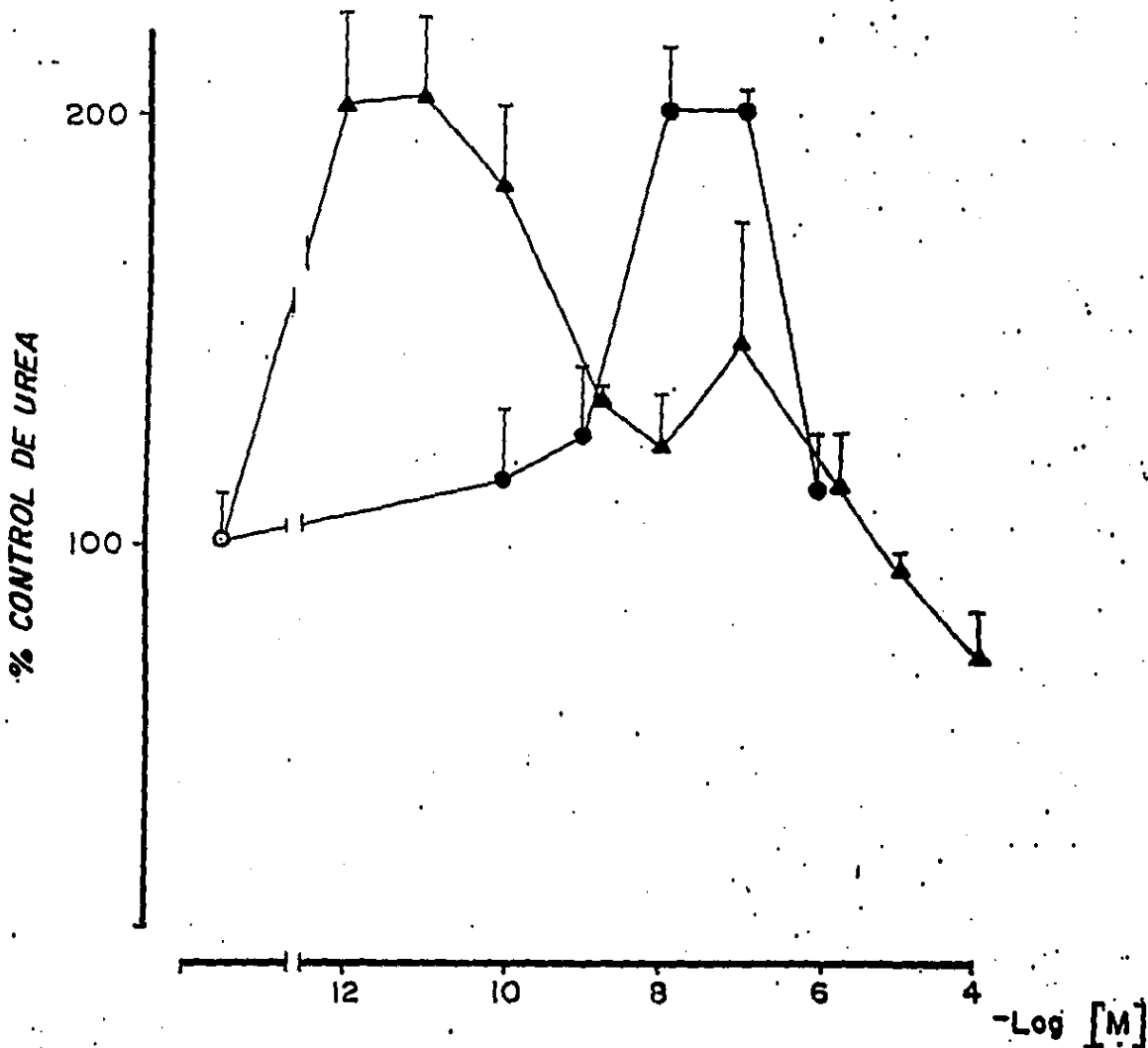


Fig. 11.

Los hepatocitos fueron incubados por 60 min en Ringer-Krebs bicarbonato, a pH 7.4 suplementado con 10 mM de glucosa, 3 mM de ornitina, 10 mM de glutamina. ○ Control; ● 1 mM de EHNA mas diferentes concentraciones de adenosina; ▲ 1 mM de EHNA mas diferentes concentraciones de inosina. Los resultados son expresados en porcentaje de control, el valor fue de 14.4 ± 3.1 nmoles de urea formada / 60 min / mg de peso húmedo de células (n=6). $p < 0.001$ $p < 0.05$

epinefrina (tabla 4). Es de interés mencionar que la estimulación de la síntesis de urea por ambos nucleósidos, al ser empleados a concentraciones de 10 a 0.1 μ M, no se observa cuando a las células se les elimina el calcio endógeno por pretatamiento con EGTA y además dichas células se incuban en Ringer-Krebs que no contiene calcio Fig. 8 y 9.

Existen evidencias experimentales en las que, en las células hepáticas hay una gran actividad de la enzima adenosin deaminasa (ADA), la cual libera el grupo amonio de la adenosina convirtiéndola en inosina. Uno de los inhibidores de esta enzima es el eritro-hidroxi-nonil-adenina (EHNA). El EHNA es un inhibidor alostérico de la enzima adenosin deaminasa, por lo tanto impide la desaminación de la adenosina y en teoría incrementará los niveles de adenosina dentro del hepatocito por lo cual se verá facilitada la acción del nucleósido lo que podrá ser medido por medio de la síntesis de urea. Al realizar una curva dosis respuesta con EHNA se puede observar que no tiene efecto alguno sobre la síntesis de urea Fig. 10. Sin embargo al emplear el EHNA a una concentración fija de 1 nanomolar, en presencia de diferentes concentraciones de adenosina e inosina, se observa una respuesta bifásica en la síntesis de urea con ambos nucleósidos (Fig. 11).

Otro de los inhibidores del metabolismo de la adenosina es el dipiridamol, conocido como fármaco inhibidor del transporte de adenosina con lo que impide su desaminación. Al impedir el transporte de la adenosina, se podría esperar que el dipiridamol potencia la acción ureogénica del nucleósido al mantenerlo confinado en el exterior del hepatocito y con mayor posibilidad de actuar sobre los receptores membranales.

Se realizó una curva dosis respuesta con el dipiridamol sobre la síntesis de urea (Fig. 12). Se adicionó glucagon cuyo efecto es el de estimular la biosíntesis de urea. En presencia de glutamina como sustrato

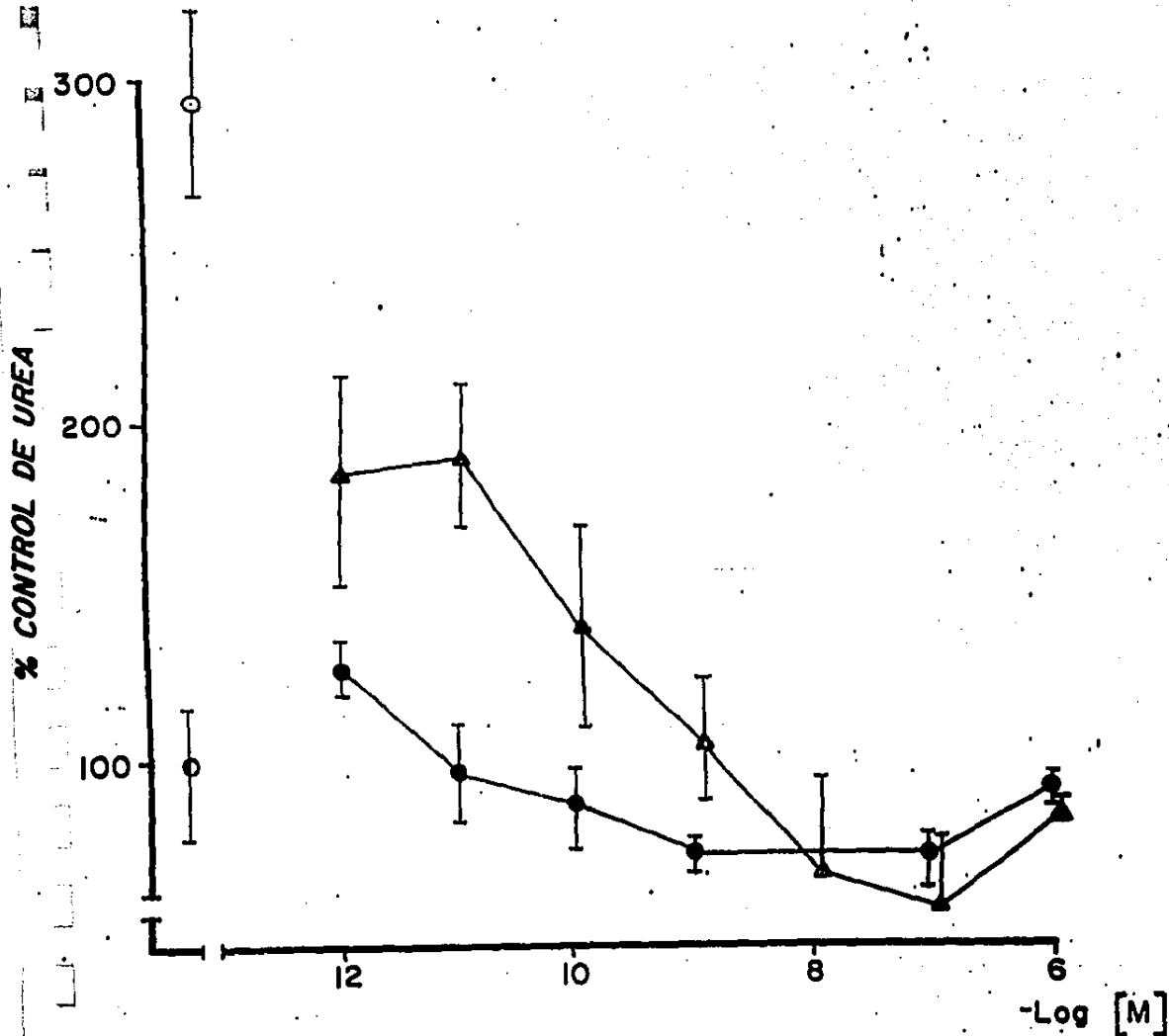


Fig. 12.

Los hepatocitos fueron incubados por 60 min en Ringer-Krebs bicarbonato, suplementado con 10 mM de glucosa, 3 mM de ornitina, 10 mM de glutamina. Control; ● 1 nM de glucagon; ○ diferentes concentraciones de dipiridamol; ▲ 1 nM de glucagon mas diferentes concentraciones de dipiridamol. Los resultados son expresados en porcentaje del control, el valor fue de 14.4 ± 3.1 nmoles de urea formada / 60 min / mg peso húmedo de células ($n=6$). $p < 0.001$ vs 0.9

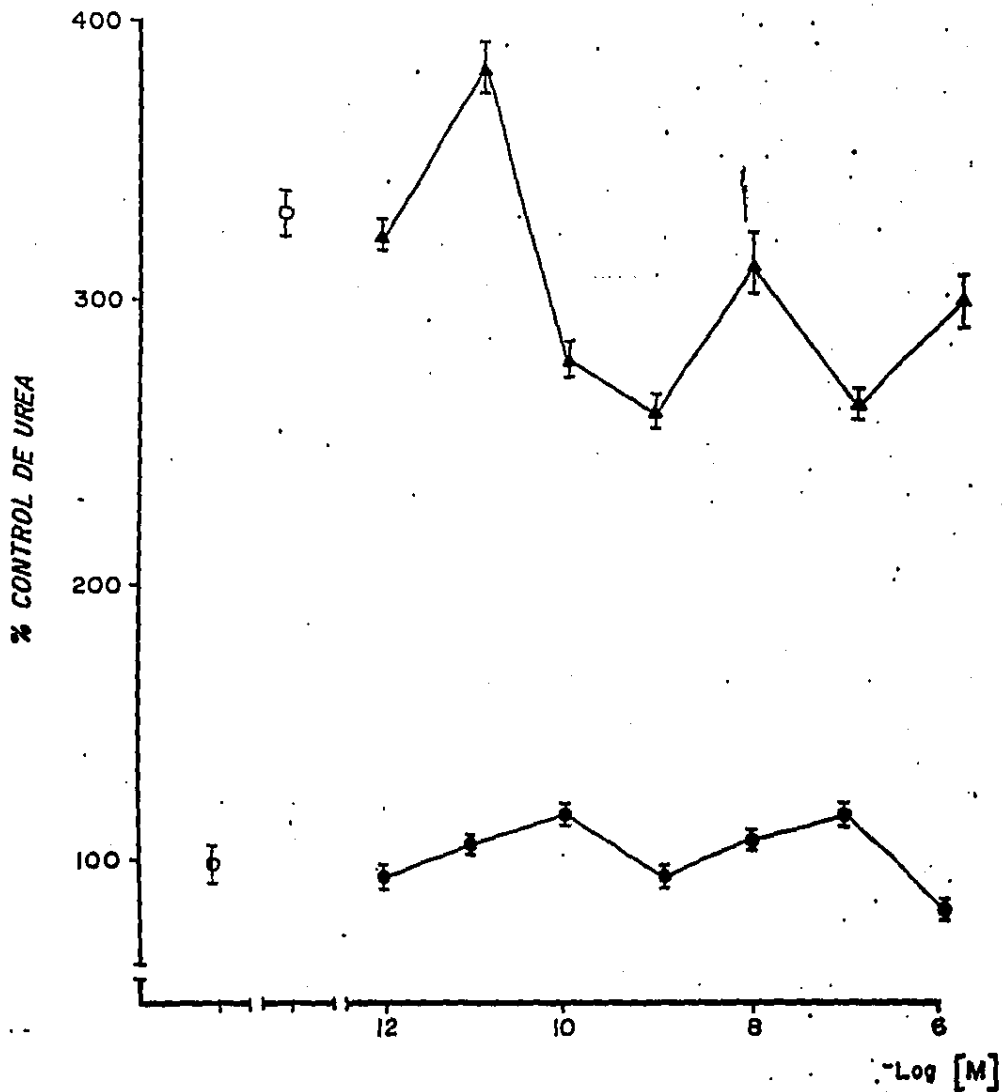


Fig. 13.

Los hepatocitos fueron incubados por 60 min en Ringer-Krebs bicarbonato, suplementado con 10 mM de glucosa, 3 mM de ornitina, 3 mM de carbonato de amonio. ● Control; ○ 1 nM de glucagon; ○ diferentes concentraciones de dipiridamol; ● 1 nM de glucagon mas diferentes concentraciones de dipiridamol. Los resultados son expresados como porcentaje del control, el valor fue de 15.2 ± 3.2 nmoles de urea formada /60 min /mg de peso húmedo de células (n=4) p < 0.001

ureogénico el efecto estimulador del glucagon sobre la urogenesis se vio bloqueado por el dipiridamol . Sin embargo en presencia de carbonato de amonio como sustrato ureogénico del glucagon en presencia del dipiridamol, no se bloqueó dicho efecto Fig. 13.

Los datos anteriores indican que el dipiridamol impide la acción ureogénica de la adenosina y el glucagon, únicamente cuando la fuente de amonio proviene de la glutamina. Por lo tanto se investigó el papel del dipiridamol en el metabolismo de la glutamina. Dichos resultados nos indican que el dipiridamol no interfiere en la actividad de la glutaminasa.

CONCLUSION

La adenosina y la inosina producen una activación de la ureogénesis que depende de la dosis, y esta capacidad no la poseen otros productos catabólicos de dichos nucleósidos. Se descartó la posibilidad de que la adenosina o la inosina actuaran como sustratos ureogénicos produciendo por ello un efecto estimulador; en base a lo siguiente:

1) Los metabolitos catabólicos de la inosina, en presencia de cloruro de amonio, no estimularon la síntesis de urea, 2) Al suprimir en un 100% la desaminación de la adenosina a una concentración de 10 micromolar la contribución del amonio formado sería despreciable comparada con la poza de amonio (10 mM), en el sustrato añadido para la síntesis de urea.

El hecho de que el efecto estimulador de la adenosina y la inosina se observara con glutamina y con carbonato de amonio, descarta la participación de la glutaminasa en el mecanismo responsable de los pasos reguladores de ambos nucleósidos en la síntesis de urea.

La respuesta bifásica presentada por la adenosina en presencia del

inhibidor de la desaminasa, el EHNA, nos guía al pensar sobre la existencia de sitios específicos de regulación del ciclo de la urea, además de los receptores ya mencionados para la adenosina. La estimulación de la ureogénesis por la adenosina y la inosina es dependiente de calcio .

Además el antagonismo mutuo entre la adenosina o la inosina y el glucagon, pero no con la epinefrina, abre más posibilidades para estudiar el mecanismo (s) involucrado en la señal de transducción para hormonas particularmente en la regulación de la ureogénesis, una ruta metabólica en la cual faltan eslabones en la respuesta metabólica final.

Por otro lado, la concentración de adenosina en células de hígado de rata es del orden de 10 micromolar (46) y se calcula que el 75% de la adenosina del tejido total está unida a proteínas intracelulares (46). Por último, los resultados reportados en el presente trabajo están en el rango de concentraciones fisiológicas de cuando menos uno de los nucleósidos usados por nosotros. Y se sugiere que la acción aquí descrita para la adenosina y la inosina, en regulación de la biosíntesis de urea, tiene relevancia fisiológica.

B I B L I O G R A F I A

1. 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 pág. 104-149.
2. Fain, J.N. y García Sáinz, J.A. (1980). "Role of phosphatidyl inositol turnover in alpha and of adenylate cyclase inhibition in alpha; effects of catecholamines" *Life Science* 26, 1183 - 1194.
3. Hruby, V.J., Agarwal, N.S., Griffem, A., Bregman, M.D., Nugent, C.A. y Brendel, K., (1981) "Glucagon structure-function relationships using isolated rat hepatocytes" *Biochem. Biophys* 674; 383-390.
4. Lehninger, A. (1975) "Metabolic and Energy Transfer Pathways: a survey of intermediate metabolism" en "Biochemistry" Worth publishers Inc. N.Y. Pág. 363-384.
5. Pohol, S.L., Birhvaumer, L., y Rodbell, M. (1970). "The glucagon-sensitive Adenyl Cyclase Systems in plasm. Membranes of Rat Liver". *J. Biol. Chem.* 246: 1849-1856.
6. Pilkis, S.J., El Maghrabi, M.R., Mc Grane M., Pilkis J. y Claus, T.H. (1982). "Regulation by glucagon of hepatic piruvate kinase, 6 phospho fructo kinase, and fructose 1,6-biphosphatasa. *Fed. Proc.* 41: 2623-2638.
7. Kagimoto, T. y Uyeda, K. (1978): Hormone stimulated phosphorylation of liver phosphofructo kinase in vivo. *J. Biol. Chem.* 254: 5584-5587.
8. Beg, Z.H. and Brewer Jr., H.B. (1981): Regulation of liver 3-hydroxy 3-methyl glutaryl coenzyme A reductase. *Curr. Top. Cell. Regul.* 20: 139-184.
9. Corvera, S. and García Sainz, J.A. (1982). "Vasopressin and angiotensin II stimulated ureogenesis through increased mitochondrial citruline production" *Life Sciences*, Vol. 31 pp. 2493-2498.
10. Warner, E.A. (1923), in: "The chemistry of Urea" (R.H.A. Plinnus and F.G. Hopkins eds.), P 1-3 Longmans, Green, New York.
11. Krebs, H.A. y Henseleit, K. (1932). *Hoppe-Sylys, Z. Physiol.*, 210, 33-66.
12. Cohen P.P. (1981): "The ornithine-urea cycle: biosynthesis and Regulation of Carbamyl phosphate synthetase I y ornithine transcarbamylase" *Currents topics in celular regulation 18* (Esterbrook, R.W. Svere, P. ed.) Academic Press, N.Y. Pág. 1-17.

13. Jones, M.E. Spector, E. & Lipman F.J. (1955). "Carbamyl phosphate, the carbamyl donor in enzymatic citrulline synthesis" *Am. Chem. Soc.* 77 pag. 819-827.
14. Kawamoto, S., Ishida, H., Mori, M., & Tatibana M. (1982). "Regulation of acetylglutamate synthetase in mouse liver. Postprandial changes in sensitivity to activation by arginine." *Eur. J. Biochem.*, 123 pag. 637-645.
15. Grisolia, S., Bâguena, R., & Mayor F. (1976) *The urea cycle.* Wiley, Nueva York.
16. Meijer, A.J., Gimpel, J.A., Deleuw, 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.
17. Wanders, R. J. A. Van Woerkam, G.M., Nooteboom, R.F., Mayer, 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.
18. Saheki, T. y Katunuma, N. (1975) "Analysis of Regulatory Factors for Urea Synthesis by isolated perfused rat liver" *J. Biochem.* 77, 659-669.
19. Meijer, A.J. (1979) "Regulation of carbamylphosphate synthase (amonia) in liver in relation to urea cycle activity" *Trends in Biochem. Sci* 4, 83-86.
20. Berry, M.N. y Friend, D.S. (1969). "High yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells" *J. Cell. Biol.* 43 pag. 506-520.
21. Gutman, I y Bergmeyer, H. (1974) in *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer, H.V., ed.) Vol. 4, pag. 1791-1799, Academic Press, New York & London.
22. Lamprecht, W. & Trautschold, I., (1974) in *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer, H.V., ed.) Vol. 4 pag. 2101-2109. Academic Press New York & London.
23. Marshall, M., Metzberg, R.L. y Cohen P.K. (1961). Physical and Kinetic properties of carbamyl phosphate synthetase from Frog liver. *J. Biol Chem* 236: 2229-2237.
24. Schmke, R.T. (1963). Studies on Factors Affecting the levels of urea cycle enzymes in Rat liver *J. Biol. Chem* 238 pag. 1012-1018.
25. Raiha, N.C.R.: Developmental Changes in Urea Cycle. Enzyme in mammalian liver. In "The urea Cycle", Grisolia, S. Bâguena, R., and Mayer, F. (Eds.), Johan Wiley & Sons, N.Y. 1976 pag. 261-272.

26. Hensgens, H.E.S.J., Verhoeven, A. J. and Meijer A.J.: The relationship between intramitochondrial N. acetylglutamate and activity of carbamylphosphate synthetase (amonia). The effect of glucagon. Eur. J. Biochem. 107: 197-205 1980.
27. Gebhardt, R., and Meeke, D; Permissiva effect of deamethasone on glucagon. Induction of urea-cycle enzymes en perfused primary monolayer cultures of rat hepatocytes. Eur. S. Biochem. 97: 29-35, 1979.
28. Cohen, P. P., Brucker, R.F., and Morris, S.M. Cellular and molecular aspects of thyroid hormone action during amphibian metamorphosis. In "Hormonal protein and peptides", Vol. VI "Thyroid hormones", L.C.H. (Ed.) Academic Press, Inc. New York, 1978, pag. 273-381
29. Halestrop. A.P., Scott, R.D., and Thomas, A.P.: Mitochondrial piruvate transport and its horonal regulation, Int. J. Biochem. 11: 97-108, 1980.
30. Wixom, R.L. Reddy, M.K., and Cohen, P.P.: A concert response of the enzymes of urea biosynthesis during tiroxine induced metamorphosis of Rama catesbeiana . J. Biol. Chem. 247: 2684-3692, 1972.
31. Nancy M. Kneer, Marian J. Wagner and Henry A. Lardy. Regulation by calcium of hormonal effects on gluconeogenesis J. Biol. Chem. 254: 12160-12168, 1979.
32. Titheradge, M.A., y Haynes, R.C. "The hormonal stimulations of ureo genesis in isolated hepatocytes through increases in mitochondrial ATP productions". Arch. Biochem. Biophys. 201, 44-50, 1980.
33. Corvera, S. and J. A. García Sáinz, 1981, α , Adrenoceptor activation stimulates ureogenesis in rat hepatocytes Eur. J. Pharma. 72.: 387-390, 1981.
34. Corvera, S., Huerta Bahena J. and J. A. García-Sáinz Stimulation of ureogenesis through α_1 and B adrenoreceptors in juvenile rat hepatocytes. Eur. J. Pharmacol 82: 89-91, 1982.
35. Corvera, S. and J. A. García Sáinz Vasopresin and angiotensin II stimulate-Through increased mitochondrial citrulline production. Life Sciences. 31; 2493-2498, 1982.
36. Martínez-Valdez, H; Madrid Marina, V., y Piña E. In vivo effect of adenosine on adenine nucleotides and inorganic phosphate in rat blood. Life Sci 30, 191-197, 1982.
37. Chagoya de Sánchez, V., y Piña E. The redox state of $NAD^+/NADH$ Systems in rat liver during in vivo inhibition of fatty acids oxidation by adenosine FEBS Lett., 83, 321-324, 1972.

38. Fain, J.N., y Malbon, C.C. Regulation of adenylate cyclase by adenosine. *Mol Cell. Biochem.*, 23, 1-27, 1979.
39. Chagoya de Sánchez V., y Piña E. Adenosine, a glucogenic and lipogenic compound. *FEBS lett.* 19, 331-334, 1972.
40. Schwabe, V. Schonhofer, P.S., y Ebert, R. Facilitation by adenosine of the action of insulin on the accumulation of adenosine 3'5'-monophosphate, lipolysis, and glucose oxidation in isolated fat cells *Eur. J. Biochem.*, 46, 537-545, 1974.
41. Burnstock, G. *J. Physiol.* (London) 313: 1-35, 1981.
42. Haslam, R.J., y Lynham, J.A. Activation of Animal and vertebrate cell growth by naturally occurring purine bases and ribonucleosides. *Pharmacol. Ther.* 8, 539-571, 1980.
43. Mills, D.C.B.; Macfarlane, D.E. Lemmer, B.W.G., y Haslam, R.J. Receptors for nucleosides and nucleotides on blood platelets. En Berne, R.M.; Rall, T.W. y Rubio, R. (dir); *Regulatory function of adenosine*, 277-288. Martinus Nijhoff, 1983.
44. Fain, J.N., y Wieser, P.B. Regulation of adenylate cyclase by adenosine *Mol. Cell. Biochem.* 23, 1-27 1979.
45. Polmar, S.H.; Birch, R.E.; Mondler, R. y Rudolf, S.A. Adenosine and cyclic nucleotides in modulation of the immune responses. En Berne, R.M. Rall, T.W. y Rubio, R. (dir). *Regulatory function of adenosine*, 249-259 Martinus Nijhoff. 1983.
46. Daly W.J. Adenosine Receptors. *Advances in Cyclic Nucleotide and Protein Phosphorylation Research*. Vol. 19 edited by D.M. Cooper and K.B. Seamon Raven Press, New York 1985.
47. Stiles G.L. Adenosine receptors: structure function and regulation *Trends Pharmacol Sci.* 12, 486-490. 1986.
48. Keppens S. and Wulf H. P₂ - purinergic control of liver glycogenolysis 231, 797-799, 1985.

Effect of adenosine and inosine on ureagenesis in hepatocytes

Raquel GUINZBERG P., Irma LAGUNA, Alejandro ZENTELLA,* Ricardo GUZMAN and Enrique PIÑA
 Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, A. Postal 70159, México,
 D.F. 04510, México

Adenosine and inosine produced a dose-dependent stimulation of ureagenesis in isolated rat hepatocytes. Hypoxanthine, xanthine and uric acid were without effect. Half-maximally effective concentrations were 0.08 μM for adenosine and 5 μM for inosine. Activation of ureagenesis by both nucleosides had the following characteristics: (a) it was observed with either glutamine or $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, provided that glucose was present; (b) it was not detected when glucose was replaced by lactate plus oleate; (c) it was mutually antagonized by glucagon, but not by adrenaline; and (d) it was dependent on Ca^{2+} . We suggest that the action of adenosine and inosine on ureagenesis might be of physiological significance.

INTRODUCTION

Our knowledge of the physiological and pathophysiological functions of the nucleoside adenosine has grown considerably. Among the described actions of the nucleoside on hepatic metabolism, it has been reported that adenosine increases ATP concentrations and the energy charge of the liver (Chagoya *et al.*, 1972). This is of interest, owing to the role of these metabolic indicators in the regulation of cell metabolism (Atkinson, 1977). Of even greater interest are the well-documented actions of adenosine as a hormone and as a neuro-modulator (Burnstock, 1981; for a more recent review, see Stefanovich *et al.*, 1985). Considerable effort has been made to characterize adenosine receptors (Burnstock, 1981; Londos *et al.*, 1983), and to design more potent adenosine-receptor antagonists (Bruns *et al.*, 1983). Liver cells are in the growing list of cells containing adenosine receptors; isolated hepatocytes, on stimulation with adenosine, and at least two of its analogues, produce a response in the adenylate cyclase activity (Londos *et al.*, 1980). Furthermore, adenosine and adenine nucleotides cause dose-dependent activation of glycogen phosphorylase in isolated hepatocytes (Keppens & De Wulf, 1985). To increase our knowledge of adenosine actions, its role on urea biosynthesis was explored. Ureagenesis is one of the metabolic routes affected by numerous hormones, either dependent or not on modifications in the activity of adenylate cyclase (Corvera & García-Sáinz, 1982). Thus a response of ureagenesis to adenosine will give a more integrated picture of the actions of the nucleoside on the regulation of liver metabolism. Lund *et al.* (1975) found that adenosine added to isolated hepatocytes inhibits urea biosynthesis; a 0.5 mM dose of the nucleoside was required to produce maximal inhibition, this concentration being several orders of magnitude higher than the concentration of adenosine used as a hormone (Londos *et al.*, 1980). The present paper describes the response in urea biosynthesis by liver cells, incubated with low doses of adenosine or inosine within the range used to exert their role as hormones. Both nucleosides were tested alone or in combination with one of two well-known ureagenic hormones, glucagon and adrenaline (Titheradge & Haynes, 1980; Corvera & García-Sáinz, 1982).

MATERIALS AND METHODS

Male Wistar rats (150-200 g) starved 24 h before the beginning of the experiment were used, unless stated otherwise. Three different commercial diets were used (Table 1): initially, Purina rat chow imported from the United States (experiments reported in Fig. 1, Tables 2 and 4, and the ATP-pool assays); when the Mexican government forbade the importation of rat chow, the experiment was continued by feeding the rats with 'Nutricubos', made in Mexico (experiments reported in Table 3, and those with hepatocytes depleted of Ca^{2+}). Since the rate of urea biosynthesis was low with this diet, some control experiments were performed with a third diet, combining equal parts of 'Nutricubos' with 'Ladrina'; this combination produced (a) a better growth rate than with 'Nutricubos' alone, and (b) a growth rate identical with the optimal one reported by Lane (1971).

Hepatocytes were isolated by the method of Berry & Friend (1969), but the recommended Ca^{2+} -free Hanks

Table 1. Composition of commercial diets used

Values (%) are from the manufacturers' labels.

	Purina chow* 5001	Nutricubos Rodent Laboratory Chow diet†	Ladrina‡
Crude protein not less than	23.0	23.0	27.0
Crude fat not less than	4.5	2.5	9.0
Crude fibre not more than	6.0	6.0	4.5
Ash not more than	8.0	8.0	10.0
Added minerals not more than	2.5	1.6	-
Nitrogen-free extract	-	48.5	39.5

* Ralston Purina Co., St. Louis, MO, U.S.A.

† Purina, S.A. de C.V. Km. 4.5 Carr. Constitución Querétaro, Qro. C.P. 76180 México.

* Present address: The Rockefeller University, 1230 York Avenue, New York, NY 10021-6399, U.S.A.

solution was replaced by Krebs-Ringer bicarbonate [Krebs & Henseleit (1932) prepared without Ca^{2+}] plus 10 mM-glucose (the latter was omitted in some experiments, as indicated below); the liver was perfused with these Ca^{2+} -free solutions; for the subsequent collagenase-digestion step, 1.2 mM- Ca^{2+} was added to the solution. In the first nine experiments, cell viability was measured by ATP contents and Trypan Blue exclusion. A value of $2.29 \pm 0.32 \mu\text{mol}$ of ATP/g (mean \pm S.E.M. for nine separate batches of cells) was obtained, which is comparable with the values found in the literature (e.g. Lund *et al.*, 1975); at least 90% of these cells excluded 0.2% Trypan Blue. Later, Trypan Blue exclusion was routinely assayed in all the experiments, and hepatocytes were used when their viability was above 85%.

The isolated cells were incubated under continuous shaking in Krebs-Ringer bicarbonate buffer in an atmosphere of O_2/CO_2 (19:1) for 60 min at 37 °C. The Krebs-Ringer buffer with 1.2 mM- Ca^{2+} was supplemented with 10 mM-glucose, 10 mM-L-glutamine, 3 mM-L-ornithine and 1% bovine serum albumin; the pH was adjusted to 7.4. In some experiments, as detailed in the Results section, 10 mM-glutamine was replaced with 10 mM- $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, and glucose by 10 mM-lactate plus 1 mM-oleate in the incubation medium. Furthermore, when cells were incubated with lactate+oleate, glucose was absent from the initial perfusion medium and the collagenase-digestion medium.

In a series of experiments, hepatocytes were dissociated in a Ca^{2+} -free medium supplemented with 1 mM-EGTA. These cells were incubated in Krebs-Ringer bicarbonate, free of Ca^{2+} , but supplemented with 10 mM-glucose, 10 mM- $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, 3 mM-L-ornithine and 1% bovine serum albumin.

Each assay was routinely performed in duplicate. Each tube contained 25–30 mg wet wt. of liver cells. At the end of the incubation period, the tubes were placed in an ice bath for 5 min, and then centrifuged at 50 g for 10 min. The supernatant was kept for urea quantification (Gutman & Bergmeyer, 1974). The numbers of observations given in Fig. 1 and the Tables, for any given experimental condition, refer to separate batches of cells.

ATP was quantified by the method of Lamprecht & Trautshold (1974). Adenosine, inosine, hypoxanthine, xanthine, uric acid, glucagon, L-adrenaline, L-glutamine, L-ornithine hydrochloride, urease (type III) and bovine serum albumin (fraction V) were obtained from Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, U.S.A. Collagenase was from Worthington. Other reagents were analytical grade, from Merck, Mexico.

RESULTS

Dose-response curves (Fig. 1) yielded K_d values of 0.08 μM for adenosine and 5 μM for inosine on urea biosynthesis. Other metabolic derivatives of adenosine, i.e. hypoxanthine, xanthine and uric acid, did not show any ureagenic action (Table 2). The incubation mixture of these deaminated compounds was supplemented with 10 μM - NH_4Cl to stimulate the concentration of NH_4^+ , obtained by exhaustive deamination of C-2 of adenosine, but identical results were recorded without this supplementation (not shown). The data obtained with adenosine, shown in Fig. 1 and Table 2, contrast with the inhibition of ureagenesis obtained in hepatocytes incubated with the same nucleoside (Lund *et al.*, 1975).

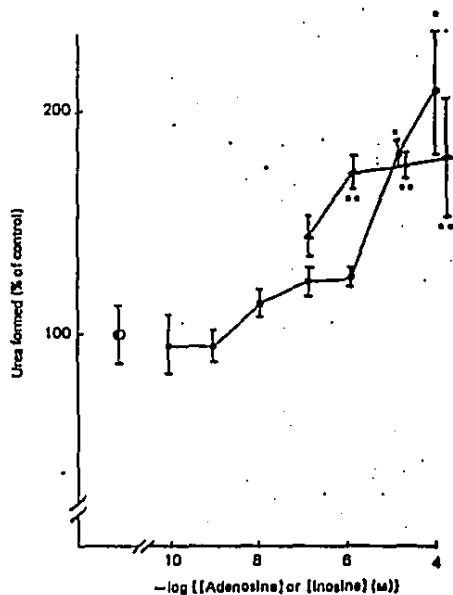


Fig. 1. Stimulation of urea synthesis by adenosine and inosine

Hepatocytes were incubated as described in the Materials and methods section: ○, control; ●, with inosine; ▲, with adenosine. Results are expressed as percentages of the control value, which was $14.48 \pm 3.12 \mu\text{mol}$ of urea formed/60 min per mg wet wt. Values plotted are the means, and vertical lines represent S.E.M., of duplicate incubations from four to six cell preparations, except the control sample, with 19 cell preparations. Statistical significance versus control is indicated: * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$.

In the experiments of Lund *et al.* (1975), 40 mg wet wt. of liver cells from 48 h-starved rats was incubated for 60 min at 37 °C with 10 mM-lactate, 1 mM-oleate, 10 mM- NH_4Cl and 2 mM-ornithine; their data show an inhibition of urea synthesis by adenosine, ranging from 23 to 65%, when the nucleoside was added at concentrations from 0.5 to 4.0 mM. Some experimental conditions used by those authors were assayed in the experiments shown in Table 3. The hepatocytes were incubated with 10 mM-lactate and 1 mM-oleate, instead of glucose, and with 10 mM- NH_4Cl or $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, instead of glutamine; however, adenosine concentration was kept at 10 μM . The same ureagenic response to low concentrations of adenosine was obtained with glutamine, $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ (Table 3) and NH_4Cl (results not shown). Interestingly, replacement of glucose by lactate+oleate abolished the ureagenic effect of adenosine, with either glutamine or $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ (Table 3). Similar results (not shown) were obtained with 10 μM -inosine instead of adenosine.

One point requires additional information. The basal rate of urea synthesized was (in nmol/60 min per mg wet wt. of cells) 14.48 in Fig. 1 and Table 2, 7.60 in Table 3,

Table 2. Effect of adenosine catabolites on urea biosynthesis

Isolated hepatocytes were incubated as described in the Materials and methods section and supplemented with the concentrations of compounds indicated. Results are expressed as the means of (nmol of urea formed/60 min per mg wet wt. of cells) \pm S.E.M. of duplicate samples from the numbers of preparations in parentheses. Statistical significance versus control is indicated.

No purine derivative No NH_4Cl	With 10 μM - adenosine No NH_4Cl	With 10 μM - inosine and 10 μM - NH_4Cl	With 10 μM - hypoxanthine and 10 μM - NH_4Cl	With 10 μM - xanthine and 10 μM - NH_4Cl	With 10 μM - uric acid and 10 μM - NH_4Cl
14.48 \pm 3.12 (19)	25.16 \pm 3.76 (3) <i>P</i> < 0.001	24.16 \pm 2.76 (3) <i>P</i> < 0.05	15.00 \pm 1.72 (3) <i>P</i> < 0.9	16.16 \pm 2.74 (3) <i>P</i> < 0.9	16.04 \pm 0.38 (3) <i>P</i> < 0.9

Table 3. Comparison of the uregenic action of adenosine in cells incubated with different sources of oxidizable substrate and with different sources of ammonia

Hepatocytes were incubated in Krebs-Ringer bicarbonate, pH 7.4, supplemented with 3 mM-ornithine, 10 mM-glucose, or 10 mM-lactate plus 1 mM-oleate, 10 mM-glutamine, or 10 mM $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$. Other conditions were as in Table 2.

Source of oxidizable substrate	Source of ammonia	Urea formed (nmol/60 min per mg wet wt. of cells)	
		No adenosine	+ 10 μM -adenosine
Glucose	Glutamine	7.60 \pm 0.50 (5)	19.36 \pm 2.64 (3) <i>P</i> < 0.01
Glucose	$(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$	7.42 \pm 0.90 (15)	21.36 \pm 0.20 (6) <i>P</i> < 0.001
Lactate + oleate	Glutamine	7.74 \pm 1.00 (4)	6.50 \pm 0.74 (4) <i>P</i> < 0.05
Lactate + oleate	$(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$	7.64 \pm 1.46 (4)	6.28 \pm 2.2 (3) <i>P</i> < 0.9

Table 4. Effects of adenosine or inosine on urea biosynthesis stimulated by glucagon and adrenaline

Isolated hepatocytes were incubated as described in the Materials and methods section with the indicated additions. Other conditions were as in Table 2.

Additions	Urea formed (nmol/60 min per mg wet wt. of cells)		
	No nucleoside	+ 100 μM -Adenosine	+ 10 μM -Inosine
No hormone	14.48 \pm 3.12 (19)	25.38 \pm 2.4 (10) <i>P</i> < 0.001*	24.16 \pm 2.76 (3) <i>P</i> < 0.05*
Glucagon (1 μM)	43.46 \pm 4.00 (7) <i>P</i> < 0.001*	7.74 \pm 1.42 (4) <i>P</i> < 0.001* <i>P</i> < 0.001†	12.18 \pm 1.40 (3) <i>P</i> < 0.001* <i>P</i> < 0.05†
Adrenaline (0.1 μM)	32.04 \pm 2.20 (7) <i>P</i> < 0.001†	37.72 \pm 2.00 (6) <i>P</i> < 0.01* <i>P</i> < 0.1†	24.12 \pm 3.48 (3) <i>P</i> < 0.9* <i>P</i> < 0.1†

* Statistical significance versus control with nucleoside, but without hormone.

† Statistical significance versus control with hormone, but without nucleoside.

and 29.8 \pm 1.0 (*n* = 8) in rats fed with the third diet (Table 1), a value similar to that found by Lund *et al.* (1975). In the last group of rats, adenosine produced a statistically significant dose-related stimulation, ranging from 14% at 0.1 μM to 25% at 10 μM , at which concentrations no increase in the ATP pool of isolated hepatocytes is observed. Thus the ability of adenosine to stimulate ureagenesis was observed with three different commercial diets.

To gain information on the mechanism involved in the ability of adenosine and inosine to stimulate ureagenesis, their responses were compared with those of glucagon and adrenaline; the possibility of additive effects was also explored (Table 4). A mixture of high doses of adenosine or inosine with glucagon mutually antagonized the effect of the nucleosides and that of the peptide hormone; however, the ureagenesis response to adrenaline was not modified by either adenosine nor inosine (Table 4).