

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

Raquel Guinzberg Perrusquia*
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 central² y del sistema cardiovascular,¹ 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 Friend³ y Guinzberg *et al.*⁴

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 O₂/CO₂ (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.

la participación del calcio en el proceso metabólico, las células fueron incubadas en un medio libre de calcio y en presencia de EGTA 1 mM.

Determinación de urea. Una vez, terminado el periodo de incubación, se centrifugaron las diferentes muestras a una velocidad de 50 veces la gravedad durante 10 minutos, y se tomaron alícuotas del sobrenadante para la cuantificación de urea, según el método descrito por Gutman y Bergmeyer.⁵ Cada ensayo se realizó por duplicado, el número de observaciones indicado para cada condición experimental se refiere a diferentes preparaciones de células. Los datos se compararon estadísticamente con la prueba de hipótesis de "t" de student, respecto a medias de datos independientes.

Resultados

La Figura 1 muestra una curva dosis-respuesta a diferentes concentraciones de adenosina e inosina contra velocidad de síntesis de urea en hepatocitos aislados de rata, donde el valor basal fue de 14.48 ± 3.12 nmolas de urea por mg de peso húmedo de células. La adenosina mostró una estimulación en la síntesis de urea al emplear concentraciones de 10^{-7} a 10^{-4} M, con una K_a de $0.08 \mu\text{M}$. Estos datos dieron la pauta para revisar si alguno de los productos del catabolismo de la adenosina presentaban el mismo efecto, de los cuales sólo la inosina incrementó la síntesis de urea, con una K_a de $5 \mu\text{M}$.

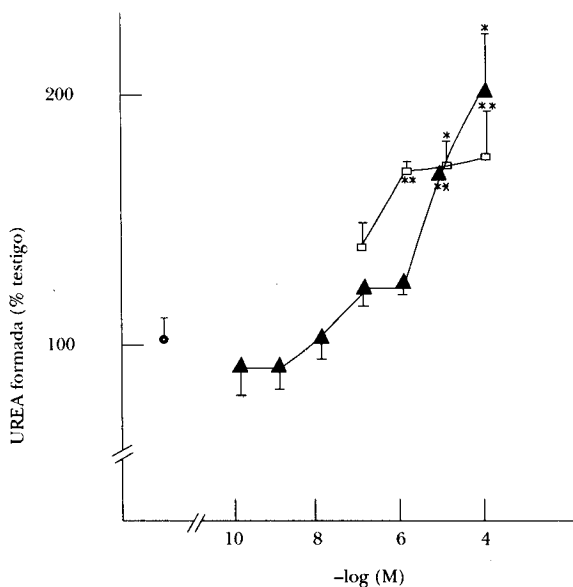


Figura 1. Estimulación de la síntesis de urea por adenosina e inosina. Testigo (○), adenosina (□), inosina (▲). * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$.

Los datos del Cuadro 1 indican que la sustitución de glucosa por la combinación de lactato más oleato impiden la actividad ureogénica de la adenosina. En el mismo cuadro, también se observa que las diferentes fuentes de amonio usadas, glutamina o carbonato de amonio, no influyen en la estimulación de la síntesis de urea ocasionada por la adenosina, al emplear glucosa como fuente de energía.

Se investigó el efecto de la alanina como sustrato oxidable para la síntesis de urea en presencia de moléculas que poseen un efecto ureogénico (Cuadro 2). Los resultados obtenidos señalan la participación de la alanina como sustrato para la formación de urea, así como la capacidad ureogénica del glucagon, la epinefrina y la adenosina; indican además, que con la mezcla lactato-oleato no se observó síntesis de urea, por lo cual llama la atención la influencia del sustrato oxidable para la estimulación de la ureogénesis, así como en la magnitud de la respuesta.

Se revisó el comportamiento de la adenosina o inosina sobre la síntesis de urea, junto con glucagon o epinefrina (Cuadro 3). De la incubación de cada nucleósido con cada una de las hormonas, resultó un antagonismo mutuo sobre los efectos individuales de cada molécula ensayada en la mezcla de adenosina o inosina con glucagon. Sin embargo, la respuesta ureogénica de la epinefrina no se modificó por la presencia de cada uno de estos nucleósidos. Por el momento, se carece de evidencias experimentales para dar una explicación a estos resultados.

Por otro lado, se incubaron células hepáticas en un medio de calcio extracelular, donde el efecto ureogénico de la adenosina fue inhibido (Cuadro 4); este resultado indica que el calcio es esencial en los efectos fisiológicos de este nucleósido en el hígado.

Cuadro 1
COMPARACION DE LA ACCION UROGENICA DE LA ADENOSINA EN HEPATOCITOS INCUBADOS CON DIFERENTES SUSTRATOS OXIDABLES Y CON DIVERSAS FUENTES DE AMONIO^o

Sustrato oxidable	Fuente de amonio	Sin adenosina	Con adenosina $10 \mu\text{M}$
Glucosa	Glutamina	7.6 ± 0.50 (5)	19.3 ± 2.64 (3)*
Glucosa	$(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$	7.4 ± 0.90 (15)	21.3 ± 0.20 (6)*
Lactato + oleato	Glutamina	7.7 ± 1.00 (4)	6.5 ± 0.74 (4)**
Lactato + oleato	$(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$	7.4 ± 1.46 (4)	6.2 ± 2.20 (3)***

^oLos datos se refieren a las nmolas de urea formada en 60 min por mg de células de peso húmedo.

Entre paréntesis se expresa el número de experimentos individuales. * $P < 0.001$, ** $P < 0.05$, *** $P < 0.9$

Discusión

Los datos de este trabajo sugieren que ambos nucleósidos poseen una acción fisiológica en los hepatocitos; primero por la baja concentración requerida para lograr una clara respuesta (Figura 1); segundo, por la especificidad de las moléculas efectoras, adenosina e inosina, en comparación con la hipoxantina, xantina y el ácido úrico; tercero, por la participación del calcio como molécula reguladora de los efectos metabólicos de la adenosina (Cuadro 3).

Cuadro 2
INFLUENCIA DE DIFERENTES SUSTRATOS SOBRE LA ACCION ESTIMULADORA DE LA UREOGENESIS, PROMOVIDA POR HORMONAS Y NUCLEOSIDOS^o

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 ± 1.08** (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)

^oLos 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 ureogénesis⁶ y de la gluconeogénesis;⁷ por el contrario, a concentraciones fisiológicas de 1 µM y aun menores, estimula la síntesis de urea (Figura 1) y la síntesis de glucosa.⁸ 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^o

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 < 0.01* P < 0.1**	P < 0.05* P < 0.9* P < 0.1**

^oLos 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
EFECTO UREOGENICO DE LA ADENOSINA EN PRESENCIA O AUSENCIA DE CALCIO^o

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)

^oLos 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 effect is 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).

3. Berry, M.N. and Friend, D.S.: Isolated rat hepatocytes. *J. Cell Biol.*, 43: 506-520 (1969).
4. Guinzberg, R., Laguna, I., Zentella, A., Guzman, R. and Piña, E.: Effect of adenosine and inosine on ureagenesis in hepatocytes. *Biochem. J.*, 245: 593-599 (1987).
5. Gutman, I. and Bergmeyer, H.U.: Determination of urea. In: *Methods of Enzymatic Analysis*. Vol. 4. Edited by: Bergmeyer, H. U., 1791-1794. *Academic Press*, New York, 1974.
6. Lund, P., Cornell, M.W. and Krebs, H.A.: Effect of adenosine on the adenine nucleotide content and metabolism of hepatocytes. *Biochem. J.*, 159: 593-599 (1975).
7. Marchand, J.C., Lavoine, A., Giroz, M. and Matray, F.: The influence of adenosine on intermediary metabolism of isolated hepatocytes. *Biochimie*, 61: 1273-1282 (1979).
8. Zentella de Piña, M., Díaz-Cruz, A., Guinzberg, P.R. and Piña, E.: "Hormone-like" effect of adenosine and inosine on gluconeogenesis from lactate in isolated hepatocytes. *Life Sci.*, 45: 2269-2274 (1989).