



0038  
UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MEXICO

14  
29

FACULTAD DE CIENCIAS  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

PARTICIPACION DEL CALCIO EN LAS ACCIONES  
METABOLICAS DE LA ADENOSINA EN HEPATOCITOS  
AISLADOS DE RATA.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

( B I O L O G I A )

P R E S E N T A

RAQUEL GUINZBERG PERRUSQUIA



DIRECTOR DE TESIS:  
DR. ENRIQUE PIÑA GARZA

1998

263604



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 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.

PAGINACION

DISCONTINUA

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**PARTICIPACION DEL CALCIO EN LAS ACCIONES METABOLICAS  
DE LA ADENOSINA EN HEPATOCITOS AISLADOS DE RATA.**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS  
(BIOLOGIA)**

**P R E S E N T A  
RAQUEL GUINZBERG PERRUSQUIA**

**MEXICO, D.F.**

**1998**

## RECONOCIMIENTO ESPECIAL

Al Dr. Salvador Uribe C. quien participó como coasesor en la dirección de esta tesis y coautor de algunos de los artículos aquí presentados.

## **DEDICATORIA**

Esta tesis, la dedico a quien debo la vida, que con amor me alentó para la consecución de cada una de mis metas, por la confianza que depositó en mí, quien me proporcionó siempre el sustento espiritual y económico, que ha hecho de mi vida algo realmente importante y que jamás olvidare: al *Sr. Jesús Guinzberg Chiyic*, mi padre, amigo y hermano.

*Memorias personales*

*Insatisfecho por la información que la morfología celular podía proporcionarme acerca de la vida, recurrí a la fisiología, al encontrar compleja la fisiología, me dirigí a la farmacología. Encontré la situación también complicada y acudí a la bacteriología, pero las bacterias fueron igual de complejas.*

*Descendí a nivel molecular, estude la química y la fisicoquímica. Después de veinte años de trabajo ,llegué a la conclusión de que para entender la vida necesitamos descender a nivel electrónico y al mundo de las ondas mecánicas.*

*Pero los electrones son solo electrones y no tienen vida del todo. Evidentemente, en esta ruta perdí la pista de la vida, se me había escapado entre los dedos.*

*Stant-Györgi*

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina.

Quiero expresar mi agradecimiento a todas las personas que han influido positivamente en mi formación académica y en el largo desarrollo de este trabajo .

No quisiera dejar de hacer manifiesto mi agradecimiento a: el *Dr. Enrique Piña*, por haber aceptado y llevado a cabo la dirección de esta tesis , por todo el apoyo, libertad, confianza y paciencia que me ha tenido durante el desarrollo de mis estudios de doctorado; al *Dr. Salvador Uribe* por su continuo interés sobre el desarrollo de este trabajo. Al *Dr. Alejandro Zentella* y a el *Dr. Arturo Hernández* por sus consejos. Y por último quisiera mencionar muy especialmente a: el *M en C Antonio Díaz Cruz* (mi esposo) por su apoyo, comprensión y ayuda durante nuestros estudios y a lo largo de este casi interminable trabajo.

A mis hijos:

*Disraeli y Abraham*

A mi madre:

*Luz María*

A los miembros del jurado y comité tutorial, por su paciencia y sugerencias en la revisión de la tesis.

¡GRACIAS POR SU APOYO!



# INDICE

---

<b>1.0 Resumen</b>	<b>página</b>
--------------------	---------------

---

1.1 Versión en español	8
1.2 Versión en inglés	10

---

## **2.0 Introducción**

---

2.1 Antecedentes	12
2.2 Receptores	13
2.3 Adenosina y metabolismo hepático	17
2.4 Flujo de calcio a través de las membranas	18

---

<b>3.0 Nota aclaratoria</b>	<b>25</b>
-----------------------------	-----------

---

## **4.0 Objetivos**

---

4.1 Objetivo general	26
4.2 Objetivos específicos	26

---

---

<b>5.0 Hipótesis</b>	<b>26</b>
----------------------	-----------

---

## **6.0 Resultados**

---

6.1 Efecto ureogénico y gluconeogénico de la adenosina.	27
6.2 Efecto de la adenosina y la inosina en la gluconeogénesis.	28
6.3 Participación del calcio sobre el efecto ureogénico de la adenosina	29
6.4 El calcio como segundo mensajero en la regulación de la ureogénesis promovida por la adenosina	31
6.5 Presencia de tres receptores de adenosina en hígado.	32

---

<b>7.0 Discusión</b>	<b>35</b>
----------------------	-----------

---

<b>8.0 Resultados colaterales</b>
-----------------------------------

---

8.1 Efecto de la dieta sobre la acción ureogénica y gluconeogénica de la adenosina.	38
8.2 La importancia de la fuente de energía en la ureogénesis	39

<b>8.0 Conclusiones</b>	<b>40</b>
-------------------------	-----------

---

<b>9.0 Perspectivas</b>	<b>41</b>
-------------------------	-----------

---

<b>10.0 Bibliografía</b>	<b>42</b>
--------------------------	-----------

---

<b>11.0 Apendice</b>	<b>52</b>
----------------------	-----------

---

## 1.0 RESUMEN

### 1.1 Resumen

En hepatocitos aislados de hígado de rata se estudió el efecto de la adenosina y la inosina a concentraciones micromolares, sobre regulación de la ureogénesis y la gluconeogénesis. Para la adenosina se estudió, además, el posible segundo mensajero de sus acciones hepáticas (calcio y/o AMPc). La adenosina y algunos de sus análogos (PIA, NECA,CCPA, CGS21680 y APNEA) estimulan la ureogénesis y la gluconeogénesis en hepatocitos aislados de rata. El efecto ureogénico de los nucleósidos, y también de las hormonas glucagon y epinefrina, es modulado por el sustrato energético (glucosa, lactato + oleato, alanina) con el que se incuban los hepatocitos y por el contenido de proteína dietética.

La incubación simultánea de hepatocitos con glucagon y adenosina produce una inhibición mutua de los efectos estimulantes en la ureogénesis y gluconeogénesis, observable con cada una de las dos moléculas. La adenosina en concentraciones de  $1\mu\text{M}$ , o menores, no eleva la poza de AMPcíclico en hepatocitos aislados; en el mismo sistema y a concentraciones similares la adenosina bloquea la estimulación en la síntesis de AMPcíclico producida por el glucagon. Estos datos sugieren que el AMPc no es el segundo mensajero en cuando menos, alguna de las respuestas metabólicas promovidas por la adenosina. Los datos siguientes señalan al calcio como posible segundo mensajero de la adenosina sobre la síntesis de urea: la ureogénesis estimulada por el nucleósido no es observable en un medio de incubación sin calcio. Concentraciones de 0.1 a  $10\mu\text{M}$  activan la incorporación inmediata de calcio extracelular al citosol de los hepatocitos.

Por otro lado, cuando los hepatocitos son incubados con diferentes concentraciones de potasio (40 mM a 120 mM) en el medio, el potasio ejerce un efecto despolarizante en la

membrana plasmática dependiendo de la dosis, lo que ocasiona un bloqueo en el influjo de calcio mediado por la adenosina, además de bloquear el incremento en la síntesis de urea promovida por el nucleósido. Estos datos sugieren que la estimulación de la síntesis de urea promovida por la adenosina depende de la entrada del calcio externo y cuyo flujo se realiza a través de un canal dependiente de receptor. La utilización de agonistas y antagonistas de los receptores para adenosina dio un panorama mas amplio acerca de los receptores de adenosina que participan en la estimulación de la ureogénesis. De aquí la propuesta de la existencia de tres tipos de receptores de adenosina en hepatocitos, y la importancia que tiene el calcio para modular la respuesta ureogénica. El análogo de adenosina  $A_1$  (CCPA) dependió parcialmente del calcio para estimular la síntesis de urea, el análogo  $A_2$  (CGS21680) no depende de calcio, y el análogo  $A_3$  depende totalmente de calcio para llevar a cabo la estimulación de la síntesis de urea, de la misma forma que lo hace la adenosina. En el caso de la regulación de la ureogénesis se puede afirmar que la adenosina actúa a través de la activación del receptor  $A_3$ . Se concluye que los efectos metabólicos de la adenosina forman parte de un sistema muy fino de control metabólico cuyo mecanismo de regulación genera una respuesta a corto plazo, lo que determinará la funcionalidad del órgano. Además el comportamiento tan variado que tiene la adenosina en hígado se debe a la participación de tres tipos de receptores, lo cual explica los resultados conflictivos hallados en la literatura acerca del papel que tienen los segundos mensajeros ( $AMPc$  y/o  $Ca^{2+}$ ) en la respuesta a adenosina. Trabajo parcialmente financiado por CONACYT : 2150P-N9507.

## 1.2 Summary

Effects of adenosine and inosine micromolar concentrations upon ureagenesis and gluconeogenesis regulation, were studied in isolated rat hepatocytes. Besides, it was also studied the possible second messenger for adenosine hepatic actions.

Adenosine and some of its analogues (CCPA, CGS-21680, APNEA, PIA and NECA) stimulated ureagenesis and gluconeogenesis in rat hepatic cells. The ureagenic effect of nucleoside, as well as glucagon and epinephrine, is modulated by the energetic substrate (glucose, lactate, oleate, alanine) in which hepatocytes are incubated and in the whole organism by the dietetic protein content.

The simultaneous incubation of hepatocytes with glucagon and adenosine produced a mutual inhibition of the stimulant effects over ureagenesis and gluconeogenesis observable upon incubation with each molecule alone. Adenosine at  $1\mu\text{M}$  or lower concentration, does not increase the cyclic AMP pool in isolated hepatocytes. In the same system and at similar concentrations adenosine blocks the stimulation of cAMP synthesis promoted by glucagon; these data suggest that cAMP is not the second messenger, in at least, one of the metabolic responses promoted by adenosine.

The following results points to the possibility the calcium can act as a second messenger of adenosine action over urea synthesis, moreover, ureagenesis stimulated by the nucleoside is not observable in a calcium free incubation media. Adenosine concentrations ranging on 0.1 to 10  $\mu\text{M}$  activated the immediate incorporation of extracellular calcium into hepatocytes cytosol.

On the other hand, when hepatocytes are incubated in media with different potassium concentrations (40 mM to 120 mM), a plasmatic membrane dose dependent depolarizative effect,

as well as ureagenesis increase are promoted. These data suggest that urea synthesis stimulation promoted by adenosine, depends upon incorporation of external calcium, flux that occurs through a receptor dependent channel. Utilization of adenosine receptor agonist and antagonist gave an amplified view over adenosine receptors which participate in ureagenesis stimulation. Hence the proposal of three kinds of adenosine receptor existence in hepatocytes, and the calcium relevance in modulating ureagenic response. A<sub>1</sub> adenosine analogs (CCPA) partially depend on calcium to stimulate urea synthesis, A<sub>2</sub> analogs (CGS21680) does not depend on calcium and A<sub>3</sub> analogs as well as adenosine totally depend on calcium to accomplish the urea synthesis. Therefore, it can be asserted that, in ureagenesis regulation, adenosine acts through the activation of an A<sub>3</sub> receptor.

It is concluded that metabolic effects of adenosine take part of a precise metabolic control, whose regulation mechanism generates a short term response, which determines the organ functionality. Moreover, the varying behavior of adenosine in the liver, may be caused for the participation of at least three types of receptors; this explains the conflictive results found in literature about the role of second messengers (cAMP and / or Ca<sup>2+</sup>) in adenosine responses. Partially supported by Grant No. 2150P-N9507 from CONACYT.

## 2.0 INTRODUCCION

### 2.1 Antecedentes

En 1929 los investigadores Drury y Szent Gyorgyi (20) dan a conocer el nombre de una molécula obtenida de extractos de músculo cardiaco, cerebro, riñón y bazo, la cual ejerce efectos pronunciados sobre la función cardiovascular, dicha molécula es la **adenosina**. A partir de estas observaciones, diferentes grupos de investigación se dedicaron al estudio de las acciones fisiológicas de la adenosina (17,19,21,27,44). Los trabajos efectuados permitieron demostrar que la adenosina no sólo participa en la regulación metabólica del flujo coronario (5,80) sino que también interviene en la regulación de la función biológica de otros órganos, incluyendo el cerebro (6,24), el músculo esquelético (18,41) y el riñón (60). Se sabe que la adenosina, cuya estructura contiene adenina y ribosa, unidas por un enlace  $\beta$ -N glucosídico, forma parte estructural del ATP, así como de los ácidos nucleicos, la coenzima A y de los nucleótidos NAD y FAD, todas ellas moléculas fundamentales en el metabolismo celular. El mecanismo de su síntesis y degradación es complejo. En la mayoría de las especies y órganos estudiados, la enzima 5-nucleotidasa es responsable de la degradación del ATP liberado al espacio extracelular, para la producción de adenosina (62); una fracción de esta enzima se encuentra también en citosol y lisosomas (11,47). En el plasma humano, la vida media de la adenosina a concentraciones fisiológicas, de 80 nmolar a 1 micromolar, es de 0.6 a 1.5 segundos; sin embargo, existen diferencias considerables entre especies (56).

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 del riñón (70,73). Tenemos así que la mayoría de órganos y sistemas corporales son parcialmente regulados por la liberación local de adenosina.

## 2.2 Receptores

En 1970, Sattin y Rall reportan que la adenosina estimula la acumulación de AMP cíclico (AMPC) en rebanadas de cerebro y que este efecto es bloqueado por la teofilina (71). A partir de estos datos y con los trabajos de Van Claker *et al.* (78) y Londos *et al.* (46), se establece que la mayoría de los efectos de la adenosina extracelular son mediados por receptores localizados sobre la superficie externa de la membrana celular, los cuales se encuentran acoplados al sistema de la adenilato ciclasa, estos receptores fueron denominados  $A_1$  y  $A_2$ . La descripción temprana del mecanismo de acción de estos receptores, menciona que el receptor  $A_1$  inhibe la actividad de la adenilato cilcasa a través de una proteína que requiere la presencia de GTP, identificada como  $G_i$ , mientras que el receptor  $A_2$  estimula la actividad de la enzima, efecto mediado por otra proteína de la familia G, identificada como  $G_s$  (Fig.1). Además de los receptores de membrana para la adenosina, existe otro componente proteico, acoplado a la enzima adenilato ciclasa y sensible al nucleósido, llamado sitio P, localizado en el espacio interno de la membrana. El sitio P parece ser un sitio de inhibición de la subunidad catalítica de la propia enzima, el cual media los efectos inhibitorios de elevadas concentraciones de adenosina; este sitio P, puede ser el blanco fisiológico para el 3'-AMP y 2'-desoxi-3-AMP (3). Algunos de los primeros reportes sobre la presencia de los receptores  $A_1$ ,  $A_2$  o ambos, así como sus efectos fisiológicos, se presentan en el Cuadro 1.



R-PIA&gt;NECA&gt;s-PIA

NECA&gt;R-PIA&gt;s-PIA

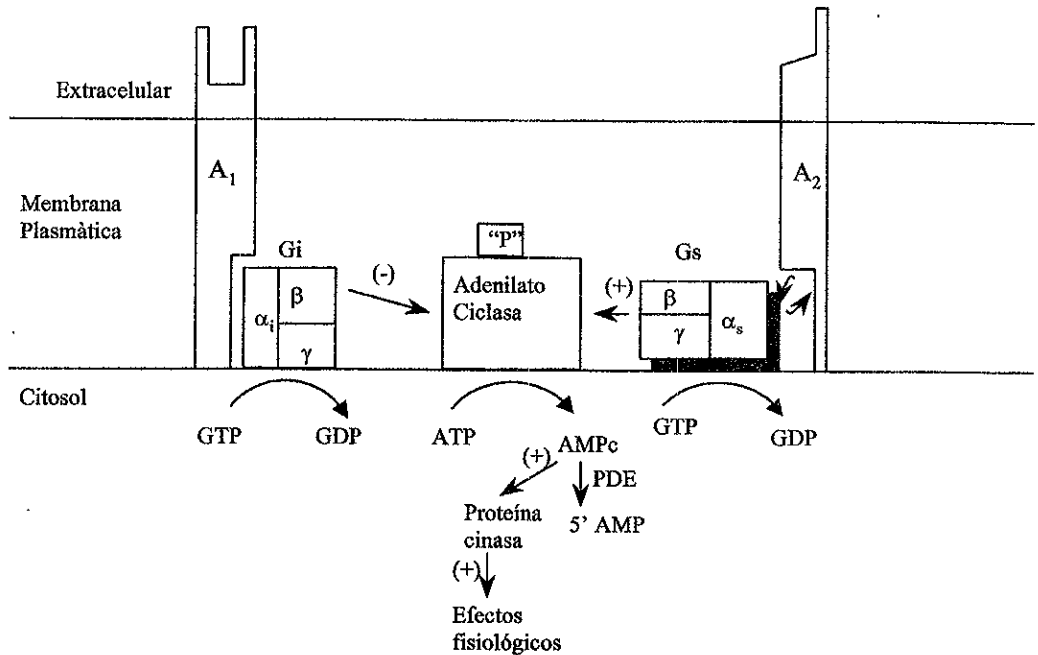


Fig. 1. Representación esquemática de los componentes del sistema de la adenilato ciclasa de los receptores  $A_1$  y  $A_2$  de la adenosina. En la parte superior se muestran los agonistas de la adenosina en orden de acuerdo a su afinidad. El receptor  $A_1$  se acopla a un nucleótido de guanina a través de una proteína  $G_i$  la cual esta compuesta de un complejo de tres subunidades ( $\alpha_i$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ), este complejo inhibe la actividad de la enzima adenilato ciclasa. El receptor  $A_2$  está asociado con una proteína  $G_s$  compuesta por tres monómeros ( $\alpha_s$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ), a través del cual se activa la enzima adenilato ciclasa. El sitio "P" es un sitio catalítico, inhibe la actividad de la enzima adenilato ciclasa. Abreviaciones: R-PIA, R-fenilisopropil-adenosina; S-PIA, S-fenilisopropil-adenosina y NECA, N-etilcarboxiamido-adenosina; GDP, guanósino difosfato; GTP, guanósino trifosfato; ATP, adenósino trifosfato; AMPc, adenósino monofosfato cíclico; 5' AMP, 5'-adenósino monofosfato; PDE, fosfodiesterasa. Fuente Stiles G.L. (73).

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

<b>TEJIDO</b>	<b>RECEPTOR</b>	<b>EFECTO FISIOLÓGICO</b>
Adiposo	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 glucogenolisis
Glándula endócrina	A <sub>2</sub>	Estimulación de síntesis o liberación de hormonas
Riñón	A <sub>2</sub>	Vasoconstricción
Tejido nervioso	A <sub>1</sub>	Inhibición de la liberación de neurotransmisores

Fuente: Daly, J. W.: Adenosine Receptors: Structure, Activity Relationships. (13).

Datos recientes en la literatura indican la posible participación de más tipos de receptores, entre los cuales se han identificado al A<sub>3</sub> y al A<sub>4</sub> (25,57,79). De los cuatro tipos de receptores para la adenosina, los tipos A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub> han sido clasificados en subtipos: A<sub>1A</sub>, A<sub>1B</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> (44,51). Este tipo de receptores de membrana pertenecen a la familia 7 TM, lo que significa que poseen siete dominios transmembranales (25, 59,79). Con respecto a los receptores, estos se

pueden clasificar de acuerdo a la topología que presentan en la membrana y por los mecanismos moleculares que emplean para transducir las señales hormonales, con base a su mecanismo de acción. Son tres las categorías que se proponen: a) receptores carentes de actividad enzimática, acoplados a proteínas G; b) receptores con funciones catalíticas intrínsecas, ya sea de tiroxina, serina o treonina cinasas, de fosfotirosina fosfatasa, o de guanilato ciclasa, que pueden estar o no acoplados a proteínas G; y c) receptores que operan canales iónicos, a través de la presencia o ausencia de proteínas G. En general los receptores de superficie celular que se conocen hasta ahora, se acompañan de proteínas G, las cuales constituyen una familia altamente conservada, compuesta de tres subunidades polipeptídicas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ . La subunidad polipeptídica  $\alpha$  de estas proteínas, ha sido usada para su clasificación, considerando el grado de homología de su secuencia primaria, se conocen en la actualidad 23 subunidades  $\alpha$  codificadas por 17 genes, situación que originó su división en cuatro familias:  $G_s$ ,  $G_{i/o}$ ,  $G_q$  y  $G_{12}$  dentro de estas, la más abundante es la  $G_{i/o}$  (26,73), así mismo se ha descrito la presencia de cinco tipos de subunidades  $\beta$  y diez subunidades  $\gamma$ . Las proteínas G actúan modulando la afinidad del agonista por su receptor, acoplándose a una enzima transmembranal encargada de producir segundos mensajeros, ejemplo de este proceso es la enzima adenilato ciclasa, de la cual, a la fecha se han identificado nueve tipos en mamíferos (I - IX); en hígado de mamífero se reportan seis tipos y en el cerebro los nueve tipos de adenilato ciclasa (39,75). Las subunidades  $\alpha$  de la proteína  $G_i$  son las responsables de inhibir la actividad de la adenilato ciclasa en cambio las subunidades  $\alpha$  de la proteína  $G_s$  producen activación de la actividad de la adenilato ciclasa.

A partir de la identificación de los receptores para adenosina, se sabe que el receptor  $A_1$  (328 aa), localizado en cerebro (cerebelo, tálamo, hipocampo), médula espinal, adipocito, testículo, corazón y riñón (58,59), inhibe la actividad de la adenilato ciclasa a través de su

interacción con la proteína  $G_{i/o}$ ; en células CHO transfectadas con el receptor humano la activación de este receptor induce un incremento en la concentración del calcio intracelular (37) y en miocitos arteriales estimula la activación de canales de  $K^+$  (3,4). Del receptor  $A_2$ , se han descrito dos subtipos, el  $A_{2A}$  y el  $A_{2B}$ . Del subtipo  $A_{2A}$  se reporta su existencia en cerebro, corazón, riñón, pulmón, plaquetas e hígado (23,58,59) y está relacionado con la estimulación de la actividad de la adenilato ciclasa, por medio de la proteína  $G_s$ , se menciona además, que este receptor está relacionado con la conductancia del  $K^+$  en células cardiacas (4,46,78).

Los datos reportados en la literatura parecen indicar que la adenosina utiliza un mecanismo de transducción específico de órgano, tejido o sistema y de proceso metabólico estimulado, ya que este nucleósido inhibe el recambio de fosfoinosítidos (44,45), además de disminuir los niveles de AMPc por un mecanismo alterno, al estimular fosfodiesterasas que se encuentran unidas a la membrana plasmática (47,67,79).

### **2.3 Adenosina y metabolismo hepático**

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 las acciones de la adenosina en células hepáticas. A continuación se mencionan una serie de datos obtenidos en hepatocitos aislados de rata, incubados en presencia de adenosina.

Marchand *et al.* (52) y Bartrons *et al.* (2) reportan un incremento en la concentración de AMPc a concentraciones de 1 mM ó de 25 a 250  $\mu$ M de adenosina respectivamente. Por otro lado Fain *et al.* (22), reportan una disminución en los niveles de AMPc a concentraciones de 200  $\mu$ M de adenosina. Por su parte Lowenstein *et al.* (47), observan un aumento en los niveles de AMPc con 100  $\mu$ M de adenosina y Carabaza *et al.* (8), reportan una 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 100  $\mu\text{M}$  del nucleósido. Por otro lado, existen también discrepancias sobre los efectos metabólicos de la adenosina en estas células, tal es el caso de Fain, quien no encuentra efecto de la adenosina sobre el metabolismo del glucógeno a concentraciones de 10 a 200  $\mu\text{M}$  (22). Bartrons, reporta una activación de la fosforilasa con 100  $\mu\text{M}$  de adenosina (2). Lund *et al.* (49), mencionan una inhibición de la gluconeogénesis a partir de lactato, a la concentración de 0.5 mM de adenosina. Guinzberg *et al.* (27), reportan un efecto ureogénico de la adenosina a concentraciones de 0.1 a 100  $\mu\text{M}$  y Zentella *et al.* (82), reportan un efecto gluconeogénico a concentraciones de 1 nM a 100  $\mu\text{M}$  de adenosina. Díaz *et al.* (16), mencionan que la adenosina adicionada a la concentración de 1  $\mu\text{M}$  en hepatocitos aislados de rata no incrementa los niveles basales de AMPc y en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  en el medio extracelular y en presencia de EGTA, se inhibe el efecto ureogénico de la adenosina. Por otro lado, también se reporta que en presencia de 1.2 mM de  $\text{Ca}^{2+}$ , la adenosina a concentraciones micromolares, incrementó los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico, con lo que concluyó que el nucleósido de adenina promueve el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  del espacio extracelular al citosol. De tal manera, el calcio pudiera ser el responsable del efecto ureogénico de la adenosina (16). Por lo relevante del dato para los objetivos de este trabajo, se hará una breve descripción de algunos mecanismos propuestos sobre el movimiento de calcio del espacio extracelular hacia el citosol.

#### **2.4 Flujo de calcio a través de las membranas**

La importancia que tiene el calcio sobre el metabolismo celular, radica en el papel que juega en muchos aspectos del señalamiento celular. Dicho catión está implicado en el proceso de

estimulación y secreción en neuronas, células endócrinas y exócrinas y también en células del sistema inmune (35), en la función de los osteoclastos (81), en la regulación de la actividad de la adenilato ciclasa (12), en el proceso de fototransducción en fotoreceptores de *Drosophila* (32,72), en la activación de la mitogénesis en linfocitos (7) y fibroblastos (43), etc. Estos efectos involucran de manera general un movimiento de calcio a través de la membrana plasmática, y dicho flujo de calcio está controlado por uno o varios mecanismos. Uno de los modelos que trata de explicar el control del movimiento de este catión, es el mecanismo Capacitativo de entrada de calcio, sugerido originalmente por Jim Putney (64), cuyo principio básico es que la entrada de calcio está regulada por el estado de llenado o vaciamiento de las pozas intracelulares de calcio. La entrada capacitativa de calcio puede ser estimulada por una gran variedad de agonistas o agentes farmacológicos que tengan en común la propiedad de liberar calcio de las pozas, por ejemplo, el inositol 1,4,5-trifosfato ( $IP_3$ ) (34,54,63), ionomicina (4,34,55), tapsigargina (7,50,63,70) o por el simple hecho de incubar las células en un medio libre de calcio (34,63,71). El mecanismo capacitativo de entrada de calcio, supone que el paso de este catión por la membrana se realiza a través de un canal, para el cual Hoth y Penner (34) acuñaron el término CRAC (Calcium Release-Activated Calcium) con la finalidad de distinguirlo de otros canales de entrada de calcio. Este canal es boqueado por cationes divalentes y trivalentes con la siguiente secuencia de eficacia:  $La^{3+} > Zn^{2+} > Cd^{2+} > Be^{2+} = Co^{2+} = Mn^{2+} > Ni^{2+} > Sr^{2+} > Ba^{2+}$  (7). Una de las propiedades más importantes de la entrada capacitativa de  $Ca^{2+}$  es su sensibilidad al calcio, ya que el calcio por sí mismo puede activar o inhibir el flujo vía el canal CRAC (7,33,34,35,48,54,63,66,83,84). Con relación al mecanismo capacitativo, varios modelos han sido propuestos para explicar el acoplamiento entre el contenido de calcio de las pozas intracelulares y la regulación del canal de calcio de la membrana plasmática. Uno de estos

modelos considera que cuando el retículo endoplásmico es vaciado de su calcio, libera un factor, el cual difunde a la membrana plasmática y estimula la apertura del canal CRAC (14,61,66). Este factor ha sido denominado CIF (Calcium Influx Factor), compuesto fosforilado de bajo peso molecular que se almacena en el retículo endoplásmico y que es liberado cuando hay una depleción de calcio de la poza (65,66).

Otro modelo para explicar la entrada de calcio a las células es el designado como Acoplamiento Conformacional, el cual involucra la participación del receptor  $IP_3$ . La propuesta es que las señales que regulan la entrada de calcio capacitativamente, son integradas por este receptor, y éste transmite la información directamente al canal CRAC a través de una interacción proteína-proteína (7). Los receptores de  $IP_3$  localizados en la membrana del retículo endoplásmico al ser activados, pueden tener dos funciones igualmente distintas; a) liberar calcio del retículo endoplásmico hacia el citosol, o b) interactuar posiblemente con algún tipo de las proteínas G, para transmitir la información a la superficie del canal, (7,38,40).

Rink T.J. (68), comenta que la célula ha desarrollado diversos mecanismos de movimiento de calcio, de los cuales hay tres clases principales; a) vaciamiento de calcio de las pozas internas; b) canales de calcio dependientes de voltaje y c) procesos mediados por receptor. Este último punto en particular, explora la entrada de calcio a partir del medio externo y Rink lo denomina específicamente RMCE (Receptor Mediated Calcium Entry), en donde la entrada de calcio es consecuente a la activación de un receptor y no depende del proceso de despolarización que genera biológicamente un incremento significativo en la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular. La propuesta para la RMCE es que puede ocurrir a través de cualquiera de los siguientes mecanismos; 1° por un complejo receptor/canal; 2° por un complejo terciario receptor-canal-proteína G; 3° que la activación directa del receptor podría ocurrir vía la difusión de segundos

mensajeros intracelulares y 4<sup>o</sup> que la entrada de calcio depende del llenado o vaciamiento de las pozas intracelulares de calcio, ya que la descarga de calcio de las pozas es seguida de la activación del receptor. Asimismo, menciona el autor las posibles funciones celulares en las que participa el proceso de entrada de calcio mediado por receptor, como son: el calcio localizado en los procesos de señalamiento, el calcio presente en el señalamiento de las células no excitables, la participación de la RMCE en el mantenimiento de las señales de calcio, así como del calcio que participa en el proceso de llenado o vaciamiento de las pozas.

Además de los anteriores en una revisión, sobre el movimiento de calcio en hepatocitos, se propone que la entrada de calcio en estas células es un proceso complejo denominado de manera general: Sistema de Entrada de Calcio Activado por Receptor (RACIS), y de cuyo mecanismo molecular se conoce poco. Acerca de este sistema Barritt y Hughes (1,36); mencionan que los mecanismos más probables por los cuales el calcio se mueve hacia el hepatocito son: 1) la activación de un cambio conformacional en una cadena polipeptídica, la cual constituye el sitio de unión del agonista, o bien, la activación de una subunidad polipeptídica que forma parte de la estructura del canal de calcio (canal putativo de calcio); 2) por activación de  $IP_3$ ,  $IP_4$  o algún otro mensajero intracelular; 3) por activación directa de una proteína G, posiblemente  $G_{i2}$ ,  $G_{i3}$ , que son sensibles a toxina pertusis y que existen en hepatocitos; 4) por un proceso de activación producido por el vaciamiento de las pozas intracelulares de calcio. En el mismo reporte, los autores sugieren que el RACIS es un canal catiónico con selectividad para el calcio y que el acoplamiento entre los receptores y el canal RACIS se debe a una interacción directa entre las proteínas G y los polipéptidos que forman el canal o bien por interacción del  $IP_3$  y/o  $IP_4$  con las proteínas que constituyen el canal (Fig 2).



Existe una gran cantidad de información en la literatura especializada que avala la importancia del calcio en una gran variedad de procesos enzimáticos en la célula, así como el papel que juega en la homeostasis del organismo, sin embargo, no existe la suficiente evidencia experimental que indique cual o cuales son los mecanismos moleculares que participan en el control del movimiento de calcio intracelular y a través de la membrana plasmática. Los mecanismos propuestos en la literatura: capacitativo, REMCE y RACIS, coinciden en dos puntos de igual importancia y dependientes uno del otro, que son: a) flujo transmembranal de calcio dependiente del estado de llenado o vaciamiento de las pozas y b) la participación de un receptor de membrana plasmática que controla el flujo de calcio y cuya activación depende de los niveles de calcio citosólico (Tabla 2). Aún no se sabe, el orden secuencial de estos dos eventos. Sin embargo, los reportes sobre la importancia del calcio en el control de los procesos fisiológicos va en aumento. La adenosina, nucleósido que podría ser considerado como un regulador universal fisiológico en el organismo, parece actuar en conjunto con el calcio para regular el metabolismo. En este trabajo se presentan datos experimentales en los que se demuestra la interacción adenosina-calcio y sus efectos reguladores del metabolismo, además de la posible participación de receptores específicos responsables de la interacción adenosina-calcio.

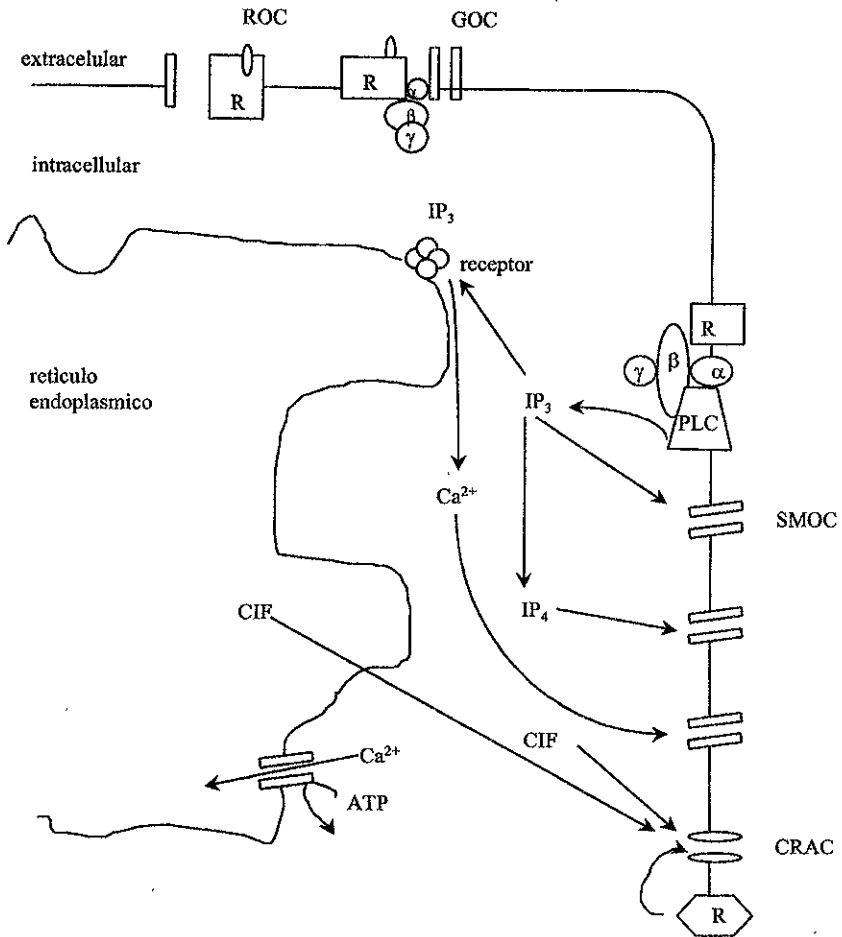


Fig. 2. Mecanismos propuestos de entrada de calcio. La entrada de calcio puede ocurrir a través de un canal operado por receptor (ROC), un canal regulado por una proteína G (GOC) un canal controlado por segundos mensajeros (SMOC) o un canal activado por la liberación de calcio (CRAC). Esta figura muestra tres tipos de SMOC; regulados por  $IP_3$ ,  $IP_4$  y calcio. El CRAC puede ser activado por el factor de entrada de calcio (CIF) o puede estar directamente acoplado a un receptor de membrana (R). Fasolato, C. et al. (23).

**Tabla 2.** Características de algunos canales que son activados por receptores o vaciamiento de las pozas.

<b>TIPO DE CANAL</b>	<b>SELECTIVIDAD A IONES</b>	<b>TIPO DE CELULA</b>
<b>Canal activado por la liberación de <math>Ca^{2+}</math></b>	$Ca^{2+} > Ba^{2+}, Sr^{2+} > Mn^{2+}$	células mastoides
		células RLB-2H3
		células T
		fibroblastos 3T3
		células HL60
		hepatocitos
		células acinares pancreáticas
		células endoteliales
		oocitos
	<b>Canal operado por segundos mensajeros</b>	$Ba^{2+}, Ca^{2+}, Mn^{2+} > Na^{+}$
$Ca^{2+}, K^{+}, Na^{+}$		neutrófilos
$Ba^{2+}, Ca^{2+}$		células T
$Ba^{2+}, K^{+}$		neuronas olfatorias
$Ba^{2+}, Ca^{2+}$		células epidermoides A431
<b>Canales operados por proteínas G</b>	$Ba^{2+}, Ca^{2+}$	células epidemoides A431
	$Ba^{2+}, Ca^{2+}, Na^{+}$	células mastoides
<b>Canales operados por receptor</b>	$Ca^{2+}, Na^{+}$	músculo liso

Fuente: Fasolato, *et al.* (23).

### **3.0 NOTA ACLARATORIA**

El autor de esta tesis considera pertinente indicar al lector que el artículo titulado:

“Ca<sup>2+</sup> dependence of the response of three adenosine type receptors in rat hepatocytes”, sustenta los objetivos del presente trabajo. Sin embargo, con la finalidad de hacer una exposición integral de los efectos metabólicos de la adenosina en células aisladas en hígado de rata, se incluyeron los datos reportados en otros trabajos, los cuales forman parte de la misma línea de investigación y grupo de trabajo al que pertenece el autor.

## **4.0 OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo general**

Investigar el efecto de la adenosina sobre el metabolismo hepático y su posible mecanismo de transducción

### **4.2 Objetivos específicos**

Explorar la participación de la adenosina en la regulación de la ureogénesis y gluconeogénesis en hepatocitos.

Explorar la participación del AMPc en las acciones metabólicas de la adenosina.

Explorar la participación del calcio sobre el efecto ureogénico de la adenosina en hepatocitos.

## **5.0 HIPOTESIS**

El efecto metabólico de la adenosina en hepatocitos aislados de rata es mediado por la presencia de un segundo mensajero (AMPc ó calcio).

## **4.0 OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo general**

Investigar el efecto de la adenosina sobre el metabolismo hepático y su posible mecanismo de transducción

### **4.2 Objetivos específicos**

Explorar la participación de la adenosina en la regulación de la ureogénesis y gluconeogénesis en hepatocitos.

Explorar la participación del AMPc en las acciones metabólicas de la adenosina.

Explorar la participación del calcio sobre el efecto ureogénico de la adenosina en hepatocitos.

## **5.0 HIPOTESIS**

El efecto metabólico de la adenosina en hepatocitos aislados de rata es mediado por la presencia de un segundo mensajero (AMPc ó calcio).

## 6.0 RESULTADOS

A continuación se hace una breve discusión de los datos reportados por nuestro grupo de investigación y que forman parte de la línea de investigación a la que pertenece el presente trabajo.

### 6.1 Efecto ureogénico de la adenosina .

Effect of adenosine and inosine on ureagenesis in hepatocytes. Guinzberg, P.R., Laguna, I., Zentella, A., Guzman, R., and Piña, E. (1987) : *Biochem. J.* **245**:371-374. (Apéndice I)

Este trabajo es el primer reporte en la literatura internacional sobre el efecto ureogénico de la adenosina a concentraciones micromolares en hepatocitos aislados de rata, así como el efecto estimulador que tiene la inosina sobre este proceso metabólico.

Los resultados indican que la ureogénesis en hígado es controlada por algunos metabolitos de purina, entre ellos la adenosina, que incrementa la velocidad de síntesis de urea de manera dosis dependiente (Apéndice I, Fig. 1). Se observa también que sólo la adenosina y la inosina estimulan la síntesis de urea. En el estímulo no interviene de manera significativa el amonio, producto de la desaminación de la adenosina, la hipoxantina, xantina y ácido úrico, como sustrato ureogénico (Apéndice I, Tabla 2); en las células incubadas con cada uno de estos catabolitos de adenosina o en presencia de amonio no se produjo un incremento en la velocidad de síntesis de urea. El amonio no participa como sustrato para la síntesis de urea y las moléculas que estimulan esta vía metabólica son la adenosina e inosina per se. Otros puntos de importancia que son observados en el presente trabajo son: 1.- la fuente de energía y de amonio que requiere el

hepatocito para la formación de urea en presencia de adenosina son glucosa y glutamina o carbonato de amonio, respectivamente (Apéndice I, Tabla 3) y 2.- el mutuo antagonismo que se presenta específicamente entre el glucagon y la adenosina, pero no con la epinefrina, sobre la síntesis de urea (Apéndice I, Tabla 4). De este último punto se originan los estudios sobre el mecanismo de transducción de la adenosina y sus efectos metabólicos en hígado.

## **6.2 Efecto gluconeogénico de la adenosina y la inosina.**

Hormone-like effect of adenosine and inosine on gluconeogenesis from lactate in isolated hepatocytes. Zentella, M. de Piña, Diaz-Cruz, A., Guinzberg, P., and Piña E. (1989) : *Life. Sci.* 45:2269-2274. (Apéndice II)

En este trabajo se exploró la posible participación de la adenosina e inosina, a concentraciones micromolares, como reguladores de otro camino metabólico; la gluconeogénesis. Se presenta una curva dosis respuesta de los hepatocitos a la adenosina y la inosina (Apéndice II, Fig. 1). Ambos nucleósidos mostraron una estimulación de la gluconeogénesis a partir de lactato en hepatocitos aislados de rata.

En otra serie de experimentos, la mezcla de glucagon o epinefrina con adenosina a concentraciones de 1  $\mu$ M respectivamente, resultó en un antagonismo mutuo sobre la acción gluconeogénica, de cada uno de los compuestos ensayados individualmente (Apéndice II, Tabla 1). Se observa también que la inosina disminuyó la estimulación de la gluconeogénesis generada por el glucagon y que no se sumaron las respuestas al incubar los hepatocitos con la mezcla epinefrina más inosina .



Por otro lado, se revisó la participación de algunos análogos de los receptores para adenosina sobre la conversión de lactato a glucosa. El 5'-(N-etil)-carboxamido-adenosina (NECA), activa el sistema de transducción de la adenilato ciclasa, al interactuar con el receptor  $A_2$ , este análogo estimuló la gluconeogénesis aún más que la propia adenosina. El N<sup>6</sup>-(L-2-fenilisopropil)-adenosina (PIA), un inhibidor del sistema de la adenilato ciclasa, con afinidad para el receptor  $A_1$  y el 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX), un inhibidor de la fosfodiesterasa, no estimularon la síntesis de glucosa (Fig. 2). Asimismo, son de interés los datos sobre la velocidad de conversión de lactato en glucosa, al incubar los hepatocitos con los nucleósidos y sus análogos, en donde a concentraciones variables de adenosina ( $10^{-7}$  a  $10^{-4}$  M) y a una concentración fija del análogo NECA ( $10^{-6}$  M), predominó el efecto del análogo sobre la velocidad de síntesis de glucosa promovida por el nucleósido natural (Apéndice II, Fig. 3). Por su parte, la mezcla adenosina ( $10^{-7}$  a  $10^{-4}$  M) y PIA ( $10^{-6}$  M), la gluconeogénesis es inhibida al compararlo con los efectos individuales de la adenosina (Apéndice II, Figs. 1 y 3) En contraste, la estimulación de la gluconeogénesis por la inosina no se alteró en presencia de NECA o PIA.

Con base en los resultados obtenidos en este trabajo, se puede concluir que la adenosina y la inosina poseen un efecto gluconeogénico, además del efecto ureogénico reportado previamente (Apéndice I). a concentraciones micromolares en el sistema de hepatocitos aislados y que en el mecanismo de transducción utilizado por la adenosina está involucrado posiblemente un receptor de membrana.

### **6.3 Participación del calcio sobre el efecto ureogénico de la adenosina.**

Metabolic responses of isolated hepatocytes to adenosine; dependence on external calcium.

Díaz, A., Guinzberg R., Uribe, S., and Píña, E. (1991) : *Life. Sci.* **49**:505-510. (Apéndice III)

En este trabajo se investigó el papel del AMPc y del  $Ca^{2+}$  sobre el efecto ureogénico de la adenosina en hepatocitos aislados de rata. Se exploró primero el efecto de la adenosina sobre la producción basal de AMPc, utilizando como indicador de la estimulación de este nucleótido cíclico al glucagon. Los resultados obtenidos se muestran en el Apéndice III, Tabla 1, en donde se observa que la adenosina no incrementa los valores basales de AMPc en comparación con el glucagon y que además la adenosina bloquea el efecto del glucagon sobre la poza del AMPc. Al no encontrar variaciones en el AMPc en respuesta a la adenosina, se investigó la posible participación del calcio en la respuesta a la adenosina. Se observó en células hepáticas aisladas e incubadas en ausencia de calcio externo y en presencia de EGTA, la adenosina a concentraciones de 1  $\mu$ M, no fue capaz de activar la síntesis de urea (Apéndice III, Tabla II). Este resultado nos indica la necesidad de la presencia de calcio para observar el efecto ureogénico de la adenosina.

La relación que se manifestó entre el calcio y la adenosina (Apéndice III, Tabla II) fue examinada mas ampliamente: Los hepatocitos cargados con Quin-2, un indicador fluorescente de calcio intracelular e incubados con 1.2 mM de calcio en el medio, mostraron un incremento en la fluorescencia al interactuar con adenosina. La adenosina promueve un aumento sobre del calcio citosólico libre (Apéndice III, Fig.1, trazo b). Trazos similares fueron obtenidos cuando los hepatocitos fueron expuestos bajo las mismas condiciones a ionomicina (ionóforo de calcio) o bien con epinefrina. En ausencia de calcio externo en el medio, no se modificó el movimiento de calcio en respuesta a la epinefrina (Apéndice III, Fig.1, trazo d) y solo hubo una respuesta pequeña y de corta duración a la adenosina (Apéndice III, Fig.1, trazo e), sin embargo, la adición de epinefrina después de esta respuesta promovida por la adenosina, produjo un efecto semejante al que registró en presencia de calcio externo (Apéndice III, Fig. 1, trazo f). Esto sugiere que la

adenosina depende de calcio externo mientras que la epinefrina puede usar pozas internas. Por último se exploró, la capacidad de la adenosina para promover la salida de calcio de las células hepáticas (Apéndice III, Fig.2). El contenido total de calcio en los hepatocitos se determinó por la adición consecutiva de un desacoplador de la fosforilación oxidativa, el FCCP, y un ionóforo de calcio, el A23187. La adenosina añadida antes de agregar el FCCP produjo una pequeña salida de calcio, aparentemente de las pozas sensibles al FCCP.

Las conclusiones que surgen de los datos presentados en este trabajo son; a) la adenosina no modifica los niveles basales de AMPc; b) el calcio participa en el efecto ureogénico de la adenosina; c) la adenosina promueve un flujo de calcio a través de la membrana plasmática del espacio extracelular hacia el citosol d) las pozas intracelulares de calcio no parecen participar en la respuesta a adenosina y e) se sugiere que es el calcio y no el AMPc el segundo mensajero en la respuesta ureogénica de la adenosina en hepatocitos aislados.

#### **6.4 El calcio como segundo mensajero en la regulación de la ureogénesis promovida por la adenosina.**

Inhibition of adenosine mediated responses in isolated hepatocytes by depolarizing concentrations of  $K^+$ . Guinzberg, R., Díaz-Cruz, A., Uribe, S., and Piña, E. (1993) : *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **197**:229-234. (Apéndice IV)

Se decidió explorar en este trabajo, los eventos que podrían estar involucrados en la regulación de la incorporación de calcio por las células hepáticas. Se inició este estudio, investigando el efecto de la concentración de  $K^+$  sobre el flujo de calcio estimulado por la

adenosina. Los resultados obtenidos son los siguientes: En presencia de una alta concentración de  $K^+$  (114 mM KCl) en el medio de incubación, no se modificaron los niveles basales de calcio citosólico, en presencia de diferentes concentraciones de adenosina ( $10^{-9}$  a  $10^{-6}$  M) (Fig. 1). En presencia de diferentes concentraciones de  $K^+$  (20 a 100 mM), se observó una disminución gradual en la incorporación de calcio generado por una concentración de  $10^{-6}$  M de adenosina. El máximo y mínimo flujo de calcio ocurrieron a las concentraciones de 20 mM y 100 mM, respectivamente (Apéndice IV, Fig. 2). En lo que se refiere al efecto ureogénico de la adenosina, se observa que un aumento en la concentración de  $K^+$  (114 mM de KCl) disminuyó la síntesis de urea, estimulada por adenosina a concentraciones de  $10^{-9}$  a  $10^{-6}$  M (Apéndice IV, Fig. 3). También se observó una disminución del efecto ureogénico de la adenosina proporcional a las diferentes concentraciones de  $K^+$  (20 a 100 mM) utilizadas, (Apéndice IV, Fig. 4).

La incorporación de calcio externo en hepatocitos incubados en presencia de adenosina, se ve bloqueada cuando se incrementa la concentración externa de  $K^+$ . En este proceso interviene la despolarización de la membrana plasmática ocasionada por un aumento en la concentración de potasio extracelular. Los datos indican la posible participación de un canal de calcio responsable del efecto que tiene la adenosina sobre este catión, y que dicho canal, aparentemente es sensible a la magnitud del potencial de membrana, por lo que se concluye que en la activación de este tipo de canal esté involucrado un receptor. Hay una correlación directa entre la magnitud del cambio de potencial y la estimulación de la ureogénesis por adenosina, lo que indica que el calcio es el segundo mensajero.

### **6.5 Presencia de tres receptores de adenosina en hígado.**

$Ca^{2+}$  dependence of the response of three adenosine type receptors in rat hepatocytes. Guinzberg, R., Díaz-Cruz, A., Uribe, S and Piña, E. (1997): Eur. J. Pharmacol. 348:243-247 (Apéndice V)

En este trabajo se investigó la posible participación de un receptor que medie los efectos de la adenosina sobre el movimiento de calcio y su relación con la síntesis de urea. Para tal fin, se utilizaron agonistas específicos para cada uno de los tres receptores propuestos para adenosina en el hígado; A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> y A<sub>3</sub>. Para el receptor A<sub>1</sub> el agonista 2-cloro-N<sup>6</sup>-ciclopentiladenosina (CCPA), para el receptor A<sub>2</sub> el agonista 2-p-(carboxietil)feniletilamino-5'-N-etilcarboxamidoadenosina (CGS21680) y para el receptor A<sub>3</sub> el agonista N<sup>6</sup>-2-4-aminofeni-etiladenosina (APNEA). Todos los agonistas en presencia de calcio (1.2 mM), promovieron una estimulación dosis dependiente sobre la síntesis de urea (Apéndice V, Figs. 1,2,3), efecto muy similar al presentado por la adenosina (Apéndice I, Fig. 1).

Con la finalidad de investigar la participación del calcio en la ureogénesis estimulada por cada uno de los receptores para adenosina, los hepatocitos fueron incubados en presencia del agonista para cada tipo de receptor y en presencia de calcio externo a una concentración de 1.2 mM CaCl<sub>2</sub>. La respuesta ureogénica fue diferente para cada uno de los agonistas; el agonista A<sub>1</sub> en ausencia de calcio disminuyó la síntesis de urea conforme aumentó la concentración del agonista, (Apéndice V, Fig. 1). Por el contrario, la ausencia de calcio para el agonista A<sub>2</sub> no modificó la ureogénesis, es decir aún sin el calcio estimuló la ureogénesis (Apéndice V, Fig. 2). Por otro lado, la ausencia de calcio externo inhibió el efecto ureogénico del agonista A<sub>3</sub> (Apéndice V, Fig. 3). Esta respuesta es similar a la que se presenta cuando los hepatocitos son incubados en presencia de adenosina y en ausencia de calcio (Apéndice III, Tabla 2). Con la finalidad de definir claramente la participación de estos tres tipos de receptor para adenosina sobre la regulación del metabolismo hepático, se utilizaron antagonistas de los receptores A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub>. Cuando se utilizó el antagonista A<sub>1</sub> 1-alil-3,7-dimetil-8-fenilxantina (ADMPX) en presencia de

cada uno de los agonistas (Apéndice V, Fig. 4 - A), únicamente el efecto del agonista  $A_1$  fue bloqueado pero no los efectos de los agonistas  $A_2$  ó  $A_3$ . El antagonista del receptor  $A_2$  3,7-dimetil-1-propargilxantina (DMPX) bloqueó el efecto ureogénico del agonista  $A_2$ , pero no los efectos de los agonistas  $A_1$  ó  $A_3$ . (Apéndice V, Fig. 4 - B). Estos antagonistas no modificaron el efecto ureogénico del agonista  $A_3$  (Apéndice V, Fig. 4, A y B). Estos datos nos sugieren la existencia de tres tipos de receptores para adenosina en los hepatocitos cuya activación individual promueve la síntesis de urea.

La necesidad del calcio externo para activar la ureogénesis con los agonistas de adenosina está en relación al tipo de receptor que sea activado (Apéndice V, Figs. 1, 2, 3). Sin embargo, los tres tipos de agonistas incrementan los niveles de calcio citosólico en presencia de calcio externo (Apéndice V, Tabla 1). El agonista  $A_3$  incrementó la concentración de calcio citoplasmático al igual que la adenosina. Al revisar la participación de los antagonistas de los receptores  $A_1$  y  $A_2$  sobre la concentración de calcio libre intracelular se observó que el ADMPX bloqueó el incremento de este cation estimulado por el agonista  $A_1$  y el DMPX inhibió el incremento del calcio libre citosólico promovido por el agonista  $A_2$ , sin embargo, la combinación de cada uno de estos antagonistas con el agonista del receptor  $A_3$  (APNEA), no modifico los niveles de calcio citosólico.

De lo anterior, llama la atención lo registrado para el agonista del receptor  $A_3$  (APNEA), el cual muestra efectos similares a los reportados para la adenosina (Apéndice III), lo que nos indica la posible participación de un receptor para adenosina, con características muy similares al del tipo  $A_3$ , responsable del efecto ureogénico y sobre el flujo de calcio, ambas acciones reportadas para la adenosina.

## 7.0 DISCUSION

Los efectos de la adenosina en el metabolismo de los hepatocitos son opuestos dependiendo de varios factores. Existe una gran paradoja en varias de las acciones de la adenosina. Concentraciones elevadas de adenosina (0.1 mM o mayores) producen, en hepatocitos aislados, una inhibición de la ureogénesis (49) y la gluconeogénesis (2,42,49,52,) y una elevación en los niveles de AMP cíclico (2,52). En contraste , concentraciones de adenosina de 1  $\mu\text{M}$  y o menores estimulan, también en hepatocitos aislados, la ureogénesis (Apéndice I, Fig. 1), la gluconeogénesis (Apéndice II, Fig. 1) y la glucogenólisis (33) y no modifican los niveles de AMP cíclico (Apéndice III, tabla 1 y 28).

Estas observaciones permiten clasificar las acciones de la adenosina en dos contextos: aquellos efectos en que hay una participación directa del nucleósido en el metabolismo (10,42,53) y aquellas en la que la adenosina presenta una acción tipo hormona (27,33,82). Las concentraciones de adenosina en el hígado son cercanas a 10  $\mu\text{M}$  (77) y en sangre las concentraciones, tanto de adenosina como de inosina, son alrededor de 1  $\mu\text{M}$  (9), por lo que se agrupan los efectos de la adenosina como farmacológicos, los observados a concentraciones mayores a 10  $\mu\text{M}$ , y los fisiológicos, detectados a concentraciones menores de 10  $\mu\text{M}$ .

Los resultados de los trabajos aquí descritos pertenecen al grupo “efectos fisiológicos de la adenosina”, en que funciona como una hormona . Es importante, entonces determinar el mecanismo de transducción de la señal generada por la adenosina en el hígado.

El metabolismo celular es regulado por una gran variedad de estímulos, los que al interactuar con los receptores de superficie generan cambios intracelulares de un grupo de moléculas conocidas como segundos mensajeros. Entre los segundos mensajeros destacan el AMPc, el  $\text{IP}_3$  y el  $\text{Ca}^{2+}$  . La adenosina regula varios procesos metabólicos en los cuales se

identifica al AMPc como segundo mensajero en cerebro (47,69,71,78), corazón (59,75,80), riñón (60), y en tejido adiposo (15,21) . Sin embargo, no existe un consenso con respecto al segundo mensajero para la adenosina en hígado.

En las células aisladas de hígado de rata, el efecto ureogénico de la adenosina se manifiesta únicamente en presencia de calcio en el medio de incubación. El proponer al calcio como segundo mensajero de la adenosina, y no al AMPc, obedece a que el nucleósido no incrementa la concentración basal del AMPc, pero si incrementa la concentración de calcio libre citosólico, efecto comprobado también por Tinton *et al.* 1996 (76).

La propuesta antes mencionada ha llevado a explorar el mecanismo molecular involucrado en el proceso de activación del flujo de calcio a través de la membrana plasmática.

Al comparar los modelos relacionados con la captación de calcio por la célula, con algunos de los datos aquí reportados resulta que:

En primer lugar, en hepatocitos incubados en ausencia de calcio extracelular, la adenosina promueve un incremento pequeño y transitorio de calcio libre en el citoplasma (Apéndice III, Fig. 1, trazo e) (16).

Esta observación coincide con la propuesta del modelo capacitativo, en donde se involucra el estado de llenado y vaciamiento de las pozas intracelulares. Este calcio libre citosólico podría ser el responsable de activar la apertura de un canal a través de proteínas G o la activación directa de una proteína constituyente del canal.

Otro dato que apoya este modelo es la salida de calcio (fig. 2) hacia el espacio extracelular en presencia de la adenosina, ya que aún cuando su concentración pueda ser mínima, no tenemos evidencia alguna de que este movimiento carezca de un significado fisiológico.



Por otro lado Tinton *et al.* en 1996 (76) reportaron que no son modificados los niveles basales de  $IP_1$ ,  $IP_2$ ,  $IP_3$  e  $IP_4$  en presencia de adenosina en hepatocitos aislados de rata, por lo que no parece haber la participación de un segundo mensajero del grupo de los fosfoinosítidos en el proceso de activación del flujo de calcio, por la adenosina.

Todos los modelos propuestos: capacitativo, RMCE, RACIS, etc., implican intervención de un receptor que activa el flujo de calcio a través de la membrana plasmática, así como en el movimiento de calcio almacenado en las pozas intracelulares. Por esto el efecto de la adenosina sobre los movimientos de calcio probablemente ocurra a través de un receptor. De los receptores propuestos para adenosina en el hígado, el que parece tener un comportamiento compatible con lo observado para la adenosina en la ureogénesis es el receptor  $A_3$  (31).

## 8.0 RESULTADOS COLATERALES

Otros trabajos publicados y relacionados al efecto metabólico de la adenosina son:

### 8.1 Efecto de la dieta sobre la acción ureogénica y gluconeogénica de la adenosina.

In vivo activation by diets and vitro activation by hormones are additive for urea synthesis in the rat liver. Guinzberg, R., Díaz-Cruz, A., and Piña, E. (1996) *Comp. Biochem. Physiol.* **115B**:369-373. (Apéndice VI)

Desde hace 20 años se sabe que el contenido y calidad de la proteína dietética induce la cantidad de las enzimas responsables de la síntesis de urea. En los experimentos aquí descritos cada dieta resultó en una cantidad de enzimas hepáticas responsables de la síntesis basal de urea. La estimulación de la ureogénesis ocasionada por las hormonas o los nucleósidos adenosina e inosina y la magnitud de la respuesta fue diferente en cada dieta (Apéndice VI, Tabla 2). Estas diferencias fueron mínimas en la gluconeogénesis (Apéndice VI, Tabla 3). Con una dieta hipoproteica, se registró una mayor estimulación de la ureogénesis por las hormonas glucagon, epinefrina y la adenosina, en comparación con la estimulación obtenida con las dietas hiperproteicas de ladrina o huevo cocido (Apéndice VI, Tabla 2). Los valores basales de gluconeogénesis fueron similares para las dietas hiperproteicas e hipoproteicas y el grado de estimulación producido por hormonas o nucleósidos mostró mínimas diferencias (Apéndice VI, Tabla 3). A pesar de lo anterior, los datos (Apéndice VI, Fig. 1) señalan una correlación entre la estimulación ureogénica y la gluconeogénica para cada una de las 4 dietas. La correlación mas alta ( $r = 0.9638$ ) se obtuvo con la dieta de huevo cocido, pero en general, cada una de las dietas las correlaciones fueron cercanas a 0.9. En suma, la dieta también es capaz de modular y

determinar la magnitud de la respuesta ureogénica y gluconeogénica a las hormonas y a los nucleósidos.

## **8.2 La importancia de la fuente de energía en la ureogénesis.**

Influencia de la fuente de energía sobre el efecto ureogénico de nucleósidos y hormonas en hepatocitos aislados de rata. Guinzberg, P. R., y Díaz-Cruz, A. (1994): *Rev. Vet. Méx.* **25**:251-254. (Apéndice VII)

Los tres sustratos oxidables empleados, glucosa, la mezcla de lactato y oleato y la alanina, modifican los niveles basales de urea formada por los hepatocitos (Apéndice VII, cuadro 2) y modulan la estimulación producida por el glucagon, la epinefrina, la adenosina y la inosina. La disponibilidad de los sustratos ureogénicos: glutamina, ornitina y amonio, se encuentran en exceso por lo que no podrían limitar la velocidad en la síntesis de urea (Apéndice VII, cuadro 1). También es de interés que los cuatro efectores empleados modulan similarmente la respuesta promovida por cada uno de los tres sustratos oxidables; así por ejemplo, la acción del glucagon es cuantitativamente mayor que la de la epinefrina, y esta a su vez es mayor que la adenosina. Sobre este punto vale la pena preguntar: en condiciones fisiológicas, la disponibilidad del sustrato oxidable en el hígado ¿modula la respuesta a las hormonas y/o a los nucleósidos? ¿cómo lo hace? Los que de manera general indican el efecto de la dieta sobre la acción ureogénica y gluconeogénica de la adenosina, así como la disponibilidad y tipo de sustrato requeridos para que se manifiesten dichos indicadores metabólicos regulados por este nucleósido.

## 9.0 CONCLUSIONES

En hepatocitos aislados de rata:

La adenosina y la inosina estimulan la ureogénesis.

La adenosina y la inosina estimulan la gluconeogénesis.

La adenosina antagoniza el efecto ureogénico y gluconeogénico del glucagon.

La adenosina estimula la entrada de calcio extracelular a través de la membrana plasmática hacia el citosol.

Se propone la existencia de tres tipos de receptores para la adenosina en hepatocitos.

## 10.0 PERSPECTIVAS

Existen dos vertientes en las perspectivas del trabajo, por un lado, la clasificación de los diferentes tipos de receptores para la adenosina, basado en la afinidad de una gran variedad de ligandos (25), de aquí la importancia del papel que juegan en la modulación de la actividad metabólica y en la funcionalidad de muchos órganos y tipos de células. Resulta de gran interés, la información que nos podría proporcionar la biología molecular para la identificación de la distribución anatómica de los receptores de adenosina en hepatocitos como una de las principales perspectivas para la continuidad de este trabajo, ya que los receptores clonados para la adenosina es pobre, en la actualidad, en hígado de rata se ha clonado únicamente el receptor  $A_2$ .

En segundo lugar, en uno de los trabajos incluidos en esta tesis, se demuestra la importancia de la inosina como regulador del metabolismo hepático. Por considerarlo de enorme importancia se sugiere investigar cual es su mecanismo de transducción responsable de la modulación del metabolismo hepático.

## 11.0 BIBLIOGRAFIA

1. Barritt, G. J., and Hughes, B. P. (1991) : The nature and mechanism of activation of the hepatocytes receptor- activated calcium inflow system. *Cell. Calcium*. **3**:283-292.
2. Bartrons, R., Van Schftingen, E., and Hers, H.G. (1984) : The ability of adenosine to decrease the concentration of fructose 2,6'bisphosphate in isolated hepatocytes. *Biochem. J.* **218**:157-163.
3. Belardinelli, L., and Isenberg, G. (1983) : Isolated arterial myocytes; adenosine and acetylcholine increase potassium conductance. *Am. J. Physiol.* **244**:H734-H737.
4. Belardinelli, L., Shyrook, J.C., and Pelleg, A. (1992) : Cardiac electrophysiologic properties of adenosine. *Coron. Artery. Dis.* **12**:1122-1126.
5. Berne, R. M. (1963) : Cardiac nucleotides in hipoxia ; a possible role in regulation of coronary blood flow. *Am. J. Physiol.* **204**:317-322.
6. Berne, R. M., Rubio, R., and Curnish, R. (1974) : Release of adenosine from ischemic brain ; effect on cerebral vascular resistance and incorporation into cerebral adenine nucleotides. *Circ. Res.* **35**:262-271.
7. Berridge, M., J. (1990) : Calcium oscillations. *J. Biol. Chem.* **265**:9583-9586.
8. Carabaza, A., Ricart, D. M., Mor, A., Guionvart, J. J., and Ciudad, J.C. (1990) : Role of cAMP on the activation of glycogen synthase and posphorylase by adenosine, fructose, and glutamine in rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* **265**:2724-2734.

9. Coade, St. B., and Pearson, J.D. (1989) : Metabolism of adenine nucleotides in human blood. *Cir. Res.* **65**:531- 537.
10. Cooper, D. M. F., Yoshimura, M., Zhang, Y., Chiona, M., and Mahey, R. (1994) : Capacitative calcium entry regulates calcium sensitive adenylate cyclase. *Biochem. J.* **297**:437-440.
11. Chagoya de Sánchez, V., Hernandez-Muñoz, R., Díaz-Muñoz, M., Villalobos, R., Glender, W., Suarez, J., and Yañez, L. (1983): Circadian variations of adenosine level in blood and liver and its possible physiological significance. *Life Sci.* **33**:1057-1064.
12. Chagoya, V., Bruner, A., and Pifia, E. (1972): In vivo modification of the energy charge in the liver cell. *Biophys. Res. Comm.* **45**:1441-14145.
13. Daly, J. W. (1985) : Adenosine receptors; In advances in cyclic nucleotide and protein phosphorylation research. Vol. 19, edited by D.M.F. Cooper and K. B. Seamon, Reven Press, New York.
14. Davies, E. V., and Hallett, M. B. (1995) : A soluble cellular factor directly stimulates calcium entry in neutrophils. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **206**:348-354.
15. De Mazancout, P., and Giudicell, Y. (1984) : Guanine nucleotides and adenosine R-site analogs stimulate the membrane-bound low Km cyclic AMP phosphodiesterase of rat adipocytes., *FEBS Lett.* **173**:385-391.
16. Díaz, A., Guinzberg R., Uribe, S., and Pifia, E. (1991) : Metabolic responses of isolated hepatocytes to adenosine; dependence on external calcium. *Life. Sci.* **49**:505-510.

17. Díaz-Cruz, A., Nava, C., Villanueva, R., Serret, M., Guinzberg, R., and Piña, E. (1996): Hepatic and cardiac oxidative stress and other metabolic changes in broilers with the ascites syndrome. *Poultry Science*. **75**:900-903.
18. Dobson, J. G., Rubio, R., and Berne, R. M. (1975) : Role of adenine nucleotides, adenosine and inorganic phosphate in the regulation of skeletal muscle blood flow. *Circ. Res.* **29**: 375-384.
19. Drury, A. N. (1936) : The physiological activity of nucleic acid and its derivatives. *Physiol. Rev.* **16**:292-325.
20. Drury, A. N. and Szent Gyorgyi, A. (1929) : The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. *J. Physiol.* **68**:213-219.
21. Elks, M. L., Jackson, M., Manganiello, V. C., and Vaughn, M. (1987) : Effect of N<sup>6</sup>-(L-2-phenylisopropyl) adenosine and insulin on cAMP metabolism in 3T3-L1 adipocytes. *Am. J. Physiol.* **252**:C343-C345.
22. Fain, N. J., and Shepherd, E. R. (1977) : Adenosine, cyclic AMP metabolism, and glycogenolysis in rat liver cells. *J. Biol. Chem.* **252**:8066-8070.
23. Fasolato, C., Innocenti, B., and Pozzan, T. (1994) : Receptor-activated calcium influx: how many mechanisms for how many channels? *Trends Pharmacol. Sci.* **15**:77-83.
24. Feldberg, W., and Serwood, S. L. (1954): Injections of drugs into lateral ventricle of the cat. *J. Physiol.* **123**:148167.
25. Fredholm, B.B., Abbracchio, G., Burnstock, J.W., Daly, T.K., Harden, K.A., Jacobson, Leff, P., and Williams, M. (1994) : Nomenclature and classification of purinoceptors. *Pharmacol. Rev.* **46**:143-156.



26. Gudermann, T., Kalkbrenner, F., and Schultz, G. (1996) :Diversity and selectivity of receptors-G protein interaction. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **36**:429-459.
27. Guinzbarg, P. R., Laguna, I., Zentella, A., Guzman, R., and Piña, E. (1987) : Effect of adenosine and inosine on ureagenesis in hepatocytes. *Biochem. J.* **245**:371-374.
28. Guinzbarg, P. R., y Díaz-Cruz, A. (1994): Influencia de la fuente de energía sobre el efecto ureogénico de nucleósidos y hormonas en hepatocitos aislados de rata. *Rev. Vet. Méx.* **25**:251-254.
29. Guinzbarg, R., Díaz-Cruz, A., and Piña, E. (1996) : In vivo activation by diets and vitro activation by hormones are additive for urea synthesis in the rat liver. *Comp. Biochem. Physiol.* **115B**:369-373.
30. Guinzbarg, R., Díaz-Cruz, A., Uribe, S., and Piña, E. (1993) : Inhibition of adenosine mediated responses in isolated hepatocytes by depolarizing concentrations of  $K^+$ . *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **197**:229-234.
31. Guinzbarg, R., Díaz-Cruz, A., Uribe, S., and Piña, E. (1997) :  $Ca^{2+}$  dependence of the response of three adenosine type receptors in rat hepatocytes. *Eur. J. Pharmacol.* **340**: 243-247.
32. Hardie, R. C. (1993): Phototransduction in the invertebrate. *Nature.* **366**:113-114.
33. Hoffer, L. J., and Lowenstein, J. M. (1986). Effect of adenosine and adenosine analogues on glucogen metabolism in isolated rat hepatocytes. *Biochem. Pharmacol.* **35**:4529-4536.
34. Hoth, M., and Penner, R. (1992) : Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells. *Nature (london).* **355**:353-356.
35. Hoth, M., and Penner, R. (1993) : Calcium release-activated calcium current in rat mast cells. *J. Physiol.* **465**:359-386.

36. Hughes, B. P., Milton, S. E., and Barrit, G. J. (1986) : Effect of vasopressin and  $La^{3+}$  on plasma-membrane calcium inflow and calcium disposition in isolated hepatocytes. *Biochem. J.* **238**:793-800.
37. Iredale, P.A., Alexander, S. P. H., and Hill, S. J. (1994) :Coupling of transfected human brain  $A_1$ adenosine receptor in CHO-K1 cells to calcium mobilization via a pertusis toxin-sensitive mechanism. *Br. J. Pharmacol.* **111**:1252-1256.
38. Irvine, R. F. (1990) : "Quantal" calcium release and the control of calcium entry by inositol phosphate a possible mechanism. *FEBS Lett.* **263**:5-9
39. Iyengar, R. (1993) : Molecular and functional diversity of mammalian Gs- stimulated adenylyl cyclases.: *FASEB J.* **7**:768-775.
40. Jayaraman, T. Ondriasova, E., Ondrinan, K., Harnick, D. J., and Marks, A. R. (1995) :The inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor is essential for T-cell receptor signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**:6007-6011.
41. Kurtz, A. (1987) : Adenosine stimulated guanylate cyclase activity in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* **269**:6292-6295.
42. Lavoinne, A., Buc. A.H., Claeysens, S., Pinosa, M., and Matray, F. (1987) : The mechanism by which adenosine decreases gluconeogenesis from lactate in isolated rat hepatocytes. *Biochem. J.* **246**:449-454.
43. Lee, K. M., Toscas, K., and Villareal, M. L. (1993) : Inhibition of bradykinin-and thapsigargin-induced calcium entry by tyroxine kinase inhibitors.*J. Biol. Chem.* **268**:9945-9948.

44. Linda, J. C., Shiling, H., Stephen, D.H., and Mathew, A.S. (1992) : ( $^3\text{H}$ ) 2-Phenylaminoadenosine ( $^3\text{H}$ -CV1808) labels a novel adenosine receptor in rat brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **263**:552-560.
45. Linden, J., and Delahunty, T. M. (1989) : Receptors the inhibit phosphoinositide breakdown. *TIBS.* **10**:104 -106.
46. Londos, C., Cooper, D. M. F., and Wolf, J. (1980) : Subclasses of external adenosine receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **77**:2551-2554.
47. Lowenstein, J. M., Yu, M. K., and Naito, Y. (1983) : Regulation of adenosine metabolism by 5' nucleotidases. In: *Regulatory Function of Adenosine*. Edited by : Berne, R. M., Rall, T.W., and Ribio, R., 117. Martimus Nijhoff, Boston.
48. Lückhoff, A., and Clapham, D. E. (1994) : Calcium channels activated by depletion of internal calcium stores in A431 cell. *Biophys. J.* **67**:177-182.
49. Lund, P., Cornell, W. N., and Krebs, A. H. (1975) : Effect of adenosine on the adenine nucleotide content and metabolism of hepatocytes. *Biochem. J.* **152**:593-599.
50. Lupu-Meiri, M., Beit-Or, A., Christensen, S. B. , and Oron, Y. (1993) : Calcium entry in *Xenopus* oocytes: effects of inositol trisphosphate, thapsigargin and DMSO. *Cell. Calcium.* **14**: 101-110.
51. Luthin, D.R., and Linden, J.J. (1995) : Comparison of  $A_4$  and  $A_{2a}$  binding sites in Striatum and COS cells transfected with adenosine  $A_{2a}$  receptors. *Pharmacol. Exp. Ther.* **272**:511-518.
52. Marchand, J. C., Lavonnie, A., Giorz, M. M., and Matray, F. (1979) : The influence of adenosine on intermediary metabolism of isolated hepatocytes. *Biochimie.* **62**:1273-1282.

53. Martínez-Valdez, H., Madrid-Marina, V., and Piña, E. (1982) : In vivo effect of adenosine on adenine nucleotides and inorganic phosphate in rat blood. *Life Sci.* **30**:191-197.
54. McDonald, T.V., Premack, B. A., and Garner, P. ( 1993) : Flash photolysis of caged inositol 1,4,5-trisphosphate activates plasma membrane calcium current in human T cell. *J. Biol. Chem.* **268**: 3889-3896.
55. Morgan, A. J., and Jacob, R. (1994) : Ionomycin enhances calcium influx by stimulating stores-regulated cation entry and not by a direct action at the plasma membrane. *Biochem. J.* **300**:665-672.
56. Moser, G. H., Scharder, J., and Denssen, A. (1989) : Turnover of adenosine in plasma of human and dog blood. *Am. J. Physiol.* **256**:C799- C806.
57. Olah, M. E., and Stiles, G. L. (1995) : Adenosine receptor subtypes.: *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **53**:581-606.
58. Olah, M. E., Ren, H., and Stiles, G. L. (1996) : Adenosine receptors: protein and gene structure.: *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **36**:135-150.
59. Olah, M.E., Ren, M., and Stiles, G. L. (1996) : Adenosine receptor subtypes: characterization and therapeutic regulation. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **36**:135-606.
60. Osswald, H. (1975) : Renal effects of adenosine and their inhibition by theophylline. *Naunyn-Shaniedberg's Arch. Pharmacol.* **288**:79-86.
61. Parekh, A. B., Terlau, H., and Stühmer, W. (1993) : Depletion of InsP<sub>3</sub> stores activates a calcium and potassium current by means of a phosphatase and a diffusible messenger. *Nature* (London ). **364**:814-818.

62. Pearson, J. D., and Coade, S. B. (1985) : Kinetics of endothelial cell ectonucleotidases. In Topics and Perspectives in Adenosine Research. Edited by: Paton, D. M., 83. Plenum Press, New York.
63. Petersen, C. C. H., and Berridge, M. J. (1994) : The regulation of capacitative calcium entry by calcium and protein kinase C in *Xenopus* oocytes. *J. Biol. Chem.* **269**:32246-32253.
64. Putney, J. W. (1986) : A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium.* **7**:1-12.
65. Randriamampita, C., and Tsien, R. Y. (1993) : Emptying of intracellular calcium stores releases a novel small messenger that stimulates calcium influx. *Nature* (London). **364**:809-814.
66. Ranganathan, R., Harris, G. L., Stevens, C. F., and Zuker, C. S. (1991) : A *Drosophila* mutant defective in extracellular calcium-dependent photoreceptor deactivation and rapid desensitization. *Nature* (London). **345**:230-232.
67. Robles-Flores, M., Allende, G., Piña, E., and García-Sáinz, J.A. (1995): Cross-talk between glucagon- and adenosine-mediated signalling systems in rat hepatocytes: effects on cyclic AMP- phosphodiesterase activity. *Biochem. J.* **312**:763-767.
68. Rink, T.J. (1990) : Receptor-mediated calcium entry. *FEBS Lett.* **268**:381-385
69. Rubio, R., Berne, R. M., Bockman, E. L., and Cornish, R. R. (1975) : Relationship between adenosine concentration and oxygen supply in rat brain. *Am. J. Physiol.* **228**:1896-1902.
70. Sargeant, P., Fardale, R. W., and Sage, S. O. (1993) : ADP- and thapsigargin-evoked calcium entry and protein tyrosine phosphorylation are inhibited by the tyrosine kinase inhibitors genistein and methyl-2,5-dihydroxybenzoate in Fura-2-loaded human platelets. *J. Biol. Chem.* **268**:18151-18156.

71. Sattin, A., and Rall, T. W. (1970) : 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- 23.
72. Selinger, Z., Doza, Y. N., and Minke, B. (1993) : Mechanisms and genetics of photoreceptores desensitization in drosophila flies. *Biochim. Biophys. Acta.* **1179**:283-289.
73. Simon, M. I., Strathmann, M.P., and Gautam, N. (1991) : Diversity of G proteins in signal traduction. *Science.* **252**:802-808.
74. Stiles, G. L. (1986) : Adenosine receptors: Structure, function and regulation. *Trends in Pharmacol. Sci.* **17**:486-490.
75. Sunahara, R. K., Dessauer, C. W.,and Gilman, A. G. (1996) : Complexity and Diversity of mammalian adenylyl cyclases.: *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **36**:461- 480.
76. Tinton, S. A., Chow, S. C. Buc-Calderon, P. M., and Kass, G. E. (1996) : Adenosine stimulates calcium influx in isolated rat hepatocytes. *Eur. J. Biochem.* **238**:576-581.
77. Ueland P.M., and Saeb, J., (1979): Sequestration of adenosine in crude extracts from mouse liver and other tissues. *Biochim. Biophys. Acta.* **587**:347-352.
78. Van Claker, D., Müller, M., and Hamprecht, B. (1979) : Adenosine regulates, via two different types of receptors, the accumulation of cyclic AMP in cultured brain cells, *J. Neurochem.* **33**:999-1005.
79. Watson, S., and Girdlestone, D. (1995) : Receptor and ion channel nomenclature supplement. *Trends Pharmacol. Sci.* **7**-8.
80. Wolf, M. M., and Berne, R. M. (1956) : Coronary vasodilator properties of purine and pyrimidine derivates. *Cir. Res.* **4**:343-348.

81. Zaidi, M., Shankar, V. S., Bax, C. M. R., Bax, B. E., Bevis, P. J. R., Pazianas, M., Alam, A. S. M. T., Moonga, B. S., and Huang, C. L. H.: Linkage of extracellular and intracellular control of cytosolic calcium in rat osteoclasts in the presence thapsigargin. *J. Bone Miner. Res.* 8:961-967.
82. Zentella, M. de Piña, Diaz-Cruz, A., Guinzberg, P., and Piña E. (1989) : Hormone-like effect of adenosine and inosine on gluconeogenesis from lactate in isolated hepatocytes. *Life. Sci.* 45:2269-2274.
83. Zweifach, A., and Lewis, R. S. (1993) : Mitogen-regulated calcium current of T lymphocytes is activated by depletion intracellular calcium stores. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90:6295-6299.
84. Zweifach, A., and Lewis, R. S. (1995): Rapid inactivation of depletion-activated calcium current ( $I_{CRAC}$ ) due to local calcium feedback. *J. Gen. Physiol.* 105:209-226.

## 12.0 APENDICE

I.- Effect of adenosine and inosine on ureagenesis in hepatocytes. Guinzberg, P.R., Laguna, I., Zentella, A., Guzman, R., and Piña, E. (1987) : *Biochem. J.* **245**:371-374.

II.- Hormone-like effect of adenosine and inosine on gluconeogenesis from lactate in isolated hepatocytes. Zentella, M. de Piña, Diaz-Cruz, A., Guinzberg, P., and Piña E. (1989) : *Life. Sci.* **45**:2269-2274.

III.- Metabolic responses of isolated hepatocytes to adenosine; dependence on external calcium. Díaz, A., Guinzberg R., Uribe, S., and Piña, E. (1991) : *Life. Sci.* **49**:505-510.

IV.- Inhibition of adenosine mediated responses in isolated hepatocytes by depolarizing concentrations of  $K^+$ . Guinzberg, R., Díaz-Cruz, A., Uribe, S., and Piña, E. (1993) : *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **197**:229-234.

V.-  $Ca^{2+}$  dependence of the response of three adenosine type receptors in rat hepatocytes. Guinzberg, R., Díaz-Cruz, A., Uribe, S and Piña, E. (1997); *Eur. J. Pharmacol.* **348**:243-247.

VI.- In vivo activation by diets and vitro activation by hormones are additive for urea synthesis in the rat liver. Guinzberg, R., Díaz-Cruz, A., and Piña, E. (1996) : *Comp. Biochem. Physiol.* **115B**:369-373.

VII.- Influencia de la fuente de energía sobre el efecto ureogénico de nucleósidos y hormonas en hepatocitos aislados de rata. Guinzberg, P. R., y Díaz-Cruz, A. (1994); *Rev. Vet. Méx.* **25**:251-254.



## 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  $0.08 \mu\text{M}$  for adenosine and  $5 \mu\text{M}$  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  $\text{Ca}^{2+}$ . 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  $0.5 \text{ mM}$  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  $\text{Ca}^{2+}$ ). 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  $\text{Ca}^{2+}$ -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, Qto. C.P. 76180 México.

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

**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 <sub>4</sub> Cl	With 10 $\mu$ M- adenosine No NH <sub>4</sub> Cl	With 10 $\mu$ M- inosine and 10 $\mu$ M-NH <sub>4</sub> Cl	With 10 $\mu$ M- hypoxanthine and 10 $\mu$ M-NH <sub>4</sub> Cl	With 10 $\mu$ M- xanthine and 10 $\mu$ M-NH <sub>4</sub> Cl	With 10 $\mu$ M- uric acid and 10 $\mu$ M-NH <sub>4</sub> Cl
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 ureagenic 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 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. 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 $\mu$ M-adenosine
Glucose	Glutamine	7.60 $\pm$ 0.50 (5)	19.36 $\pm$ 2.64 (3) <i>P</i> < 0.01
Glucose	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	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	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	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 $\mu$ M-Adenosine	+ 10 $\mu$ M-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 $\mu$ M)	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 $\mu$ M)	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  $\mu$ M to 25% at 10  $\mu$ M, 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).

"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  $K_a$  of  $7.5 \times 10^{-8}$  and  $9 \times 10^{-8}$  M, respectively. Absence of 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<sup>6</sup>-(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). Lavoinne *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. Hoffer and Lowenstein (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

in Fig. 1;  $K_a$  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

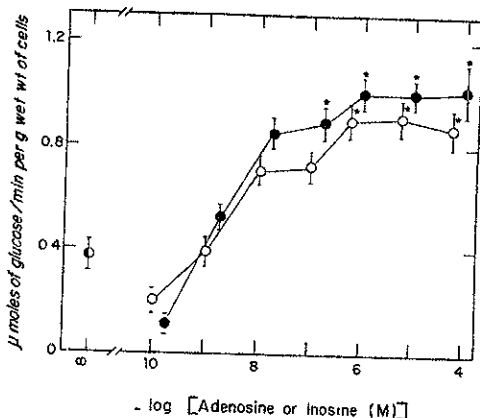


FIG. 1

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 formation (Fig. 2). The 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).

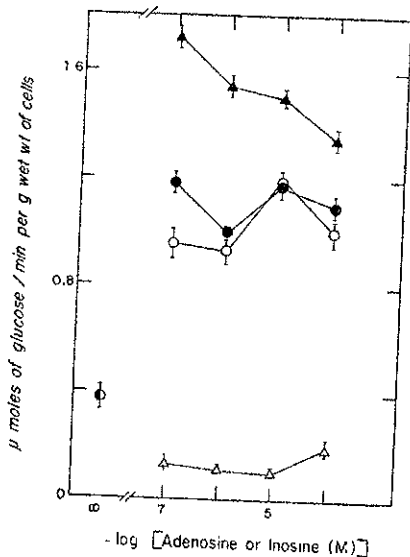


FIG. 3

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.

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

Antonio Díaz\*, Raquel Guinzberg\*\*, Salvador Uribe\*\*\* and Enrique Pifia\*\*.

\*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 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: Fain 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 Bartons *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 ( $K_a=7.5 \times 10^{-8}$  M) (6) and the rate of glucose synthesis from lactate ( $K_a=8 \times 10^{-8}$  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  $Ca^{2+}$  (7uM) 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 responses 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

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 Ureagenic 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, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < .001$ .

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 FMAX (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

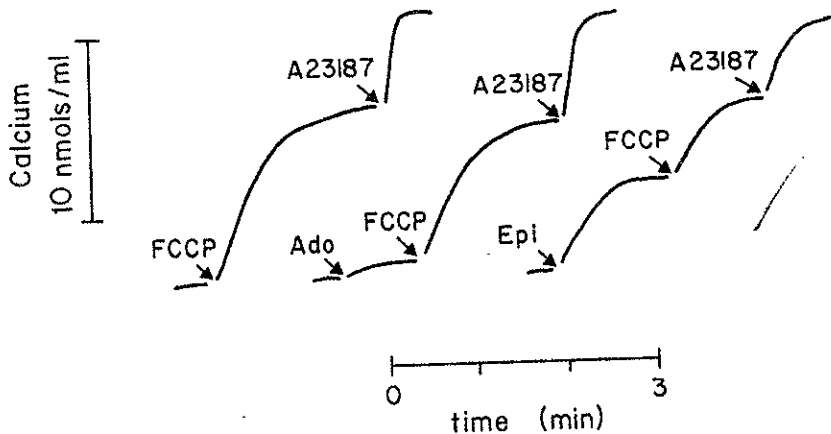


FIG. 2.

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-phenylhydrazine, A23187: 1  $\mu$ M A23187.



INHIBITION OF ADENOSINE MEDIATED RESPONSES IN ISOLATED HEPATOCYTES  
BY DEPOLARIZING CONCENTRATIONS OF  $K^+$

Raquel Guinzberg<sup>1</sup>, Antonio Díaz-Cruz<sup>2</sup>, Salvador Uribe<sup>3</sup> and Enrique Píña<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Biochemistry, School of Medicine, <sup>2</sup>Department of Animal Nutrition and Biochemistry, School of Veterinary Medicine and <sup>3</sup>Institute of Cell Physiology, National University of Mexico, Mexico 04510 D. F.

Received October 8, 1993

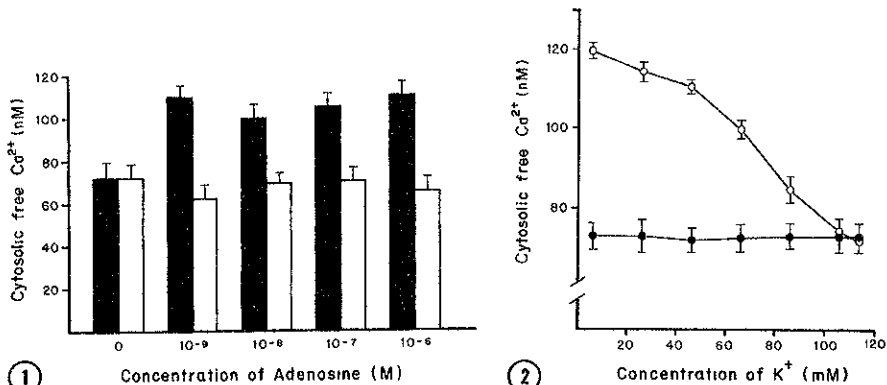
---

**Summary:** Isolated rat hepatocytes, incubated in a high  $K^+$  medium which depolarizes their plasma membrane, were used to investigate the response to adenosine. High  $K^+$  concentration blocked both the adenosine mediated increase of calcium influx and the increase in the rate of urea synthesis. It is concluded that a) adenosine stimulates calcium influx in hepatocytes probably through receptor-operated  $Ca^{2+}$  channels which are closed by depolarization of the plasma membrane, b) the higher cytosolic calcium concentration triggers a regulatory step that fully stimulates the rate in urea synthesis. © 1993 Academic Press, Inc.

---

Incubation of isolated rat hepatocytes with micromolar concentrations of adenosine stimulates glycogenolysis (1) ureagenesis (2) and gluconeogenesis (3). Since an increase in the cytosolic free calcium concentration ( $Ca^{2+}$  cyt) has been observed in hepatic cells after addition of adenosine and since the absence of calcium in the incubation mixture suppressed the adenosine-stimulated ureagenesis, calcium has been proposed as the transducing signal for adenosine in the hepatic cell (4). The elevation of  $Ca^{2+}$  cyt produced by adenosine seems to be predominantly due to a stimulation of the influx of  $Ca^{2+}$  across the plasma membrane (4).

The  $Ca^{2+}$  inflow systems involved in the hormonal stimulation of  $Ca^{2+}$  uptake in the liver are not well characterized, but it has been shown that they are distinct from the voltage-gated channels responsible for  $Ca^{2+}$  influx in excitable cells (5, 6). In rat liver, hormone dependent  $Ca^{2+}$  influx has been suggested to occur through receptor operated  $Ca^{2+}$  channels (7-8). Incubation of isolated hepatocytes with high external  $K^+$ , enough to produce depolarization of their liver plasma membranes (7, 9), abolished the stimulated  $Ca^{2+}$  influx induced by co-



**Fig. 1.** Effect of different concentrations of adenosine on the  $\text{Ca}^{2+}$  cyt of isolated rat hepatocytes at two different KCl concentrations. Quin-2 loaded liver cells (25 to 30 mg wet weight) were incubated in 2.5 ml of Krebs - Ringer bicarbonate containing normal  $\text{K}^+$  concentration (■ 5.7 mM KCl and 120 mM NaCl, reference 12) or high  $\text{K}^+$  concentration (□ 114 mM KCl and 37 mM NaCl). Each value represents the average  $\pm$  standard error,  $n=3$ .

**Fig. 2.** Effect of varying the external  $\text{K}^+$  concentrations on the adenosine - mediated increase in  $\text{Ca}^{2+}$  cyt. The original concentrations of NaCl and KCl in Krebs-Ringer solution (12) were modified in order to reach the KCl concentration indicated in the figure, at the expense of decreasing NaCl concentration; in the absence of adenosine (●), and with  $10^{-6}$  M adenosine (○). Other indications as in Fig. 1.

progressively inhibited by increasing the KCl concentration, at the expense of NaCl, in the incubation mixture of isolated liver cells (Fig. 2). In contrast, the basal levels of  $\text{Ca}^{2+}$  cyt were not modified by  $\text{K}^+$  changes in the incubation mixture. There is an excellent correlation between the progressive diminution in plasma membrane potential (7) and the diminution in the adenosine - mediated increase in  $\text{Ca}^{2+}$  cyt (Fig. 2). Both actions were equally impaired as a function of the  $\text{K}^+$  concentration in the Krebs-Ringer medium in which liver cells were incubated.

The increase in the rate of urea synthesis was affected in a complex way by the depolarization of the hepatocyte plasma membrane produced by incubating cells in increasing  $\text{K}^+$  concentrations. A dose-dependent stimulation in the rate of urea synthesis was produced by adenosine using unmodified Krebs-Ringer solution (Fig. 3). The increase has statistical significance ( $p < .001$ ) beginning at a nucleoside concentration of  $10^{-8}$  M. Additionally, the incubation of

channels and a process of facilitated diffusion (5). Voltage-operated channels are only present in excitable cells (15,16), and, specifically, no voltage-dependent inward  $\text{Ca}^{2+}$  currents were identified in avian hepatocytes (17).  $\text{Ca}^{2+}$  facilitated diffusion is not modified by depolarization of the membrane or by the binding of an agonist to its receptor (18). The data obtained here with isolated hepatocytes: adenosine mediated  $\text{Ca}^{2+}$  influx and its blockage at elevated  $\text{K}^+$  external concentrations (Figs. 1 and 2), which produced depolarization of liver plasma membrane (7, 9), suggest the presence of receptor-operated  $\text{Ca}^{2+}$  channels opened by adenosine, and are thus responsible for the nucleoside stimulated  $\text{Ca}^{2+}$  influx. A direct action of high  $\text{K}^+$  incubation medium on the  $\text{Ca}^{2+}$  channel can be discarded since the basal uptake of  $\text{Ca}^{2+}$  was not modified (Figs. 1 and 2).

It is interesting to compare the opposite responses of adenosine-receptors upon agonist stimulation, either in the nervous system and in the hepatocyte; in the former adenosine closes  $\text{Ca}^{2+}$  channels and opens  $\text{K}^+$  channels (19), in the latter the nucleoside opens  $\text{Ca}^{2+}$  channels (Figs. 1 and 2). In addition, the depolarization of plasma cell membranes from nerve or hepatic cells is accompanied by opposite responses in their respective  $\text{Ca}^{2+}$  channels: in nerve cells they are opened (19) but in hepatic cells they are closed (7,9).

A small increase in the rate of urea synthesis was present even in the absence of a net  $\text{Ca}^{2+}$  influx from the extracellular medium, but a full increase in the rate of urea synthesis required a net  $\text{Ca}^{2+}$  influx and was adenosine dose-dependent (Figs. 3 and 4). Consequently, an adenosine-mediated rise in the concentration of cytosolic calcium likely impinges a regulatory step in the extramitochondrial route of urea biosynthesis. Increases in the uptake of ornithine and in the synthesis of citrulline due to the presence of  $\text{Ca}^{2+}$  ions have been documented (20, 21). Therefore, it is proposed that the complete stimulation in the rate of urea synthesis by adenosine depends on the uptake of external calcium through a receptor-operated channel.

#### REFERENCES

1. Keppens, S., and De Wulf, H. (1985) *Biochem. J.* **231**, 797-799.
2. Guinzberg, P. R., Laguna, I., Zentella, A., Guzman, R., and Piña, E. (1987) *Biochem J.* **245**, 371-374.

Reprinted from

# European Journal of Pharmacology

---

European Journal of Pharmacology 340 (1997) 243–247

## Ca<sup>2+</sup> dependence of the response of three adenosine type receptors in rat hepatocytes

Raquel Guinzberg <sup>a</sup>, Antonio Díaz-Cruz <sup>b</sup>, Salvador Uribe <sup>c</sup>, Enrique Piña <sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Biochemistry, School of Medicine, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 70-159, 04510 Mexico DF, Mexico

<sup>b</sup> School of Veterinary Medicine, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 70-159, 04510 Mexico DF, Mexico

<sup>c</sup> Inst de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 70-159, 04510 Mexico DF, Mexico

Received 21 August 1997; revised 29 September 1997; accepted 30 September 1997



## Ca<sup>2+</sup> dependence of the response of three adenosine type receptors in rat hepatocytes

Raquel Guinzberg<sup>a</sup>, Antonio Díaz-Cruz<sup>b</sup>, Salvador Uribe<sup>c</sup>, Enrique Piña<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Biochemistry, School of Medicine, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo Postal 70-159, 04510 Mexico DF, Mexico

<sup>b</sup> School of Veterinary Medicine, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo Postal 70-159, 04510 Mexico DF, Mexico

<sup>c</sup> Inst de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo Postal 70-159, 04510 Mexico DF, Mexico

Received 21 August 1997; revised 29 September 1997, accepted 30 September 1997

### Abstract

The effect of three different receptor-specific adenosine agonists on the rate of ureagenesis by isolated rat hepatocytes and the dependence on the external free Ca<sup>2+</sup> concentration ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>o</sub>) were investigated. In the presence of high [Ca<sup>2+</sup>]<sub>o</sub> all adenosine receptor agonists increased ureagenesis to similar levels. However, with low [Ca<sup>2+</sup>]<sub>o</sub> the effects of each agonist varied as follows: (i) the adenosine A<sub>1</sub> receptor agonist, 2-chloro-*N*<sup>6</sup>-cyclopentyl-adenosine, increased ureagenesis depending partially on [Ca<sup>2+</sup>]<sub>o</sub>, (ii) the adenosine receptor A<sub>2</sub> agonist, 2-*p*-(2-carboxy-ethyl) phenethylamino-5'-*N*-ethylcarboxyamido adenosine hydrochloride, increased ureagenesis independently of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>o</sub> and (iii) in contrast, the adenosine receptor A<sub>3</sub> agonist *N*<sup>6</sup>-2-(4-aminophenyl) ethyladenosine, increased ureagenesis only in the presence of high [Ca<sup>2+</sup>]<sub>o</sub>. The adenosine receptor A<sub>1</sub> antagonist, 1-allyl-3,7-dimethyl-8-phenyl xanthine, inhibited the effect of the adenosine receptor A<sub>1</sub> agonist on ureagenesis, but not the effect of the adenosine A<sub>2</sub> or A<sub>3</sub> receptor agonists. The adenosine A<sub>2</sub> receptor antagonist, 3,7-dimethyl-1-propargylxanthine, inhibited only the effect of the adenosine A<sub>2</sub> receptor agonist. Thus, in addition to A<sub>1</sub> and A<sub>2</sub> type adenosine receptors, rat hepatocytes possess an A<sub>3</sub>-like adenosine receptor which responds to the addition of an adenosine A<sub>3</sub> agonist by accelerating ureagenesis a [Ca<sup>2+</sup>]<sub>o</sub> dependent manner. Moreover, it was observed that in the presence of extracellular Ca<sup>2+</sup> each agonist increased [Ca<sup>2+</sup>]<sub>o</sub> and this effect was inhibited by the appropriate specific antagonist. © 1997 Elsevier Science B.V.

**Keywords:** Adenosine; Adenosine receptor, Ca<sup>2+</sup>; Cell; Cellular metabolism; Uroagenesis

### 1. Introduction

In mammals, the interaction of adenosine with the different adenosine receptors found in the plasma membrane of each type of cell results in a large number of physiological effects. There are at least five subtypes of adenosine receptors. These have been classified as A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub>, A<sub>3</sub> and A<sub>4</sub>. This classification is supported by biochemical, pharmacological and molecular cloning evidence (Dafziel and Westfall, 1994; Palmer et al., 1995).

In some organs and species, such as mouse and humans, adenosine A<sub>3</sub> receptors have been cloned. However, no reports are available on the physiological response of the adenosine A<sub>3</sub> receptor in the liver. The synthesis of adenosine receptor-specific agonists allows the analysis of the cellular response to the stimulation of each specific adeno-

sine receptor type. Thus, in this paper, the effects of three adenosine receptor-specific agonists and two adenosine receptor-specific antagonists on the rate of urea synthesis in isolated rat hepatocytes are reported. The dependence of the ureagenic response on [Ca<sup>2+</sup>]<sub>o</sub> was investigated in order to gain insight into the transduction signal(s) involved for each of these receptors within the liver.

### 2. Materials and methods

All reagents were of the highest purity available commercially. Adenosine, quin-2, A23187, bovine serum albumin type V and dimethylsulfoxide were from Sigma Co., St Louis, MO. Adenosine agonists were chosen according to their affinity for each kind of receptor (RBI catalog, RBI Co, Natick, MA). These were as follows: the adenosine A<sub>1</sub> receptor agonist was 2-chloro-*N*<sup>6</sup>-cyclopentyl-adenosine (CCPA) ( $K_a = 0.2\text{--}0.4$  nM); the adenosine A<sub>2</sub>

\* Corresponding author. Tel.: +52-5-6232403; fax: +52-5-6225630; e-mail: suribe@ifesun1.ifisiof.unam.mx

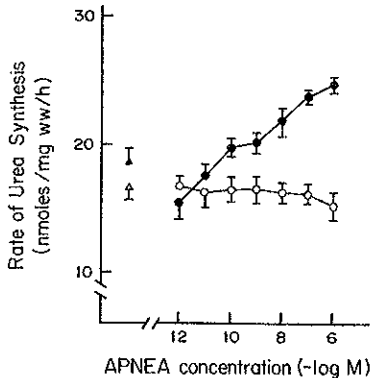


Fig. 3. Effects of different concentrations of the adenosine  $A_3$  receptor agonist,  $N^6,2$ -(4-aminophenyl) ethyladenosine (APNEA), on the rate of urea synthesis. Experimental conditions as in Fig. 1. (●) 12 mM  $Ca^{2+}$ , (○) 12 mM EGTA. Control urea synthesis was measured in the absence of agonist with (▲) or without (▲)  $Ca^{2+}$ . Results are expressed as means  $\pm$  S.E.M (bars) of duplicate incubations from four cell preparations. In the presence of 12 mM  $[Ca^{2+}]_i$ , the response to  $10^{-11}$  and  $10^{-10}$  M APNEA was significant at  $P < 0.05$  in Student's  $t$ -test. From  $10^{-9}$  at  $10^{-6}$  M APNEA,  $P < 0.01$ .

was similar to the rate observed previously in the presence of adenosine (Guinberg et al., 1993). In the presence of the adenosine  $A_1$  and  $A_2$  receptor agonists, a significant stimulation was detected at adenosine agonist concentrations of  $10^{-10}$  M ( $P < 0.05$ ) and increased with concentrations up to  $10^{-6}$  M ( $P < 0.01$ ). The adenosine  $A_3$  receptor agonist APNEA, stimulated ureagenesis at  $10^{-11}$  M ( $P < 0.05$ ) and this stimulation increased with agonist concentrations up to  $10^{-6}$  M APNEA ( $P < 0.01$ ). APNEA stimulated ureagenesis in spite of reports indicating that rat hepatocytes do not contain adenosine  $A_3$  receptors (Linden, 1994).

In order to assess the dependence on  $[Ca^{2+}]_i$  of the response elicited by each adenosine receptor agonist, the same experiments were conducted in the absence of  $[Ca^{2+}]_i$ . All adenosine receptor agonists were used at a final concentration of 1  $\mu$ M. It was observed that the ureagenic response to each adenosine receptor agonist was different when  $Ca^{2+}$  was not added to the incubation medium. In the absence of  $[Ca^{2+}]_i$ , the response to the adenosine receptor agonist  $A_1$  was smaller (Fig. 1) and the response to agonist  $A_2$  was the same that in the presence of  $[Ca^{2+}]_i$  (Fig. 2), whereas the ureagenic response to the adenosine  $A_3$  receptor agonist was totally absent if  $[Ca^{2+}]_i$  was low (Fig. 3).

To further define the involvement of each adenosine receptor on the ureagenic response, two adenosine receptor-specific antagonists were used to titrate the effects of each adenosine receptor agonist (Fig. 4A). Increasing concentrations of the adenosine  $A_1$  receptor antagonist inhibited

the response to the adenosine  $A_1$  receptor agonist while the responses to the adenosine  $A_2$  and  $A_3$  receptor agonists were not affected (Fig. 4A). The adenosine  $A_2$  receptor antagonist inhibited the response to the adenosine  $A_2$  receptor agonist, but did not inhibit the adenosine  $A_1$  or  $A_3$  receptor agonist-mediated stimulation of ureagenesis (Fig. 4B).

Since the  $[Ca^{2+}]_i$  dependence of the ureagenic response to each adenosine receptor agonist was different, it was decided to test the effects of each of the adenosine receptor agonists on  $[Ca^{2+}]_i$  (Table 1). In contrast to the effects on ureagenesis, the effects on  $[Ca^{2+}]_i$  of the adenosine recep-

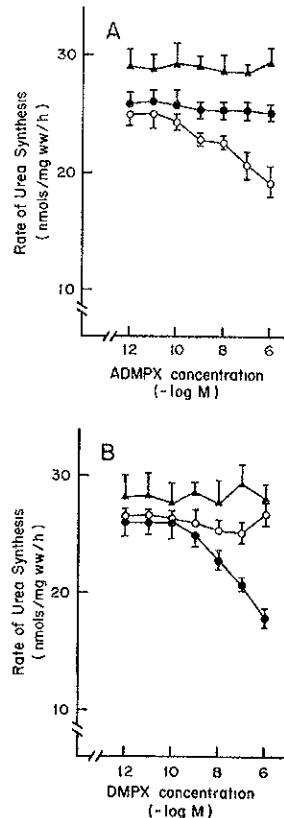


Fig. 4. Effects of two receptor-specific adenosine antagonists on the increased rate of ureagenesis produced by three specific receptor agonists. Experimental conditions as in Fig. 1, except each agonist was used at  $10^{-6}$  M. (A) Increasing concentrations of the  $A_1$  antagonist 1-Allyl 3-7 dimethyl-8 phenyl xanthine (ADMPX) or (B) increasing concentrations of the  $A_2$  antagonist 3,7-dimethyl-1-propargylxanthine (DMPX). The agonists used were (○) the  $A_1$  agonist, CCPA, (●) the  $A_2$  agonist, CGS-21680, (▲) the  $A_3$  agonist, APNEA. Bars are S.E.M.

## Acknowledgements

We thank J. Sepúlveda and R. Paredes for technical assistance. Partially supported by Grant No. 2150P-N9507 from CONACYT, UNAM, Mexico and grant No. 400346-5-2363PN from CONACYT.

## References

- Bartrons, R., Van Schaftingen, E., Hers, G., 1984. The ability of adenosine to decrease the concentration of fructose 2,6-bisphosphate in isolated hepatocytes. *Biochem Pharmacol* 218, 157–163.
- Berry, M.N., Friend, D.S., 1969. Isolated rat hepatocytes. *J. Cell. Biol.* 43, 506–520.
- Charest, R., Blackmore, P.F., Berthon, B., Exton, J.H., 1983. Changes in free cytosolic  $Ca^{2+}$  in hepatocytes following  $\alpha 1$ -adrenergic stimulation. Studies on quin-2 loaded hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 258, 8769–8773.
- Dalziel, H.H., Westfall, D.P., 1994. Receptors for adenine nucleotides and nucleosides. Subclassification, distribution and molecular characterization. *Pharmacol. Rev.* 46, 449–466.
- Díaz, A., Gunzberg, R., Uribe, S., Piña, E., 1991. Metabolic responses of isolated hepatocytes to adenosine: Dependence on external calcium. *Life Sci.* 49, 505–510.
- Fredholm, B.B., Abbracchio, M.P., Burnstock, G., Daly, J.W., Harden, K., Jacobson, K.A., Leff, P., Williams, M., 1994. Nomenclature and classification of purinoceptors. *Pharmacol. Rev.* 46, 143–156.
- Gunzberg, P.R., Laguna, I., Zentella, A., Guzman, R., Piña, E., 1987. Effect of adenosine and inosine on ureagenesis in hepatocytes. *Biochem. J.* 245, 371–374.
- Gunzberg, R., Díaz-Cruz, A., Uribe, S., Piña, E., 1993. Inhibition of adenosine mediated responses in isolated hepatocytes by depolarizing concentrations of  $K^+$ . *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 197, 229–234.
- Gutman, I., Bergmeyer, H.U., 1974. Determination of urica. In: Bergmeyer, H.U. (Ed.), *Methods of Enzymatic Analysis*, vol. 4. Verlag Chemie, Academic Press, New York, pp. 1791–1794.
- Hirano, D., Aoki, Y., Ogasawara, H., Kodama, H., Waga, I., Sakanaka, C., Shimizu, T., Nakamura, M., 1996. Functional coupling of adenosine  $A_{2a}$  receptor to inhibition of the mitogen-activated protein kinase cascade in Chinese hamster ovary cells. *Biochem. J.* 316, 81–86.
- Linden, J., 1994. Cloned adenosine  $A_3$  receptors. Pharmacological properties, species differences and receptor functions. *Trends Pharmacol. Sci.* 15, 298–306.
- Marchand, J.C., Lavonnie, A., Giroz, M., Matray, F., 1979. Influence of adenosine on intermediary metabolism of isolated hepatocytes. *Biochimie* 61, 1273–1282.
- Murison, E., Goodson, S.J., Harris, C.A., Edbrooke, M.R., 1995. The human  $A_3$  adenosine receptor gene. *Biochem. Soc. Trans.* 23, 270S.
- Murthy, K.S., McHenry, L., Grider, J.R., Makhlof, G.M., 1995. Adenosine  $A_1$  and  $A_{2b}$  receptors coupled to distinct interactive signaling pathways in intestinal muscle cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 274, 300–306.
- Palmer, T.M., Stiles, G.L., 1995. Adenosine receptors. *Neuropharmacology* 34, 683–694.
- Palmer, T.M., Gettys, W.T., Stiles, G.L., 1995. Differential interaction with and regulation of multiple G-proteins by the rat  $A_3$  adenosine receptor. *J. Biol. Chem.* 270, 16895–16902.
- Sajadi, F.G., Boyle, D.L., Domingo, R.C., Firestein, G.S., 1996. cDNA cloning and characterization of  $A_{3b}$ : An alternatively spliced rat  $A_3$  adenosine receptor variant. *FEBS Lett.* 382, 125–129.
- Tsien, R.Y., Pozzan, T., Rink, T.J., 1982. Calcium homeostasis in intact lymphocytes: Cytoplasmic free calcium monitored with a new, intracellularly trapped fluorescent indicator. *J. Cell. Biol.* 94, 325–334.

# Influencia de la fuente de energía sobre el efecto ureogénico de nucleósidos y hormonas en hepatocitos aislados de rata

Raquel Guinzberg Perrusquía\*  
Antonio Díaz Cruz\*\*

## Resumen

La adenosina y la inosina son nucleósidos formados durante la degradación del ATP, los cuales juegan un papel importante en la regulación del metabolismo hepático. En células aisladas de hígado de rata e incubadas bajo diferentes condiciones experimentales, ambos nucleósidos presentan un efecto ureogénico, el cual presenta las siguientes características: a) Se manifiesta cuando los hepatocitos son incubados con glutamina, alanina o carbonato de amonio; b) este proceso metabólico regulado por adenosina e inosina es dependiente del sustrato oxidable; c) un efecto inhibitorio de la ureogénesis es observado cuando las células son incubadas en ausencia de calcio; d) este efecto es antagonizado por glucagon, pero no por epinefrina. Los efectos metabólicos de la adenosina e inosina aquí descritos, forman parte de un sistema muy fino de control metabólico, cuyo mecanismo de regulación genera una respuesta a corto plazo, lo que determinará la funcionalidad del órgano. Por lo tanto, se considera que los datos presentados en este trabajo son de gran importancia fisiológica.

## Introducción

Una de las características sobresalientes de los organismos multicelulares es la notable capacidad de comunicación entre sus células. En los mamíferos, existe abundante información sobre el mecanismo de comunicación intercelular entre sus células nerviosas y con células de diferente estirpe, así como la comunicación establecida por las hormonas o la llamada comunicación parácrina, en la cual la célula libera al espacio extracelular su mensaje, mismo que actúa sobre las células vecinas regulando sus funciones, estos tipos de comunicación constituyen un área de gran interés para el estudio de la fisiología celular. En este trabajo, los

mensajeros aquí seleccionados son la adenosina, un nucleósido que ha mostrado ser un potente regulador de la función fisiológica del sistema nervioso central<sup>1</sup> y del sistema cardiovascular,<sup>1</sup> así como el nucleósido inosina, cuya participación no es muy clara en el metabolismo celular. El indicador de los efectos metabólicos de estos nucleósidos, fue la síntesis de urea en hepatocitos aislados de rata, así como las condiciones que favorecen su efecto fisiológico. Se revisó también la interacción de estos nucleósidos con las hormonas glucagon y epinefrina, de los que es bien conocido su efecto ureogénico. El presente estudio se realizó para establecer el papel que juega el tipo de sustrato oxidable sobre la síntesis de urea regulada por los nucleósidos, adenosina e inosina, así como las hormonas glucagon y epinefrina en hepatocitos aislados de rata.

## Material y métodos

Se emplearon ratas Wistar, machos de 150-200 g de peso, los animales se alimentaron con una dieta comercial y agua *ad libitum*, y fueron mantenidos en ayuno por 24 horas antes de ser anestesiados con éter para aislar los hepatocitos. Los reactivos utilizados en este trabajo, se obtuvieron de diferentes fuentes comerciales de la mayor pureza posible. Anestesiada la rata, se procedió a la perfusión del hígado, con una solución de glucosa 10 mM en Krebs Ringer-bicarbonato, a pH 7.4, una vez perfundida la glándula hepática, se sometió a una digestión con colagenasa 1 mg/ml, durante 20 minutos, transcurrido este tiempo, se obtuvieron las células cuya viabilidad fue cuantificada por la técnica de exclusión de azul de tripan al 0.2%. Para más detalles revisar Berry y Friend<sup>3</sup> y Guinzberg *et al.*<sup>4</sup>

**Sistema de incubación.** Las células se incubaron en una solución de Krebs Ringer-bicarbonato pH 7.4, el cual contenía albúmina sérica bovina al 1%, ornitina 3 mM y calcio 1.2 mM, bajo una atmósfera saturada de O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (95/5%), en agitación continua, durante 60 minutos, y a una temperatura de 37°C. Para la realización de los experimentos, el medio de incubación fue enriquecido con los siguientes sustratos: glucosa 10 mM, glutamina 10 mM, carbonato de amonio 5 mM, lactato 10 mM, oleato 1 mM y alanina 10 mM, según el protocolo de cada experimento. En los ensayos, donde se determinó

Recibido para su publicación el 13 de octubre de 1993

\* Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D.F.

\*\* Departamento de Nutrición Animal y Bioquímica, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D.F.



**Cuadro 2**  
**INFLUENCIA DE DIFERENTES SUSTRATOS SOBRE LA ACCION ESTIMULADORA DE LA UREOGENESIS, PROMOVIDA POR HORMONAS Y NUCLEOSIDOS<sup>o</sup>**

Adiciones	Glucosa	Lactato + Oleato		Alanina
Testigo	7.4 ± 0.90 (5)	6.8 ± 0.32 (5)	13.8 ± 1.56 (5)	
Glucagon 1 µM	36.0 ± 4.90* (6)	9.4 ± 1.06** (5)	60.8 ± 5.60* (5)	
Epinefrina 1 µM	27.2 ± 2.37* (6)	9.6 ± 1.40** (5)	54.8 ± 7.00* (5)	
Adenosina 1 µM	21.3 ± 0.20* (6)	6.6 ± 0.76*** (5)	36.0 ± 3.20* (5)	
Inosina 1 µM		8.0 ± 0.74*** (5)	34.6 ± 4.20* (5)	

<sup>o</sup>Los datos se refieren a las nmolas de urea formada en 60 min por mg de células de peso húmedo  
 Los valores de P se refieren al significado estadístico con su testigo respectivo\* P < 0.001, \*\* P < 0.05, \*\*\* P < 0.9

Cabe mencionar que se presenta una paradoja en varias acciones de la adenosina en hepatocitos aislados de rata, pues a concentraciones elevadas del nucleósido, 0.1 mM o mayores, se produce un efecto inhibitorio de la ureogénesis<sup>6</sup> y de la gluconeogénesis,<sup>7</sup> por el contrario, a concentraciones fisiológicas de 1 µM y aun menores, estimula la síntesis de urea (Figura 1) y la síntesis de glucosa.<sup>8</sup> Estos datos parecen indicar un efecto bifásico de la adenosina, observables a altas concentraciones y clasificados como farmacológicos y los efectos fisiológicos, los encontrados a bajas concentraciones. Una incógnita que se plantea es: ¿Cuál es la función de la adenosina e inosina en la fisiología hepática? También es importante cuestionar la participación de los sustratos oxidables empleados, ya que la glucosa, la mezcla lactato-oleato y la alanina, modifican los niveles basales de urea

**Cuadro 3**  
**ACCION DE LA ADENOSINA Y LA INOSINA SOBRE LA ESTIMULACION DE LA SINTESIS DE UREA PROMOVIDA POR GLUCAGON Y EPINEFRINA<sup>o</sup>**

Adiciones	Sin nucleósido	Adenosina 100 µM	Inosina 100 µM
Testigo	14.4 ± 3.12 (19)	25.3 ± 2.40 (10)	24.1 ± 2.76 (3)
Glucagon 1 µM	43.4 ± 4.00 (7)	7.7 ± 1.42 (4)	12.1 ± 1.40 (3)
Epinefrina 1 µM	32.0 ± 2.20 (7)	37.7 ± 2.00 (6)	24.1 ± 3.48 (3)
	P < 0.001*	P < 0.001*	P < 0.001*
	P < 0.001**	P < 0.01*	P < 0.9*
		P < 0.1**	P < 0.1**

<sup>o</sup>Los datos se refieren a las nmolas de urea formadas en 60 min por mg de peso húmedo de células

\*Significado estadístico vs el testigo con nucleósido, pero sin hormona.

\*\*Significado estadístico vs el testigo con nucleósido, pero sin nucleósido.

**Cuadro 4**  
**EFFECTO UREOGENICO DE LA ADENOSINA EN PRESENCIA O AUSENCIA DE CALCIO<sup>o</sup>**

Adiciones	Calcio 1.2 mM	Sin calcio
Testigo	9.2 ± 0.30 (4)	8.6 ± 0.18 (4)
Adenosina 1 µM	17.2 ± 0.70* (4)	10.2 ± 1.20** (4)

<sup>o</sup>Los datos se refieren a las nmolas de urea formada en 60 min por mg de peso húmedo de células  
 \* P < 0.001, \*\* P < 0.9

formados por los hepatocitos (Cuadro 1) y modulan la estimulación por glucagon, epinefrina, adenosina e inosina (Cuadro 2). En estos experimentos, la disponibilidad de sustratos ureogénicos, ornitina y carbonato de amonio se encuentran en exceso, por lo que no podría limitar la velocidad en la síntesis de urea. Sobre este punto, es válido preguntar ¿en qué condiciones fisiológicas, la disponibilidad del sustrato oxidable en el hígado modula la respuesta a las hormonas, o en su caso, la de los nucleósidos?

No obstante, falta la prueba contundente y definitiva de la participación de ambos nucleósidos en la fisiología del hígado.

## Abstract

Adenosine and inosine are nucleosides formed during ATP degradation and play an important role on hepatic metabolism regulation. In cells isolated from rat liver, incubated under different experimental conditions, both nucleosides present an ureogenic effect and have the following characteristics: a) This ureogenic effect is present when hepatocytes are incubated with glutamine, alanine or ammonium carbonate, b) The adenosine and inosine regulated metabolic process is dependent upon oxidable substrate, c) When cells are incubated without calcium, an inhibitory effect is observed and d) Adenosine and inosine effects are reverted by glucagon, but not by epinephrine. These described metabolic effects of adenosine and inosine are part of very fine metabolic control system. Its regulation generates the short term response that determines organ functionality. Therefore, it is considered that data presented here is of great physiological importance.

## Literatura citada

- Berne, R.M.: Cardiac nucleotides in hypoxia; a possible role in regulation of coronary blood flow. *Am. J. Physiol.*, 204: 317 (1963).
- Berne, R.M., Rubio, R. and Curnish, R.: Release of adenosine from ischemic brain. Effect on cerebral vascular resistance and incorporation into cerebral adenine nucleotides. *Circ. Res.*, 25: 262 (1974).



## *In Vivo* Activation by Diets and *In Vitro* Activation by Hormones Are Additive for Urea Synthesis in the Rat Liver

Raquel Guinzberg,\* Antonio Diaz-Cruz† and Enrique Piña\*

\*DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY, SCHOOL OF MEDICINE AND †DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY, SCHOOL OF VETERINARY MEDICINE, NATIONAL UNIVERSITY OF MEXICO, MÉXICO

**ABSTRACT.** The basal rate of urea or glucose synthesis, set *in vivo* by different diets, was challenged by addition of hormones to isolated hepatocytes. Basal rate of urea synthesis ranged from 7.1 to 23.5 and 27.8 nmol/mg wet weight cells/hr in hepatocytes prepared from rats with a protein free diet or with two distinct but complete protein diets. Maximum difference in the basal rate of glucose synthesis from lactate was only 26.7% for the same diets. Depending on the basal rate of urea synthesis fixed *in vivo* by the diets, significant *in vitro* activations superimposed on these, either low or high, basal rates with a remarkable constancy: 2.4-fold with glucagon, 1.9-fold with epinephrine and 1.4- to 1.8-fold with adenosine. Likewise, the basal rate of glucose synthesis from lactate, established by these diets, superimposed 3.7-fold with glucagon, 2.4-fold with epinephrine, 2.1- to 2.4-fold with adenosine and 2.0- to 2.5-fold with inosine. The stimulation of hepatocytes *in vitro* showed a direct relationship in the increased rates of urea and glucose synthesis. The short-term activation in urea and glucose synthesis superimposed in proportion to the long-term status of urea or glucose formation set in the liver by the diet. Copyright © 1996 Elsevier Science Inc. COMP BIOCHEM PHYSIOL 115B;3:369-373, 1996.

**KEY WORDS.** Adenosine, diet, epinephrine, glucagon, gluconeogenesis, hepatocytes, protein in diet, ureagenesis, rat

### INTRODUCTION

Control of metabolic pathways can be either long term, involving the synthesis and degradation of enzyme molecules (time range of hours or days), or short term, via activation or inhibition of existing enzyme molecules (time range of seconds or minutes). Gluconeogenesis and ureagenesis in the rat liver are among the metabolic pathways thus regulated, and abundant literature on these topics is already available (for reviews see 18,20,21). Activities of the urea cycle enzymes, for example, are highest in response to high-protein diets and are reduced in response to low-protein or protein-free diets (22,23). These diet-dependent changes in urea cycle enzyme activity are primarily the consequence of changes in enzyme mass (19,22,23), which in turn largely reflect altered enzyme synthesis rates (28). It is likely that dietary responses are mediated primarily by hormones (25). On the other hand, it is well known that hormones, and some hormone-like substances such as adenosine, can stimulate *in vitro* the synthesis of urea and/or glucose. In isolated rat hepatocytes, the rate of urea synthesis and the rate of

glucose synthesis from lactate are increased in the presence of glucagon (24,27), epinephrine (4,9) or adenosine (11,29).

The aim of this work was to explore in isolated hepatocytes if the short-term activation in the rate of urea synthesis from  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  or glucose synthesis from lactate, both stimulated independently by glucagon, epinephrine or adenosine, could be quantitatively superimposed on the rates of urea or glucose synthesis, previously set in the liver by the different content or quality of protein in four diets. An addition of the short-term activation on the long-term activation might be expected, but information on the quantitative changes might contribute to better understanding the overall metabolic regulation.

### MATERIAL AND METHODS

In the preliminary experiments, recently weaned male Wistar rats were used and were chronically fed *ad libitum* with two different commercial diets: Ladrina or Nutricubos. The content of both diets, according to the producer-label and to the assays performed in our laboratory, are included in Table 1. Ladrina is a canine chow presented in a pellet form that maintains an optimum rat growth rate. Nutricubos is a rodent chow presented in a pellet form that pro-

Address reprint requests to E. Piña, Dept. of Biochemistry, School of Medicine, National University of Mexico, A. Postal 70159, México 04510 D.F. Tel (525) 616-1104 and (525) 623-2403; Fax (525) 623-2155.

Received 30 August 1995; accepted 25 April 1996.

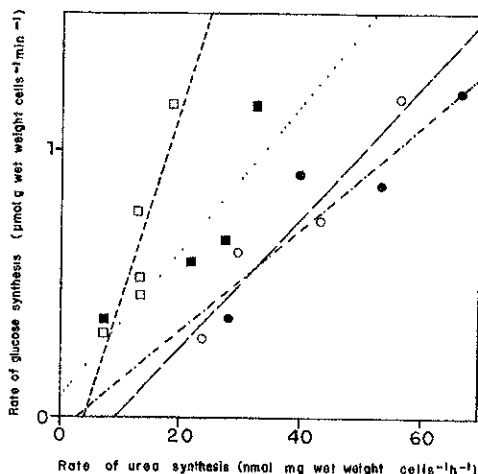


FIG. 1. Relationship between ureagenesis and gluconeogenesis stimulated by effectors in isolated hepatocytes prepared from rats subjected to the following diets:  $\square$ , sucrose;  $\blacksquare$ , Nutricubos;  $\bullet$ , Ladrina;  $\circ$ , boiled egg white. Data are from values recorded in Tables 2 and 3. The correlation coefficient ( $r$ ) calculated for the diets was as follows: sucrose 0.906, Nutricubos 0.87, Ladrina 0.907 and boiled egg white 0.964.

were effective in the four selected diets and the superimposed short-time activation was higher for gluconeogenesis than for ureagenesis: glucagon averaged a quantitative and relatively constant 3.7-fold stimulation over the long-term regulation (except for the Nutricubos diet), epinephrine promoted a 2.4-fold activation (except of the Nutricubos diet) and adenosine and inosine also gave a higher stimulation on *in vitro* glucose synthesis from lactate than the respective stimulation of urea synthesis from  $\text{NH}_4^+$ .

The relationship between the rate of urea synthesis and the rate of glucose synthesis for the experimental groups included in this work is shown in Fig. 1. The values recorded in Tables 2 and 3 represent an average of six individual assays, each value was used to construct Fig. 1. Points represent the intersection of the urea value with that of glucose value, for a particular diet, with or without an effector added *in vitro*. Analysis for a linear correlation ( $r$ ) was calculated for each diet.

## DISCUSSION

The main question in this article is answered affirmatively: the short-term activation, promoted by hormones or nucleosides, add in proportion over the long-term status defined by the diets. These short-term activations were systematically higher for gluconeogenesis (Table 3) than for ureagenesis (Table 2). However, the overall stimulation, long-

term plus short term, was 9.2-fold for ureagenesis, comparing the basal rate in cells from a protein-free diet and incubated without hormones, with the value obtained in hepatocytes incubated with glucagon and obtained from animals fed with Ladrina (Table 2). For gluconeogenesis, the greatest long-term stimulation plus short-term stimulation was a 4.1-fold increase (Table 3).

On the other hand, as can be concluded from the  $r$  values included in the legend of Fig. 1, there is a similar stimulation between the rate of urea synthesis from  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  and the rate of glucose synthesis from lactate, in isolated hepatocytes prepared from each one of the selected diets when they are stimulated with glucagon, epinephrine or adenosine. These results agree with previous reports showing a direct relationship between the increase in ureagenesis and that of gluconeogenesis in isolated hepatocytes (17). However, a reciprocal change in gluconeogenesis and ureagenesis was induced by fatty acid oxidation or using proline as ammonium source (3,15).

Results recorded with Nutricubos are conflicting: (1) chronic feeding with this diet, containing 27% protein (Table 1), promotes a growth rate 20% below the optimum, (2) basal rate of urea synthesis is comparable with a protein free diet (Table 2), (3) on a percent basis, the greatest *in vitro* increase over the basal rate of urea synthesis was observed in rats fed with Nutricubos (Table 2) and (4) in cells prepared from these rats the stimulated values for ureagenesis or gluconeogenesis did not match quantitatively with the values obtained for the three other diets. These data suggest that Nutricubos diet is qualitatively incomplete, incompletely digested or does not meet the energy requirements of rats. Supplemental experiments with synthetic diets might be adequate for solving these new inquiries, but the results with Nutricubos listed below cannot invalidate the leading conclusion: the *in vitro* activation in urea and glucose synthesis is added to the *in vivo* status of urea or glucose formation established by the diet. Furthermore, the direct relationship between the rate of ureagenesis and gluconeogenesis in hepatocytes prepared from the selected diets was observed for all diets, including the Nutricubos one (Fig. 1).

Data recorded with Ladrina, boiled egg white and sucrose allow some additional comments. The diet-dependent adjustment in urea synthesis *in vivo*, reported more than 30 years ago (22,23), was reproduced by the incubation of isolated liver cells prepared from animals maintained with the described diets. Additionally, when comparing the data obtained with the control protein diet with those of a protein-free diet, there is a decrease of 75% in the *in vivo* rate of urea excretion (23), the hepatic levels of urea cycle enzymes (23) and the basal rate of urea synthesis in isolated hepatocytes (Table 2). The latter model seems to be simpler to perform and to study.

High-protein (around 50%) carbohydrate-free diets (HPCF diets) have been used to obtain substantial differ-

- tration in hepatocytes is mediated by an increase in cyclic AMP concentration. *Eur. J. Biochem.* 179:47-52;1989.
27. Titheradge, M.A.; Haynes, R.C. Jr. The hormonal stimulation of ureogenesis in isolated hepatocytes through increases in mitochondrial ATP production. *Arch Biochem. Biophys.* 201: 44-55,1980.
28. Tsuda, M.; Shikata, Y.; Katsunuma, T. Effect of dietary proteins on the turnover of rat liver argininosuccinate synthetase. *J. Biochem.* 85:699-704;1979.
29. Zentella de Piña, M.; Díaz-Cruz, A., Guinzberg, R ; Piña, E. "Hormone-like" effect of adenosine and inosine on gluconeogenesis from lactate in isolated hepatocytes. *Life Sci.* 45: 2269-2274;1989.