

2ej. 49



**Universidad Nacional Autónoma  
de México**

**FACULTAD DE QUIMICA**

**ESTUDIO SOBRE EL MECANISMO DE INDUCCION DE  
GLUCONEOGENESIS Y UREOGENESIS POR ADENOSINA  
" IN VIVO "**

**T E S I S**

Que para obtener el Título de  
**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

p r e s e n t a

**PATRICIA LORETO GONZALEZ RAZO**



México, D. F.

1987



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## INDICE

	PAGINA
Introducción.....	6
Adenosina. Importancia Fisiológica.....	8
Efectos neuronales.....	8
Efectos cardiovasculares.....	9
Efectos sobre acciones hormonales.....	9
Efectos citotóxicos.....	9
Acciones bioquímicas.....	9
Gluconeogénesis. Importancia Fisiológica.....	12
Regulación.....	12
Enzimas importantes que participan.....	13
Ureogénesis. Importancia Fisiológica.....	16
Regulación.....	16
Interrelación entre gluconeogénesis y ureogénesis.....	18
Objetivo.....	23
Materiales y Métodos.....	24
Animales.....	24
Tratamiento con adenosina <u>in vivo</u> .....	24
A. Rebanadas de Hígado. Incubaciones.....	24
Sustratos.....	25
Desproteínización.....	25
B. Mitocondrias aisladas con fracción soluble.....	25
Incubaciones.....	26
Sustratos.....	26
Desproteínización.....	26
Producción de <sup>14</sup> CO <sub>2</sub> .....	27

	PAGINA
Determinación de metabolitos.....	28
Cálculos.....	30
Determinación de incorporación de radioactividad a metabolitos.....	31
Estadística.....	32
<b>Resultados</b>	
Efecto de la adenosina en gluconeogénesis y ureo- génesis en rebanadas hepáticas.....	33
Mitocondrias aisladas reconstituidas con fracción soluble.....	36
Mitocondrias aisladas sin fracción soluble.....	37
Discusión.....	38
Bibliografía.....	46

ABREVIATURAS UTILIZADAS.

ADP	Adenosín difosfato
AOA	Acido oxaloacético
Asp	Aspartato
ATP	Adenosín trifosfato
$\alpha$ -CG	Alfa-cetoglutarato
Ci	Curie
cpm	Cuentas por minuto
D.O.	Densidad óptica
GDP	Guanosín difosfato
Glu	Glutamato
GTP	Guanosín trifosfato
LAC	Lactato
MAL	Malato
MDH	Malato deshidrogenasa
MDHc	Malato deshidrogenasa citosólica
MDHm	Malato deshidrogenasa mitocondrial
NAD <sup>+</sup>	Nicotín adenín dinucleótido oxidado
NADH	Nicotín adenín dinucleótido reducido
NADP <sup>+</sup>	Nicotín adenín dinucleótido fosfato oxidado.
NADPH	Nicotín adenín dinucleótido fosfato reducido.
PEP	Fosfoenol-piruvato
Pi	Fósforo inorgánico
Pir	Piruvato
TGO	Transaminasa glutámico oxaloacética

## INTRODUCCION.

Desde 1968(1), Chagoya de Sanchez, et.al. han llevado a cabo estudios sobre el efecto que tiene la administración in vivo de adenosina sobre el metabolismo hepático. De estos estudios se ha desprendido que el uso del nucleósido puede ser una excelente arma farmacológica para el estudio de la regulación del metabolismo intermediario del tejido hepático.

Los efectos que promueve la adenosina en ratas sometidas a un estado en ayuno moderado, han indicado que los procesos biosintéticos del hígado son favorecidos como ocurre en el patrón metabólico de un animal que se encuentra en condiciones de alimentación adecuada. Como ejemplo de estos efectos se puede citar el incremento en la actividad de la glucógeno sintetasa y la velocidad de recambio del glucógeno, la inhibición de la activación y subsecuente oxidación de los ácidos grasos libres así como la disminución de la lipogénesis. En estudios más recientes se ha demostrado que el tratamiento con el nucleósido favorece la utilización de etanol por el hígado, efecto que parece estar relacionado con una participación directa de la lanzadera mitocondrial del malato-aspartato, sugiriendo fuertemente que existen efectos de la adenosina sobre la actividad mitocondrial.

Dos vías que se consideran netamente hepáticas, como son la gluconeogénesis y la ureogénesis, comparte varios puntos en común: sustratos, coenzimas y efectores, y muy importantemente,

la localización subcelular de los pasos enzimáticos de estas vías metabólicas intra y extramitocondriales.

En el presente trabajo de tesis se estudiaron estas dos vías metabólicas y el posible efecto que sobre éstas puedan tener las modificaciones de la adenosina en la función mitocondrial. Incluyendo que ésta función pueda estar inhibida o favorecida por la acción del nucleósido y que induzca un cambio en los procesos biosintéticos del hepatocito.

Con el fin de lograr una comprensión más correcta del problema que se pretendió abordar, la introducción se divide en: a) características de adenosina, b) factores regulatorios de gluconeogénesis y ureogénesis y c) la interrelación entre éstas vías metabólicas.

## ANTECEDENTES GENERALES.

### ADENOSINA.

La 6-amino-9-D-ribofuranosil-9-H purina, también conocida como adenosina, es un nucleósido formado de adenina y ribosa.

Este nucleósido juega un importante papel al ser molécula precursora de nucleótidos como el AMP, ADP y ATP, indispensables en el metabolismo energético y en la constitución de coenzimas y material genético (2).

La adenosina es transportada a las células por difusión facilitada. Puede ser sintetizada por las células a partir de la desfosforilación de AMP catalizada por fosfatasa o una 5'-nucleotidasa específica, o también de la degradación de S-adenosilhomocisteína por la S-adenosilhomocistina hidrolasa.

Se sabe que ciertos tejidos como miocardio y tejido adiposo son capaces de liberar adenosina.

Se ha reportado varias acciones biológicas de los compuestos de purina, siendo las más comunes las del ATP y la adenosina. En este caso, solo se mencionarán las acciones y efectos causados por la adenosina:

### ACCIONES MULTIPLES.

1. Efectos neuronales. La adenosina y el ATP tienen efectos depresores en el sistema nervioso periférico(3).



2. Efectos cardiovasculares. En condiciones de hipoxia el corazón muestra una reducción en la resistencia vascular coronaria asociada con un incremento en la liberación de adenosina (4).

3. Efectos sobre acciones hormonales. La adenosina estimula la esteroidogénesis, en las glándulas adrenales y células de Leyding, así como la secreción de glucagón (5) y hormona de crecimiento (4); por el contrario, el nucleósido inhibe la liberación de insulina bajo estímulo de glucosa (5,6).

4. Efectos citotóxicos y de inmunosupresión. Los efectos citotóxicos de la adenosina se pueden asignar principalmente a la inhibición de la síntesis de pirimidinas. También se ha observado que la adenosina posee acciones que dificultan o impiden la respuesta inmune(7).

#### TRABAJOS PREVIOS.

Algunas de las acciones bioquímicas de la adenosina, en el metabolismo hepático y del tejido adiposo que han servido de antecedentes a éste trabajo son las siguientes:

a. El aumento de 40% de la poza de ATP, y consecuente elevación de la carga energética de la célula hepática (8, 9).

El aumento de carga energética en hígado in vivo, se ha confirmado in vitro en hígado perfundido, en rebanadas de hígado

y en hepatocitos aislados(8).

b. Aumento de 8 veces la actividad de la glucógeno sintetasa de hígado de rata, considerada como el punto de mayor importancia en la biosíntesis de glucógeno. Esta elevación no está mediada por insulina, pues en las ratas diabéticas se observa un incremento de 5 veces la actividad de la forma activa de la enzima glucógeno sintetasa (9).

c. El aumento de 6 veces la incorporación de alanina al glucógeno hepático (gluconeogénesis) (10).

d. Aumento de 13 veces la incorporación de glucosa-<sup>14</sup>C al glucógeno hepático (glucogénesis) (10).

e. El aumento de 5 veces en la lipogénesis en el tejido adiposo del epidídimo (11).

f. Acción antilipolítica de la adenosina in vitro (12).

g. En hígado la adenosina deprime in vivo e in vitro la oxidación de cadenas de ácidos grasos, por inhibir la Acil-CoA sintetasa extramitocondrial(13).

h. La disminución de la lipogénesis hepática (14).

El patrón metabólico que se observa en presencia de la adenosina, se caracteriza por una tendencia a incrementar los procesos anabólicos, como la síntesis de glucógeno y disminuir los catabólicos como la oxidación hepática de ácidos grasos, lo que nos conduce a la conclusión que por un mecanismo aún no muy claro, la adenosina cambia el patrón metabólico de animal en ayunas a uno de animal alimentado. Probablemente el eje

alrededor del cual gira este cambio, sea el aumento de la carga energética que se sabe favorece secuencias anabólicas, e inhibe las catabólicas.

#### ANTECEDENTES DIRECTOS.

1. El aumento de gluconeogénesis a partir de lactato in vivo (15).

2. La vía gluconeogénica, requiere de equivalentes reductores y éstos se generan en el citosol promovidos por la mitocondria. En la mitocondria estos equivalentes reductores pueden provenir de la -oxidación, pero, al dar tratamiento con adenosina la oxidación de los ácidos grasos se inhibe (13).

3. La adenosina en presencia de etanol promueve la movilización de equivalentes reductores del citosol a la mitocondria (16).

4. La adenosina estimula la ureogénesis (17).

## ANTECEDENTES ESPECIFICOS.

### GLUCONEOGENESIS

#### Importancia Fisiológica.

La gluconeogénesis es el proceso que permite satisfacer las demandas de glucosa del organismo cuando no se dispone de suficiente cantidad de carbohidratos en la dieta. Se necesita un suministro continuo de glucosa como fuente de energía, especialmente para el sistema nervioso y los eritrocitos.

La mayor parte de las reacciones son la reversa de la glicólisis(18), consume energía, provee glucosa a animales en ayunas y también glucosa-6-fosfato en microorganismos que crecen en ausencia de glucosa; es así, esencial para la supervivencia, porque todas las células requieren derivados de glucosa como sustrato energético y en la formación de glucolípidos, glicoproteínas y polisacáridos estructurales, los cuales son constituyentes normales de las membranas.

#### Regulación.

La regulación de ésta vía, está localizada en tres puntos importantes de la secuencia multienzimática que la constituye. Estos son a nivel de: 1. piruvato a fosfoenol-piruvato; 2. fructosa-1,6-difosfato a fructosa-1-fosfato y 3. glucosa-6-fosfato a glucosa.

Para que se lleve a cabo la primera reacción se necesitan

dos enzimas importantes que son la piruvato carboxilasa y la fosfoenolpiruvato carboxicinasas (Fig. 1). En las siguientes dos reacciones, participan dos fosfatasa, la D-fructosa-1,6-difosfato-1-fosfatasa y la D-glucosa-6-fosfatasa (18).

Estos tres pasos deben ser controlados de una manera sincronizada por un mecanismo concertado, para prevenir acumulación excesiva de metabolitos intermediarios.

En los organismos superiores, mientras que glicólisis ocurre en todas las células, gluconeogénesis opera solamente en hígado y riñón.

#### Enzimas Importantes que participan en Gluconeogénesis.

Piruvato carboxilasa (EC 6.4.1.1). El primer paso de la gluconeogénesis a partir de piruvato, es catalizado por piruvato carboxilasa una enzima exclusivamente mitocondrial (19,20). La actividad de la enzima es modulada positivamente por acetil-CoA, favorecida por una alta relación ATP/ADP, e inhibida por glutamato (21). La insulina la inhibe y el cortisol aumenta su actividad (22,23). Esta enzima es fundamental para la producción de oxaloacetato en gluconeogénesis y como parte de un mecanismo anaplerótico de intermediarios del Ciclo de Krebs (Fig. 1).

Fosfoenolpiruvato carboxicinasas (EC 4.1.1.32). Enzima que cataliza la segunda reacción importante de gluconeogénesis (Fig. 1). Esta enzima es exclusivamente mitocondrial en el

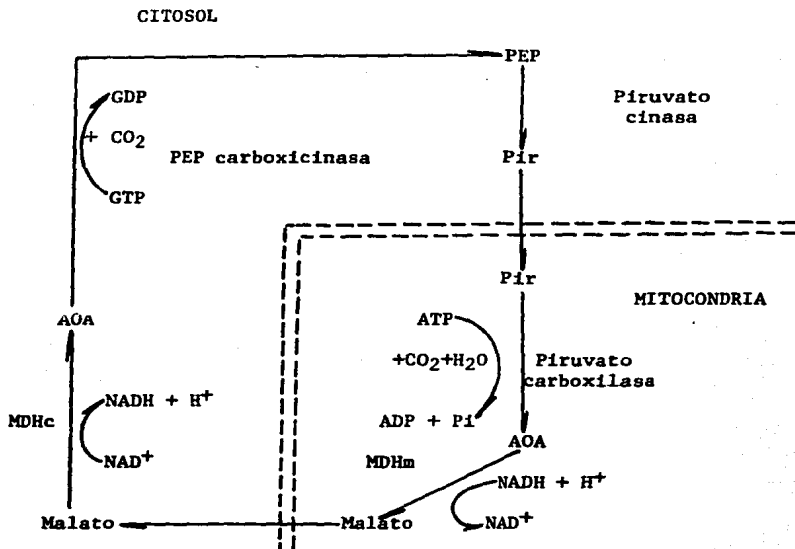


FIG. 1. ENZIMAS INICIALES DE LA GLUCONEOGENESIS

conejo y la paloma, mientras que en el cobayo y en el hombre está distribuida tanto en citosol como en mitocondrias (24,25). A diferencia de estas especies, en el hígado de rata y el ratón la PEP-carboxicinas se encuentra en el citosol, así el transporte de malato y aspartato hacia el citosol es obligatorio para gluconeogénesis a partir de precursores de tres carbonos como lactato, piruvato y alanina(26). La inanición, la diabetes, el glucagón, AMP cíclico, adrenalina y glucocorticoides aumentan el contenido hepático de la enzima (por arriba de 10 U/g), mientras que la insulina presenta el efecto contrario (25).

D-Fructosa-1,6-bifosfato-1-fosfatasa (EC 3.1.3.11). Es una enzima alostérica, en la cual es necesario considerar las concentraciones de sus sustratos y de sus dos inhibidores, AMP cíclico (27) y fructosa-2,6-difosfato (18). Su actividad es dependiente de  $Mg^{2+}$ (2).

D-glucosa-6-fosfatasa (EC 3.1.3.9). El hígado de rata alimentada contiene aproximadamente 14 U. de glucosa-6-fosfatasa por gramo y esta cantidad es el doble en inanición o diabetes (18). Es común creer que porque esta enzima ocupa una posición estratégica en el mantenimiento de la homeostasis de glucosa, puede ser regulada estrictamente, sin embargo, solo se presenta una ligera inhibición por los productos de reacción, glucosa y Pi, cuyos efectos son pequeños cuando juegan un papel en condiciones fisiológicas (18).

## UREOGENESIS

### Importancia Fisiológica.

En los tejidos de mamíferos los grupos aminos de los  $\alpha$ -aminoácidos, derivados ya sea de la dieta o de la demolición de las proteínas tisulares son excretados, en último término, como urea en la orina.

La urea, es el producto final característico del metabolismo del nitrógeno de los aminoácidos en el hombre y otros organismos ureotélicos como la rata.

La principal ruta para la excreción de nitrógeno en el hombre es la urea sintetizada en el hígado, vertida a la sangre y eliminada por el riñón.

El hígado es el único órgano capaz de sintetizar urea. El humano sintetiza de 20 a 30 g. de urea por día y es un proceso que requiere una cantidad sustancial de energía como ATP (2,25,26).

### Enzimas que participan en Ureogénesis.

La urea se forma por un grupo especial de enzimas, cuyo funcionamiento combinado constituye el ciclo de la urea (Fig. 2). Se lleva a cabo en solo cinco reacciones, cada una catalizada por una enzima diferente.

### Regulación.

Se ha descrito que la síntesis de urea es controlada en el paso de carbamil-fosfato sintetasa (EC 2.7.2.2), por cambios en



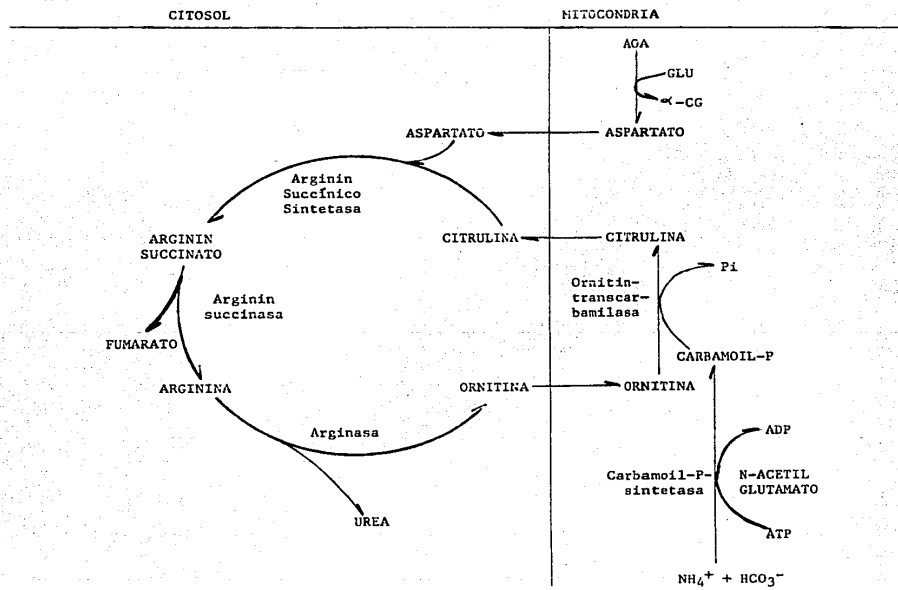


FIG. 2. CICLO DE LA UREA.

la concentración de N-acetil glutamato (30,31,32,33).

Ahora bien, la fuente inmediata del nitrógeno proviene de:

- a. Ión amonio.
- b. Grupo amino del aspartato.

El carbono de la urea se origina a partir del  $\text{CO}_2$ , el cual de este modo puede considerarse como aceptor del nitrógeno. Este proceso es significativamente endergónico y requiere 3 moléculas de ATP por molécula de urea producida (28,29,34,35).

Aunque el ión amonio y el aspartato son fuentes de nitrógeno inmediatas, ambas pueden provenir del glutamato. El aspartato puede adquirir su grupo amino del glutamato por simple transaminación, actuando el oxaloacetato como cetoácido aceptor (Fig. 2).

Las sustancias que aumentan la síntesis de urea son iones  $\text{NH}_4^+$ , ornitina, lactato, piruvato y fructosa. Es claro que el ión amonio y bicarbonato pueden ser limitantes, ya que son los que ponen en marcha la síntesis de urea (36).

## INTERRELACION ENTRE GLUCONEOGENESIS Y SINTESIS DE UREA.

Esta interrelación que existe entre gluconeogénesis y ureogénesis se observa por lo siguiente:

a). La bicompartimentalización de sus síntesis que se llevan a cabo tanto en mitocondria como en el citosol. La gluconeogénesis al igual que la ureogénesis se inician en la mitocondria y continúan sus reacciones en el citosol (Fig. 1 y 2).

b). Una vía común a los dos procesos metabólicos es el ciclo de los ácidos dicarboxílicos (Fig. 2 y 3). De los sustratos que participan en ambas vías son el aspartato,  $\alpha$ -cetoglutarato y glutamato(36). El aspartato se forma a partir del oxaloacetato y glutamato por la acción de la transaminasa glutámico oxaloacética (EC 2.6.1.1) que transfiere el grupo amino del glutamato al oxaloacetato, originando  $\alpha$ -cetoglutarato. La enzima que participa en ésta transaminación, se encuentra tanto en citoplasma como en mitocondria (37) por lo que estas reacciones se llevan a cabo en ambos compartimentos (Fig. 2 y 4 ). El paso de metabolitos de mitocondria a citosol y viceversa, se llevan a cabo através de translocadores específicos, así, el glutamato y malato pueden entrar a la mitocondria en tanto que aspartato y  $\alpha$ -cetoglutarato salgan de ella (38,39).

El mecanismo por el cual se moviliza el aspartato, lleva implícita una porción del ciclo de los ácidos dicarboxílicos el cual es importante en gluconeogénesis por ser el donador del

esqueleto de carbonos y potencialmente en ureogénesis al dar uno de los grupos aminos en la síntesis de urea, inclusive, se sabe que el intermediario en la formación de glucosa a partir de lactato es el aspartato, y cuando se forma a partir de piruvato o alanina es através de malato (Fig. 4 y 5) (36).

Otra participación importante del ciclo de los ácidos dicarboxílicos es en la transferencia de equivalentes reductores de citosol a mitocondria y visceversa (37,40,41).

c). Otro motivo de interconexión entre la gluconeogénesis y ureogénesis, a parte de los sustratos, es el requerimiento de los dos procesos por el ATP.

Para la síntesis de una molécula de glucosa a partir de lactato, se requiere de 6 moléculas de ATP y para la síntesis de una molécula de urea a partir de 8 aminoácidos o iones amonio, se requieren de 4 moléculas de ATP (36).

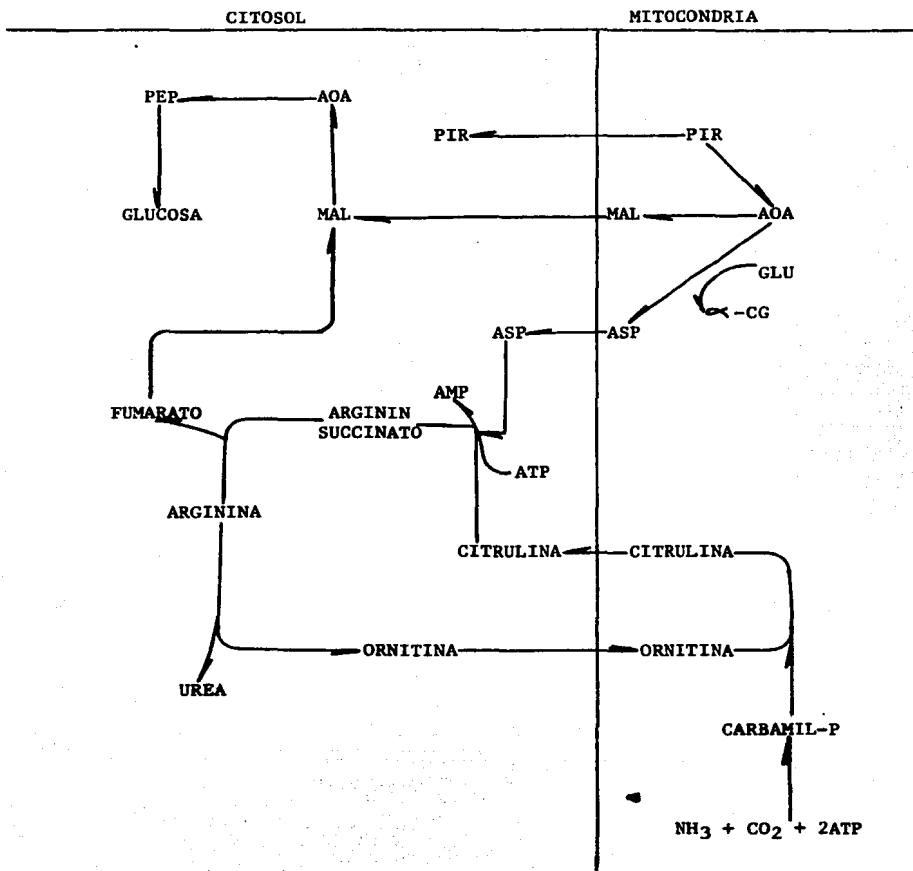


FIG. 3. INTERRELACION ENTRE GLUCONEOGENESIS Y UROGENESIS.

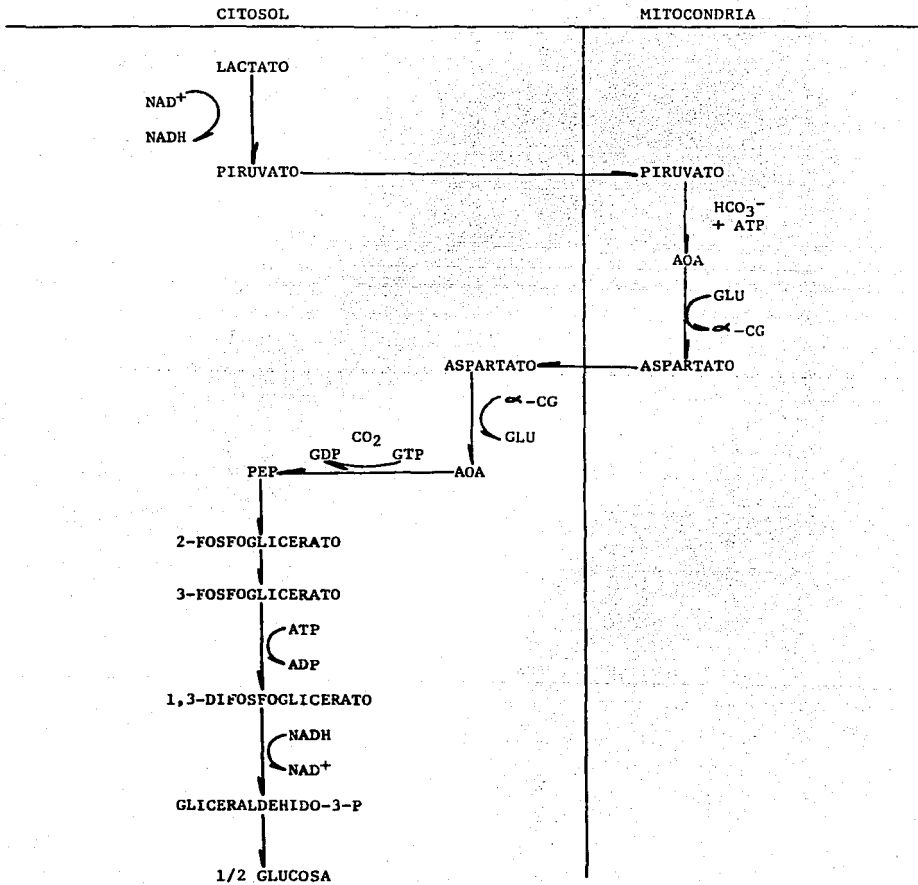


FIG. 4. GLUCONEOGENESIS A PARTIR DE LACTATO EN HIGADO DE RATA

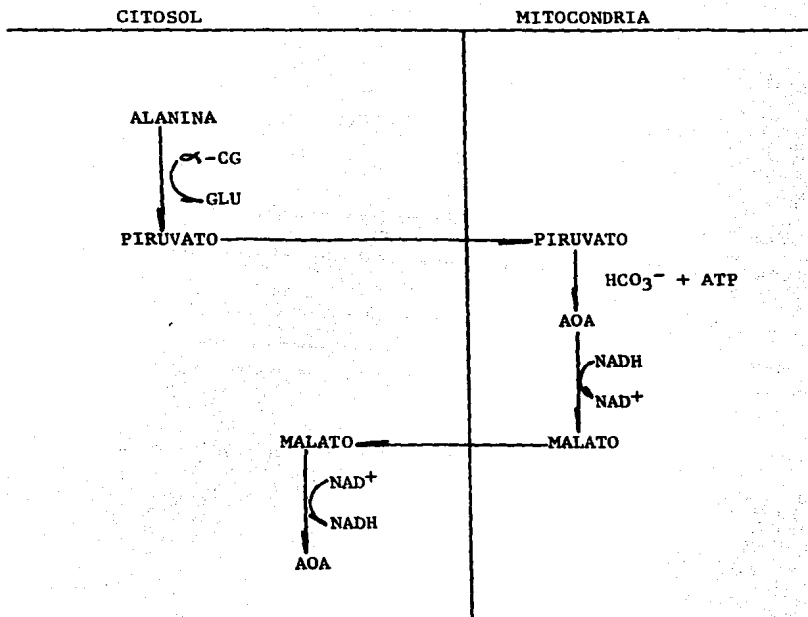


FIG. 5

PASOS INICIALES Y COMPARTIMENTALIZACION DE GLUCONEOGENESIS A PARTIR DE ALANINA O PIRUVATO EN HIGADO DE RATA.

## OBJETIVO GENERAL

Determinar la fuente de carbono para gluconeogénesis.

## OBJETIVOS PARTICULARES

- A. Ver si la gluconeogénesis reportada "in vivo" se reproducía en un sistema más sencillo.
- B. Averiguar cuál es la vía que predomina como donadora del esqueleto carbonado.
- C. Probar otra vía en la que participe el ciclo de los ácidos dicarboxílicos.
- D. Ver ureogénesis.



## MATERIALES Y METODOS.

### Animales.

Se trabajó con ratas macho de la cepa Wistar, de un peso aproximado de 150-200 g., a las cuales se les suprimió el alimento por 18-20 horas antes del tratamiento.

### Tratamiento con adenosina in vivo.

Las ratas control recibieron solución salina isotónica y las ratas experimentales se les administró adenosina (200 mg/Kg de peso) disuelta en solución salina a pH 7.4. El volumen inyectado fué a razón de 1 ml. por 100 g. de peso corporal y por vía intraperitoneal. Los tiempos de tratamiento fueron de 15, 30 y 60 minutos, al término de estos tiempos, los animales se sacrificaron por decapitación y se extrajo el hígado rápidamente.

### A. REBANADAS DE HIGADO.

El hígado se cortó en rebanadas de 0.5 mm. de grosor, de las cuales se pesaron 500 mg. (peso húmedo) y se incubaron.

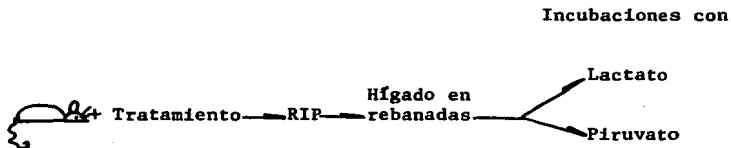
### Incubaciones.

Se realizó en 5 ml. de medio de Krebs-Ringer bicarbonato, previamente gaseado por 15 minutos con 95% de O<sub>2</sub> y 5% de CO<sub>2</sub> (v/v), ajustándose a pH 7.4 con Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.

La incubación se hizo por 30 minutos a 37°C con agitación continúa.

### Sustratos.

Al medio de incubación, se le adicionó palmitato de potasio 0.5 mM., sustrato frío y marcado de lactato y piruvato. Cada rata en experimentación se probó con los dos sustratos, como se señala en el esquema siguiente:



La concentración de lactato frío que se usó fué de 1.5mM y  $1 \times 10^6$  cpm. de [ $^{14}\text{C}(\text{U})$ ]-Lactato (Actividad Específica 174.3 mCi/mmol).

La concentración de piruvato frío fué de 2.0 mM. y también  $1 \times 10^6$  cpm. de [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ]-Piruvato (Actividad Específica 17.3 mCi/mmol).

### Desproteinización.

La incubación se terminó desproteinizándose con  $\text{HClO}_4$  con el volumen necesario para una concentración final de 6% p/v.

### B. MITOCONDRIAS AISLADAS RECONSTITUIDAS CON FRACCION SOLUBLE.

A una rata tratada, se le extrajo el hígado y se preparó la fracción soluble según A. Dawson (42). De otra rata tratada en

idénticas condiciones se preparó la fracción mitocondrial según método de Schneider y Hogeboom(43).

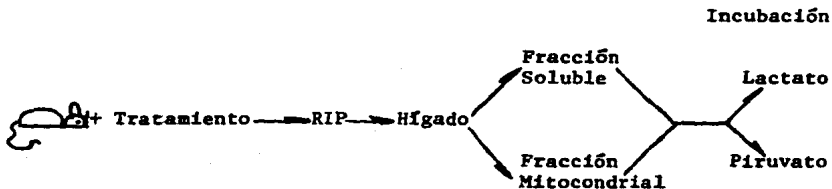
#### Incubaciones.

La incubación se hizo con la fracción mitocondrial (5 mg. de proteína) y con fracción soluble (10 mg. de proteínas) a 30°C por 20 minutos con agitación continua, en 3 ml. de medio que contiene manitol 300 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  10 mM, Tris-HCl 10mM, KCl 10 mM,  $\text{MgCl}_2$  5 mM, ADP 2 mM y  $\text{NAD}^+$  2  $\mu\text{M}$  (42).

#### Sustratos.

Se usó lactato y piruvato frío y marcado para cada animal en experimentación, como se señala en el esquema de abajo. El lactato frío se usó a una concentración de 1.5 mM. y  $5 \times 10^5$  cpm. de [ $^{14}\text{C}(\text{U})$ ]-Lactato.

El piruvato frío a una concentración de 2.0 mM. y  $5 \times 10^5$  cpm. de [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ]-Piruvato.



#### Desproteínización.

La incubación se terminó adicionando  $\text{HClO}_4$  hasta una concentración final de 6% p/v.

Producción de  $^{14}\text{CO}_2$ . (Oxidación de  $^{14}\text{C(U)}$ )-Lactato y  
[1- $^{14}\text{C}$ ]-Piruvato.

En los matraces de incubación, se utilizaron canastillas aéreas que contenían 0.2 ml. de hidróxido de hiamina, con el objeto de captar el  $^{14}\text{CO}_2$  liberado de las rebanadas de hígado y de mitocondrias con fracción soluble. Después de desproteínizar las muestras se dejaron a temperatura ambiente por 15 minutos. Al término de este tiempo el hidróxido de hiamina se transfiere a viales que contenían 10 ml. de líquido de centelleo (1.2% PPO (2,5-difeniloxazolil) y 0.3% POPOP (1,4-bis 2(5-feniloxazolil)-benceno) en tolueno).

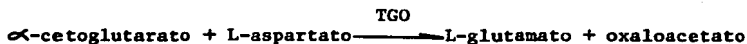


los aminoácidos dibásicos. Una solución ácida y el calor promueven la reacción que usualmente incorpora un oxidante, tal como el sulfato de amonio férrico para destruir la hidroxilamina que se puede formar. Se mide en una longitud de onda de 420 nm. (45).

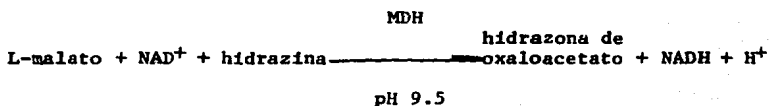
\* Se determinó exclusivamente en rebanadas de hígado, teniendo un control desnaturalizado por el calor, para eliminar la urea que tuviera en sí la rebanada de hígado. La determinación se hizo de un homogenado de las rebanadas.

Metabolitos de la lanzadera malato-aspartato.

a. Aspartato. Se determinó según Pleiderer (44), donde el aspartato en presencia de  $\alpha$ -cetoglutarato y la transaminasa glutámico oxaloacética (TGO) forman oxaloacetato, el cual con malato deshidrogenasa (MDH) y NADH forman malato. La disminución de densidad óptica se observa a una longitud de onda de 340 nm.



b. Malato. Este sustrato se determina según Hans-Jürgen Hohorst (44). La reacción es catalizada por malato deshidrogenasa (MDH) que por reducción de  $\text{NAD}^+$  se observa cambio de D.O. a una longitud de onda de 340 nm. La reacción requiere un medio alcalino (solución amortiguadora de hidrazina-glicina pH 9.5) y el oxaloacetato reacciona con la hidrazina formando una hidrazona.



Proteínas. Se determinaron por el método de Biuret.

#### Cálculos.

Para obtener las concentraciones de estos metabolitos, se usó la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración} = \frac{\text{D.O.} \times \text{volumen final}}{(\text{nmol /g.t.h.}) \text{ muestra} \times \epsilon \times \text{peso de la muestra}}$$

$\epsilon$  = absorbancia de NADH o NADPH y con valor de 6.22, el coeficiente de extinción.

g.t.h. = gramo de tejido por hora.

## Determinación de Incorporación de radioactividad a metabolitos.

Para determinar la incorporación de marca en aspartato y malato a partir de [ $^{14}\text{C}(\text{U})$ ]-Lactato y [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ]-Pirúvico, se realizó por cromatografía en placa fina.

La cromatografía de aspartato se realizó en un soporte de celulosa, aplicando 10 ul. de una muestra concentrada 5 veces y con 1 ul. de acarreador (ácido aspártico 20 mM pH 7). La primera fase móvil fue n-butanol, ácido acético glacial y agua (4:1:15), la segunda fase móvil, metanol, agua y piridina (20:5:1), con tiempo de corrimiento de 5 y 1 horas respectivamente (46). Se reveló con ninhidrina al 0.8% en etanol. El Rf de aspartato fue 0.59.

La cromatografía para separar al malato se realizó en un soporte de sílica gel, aplicando 20 ul. de la misma muestra concentrada y 5 ul. de acarreador (malato 20 mM). El eluyente inicial fue etanol, agua y amoníaco (80:16:4). La segunda fase móvil es idéntica a la primera pero se adicionó púrpura de bromoceresol como revelador, a una concentración de 0.04% y con pH ajustado a 8.0 (47).

El tiempo de corrimiento fue 1.30 y 2.20 horas respectivamente. En este caso, las manchas violáceas se observaron con vapores de amoníaco. El Rf fue 0.23.

Las manchas son raspadas y colocadas en viales con tritosol para su conteo.



### Cálculo de la Actividad Específica.

Este valor resulta de relacionar la radioactividad en el compuesto separado y su concentración en la muestra.

$$\text{Radioactividad en el compuesto} = \frac{\text{c.p.m.} \times \text{volumen final}}{\text{muestra} \times \text{peso del tejido}} = \text{c.p.m./g.t.h.}$$

$$\text{Actividad Específica} = \frac{\text{radioactividad}}{\text{concentración}} = \text{c.p.m./mol.}$$

### Estadística.

Los resultados se presentan como el promedio de por lo menos cinco experimentos, indicando el error estándar. Se utilizó la prueba de "t" con un valor menor o igual a 0.05 para determinar si eran significativos.

## RESULTADOS

### EFFECTO DE LA ADENOSINA EN GLUCONEOGENESIS Y UROGENESIS EN REBANADAS HEPATICAS

El tratamiento con adenosina favorece que la formación de glucosa y urea en rebanadas hepáticas se incremente, dependiendo del sustrato que se empleé (Fig. 6 y 7).

Así, cuando se utiliza lactato como sustrato con tiempos tempranos de tratamiento (15 min.), la liberación de glucosa y urea en el medio de incubación se incrementa en animales tratados con adenosina (Fig. 6).

Sin embargo, el perfil que presenta a los 30 y 60 minutos fué diferente. A estos tiempos de tratamiento, la formación de glucosa en rebanadas hepáticas a partir de lactato permanece alta en animales tratados por el nucleósido, mientras que el incremento en la ureogénesis "inducida" por la adenosina decae a los 30 y 60 minutos (Fig. 6).

Los datos de gluconeogénesis son muy semejantes a lo encontrado en hígados de animales tratados con adenosina y lactato radiactivo, in vivo (15).

En cambio, cuando se utilizó piruvato como sustrato, en rebanadas hepáticas provenientes de animales tratados con adenosina, solo se encontró un incremento transitorio en la formación de glucosa, y este fué a los 15 minutos de tratamiento (Fig. 7), mientras que la formación de urea, no fué afectada a ningún tiempo de tratamiento.

Esto podría sugerir que el efecto de la adenosina sobre

ambas vías metabólicas, puede estar relacionado con la vía metabólica que sigue cada sustrato para integrarse a la gluconeogénesis y ureogénesis.

EFFECTO DE LA ADENOSINA EN EL DESTINO METABOLICO DE LACTATO Y PIRUVATO (Transformación a malato, aspartato y  $\text{CO}_2$ ) POR:

A. Rebanadas Hepáticas.

B. Mitocondrias aisladas reconstituídas con fracción soluble.

C. Mitocondrias aisladas sin fracción soluble.

Ya que la lanzadera malato-aspartato presenta pasos mitocondriales y citosólicos (16,37,42), se intentó ver el efecto de adenosina en el destino metabólico de lactato y piruvato, los cuales son metabolizados por piruvato carboxilasa o piruvato deshidrogenasa, favorecidos uno u otro, y reflejados en algún metabolito.

Para ésto, se midió la aparición de marca tanto en aspartato como en malato, como índice de la actividad de la piruvato carboxilasa de la vía gluconeogénica y como índice de la oxidación de los sustratos empleado y actividad de la piruvato deshidrogenasa, se midió la liberación de  $\text{CO}_2$  marcado.

A. REBANADAS HEPATICAS.

La oxidación de sustratos por medio del ciclo de Krebs, también fué modificada por el tratamiento con la adenosina

(Tabla 1). Las rebanadas de hígado tanto de animales tratados con salina como con adenosina mostraron una mayor utilización de pirúvico, lo cual se midió por la liberación de  $\text{CO}_2$  al medio.

En los animales tratados con adenosina por 15 minutos, la oxidación del lactato fué semejante al control (Tabla 1), a pesar del incremento de marca en el aspartato y malato, lo cual indica que aún en presencia de una alta carboxilación del pirúvico no hubo disminución del flujo a través del ciclo de Krebs.

Sorprendentemente a los 30 minutos de tratamiento fué notorio un aumento de la capacidad mitocondrial usando lactato como sustrato (Tabla 1). Este incremento se acompañó de una disminución en la formación de aspartato con el consiguiente aumento de malato, el cual es significativo con un valor de  $p < 0.05$  (Fig. 8).

A 60 min. de tratamiento, nuevamente se ha reestablecido el equilibrio inicial y no se encuentran diferencias tanto en la oxidación de lactato como en su incorporación a aspartato y malato cuando se compara con las muestras de hígado obtenidas de animales controles.

En el caso de la oxidación de pirúvico, el patrón metabólico inducido por la administración de adenosina, fué muy semejante a lo obtenido con el lactato como sustrato (Tabla 1); de interés fué observar el incremento en la oxidación de piruvato, que también coincide con los 30 minutos de tratamiento y que se acompaña de una caída en la incorporación de marca, tanto en el aspartato como en el malato (Fig. 9). Sugiriendo que el nucleósido favorece un incremento global en la capacidad oxidativa mitocondrial a los 30 minutos de tratamiento in vivo.

## B. MITOCONDRIAS AISLADAS RECONSTITUIDAS CON FRACCION SOLUBLE.

Dado que los efectos del nucleósido parecen estar ligados a la participación mitocondrial en el manejo de los sustratos empleados, se exploró el efecto de la adenosina in vivo sobre la actividad mitocondrial en preparaciones de mitocondrias aisladas suplementadas con enzimas citoplásmicas obtenidas de animales que recibieron un tratamiento semejante.

Cuando las mitocondrias se obtuvieron de animales tratados con adenosina por 15 minutos, éstas conservan una alta capacidad para formar aspartato a partir del lactato (Fig. 10) y este efecto se pierde cuando los animales fueron tratados por 30 minutos, correlacionando estos datos, con lo encontrado en rebanadas de tejido.

Nuevamente, en las mitocondrias aisladas no se observaron cambios en la incorporación de marca en malato a partir de lactato, conservándose niveles semejantes de este sustrato con las mitocondrias obtenidas de animales controles (Fig. 10).

Ahora bien, la incorporación de piruvato a aspartato, como a malato, no cambió en mitocondrias aisladas de animales tratados con adenosina (Fig. 11).

A pesar de que en mitocondrias aisladas se reprodujeron los efectos de la adenosina encontrados en rebanadas hepáticas, el incremento en la oxidación de sustratos por la mitocondria encontrados a los 30 minutos de tratamiento, no se obtuvo en mitocondrias aisladas (Tabla 2), sugiriendo que durante la preparación de mitocondrias de animales tratados con adenosina se

pierde algún factor que impide reproducir en estas preparaciones lo que ocurre con el tejido completo.

### C. MITOCONDRIAS AISLADAS SIN FRACCION SOLUBLE.

Para ahondar más en el papel de la mitocondria con el efecto de la adenosina, se realizó otra serie de experimentos en mitocondrias aisladas, las cuales no fueron suplementadas con factores citoplásmicos. Estas mitocondrias fueron incubadas en presencia de lactato y piruvato radiactivo. En las mitocondrias de animales tratados con adenosina y en ausencia de factores citoplásmicos, se obtuvo un incremento del 35% en la formación de aspartato a partir de lactato, comparado con las mitocondrias de los animales tratados con solución salina.

Por otro lado, la magnitud de incorporación de lactato y piruvato a malato, descendió a un 25% de lo encontrado en rebanadas de tejido o en mitocondrias aisladas suplementadas con fracción soluble, lo cual indica que un alto porcentaje de aparición de marca en este metabolito se debe a reacciones colaterales, principalmente citoplásmicas.

No obstante, como se demuestra en todos los resultados anteriores, no hubo cambio significativo en el manejo de carbonos por malato en los tejidos obtenidos de animales tratados con adenosina, sugiriendo que el lactato que comparte pasos citoplásmicos y mitocondriales para su utilización (18,36), es el sustrato que se ve afectado por la acción del nucleósido.

# DETERMINACION DE GLUCOSA Y UREA A PARTIR DE LACTATO EN REBANADAS DE HIGADO

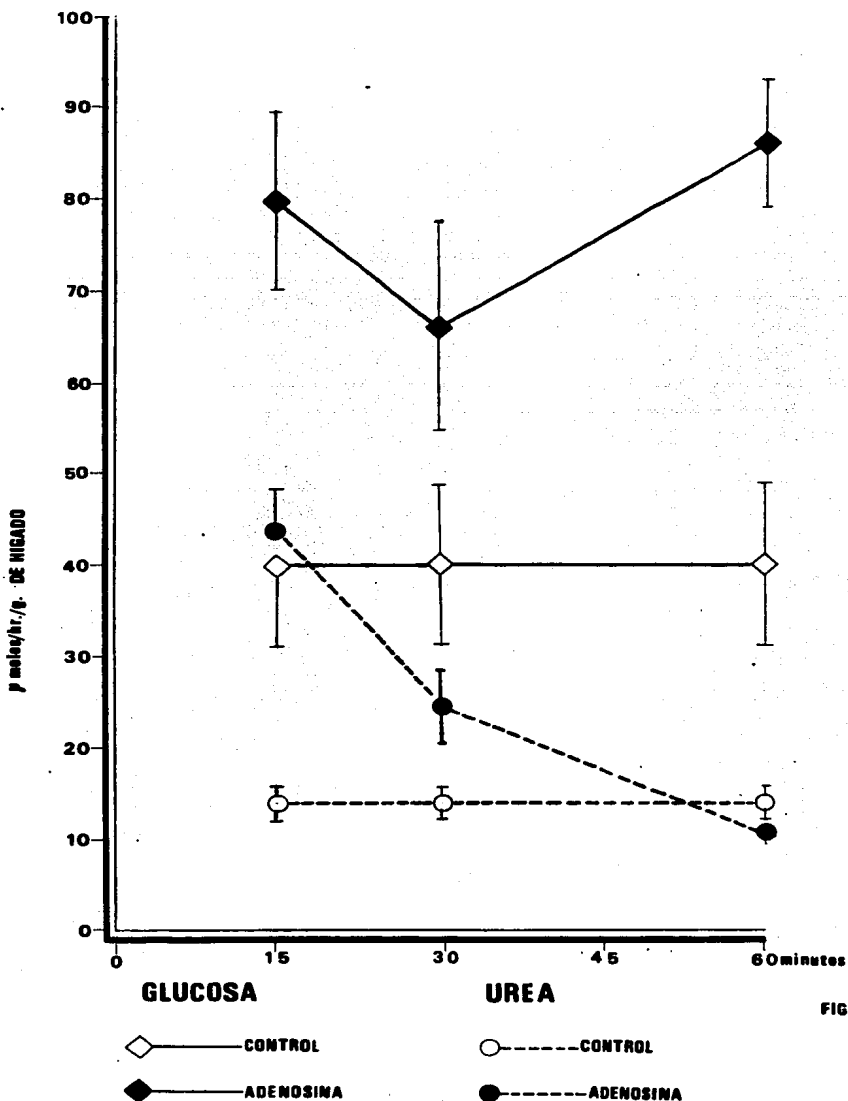


FIG. 6

# DETERMINACION DE GLUCOSA Y UREA A PARTIR DE PIRUVATO EN REBANADAS DE HIGADO

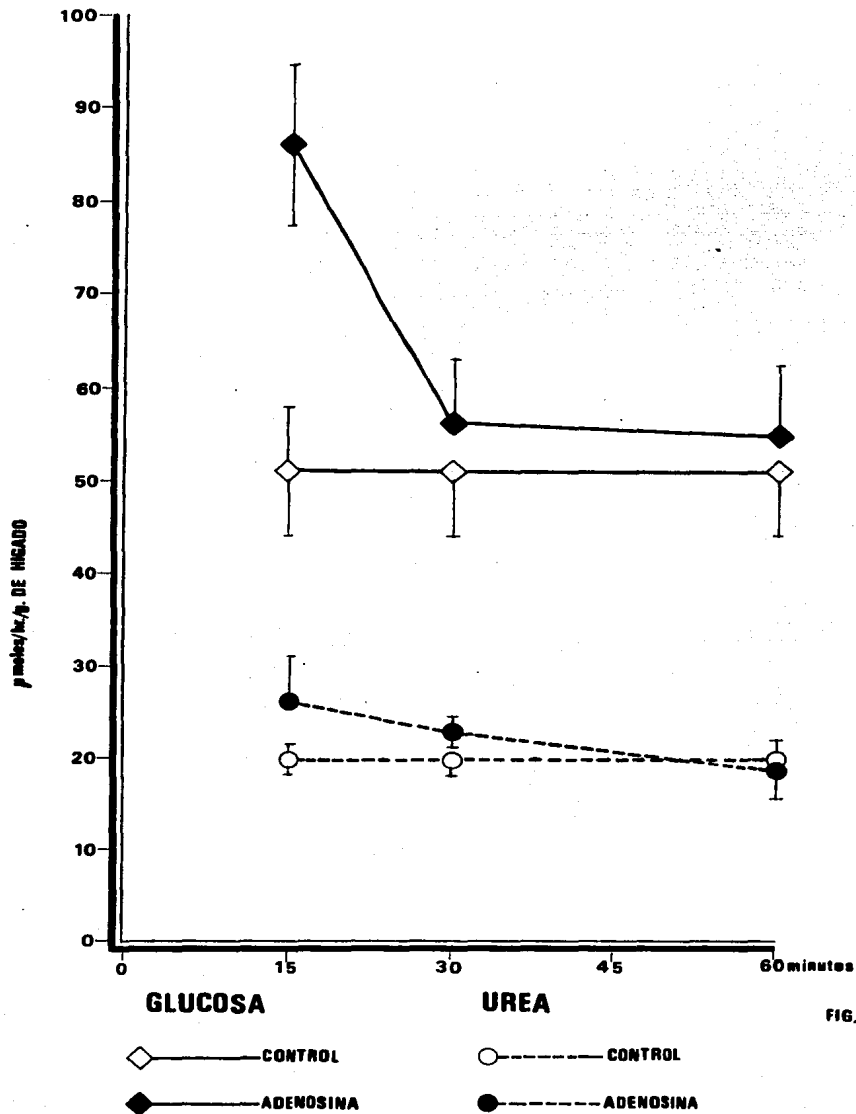


FIG. 7



INCORPORACION DE  $^{14}\text{C}$  (U) LACTATO EN ASPARTATO Y MALATO EN  
REBANADAS DE HIGADO

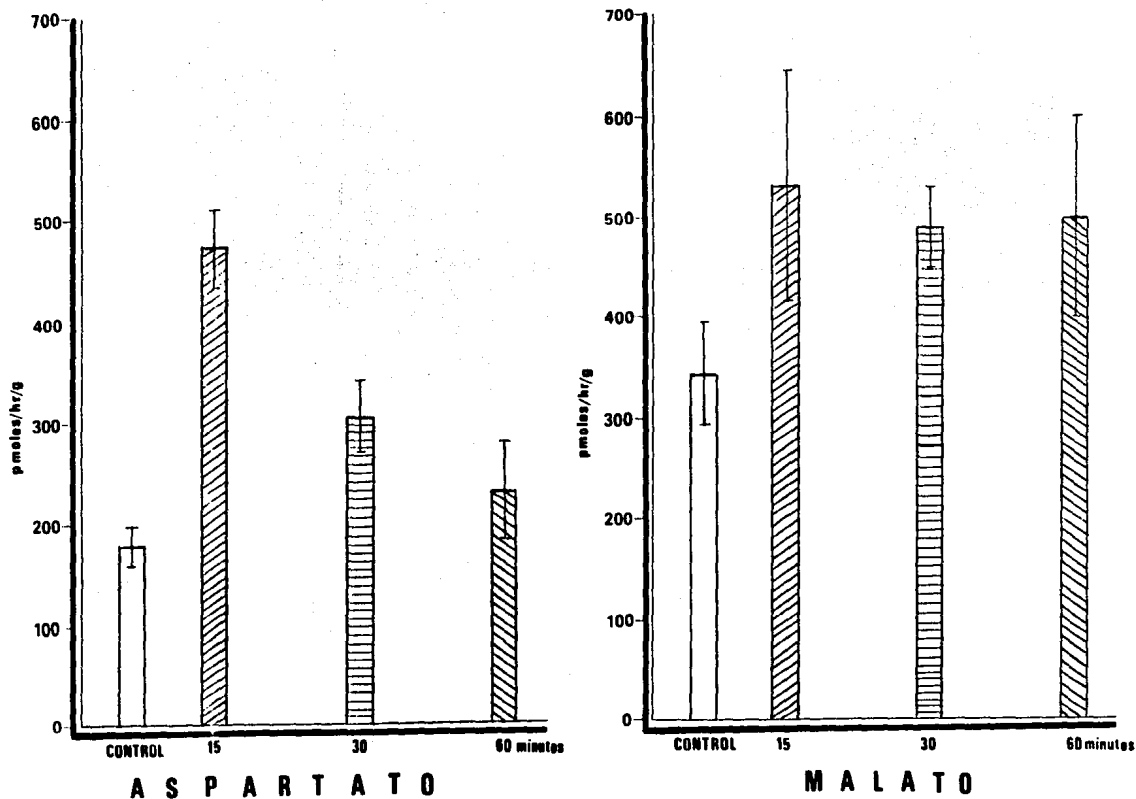


FIG. 8

INCORPORACION DE [1-<sup>14</sup>C] PIRUVATO EN ASPARTATO Y MALATO EN  
REBANADAS DE HIGADO

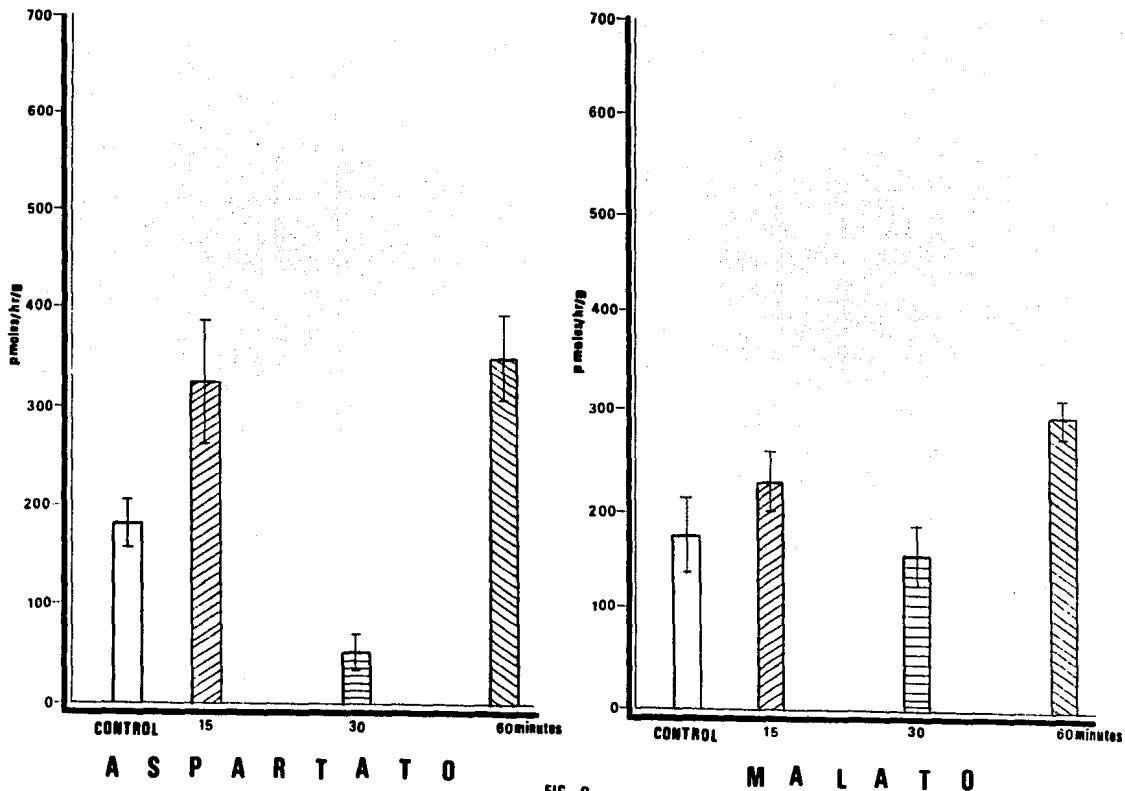


FIG. 9

INCORPORACION DE  $^{14}\text{C}$  (U) LACTATO EN ASPARTATO Y MALATO EN  
REBANADAS DE HIGADO

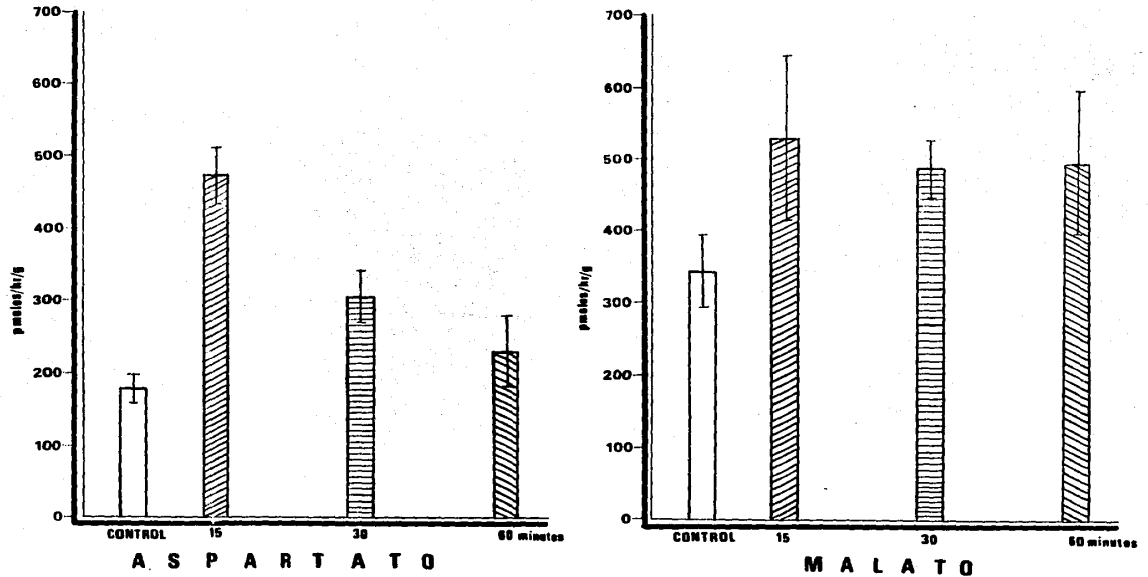


FIG. 8

INCORPORACION DE [1-<sup>14</sup>C] PIRUVATO EN ASPARTATO Y MALATO EN REBANADAS DE HIGADO

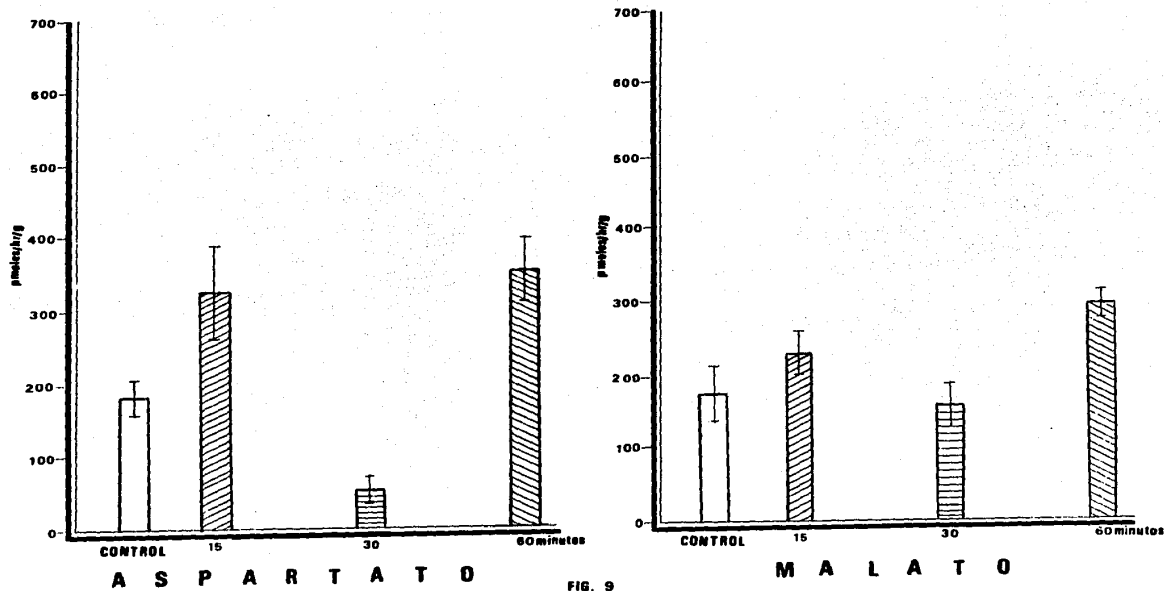


FIG. 9

INCORPORACION DE  $^{14}\text{C}$  (U)-LACTATO EN ASPARTATO Y MALATO EN MITOCONDRIAS AISLADAS CON FRACCION SOLUBLE

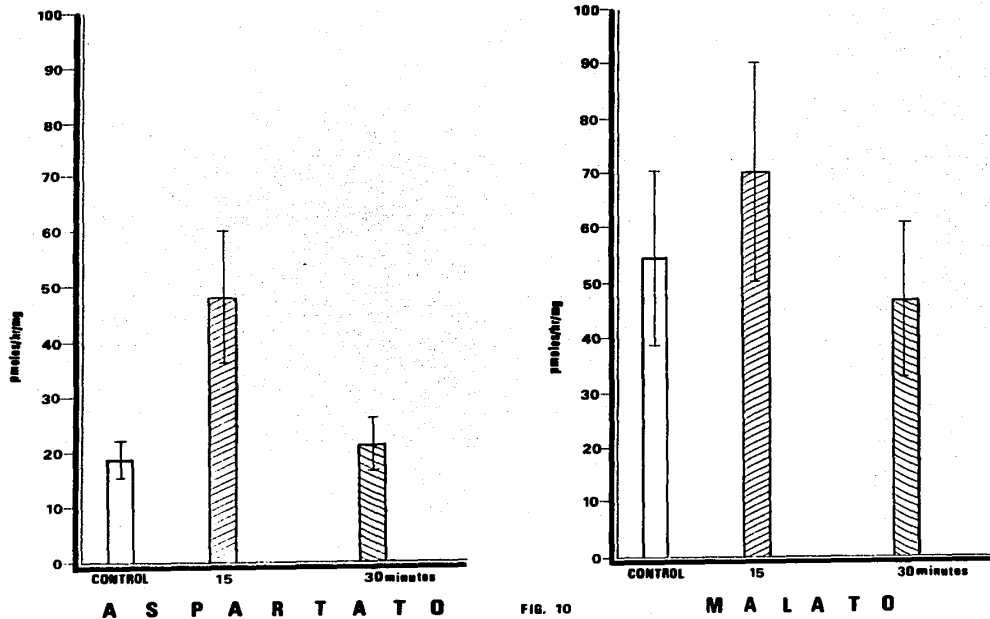


FIG. 10

**INCORPORACION DE [1-<sup>14</sup>C]-PIRUVATO EN ASPARTATO Y MALATO EN MITOCONDRIAS AISLADAS CON FRACCION SOLUBLE**

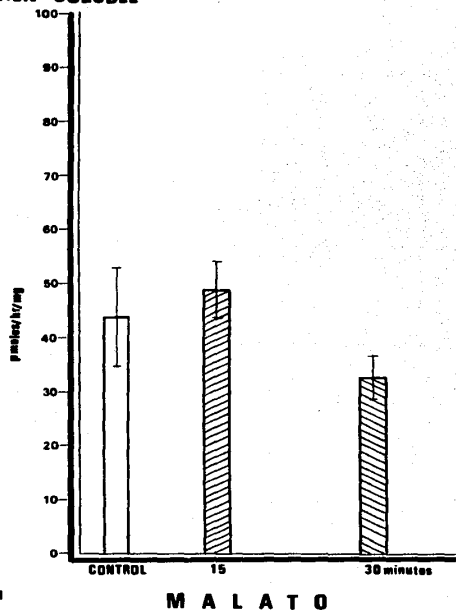
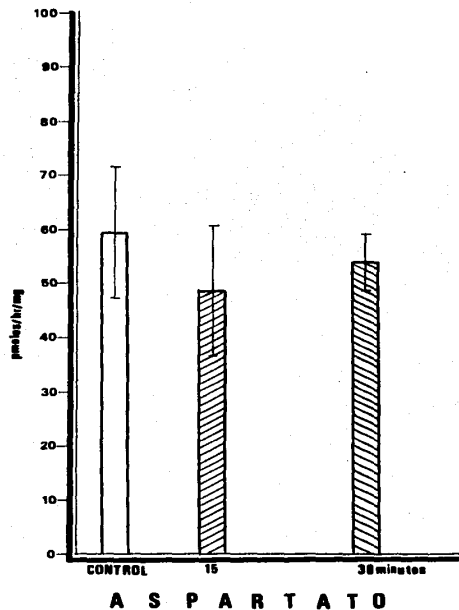


FIG. 11

TABLA 1.

<u>OXIDACION DE [<sup>14</sup>C(U)]-LACTATO A CO<sub>2</sub></u>			<u>OXIDACION DE [1-<sup>14</sup>C]-PIRUVATO A CO<sub>2</sub></u>		
<u>CONTROL</u>	<u>TIEMPO TRAT.</u>	<u>EXPERIMENTALES</u>	<u>CONTROL</u>	<u>TIEMPO TRAT.</u>	<u>EXPERIMENTALES</u>
cpm x 10 <sup>3</sup> /g/hr	min.	cpm x 10 <sup>3</sup> /g/hr	cpm x 10 <sup>3</sup> /g/hr	min.	cpm x 10 <sup>3</sup> /g/hr
37.3 ± 3.59 (5)	15	34.59 ± 3.5 (5)	5.82 ± 1.2 (7)	15	5.16 ± 0.4 (5)
	30	50.18 ± 3.9 (6)		30	11.12 ± 1.16 (6)
	60	28.30 ± 1.7 (4)		60	5.0 ± 0.52 (4)

OXIDACION DE SUSTRATOS POR REBANADAS HEPATICAS

TABLA 2.

<u>OXIDACION DE [<sup>14</sup>C(U)]-LACTATO A CO<sub>2</sub></u>			<u>OXIDACION DE [1-<sup>14</sup>C]-PIRUVATO A CO<sub>2</sub></u>		
<u>CONTROL</u>	<u>TIEMPO</u> <u>TRAT.</u>	<u>EXPERIMENTALES</u>	<u>CONTROL</u>	<u>TIEMPO</u> <u>TRAT.</u>	<u>EXPERIMENTALES</u>
cpm x 10 <sup>3</sup> /mg/hr	min.	cpm x 10 <sup>3</sup> /mg/hr	cpm x 10 <sup>3</sup> /mg/hr	min.	cpm x 10 <sup>3</sup> /mg/hr
5.23 ± 1.13 (5)	15	0.89 ± 0.19 (4)	1.28 ± 0.15 (5)	15	1.05 ± 0.07 (5)
	30	2.51 ± 0.88 (7)		30	0.96 ± 0.05 (6)

OXIDACION DE SUSTRATOS POR MITOCONDRIAS AISLADAS  
CON FRACCION SOLUBLE.



## DISCUSION.

Dentro de las múltiples acciones fisiológicas de la adenosina, están sus acciones sobre el metabolismo hepático.

La administración in vivo de este nucleósido promueve la inducción de un patrón metabólico de animal alimentado en un animal ayunado, es decir, aumenta síntesis de glucógeno, produce hiperglicemia, eleva la carga energética, inhibe la activación de los ácidos grasos; siendo esta situación metabólica la opuesta al de animal ayunado.

En estas condiciones se estudió como estaba afectado el proceso de gluconeogénesis hepática, que a priori se suponía inhibido en animales ayunados en presencia de adenosina.

Sorprendentemente se encontró una elevación transitoria del proceso gluconeogénico a partir de lactato (15), por lo que el principal objetivo de este estudio, fué esclarecer el mecanismo por el cual con las condiciones metabólicas producidas por la adenosina, se encontraba elevada la gluconeogénesis.

Como ya se comentó con anterioridad, este proceso requiere de la actividad de la vía colateral de los ácidos dicarboxílicos, que permitan el transporte de esqueletos de tres carbonos de la mitocondria al citosol, así como de equivalentes reductores, NAD/NADH, necesarios para revertir la reacción de la 3-P-gliceraldehído deshidrogenasa. Ahora bien, dependiendo del

sustrato gluconeogénico, así sería el camino utilizado, para este proceso, de transaminación si se trata de lactato y de deshidrogenación con piruvato (Fig. 4 y 5).

Las rutas de transporte de ácidos dicarboxílicos citosol-mitocondria, afectan otras vías metabólicas compartimentalizadas como la ureogénesis, por lo que discutiré los resultados encontrados en la acción de la adenosina en el destino metabólico que sigue el lactato y piruvato como sustratos gluconeogénicos: su transformación a aspartato, malato o  $\text{CO}_2$ , relacionándolos con los productos finales de los procesos estudiados como son glucosa y urea (Fig. 12).

El efecto del tratamiento con adenosina induce una respuesta diferente en función del tiempo y en función del sustrato utilizado: lactato o piruvato.

En presencia de lactato, se comprueba el efecto de la adenosina previamente reportado in vivo de aumento en la formación de glucosa durante los diferentes tiempos de tratamiento, y el piruvato generado por la deshidrogenasa láctica (Fig. 12) se maneja en los primeros 15 y 30 minutos, por una carboxilación y subsecuente transaminación hasta formar aspartato (Fig. 6 y 8). Este efecto está apoyado en una mayor incorporación de marca del [ $^{14}\text{C}(\text{U})$ ]-Lactato en aspartato y aumento en la formación de urea (Fig. 12), ya que el aspartato es un sustrato ureogénico y en glucosa por ser un precursor gluconeogénico, y

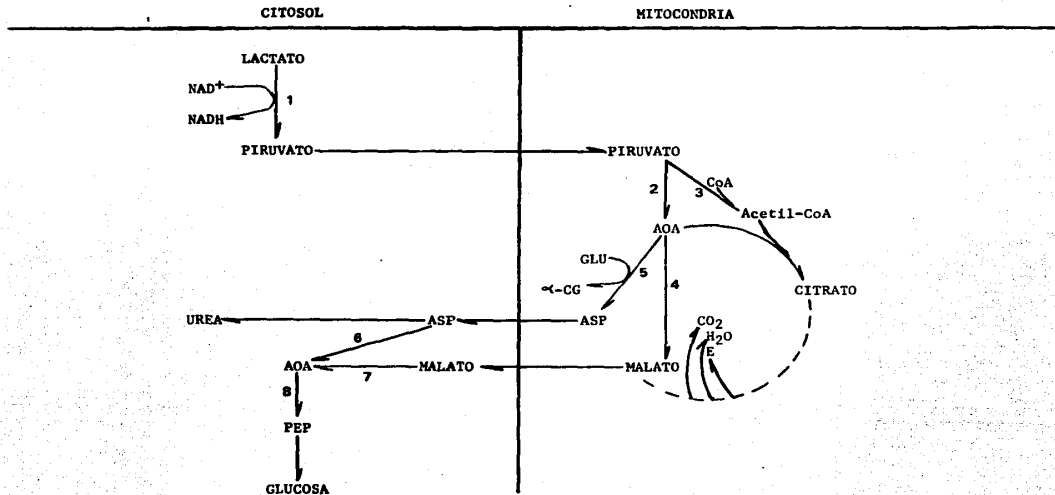


FIG. 12.

1. LACTATO DESHIDROGENASA.
2. PIRUVATO CARBOXILASA.
3. PIRUVATO DESHIDROGENASA.
4. MALATO DESHIDROGENASA MITOCONDRIAL.
5. TRANSAMINASA GLUTAMICO OXALACETICA MITOCONDRIAL.
6. TRANSAMINASA GLUTAMICO OXALACETICA CITOSOLICA.
7. MALATO DESHIDROGENASA CITOSOLICA.
8. FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXICINASA.

por la incorporación de marca a malato los cuales se observan semejantes a los valores de los animales controles.

A los 30 minutos de tratamiento se observa un cambio en el flujo metabólico que se manifiesta por incremento en la oxidación del sustrato gluconeogénico reducido (Tabla 1).

En relación con piruvato hay gluconeogénesis transitoria, no tan evidente como con lactato y ésta es exclusivamente a los 15 minutos de tratamiento; por la incorporación de marca pareciera que es a través de aspartato, reflejándose en urea un ligero aumento (fig. 7 y 9). A los 30 min. con el nucleósido se observa una oxidación aumentada del sustrato, en este caso es mayor que la del sustrato reducido. A los 60 min. hay mayor incorporación de marca de piruvato tanto en aspartato (95%) como en malato (65%). Este último dato se contrapone con lo reportado en la literatura, de que en condiciones normales, el pirúvico es manejado preferencialmente por malato (36), ésta podría ser una diferencia debida al tratamiento con adenosina.

Lo anterior podría indicarnos que los sustratos, a los 15 minutos de tratamiento con el nucleósido, están siendo metabolizados por piruvato carboxilasa y transaminación vía aspartato (Fig. 12), canalizándolos hacia la formación de glucosa y de urea.

El flujo de incremento en la actividad oxidativa que se observa a los 30 min. de tratamiento, nos puede representar un

flujo mayor a través de piruvato deshidrogenasa (Fig. 12), y éste se ve más favorecido con el sustrato oxidado que es el piruvato, presentando un incremento en la oxidación de 91% (Tabla 1), cuando solo se observa un 35% de aumento con el sustrato reducido, lactato. A los 60 minutos de tratamiento cambia el flujo metabólico y la piruvato deshidrogenasa se encuentra inactiva y la piruvato carboxilasa se activa. A este tiempo, dependiendo del sustrato que se utilice, reducido u oxidado se observa que: con lactato aún hay gluconeogénesis vía malato, mientras que con piruvato no hay gluconeogénesis pero se observa un flujo de incorporación de marca a precursores gluconeogénicos y ureogénicos como aspartato y malato.

Dado que las primeras reacciones para determinar el destino de estos dos sustratos hacia glucosa, urea o  $\text{CO}_2$ , requieren la participación de enzimas mitocondriales, se planearon experimentos que nos permitieran llegar a entender estos eventos metabólicos.

Esto se hizo con mitocondrias hepáticas, aisladas de animales tratados y suplementadas con citosol. A pesar del tiempo requerido para la preparación de las mitocondrias, cuando los animales fueron tratados con adenosina, sus mitocondrias conservan la capacidad de producir aspartato en forma más activa a partir de lactato, mientras que con piruvato la producción de malato y aspartato fué prácticamente semejante al control.

En la encrucijada metabólica que participa en el destino

que sufre el lactato o el piruvato, intervienen de manera importante las siguientes vías:

Por un lado en la carboxilación del piruvato por piruvato carboxilasa y por otro lado la deshidrogenación y formación de acetil CoA por la piruvato deshidrogenasa hasta formar CO<sub>2</sub> (Fig. 12). La regulación de ésta encrucijada no está bien establecida, por una parte:

1. Se tienen reportes de que la actividad de piruvato carboxilasa aumenta al aumentar la relación ATP/ADP (48) y en estas condiciones la piruvato deshidrogenasa se encuentra inactiva, es decir, está fosforilada (49).

2. Por otra parte, se acepta que la concentración mitocondrial de acetil CoA es el activador de la piruvato carboxilasa, enzima clave para la gluconeogénesis (2,18,19). Sin embargo, algunos reportes (48), sugieren que la actividad de piruvato carboxilasa se ha comportado independiente de la concentración de su activador alostérico, acetil CoA, y que su regulación pueda ser, al igual que la piruvato deshidrogenasa, dependiente del potencial de fosforilación (49) y de que exista la posibilidad de una regulación concertada entre piruvato carboxilasa y piruvato deshidrogenasa de tal manera que la activación de una de ellas dé como consecuencia la inactivación de la otra.

3. También se ha reportado (50) que las hormonas gluconeogénicas (glucagón, vasopresina, angiotensina II) aumentan la concentración de Ca<sup>2+</sup> citosólico y proponen que este anión active

la cadena respiratoria y como consecuencia de ésto la gluconeogénesis y la ureogénesis.

Estas tres posibilidades pueden ser analizadas a la luz de los resultados actuales y previos:

a). La administración del nucleósido en animales ayunados, tiende a elevar la concentración de ATP y consecuentemente cambia la relación ATP/ADP tanto en citoplasma como en mitocondria (16) y este efecto se acompaña de una estimulación en la actividad oxidativa mitocondrial de sustratos del sitio I.

b). Aunque no se cuantificaron los niveles intramitocondriales de acetyl-CoA en nuestras condiciones experimentales, se puede asegurar que en las ratas con adenosina, los niveles son muy bajos por la ausencia de  $\beta$ -oxidación (13).

c). En datos obtenidos por la Dra. Chagoya, ha encontrado que la adenosina aumenta la concentración de  $Ca^{2+}$  mitocondrial (51).

Estos cambios que realiza la adenosina en la relación ATP/ADP, disminución de Acetyl-CoA por disminución de  $\beta$ -oxidación,  $Ca^{2+}$  elevado, estado óxido-reducción mitocondrial aumentado, pueden estar afectando la regulación de la encrucijada metabólica que estamos estudiando, pero no sabemos cuál de ellos inicie la secuencia de cambios metabólicos que observamos.

Sin embargo, analizando los resultados, surge una observación importante que pudiera orientar hacia la posible regulación de la

utilización de piruvato por la mitocondria y que a través del tratamiento con adenosina se hace más evidente.

Cuando el precursor es lactato, el efecto del nucleósido se manifiesta en gluconeogénesis y ureogénesis vía aumento de formación de aspartato; en cambio cuando el sustrato es piruvato la acción gluconeogénica y ureogénica es transitoria, observándose solo a los 15 minutos. Sin embargo, la radioactividad en aspartato y malato, posibles precursores gluconeogénicos y ureogénicos, sugieren la existencia de un impedimento para que éstos precursores lleguen a su destino final: glucosa y/o urea.

En estudios previos (16), conocemos que la adenosina no modifica la transaminasa glutámica oxalacética (TGO) mitocondrial por lo que pudieramos pensar que el efecto de diferencia en el destino metabólico según se utilice, puede estar en las enzimas que metabolizan éstos precursores en el citosol o en la translocación de éstos sustratos mitocondriales al citosol, diferencia que se hace evidente al usar un sustrato oxidado (piruvato) y un sustrato reducido (lactato).

Esta diferencia pudiera reflejarse en un cambio en el estado redox del citoplasma como posible disparador de la subsecuente utilización del sustrato. Efectos similares observados con el lactato, se encontraron en animales tratados con etanol más adenosina, en los que es evidente la modificación del potencial oxido-reducción del citoplasma hacia un estado reducido y una modificación de la lanzadera malato-aspartato en un incremento



inducido por el mismo nucleósido, sugiriendo la activa participación de la lanzadera malato-aspartato en los efectos observados con el lactato en este estudio.

En conclusión, se sugiere que el mecanismo de inducción de gluconeogénesis y ureogénesis, esté mediado por incremento de las lanzaderas como se observó en el caso del tratamiento con etanol más adenosina (16), al aumentar esta vía resulta en un aumento en la formación y movilización de aspartato en la mitocondria. Al ser el aspartato un sustrato común en la vía gluconeogénica y ureogénica se ven incrementadas las dos vías.

Este efecto de adenosina solo se hace evidente cuando el precursor gluconeogénico es el lactato que genera un estado redox más reducido en el citosol.

El aumento en formación y movilización del aspartato pudiera deberse a un cambio de fluidez en la membrana inducida por el tratamiento con el nucleósido y ésta pudiera ser una posible explicación del aumento en gluconeogénesis y ureogénesis inducida por adenosina.

BIBLIOGRAFIA.

1. CHAGOYA DE SANCHEZ, V., BRIONES, R., PIÑA, E.(1971). Inhibition by adenosine of the cortisol-induced liver glucogen accumulation in adrenalectomized rats. *Biochem. Pharmacol.* 20;2535-2541.
2. LEHNINGER, A., L. (1980) *Bioquímica*. Editorial Omega. Segunda Edición. Barcelona, España. p. 475.
3. HAULICA, I. (1973). Preliminary data on the possible hypnogenic role of adenosine. *Neurochem. J.* 21:701-02.
4. FOX, Irving . (1978). The role of adenosine and 2'-deoxyadenosine in mammalian cells. *Ann. Rev. Biochem.* 47:655-86.
5. SUAREZ MUNGUIA, J., VALLES, V.E., CHAGOYA DE S.V.(1987). Effect of adenosine on the serum levels of glucose, insulin and glucagon in vivo. *The Intern. J. Biochem.* 19, 85-88.
6. CAMPBELL, I. (1982). Effect of adenosine the rat islet function and metabolism. *Biochem. J.* 204; 689-96.
7. BERNE, R., ROLL, T., RUBIO, R. (1983). Regulatory function of adenosine. Martinus Nijhoff Publishers U.S.A.
8. CHAGOYA DE S., V., et. al. (1972). In Vivo modification of the energy charge in the liver cell. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 46(3):1441-45.
9. CHAGOYA DE S., V., et. al. (1974). Utilization of adenosine as a tool in studies on the regulation of liver glycogen biosynthesis. *Arch. Biochem. Biophys.* 160:145-50.
10. CHAGOYA DE S., V., et. al. (1972). Adenosine, a glucogenic and lipogenic compound. *FEBS Letters.* 19(4):331-34.

11. CHAGOYA DE S., V. et. al. (1972). Effect of adenosine in the incorporation of palmitic acid. Biochem. Pharmacol. 20:346-51.
12. DALE, V., P., MUNNETH, H. (1962). Antilipolytic Action of adenosine in vitro. J. Biol. Chem. 237:2758-765.
13. CHAGOYA DE S., V. et. al. (1977). Regulation of fatty acid oxidation by adenosine at the level of its extramitochondrial activation. Biochem. Biophys. Res. Comm. 76:804-812.
14. HARRIS, R.,A., et. al. (1976). Adenosine produces a disminution of tryacylglyceroles hepatic production lipids. 10:673-681.
15. YAÑEZ MALDONADO LUCIA (1982). Efecto de la adenosina en la gluconeogénesis hepática in vivo papel de la energfa, estado Redox y oxidación de los ácidos grasos. Tesis de Licenciatura Facultad de Química.
16. HERNANDEZ-MUÑOZ, R. (1985). Estudio de los mecanismos involucrados en el efecto protector de la adenosina sobre el hfgado graso inducido por el etanol. Papel de la lanzadera del malato-aspartato y la función mitocondrial. Tesis de Maestrfa. Facultad de Química.
17. ZENTELLAS A. (1982). Ureogenesis, stimulation by adenosine. International Symposium on Adenosine. Charlottesville Virginia U.S.A.
18. HERS, H., G., HUE, L. (1983). Gluconeogenesis and related aspects of glycolysis. Ann. Rev. Biochem. 52:617-53.
19. WALTER, P. (1976). Gluconeogenesis. Its regulation

in Mammalian Species. New York: Willey. p. 239-265.

20. BOTTGER, I., WIELAND, O. (1969). Intracellular localization of pyruvate carboxylase and phosphoenolpyruvate carboxykinase in rat liver. Eur. J. Biochem. 8:113-19.

21. BARRITT, G., J., ZANDER, G., L. (1976). The regulation of pyruvate carboxylase activity and gluconeogenic tissue. Ver ref. 19 p.3-46.

22. MONTGOMERY, R., et. al. (1980) Biochemistry: A case oriented approach. Tercera Edición. p. 236-38.

23. WHITE, A. (1973). Principles of biochemistry. Quinta Edición. McGraw Hill.

24. SOLING, H., D., KLEINEKE, J. (1976). Species dependent regulation of hepatic gluconeogenesis in higher animals. Ver ref. 19 p. 369-462.

25. TILGHMAN, S., M., HANSON, R., W. (1976). Hormonal regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GPT) in mammalian tissues. Ver ref. 19 p. 47-91.

26. WILLIAMSON J. R. (1976). Role of anion transport in the regulation of metabolism. Ver ref. 19 p. 168.

27. RAY., P., D. (1976). Hepatic gluconeogenesis in the rabbit. Ver ref. 19 p. 293.

28. BOHINSKI, R., C. (1978). Bioquímica. Fondo Educativo Interamericano, S.A. México.

29. MARTIN, D., W., et. al. (1982). Bioquímica de Harper. Editorial El Manual Moderno, S.A. México.

30. MEIJER, A., I., HENSGENS, H., E., S., J. (1982). Metabolic Compartmentation (Sies, H., Ed.) Academic Press, N.Y. p. 259-286.

31. HENSGENS, H.,E.,S.,J., VENHOEVEN, A.,J., MÜJER, A., J. (1980). The relationship between intramitochondrial N-acetyl glutamate and activity of carbamoyl-phosphate synthetase (Ammonia). Eur. J. Biochem. 107, 197-205.
32. LUND, P., WIGGINS, D. (1984). Is N-acetylglutamate a short-term regulator of urea synthesis? Biochem. J. 218, 991-994.
33. JOSEPH, S.,K., MCGIVAN, J., D. (1978). The effect of ammonium chloride and glucagon on the metabolism of glutamine in isolated liver cells from starved rats. Biochem. Biophys. Acta. 543,16-28.
34. WANDERS, R., J., A. MEIJER, J. (1984). Analysis of the control of citrulline synthesis in isolated rat-liver mitochondria. Eur. J. Biochem. 142, 247-254.
35. TITHERADGE, M., A., HAYNES, R.,C.,Jr. (1980). The hormonal stimulation of ureogenesis in isolated hepatocytes through increases in mitochondrial ATP production. Arch. Biochem. Biophys. 201, 44-55.
36. KREBS, H., A., LUND, P. (1976). Interrelations between gluconeogenesis and urea synthesis. Ver ref. 19 p. 276.
37. CEDERBAUM, A.I., LIEBER, C.S., BEATTIE, D.S., RUBIN, E. (1973). Characterization of shuttle mechanisms for the transport of reducing equivalents into mitochondria. Arch. Biochem. Biophys. 158,763-781.
38. RAY, P., D., HANSON R., L., LARDY, H., A. (1970). Inhibition by hydrazine of gluconeogenesis in the rat. J. Biol. Chem. 245,690-696.

39. CHAMPELL, J., B. (1968) Systems used for the transport of substrates into mitochondria. Brit. Med. Bull. 24,150.
40. GREENSPAN, M., D., PURVIS, J., L. (1968). The Energy-linked incorporation of diphosphopyridine nucleotide into rat liver mitochondria. J. Biol. Chem. 243:2921.
41. GIMPEL, J., A., DE HAAN E., TAGER, J. (1973). Biochem. Biophys. A. 292:582.
42. DAWSON, A., G. (1982). Rapid oxidation of NADH via the reconstituted malate-aspartate shuttle in systems containing mitochondrial and soluble fractions of rat liver: implications for ethanol metabolism. Biochem. Pharmacology. 31(17)2733-2738.
43. SCHNEIDER, W., C., HOGEBOON, G., G. (1950). Intracellular distribution of enzymes. J. Biol. Chem. 183:123-128.
44. BERGMAYER, H., V., "Methods of Enzymatic Analysis" Impresion 1965 Verlag Chemie G.M.B.H. Weinheim Bergstr. Academic Press, New York and London.
45. TOOD-SANFORD. Diagnóstico Clínico por el Laboratorio. Salvat Editores. 6a. Edición, 1982 México. p. 606.
46. YAMAZAKI, R., K., GRAETZ, G., S. (1977). Glucagon stimulation of citrulline formation in isolated hepatic mitochondria. Archiv. Biochem. Biophys. 178:19-25.
47. WIKENING, J., NOWACK, J., DECKER, K. (1975). The dependence of glucose formation from lactate on the adenosine triphosphate content in the isolated perfused rat liver. Biochem. Biophys Acta. 392,299:309.
48. STUCKI, J.W., BRAWAND, F., WALTER, P. (1972). Regulation of pyruvate metabolism in rat-liver mitochondria by adenine

nucleotides and fatty acids. Eur. J. Biochem. 27,181-191.

49. WIELAND, O.H., PORTENHAUSER, R.(1974). Regulation of pyruvate-dehydrogenase interconversion in rat-liver mitochondria as related to the phosphorylation state of intramitochondrial adenine nucleotides. Eur. J. Biochem. 45,577-588.

50. FRIEDMANN, N.K. (1986). What is the role of  $Ca^{2+}$  in the hormonal stimulation of gluconeogenesis? TIBS 11; 276-279.

51. CHAGOYA DE SANCHEZ V.- Comunicación Personal.

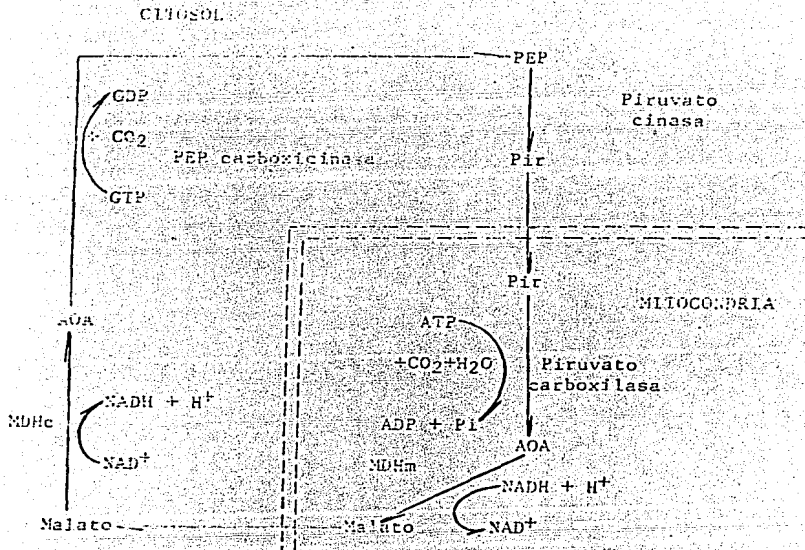


FIG. 1. ENZIMAS INICIALES DE LA GLUCONEOGENESIS



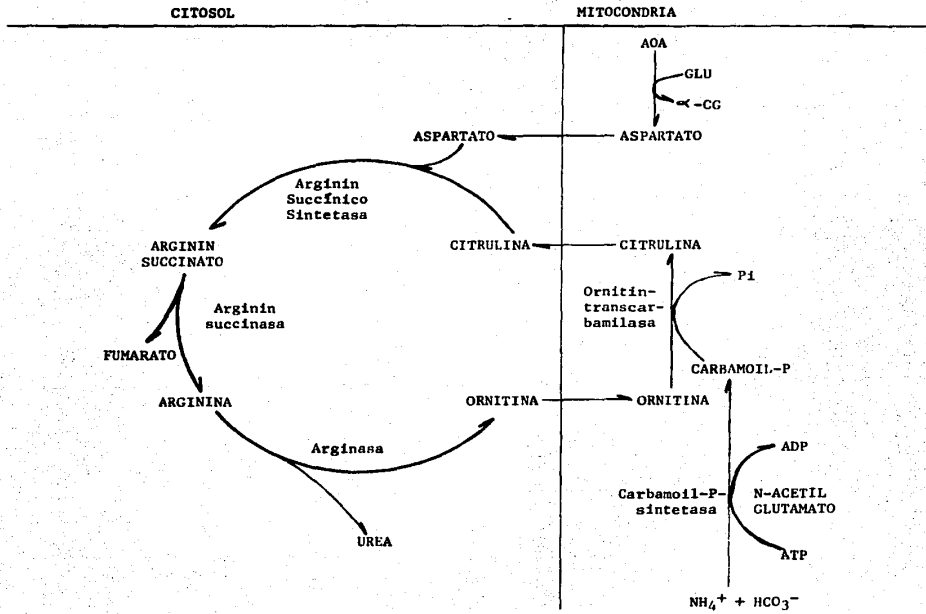


FIG. 2. CICLO DE LA UREA.

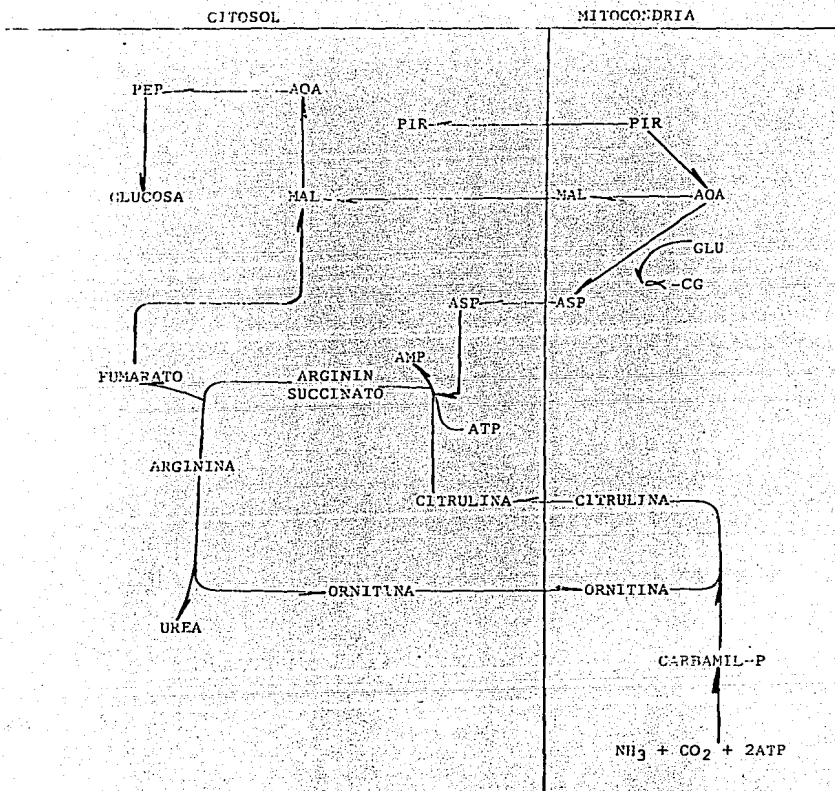


FIG. 3. INTERRELACION ENTRE GLUCONEOGENESIS Y UROGENESIS.

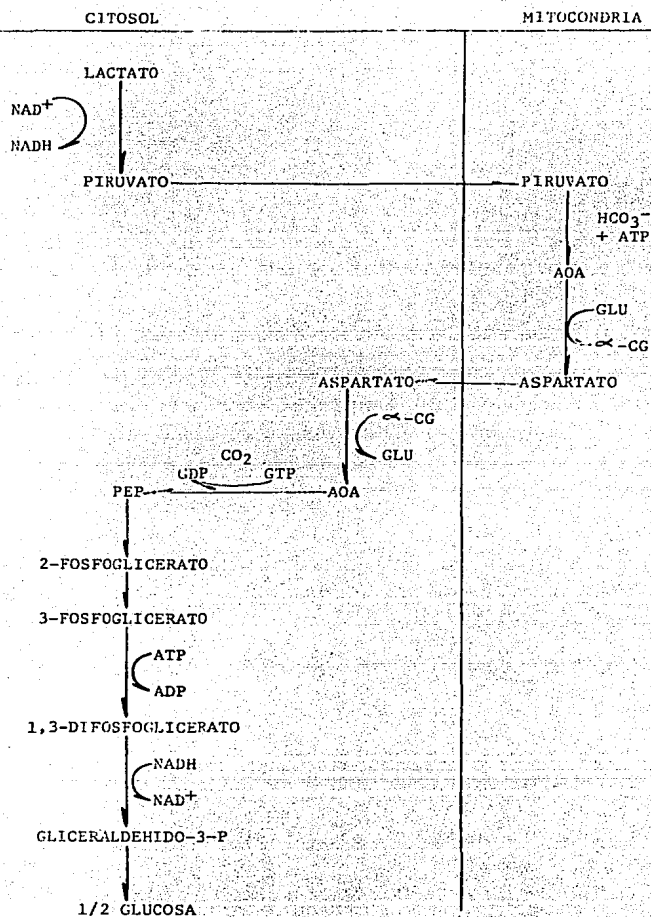


FIG. 4. GLUCONEOGENESIS A PARTIR DE LACTATO EN HIGADO DE RATA

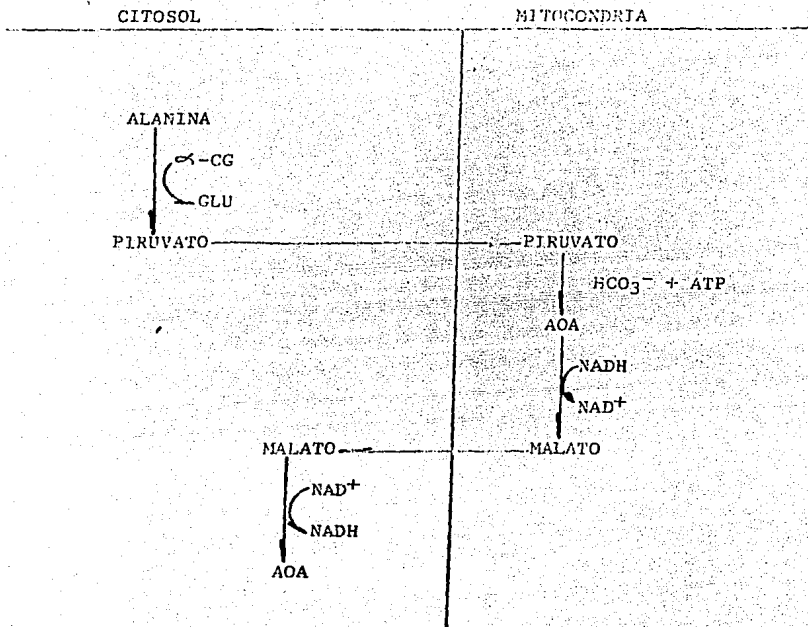


FIG. 5

PASOS INICIALES Y COMPARTIMENTALIZACION DE GLUCONEOGENESIS A PARTIR DE ALANINA O PIRUVATO EN HIGADO DE RATA.

DETERMINACION DE GLUCOSA Y UREA A PARTIR DE LACTATO EN REBANADAS DE HIGADO

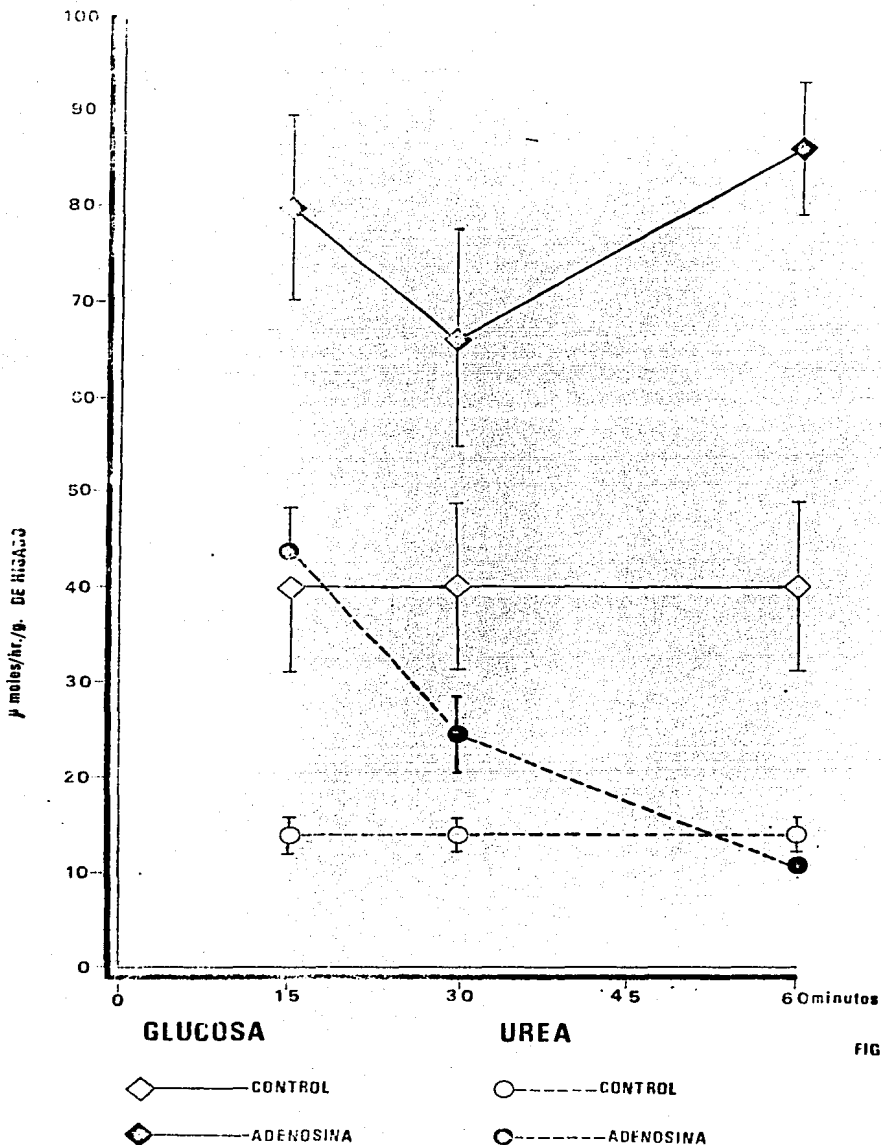


FIG. 6

# DETERMINACION DE GLUCOSA Y UREA A PARTIR DE PIRUVATO EN REBANADAS DE HIGADO

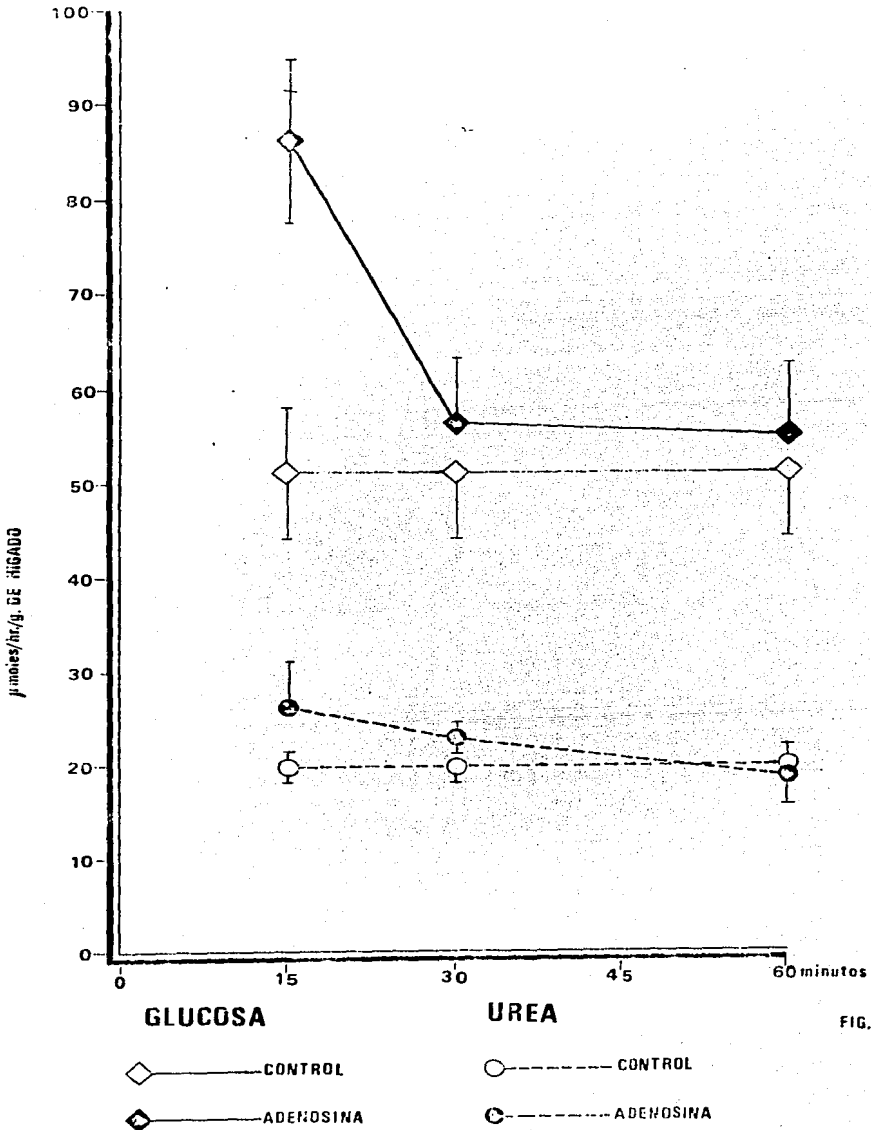


FIG. 7

INCORPORACION DE  $^{14}\text{C}$  (U)-LACTATO EN ASPARTATO Y MALATO EN  
REBANADAS DE HIGADO

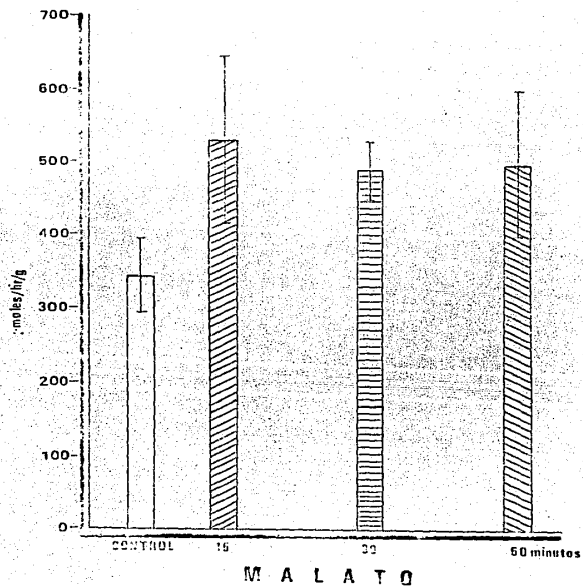
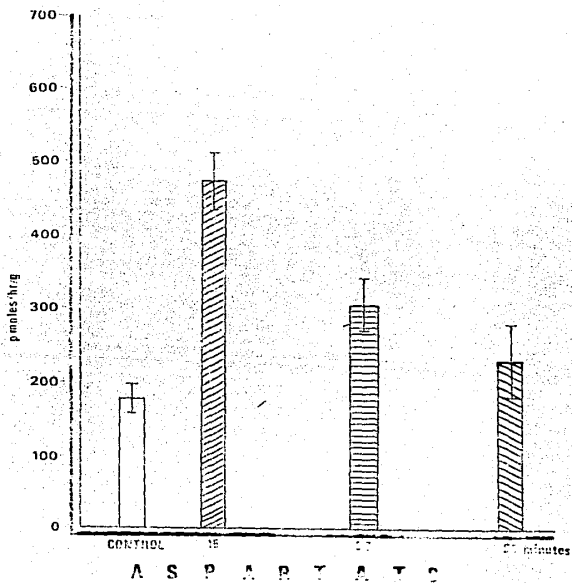


FIG. 8

INCORPORACION DE  $[1-^{14}C]$  PIRUVATO EN ASPARTATO Y MALATO EN  
REBANADAS DE HIGADO

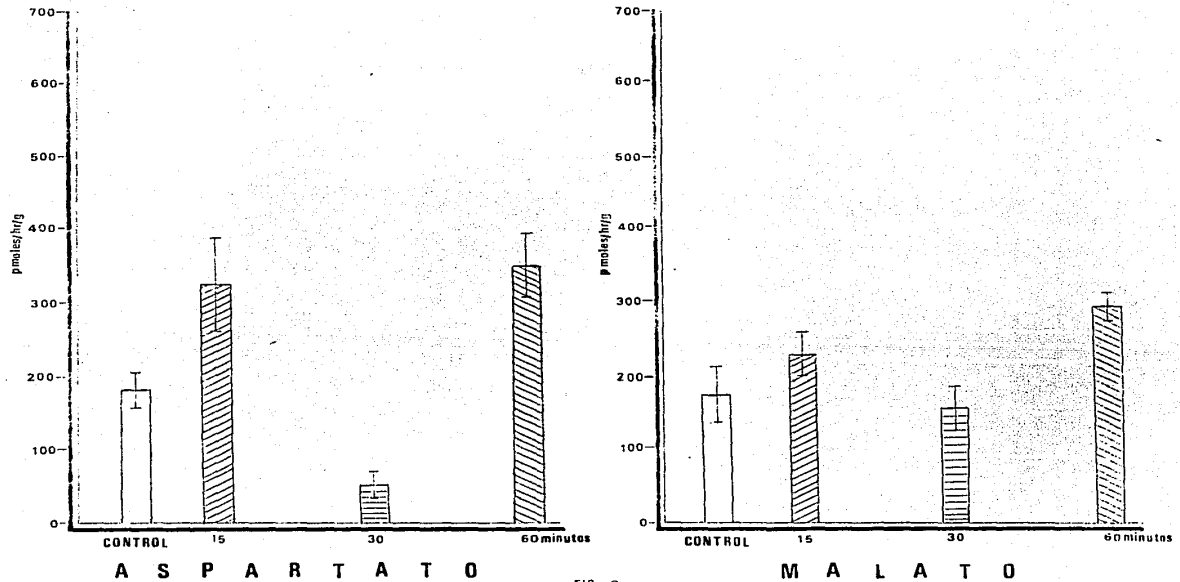


FIG. 9



INCORPORACION DE  $^{14}\text{C}$  (U)-LACTATO EN ASPARTATO Y MALATO EN MITOCONDRIAS AISLADAS CON TRACCION SOLUBLE

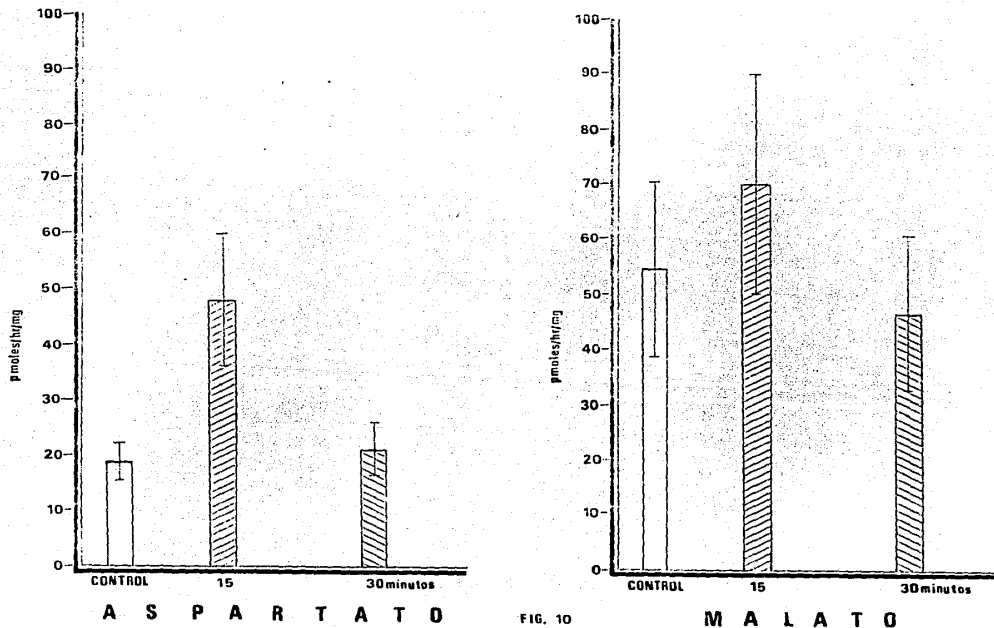


FIG. 10

INCORPORACION DE  $[1-^{14}C]$  PIRUVATO EN ASPARTATO Y MALATO EN MITOCONDRIAS AISLADAS CON FRACCION SOLUBLE

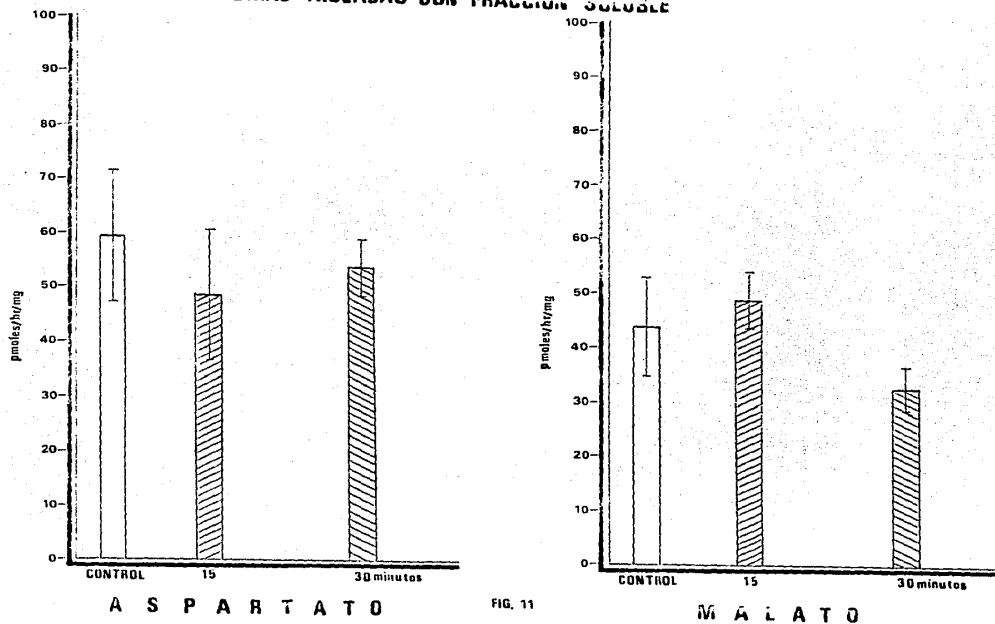


FIG. 11

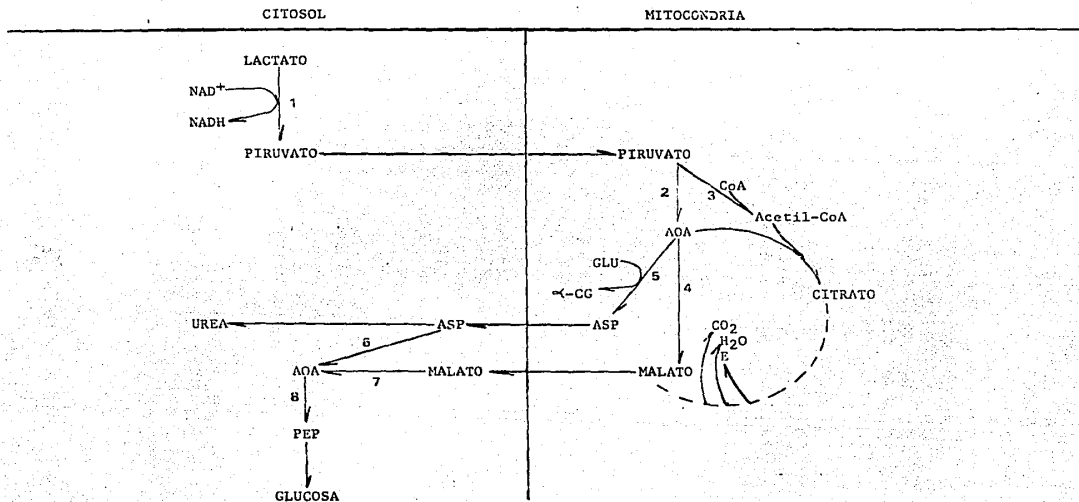


FIG. 12.

1. LACTATO DESHIDROGENASA.
2. PIRUVATO CARBOXILASA.
3. PIRUVATO DESHIDROGENASA.
4. MALATO DESHIDROGENASA MITOCONDRIAL.
5. TRANSAMINASA GLUTAMICO OXALACETICA MITOCONDRIAL.
6. TRANSAMINASA GLUTAMICO OXALACETICA CITOSOLICA.
7. MALATO DESHIDROGENASA CITOSOLICA.
8. FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXICINASA.

TABLA 1.

<u>OXIDACION DE [<sup>14</sup>C(U)]-LACTATO A CO<sub>2</sub></u>			<u>OXIDACION DE [1-<sup>14</sup>C]-PIRUVATO A CO<sub>2</sub></u>		
<u>CONTROL</u>	<u>TIEMPO TRAT.</u>	<u>EXPERIMENTALES</u>	<u>CONTROL</u>	<u>TIEMPO TRAT.</u>	<u>EXPERIMENTALES</u>
cpm x 10 <sup>3</sup> /g/hr	min.	cpm x 10 <sup>3</sup> /g/hr	cpm x 10 <sup>3</sup> /g/hr	min.	cpm x 10 <sup>3</sup> /g/hr
37.3 ± 3.59 (5)	15	34.59 ± 3.5 (5)	5.82 ± 1.2 (7)	15	5.16 ± 0.4 (5)
	30	50.18 ± 3.9 (6)		30	11.12 ± 1.16 (6)
	60	28.30 ± 1.7 (4)		60	5.0 ± 0.52 (4)

OXIDACION DE SUSTRATOS POR REBANADAS HEPATICAS

TABLA 2.

<u>OXIDACION DE [<sup>14</sup>C(U)]-LACTATO A CO<sub>2</sub></u>			<u>OXIDACION DE [1-<sup>14</sup>C]-PIRUVATO A CO<sub>2</sub></u>		
<u>CONTROL</u>	<u>TIEMPO TRAT.</u>	<u>EXPERIMENTALES</u>	<u>CONTROL</u>	<u>TIEMPO TRAT.</u>	<u>EXPERIMENTALES</u>
cpm x 10 <sup>3</sup> /mg/hr	min.	cpm x 10 <sup>3</sup> /mg/hr	cpm x 10 <sup>3</sup> /mg/hr	min.	cpm x 10 <sup>3</sup> /mg/hr
5.23 ± 1.13 (5)	15	0.89 ± 0.19 (4)	1.28 ± 0.15 (5)	15	1.05 ± 0.07 (5)
	30	2.51 ± 0.88 (7)		30	0.96 ± 0.05 (6)

OXIDACION DE SUSTRATOS POR MITOCONDRIAS AISLADAS  
CON FRACCION SOLUBLE.