

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

MECANISMOS DE SEÑALIZACIÓN DE LOS RECEPTORES DE  
ADENOSINA A<sub>2A</sub> Y A<sub>2B</sub> EN LA UREOGÉNESIS, GLUCOGENÓLISIS  
Y GLUCONEOGÉNESIS EN HEPATOCITOS AISLADOS DE RATA.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

PRESENTA

**CARLOS ACOSTA TRUJILLO**

Asesores:

Dra. Raquel Guinzberg Perrusquía

Dr. Enrique Piña Garza

México, D. F.

2009



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.

## DEDICATORIA

A mis padres:

Isidra Trujillo y Guillermo Acosta del Águila. Por la confianza que depositaron en mí y su ayuda incondicional, ya que sin ella no hubiera podido dar éste paso.

A mis hermanos:

Jenny, Guillermo y Arturo. Por su apoyo a lo largo de mi carrera.

A mi novia:

K. Vanessa Maillard Berdeja. Por su comprensión, apoyo y cariño a lo largo de éste trabajo.

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México.  
Al Laboratorio 34 de la Unidad de Posgrado e Investigación de la Facultad de  
Medicina.

Al proyecto del CONACYT con # 90551.

Al proyecto PAPIIT con # IN201208.

Por su apoyo y facilidades para este trabajo.

A mis asesores:

Dra. Raquel Guinzberg Perrusquía y el Dr. Enrique Piña  
Garza por su paciencia y por haber llevado a cabo la dirección de ésta tesis.

A los miembros del jurado: MVZ, M. en C. Humberto Máximo Troncoso  
Altamirano, Dr. Antonio Díaz Cruz, MVZ, M. en C. Miguel Ángel Martínez  
Castillo, MVZ. Manuel Espinosa Pedroza y Dra. Sara del Carmen Caballero  
Chacón por sus sugerencias en la revisión de ésta tesis.

Al Dr. Héctor Riveros Rosas por sus valiosos comentarios  
A todos los que forman parte del grupo de investigación del Dr. Piña  
En especial al Dr. Antonio por recomendarme para formar parte de un  
excelente equipo de trabajo.

Al Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de  
Experimentación por aprobar el protocolo de ésta tesis.

## CONTENIDO

Resumen.	1
Lista de abreviaturas usadas en este trabajo.	3
Introducción.	5
Gluconeogénesis.	5
Glucogenólisis.	7
Ureogénesis.	8
Adenilil ciclasa.	10
Proteínas G	10
Adenosin monofosfato cíclico.	11
Proteína cinasa dependiente de AMPc.	12
Proteína de intercambio directamente activada por AMPc.	13
Antecedentes.	14
Adenosina y sus receptores.	14
Hipótesis.	18
Objetivo.	18
Material y Métodos.	19
Animales de Experimentación.	19
Reactivos.	19
Aislamiento de células hepáticas.	20
Determinación de glucosa (Gluconeogénesis).	20
Determinación de glucosa (Glucogenólisis).	21
Determinación de urea (Ureogénesis).	21
Protocolo del experimento.	23
Tabla 1. Protocolo para la incubación de los hepatocitos que representa las diferentes condiciones experimentales con los agonistas de receptores de adenosina, los análogos de AMPc y los inhibidores de la PKA y la Epac.	23
Análisis estadístico.	24

Resultados. 25

Glucogenólisis. 25

Figura 1. Respuestas obtenidas a la estimulación de los receptores A2A y A2B, y el efecto producido por los análogos de AMPc, y los inhibidores de PKA y Epac en la glucogenólisis. 27

Figura 2. Respuestas obtenidas por la estimulación de los receptores de adenosina A2A y su bloqueo con el H-89 en la glucogenólisis. 28

Figura 3. Respuestas obtenidas por la estimulación de los receptores de adenosina A2B y su bloqueo con el BFA en la glucogenólisis. 29

Gluconeogénesis. 29

Figura 4. Respuestas obtenidas a la estimulación de los receptores A2A y A2B, y el efecto producido por los análogos de AMPc, y los inhibidores de la PKA y la Epac en la gluconeogénesis. 32

Figura 5. Respuestas obtenidas por la estimulación de los receptores de adenosina A2A y su bloqueo con el H-89 en la gluconeogénesis. 33

Figura 6. Respuestas obtenidas por la estimulación de los receptores de adenosina A2B y su bloqueo con el BFA en la gluconeogénesis. 34

Ureogénesis.34

Figura 7. Respuestas obtenidas a la estimulación de los receptores A2A y A2B, y el efecto producido por los análogos de AMPc, y los inhibidores de la PKA y la Epac en la ureogénesis.37

Figura 8. Respuestas obtenidas por la estimulación de los receptores de adenosina A2A y su bloqueo con el H-89 en la ureogénesis. 38

Figura 9. Respuestas obtenidas por la estimulación de los receptores de adenosina A2B y su bloqueo con el BFA en la ureogénesis. 39

Mecanismo propuesto: 39

Figura 10. Mecanismo de señalización propuesto para los receptores A2A y A2B de la adenosina en la ureogénesis, la glucogenólisis y la gluconeogénesis en hepatocitos aislados de rata. 40

Discusión. 41

Conclusiones. 45

Bibliografía. 47

## Resumen.

ACOSTA TRUJILLO CARLOS. **Mecanismos de señalización de los receptores de adenosina  $A_{2A}$  y  $A_{2B}$  en la ureogénesis, glucogenólisis y gluconeogénesis en hepatocitos aislados de rata** (bajo la dirección de la Dra. Raquel Guinzberg Perrusquía y el Dr. Enrique Piña Garza).

En hepatocitos aislados de hígado de rata se estudió el efecto de los receptores de adenosina  $A_{2A}$  y  $A_{2B}$  en la señalización celular vía AMPc (PKA o Epac), sobre la ureogénesis, gluconeogénesis y glucogenólisis. Los hepatocitos aislados de rata se incubaron con agonistas selectivos de los receptores  $A_{2A}$  y  $A_{2B}$ , con análogos del AMPc específicos para activar a PKA o Epac, e inhibidores de la PKA y la Epac. Los resultados obtenidos indican que cuando estimulamos a los hepatocitos con el análogo  $A_{2A}$  en presencia del H89, inhibidor de la PKA, se inhibe el aumento en la concentración de urea y glucosa, previamente detectado en presencia del análogo solo. Al estimular con el análogo selectivo  $A_{2B}$  en presencia del mismo H89 no se inhibió la activación de la gluconeogénesis, glucogenólisis ni de la ureogénesis registrada con el análogo  $A_{2B}$  solo. Cuando la mezcla de incubación contenía al agonista selectivo  $A_{2A}$  y Brefeldin A, un inhibidor de la Epac sobre la síntesis de glucosa y urea, no se ve afectado el efecto estimulador del agonista de  $A_{2A}$ , en cambio si la mezcla de incubación está constituida por  $A_{2B}$  y Brefeldin A se observa un efecto inhibitorio del estímulo del agonista  $A_{2B}$  al activar la gluconeogénesis, glucogenólisis y ureogénesis. Estos datos nos permiten sugerir que en hepatocitos de rata, la señalización celular del receptor de adenosina  $A_{2A}$  es a través de la

cascada de amplificación dependiente de PKA y la señalización celular del receptor  $A_{2B}$  es por medio de la correspondiente cascada de amplificación ligada a Epac.



## Lista de abreviaturas usadas en este trabajo.

---

6BNZ	N <sup>6</sup> -benzoiladenosín-3',5'- monofosfato cíclico.
8pCPT	8-(4-clorofeniltio) -2'-O-metiladenosín 3',5'- monofosfato cíclico.
AC	adenilil ciclase.
ADP	adenosín difosfato.
ATP	adenosín trifosfato.
Agosel	agonistas selectivos.
AMP	adenosín monofosfato.
AMPc	adenosín monofosfato cíclico.
BFA	brefeldin A; gama 4-dihidroxi-2-(6-hidroxi-1-heptenil)-4-ácido ciclopentancrotónico lambda-lactona.
CGS-21680	2-p-(2carboxyethyl)phenetyl-5'-N-ethylcarboxiamido adenosine.
DPCPX	8-ciclopentil-1,3-dipropilxantina.
Epac	proteína de intercambio activada por AMPc (del inglés exchange protein directly activated by cAMP).
GDP	guanosina difosfato.
GTP	guanosina trifosfato.
H-89	N-[2-(p-bromocinnamilamino)etil]-5-isoquinolín sulfonamida.
NECA	3-5'-N-ethylcarboxiamido adenosine.
PDE	fosfodiesterasa.

PKA

proteína cinasa dependiente de AMPc.

## Introducción.

---

### Gluconeogénesis.

La glucosa ocupa un lugar central en el metabolismo, como combustible y como precursor de otras biomoléculas. Las células del cerebro y los glóbulos rojos dependen casi por completo de la glucosa como fuente de energía. La capacidad del hígado para almacenar glucógeno solamente basta para suministrar glucosa al cerebro durante medio día en situación de ayuno. De este modo, cuando se ayuna la mayor parte de la glucosa necesaria debe ser aportada por gluconeogénesis (literalmente, nueva síntesis de glucosa) que es la biosíntesis de glucosa a partir de precursores que no son carbohidratos. La gluconeogénesis y la síntesis de urea representan las vías biosintéticas principales del hígado durante el ayuno[1]. La gluconeogénesis se lleva a cabo, principalmente, en el hígado y en la corteza renal. Algunos de los sustratos gluconeogénicos son: lactato, piruvato, glicerol y alanina, siendo el lactato uno de los más importantes.

En la regulación de la gluconeogénesis cabe destacar el papel de la fructosa-2,6-bisfosfato, una molécula señal. Al aumentar los niveles de fructosa-2,6-bisfosfato se inhibe la gluconeogénesis, debido a que actúa sobre la fructosa-1,6-bisfosfatasa[2]. La fructosa-2,6-bisfosfato se forma por fosforilación de la fructosa-6-fosfato, en una reacción catalizada por la fosfofructocinasa-2. También la fructosa-2,6-bisfosfato es hidrolizada a fructosa-6-fosfato por la fructosa-2,6-bisfosfatasa. Tanto la fosfofructocinasa-2 como la fructosa-2,6-bisfosfatasa se encuentran en la misma cadena peptídica de 55 kD. Esta enzima bifuncional tiene un dominio regulador en la región amino terminal, seguido por un dominio quinasa y un dominio fosfatasa[3].

Esta enzima bifuncional puede ser regulada tanto por el AMPc como por el calcio. Un aumento en la concentración del AMPc activa la subunidad catalítica de la proteína cinasa dependiente de AMPc (PKA). La PKA fosforila a las enzimas fosfofructocinasa-2 y fructosa-2,6-bisfosfatasa; de este modo, se inhibe la síntesis de fructosa-2,6-bisfosfato y se activa su degradación. La PKA también fosforila a la piruvato cinasa, inactivándola, esto disminuye el ciclo fútil piruvato/fosfoenolpiruvato, con lo que se reconduce al fosfoenolpiruvato hacia la síntesis de glucosa. La adrenalina promueve la gluconeogénesis por estimulación de los receptores  $\alpha$ -1 adrenérgicos, incrementando el calcio citosólico, y disminuyendo la concentración de la fructosa-2,6-bisfosfato. El aumento de calcio activa a una proteína cinasa dependiente de calcio (PKC), que fosforila a la fosfofructocinasa-2[4].

El control a corto plazo de la gluconeogénesis puede ser ejercida por hormonas como el glucagon. La gluconeogénesis también es controlada por sus productos finales como la glucosa y es incrementada durante la diabetes y el ayuno[5]. Las propiedades del glucagon para estimular la gluconeogénesis desde el lactato en preparaciones de hígado aislado fueron informadas por primera vez por Schimassek & Mitzkat en 1963[6]. El glucagon incrementó la tasa aparente de gluconeogénesis en un 30%-70% cuando se utilizaron hígados perfundidos de ratas en ayuno, y de 200%-400% con hígados de ratas alimentadas[7-9]. El glucagon no solo estimula la gluconeogénesis desde lactato y piruvato, también lo hace desde sustratos como glutamato[10], glutamina[11] y propionato[12], que entran en la vía metabólica a nivel de oxaloacetato, o como fructosa[13], gliceraldehído y dihidroxiacetona[14], que son convertidas a triosa fosfato.

## Glucogenólisis.

Otra forma de obtener glucosa libre es por la degradación del glucógeno. En la glucogenólisis primero actúa la enzima glucógeno fosforilasa, la cual acorta las cadenas del glucógeno eliminando los restos glucosilos o glucosídicos terminales que aparecen en forma de glucosa-1-fosfato. Posteriormente la enzima desramificante cataliza dos reacciones sucesivas: la primera es una transferencia de glucosilos terminales y la segunda (amilo-1,6-glucosidasa) es la hidrólisis del residuo que permanecía unido por enlace  $\alpha$  1-6 para dar glucosa libre. Tanto la síntesis como la degradación del glucógeno se regulan por efectores alostéricos (AMP, ATP, glucosa-6-fosfato, entre otros) y por modificación covalente a través de fosforilación y desfosforilación[3].

La glucógeno fosforilasa es un dímero con un sitio activo para unirse al glucógeno, otro para la glucosa, un sitio de unión al AMP y además un sitio inhibidor. Cada uno de los monómeros puede ser fosforilado en la serina-14. La fosforilación de este sitio convierte la forma *b* o inactiva, en la forma *a* o activa. La enzima que fosforila a la glucógeno fosforilasa es la fosforilasa cinasa, formada por tres subunidades:  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\delta$ . La subunidad  $\delta$  es la calmodulina, proteína que también existe separadamente, que juega un papel regulador. La calmodulina liga cuatro iones calcio por monómero; cuando las subunidades de calmodulina de la fosforilasa cinasa están activadas, la molécula entera cambia a la conformación activa y es capaz de fosforilar a la glucógeno fosforilasa. De esta manera el incremento en la concentración de calcio provoca la degradación de glucógeno. Por medio de la adrenalina (receptor alfa), el complejo adrenalina-receptor convierte al fosfatidilinositol-4,5-bifosfato a inositol-1,4,5-trifosfato ( $IP_3$ ) y diacilglicerol[3]. El  $IP_3$  es capaz de liberar calcio

del retículo endoplásmico e incrementar su concentración en el citosol. Al final se obtiene una activación de la fosforilasa cinasa por medio de la calmodulina[3].

La glucogenólisis hepática responde también a los incrementos en los niveles de AMPc. El AMPc activa las subunidades C de la PKA, enzima capaz de fosforilar las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de la fosforilasa cinasa y de esta manera activarla y promover la glucogenólisis[3].

El glucagon aumenta la glucogenólisis hepática por la estimulación de la adenilil ciclasa que causa un incremento en los niveles de AMPc celular que activa a la PKA y esta a su vez conduce a la activación de una glucógeno fosforilasa para la degradación del glucógeno[15]. Al mismo tiempo, la PKA fosforila y ayuda a inactivar la síntesis de glucógeno[16].

### Ureogénesis.

La urea es formada en el hígado por un proceso cíclico en el cual la ornitina es primero convertida en citrulina y después en arginina[17]. La reacción hidrolítica de arginina produce la urea y regenera ornitina. La urea es el principal producto final de nitrógeno en el metabolismo de mamíferos y muchos otros organismos, además el ciclo de la urea requiere de enzimas mitocondriales y citosólicas[18].

La ruta del nitrógeno removido por el hígado del exceso de aminoácidos es la siguiente: Las transaminasas transfieren nitrógeno de glutamato a 2-oxoglutarato. Como la urea contiene 2 átomos de nitrógeno, 2 moléculas de glutamato deben donar su grupo amino. Una molécula es desaminada directamente por glutamato deshidrogenasa. Ésta molécula de amonio es combinada con bicarbonato para formar fosfato de carbamoil, el cual transfiere

su grupo carbamoil a ornitina para formar citrulina. La segunda molécula de glutamato transfiere su nitrógeno por transaminación al oxaloacetato para formar aspartato. La molécula de aspartato es incorporada intacta a argininosuccinato mediante una reacción con citrulina. Después por una reacción de eliminación, la cadena de 4 carbonos de argininosuccinato es convertida a fumarato con la aparición de arginina como producto de eliminación. Finalmente la hidrólisis de arginina nos da urea y se regenera la ornitina.

La carbamoil fosfato sintetasa I, la enzima mitocondrial que cataliza el primer paso del ciclo de la urea depende de  $Mg^{2+}$  y ATP[19], es regulada por cambios en la concentración de  $Ca^{2+}$  en la matriz mitocondrial[20] y es activada alostéricamente por el N-acetilglutamato[21]. Este metabolito es sintetizado a partir de glutamato y acetil-CoA por la N-acetilglutamato sintetasa, e hidrolizado por una hidrolasa específica. La velocidad de producción de la urea por el hígado está, de hecho, en correlación con la concentración de N-acetilglutamato. Cuando aumenta la degradación de aminoácidos generando un exceso de nitrógeno que debe ser excretado, se requiere un aumento en la velocidad de síntesis de urea. El incremento en esta tasa de degradación implica un aumento en la concentración de glutamato a través de reacciones de transaminación. Esta situación, a su vez, provoca un aumento en la síntesis del N-acetilglutamato, estimulando a la carbamoil fosfato sintetasa y, por lo tanto, a todo el ciclo de la urea. Las enzimas restantes del ciclo de la urea están controladas por las concentraciones de sus respectivos sustratos.

El glucagon incrementa la actividad de las cinco enzimas del ciclo de la urea en el hígado de rata [22].

## Adenilil ciclasa.

La activación de la adenilil ciclasa (AC) da como resultado la producción intracelular de AMPc a partir de ATP, es iniciada por el enlace de hormonas a receptores de superficie de células[23]. Adrenalina o epinefrina, dopamina, prostaglandina PGE2, adenosina, y glucagon son solo algunos ejemplos de muchas hormonas que activan la AC mediante enlace a receptores de membrana. En mamíferos se han identificado nueve genes que codifican para la adenilil ciclasa de membrana(AC1 a AC9)[24-27] y un gen que codifica para una isoforma soluble(sAC)[28]. Estas diez isoformas de adenilil ciclasa pueden ser divididas en cinco familias distintas basadas en la similitud de la secuencia de aminoácidos y sus atributos funcionales. Las isoformas sensibles a  $Ca^{2+}$  y  $Ca^{2+}$ -calmodulina son los tipos AC1, AC3 y AC8. Las que son estimuladas por la subunidad  $\beta\gamma$  de las proteínas G son AC2, AC4 y AC7. La AC5 y la AC6 se distinguen por su sensibilidad a ser inhibidas por  $Ca^{2+}$  y las isoformas de la subunidad  $\alpha_i$  de las proteínas G ( $G\alpha_o$ ,  $G\alpha_{i1}$ ,  $G\alpha_{i2}$ ,  $G\alpha_{i3}$  y  $G\alpha_z$ ). AC9 es la más divergente de la familia y es altamente insensible al diterpeno forskolin. La última isoforma, sAC, es la más divergente de todas las ciclasas de mamífero y es similar a las ciclasas encontradas en cianobacterias[28]

En hígado de mamíferos se ha reportado la existencia de la AC4 y AC5, en general todas las isoformas de AC se encuentran, aunque no limitadas, en tejidos excitables como son las neuronas y el músculo[24, 29].

## Proteínas G

Las señales de transducción mediadas por proteínas G es un complejo y muy versátil sistema de señalización transmembranal que envuelve cientos de receptores diferentes y múltiples proteínas G y efectores[30]. Las proteínas de



unión de nucleótidos de guanina o proteínas G son heterotrímeros compuestos por las subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ , y se clasifican con base a su subunidad  $\alpha$ [31]. Las proteínas G heterotriméricas que acoplan receptores a efectores, pueden ser divididas en cuatro grupos expresadas en familias,  $G_s$ ,  $G_i/G_o$ ,  $G_q/G_{11}$  y  $G_{12}/G_{13}$ [32-34]. Las concentraciones celulares de proteínas G que pertenecen a la familia  $G_{i/o}$  exceden considerablemente a aquellas de las otras familias[31]. La subunidad  $\alpha$  consiste en dos dominios: un dominio con actividad de GTPasa y un dominio de  $\alpha$  hélice, que es común en todas las subunidades  $\alpha$ . Las proteínas G, en reposo, se encuentran normalmente unidas a GDP. Cuando ocurre la unión del agonista al receptor, y activación del mismo, el GDP se intercambia por un GTP citosólico y la proteína G se disocia en dos componentes: la subunidad  $\alpha$  unida al GTP y las subunidades  $\beta$  y  $\gamma$ . Eventualmente, la subunidad  $\alpha$  se inactiva a si misma (actividad de GTPasa) y, ya unida a GDP, se vuelve a reconstituir la proteína G[31].

Se han descrito cinco subunidades  $\beta$  y diez subunidades  $\gamma$ [35] Las subunidades  $\beta$  y  $\gamma$  se encuentran asociadas fuertemente y se les puede manejar como una sola unidad funcional. Tanto las subunidades  $\alpha$  unidas a GTP como los dímeros  $\beta$  y  $\gamma$  son moléculas activas por sí mismas y modulan la actividad de proteínas efectoras específicas[36, 37].

### Adenosin monofosfato cíclico.

El concepto de segundo mensajero en señalización nació con el descubrimiento del adenosin monofosfato cíclico (AMPc) y su habilidad para influenciar el metabolismo, la forma celular y la transcripción genética[38] vía fosforilación reversible de proteínas. El AMPc es producido por la adenilil ciclasa en respuesta a una variedad de señales extracelulares como son

hormonas, factores de crecimiento y neurotransmisores, este AMPc difunde rápidamente en la célula para activar las proteínas cinasas dependientes de AMPc y también estimula la fosforilación de un grupo selecto de proteínas. La disminución en los niveles de AMPc en citosol es debido a la hidrólisis del AMPc por las fosfodiesterasas. En la ausencia de fosfodiesterasas el AMPc es extremadamente estable. Durante mucho tiempo se pensó que el único objetivo del AMPc era la proteína cinasa dependiente de AMPc (PKA)[39], que se ha convertido en un modelo de estructura y regulación de proteína cinasa [40-42].

### Proteína cinasa dependiente de AMPc.

En la mayoría de las células eucariotas, el AMPc ejerce una gran influencia dentro de la célula principalmente a través de la activación de la proteína cinasa dependiente de AMPc (PKA), una enzima clave con numerosos sustratos intracelulares[43]. La PKA fue una de las primeras proteínas cinasas en ser descubiertas[39]. La PKA está compuesta de dos subunidades: la catalítica (C) y la reguladora (R). La subunidad C es inicialmente fosforilada en el aminoácido treonina 197 (T197)[44, 45]. La fosforilación de T197 es necesaria para la maduración y actividad biológica óptima de la PKA[46, 47]. Una vez fosforilada la subunidad C de la PKA es totalmente activa, y el T197 fosforilado no se desactiva rápidamente[48]. La subunidad C de la PKA es entonces regulada vía interacción con la subunidad inhibitoria R, el mayor receptor intracelular de AMPc que secuestra la subunidad C para formar una holoenzima heterotetramérica inactiva,  $R_2C_2$ . El AMPc se une a la subunidad R e induce cambios conformacionales que permiten la disociación de la holoenzima en sus constituyentes subunidades C y R[49]. La subunidad C

## Antecedentes.

---

### Adenosina y sus receptores.

La adenosina es un nucleósido de purina y es intermediario en la vía degradativa del ATP. La adenosina es transportada hacia las células por medio de difusión facilitada, pero también es formada en las células a partir del AMP o de la degradación de la S-adenosilhomocisteína. El AMP intracelular es derivado hacia adenosina por una nucleotidasa específica[58, 59]. La adenosina es degradada hacia inosina por la adenosina desaminasa o llevada hacia AMP por la adenosina cinasa[58, 59].

Entre las propiedades biológicas de la adenosina se encuentra su toxicidad para las células de mamíferos y para las bacterias[58]. En sistema nervioso central la adenosina produce disminución en la liberación de neurotransmisores, sedación, disminución en la actividad locomotora, hiperalgesia y actúa como anticonvulsivante. En el sistema cardiovascular produce vasodilatación, vasoconstricción, bradicardia, un efecto inotrópico negativo e inhibición de la agregación plaquetaria. En el riñón produce disminución en el filtrado glomerular y funciona como anti diurético e inhibe la liberación de renina. En el sistema respiratorio produce broncoconstricción, broncodilatación, secreción de moco y depresión respiratoria. En el sistema gastrointestinal produce inhibición de la secreción de ácido gástrico[60]. Las acciones opuestas de la adenosina en un mismo sistema se deben a la activación de diferentes receptores de membrana[60].

Actualmente hay evidencia de la existencia de un gran número de células que contienen receptores de membrana donde la adenosina actúa para modificar las funciones celulares[61]. Estos receptores son llamados, en general,

purinoreceptores, los cuales están subdivididos. En un principio fueron clasificados como receptores P<sub>1</sub> y P<sub>2</sub>, siendo los primeros más sensibles a la adenosina y al AMP y los responsables de la modulación de la actividad de la adenilil ciclase, mientras que los P<sub>2</sub> son más sensibles al ATP y al ADP[59, 62]. Actualmente los receptores P<sub>1</sub>, específicos para la adenosina, se subdividen en cuatro subtipos: A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> y A<sub>3</sub>[62]; se propone la existencia de un quinto subtipo de receptor llamado A<sub>4</sub>[63], el cual no ha sido clonado.

Tradicionalmente, los receptores para la adenosina han sido clasificados en subtipos, basándose principalmente en sus características de unión del ligando y las respuestas bioquímicas obtenidas por su activación. El primer parámetro incluye las afinidades relativas de una serie de agonistas como también la sensibilidad a antagonistas. La clonación de los receptores de adenosina se inició en 1989 con el aislamiento de los cDNAs del “receptor huérfano”, denominados RDC7 y RDC8, por Libert et al[64]. Posteriormente se confirmó que el RDC7 y el RDC8 codificaban al receptor A<sub>1</sub>[65] y al receptor A<sub>2</sub>[66], respectivamente. Los receptores de adenosina pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a las proteínas G y se caracterizan por siete dominios transmembranales de aproximadamente de 22 a 25 aminoácidos hidrofóbicos[67]. Se considera que el lado intracelular de estos receptores, particularmente las regiones de las asas intracelulares 3-4 y 5-6; y la porción carboxilo terminal, interaccionan con la proteína G acopladora[68].

En hígado de ratas se ha detectado los ARNm que codifican para los cuatro subtipos de receptores de adenosina, aunque se detectó que el ARNm del receptor de adenosina A<sub>3</sub> estaba presente en mayor cantidad[69-71].

En hígado de ratas se han informado concentraciones de adenosina de 0.01 μM [72],

mientras que en plasma y suero son de 2.4  $\mu\text{M}$  [73] y 8.0  $\mu\text{M}$  [74] respectivamente.

Se ha estudiado que en hepatocitos aislados de rata concentraciones micro molares de adenosina estimulan la glucogenólisis[75], la gluconeogénesis[76] y la ureogénesis[77].

La respuesta ureogénica a la estimulación de los receptores de adenosina  $A_1$  o  $A_3$ , es estrictamente dependiente del incremento de la concentración de calcio intracelular y extracelular respectivamente[78], mientras que la respuesta ureogénica el receptor  $A_{2A}$  no depende de la concentración de calcio[79].

Se sabe que en hepatocitos aislados de rata la concentración de AMPc se incrementó en respuesta al estímulo de los receptores de adenosina  $A_{2A}$  y  $A_{2B}$ , al igual que la ureogénesis[80]. Es de gran interés hacer notar que al inhibir la adenilil ciclasa en presencia de bloqueadores específicos, la respuesta ureogénica de los receptores de adenosina  $A_{2A}$  y  $A_{2B}$  se bloquea, pero no la respuesta de los receptores  $A_1$  y  $A_3$ [80].

En hepatocitos aislados de rata se encontró que la activación del receptor de adenosina  $A_{2A}$  estimula la gluconeogénesis mediada por AMPc[81].

También se ha reportado que la estimulación del receptor  $A_{2B}$  incrementa la liberación de glucosa, probablemente por un proceso dependiente de AMPc[82].

En conclusión para los efectos de este trabajo los datos importantes son los siguientes:

- i. Los receptores hepáticos de la adenosina cuya señalización ocurre vía AMPc son los  $A_{2A}$  y  $A_{2B}$ .
- ii. La estimulación de dichos receptores produce en el hígado un aumento en la gluconeogénesis, la glucogenólisis y la síntesis de urea.

- iii. Parece redundante y no existe ninguna explicación al hecho de que 2 receptores distintos, que son activados por el mismo agonista (la adenosina), producen las mismas respuestas metabólicas vía la cascada de amplificación del AMPc.

En vista de lo anterior, y de que se ha reportado dos rutas diferentes en la cascada de amplificación de AMPc, una vía PKA y otra vía Epac, se propone la siguiente hipótesis:

## Hipótesis.

---

La vía de señalización del AMPc, generado por la activación de los receptores  $A_{2A}$  y  $A_{2B}$  en el hepatocito, corre río abajo por dos rutas; una en la que interviene la PKA y otra en la que participa la Epac.

## Objetivo.

---

El objetivo es investigar la participación de la PKA y la Epac como parte de la respuesta a la estimulación de los receptores  $A_{2A}$  y  $A_{2B}$  de la adenosina en la glucogenólisis, la gluconeogénesis y la ureogénesis.

## Material y Métodos.

---

### Animales de Experimentación.

Se utilizaron 15 ratas macho de la cepa Wistar con un peso entre 180 a 200 gramos, alimentadas *ad libitum*, con alimento comercial<sup>1</sup>. Los animales fueron mantenidos durante una semana con temperatura controlada de 20°C, colocados por parejas en jaulas con dimensiones de 24cm de ancho, 40cm de largo y 20cm de alto, con lecho comercial<sup>2</sup> elaborado de maderas duras libres de patógenos, alquitranes y aflatoxinas.

Los experimentos se realizaron de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio), y aprobados por el Comité Institucional de Ética de la Facultad de Medicina y por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México.

### Reactivos.

Se utilizaron los siguientes reactivos: análogo de adenosina específico para estimular los receptores A<sub>2A</sub> (CGS-21680)[83]; análogo de adenosina específico para estimular los receptores A<sub>2B</sub> (NECA) [84-86]; análogo de adenosina para inhibir los receptores A<sub>1</sub> (DPCPX); análogo de AMPc específico para estimular PKA (6BNZ)[87]; análogo de AMPc específico para estimular EPAC (8pCPT)[87]; inhibidor específico para PKA (H89)[88, 89]; inhibidor específico para EPAC (BFA)[90].

<sup>1</sup>Harlan 2018S de la marca Harlan TEKLAD elaborado en Madison, Wisconsin.

<sup>2</sup>Aspen Chip de la marca NEPCO.



Debido a que NECA también estimula a los receptores  $A_1$ , se añadió un inhibidor específico para éstos receptores; por lo que al hablar del análogo de adenosina NECA se hace referencia a la mezcla del agonista del receptor  $A_{2B}$  con el antagonista para el receptor  $A_1$ .

### Aislamiento de células hepáticas.

La rata se anestesió utilizando fármacos aprobados por la NOM-062-ZOO-1999 (ketamina y xylazina 75mg/Kg + 10mg/kg IP) y se realizó la eutanasia por exanguinación, se aislaron las células hepáticas por el método de Berry y Friend[91], modificado por Guinzberg R.[77], el cual consiste en la perfusión del hígado, a través de la vena porta, con solución Ringer-Krebs-Bicarbonato (NaCl 120mM, KCl 5.7 mM,  $KH_2PO_4$  1.2mM,  $NaHCO_3$  12 mM) adicionado con colagenasa tipo IV con lo que se digiere el estroma hepático. Se obtienen las células hepáticas macerando el hígado y lavando con la misma solución Ringer-Krebs-Bicarbonato; la solución de hepatocitos se vació en un tubo, se centrifugó y se decantó el sobrenadante. La muestra celular se sometió a la prueba de exclusión con azul de tripano, para evaluar la viabilidad celular, obteniendo una viabilidad mayor del 90%. Todos los experimentos se realizaron por duplicado.

### Determinación de glucosa (Gluconeogénesis).

Se utilizaron ratas en ayuno (24 hrs). Se obtuvieron los hepatocitos con el procedimiento ya descrito, las células aisladas se separaron en tubos y se incubaron en presencia de lactato (como sustrato), análogos de adenosina, los análogos del AMPc y los inhibidores de la PKA y la Epac, la incubación se hizo durante 60 minutos

en un baño de agua con una temperatura de 37°C y con agitación continua, posteriormente se centrifugó a 2700g durante 5 minutos y se obtuvo el sobrenadante. La determinación de la concentración de glucosa se hizo en el sobrenadante con el método de Fales[92], el color desarrollado se midió a 540 nm en un espectrofotómetro de luz visible. Se evaluó el efecto gluconeogénico de los análogos de adenosina en presencia de análogos del AMPc y los inhibidores de la Epac y la PKA comparándolos con un basal.

### Determinación de glucosa (Glucogenólisis).

Las células aisladas se separaron en tubos y se incubaron en presencia de análogos de adenosina, con la adición de los mismos reactivos utilizados para gluconeogénesis (excepto lactato), durante 45 minutos en un baño de agua con temperatura de 37°C y con agitación continua, después se centrifugó a 2700g durante 5 minutos y se obtuvo el sobrenadante. La determinación de la concentración de glucosa se hizo en el sobrenadante con el método de Fales[92], el color desarrollado se midió a 540 nm en un espectrofotómetro de luz visible. Se evaluó el efecto glucogenolítico de los análogos de adenosina en presencia de análogos del AMPc y los inhibidores de la Epac y la PKA comparándolos con un basal.

### Determinación de urea (Ureogénesis).

Las células aisladas se separaron en tubos y se incubaron en presencia de carbonato de amonio (como fuente de nitrógeno), ornitina (para la síntesis de urea), análogos de adenosina, así como los análogos del AMPc e inhibidores de la PKA y la Epac. La incubación se hizo durante 60 minutos en un baño de agua con temperatura

de 37°C y con agitación continua, posteriormente las muestras se centrifugaron a 2700g durante 5 minutos y se obtuvo el sobrenadante. La concentración de urea se determinó en el sobrenadante con el método de Gutman y Bergmeyer[93]. Se evaluó el efecto ureogénico de los análogos de adenosina en presencia de análogos del AMPc y de inhibidores de la Epac y la PKA comparándolos con un basal.

## Protocolo del experimento.

La incubación de los hepatocitos con los diferentes reactivos se realizó de acuerdo a la Tabla 1.

	CGS- 21680	NECA	6-BNZ	8pCPT	H89	BFA
BASAL	---	---	---	---	---	---
α	+	---	---	---	---	---
β	---	+	---	---	---	---
γ	---	---	+	---	---	---
δ	---	---	---	+	---	---
ε	---	---	---	---	+	---
ζ	---	---	---	---	---	+
η	+	---	+	---	---	---
θ	+	---	---	+	---	---
ι	+	---	---	---	+	---
κ	+	---	---	---	---	+
λ	---	+	+	---	---	---
μ	---	+	---	+	---	---
ν	---	+	---	---	+	---
ξ	---	+	---	---	---	+

**Tabla 1. Protocolo para la incubación de los hepatocitos que representa las diferentes condiciones experimentales con los agonistas de receptores de adenosina, los análogos de AMPc y los inhibidores de la PKA y la Epac.**

De lado izquierdo se encuentran los tratamientos nombrados con las literales del alfabeto griego, en la parte superior están los nombres de las sustancias adicionadas y al centro se indica con un signo (+) la adición de 10  $\mu$ L de la sustancia para obtener una concentración final de 1  $\mu$ M de dicha sustancia. Al basal no se le adiciona ninguna de las sustancias mencionadas. El mismo protocolo se utilizó para la determinación de glucosa y de urea. CGS-21680, análogo de adenosina específico para estimular los receptores  $A_{2A}$  (AGOSEL  $A_{2A}$ ); NECA, análogo de adenosina específico para estimular a los receptores  $A_{2B}$  (AGOSEL  $A_{2B}$ ); 6BNZ, análogo de AMPc específico para estimular a la PKA; H89, inhibidor específico para la PKA; 8pCPT, análogo de AMPc específico para estimular la Epac; BFA, inhibidor específico para la Epac.

## Análisis estadístico.

Los resultados obtenidos de las determinaciones de glucosa y urea se presentan como la media  $\pm$  error estándar (ES). Se utilizó el procedimiento de análisis de varianza (ANOVA) para realizar el análisis de los datos para todos los casos, considerando una  $p < 0.05$  como estadísticamente significativa. Se utilizó el método de Bonferroni para realizar las comparaciones múltiples de medias cuando existió diferencia estadística significativa en el ANOVA. Se utilizó el programa estadístico Sigma Stat v.1 para el sistema operativo Windows.

## Resultados.

---

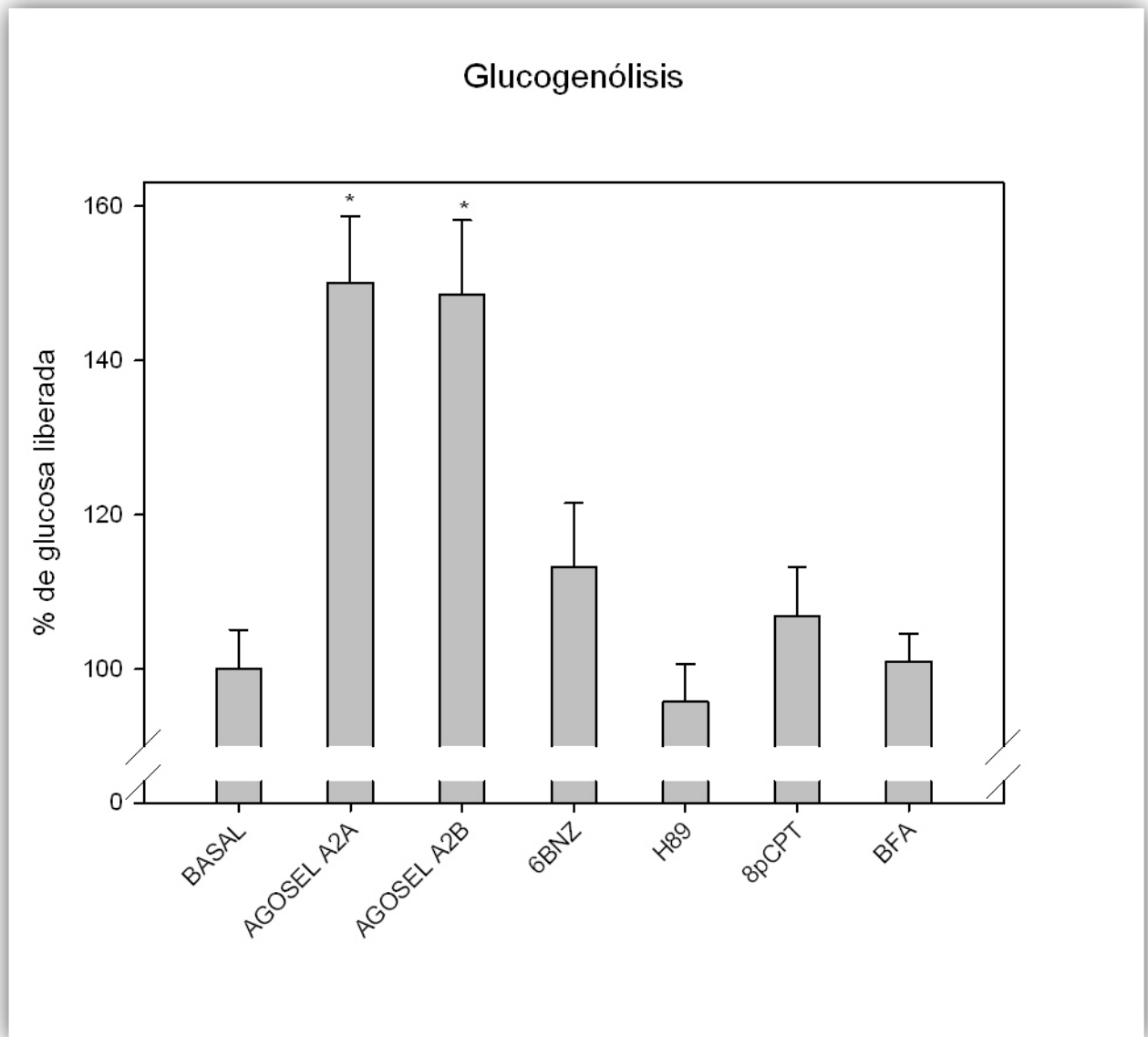
### Glucogenólisis.

En este experimento los resultados son el promedio de 3 ensayos realizados por duplicado, la glucosa basal liberada fue de  $68.40 \pm 3.48$   $\mu$ moles de glucosa por mg de hepatocitos en 45 minutos de incubación y este valor se tomó como el 100% de glucosa liberada, y los diferentes tratamientos se compararon contra este porcentaje. En la Figura 1 se muestran las respuestas obtenidas a la estimulación de los receptores  $A_{2A}$  y  $A_{2B}$ , y el efecto producido por los análogos de AMPc, y los inhibidores de la PKA y la Epac en la glucogenólisis. Los hepatocitos (obtenidos de ratas comidas) que fueron incubados con el H89 ( $95.77\% \pm 4.95$ ) y el BFA ( $101.03\% \pm 3.55$ ) no mostraron aumento en la liberación de glucosa que fuera estadísticamente significativo comparados contra el basal, en cambio cuando los hepatocitos estuvieron incubados con agonistas de receptores  $A_{2A}$  ( $150.09\% \pm 8.63$ ) y  $A_{2B}$  ( $148.49\% \pm 9.66$ ) la liberación de glucosa aumentó y fue estadísticamente significativo comparando contra el basal. Los análogos de AMPc, el 6BNZ ( $113.22\% \pm 8.31$ ) y el 8pCPT ( $106.82\% \pm 6.38$ ), aumentaron la liberación de glucosa pero no hubo diferencia estadísticamente significativa con respecto al basal.

En la Figura 2 se muestran las respuestas obtenidas a la estimulación de los receptores  $A_{2A}$  junto con el efecto producido por los análogos de AMPc, y los inhibidores de la PKA y la Epac en la glucogenólisis. Cuando la mezcla de incubación estuvo constituida por el agonista de receptores  $A_{2A}$  y el H89 ( $96.56\% \pm 3.34$ ) no se percibió el estímulo ocasionado por el agonista  $A_{2A}$  y no hubo cambios en la liberación de glucosa que fueran estadísticamente significativos comparando contra

el basal, mientras que en las mezclas del agonista de receptores  $A_{2A}$  con el 6BNZ ( $140.39\% \pm 5.45$ ), el 8pCPT ( $139.01\% \pm 7.02$ ) y el BFA ( $139.88\% \pm 7.35$ ) sí mostraron un aumento en la liberación de glucosa y fue estadísticamente significativo comparado contra el basal.

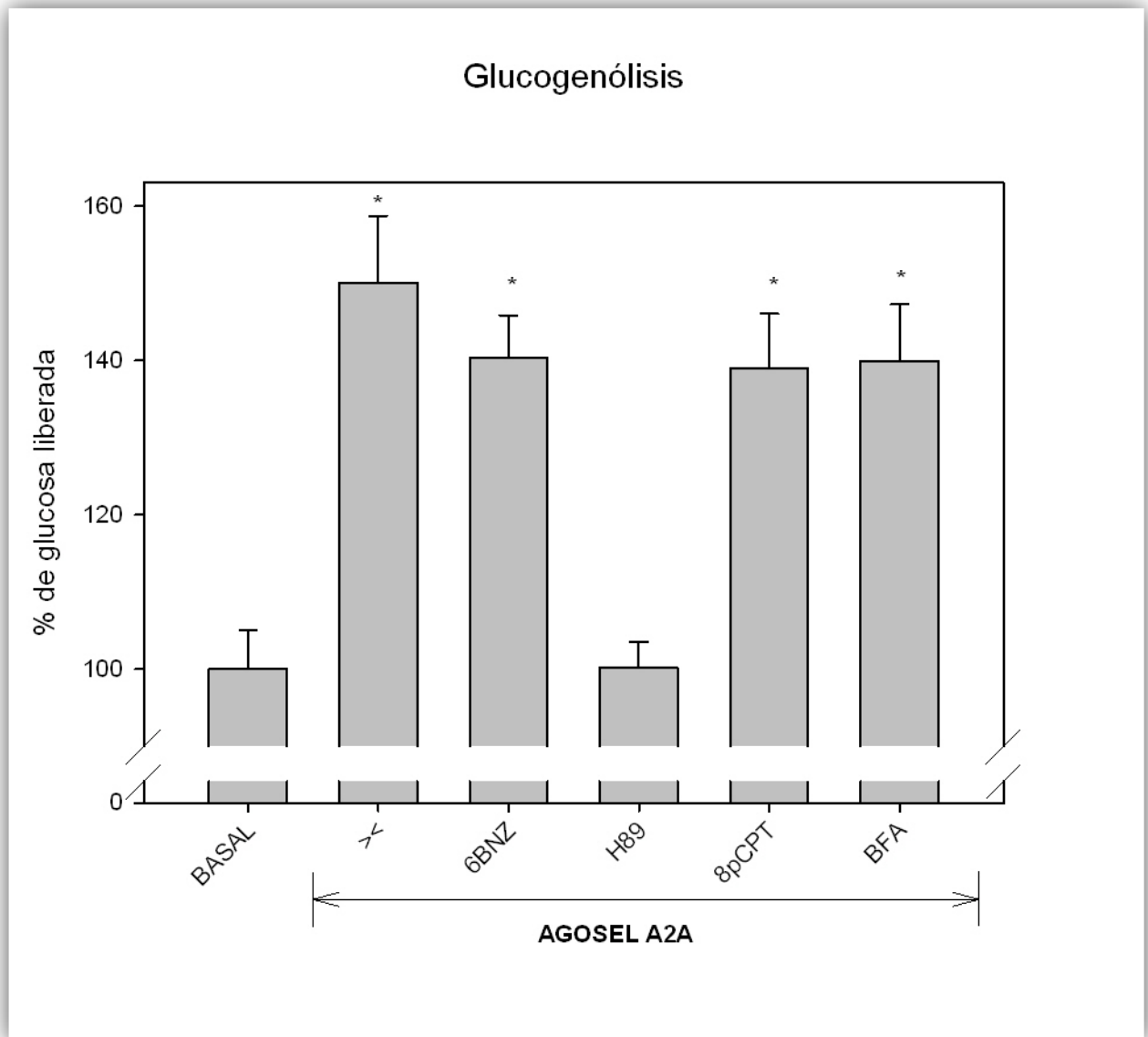
La información de la Figura 3 es muy similar a la información de la Figura 2 en cuanto a tratamiento se refiere, pero la incubación fue en presencia del análogo específico del receptor de adenosina  $A_{2B}$  con los análogos de AMPc específicos para la PKA y la Epac y los inhibidores de la PKA y la Epac. Esta vez donde no hubo efecto por la estimulación del receptor  $A_{2B}$  con su agonista selectivo fue cuando la mezcla de incubación estuvo constituida por el agonista de receptor  $A_{2B}$  y el BFA ( $100.39\% \pm 5.27$ ) por lo que no hubo diferencia estadísticamente significativa comparando contra el basal, en cambio en las mezclas del agonista de receptores  $A_{2B}$  con el 6BNZ ( $142.89\% \pm 9.22$ ), el H89 ( $140.96\% \pm 7.94$ ) y el 8pCPT ( $141.76\% \pm 5.74$ ) sí existió incremento en la liberación de glucosa y fue estadísticamente significativo comparado contra el basal.



**Figura 1. Respuestas obtenidas a la estimulación de los receptores  $A_{2A}$  y  $A_{2B}$ , y el efecto producido por los análogos de AMPc, y los inhibidores de PKA y Epac en la glucogenólisis.**

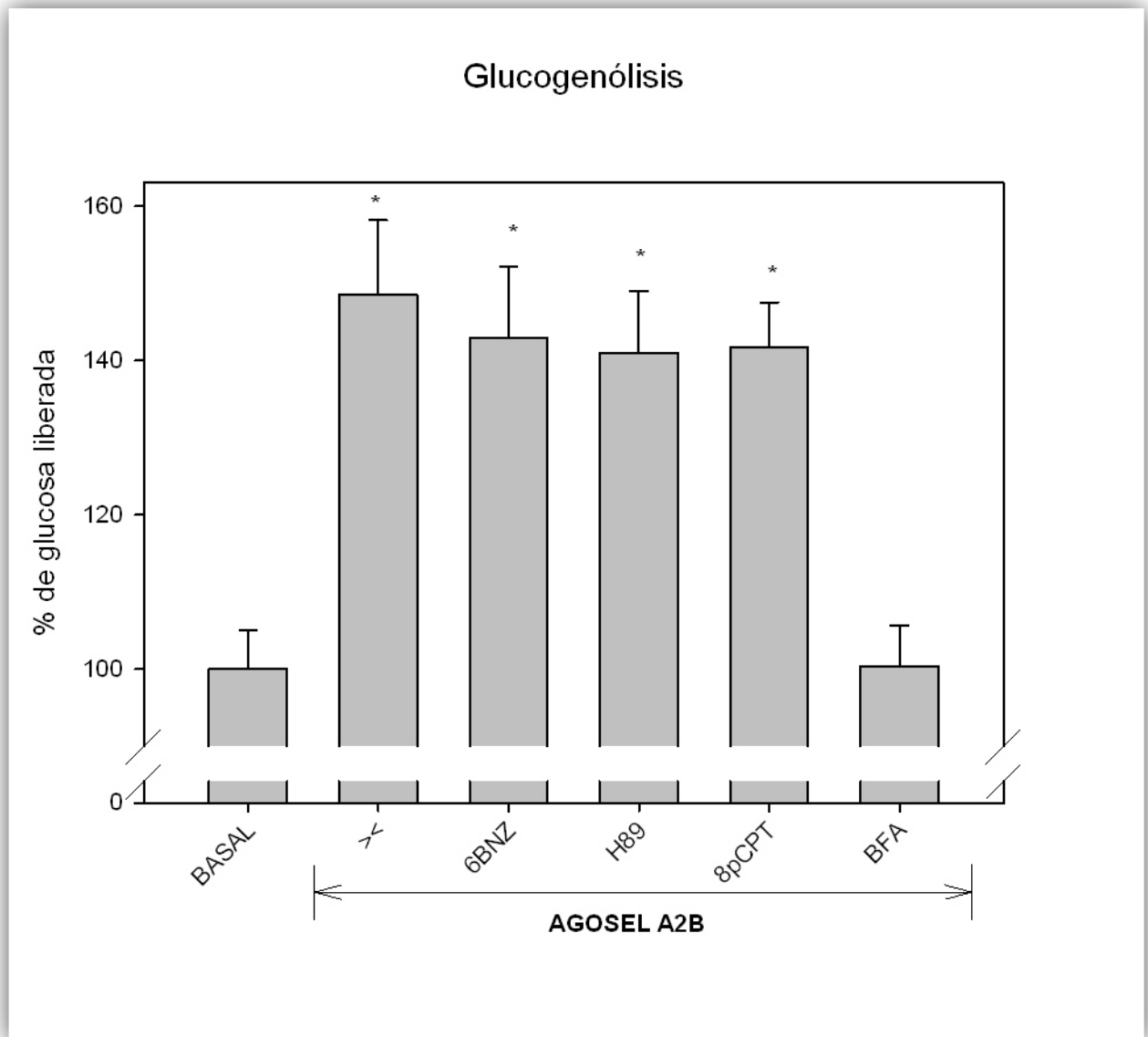
Los valores son el promedio  $\pm$  el error estándar de tres diferentes experimentos realizados por duplicado. Las barras con asterisco (\*) presentan diferencia estadísticamente significativa contra el basal. AGOSEL A2A (CGS-21680, análogo de adenosina específico para estimular los receptores  $A_{2A}$ ); AGOSEL A2B (NECA, análogo de adenosina específico para estimular los receptores  $A_{2B}$ ); 6BNZ (análogo de AMPc específico para estimular a la PKA); H89 (inhibidor específico para la PKA); 8pCPT (análogo de AMPc específico para estimular a la Epac); BFA (inhibidor específico para la Epac).





**Figura 2. Respuestas obtenidas por la estimulación de los receptores de adenosina A<sub>2A</sub> y su bloqueo con el H-89 en la glucogenólisis.**

Los valores son el promedio  $\pm$  el error estándar de tres diferentes experimentos realizados por duplicado. Las barras con asterisco (\*) presentan diferencia estadísticamente significativa contra el basal. AGOSEL A<sub>2A</sub> (CGS-21680, análogo de adenosina específico para estimular los receptores A<sub>2A</sub>); 6BNZ (análogo de AMPc específico para estimular a la PKA); H89 (inhibidor específico para la PKA); 8pCPT (análogo de AMPc específico para estimular a la Epac); BFA (inhibidor específico para la Epac).



**Figura 3. Respuestas obtenidas por la estimulación de los receptores de adenosina A<sub>2B</sub> y su bloqueo con el BFA en la glucogenólisis.**

Los valores son el promedio  $\pm$  el error estándar de tres diferentes experimentos realizados por duplicado. Las barras con asterisco (\*) presentan diferencia estadísticamente significativa contra el basal. AGOSEL A2B (NECA, análogo de adenosina específico para estimular los receptores A<sub>2B</sub>); 6BNZ (análogo de AMPc específico para estimular a la PKA); H89 (inhibidor específico para la PKA); 8pCPT (análogo de AMPc específico para estimular a la Epac); BFA (inhibidor específico para la Epac).

### Gluconeogénesis.

En este experimento los resultados son el promedio de 3 ensayos realizados por duplicado, la glucosa producida del basal fue de  $21.8 \pm 1.26$   $\mu$ moles de glucosa por

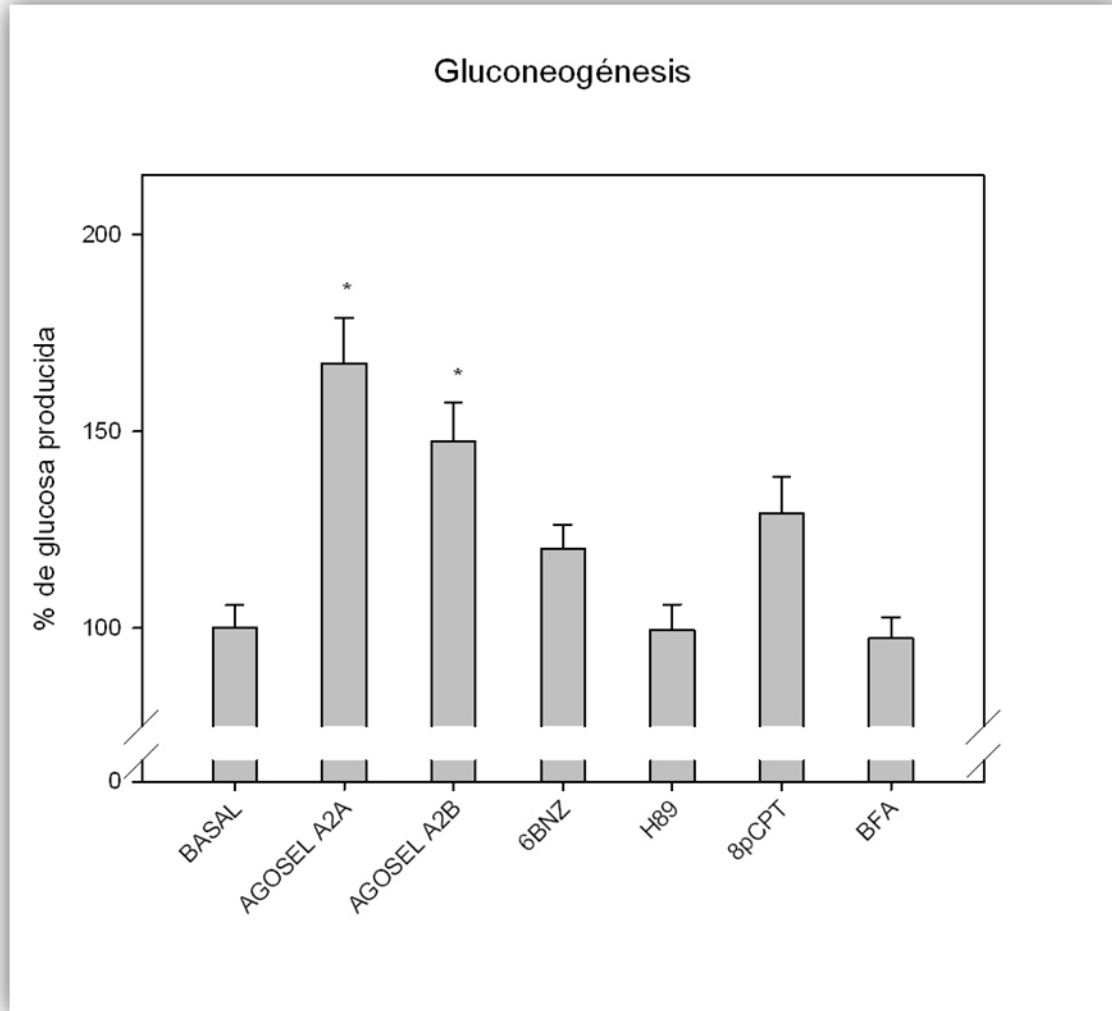
mg de hepatocitos en 60 minutos de incubación y este valor se tomó como el 100% de glucosa producida, y los diferentes tratamientos se compararon contra este porcentaje.

En la Figura 4 se tienen los datos de los experimentos cuando los hepatocitos se incubaron con los agonistas para receptores  $A_{2A}$  y  $A_{2B}$ , análogos de AMPc específicos para la PKA y la Epac e inhibidores de la PKA y la Epac. Los hepatocitos que fueron incubados con el H89 ( $99.52\% \pm 6.51$ ) o el BFA ( $97.41\% \pm 5.39$ ) no mostraron cambios en la producción de glucosa que fueran estadísticamente significativos comparados contra el basal, en cambio cuando los hepatocitos estuvieron incubados con agonistas de receptores  $A_{2A}$  ( $167.30\% \pm 11.52$ ) y  $A_{2B}$  ( $147.38\% \pm 9.98$ ) la producción de glucosa aumentó y fue estadísticamente significativa comparada contra la del basal. Los análogos de AMPc, el 6BNZ ( $120.26\% \pm 5.98$ ) y el 8pCPT ( $129.20\% \pm 9.22$ ), aunque aumentaron la producción de glucosa no mostró diferencia estadísticamente significativa comparados contra el basal.

En la Figura 5 se muestran los datos de las producciones de glucosa de los hepatocitos incubados con el agonista de receptores  $A_{2A}$  de la Figura 4 y también cuando la mezcla de incubación estuvo constituida por el agonista de receptores  $A_{2A}$  con los análogos de AMPc específicos para la PKA y la Epac y con los inhibidores de la PKA y la Epac. Cuando la mezcla de incubación estuvo constituida por el agonista de receptores  $A_{2A}$  y el H89 ( $90.03\% \pm 7.81$ ) no mostró cambios en la producción de glucosa que fueran estadísticamente significativos en comparación contra el basal, pero en las mezclas del agonista de receptores  $A_{2A}$  con el 6BNZ ( $182.26\% \pm 10.71$ ), el 8pCPT ( $167.48\% \pm 12.35$ ) y el BFA ( $166.40\% \pm 9.56$ ) si hubo incremento en la

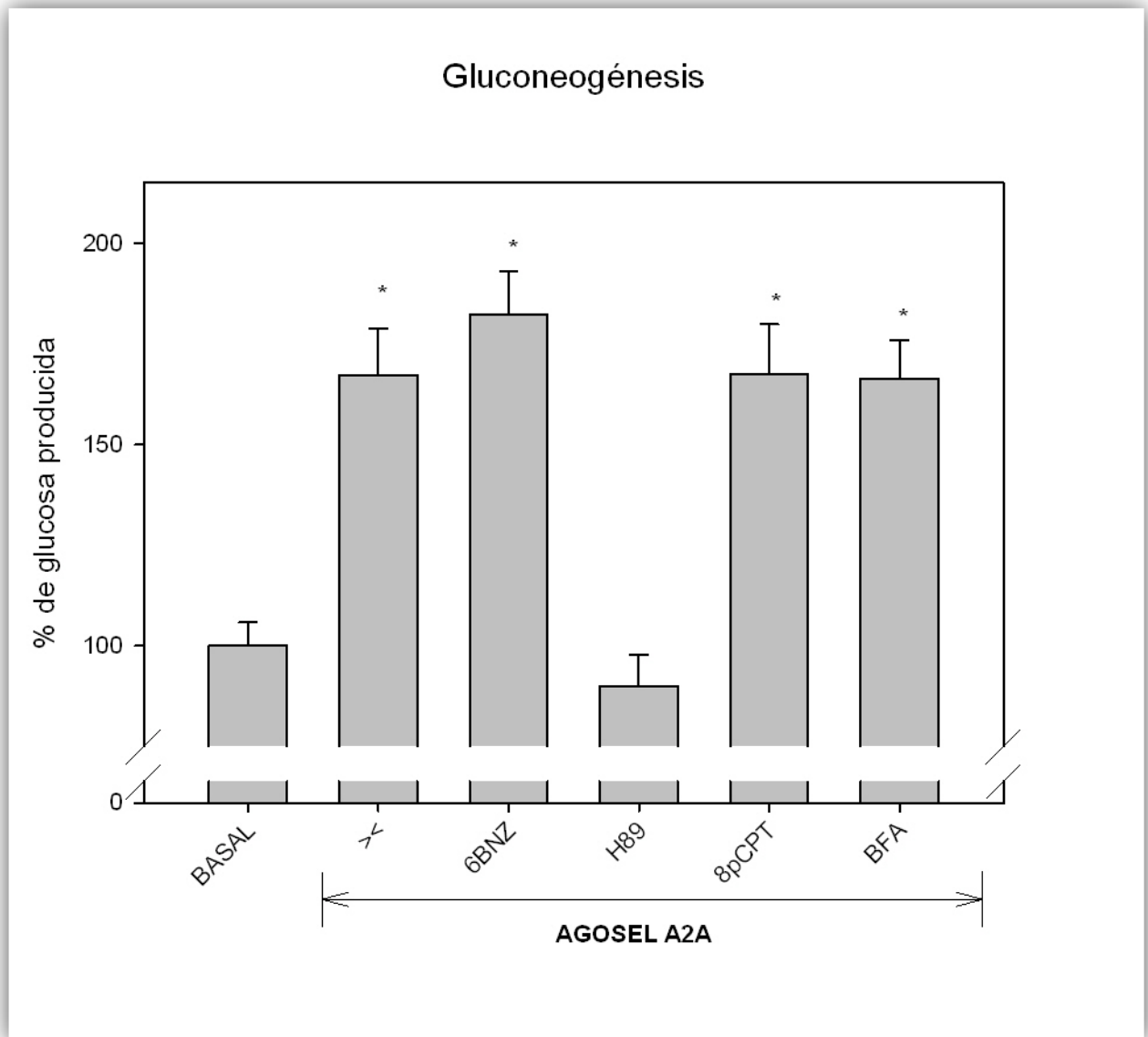
producción de glucosa y fue estadísticamente significativa comparándolos contra el basal.

La información de la Figura 6 es muy similar a la información de la Figura 5 en cuanto a tratamiento se refiere, pero la incubación fue en presencia del análogo específico de los receptores de adenosina  $A_{2B}$  con los análogos de AMPc específicos para la PKA y la Epac, y los inhibidores de la PKA y la Epac. Esta vez donde no hubo diferencia estadísticamente significativa en la producción de glucosa fue cuando la mezcla de incubación estuvo constituida por el agonista de receptores  $A_{2B}$  y el BFA ( $99.29\% \pm 2.19$ ) mientras que las mezclas del agonista de receptores  $A_{2B}$  con el 6BNZ ( $153.93\% \pm 6.51$ ), el H89 ( $165.35\% \pm 12.47$ ) y el 8pCPT ( $197.11\% \pm 15.93$ ) si mostraron incremento en la producción de glucosa y fue estadísticamente significativa comparando contra el basal.



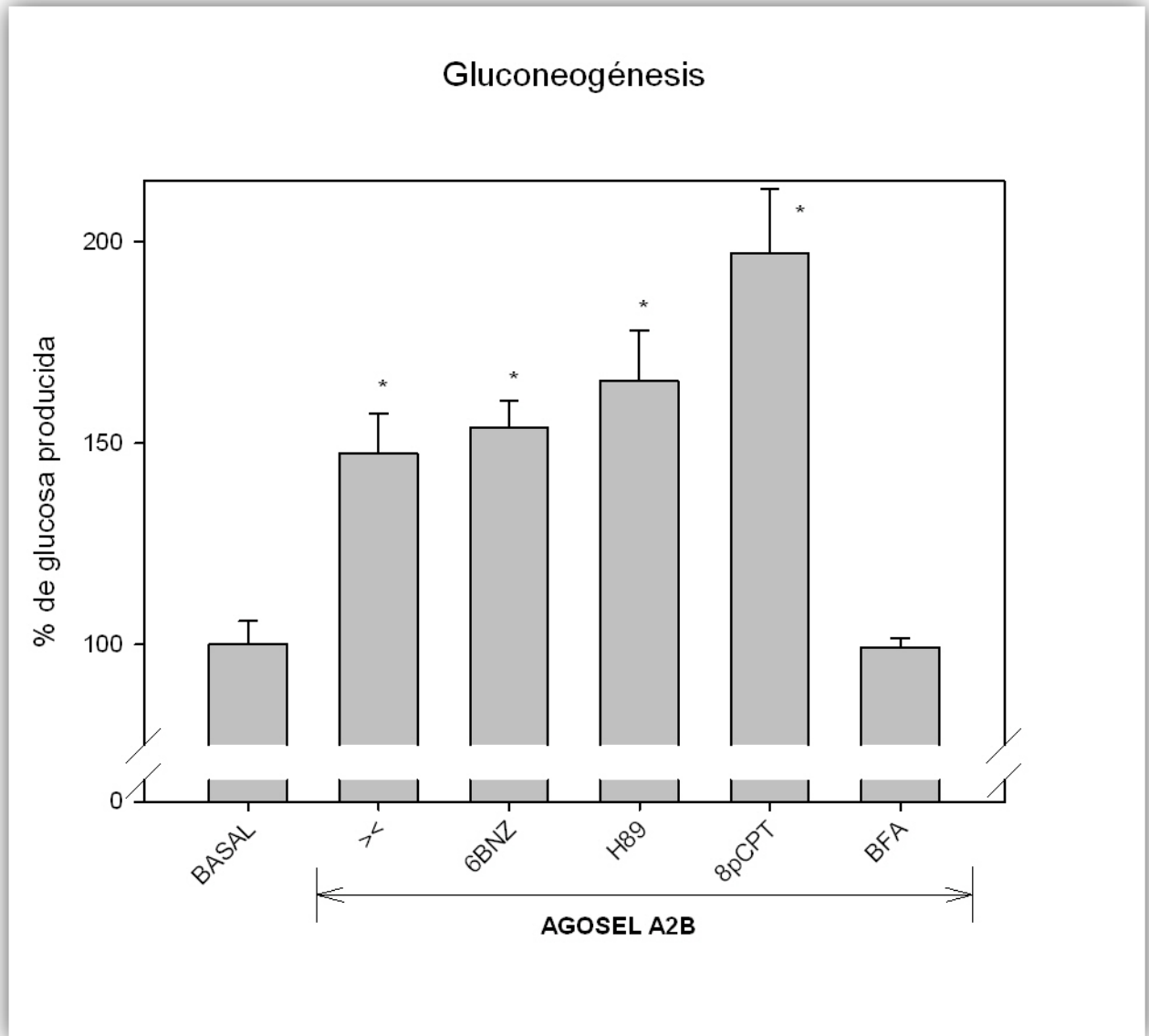
**Figura 4. Respuestas obtenidas a la estimulación de los receptores  $A_{2A}$  y  $A_{2B}$ , y el efecto producido por los análogos de AMPc, y los inhibidores de la PKA y la Epac en la gluconeogénesis.**

Los valores son el promedio  $\pm$  el error estándar de tres diferentes experimentos realizados por duplicado. Las barras con asterisco (\*) presentan diferencia estadísticamente significativa contra el basal. AGOSEL A2A (CGS-21680, análogo de adenosina específico para estimular los receptores  $A_{2A}$ ); AGOSEL A2B (NECA, análogo de adenosina específico para estimular los receptores  $A_{2B}$ ); 6BNZ (análogo de AMPc específico para estimular a la PKA); H89 (inhibidor específico para la PKA); 8pCPT (análogo de AMPc específico para estimular a la Epac); BFA (inhibidor específico para la Epac).



**Figura 5. Respuestas obtenidas por la estimulación de los receptores de adenosina A<sub>2A</sub> y su bloqueo con el H-89 en la gluconeogénesis.**

Los valores son el promedio  $\pm$  el error estándar de tres diferentes experimentos realizados por duplicado. Las barras con asterisco (\*) presentan diferencia estadísticamente significativa contra el basal. AGOSEL A2A (CGS-21680, análogo de adenosina específico para estimular los receptores A<sub>2A</sub>); 6BNZ (análogo de AMPc específico para estimular a la PKA); H89 (inhibidor específico para la PKA); 8pCPT (análogo de AMPc específico para estimular a la Epac); BFA (inhibidor específico para la Epac).



**Figura 6. Respuestas obtenidas por la estimulación de los receptores de adenosina  $A_{2B}$  y su bloqueo con el BFA en la gluconeogénesis.**

Los valores son el promedio  $\pm$  el error estándar de tres diferentes experimentos realizados por duplicado. Las barras con asterisco (\*) presentan diferencia estadísticamente significativa contra el basal. AGOSEL A2B (NECA, análogo de adenosina específico para estimular los receptores  $A_{2B}$ ); 6BNZ (análogo de AMPc específico para estimular a la PKA); H89 (inhibidor específico para la PKA); 8pCPT (análogo de AMPc específico para estimular a la Epac); BFA (inhibidor específico para la Epac).

## Ureogénesis.

El nivel basal de la síntesis de urea fue de 15.79 nmoles de urea por mg de hepatocitos en 60 minutos de incubación, siendo el promedio de 4 experimentos

realizados por duplicado, éste valor se tomó como el 100% de urea sintetizada con el cual se compararon los diferentes tratamientos.

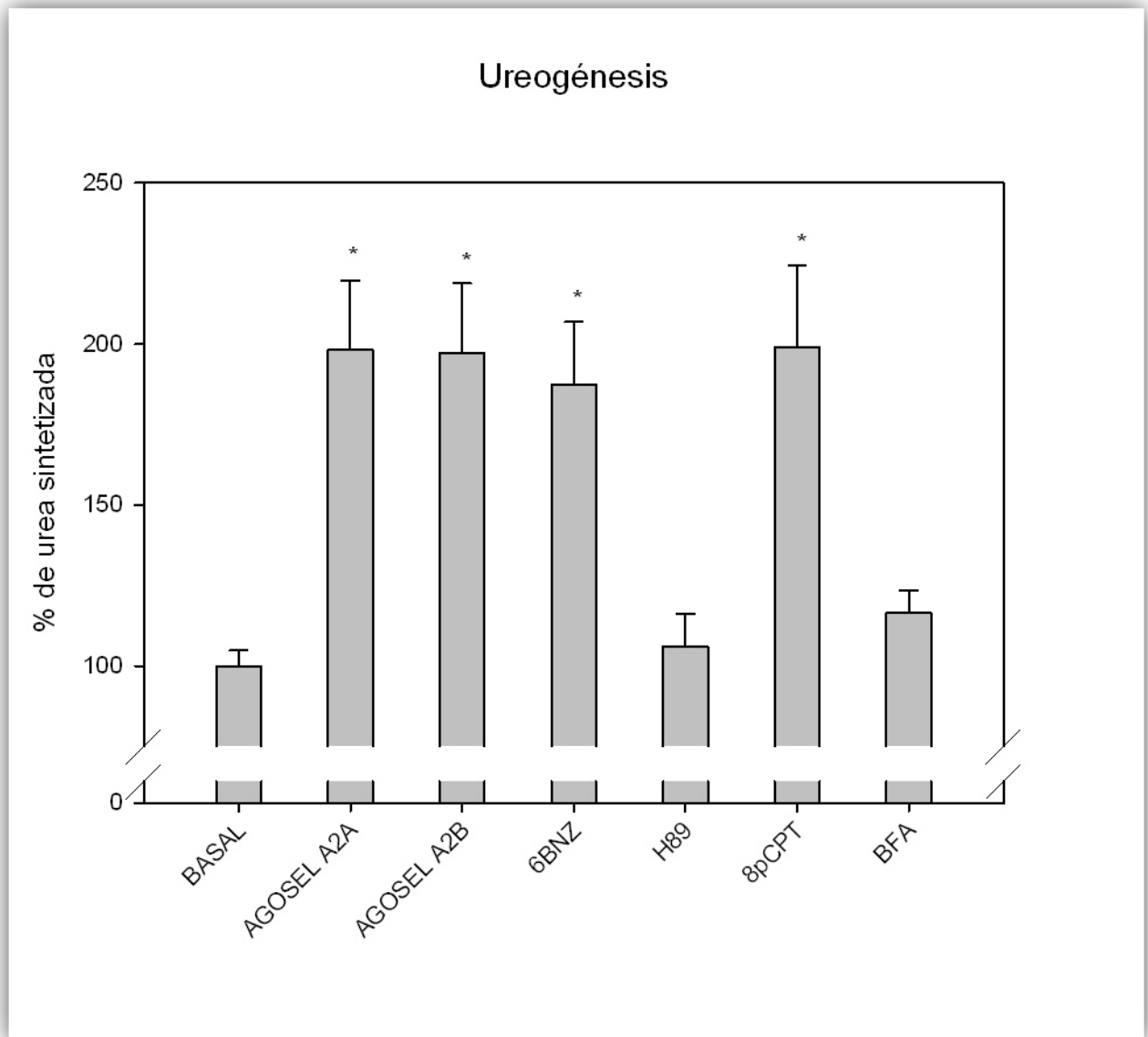
En la Figura 7 se muestra la información de la incubación de los hepatocitos en presencia de los agonistas para receptores  $A_{2A}$  y  $A_{2B}$ , análogos de AMPc específicos para la PKA y la Epac e inhibidores de la PKA y la Epac. Los hepatocitos que fueron incubados con el H89 ( $106.13\% \pm 9.97$ ) y el BFA ( $116.40\% \pm 7.06$ ) no mostraron cambios en la síntesis de urea que fueran estadísticamente significativos comparados contra el basal, en cambio cuando los hepatocitos incubados con agonistas de receptores  $A_{2A}$  ( $198.12\% \pm 21.69$ ) y  $A_{2B}$  ( $197.32\% \pm 21.47$ ), y los análogos de AMPc, el 6BNZ ( $187.37\% \pm 19.52$ ) y el 8pCPT ( $198.77\% \pm 25.72$ ), la síntesis de urea aumentó y fue estadísticamente significativa comparando contra el basal.

La información de la Figura 8 muestra la respuesta cuando las mezclas de incubación estuvieron constituidas por el agonista de receptores  $A_{2A}$  con los análogos de AMPc específicos para la PKA y la Epac y con los inhibidores de la PKA y la Epac. Cuando la mezcla de incubación estuvo constituida por el agonista de  $A_{2A}$  y H89 ( $104.17\% \pm 4.71$ ) no se percibe el estímulo ocasionado por el agonista  $A_{2A}$  y no hay cambio en la síntesis de urea que fuera estadísticamente significativo comparado contra el basal, mientras que en las mezclas del análogo de receptores  $A_{2A}$  con el 6BNZ ( $186.58\% \pm 8.38$ ), el 8pCPT ( $199.77\% \pm 26.59$ ) y el BFA ( $182.30\% \pm 12.49$ ) es bastante aparente el incremento en la síntesis de urea y es estadísticamente significativo con respecto al basal.

En la Figura 9 se muestra información que es muy similar a la Figura 8, en cuanto a tratamiento se refiere, pero en vez de que la mezcla de incubación fuera con el

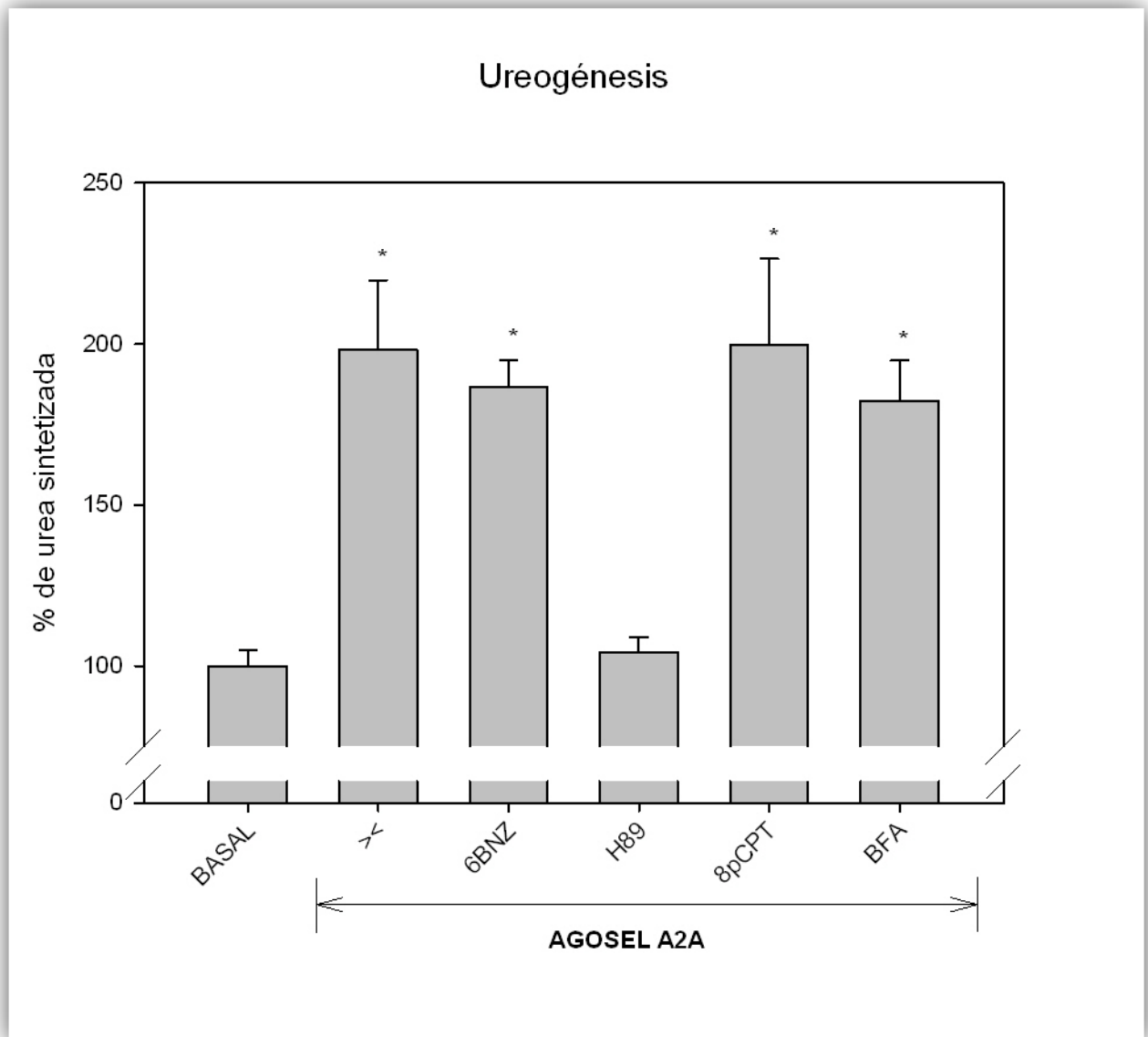


agonista de receptores  $A_{2A}$  se utilizó el agonista de receptores  $A_{2B}$  con los análogos de AMPc específicos para la PKA y la Epac y los inhibidores de la PKA y la Epac. Esta vez donde no hubo efecto por la estimulación del receptor  $A_{2B}$  con su agonista selectivo fue cuando la mezcla de incubación estuvo constituida por el agonista de receptores  $A_{2B}$  y el BFA ( $116.52\% \pm 10.03$ ), por lo que no hubo diferencia estadísticamente significativa en la síntesis de urea comparando contra el basal, mientras que en las mezclas del agonista de receptores  $A_{2B}$  con el 6BNZ ( $194.83\% \pm 11.98$ ), el H89 ( $191.26\% \pm 12.25$ ) y el 8pCPT ( $192.70\% \pm 21.35$ ) si hubo incremento en la síntesis de urea con diferencia estadísticamente significativa contra el basal.



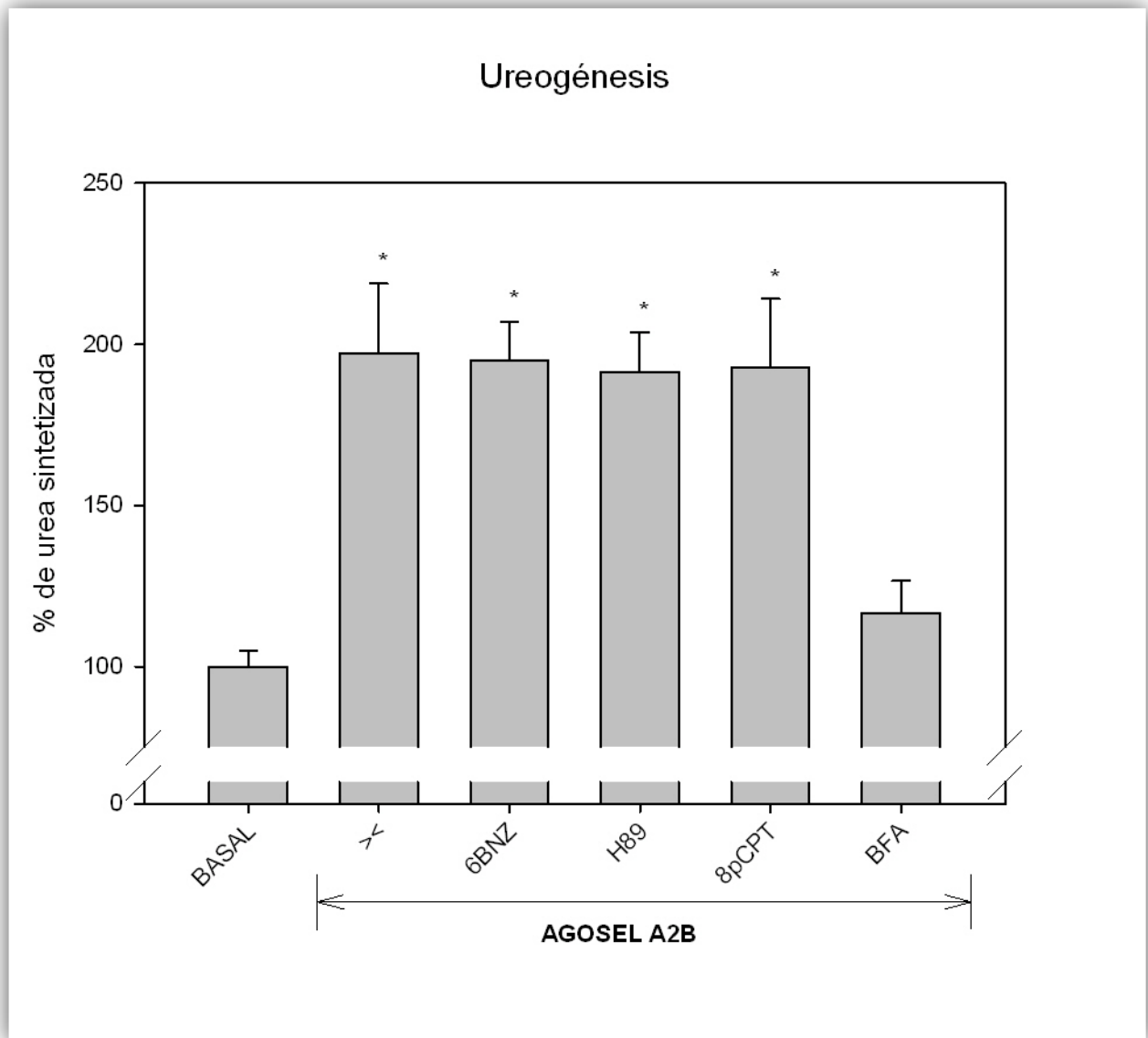
**Figura 7. Respuestas obtenidas a la estimulación de los receptores  $A_{2A}$  y  $A_{2B}$ , y el efecto producido por los análogos de AMPc, y los inhibidores de la PKA y la Epac en la ureogénesis.**

Los valores son el promedio  $\pm$  el error estándar de tres diferentes experimentos realizados por duplicado. Las barras con asterisco (\*) presentan diferencia estadísticamente significativa contra el basal. AGOSEL A2A (CGS-21680, análogo de adenosina específico para estimular los receptores  $A_{2A}$ ); AGOSEL A2B (NECA, análogo de adenosina específico para estimular los receptores  $A_{2B}$ ); 6BNZ (análogo de AMPc específico para estimular a la PKA); H89 (inhibidor específico para la PKA); 8pCPT (análogo de AMPc específico para estimular a la Epac); BFA (inhibidor específico para la Epac).



**Figura 8. Respuestas obtenidas por la estimulación de los receptores de adenosina  $A_{2A}$  y su bloqueo con el H-89 en la ureogénesis.**

Los valores son el promedio  $\pm$  el error estándar de tres diferentes experimentos realizados por duplicado. Las barras con asterisco (\*) presentan diferencia estadísticamente significativa contra el basal. AGOSEL A2A (CGS-21680, análogo de adenosina específico para estimular los receptores  $A_{2A}$ ); 6BNZ (análogo de AMPc específico para estimular a la PKA); H89 (inhibidor específico para la PKA); 8pCPT (análogo de AMPc específico para estimular a la Epac); BFA (inhibidor específico para la Epac).

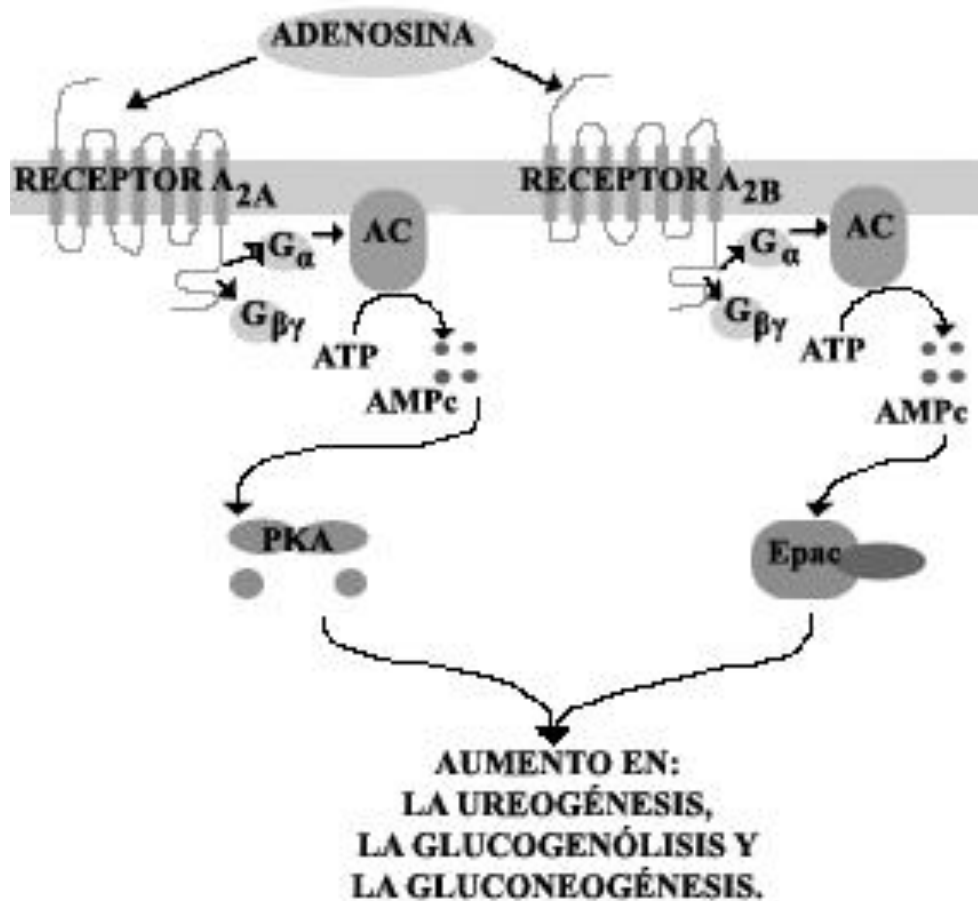


**Figura 9. Respuestas obtenidas por la estimulación de los receptores de adenosina  $A_{2B}$  y su bloqueo con el BFA en la ureogénesis.**

Los valores son el promedio  $\pm$  el error estándar de tres diferentes experimentos realizados por duplicado. Las barras con asterisco (\*) presentan diferencia estadísticamente significativa contra el basal. AGOSEL A2B (NECA, análogo de adenosina específico para estimular los receptores  $A_{2B}$ ); 6BNZ (análogo de AMPc específico para estimular a la PKA); H89 (inhibidor específico para la PKA); 8pCPT (análogo de AMPc específico para estimular a la Epac); BFA (inhibidor específico para la Epac).

### Mecanismo propuesto:

De acuerdo con el análisis de los resultados se propone el mecanismo esquematizado en la Figura 10.



**Figura 10. Mecanismo de señalización propuesto para los receptores A<sub>2A</sub> y A<sub>2B</sub> de la adenosina en la ureogénesis, la glucogenólisis y la gluconeogénesis en hepatocitos aislados de rata.**

La estimulación del receptor A<sub>2A</sub> de la adenosina activa a la adenilil ciclasa (AC) por medio de la subunidad α de la proteína G (G<sub>α</sub>), la cual cataliza la síntesis de AMPc a partir de ATP. El AMPc generado se une a la subunidad reguladora de la proteína cinasa A (PKA) para liberar la subunidad catalítica de la PKA y así aumentar la ureogénesis, la glucogenólisis y la gluconeogénesis. Si la estimulación se hace sobre el receptor A<sub>2B</sub> de la adenosina el AMPc generado se une a la proteína de intercambio directamente activada por AMPc (Epac) y también aumenta la ureogénesis, la glucogenólisis y la gluconeogénesis.

## Discusión.

---

Los resultados presentes en ésta tesis ofrecen la oportunidad de mostrar, gracias a la selección del modelo experimental adecuado, la existencia de dos rutas diferentes para la señalización de los receptores de la adenosina en el tejido hepático.

Dada la similitud de las respuestas de los receptores de la adenosina a la presencia de las distintas moléculas empleadas en éste trabajo, resulta conveniente hacer un resumen de los resultados que se intentan interpretar y así facilitar la discusión. Los receptores  $A_{2A}$  y  $A_{2B}$  fueron estimulados por sus respectivos agonistas selectivos para acelerar la glucogenólisis, la gluconeogénesis y la ureogénesis. Los inhibidores de la PKA y de la Epac, el H89 y el BFA, añadidos individualmente a las distintas muestras de hepatocitos, no modificaron ninguna de las tres grandes vías metabólicas estudiadas. Los análogos del AMPc aquí empleados, el 6BNZ para la PKA y el 8pCPT para la Epac, usados solos en los medios de incubación con las células hepáticas, únicamente produjeron una estimulación estadísticamente significativa para el caso de la ureogénesis. Se requiere de más información y de nuevos experimentos para tratar de dar una explicación razonable a tales experimentos.

Tal vez los datos más significativos de la presente tesis son los obtenidos al mezclar un agonista selectivo con un inhibidor específico. Cuando el agonista selectivo del receptor  $A_{2A}$  se incubaba con H89, el inhibidor específico de la PKA, no se observa la acción estimulante del agonista selectivo ni en la glucogenólisis, ni en la gluconeogénesis, ni en la ureogénesis, Sin embargo, cuando el mismo agonista selectivo para el receptor  $A_{2A}$  se incubaba simultáneamente con BFA, el inhibidor

específico para Epac, si se observa la acción estimuladora del agonista  $A_{2A}$  en las tres grandes vías metabólicas aquí seleccionadas. El conjunto de datos anteriores indica: que el agonista del receptor  $A_{2A}$  empleado solo genera suficiente AMPc para lograr la estimulación de la glucogenólisis, la gluconeogénesis y la ureogénesis; que cuando se usan simultáneamente el agonista  $A_{2A}$  y el inhibidor de la PKA, el H89, no estimula ninguna de las tres vías metabólicas; sin embargo al usar simultáneamente el agonista  $A_{2A}$  y un inhibidor de Epac, el BFA, si hay suficiente AMPc y se observa la estimulación por la liberación y síntesis de glucosa y urea.

La conclusión general es que la ruta de amplificación del AMPc generado por la estimulación del receptor  $A_{2A}$  de la adenosina, para estimular tres grandes vías metabólicas, ocurre vía PKA y no sucede vía Epac.

Una situación equivalente sucede para el caso del receptor  $A_{2B}$  de la adenosina. Su estimulación con el uso exclusivo del agonista selectivo produce un aumento en las tres vías: la glucogenólisis, la gluconeogénesis y la ureogénesis. La acción de éste agonista selectivo se impide con el inhibidor de la Epac, el BFA. La acción de éste agonista selectivo no se impide con el inhibidor de la PKA, el H89. La conclusión es que el AMPc generado por la estimulación selectiva del receptor  $A_{2B}$  de la adenosina viaja a través de la Epac y no lo hace a través de la PKA.

Un corolario importantísimo a las conclusiones anotadas es que el AMPc generado por la estimulación del agonista  $A_{2A}$  de la adenosina no difunde, no alcanza, no está accesible a la estructura de amplificación de la Epac, la estructura de amplificación activada por el agonista  $A_{2B}$  de la adenosina. Lo anterior es así de tajante porque en caso de que lograra llegar a la estructura de amplificación de la Epac, entonces el

H89 (inhibidor de la Epac) no inhibiría ninguna de las vías metabólicas que experimentalmente se observó que sí las inhibe. Lo mismo puede decirse para los receptores  $A_{2B}$ : el AMPc generado por la estimulación selectiva de los receptores  $A_{2B}$  de la adenosina, impiden su acción en presencia del inhibidor de la Epac, el BFA, pero ese AMPc no incide, no actúa, no puede estimular la estructura de amplificación de la PKA, la estructura usada por el AMPc generado exclusivamente por la activación de los receptores  $A_{2A}$  de la adenosina.

Por consiguiente, el AMPc generado por la estimulación selectiva de un receptor específico, en este caso el  $A_{2A}$  y el  $A_{2B}$  de la adenosina, se encuentra perfectamente compartimentalizado y no difunde libremente en la célula hepática. Esto es, el AMPc formado por la estimulación del receptor  $A_{2A}$  de la adenosina es canalizado y se usa exclusivamente por la PKA para activar vías metabólicas. Ese AMPc no es compartido por otras vías de amplificación, como pudiera ser la Epac, para estimular las mismas vías por una ruta diferente. La idea es tan importante que se puede ser iterativo sobre la misma: no importa que los dos receptores estén en la misma célula hepática, tampoco importa que la respuesta fisiológica final sea la misma (estimulación de la glucogenólisis, la gluconeogénesis y la ureogénesis) el AMPc no se mezcla, lo genera la estimulación de un receptor para activar una estructura específica ligada a un tipo de receptor, y no lo comparte con otra estructura específica ligada a otro tipo de receptor, a pesar de que en ambos casos la respuesta final sea idéntica.

Recientemente se reportó que en el hipocampo, el AMPc sintetizado en respuesta al estímulo de un receptor  $\beta_2$  adrenérgico se destina exclusivamente, a modular la



actividad de un canal particular de calcio, clase C, tipo L ( $Ca_v1.2$ )[94]. En el trabajo aquí desarrollado, tomando como modelo experimental los receptores de la adenosina en el hepatocito aislado de rata, vale la pena hacer notar los siguientes aspectos.

Hasta donde se sabe, los receptores  $A_{2A}$  y  $A_{2B}$  se encuentran en hígado[71] y en numerosos tejidos de mamíferos. La adenosina es el único agonista fisiológico descrito para este par de receptores, tanto en hepatocitos como en otros tejidos donde existen receptores de la adenosina. Además, que para el caso particular del hígado, se desconoce el papel funcional de estos receptores en el mantenimiento de la homeostasis del organismo[95].

Ante tales hechos puede suponerse que la acción ureogénica, gluconeogénica y glucogenolítica representa acciones fundamentales del nucleósido en la homeostasis del organismo, por lo que existen 2 vías para así asegurar su ejecución.



## Conclusiones.

---

Tanto el receptor  $A_{2A}$  como el  $A_{2B}$  al ser estimulados tienen un efecto activador en la glucogenólisis, gluconeogénesis y ureogénesis.

La PKA del hepatocito es inhibida por el compuesto llamado H89, con lo que se bloquea la activación en la glucogenólisis, la gluconeogénesis y la ureogénesis promovida por la estimulación de los receptores  $A_{2A}$  de la adenosina

La Epac del hepatocito es inhibida por el compuesto BFA, con lo que se impide la activación en la glucogenólisis, la gluconeogénesis y la ureogénesis debidos a la estimulación de los receptores  $A_{2B}$  de la adenosina.

Al estimular el receptor  $A_{2A}$  e inhibir a la PKA no existe efecto por el estímulo de dicho receptor, pero en cambio si se estimula al receptor  $A_{2B}$  y se inhibe a la misma PKA si existe efecto por el estímulo de dicho receptor. Algo similar sucede si se estimula al receptor  $A_{2A}$  y al mismo tiempo inhibimos a Epac, el efecto del estímulo es notable, pero si estimulamos el receptor  $A_{2B}$  e inhibimos a la misma Epac, no hay efecto notable por el estímulo de dicho receptor en la glucogenólisis, gluconeogénesis y ureogénesis.

Los análogos del AMPc, 6BNZ y 8pCPT a concentraciones micro molares estimulan la ureogénesis, pero a la misma concentración no tienen el mismo efecto que sea estadísticamente significativo en la glucogenólisis ni la gluconeogénesis.

Los resultados obtenidos nos permiten sugerir que:

- Los receptores de adenosina  $A_{2A}$  y  $A_{2B}$  tienen diferentes mecanismos de señalización en la glucogenólisis, la gluconeogénesis y la ureogénesis.

- En hepatocitos aislados de rata, la estimulación del receptor  $A_{2A}$  con el agonista selectivo CGS-21680, genera AMPc que es exclusivo para activar la PKA y como consecuencia un aumento en la velocidad de síntesis de urea y glucosa (glucogenólisis y gluconeogénesis).
- En hepatocitos aislados de rata, la estimulación del receptor  $A_{2B}$  con el agonista selectivo NECA, genera AMPc que es exclusivo para activar la Epac y como consecuencia un aumento en la velocidad de síntesis de urea y glucosa (glucogenólisis y gluconeogénesis).

## Bibliografía.

---

1. Meijer, A.J., J.A. Gimpel, G. Deleeuw, M.E. Tischler, J.M. Tager, and J.R. Williamson, *Interrelationships between gluconeogenesis and ureogenesis in isolated hepatocytes*. J Biol Chem, 1978. **253**(7): p. 2308-2320.
2. Voet, D. and J.G. Voet, *Biochemistry*. 2nd ed. 1995, New York: J. Wiley & Sons. xvii, 1361 p.
3. Stryer, L., *Biochemistry*. 4th ed. 1995, New York: W.H. Freeman. xxxiv, 1064 p.
4. Metzler, D.E. and C.M. Metzler, *Biochemistry : the chemical reactions of living cells*. 2nd ed. 2001, San Diego, Calif.: Harcourt/Academic Press.
5. Hers, H.G. and L. Hue, *Gluconeogenesis and related aspects of glycolysis*. Annu Rev Biochem, 1983. **52**: p. 617-653.
6. Schimassek, H. and H.J. Mitzkat, [*on a Specific Effect of Glucagon on the Embden-Meyerhof Chain in the Liver. Experiments on the Isolated Perfused Rat Liver.*]. Biochem Z, 1963. **337**: p. 510-518.
7. Exton, J.H., L.E. Mallette, L.S. Jefferson, E.H. Wong, N. Friedmann, T.B. Miller, Jr., and C.R. Park, *The hormonal control of hepatic gluconeogenesis*. Recent Prog Horm Res, 1970. **26**: p. 411-461.
8. Ross, B.D., R. Hems, and H.A. Krebs, *The rate of gluconeogenesis from various precursors in the perfused rat liver*. Biochem J, 1967. **102**(3): p. 942-951.
9. Williamson, J.R., E.T. Browning, R.G. Thurman, and R. Scholz, *Inhibition of glucagon effects in perfused rat liver by (+)decanoylcarnitine*. J Biol Chem, 1969. **244**(18): p. 5055-5064.
10. Ui, M., J.H. Exton, and C.R. Park, *Effects of glucagon on glutamate metabolism in the perfused rat liver*. J Biol Chem, 1973. **248**(15): p. 5350-5359.
11. Joseph, S.K. and J.D. McGivan, *The effect of ammonium chloride and glucagon on the metabolism of glutamine in isolated liver cells from starved rats*. Biochim Biophys Acta, 1978. **543**(1): p. 16-28.
12. Blair, J.B., D.E. Cook, and H.A. Lardy, *Interaction of propionate and lactate in the perfused rat liver. Effects of glucagon and oleate*. J Biol Chem, 1973. **248**(10): p. 3608-3614.
13. Veneziale, C.M., *Gluconeogenesis from fructose in isolated rat liver. Stimulation by glucagon*. Biochemistry, 1971. **10**(18): p. 3443-3447.
14. Veneziale, C.M., *Gluconeogenesis from D-glyceraldehyde and dihydroxyacetone in isolated rat liver. Stimulation by glucagon*. Biochemistry, 1972. **11**(17): p. 3286-3289.
15. Studer, R.K., K.W. Snowdowne, and A.B. Borle, *Regulation of hepatic glycogenolysis by glucagon in male and female rats. Role of cAMP and Ca<sup>2+</sup> and interactions between epinephrine and glucagon*. J Biol Chem, 1984. **259**(6): p. 3596-3604.
16. Farghali, H., J. Hodis, N. Kutinova-Canova, P. Potmesil, E. Kmonickova, and Z. Zidek, *Glucose release as a response to glucagon in rat hepatocyte culture: involvement of NO signaling*. Physiol Res, 2008. **57**(4): p. 569-575.
17. Krebs, H.A., *The discovery of the ornithine cycle of urea synthesis*. Trends Biochem.Sci., 1982. **7**: p. 76-78.
18. Watford, M., *Channeling in the urea cycle: a metabolon spanning two compartments*. Trends Biochem Sci, 1989. **14**(8): p. 313-314.
19. Elliott, K.R. and K.F. Tipton, *Kinetic studies of bovine liver carbamoyl phosphate*

- synthetase*. Biochem J, 1974. **141**(3): p. 807-816.
20. Meijer, A.J., G.M. van Woerkom, R. Steinman, and J.R. Williamson, *Inhibition of Ca<sup>2+</sup> of carbamoylphosphate synthetase (ammonia)*. J Biol Chem, 1981. **256**(7): p. 3443-3446.
  21. McCudden, C.R. and S.G. Powers-Lee, *Required allosteric effector site for N-acetylglutamate on carbamoyl-phosphate synthetase I*. J Biol Chem, 1996. **271**(30): p. 18285-18294.
  22. Snodgrass, P.J., R.C. Lin, W.A. Muller, and T.T. Aoki, *Induction of urea cycle enzymes of rat liver by glucagon*. J Biol Chem, 1978. **253**(8): p. 2748-2753.
  23. Robison, G.A., R.W. Butcher, and E.W. Sutherland, *Cyclic AMP*. Annu Rev Biochem, 1968. **37**: p. 149-174.
  24. Sunahara, R.K., C.W. Dessauer, and A.G. Gilman, *Complexity and diversity of mammalian adenylyl cyclases*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1996. **36**: p. 461-480.
  25. Patel, T.B., Z. Du, S. Pierre, L. Cartin, and K. Scholich, *Molecular biological approaches to unravel adenylyl cyclase signaling and function*. Gene, 2001. **269**(1-2): p. 13-25.
  26. Smit, M.J. and R. Iyengar, *Mammalian adenylyl cyclases*. Adv Second Messenger Phosphoprotein Res, 1998. **32**: p. 1-21.
  27. Hanoune, J., Y. Pouille, E. Tzavara, T. Shen, L. Lipskaya, N. Miyamoto, Y. Suzuki, and N. Defer, *Adenylyl cyclases: structure, regulation and function in an enzyme superfamily*. Mol Cell Endocrinol, 1997. **128**(1-2): p. 179-194.
  28. Buck, J., M.L. Sinclair, L. Schapal, M.J. Cann, and L.R. Levin, *Cytosolic adenylyl cyclase defines a unique signaling molecule in mammals*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(1): p. 79-84.
  29. Hanoune, J. and N. Defer, *Regulation and role of adenylyl cyclase isoforms*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2001. **41**: p. 145-174.
  30. Markovic, D. and R.A. Challiss, *Alternative splicing of G protein-coupled receptors: physiology and pathophysiology*. Cell Mol Life Sci, 2009.
  31. Gudermann, T., F. Kalkbrenner, and G. Schultz, *Diversity and selectivity of receptor-G protein interaction*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1996. **36**: p. 429-459.
  32. Simon, M.I., M.P. Strathmann, and N. Gautam, *Diversity of G proteins in signal transduction*. Science, 1991. **252**(5007): p. 802-808.
  33. Mizuno, N. and H. Itoh, *Functions and regulatory mechanisms of Gq-signaling pathways*. Neurosignals, 2009. **17**(1): p. 42-54.
  34. Strathmann, M.P. and M.I. Simon, *G alpha 12 and G alpha 13 subunits define a fourth class of G protein alpha subunits*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(13): p. 5582-5586.
  35. Ray, K., C. Kunsch, L.M. Bonner, and J.D. Robishaw, *Isolation of cDNA clones encoding eight different human G protein gamma subunits, including three novel forms designated the gamma 4, gamma 10, and gamma 11 subunits*. J Biol Chem, 1995. **270**(37): p. 21765-21771.
  36. Clapham, D.E. and E.J. Neer, *New roles for G-protein beta gamma-dimers in transmembrane signalling*. Nature, 1993. **365**(6445): p. 403-406.
  37. Iniguez-Lluhi, J., C. Kleuss, and A.G. Gilman, *The importance of G-protein beta lambda subunits*. Trends Cell Biol, 1993. **3**(7): p. 230-236.
  38. Sutherland, E.W., *Studies on the mechanism of hormone action*. Science, 1972. **177**(47): p. 401-408.

39. Walsh, D.A., J.P. Perkins, and E.G. Krebs, *An adenosine 3',5'-monophosphate-dependant protein kinase from rabbit skeletal muscle*. J Biol Chem, 1968. **243**(13): p. 3763-3765.
40. Doskeland, S.O., E. Maronde, and B.T. Gjertsen, *The genetic subtypes of cAMP-dependent protein kinase--functionally different or redundant?* Biochim Biophys Acta, 1993. **1178**(3): p. 249-258.
41. Francis, S.H. and J.D. Corbin, *Cyclic nucleotide-dependent protein kinases: intracellular receptors for cAMP and cGMP action*. Crit Rev Clin Lab Sci, 1999. **36**(4): p. 275-328.
42. Canaves, J.M. and S.S. Taylor, *Classification and phylogenetic analysis of the cAMP-dependent protein kinase regulatory subunit family*. J Mol Evol, 2002. **54**(1): p. 17-29.
43. Shabb, J.B., *Physiological substrates of cAMP-dependent protein kinase*. Chem Rev, 2001. **101**(8): p. 2381-2411.
44. Cheng, X., Y. Ma, M. Moore, B.A. Hemmings, and S.S. Taylor, *Phosphorylation and activation of cAMP-dependent protein kinase by phosphoinositide-dependent protein kinase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(17): p. 9849-9854.
45. Cauthron, R.D., K.B. Carter, S. Liauw, and R.A. Steinberg, *Physiological phosphorylation of protein kinase A at Thr-197 is by a protein kinase A kinase*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(3): p. 1416-1423.
46. Steinberg, R.A., R.D. Cauthron, M.M. Symcox, and H. Shuntoh, *Autoactivation of catalytic (C alpha) subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase by phosphorylation of threonine 197*. Mol Cell Biol, 1993. **13**(4): p. 2332-2341.
47. Adams, J.A., M.L. McGlone, R. Gibson, and S.S. Taylor, *Phosphorylation modulates catalytic function and regulation in the cAMP-dependent protein kinase*. Biochemistry, 1995. **34**(8): p. 2447-2454.
48. Shoji, S., K. Titani, J.G. Demaille, and E.H. Fischer, *Sequence of two phosphorylated sites in the catalytic subunit of bovine cardiac muscle adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase*. J Biol Chem, 1979. **254**(14): p. 6211-6214.
49. Taylor, S.S., J.A. Buechler, and W. Yonemoto, *cAMP-dependent protein kinase: framework for a diverse family of regulatory enzymes*. Annu Rev Biochem, 1990. **59**: p. 971-1005.
50. Kemp, B.E., *Peptides and protein phosphorylation*. 1990, Boca Raton, Fla.: CRC Press. 322 p.
51. Hofmann, F., J.A. Beavo, P.J. Bechtel, and E.G. Krebs, *Comparison of adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinases from rabbit skeletal and bovine heart muscle*. J Biol Chem, 1975. **250**(19): p. 7795-7801.
52. Dremier, S., R. Kopperud, S.O. Doskeland, J.E. Dumont, and C. Maenhaut, *Search for new cyclic AMP-binding proteins*. FEBS Lett, 2003. **546**(1): p. 103-107.
53. de Rooij, J., F.J. Zwartkruis, M.H. Verheijen, R.H. Cool, S.M. Nijman, A. Wittinghofer, and J.L. Bos, *Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP*. Nature, 1998. **396**(6710): p. 474-477.
54. Kawasaki, H., G.M. Springett, N. Mochizuki, S. Toki, M. Nakaya, M. Matsuda, D.E. Housman, and A.M. Graybiel, *A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap1*. Science, 1998. **282**(5397): p. 2275-2279.
55. Seino, S. and T. Shibasaki, *PKA-dependent and PKA-independent pathways for cAMP-regulated exocytosis*. Physiol Rev, 2005. **85**(4): p. 1303-1342.
56. Ozaki, N., T. Shibasaki, Y. Kashima, T. Miki, K. Takahashi, H. Ueno, Y. Sunaga, H.

- Yano, Y. Matsuura, T. Iwanaga, Y. Takai, and S. Seino, *cAMP-GEFII is a direct target of cAMP in regulated exocytosis*. *Nat Cell Biol*, 2000. **2**(11): p. 805-811.
57. Aromataris, E.C., M.L. Roberts, G.J. Barritt, and G.Y. Rychkov, *Glucagon activates Ca<sup>2+</sup> and Cl<sup>-</sup> channels in rat hepatocytes*. *J Physiol*, 2006. **573**(Pt 3): p. 611-625.
  58. Fox, I.H. and W.N. Kelley, *The role of adenosine and 2'-deoxyadenosine in mammalian cells*. *Annu Rev Biochem*, 1978. **47**: p. 655-686.
  59. Olsson, R.A. and J.D. Pearson, *Cardiovascular purinoceptors*. *Physiol Rev*, 1990. **70**(3): p. 761-845.
  60. Collis, M.G. and S.M. Hourani, *Adenosine receptor subtypes*. *Trends Pharmacol Sci*, 1993. **14**(10): p. 360-366.
  61. Fredholm, B.B., I.J. AP, K.A. Jacobson, K.N. Klotz, and J. Linden, *International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors*. *Pharmacol Rev*, 2001. **53**(4): p. 527-552.
  62. Watson, S. and D. Girdlestone, *TiPS on nomenclature*. *Trends Pharmacol Sci*, 1995. **16**(1): p. 15-16.
  63. Luthin, D.R. and J. Linden, *Comparison of A<sub>4</sub> and A<sub>2a</sub> binding sites in striatum and COS cells transfected with adenosine A<sub>2a</sub> receptors*. *J Pharmacol Exp Ther*, 1995. **272**(2): p. 511-518.
  64. Libert, F., M. Parmentier, A. Lefort, C. Dinsart, J. Van Sande, C. Maenhaut, M.J. Simons, J.E. Dumont, and G. Vassart, *Selective amplification and cloning of four new members of the G protein-coupled receptor family*. *Science*, 1989. **244**(4904): p. 569-572.
  65. Libert, F., S.N. Schiffmann, A. Lefort, M. Parmentier, C. Gerard, J.E. Dumont, J.J. Vanderhaeghen, and G. Vassart, *The orphan receptor cDNA RDC7 encodes an A<sub>1</sub> adenosine receptor*. *EMBO J*, 1991. **10**(7): p. 1677-1682.
  66. Maenhaut, C., J. Van Sande, F. Libert, M. Abramowicz, M. Parmentier, J.J. Vanderhaeghen, J.E. Dumont, G. Vassart, and S. Schiffmann, *RDC8 codes for an adenosine A<sub>2</sub> receptor with physiological constitutive activity*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1990. **173**(3): p. 1169-1178.
  67. Olah, M.E., H. Ren, and G.L. Stiles, *Adenosine receptors: protein and gene structure*. *Arch Int Pharmacodyn Ther*, 1995. **329**(1): p. 135-150.
  68. Ostrowski, J., M.A. Kjelsberg, M.G. Caron, and R.J. Lefkowitz, *Mutagenesis of the beta 2-adrenergic receptor: how structure elucidates function*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1992. **32**: p. 167-183.
  69. Stehle, J.H., S.A. Rivkees, J.J. Lee, D.R. Weaver, J.D. Deeds, and S.M. Reppert, *Molecular cloning and expression of the cDNA for a novel A<sub>2</sub>-adenosine receptor subtype*. *Mol Endocrinol*, 1992. **6**(3): p. 384-393.
  70. Salvatore, C.A., M.A. Jacobson, H.E. Taylor, J. Linden, and R.G. Johnson, *Molecular cloning and characterization of the human A<sub>3</sub> adenosine receptor*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. **90**(21): p. 10365-10369.
  71. Dixon, A.K., A.K. Gubit, D.J. Sirinathsinghji, P.J. Richardson, and T.C. Freeman, *Tissue distribution of adenosine receptor mRNAs in the rat*. *Br J Pharmacol*, 1996. **118**(6): p. 1461-1468.
  72. Arnold, S.T. and R.L. Csyk, *Adenosine export from the liver: oxygen dependency*. *Am J Physiol*, 1986. **251**(1 Pt 1): p. G34-39.
  73. Pillwein, K., H.N. Jayaram, and G. Weber, *Effect of ischemia on nucleosides and bases in rat liver and hepatoma 3924A*. *Cancer Res*, 1987. **47**(12): p. 3092-3096.



74. Rustum, Y.M., *High-pressure liquid chromatography. I. Quantitative separation of purine and pyrimidine nucleosides and bases.* Anal Biochem, 1978. **90**(1): p. 289-299.
75. Keppens, S. and H. De Wulf, *P2-purinergic control of liver glycogenolysis.* Biochem J, 1985. **231**(3): p. 797-799.
76. Zentella de Pina, M., A. Diaz-Cruz, R. Guinzberg, and E. Pina, *"Hormone-like" effect of adenosine and inosine on gluconeogenesis from lactate in isolated hepatocytes.* Life Sci, 1989. **45**(23): p. 2269-2274.
77. Guinzberg, R., I. Laguna, A. Zentella, R. Guzman, and E. Pina, *Effect of adenosine and inosine on ureagenesis in hepatocytes.* Biochem J, 1987. **245**(2): p. 371-374.
78. Diaz, A., R. Guinzberg, S. Uribe, and E. Pina, *Metabolic responses of isolated hepatocytes to adenosine; dependence on external calcium.* Life Sci, 1991. **49**(7): p. 505-510.
79. Guinzberg, R., A. Diaz-Cruz, S. Uribe, and E. Pina, *Ca<sup>2+</sup> dependence of the response of three adenosine type receptors in rat hepatocytes.* Eur J Pharmacol, 1997. **340**(2-3): p. 243-247.
80. Guinzberg, R., S. Uribe, A. Diaz-Cruz, A. Hernandez Cruz, and E. Pina, *In rat hepatocytes, different adenosine receptor subtypes use different secondary messengers to increase the rate of ureagenesis.* Life Sci, 2006. **79**(4): p. 382-390.
81. Gonzalez-Benitez, E., R. Guinzberg, A. Diaz-Cruz, and E. Pina, *Regulation of glycogen metabolism in hepatocytes through adenosine receptors. Role of Ca<sup>2+</sup> and cAMP.* Eur J Pharmacol, 2002. **437**(3): p. 105-111.
82. Yasuda, N., T. Inoue, T. Horio, K. Nagata, H. Minami, T. Kawata, Y. Hoshino, H. Harada, S. Yoshikawa, O. Asano, J. Nagaoka, M. Murakami, S. Abe, S. Kobayashi, and I. Tanaka, *Functional characterization of the adenosine receptor contributing to glycogenolysis and gluconeogenesis in rat hepatocytes.* Eur J Pharmacol, 2003. **459**(2-3): p. 159-166.
83. Zocchi, C., E. Ongini, A. Conti, A. Monopoli, A. Negretti, P.G. Baraldi, and S. Dionisotti, *The non-xanthine heterocyclic compound SCH 58261 is a new potent and selective A2a adenosine receptor antagonist.* J Pharmacol Exp Ther, 1996. **276**(2): p. 398-404.
84. Brackett, L.E. and J.W. Daly, *Functional characterization of the A2b adenosine receptor in NIH 3T3 fibroblasts.* Biochem Pharmacol, 1994. **47**(5): p. 801-814.
85. Alexander, S.P., J. Cooper, J. Shine, and S.J. Hill, *Characterization of the human brain putative A2B adenosine receptor expressed in Chinese hamster ovary (CHO.A2B4) cells.* Br J Pharmacol, 1996. **119**(6): p. 1286-1290.
86. Klotz, K.N., J. Hessling, J. Hegler, C. Owman, B. Kull, B.B. Fredholm, and M.J. Lohse, *Comparative pharmacology of human adenosine receptor subtypes - characterization of stably transfected receptors in CHO cells.* Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 1998. **357**(1): p. 1-9.
87. Christensen, A.E., F. Selheim, J. de Rooij, S. Dremier, F. Schwede, K.K. Dao, A. Martinez, C. Maenhaut, J.L. Bos, H.G. Genieser, and S.O. Doskeland, *cAMP analog mapping of Epac1 and cAMP kinase. Discriminating analogs demonstrate that Epac and cAMP kinase act synergistically to promote PC-12 cell neurite extension.* J Biol Chem, 2003. **278**(37): p. 35394-35402.
88. Park, W.S., Y.K. Son, N. Kim, J.B. Youm, M. Warda, J.H. Ko, E.A. Ko, S.H. Kang, E. Kim, Y.E. Earm, and J. Han, *Direct modulation of Ca(2+)-activated K(+) current by H-89 in rabbit coronary arterial smooth muscle cells.* Vascul Pharmacol, 2007. **46**(2):

- p. 105-113.
89. Chijiwa, T., A. Mishima, M. Hagiwara, M. Sano, K. Hayashi, T. Inoue, K. Naito, T. Toshioka, and H. Hidaka, *Inhibition of forskolin-induced neurite outgrowth and protein phosphorylation by a newly synthesized selective inhibitor of cyclic AMP-dependent protein kinase, N-[2-(p-bromocinnamylamino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide (H-89), of PC12D pheochromocytoma cells.* J Biol Chem, 1990. **265**(9): p. 5267-5272.
  90. Zeeh, J.C., M. Zeghouf, C. Grauffel, B. Guibert, E. Martin, A. Dejaegere, and J. Cherfils, *Dual specificity of the interfacial inhibitor brefeldin a for arf proteins and sec7 domains.* J Biol Chem, 2006. **281**(17): p. 11805-11814.
  91. Berry, M.N. and D.S. Friend, *High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells: a biochemical and fine structural study.* J Cell Biol, 1969. **43**(3): p. 506-520.
  92. Fales, F.W., *Glucose (enzymatic) standard methods.* Clin Chem, 1963. **4**: p. 101-112.
  93. Bergmeyer, H.U., *Methods of enzymatic analysis.* 2d English ed. 1974, Weinheim New York: Verlag Chemie ; Academic Press. 4 v.
  94. Leroy, J., A. Abi-Gerges, V.O. Nikolaev, W. Richter, P. Lechene, J.L. Mazet, M. Conti, R. Fischmeister, and G. Vandecasteele, *Spatiotemporal dynamics of beta-adrenergic cAMP signals and L-type Ca<sup>2+</sup> channel regulation in adult rat ventricular myocytes: role of phosphodiesterases.* Circ Res, 2008. **102**(9): p. 1091-1100.
  95. Jacobson, K.A. and Z.G. Gao, *Adenosine receptors as therapeutic targets.* Nat Rev Drug Discov, 2006. **5**(3): p. 247-264.