



11261  
3  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

EFFECTOS METABOLICOS DE LA ADENOSINA EN  
HEPATOCITOS AISLADOS DE RATA

T E S I S

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

PRESENTA EL  
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

ANTONIO DIAZ CRUZ

México, D. F.

1995

FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO  
FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

EFFECTOS METABOLICOS DE LA ADENOSINA EN HEPATOCITOS AISLADOS  
DE RATA

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

QUE PRESENTA EL  
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

ANTONIO DIAZ CRUZ

MEXICO, D.F.

1995

## INDICE

RESUMEN

INTRODUCCION

1

DISCUSION DE ARTICULOS

9

DISCUSION GENERAL

13

PERSPECTIVAS

13

BIBLIOGRAFIA

15

ARTICULOS

## RESUMEN

**Díaz Cruz Antonio:** Efectos metabólicos de la adenosina en hepatocitos aislados de rata. Bajo la dirección de: *Dr. Enrique Piña Garza y M. en C. Raquel Guinzberg Perrusquía*. Trabajo de tesis para la obtención de grado de Maestro en Ciencias, área : Bioquímica, realizado en el Depto. de Bioquímica, Lab. 5 , Fac. Medicina, UNAM.

Uno de los productos del catabolismo del ATP es el nucleósido de adenina ( adenosina ), molécula que se caracteriza por actuar como regulador fisiológico en una gran variedad de procesos enzimáticos en diferentes órganos, tejidos y sistemas. En este trabajo se revisó la participación de la adenosina en la regulación del metabolismo hepático, a través del sistema de células aisladas, las cuales fueron incubadas en presencia de epinefrina, glucagon y adenosina, a una concentración de  $10^{-6}$  M cada una, los indicadores metabólicos cuantificables fueron: capacidad gluconeogénica de la adenosina y efecto de la adenosina sobre el movimiento de calcio celular. Los resultados obtenidos son: 1.- La adenosina y la inosina estimulan la síntesis de glucosa a partir de lactato., 2.- El efecto gluconeogénico de la epinefrina y del glucagon se inhibe en presencia de adenosina., 3.- La adenosina no modifica los niveles basales de AMPc , 4.- La síntesis de AMPc estimulada por glucagon se inhibe en presencia de adenosina., 5.- El efecto ureogénico de la adenosina, se inhibe en ausencia de calcio en el medio de incubación., 6.- La adenosina incrementa los niveles de calcio citosólico a expensas del calcio extracelular., 7.- Cuando los hepatocitos son incubados en ausencia de calcio en el medio de incubación, la adenosina promueve un pequeño y transitorio aumento de calcio citosólico. De estas observaciones se propone al calcio como el mensajero intracelular para los efectos metabólicos de la adenosina en los hepatocitos de rata

## EFFECTOS METABÓLICOS DE LA ADENOSINA EN HEPATOCITOS AISLADOS DE RATA

### INTRODUCCIÓN

En 1929 los investigadores Drury y Szent Gyorgyi (12) dieron a conocer el nombre de una molécula obtenida de extractos de músculo cardíaco, cerebro, riñón y bazo, la cual ejercía efectos pronunciados sobre la función cardiovascular, dicha molécula fue la **adenosina**. A partir de estas observaciones, diferentes grupos de investigadores se dedicaron al estudio de las acciones fisiológicas de la adenosina (11,15,29,46). Estos trabajos permitieron asegurar que la adenosina no solo participa en la regulación metabólica del flujo coronario ( 5 ) sino que también interviene en la regulación de la función fisiológica de otros órganos, incluyendo el cerebro (6,37), el músculo esquelético ( 10 ) y el riñón ( 31 ). Se sabe que la adenosina es un nucleósido formado por adenina y ribosa, unidas por un enlace  $\beta$  - N glucosídico ( fig. 1 ) y cuyo mecanismo de síntesis y degradación es complejo. Seis enzimas son las que están involucradas en el metabolismo intracelular de la adenosina: 1.- nucleotidasa 5' citósólica, 2.- 5' ectonucleotidasa, 3.- fosfatasa no específicas y 4.- S - adenosilhomocistein hidrolasa, las cuales intervienen en el proceso de síntesis de adenosina. Participan en la fase catabólica de la adenosina las enzimas: 5.- adenosin quinasa y 6.- adenosin deaminasa ( 34,39,40 ). De las reacciones catalizadas por estas enzimas, dos son las que se relacionan principalmente con la formación de adenosina; la desfosforilación del AMP por acción de la 5' nucleotidasa y la fosfatasa alcalina, así como la hidrólisis de la S-adenosil-L-homocisteina ( SAH ) por la SHA-hidrolasa, para la producción de adenosina y L-homocisteina, (fig. 2 ). En la mayoría de las especies y órganos estudiados, la 5-nucleotidasa es predominantemente una ectoenzima responsable de la degradación del ATP liberado al espacio extracelular, para producción de adenosina ( 33 ), cierta fracción de esta enzima se encuentra también

el citosol y los lisosomas ( 8,26 ). La enzima SAH-hidrolasa es una enzima exclusivamente citosólica y amplia distribución ( 44 ), cuyos productos de su actividad son la adenosina y la L-homocisteína, los que son transformados por la adenosin quinasa o adenosin deaminasa y la metionín quinasa a cistationín-B-sintetasa. Son de interés los estudios sobre el recambio de la adenosina en el plasma humano, donde la vida media del nucleósido, a concentraciones fisiológicas de 80 nanomolar a 1 micromolar, es de 6 0. a 1.5 segundos; se menciona, sin embargo, que existen diferencias considerables entre las especies ( 30 ).

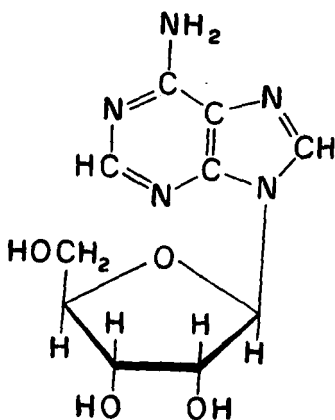


Fig. 1 Estructura de la adenosina.

El estudio sobre el mecanismo de formación de adenosina en diferentes tejidos es de gran importancia, ya que de él, depende el entendimiento de las varias funciones adscritas a este nucleósido.

El patrón de desfosforilación extracelular a partir de ATP → ADP → adenosina ha sido observado en células de músculo liso y endotelio ( 17,32 ), así como en linfocitos B ( 2 ) y plasma humano ( 42 ).

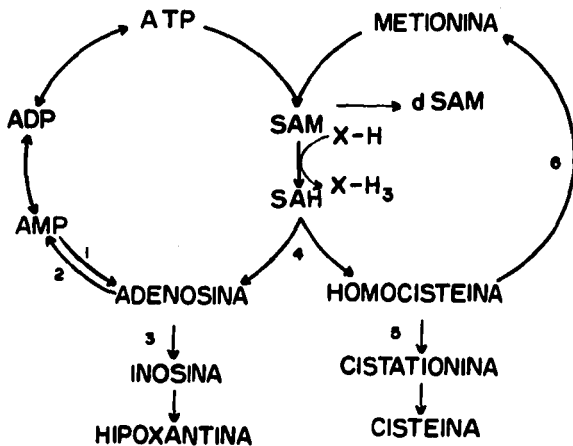


Fig. 2. Vía de producción citosólica de adenosina y homocisteína por el proceso de transmetilación: SAM, S - adenosil - L- metionina; dSAM, desoxi - S- adenosil - L - metionina; SAH; S - adenosil - L - homocistein; X - H, aceptor de metilos; las enzimas: (1) 5' nucleotidasa (EC 3.1.3.5); (2) adenosin quinasa (EC 2.7.1.20); (3) adenosin deaminasa (EC 3.1.3.5); (4) SAM - hidrolasa (EC 3.3.1.1); (5) cistationin - β - sintetasa (EC 4.2.1.22); (6) 5' metiltetrahidrofolato - homocistein metil transferasa (EC 2.1.1.13). Fuente: Schrader, J.: Adenosine and Adenine Nucleotides as Regulators of Cell Function (1991).



Como se mencionó anteriormente, los efectos de la adenosina no están limitados al sistema cardiovascular, otras de las funciones de la adenosina incluyen: estimulación de la secreción gástrica, regulación de la función linfocitaria, inducción de broncoespasmo, inhibición de la agregación plaquetaria, inhibición de la lipólisis en tejido adiposo, inhibición de la liberación de renina y el tono vascular en el riñón, ( 38,42 ). Tenemos así, que la mayoría de órganos y sistemas corporales son parcialmente regulados por la liberación local de adenosina.

En 1970 Sattin y Rall reportaron que la adenosina estimuló la acumulación de AMP-cíclico (AMPC) en rebanadas de cerebro y que este efecto fue bloqueado por la teofilina ( 38 ); a partir de estos datos y con los trabajos de Van Claker *et al* ( 45 ) y Londos *et al* ( 25 ) se estableció que la mayoría de los efectos de la adenosina extracelular son mediados por receptores localizados en la superficie de la membrana celular, los cuales están acoplados a diferentes componentes del sistema adenilato ciclasa, estos receptores fueron denominados  $A_1$  y  $A_2$ . El receptor  $A_1$  inhibe la actividad de la adenilato ciclasa por interacción con una proteína que requiere la presencia de GTP, identificada como  $G_i$ , mientras que el receptor  $A_2$  actúa vía una proteína  $G_s$ , para la activación de la enzima. Además de los receptores de membrana para la adenosina, existe otro sitio, sensible al nucleósido, llamado sitio P, localizado sobre la superficie interna de la membrana y parece ser un sitio de inhibición de la subunidad catalítica de la adenilato ciclasa, la cual media los efectos inhibitorios de elevadas concentraciones de adenosina. Datos recientes indican que este segundo sitio inhibitorio puede ser el blanco fisiológico para el 3' - AMP y 2' - desoxi- 3-AMP ( 4 ).

Los receptores  $A_1$  y  $A_2$  se encuentran ampliamente distribuidos en el organismo, la **Tabla 1**, muestra la distribución de estos receptores en algunos tejidos y sus efectos.

A partir del descubrimiento del AMPc y de la identificación de receptores de adenosina acoplados al sistema adenilato ciclasa en sistema nervioso ( 9,38 ), adipocitos ( 25 ), hepatocitos ( 24 )

**Tabla 1. Receptores de adenosina acoplados al sistema de la adenilato ciclasa en varios tejidos y células, posible función fisiológica**

Tejido o Célula.	Receptor	Efecto Fisiológica
Células adiposas	A <sub>1</sub>	Inhibición de la lipólisis
Corazón	A <sub>1</sub>	Depresión de la función cardíaca
Plaquetas	A <sub>2</sub>	Inhibición de la agregación plaquetaria.
Hígado	A <sub>2</sub>	Estimulación de la glicogenólisis
Glándula endocrina	A <sub>2</sub>	Estimulación de la síntesis o liberación de hormonas
Riñón	A <sub>2</sub>	Vasoconstricción
Tejido nerviosos	A <sub>1</sub>	Inhibición de la liberación de neurotransmisores

Fuente: Daly, J. W.: Adenosine Receptors: Estructure, Activity Relationships. (1985).

plaquetas ( 24 ), entre otros tejidos, se propuso que el AMPc es el mediador de los efectos metabólicos de la adenosina. Sin embargo datos recientes indican que algunas de las acciones de la adenosina ocurren independientemente del AMPc, por ejemplo, la conductancia del potasio en células arteriales y células del hipocampo, donde el receptor parece estar acoplado a un canal de potasio, vía una proteína G, sensible a la toxina pertusis, denominado G<sub>k</sub> ( 43 ). Por otro lado se ha visto que la adenosina inhibe corrientes de calcio sensibles a voltaje en el hipocampo y otros tejidos neuronales, dicho proceso involucra un canal iónico, que al parecer, es el responsable de la entrada de calcio y la liberación de transmisores ( 16 ). Riberio y Sebastiao ( 35 ) proponen la existencia de un tercer subtipo de receptor para la adenosina, denominado A<sub>3</sub>, acoplado a un canal de calcio. Kurtz ( 22 ) ha presentado evidencias de que el músculo liso vascular posee receptores de adenosina que se acoplan a la guanilato ciclasa.

Hay también varios reportes que sugieren la presencia de receptores de adenosina que median la inhibición del recambio de fosfoinosítidos ( 23 ); se menciona además que los receptores de adenosina pueden disminuir los niveles de AMPc por un mecanismo alterno, al estimular fosfodiesterasas que se encuentran unidas a la membrana plasmática ( 13,22 ). Se sugiere que la actividad de la guanilato ciclasa en células vasculares de músculo liso y una fosfodiesterasa del AMPc de baja K<sub>m</sub> en células adiposas pueden ser modificadas por el receptor A<sub>1</sub> ( 13,29 ).

Por otro lado, el sistema efector de la fosfolipasa para estimular a las células corticales de los tubulos colectores parece estar acoplado al receptor A<sub>1</sub> ( 1 ).

El hígado es otro de los órganos que se ve influenciado por la acción de la adenosina. Sin embargo, existe controversia sobre la posible participación del AMPc como mediador de en las acciones de la adenosina en células hepáticas. A continuación se enlista una serie de datos, obtenidos de

hepatocitos aislados de rata, incubados en presencia de adenosina, como un antecedente de los datos reportados en este trabajo.

En membranas plasmáticas de estas células han sido identificados receptores para adenosina del tipo  $A_2$  ( 32 ). Marchand *et al* ( 28 ) reportan un incremento en la concentración de AMPc a concentraciones de 1 mM de adenosina; Bartrons *et al* ( 3 ) encuentra un aumento de AMPc, a concentraciones de 25 a 250  $\mu$ M de adenosina; mientras que Fain *et al* ( 14 ) reporta una disminución en los niveles de AMPc, a concentraciones de 200  $\mu$ M del nucleósido de adenina. Por su parte Lowenstein *et al* ( 26 ) observan un aumento en los niveles de AMPc con 100  $\mu$ M de adenosina y Carabaza *et al* ( 7 ) reportan disminución de AMPc en células hepáticas de rata ayunada, incubadas con 0.5 mM de adenosina y un aumento en los niveles de este nucleósido cíclico en hepatocitos de rata alimentada, incubados en presencia de con 100  $\mu$ M del nucleósido. Por otro lado, existen también discrepancias sobre los efectos metabólicos que produce la adenosina en estas células. Tal es el caso de Fain, quien no encuentra efecto de la adenosina sobre el metabolismo del glucógeno ( 14 ). Bartrons, reporta una activación de la fosforilasa ( 3 ). Lund *et al* ( 27 ), mencionan una inhibición de la gluconeogénesis a partir de lactato, a concentraciones milimolares de adenosina. Guinzberg *et al* ( 18 ) reporta un efecto ureogénico de la adenosina a concentraciones micromolares y Zentella *et al* ( 47 ) reporta un efecto gluconocogénico a concentraciones micromolares de adenosina.

**La información previa indica que aun no se dispone de suficiente evidencia experimental sobre el sistema de señalamiento utilizado por la adenosina en la regulación funcional del hepatocito.**

**El objetivo del presente trabajo es tratar de dilucidar el mecanismo de transducción de la adenosina en hepatocitos aislados de rata.**

**En base a la información presentada, es probable que las acciones de la adenosina en células hepáticas involucren un mecanismo de transducción diferente al sistema de la adenilato ciclasa, reportado en otros tejidos.**

## DISCUSIÓN DE LOS ARTICULOS PRESENTADOS.

Los artículos presentados en este trabajo son:

**Trabajo 1.- "Hormone - like" effect of adenosine and inosine on gluconeogenesis from lactate in isolated hepatocytes.**

**Trabajo 2.- Metabolic responses of isolated hepatocytes to adenosine; dependence on external calcium.**

### Primer trabajo:

Se procedió a estudiar un indicador del efecto metabólico de la adenosina y la inosina para actuar a la manera de una hormona: el indicador fue la síntesis de glucosa a partir de lactato. En este trabajo se presenta una curva dosis - respuesta de los hepatocitos a la adenosina y la inosina ( Fig. 1, trabajo 1 ). Ambos nucleósidos estimulan la gluconeogénesis. Se muestra también que de la mezcla glucagon o epinefrina, con la adenosina, resultó en un antagonismo mutuo de la acción gluconeogénica para cada uno de los compuestos ensayados individualmente, se observa también que la inosina disminuyó la estimulación de la gluconeogénesis generada por el glucagon y que no se sumaron las respuestas gluconeogénicas, al incubar los hepatocitos con una mezcla de epinefrina e inosina ( Tabla 1, trabajo 1 ).

Se revisó también la acción de los análogos de la adenosina sobre la conversión de lactato a glucosa, en donde la 5'-( N-etil ) carboxamido-adenosina ( NECA ), análogo de la adenosina con mayor afinidad para el receptor  $A_2$ , estimuló la gluconeogénesis aun más que la propia adenosina, mientras que

el análogo N<sup>6</sup> - ( L-2-fenilisopropil ) - adenosina ( L - PIA ) con mayor afinidad para el receptor A<sub>1</sub> y la 3 - isobutil-1-metil-xantina ( IBMX ), un inhibidor de la fosforidesterasa, no produjeron una estimulación de la gluconeogénesis ( Fig. 2, trabajo 1 ). Por otro lado, los datos sobre la velocidad de conversión de glucosa, a partir de lactato, en hepatocitos incubados con el nucleósido y sus análogos, resultó en una disminución del efecto gluconeogénico de la NECA, dependiente de la concentración de adenosina ( Fig. 3, trabajo 1 ). Por su parte, la mezcla de adenosina y PIA presenta un efecto inhibitorio de la síntesis de glucosa. Comparativamente, la estimulación de la gluconeogénesis por la inosina no se alteró en presencia de la NECA o PIA ( Fig. 3, trabajo 1 ).

Queda claro que la adenosina y la inosina poseen un efecto gluconeogénico en células aisladas de hígado de rata, que la NECA posee un efecto gluconeogénico, debido probablemente a la activación del receptor A<sub>2</sub>, ya que la literatura reporta la existencia de este tipo de receptor en hígado de rata ( 25,3 ) y que el PIA no estimula la síntesis de glucosa. Sin embargo, cuando se mezclan estas moléculas, el efecto gluconeogénico de la adenosina no se manifiesta, y el de los análogos de adenosina se modifica en presencia del nucleósido de adenina. Con respecto a la inosina, es importante mencionar, que no se le ha dado continuidad al estudio de sus efectos metabólicos en hepatocitos aislados de rata.

#### Segundo trabajo:

En este reporte se propone al posible mensajero intracelular mediador de las respuestas metabólicas de la adenosina en hepatocitos aislados de rata. Los datos presentados aquí, muestran que la adenosina no aumenta los niveles basales de AMPc en comparación con el glucagón, y que además el nucleósido impide el aumento en la poza del nucleótido cíclico promovido por el glucagón ( tabla 1,

trabajo 2 ). La adenosina, a concentraciones de 1  $\mu\text{M}$  o menores, estimula la gluconeogénesis a partir de lactato ( 47 ) y la ureogénesis ( 18 ); sin embargo, a esas concentraciones de adenosina no hay cambios en los niveles basales de AMPc ( Tabala 1, trabajo 2 ). Por otro lado, en los hepatocitos incubados en ausencia de calcio ( tratados con EGTA ), la adenosina, a concentraciones de 1  $\mu\text{M}$ , no fue capaz de activar la síntesis de urea ( tabla II, Trabajo 2 ), lo que nos indica la esencialidad del calcio para obtener en el hígado los efectos metabólicos de la adenosina.

Los siguientes experimentos fueron encaminados a revisar la relación existente entre el calcio y adenosina en células hepáticas. Los datos aquí reportados indican que la adenosina promueve el flujo de calcio extracelular a través de la membrana plasmática hacia el citosol, ya que en los hepatocitos cargados con Quin - 2, un indicador fluorescente de calcio intracelular e incubados con 1.2 mM de calcio en el medio, se observó un incremento en la fluorescencia cuando las células son estimuladas con adenosina. Trazos similares fueron obtenidos cuando las células fueron expuestas, bajo las mismas condiciones a ionomicina, un ionóforo de calcio o bien con la hormona epinefrina ( Fig. 1, trabajo 2 ).

En ausencia de calcio exógeno no se modificó el movimiento de calcio en respuesta a la epinefrina, pero solo hubo una respuesta pequeña y de corta duración a la adenosina. En los hepatocitos donde la adenosina manifiesta la respuesta pequeña y transitoria, la epinefrina produce un efecto semejante al que registró en presencia de calcio externo ( Fig. 1, trabajo 2 ).

Por último, se revisó la capacidad de la adenosina para movilizar calcio de los compartimientos intracelulares en las células del hígado. El contenido total de calcio en los hepatocitos se determinó por la adición consecutiva del FCCP, un desacoplador de la fosforilación oxidativa y un ionóforo de calcio, el A23187. La adenosina añadida antes del FCCP, produjo una pequeñísima salida de calcio hacia el espacio extacelular, mientras que la epinefrina ocasionó una salida de casi un tercio del total del calcio



celular, la fuente de este calcio parece ser la mitocondria, ya que la magnitud de la respuesta al FCCP disminuye cuando se agrega adenosina o epinefrina antes del desacoplador, al medio de incubación. Estos datos muestran que la adenosina promueve la liberación de calcio almacenado en una de las pozas celulares, aunque la magnitud de este flujo no es tan marcada como el incremento en la concentración de calcio citosólico que se da, cuando las células son incubadas en presencia de calcio externo más adenosina.

#### **Resumen:**

A continuación, se enumeran los datos reportados en estos dos trabajos, obtenidos de células aisladas de hígado de rata: 1.- La adenosina y la inosina estimulan la síntesis de glucosa a partir de lactato., 2.- El efecto gluconeogénico de la epinefrina y del glucagon se inhibe en presencia de adenosina., 3.- La adenosina no modifica los niveles basales de AMPc., 4.- La síntesis de AMPc estimulada por el glucagon se inhibe en presencia de adenosina., 5.- El efecto ureogénico de la adenosina en hepatocitos se inhibe en ausencia de calcio en el medio de incubación., 6.- La adenosina, incrementa los niveles de calcio citosólico a expensas del calcio extracelular., 7.- La adenosina promueve un pequeño y transitorio movimiento de calcio al espacio intra y extracelular, cuando los hepatocitos son incubados en ausencia de calcio en el medio de incubación.

## DISCUSIÓN GENERAL

El hígado, al igual que muchos órganos, está sujeto a un control metabólico específico, en donde, la adenosina juega un papel importante en la regulación de varios procesos enzimáticos. Es un hecho que en el sistema de hepatocitos aislados, este nucleósido ha mostrado un efecto ureogénico ( 18 ) y gluconeogénico ( primer trabajo ). Los datos aquí presentados señalan también, un movimiento de calcio a través de la membrana plasmática, regulado por la adenosina, proceso que se manifiesta de forma muy marcada, cuando las células se incuban en presencia de calcio, en donde además este nucleósido de adenina, no modifica los niveles basales de AMPc, por otro lado, en ausencia de este ión, no se observa un aumento en la síntesis de urea, estimulada por la adenosina, por lo que en base a los datos reportados en este trabajo, y por las evidencias experimentales que se han dado sobre la participación del calcio en los efectos fisiológicos de varias hormonas, se propone a este ión como el segundo mensajero, utilizado por la adenosina, en su sistema de transducción, en células hepáticas.

## PERSPECTIVAS

Para la continuidad del presente trabajo, se propone revisar el mecanismo por el cual la adenosina regula el flujo de calcio del espacio extracelular hacia el citosol. Si este movimiento se realizara a través de un canal de calcio, se sugiere: a.- Someter las células a procesos de polarización - despolarización, para saber si es dependiente de voltaje., b.- Acompañar este proceso con técnicas de "patch-clamp" para apoyar la hipótesis de la presencia de un canal sensible a la adenosina., c.- Investigar

si en la apertura o cierre del flujo de calcio intervienen proteínas de la familia **G** , sensibles a la toxina pertusis., d.- Revisar si existe un receptor para adenosina responsable de activar la entrada de calcio, vía un canal., e.- Investigar si el mecanismo de acción de la adenosina, es únicamente a través de calcio, o puede estar involucrado otro sistema de transducción.

## BIBLIOGRAFIA

1. Arend, L. J., Handler, J.S., Rhim, J.S., Gusousky, F., and Spielman, W.S.: Adenosine-sensitive phosphoinositide turnover in a newly established renal cell line. *Am. J. Physiol.*, F1067, (1989).
2. Barankiewicz, J., Dosch, H.M., and Cohen, A.: Extracellular nucleotide catabolism in human B and T lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 263, 7094, (1988).
3. Bartrons, Ramon, Van Schaftingen, Emile and Hers, Henri-Gery.: The ability of adenosine to decrease the concentration of fructose 2,6-bisphosphate in isolated hepatocytes. *Biochem. J.*, 218, 157-163, (1984).
4. Belardinelli, L., and Isenberg, G: Isolated arterial myocytes; adenosine and acetylcholine increase potassium conductance. *Am. J. Physiol.*, 244, H734, (1983).
5. Berne, R.M.: Cardiac nucleotides in hypoxia; a possible role in regulation of coronary blood flow. *Am. J. Physiol.* 204, 317, (1963).
6. Berne, R.M., Rubio, R., and Cumish, R.: Release of adenosine from ischemic brain; effect on cerebral vascular resistance and incorporation into cerebral adenine nucleotides. *Circ. Res.*, 25, 262. (1974).
7. Carabaza, Assumpata, Ricart, D. Maribel, Mor, Angels., Guinovart, J. Joan and Ciudad, J. Carlos.: Role of AMP on the activation of glycogen synthase and phosphorylase by adenosine, fructose, and glutamine in rat hepatocytes. *Journal of Biological Chemistry.* vol. 265, No. 5, 2724-2732, (1990).
8. Coade, St. B., and Pearson, J. D. : Metabolism of adenine nucleotides in human blood. *Circ. Res.*, 65, 531, (1989).
9. Daly, J.W.: Adenosine receptors; In advances in cyclic nucleotide and protein phosphorylation research. Vol. 19, edited by D.M.F. Cooper and K.B. Seamon, Raven Press, New York, (1985).

10. Dobson, J.G., Rubio, R., and Berne, R. M.: Role of adenine nucleotides, adenosine and inorganic phosphate in the regulation of skeletal muscle blood flow. *Circ. Res.*, 29, 375. (1975).
11. Drury, A. N.: The physiological activity of nucleic acid and its derivatives. *Physiol. Rev.*, 16, 292, (1936).
12. Drury, A. N. and Szent Gyorgyi, A.: The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. *J. Physiol.*, 68, 213, (1929).
13. Elks, M. L., Jackson, M., Manganiello, V.C., and Vaughn, M.: Effect of N<sup>6</sup> - (L-2- phenylisopropyl) adenosine and insulin on cAMP metabolism in 3T3-L1 adipocytes. *Am. J. Physiol.*, 252, C 343, (1987).
14. Fain, N. John and Shepherd, E. Raymond: Adenosine, cyclic AMP metabolism, and glycogenolysis in rat liver cells. *J. Biological Chemistry*. 252-22, 8066-8070. (1970).
15. Feldberg, W., and Serwood, S.L.: Injections of drugs into lateral ventricle of the cat. *J. Physiol.* 123, 148. (1954).
16. Fredholm, B. B., and Dunwiddie, T. V.: How does adenosine inhibit transmitter release?. *Trends Pharmacolo. Sci.*, 9, 130, (1988).
17. Gordon, J. L., Pearson, J. D., and Slakey, L. L.: The hydrolysis of extracellular adenine nucleotides by cultured endothelial cells from pig aorta. *J. Biol. Chem.*, 261, 15496, (1986).
18. Guinzber, P. Raquel, Laguna, Irma., Zentlla, Alejandro., Guzman, Ricardo., and Piña E.: Effect of adenosine and inosine on ureagenesis in hepatocytes. *Biochem. J.*, 245, 371 - 374, (1987).
19. Hoffer, John, L., and Lowenstein, John, M.: Effects of adenosine and adenosine analogues on glycogen metabolism in isolated rat hepatocytes. *Biochemical Pharmacology.*, Vol.35, No. 24, 4529-4536, (1986).

20. Jacob, M. Y., and Berne, R. M.: Metabolism of purine derivatives by the isolated cat heart. *Am. J. Physiol.*, 198, 322, (1960).
21. Johnson, R. A., Teung, S. M. H., Bushfield, M., Tübner, D., and Shoshiani, Y.: Physiological and biochemical aspects of P-site-mediated inhibition of adenyl cyclase, in Purines in Cellular Signaling, Targets for New Drugs, Jacobson, K. A., Daly, J. W., and Manganiello, V., Eds. Springer - Verlag, New York, 185 (1990).
22. Kurtz, A.: Adenosine stimulates guanylate cyclase activity in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.*, 262, 6296, (1987).
23. Linden, J., and Delahunty, T. M.: Receptors that inhibit phosphoinositide breakdown. *TIBS*, 10, 114 (1989).
24. Londos, C., and Wolff, J.: Two distinct adenosine sensitive sites on adenylate cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, 5482, (1977).
25. Londos, C., Cooper, D.M.F., and Wolff, J.: Subclasses of external adenosine receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:2551-2554, (1980).
26. Lowenstein, J. M., Yu, M. K., and Naito, Y.: Regulation of adenosine metabolism by 5' nucleotidases. In: Regulatory Function of Adenosine. Edited by: Berne, R. M., Rall, T. W., and Rubio, R., 117. *Martinus Nijhoff*, Boston, (1983).
27. Lund, Patricia., Cornell, W. Neal., and Krebs, A. Hans.: Effect of adenosine on the adenine nucleotide content and metabolism of hepatocytes. *Biochem. J.*, 152: 593-599, (1975).
28. Marchand, Jeane-Claude., Lavonnie, Alain., Giorz, Monique., and Matray, Francois.: The influence of adenosine on intermediary metabolism of isolated hepatocytes. *Biochimie.*, 62: 1273-1282, (1979).

29. de Mazancourt, P., and Giudicelli, Y.: Guanine nucleotides and adenosine R-site analogs stimulate the membrane-bound low Km cyclic AMP phosphodiesterase of rat adipocytes., *FEBS Lett.*, 173:385, (1984).
30. Moser, G. H., Scharder, J., and Denssen, A.: Turnover of adenosine in plasma of human and dog blood. *Am. J. Physiol.*, 256:C799, (1989).
31. Osswald, H.: Renal effects of adenosine and their inhibition by theophylline. *Naunyn-Schneidberg's Arch. Pharmacol.*, 288:79, (1975).
32. Pearson, J. D., Carleton, J. S., and Gordon, J. L.: Metabolism of adenine nucleotides by ectoenzymes of vascular endothelial and smooth-muscle cells in culture. *Biochem. J.*, 190:421, (1980).
33. Pearson, J. D., and Coade, S. B.: Kinetics of endothelial cell ectonucleotidases. In: Topics and Perspectives in Adenosine Research. Edited by: Paton, D. M., 83. *Plenum Press*, New York, (1985).
34. Pearson, A. R. P., Jakobs, E. S., Ng, C. Y. C., and Odegaard, R. D.: Nucleoside transport inhibition in vitro and in vivo. In: Topics and Perspectives in Adenosine Research. Edited by: Gerlach, E., and Becker, B. F., 89. *Springer-Verlag*, Berlin, (1978).
35. Ribeiro, J. A., and Sebastiao, A. M.: Adenosine receptors and calcium: basis for proposing a third (A<sub>3</sub>) adenosine receptor., *Proc. Neurobiol.*, 26:179, (1986).
36. Rodbell, M., and Londos, C.: Regulation of hepatic adenylate cyclase by glucagon, GTP, divalent cations, and adenosine. *Metabolism*, 25:11, suppl. 1 (November), (1976).
37. Rubio, R., Berne, R. M., Bockman, E. L., and Cornish, R. R. : Relationship between adenosine concentration and oxygen supply in rat brain. *Am. J. Physiol.*, 228:1896, (1975).

38. Sattin, A., and Rall, T. W.: The effect of adenosine and adenine nucleotides on the cyclic adenosine 3'-5-phosphate content of guinea pig cerebral cortex slices. *Mol. Pharmacol.*, 6:13, (1970).
39. Schrader, J., Schutz, W., and Berdenheuer, H.: Role of S-adenosylhomocysteine hidrolase in adenosine metabolism in mammalian heart. *Biochem. J.*, 196: 65, (1981).
40. Shradar, W. P., and Wart, C. A.: Localization of adenosine deaminase and adenosine deaminase complexing protein in rabbit heart. Implications for adenosine metabolism. *Circ. Res.*, 66:754, (1990).
41. Stiles, G. L.: Adenosine receptors and Beyond: Molecular mechanisms of physiological regulation. *Clinical Research.*, 38(1):10, (1990).
42. Stiles, G. L.: Adenosine receptors: Structure, function and regulation., *Trends in Pharmacol. Sci.*, 7:486, (1986).
43. Trussell, L. O., and Jackson, M. B.: Adenosine-activated potassium conductance in cultured striatal neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 82:4857, (1985).
44. Ueland, P. M.: Pharmacological and biochemical aspects of S-adenosylhomocysteine and S-adenosilhomocysteine hydrolase. *Pharmacol. Rev.*, 34:223, (1982).
45. Van Claker, D., Muller, M., and Hamprecht, B.: Adenosine regulates via two different types of receptors, the accumulation of cyclic AMP in cultured brain cells., *J. Neurochem.*, 33:999, (1979).
46. Wolf, M. M., and Berne, R. M.: Coronary vasodilator properties of purine and pyrimidine derivatives. *Circ. Res.*, 4:343, (1956).
47. Zentella, M. de Piña, Diaz-Cruz, A., Guinzberg, P., and Piña, E.: Hormone-Like effect of adenosine and inosine on gluconeogenesis from lactate in isolated hepatocytes. *Life Sciences.*, 45:2269, (1989).



"HORMONE-LIKE" EFFECT OF ADENOSINE AND INOSINE ON GLUCONEOGENESIS  
FROM LACTATE IN ISOLATED HEPATOCYTES

M. Zentella de Piña, A. Díaz-Cruz, R. Guinzberg P. and E. Piña

Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Apartado Postal 70-159, 04510, México, D.F. MEXICO

(Received in final form October 3, 1989)

Summary

In isolated rat hepatocytes adenosine and inosine showed a dose-dependent increase in the rate of glucose synthesis from lactate with a  $K_m$  of  $7.5 \times 10^{-6}$  and  $9 \times 10^{-6}$  M, respectively. Absence of this action was recorded with: IMP, xanthosine, adenine, hypoxanthine, and uric acid. A reciprocal inhibition of individual gluconeogenic stimulation was found in cells incubated with glucagon or epinephrine and adenosine, but not with inosine. 5'-(N-ethyl) carboxamido adenosine was more potent than adenosine, whereas N'-(1-2-phenylisopropyl)-adenosine antagonized the stimulation of gluconeogenesis by adenosine. Neither of the analogs used modified the stimulatory role of inosine on the studied pathway. Adenosine and inosine may be involved in the short term regulation of gluconeogenesis.

The metabolic responses to adenosine range from "hormone-like" effects seen at low concentrations, to direct participation in adenine nucleotide metabolism, observed at concentrations around 1 mM (see 1 for review). Gluconeogenesis is one of the pathways altered by millimolar concentrations of the nucleoside. Lund *et al.* (2) reported that adenosine decreases hepatic gluconeogenesis from lactate; this finding was confirmed by two other groups (3-5). Levoigne *et al.* (5) suggested that the mechanism by which millimolar concentrations of adenosine inhibit hepatic gluconeogenesis from lactate, probably results from its conversion into adenine nucleotides.

On the other side are the "hormone like" effects of the nucleoside on the liver. Moffer and Lovenstein (6) reported stimulation of glucose release, glycogen loss and the conversion of glycogen phosphorylase b to a by micromolar concentrations of adenosine and 5'-deoxy-5'-chloroadenosine. Guinzberg *et al.* (7) found that micromolar concentrations of adenosine or inosine increased the rate of urea synthesis in isolated hepatocytes. This paper deals with the "hormone-like" action of adenosine, and some of its catabolites and analogs, on the hepatic gluconeogenesis from lactate.

Gluconeogenesis and ureogenesis are related metabolic pathways, they share enzymes, transport systems, and metabolic signal molecules in the mammalian liver (8). Several hormones stimulate both pathways (9,10), and important steps in urea synthesis and gluconeogenesis have been found to vary in parallel (11). Since adenosine and inosine, used at near physiological

concentrations, increased the rate of urea synthesis in isolated rat liver cells (7), a stimulation of gluconeogenesis might be anticipated with hepatocytes incubated in the presence of these nucleosides. Stimulation of gluconeogenesis by adenosine in renal cortical fragments (12) and by 100 M 2-chloroadenosine in isolated hepatocytes (3), both from fed rats, was reported previously. Preliminary results from this work were presented elsewhere (13).

#### Materials and Methods

Male Wistar rats (150 - 200 g) starved for 24 h and allowed to drink water freely, were used in these experiments. Isolated hepatocytes were prepared by the method of Berry and Friend (14), as detailed previously (7). Cell viability was assayed by the Trypan Blue exclusion method; experiments were performed when a 90% of viability was recorded. Hepatocytes were incubated under the experimental conditions described in Figures and Table. At the end of the incubation period, tubes were placed in ice cold water during 5 min and spun at 50 g for 10 min. The supernatant was used to measure glucose by the method of Fales (15).

The following reagents were from Sigma Chemical Co. St. Louis, Mo. USA.: IMP, xanthosine, adenosine, inosine, adenine, hypoxanthine, xanthine, uric acid, glucagon, L-epinephrine, L-ornithine hydrochloride, bovine serum albumin (fraction V), collagenase (type IV), N<sup>6</sup>-(L-2 phenylisopropyl)-adenosine (PIA); 5<sup>8</sup>-(N-ethyl) carboxamido-adenosine (NECA); 3-isobutyl-1-methyl-xanthine (IBMX). Other reagents were analytical grade from Merck-México.

TABLE 1. Effects of adenosine or inosine on gluconeogenesis from lactate, stimulated by glucagon and epinephrine.

Additions	No <sup>a</sup> nucleoside	Adenosine (1 μM)	Inosine (1 μM)
Glucose formed in umoles/min per g wet weight of cells			
No hormone	0.37 ± 0.05 (3)	0.90 ± 0.04 (3)* p < 0.001	0.92 ± 0.05 (3)* p < 0.001
Glucagon (1 μM)	1.2 ± 0.08 (3)** p < 0.001	0.46 ± 0.07 (5)*** p < 0.01	0.82 ± 0.04 (3)
Epinephrine (1 μM)	0.86 ± 0.08 (3)** p < 0.01	0.47 ± 0.05 (4)*** p < 0.01	0.96 ± 0.05 (3)

Isolated hepatocytes were incubated as described in Fig. 1, and supplemented with the concentrations of the indicated compounds. Results are expressed as the means ± S.E.M. of duplicated samples. The number of cell preparations is indicated in parenthesis.

\* Control vs nucleoside, without hormone

\*\* Control vs hormone without nucleoside

\*\*\* Hormone (glucagon or epinephrine) vs adenosine plus hormone

#### Results

The gluconeogenic dose-response curves to adenosine and inosine are shown

in Fig. 1;  $K_m$  values of  $7.5 \times 10^{-8}$  and  $9 \times 10^{-8}$  M were recorded, respectively. In the incubation system described in the legend of Fig. 1, none of the following compounds stimulated gluconeogenesis when tested at concentrations up

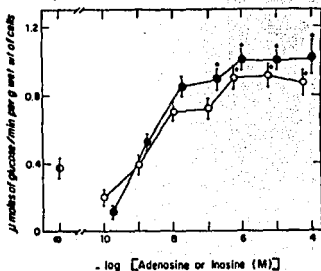


FIG. 1

Stimulation of glucose synthesis from lactate by adenosine or inosine. In a final volume of 1 ml, 35 mg of hepatocytes (wet weight) were incubated for 60 min in Krebs-Ringer bicarbonate, pH 7.4, with 3 mM ornithine, 10 mM lactate, 5 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ , supplemented with different concentrations of adenosine (○) and inosine (●); (●) control. Results are given as the means and vertical lines represent the S.E.M. of duplicated incubations from 4-6 cell preparations. Statistical significance versus control is indicated: \* $p < 0.001$ .

to 10 micromolar: IMP, xanthosine, adenine, hypoxanthine, xanthine, and uric acid (data not shown).

The mixture of glucagon or epinephrine with adenosine resulted in mutual antagonism of the gluconeogenic action promoted by each compound assayed alone (Table 1). Otherwise, the action of glucagon stimulating glucose synthesis was diminished by inosine to the value obtained with this nucleoside alone. Lack of an additive gluconeogenic response was obtained in hepatocytes incubated with epinephrine and inosine.

Among the adenosine analogs tested, NECA, which activates the adenylate cyclase system (16), increased the rate of glucose production from lactate more efficiently than the natural nucleoside (Fig. 2). Moreover PIA and IBMX, inhibitors of the adenylate cyclase system (16), did not change the basal rate of glucose synthesis from lactate was influenced distinctively when adenosine or inosine were incubated with the hepatocytes in the presence of a single dose from two adenosine analogs, NECA and PIA (Fig. 3). At lower doses of adenosine the action of NECA predominated over the effect of the natural nucleoside. The mixture of adenosine and PIA resulted in an inhibition in the rate of glucose synthesis, this result is rather surprising when the individual effects of adenosine and PIA are considered independently (Figs. 1 and 2). The ability of inosine to stimulate gluconeogenesis was not modified by the addition of NECA or PIA (Fig. 3).

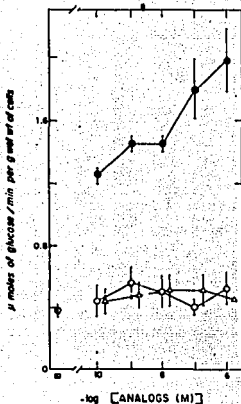


FIG. 2

Effect of adenosine analogs on the gluconeogenesis. Hepatocytes were incubated as described in Fig. 1, and supplemented with different concentrations of the following adenosine analogs: NECA (●), PIA (○) and IBMX (△); control (○). Values plotted are the means, and vertical lines represent S.E.M. of duplicated incubations from 3 independent cell preparations.

#### Discussion

Adenosine has an opposite action in hepatic gluconeogenesis from lactate depending on the concentrations used of the nucleoside; the inhibition observed with 0.5 mM adenosine (2-5) becomes an activation by lowering its concentration to the micro range (Fig. 1). Similar results were reported for the effect of the nucleoside on liver ureogenesis: an inhibition at high concentrations (2), and an activation at near physiological concentrations (7). The total cellular content of ATP remained unmodified under experimental conditions in which the nucleoside elicited a clear ureogenic action (7). These data, together with the low concentrations required to obtain a good gluconeogenic effect (Fig. 1) and the distinctive gluconeogenic response observed with selected adenosine analogs (Fig. 2), suggest an action of the nucleoside through its interaction with membrane receptors.

Adenosine receptors that mediate stimulation or inhibition of adenylate cyclase activity have been discriminated with appropriate adenosine analogs (17). Accordingly, the relative potency of adenosine analogs at the stimulatory receptors was NECA >, adenosine >, PIA, whereas the reverse potency order was seen with inhibitory receptors (17). On these bases the results obtained in this paper (Figs. 2 and 3) indicate that the gluconeogenic action of adenosine might be mediated by its interaction with cell surface receptors, which activate the adenylate cyclase system. The ability of adenosine or 2-chloroadenosine to decrease the concentration of fructose 2,6-bisphosphate in hepatocytes was accompanied by an increase in the concentration of cyclic AMP (3). Also, liver glycogenolysis promoted by adenosine and certain of its analogs was the result of a stimulated conversion of glycogen phosphorylase  $b$  to  $a$ , preceded by a rise in the basal levels of cyclic AMP (6).

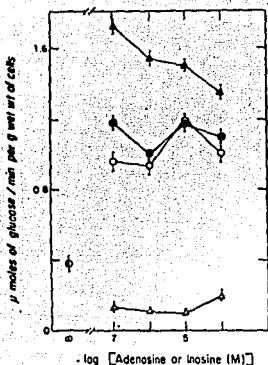


FIG. 3

Comparison of gluconeogenic action of adenosine and inosine in cells incubated with adenosine analogs. Hepatocytes were incubated as described in Fig. 1 in presence of NECA  $10^{-6}$  M plus adenosine ( $\blacktriangle$ ); PIA  $10^{-6}$  M plus adenosine ( $\triangle$ ); NECA  $10^{-6}$  M plus inosine ( $\bullet$ ) and PIA  $10^{-6}$  M plus inosine ( $\circ$ ); control ( $\odot$ ). Results are given as the means and vertical lines represent the S.E.M. of duplicated incubations from 3 cell preparations.

Several intriguing differences in the gluconeogenic response to adenosine or inosine were observed when the hepatocytes were challenged with either one of these nucleosides, supplemented with a hormone or an adenosine analog. The recognized gluconeogenic effect of glucagon (9) or epinephrine (10) was impaired with adenosine, but was almost unmodified with inosine (Table 1). A less likely alternative is that stimulation of gluconeogenesis might be due to inosine formed from adenosine (Table 1), while inhibition of glucagon and epinephrine action is direct due to adenosine effects. Moreover, PIA blocked the gluconeogenic effect of adenosine, not that of inosine (Fig. 3). These differences point toward independent routes promoting hepatic gluconeogenesis for either, adenosine itself, or inosine. Inhibition of metabolic responses to glucagon or epinephrine by adenosine were described previously by Fain and Shepherd (18): the nucleoside (200  $\mu$ M) reduced the stimulation of glycogenolysis by glucagon or epinephrine in isolated rat liver cells. In contrast, in this system, 2',5'-dideoxyadenosine was an ineffective inhibitor of glycogenolysis while it was much more potent than adenosine as an inhibitor of cyclic AMP accumulation (18). These results suggest that glucose release by rat liver cells can be dissociated from alterations in cyclic AMP (18). The data of this paper provide only indirect evidence in favor of a physiological role of cyclic AMP as mediator of adenosine in stimulating liver gluconeogenesis (Figs. 2 and 3).

The abundance of adenosine and inosine in mammalian tissues (19,20), their ability to stimulate liver metabolic pathways such as glycogenolysis (data for adenosine only, in references 3 and 6), ureogenesis (7), and gluconeogenesis (Fig. 1), the effect of adenosine impairing the gluconeogenic response to glucagon and epinephrine (Table 1), and the action of both nucleosides blocking the ureogenic role of glucagon (7), make further studies necessary to define the physiological significance and the *in vivo* relationships of these facts.

#### Acknowledgements

We thank A. García-Sáinz and K. Villalobos for helpful discussions; A. Peña for the generous donation of some reagents; I. Mascher for her assistance in preparing the manuscript and Virginia Godínez for her help in typing the manuscript. This work was partially supported by Grant PSCSACNA-052045 from CONACYT, México.

#### References

1. J.R.S. ARCH and E.A. NEWSHOLME, *Essays Biochem.* **14**, 82-123 (1978).
2. P.N. LUND, N.W. CORNELL and H. A. KREBS, *J. Biochem.* **152**, 593-599 (1975).
3. R. BARTONS, E. VAN SENFTINGEN and H.H. HERS, *J. Biochem.* **218**, 157-163 (1984).
4. J.C. MARCHAND, A. LAVOINNE, M. GIROZ and F. MATRAY, *Biochimica* **61** 1273-1282 (1979).
5. A. LAVOINNE, A.H. BUC, S. CLAEYSSENS, M. PINOSA and F. MATRAY, *Biochem J.* **246** 449-454 (1987).
6. L.J. HOFFER and J.M. LOWENTHEIN, *Biochem. Pharmacol.* **35**, 4529-4536 (1986).
7. P.R. GUINZBERG, I. LAGUNA, A. ZENTELLA, R. GUZMAN and E. PIRA, *Biochem. J.* **245** 371-374 (1987).
8. J.A. MEIJER, A.J. GIMPEL, G. DELLEUW, E.M. TISCHLER, M.J. TAGER and R.J. WILLIAMSON, *J. Biol. Chem.* **253**, 2308-2320 (1978).
9. M.M. KNEER, J.M. WAGNER and A.H. LARDY, *J. Biol. Chem.* **254**, 12160-12168 (1979).
10. S. CORVERA, B.J. HUERTA and A. GARCIA-SAINZ, *European J. Pharmacol.* **82**, 89-91 (1982).
11. R.J. APRILLE, *Faseb J.* **2**, 2547-2556 (1988).
12. D.A. RODIN, R.A. RODIN and E.D. SAGGERSON, *Biochem. Pharmacol.* **29**, 828-829 (1980).
13. A. DIAZ-CRUZ, P.R. GUINZBERG, M. ZENTELLA and E. PIRA, *Abstr. Coma. 14th Int. Congr. Biochem.* **40**: 93, 82 (1988).
14. M.N. BERRY and D.S. FRIEND, *J. Cell Biol.* **43**, 506-520 (1969).
15. F.W. FALES, *Stand. Methods Clin. Chem.* **4**, 101-112 (1963).
16. J.W. DALY, *J. Med. Chem.* **25**, 197-207 (1982).
17. C. LONDOS, M.F.D. COOPER and J. WOLF, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 2551-2554 (1980).
18. J.N. FAIN and R.E. SHEPHERD, *J. Biol. Chem.* **25**, 8066-8070 (1977).
19. V. CHAGOYA DE SANCHEZ, R. HERNANDEZ-MUNOZ, M. DIAZ-MUNOZ, R. VILLALOBOS, W. GLENDER, S. VIDRIO, J. SUAREZ and L. YAÑEZ, *Life Sci.* **33**, 1057-1064 (1983).
20. J. ONTYD and J. SCHRADER, *J. Chromatogr.* **307**, 404-409 (1984).

METABOLIC RESPONSES OF ISOLATED HEPATOCYTES TO ADENOSINE;  
DEPENDENCE ON EXTERNAL CALCIUM.

Antonio Díaz\*, Raquel Guinsberg\*\*, Salvador Uribe\*\*\* and Enrique Piña\*\*.

\*School of Veterinary Medicine, \*\*Dept. of Biochemistry, School of Medicine, Apdo. Postal 70-159, and \*\*\*Instituto de Fisiología Celular, Apdo. Postal 70-600, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 México D. F., México.

(Received in final form June 7, 1991)

Summary

The role of cyclic-adenosine monophosphate (cAMP) and calcium ( $Ca^{2+}$ ) in the metabolic responses to adenosine was studied in isolated hepatocytes from fed rats. In the presence of 1.2 mM  $Ca^{2+}$  but not in the absence of  $Ca^{2+}$ , adenosine stimulated ureagenesis without increasing cAMP. Adenosine inhibited the glucagon mediated increase in cAMP. Adenosine increased free cytoplasmic  $Ca^{2+}$  provided that cells were incubated in the presence of external  $Ca^{2+}$ . In the absence of added  $Ca^{2+}$  adenosine did not stimulate ureagenesis or the movements of  $Ca^{2+}$ . It is suggested that, in the liver cell,  $Ca^{2+}$  may be a second messenger for adenosine.

Cyclic AMP and  $Ca^{2+}$  have been proposed as the second messengers mediating the responses of hepatocytes to adenosine. However, the available information on changes in cAMP in hepatocytes incubated with adenosine is contradictory: Fein and Shepherd (1) reported that adenosine and 2'5'dideoxyadenosine did not increase the basal value of cAMP. In contrast, Marchand *et al.* (2) and Barton *et al.* (3) found that the synthesis of cAMP was stimulated by adenosine or 2-chloroadenosine. In addition, in hepatocytes treated with increased concentrations of adenosine, a dose dependent rise in cAMP has been reported (4). Carabaza *et al.* (5) observed that cAMP is increased by adenosine only in hepatocytes from fed rats but is not affected in starved animals. However, recent reports show that even in hepatocytes from starved rats, adenosine increased the rate of urea synthesis ( $K_m=7.5 \times 10^{-8}$  M) (6) and the rate of glucose synthesis from lactate ( $K_m=8 \times 10^{-6}$  M) (7). All these results have led to controversy on whether cAMP participates in the response of hepatocytes to adenosine.

In contrast with the cAMP data, there is indirect evidence involving  $Ca^{2+}$  as a possible mediator of the response of the hepatocyte to adenosine e. g. the increased rate of urea synthesis with adenosine was absent in previous experiments using a  $Ca^{2+}$  free medium (6). Likewise, the adenosine mediated production of glucose decreased sharply in low  $Ca^{2+}$  (7  $\mu$ M) perfusates (8). Carabaza *et al.* (5) proposed that  $Ca^{2+}$  mediates the activation of phosphorylase by adenosine because EGTA blocked the effect.

The effects of adenosine on hepatocytes seem to be specific for this compound and not for other related molecules. Inosine can mimic the response of hepatocytes to adenosine but ATP, uric acid or hypoxanthine do not have any effects (6). In this work, the putative role of cAMP or  $Ca^{2+}$  in

the adenosine mediated increase in the rate of urea production was studied in isolated rat hepatocytes.

#### Materials and methods

Hepatocyte isolation. Male Wistar rats weighing 150 to 200 g and fed ad libitum were anesthetized with ether and hepatocytes were isolated using slight modifications (6) to the method of Berry and Friend (9).

Measurements of cAMP and urea. Cyclic AMP was determined in duplicate using the Amersham Kit TRK432 and urea was measured according to Gutman and Bergmeyer (10).

Quin2 loading of hepatocytes. It was done according to Charast et al. (11). Briefly, isolated hepatocytes were diluted in Krebs-Ringer bicarbonate, to approximately 50 mg w/ml and incubated at 37°C under an O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (95/5%) atmosphere for 10 min. The hepatocytes were incubated for 20 more minutes in the presence of 100 uM quin2/AM added from a 20 mM stock solution in DMSO. After incubation with quin2/AM, the cells were washed twice by centrifugation at 500 rpm/3 min in a clinical centrifuge. Liver cells were distributed in 200 ul aliquots in Eppendorf microfuge tubes and immersed in ice until used (12).

Fluorescence measurements. A 200 ul sample of cells was diluted with 2.3 ml of Krebs-Ringer bicarbonate at room temperature and incubated under constant agitation in a reciprocal water bath shaker (New Brunswick R76) at 37°C under an atmosphere of O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (95/5%) for 10 min. Then the cells were transferred to a 3 ml cuvette and the fluorescence measured in a Farrand Mark I spectrofluorometer at 340-500 nm. At the end of every trace, 10 uM ionomycin was added to determine maximal fluorescence (12), then 100 uM MnCl<sub>2</sub> was added to quench extracellular quin2 (13) and last, 0.1% v/v triton X-100 was added to determine minimal fluorescence (12,13). The concentration of quin2 in cells was estimated by addition of known amounts of quin2 acid to tritonX-100-treated non-loaded cells and assuming a cellular volume of 2 ul/mg prot. (12,13).

Extramitochondrial calcium movements. Were measured with arsenazo III in an SLM DM2-C spectrophotometer in dual mode at 675-685 nm. Both arsenazo III and the reaction mixture were treated with the Ca<sup>2+</sup> chelator chelex-100 (Bio-Rad) previous to the experiments in order to deplete all Ca<sup>2+</sup> from the medium. pH was always checked and adjusted after chelex treatment (11, 14).

#### Results and Discussion

Isolated hepatocytes incubated in 1 uM adenosine failed to increase the basal concentration of cAMP (Table I). Glucagon did increase cAMP but adenosine, at equisolar concentrations, inhibited the effects of glucagon on cAMP (Table I). These results agree with reports indicating that adenosine does not increase cAMP (1). Adenosine concentrations of 1 to 100 uM were tested in experiments similar to those reported in Table I and no increase in cAMP was observed at any of the adenosine concentrations tested (results not shown).

Hoffer and Lowenstein (4) did find 40% increased cAMP when they used 10 uM adenosine. However, at lower concentrations of adenosine (5 uM), no increase in cAMP was detected while the activity of phosphorylase did increase



substantially. The only difference between their system and ours is that they added 20 mM glucose to their incubation mixture (4). Thus, it seems that in hepatocytes isolated from fed rats or in the presence of high glucose it is possible to increase the levels of cAMP if the concentration of adenosine is 10  $\mu$ M or higher (2-5). With 10  $\mu$ M adenosine or less no increase in the cAMP levels were observed when adding 1 to 100  $\mu$ M adenosine (Table I, results not shown and references 2-5). This is in contrast with the stimulation of glycogenolysis (4), ureagenesis (6) and gluconeogenesis (7) observed even at a concentration of adenosine as low as 1  $\mu$ M. In addition, 2',5'-dideoxyadenosine inhibited the rise in cAMP due to glucagon but did not inhibit the increase in glucose release promoted by the same hormone (1). All these data are strongly suggestive that cAMP may not be a mediator of the metabolic response to adenosine in isolated rat hepatocytes.

TABLE I

Effects of Adenosine and Glucagon on cyclic AMP Accumulation by Rat Liver Cells.

ADDITIONS	pmol cAMP/mg ww hepatocytes
None	1.26 $\pm$ 0.10 (6)
1 $\mu$ M Glucagon	2.30 $\pm$ 0.30 (4)
1 $\mu$ M Adenosine	1.33 $\pm$ 0.18 (4)
1 $\mu$ M Glucagon + 1 $\mu$ M Adenosine	1.33 $\pm$ 0.14 (3)

Hepatocytes were incubated at 37°C for 2 min in Krebs-Ringer bicarbonate buffer with 1.2 mM CaCl<sub>2</sub> without glucose and without an inhibitor of phosphodiesterase. Results are expressed as the means  $\pm$  S. E. M. of duplicated samples. The numbers between brackets are the experiments performed. \* indicates a statistical significance of  $p < 0.05$  against the control (no additions).

Adenosine (0.1-10  $\mu$ M) only stimulated ureagenesis if the cells were incubated in the presence of Ca<sup>2+</sup>. The effects of 1  $\mu$ M adenosine are shown in Table II (see also 6). This result and earlier evidence suggested that Ca<sup>2+</sup>

TABLE II

Comparison of the Uraemic Action of Adenosine in Hepatocytes Incubated with or without Calcium.

ADDITIONS	Urea (nmols/mg ww cells/hour)	
	1 mM EGTA	1.2 mM CaCl <sub>2</sub>
None	8.6 $\pm$ 0.18	9.2 $\pm$ 0.30
1 $\mu$ M Adenosine	10.2 $\pm$ 1.20*	17.2 $\pm$ 0.70**

Hepatocytes were incubated for one hour in Krebs-Ringer Bicarbonate pH 7.4, without calcium except where indicated. The medium was supplemented with 3 mM ornithine, 10 mM glucose and 5 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. n = 5, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < .001$ .

mediates the stimulation of glycogenolysis by adenosine (5,8) indicate that  $Ca^{2+}$  and not cAMP, may be the mediator of certain metabolic responses to adenosine in hepatocytes.

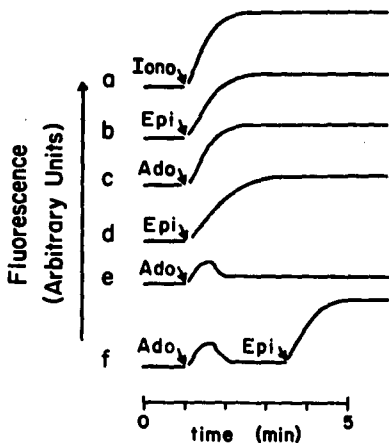


FIG. 1

Effects of Adenosine and Epinephrine on the Fluorescence of Quin2 Loaded Hepatocytes.

Quin2 loaded hepatocytes (25 to 30 mg ww) were incubated in 2.5 ml of Krebs-Ringer bicarbonate. Added  $Ca^{2+}$  was either 1.2 mM (tracings a, b and c) or 0 (tracings d, e and f). Where indicated, 10  $\mu$ M ionomycin, 4  $\mu$ M adenosine, 4  $\mu$ M epinephrine. The experiment is representative of three different experiments performed in different days where essentially the same results were obtained.

The effects of adenosine on free cytoplasmic calcium ( $Ca_f$ ) were explored measuring  $Ca^{2+}$  in quin2 loaded hepatocytes (Fig. 1). In this figure, 4  $\mu M$  adenosine was used, although we obtained essentially the same results at concentrations of adenosine from 0.1 to 10  $\mu M$  (results not shown). Basal  $Ca_f$  was from 160 to 200 nM. The addition of ionomycin led to the highest  $Ca_f$  concentration and was taken as PMAX (12). This increase was obtained regardless of whether the external medium was supplemented with 1.2 mM calcium chloride (Fig. 1, a) or not (results not shown). In the presence of  $Ca^{2+}$ , cells responded to epinephrine (Fig. 1, b) and to adenosine (Fig. 1, c) in a similar manner, i.e.  $Ca_f$  increased to 0.8 to 1.2  $\mu M$ . In the absence of  $Ca^{2+}$  (Fig. 1, d to f) the response to epinephrine was not modified (Fig. 1, d). In contrast, when adenosine was added in the absence of  $Ca^{2+}$  only a small and transient increase in  $Ca_f$  was observed; to a concentration of 240 nM or less (Fig. 1, e). The last tracing shows that in the same cells where adenosine could elicit only a small and transient  $Ca_f$  increase, epinephrine generated a response similar to that seen in the presence of  $Ca^{2+}$  (Fig. 1, f).

The results with quin-2 suggested that adenosine could mediate an increase in free cytoplasmic  $Ca^{2+}$  only if external  $Ca^{2+}$  was available. This

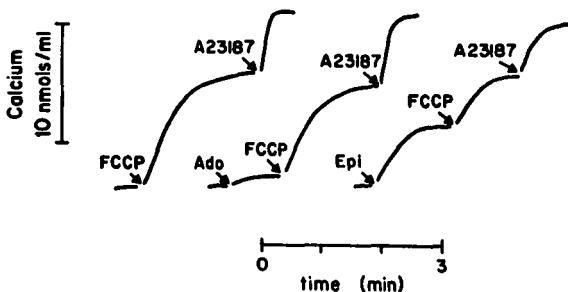


FIG. 2.

Effects of Adenosine and Epinephrine on the Endogenous Calcium Pools of Isolated Hepatocytes.

Hepatocytes (8 to 10 mg ww/ml) were incubated at 37°C in 3 ml of chelex treated Krebs-Ringer bicarbonate medium in the presence of 50  $\mu M$  arsenazo III under continuous aeration with 95% oxygen/5% carbon dioxide and constant agitation for four minutes. Then the sample was transferred to a DW-2 Aminco spectrophotometer equipped with a magnetic stirrer and a thermostated water bath (37°C). Absorbance was read in the dual mode at 675-685 nm. Additions were: Ado: 4  $\mu M$  adenosine, Epi: 4  $\mu M$  epinephrine, FCCP: 6  $\mu M$  carbonyl cyanide p-trifluoromethoxy-phenylhydrazone, A23187: 1  $\mu M$  A23187.

led us to determine whether adenosine could extract  $\text{Ca}^{2+}$  from the internal  $\text{Ca}^{2+}$  pools of the liver cell (11) (Fig. 2). The total content of  $\text{Ca}^{2+}$  in hepatocytes was determined by the sequential addition of an uncoupler (FCCP) and a  $\text{Ca}^{2+}$  ionophore (A23187) (Fig. 2) and estimated to be 1.5 to 1.8 nmoles of  $\text{Ca}^{2+}$ /mg ww of cells (11). This was slightly higher than reported before (14). The addition of 4  $\mu\text{M}$  adenosine prior to FCCP resulted in an almost negligible efflux of  $\text{Ca}^{2+}$ . Epinephrine (4  $\mu\text{M}$ ) led to the efflux of about one third of cell  $\text{Ca}^{2+}$ , apparently from both the FCCP sensitive and the FCCP insensitive pools (Fig. 2) (11).

Adenosine increased the  $\text{Ca}^{2+}$  flux from the medium into the cytoplasm (Fig. 1). In contrast, no release of  $\text{Ca}^{2+}$  from the internal stores into the cytoplasm (Fig. 1) or into the external medium was detected (Fig. 2). In addition, when no external  $\text{Ca}^{2+}$  was present, adenosine was not capable of mediating an increase in the rate of ureagenesis by the hepatocyte (Table II). This evidence, together with the lack of adenosine mediated increases in cAMP (Table I) suggests that  $\text{Ca}^{2+}$  and not cAMP may be a second messenger for the adenosine response of some metabolic pathways of the hepatocytes.

#### Acknowledgements.

Supported in part by a grant from the DGAPA/UNAM, project IN-20-104-89. The authors thank Norma Silvia Sánchez for her technical assistance.

#### References

1. J. N. FAIN, and R. E. SHEPHERD, *J. Biol. Chem.* **252** 8066-8070 (1977).
2. J. C. MARCHAND, A. LAVONIE, M. GIROZ and F. MATRAY, *Biochimie* **61** 1273-1282 (1979).
3. R. BARTONS, E. VAN SCHAFTINGEN and H. G. HERS, *Biochem. J.* **218** 157-163 (1984).
4. L. J. HOFFER and J. M. LOWENSTEIN, *Biochem. Pharmacol.* **35** 4529-4536 (1986).
5. A. CARABAZA, M. D. RICART, A. MOR, J. J. GUINOVAR AND C. J. CIUDAD, *J. Biol. Chem.* **265** 2724-2732 (1990).
6. P. R. GUINZBERG, I. LAGUNA, A. ZENTELLA, R. GUZMAN and E. PIRA, *J. Biochem.* **245** 371-374 (1987).
7. M. ZENTELLA de PIRA, A. DIAZ-CRUZ, P. R. GUINZBERG and E. PIRA, *Life Sci.* **45** 2269-2274 (1989).
8. D. B. BUXTON, S. M. ROBERTSON and M. S. OSLOM, *Biochem. J.* **237** 773-780 (1986).
9. H. M. BERRY and D. S. FRIEND, *J. Cell. Biol.* **43** 506-520 (1969).
10. I. GUTMAN and H. U. BERGMAYER, in *Methods of Enzymatic Analysis*, Bergmeyer, H. U., ed., Vol. 4 1791-1794, Academic Press, New York and London (1974).
11. R. CHAREST, P. F. BLACKMORE, B. BERTHON and J. H. EXTON, *J. Biol. Chem.* **258** 8769-8773 (1983).
12. J. M. STADDON and R. G. HANSFORD, *Biochem. J.* **238** 737-743 (1986).
13. R. Y. TSIEN, T. POZZAN and T. J. RINK, *J. Cell Biol.* **94** 325-334 (1982).
14. S. UNIBE, R. VILLALOBOS-MOLINA and T. M. DEVLIN, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **143** 1024-1029 (1987).