

107  
E. Guzmán

UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MEXICO



Facultad de Química

“EFECTOS DE LA TOXINA PERTUSSIS SOBRE LAS  
ACCIONES DE INSULINA Y ADENOSINA EN ADIPO-  
CITOS DE RATA”

T E S I S

Que para obtener el Título de  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P r e s e n t a

MARIA DE LA LUZ TORNER AGUILAR



México D. F.

1985



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## INDICE

1.	Introducción	1
2.	Objetivos	16
3.	Materiales y Métodos	18
4.	Resultados	22
5.	Discusión	40
6.	Bibliografía	43

## 1. INTRODUCCION

Las hormonas son secreciones naturales de las glándulas endocrinas y ejercen importantes efectos funcionales sobre otros tejidos. Por definición una hormona es una sustancia secretada por un tejido (una glándula endocrina) y transportada a otros tejidos donde regulan una variedad de actividades fisiológicas y metabólicas.

Se sabe que las células blanco donde ejercen sus efectos las hormonas contienen receptores; estos receptores son proteínas especializadas capaces de unir la hormona con una alta afinidad y especificidad. La unión de la hormona a su receptor específico causa la formación de una molécula mensajera intracelular, la cual estimula o deprime alguna actividad bioquímica característica de la célula blanco. (1)

De acuerdo a su sitio de acción celular se puede clasificar a las hormonas como sigue:

- i) las que tienen la capacidad de entrar a la célula (esteroides),
- ii) las que actúan a nivel de la membrana plasmática, como catecolaminas y hormonas peptídicas.

Las hormonas esteroides ganan acceso al compartimiento intracelular y se unen a las proteínas receptoras citoplasmáticas. Después de esta interacción el complejo hormona-receptor, con o sin alguna modificación, se transporta a sitios de acción dentro del núcleo. Estas hormonas en general ejercen su acción en un periodo de tiempo largo, y algunas de ellas tienen también la capacidad de alterar la respuesta celular a

ciertas hormonas que actúan a nivel de la membrana plasmática ejerciendo así, un efecto permisivo.

Las demás hormonas actúan interaccionando con receptores específicos que se encuentran en la membrana plasmática, formándose un complejo hormona-receptor que da lugar a una señal o segundo mensajero intracelular.

Se conocen dos mecanismos de acción hormonal que actúan a nivel de la membrana plasmática:

- i) uno, no del todo dilucidado que involucra un recambio de fosfatidil-inositol y aumento en la concentración de Ca intracelular.
- ii) otro, a través de la enzima adenilato ciclasa, que emplea AMP cíclico como segundo mensajero.

Existe mucha información sugiriendo que un incremento en la concentración de Ca en el citosol puede actuar como un mensajero intracelular o "factor de acoplamiento". La movilización de Ca inducida por hormonas está asociada, de acuerdo a Michell, con alteraciones en el metabolismo de inosítidos en una amplia variedad de tejidos. El efecto hormonal más ampliamente observado sobre el metabolismo de inosítidos es el rompimiento inicial de fosfatidil-inositol seguido de un aumento compensatorio en la velocidad de su síntesis. En varios tipos de células, se demostró que ésto es un fenómeno de resíntesis secundaria que resulta de la desaparición de fosfatidil-inositol con la generación de inositol fosfato, diacilglicerol, y subsecuentemente ácido fosfatídico. También se ha visto que el fosfatidil inositol-4-fosfato y el fosfatidil inositol-4,5-bifosfato pueden degradarse en respuesta a un estímulo hormonal, y estos cambios son proporcionalmente más grandes y

más rápidos que la degradación de fosfatidil inositol. (2,3)

#### Sistema Adenilato Ciclasa.

Algunas hormonas y neurotransmisores interactúan con receptores específicos en las membranas plasmáticas celulares unidas a un complejo sistema regulatorio: la Adenilato ciclasa descubierta por Sutherland y Rall. Esta enzima es estimulada o inhibida por el complejo hormona-receptor y el resultado es la alteración de la velocidad de síntesis del 3',5'-monofosfato cíclico de adenosina (AMP cíclico) a partir de ATP.

El AMP cíclico actúa entonces como mediador intracelular de la hormona y el sistema funciona como mecanismo de transferencia y amplificación de la información inherente a la hormona extracelular.

El mecanismo de acción del AMP cíclico para producir cambios enzimáticos es complejo y resulta de la iniciación de la serie en cascada de reacciones de fosforilación de proteínas.

También se producen reacciones similares en el tejido adiposo conllevando a la activación de la triglicérido lipasa, con la consiguiente hiperlipemia. (1)

#### Estructura de la Adenilato ciclasa:

El sistema enzimático se encuentra estructurado dentro de la membrana celular, y está compuesto por lo menos por tres clases de elementos: Sobre la superficie externa de la membrana celular se encuentra localizado el receptor (R) el que contiene un sitio específico para la unión de hormonas y neurotransmisores.

En la Cara interna de la membrana están la unidad catalítica (C) y las proteínas reguladas por nucleótidos (N).

Estos últimos contienen sitios de unión para GTP y son responsables de mediar los efectos de GTP y de varias hormonas sobre la actividad de C. Estas proteínas están involucradas por tanto en la activación e inhibición de la adenilato ciclasa y se piensa que son el resultado de un aumento mediado por receptores de las acciones intrínsecas de los nucleótidos de guanina. Existen argumentos cinéticos que sugieren que los efectos estimulatorios e inhibitorios de los guanín nucleótidos están mediados vía interacción con distintas proteínas N, siendo Ns la proteína reguladora de guanín-nucleótidos que media la activación de la adenilato ciclasa y Ni la proteína reguladora que media la inhibición de la enzima. (4)

La subunidad Ns es la proteína que sirve también como sustrato a la ADP-ribosilación catalizada por la toxina del Cólera. Ya que esta ADP-ribosilación de la proteína altera sus funciones intensamente, esta exotoxina bacteriana ha probado ser un arma excelente para analizar el mecanismo de acción de Ns.

La subunidad Ni es la proteína reguladora involucrada en la inhibición de la ciclasa; este efecto inhibitorio puede ser bloqueado con una toxina de Bordetella pertussis, la toxina pertussis. Esta toxina es una enzima ADP-ribosilante que usa como sustrato un péptido Nr = 40 000 que es distinto al péptido ribosilado por la toxina del Cólera.

Ns se ha logrado purificar por Gilman y colaboradores y se encontró que es un heterodímero de composición  $\alpha\beta$ , la subunidad  $\alpha$  contiene no sólo el sitio para la acción de la toxina del Cólera sino que es también el sitio de unión para guanín-nucleótidos, y es responsable de la activación de la subunidad catalítica C. La subunidad  $\beta$  se piensa que regula

la capacidad de  $\alpha$  de activar a C. También Ni es un heterodimero que contiene una subunidad  $\alpha$  y una  $\beta$ , la cual al igual que Ns, tiene un Mr = 35 000. (5)

De acuerdo al modelo propuesto por Rodbell, Ns está ligado solo a receptores que causan la activación de la adenilato ciclasa, mientras que Ni está acoplado exclusivamente con receptores que median la acción inhibitoria.

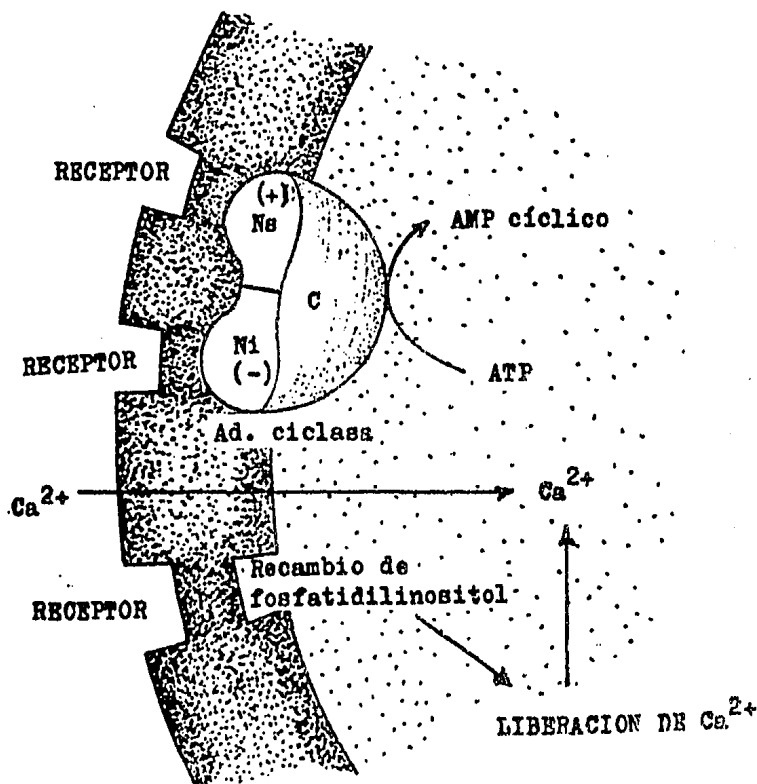


FIG. 1-1. MECANISMOS DE ACCION DE HORMONAS QUE ACTUAN A NIVEL DE LA MEMBRANA PLASMATICA. (3,4)



## AGENTES A ESTUDIAR:

### TOXINA PERTUSSIS

La toxina pertussis es una proteína producida por Bordetella pertussis, el microorganismo causante de la tosferina. Esta toxina ejerce una variedad de respuestas que incluyen la inducción de linfocitosis, la sensibilización de los animales a efectos de histamina, la estimulación de la secreción de insulina y la estimulación de la lipólisis en adipocitos de rata. Por esto mismo, se le han dado nombres diferentes a esta toxina, tales como:

- 1) Factor promotor de linfocitosis.
- 2) Proteína activadora de los islotes.
- 3) Factor sensibilizante a histamina.
- 4) Pertussígeno.
- 5) Toxina pertussis.

Además de estas acciones la toxina pertussis actúa como una hemaglutinina y sirve como un inmunógeno importante para la protección de ratones al ser retados con Bordetella pertussis.

La toxina pertussis es una proteína oligomérica; consta de 6 subunidades denominadas S1, S2, S3, S5 y dos subunidades S4, las que se han logrado separar mediante electroforesis bidimensional. La subunidad S1 parece ser la que posee actividad de ADP-ribosil transferasa, así como actividad de NAD-glicohidrolasa. La toxina pertussis demuestra la capacidad de catalizar específicamente la ADP-ribosilación de un componen-

te de la membrana ( $M_r = 41\ 000$ ).

Los análisis del componente S1 mediante electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS, en presencia y ausencia de agentes reductores indican la presencia de disulfuros internos en esta subunidad. Otras exotoxinas bacterianas también requieren la reducción de disulfuros para presentar la actividad de ADP-ribosil transferasa; este fenómeno ha sido observado para las toxinas diftérica y del cólera. (6,7)

La toxina pertussis es, al igual que la toxina del Cólera, una proteína con la estructura A-B, en la cual un oligómero B se une a receptores particulares en la superficie de la célula blanco para permitir que el protómero A se inserte gradualmente en la membrana celular, donde este componente activo de la toxina cataliza la transferencia de ADP-ribosa del NAD citosólico a una proteína específica de la membrana. El tiempo o fase lag definido observado que invariablemente precede a la aparición de la acción de la toxina pertussis en células intactas se debe a este acceso gradual del componente activo a su sitio de acción.

La toxina pertussis resulta efectiva en causar la pérdida característica de ciertas respuestas celulares mediadas por receptores. La estimulación de receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos en células de islotes de rata, receptores colinérgicos muscarínicos y receptores para adenosina en células cardíacas de rata, y receptores opiáceos,  $\alpha_2$ -adrenérgicos y muscarínicos en células híbridas de Neuroblastoma x Glioma, resulta en una inhibición de la adenilato ciclasa y por tanto, en marcadas disminuciones en su contenido de AMP cíclico celular, (es decir, son receptores inhibitorios). (8) Estas disminuciones no son observables si las células se incuban en contacto con

bajas concentraciones de la toxina pertussis. Esto muestra que la inhibición mediada por receptores de la adenilato ciclase es revertida por tratamiento de las células con la toxina pertussis. Su administración a hamsters produce una disminución marcada en la sensibilidad de sus adipocitos a aminas  $\alpha$ 2-adrenérgicas, prostaglandina  $E_2$ , ácido nicotínico y fenil isopropil adenosina. Todos estos agentes normalmente inhiben a la adenilato ciclase en adipocitos de hamster a través de procesos dependientes de GTP mediados por receptores. Por el contrario, la acción de los agentes que activan a la adenilato ciclase no está disminuída sino aumentada. (9,10)

La toxina pertussis cataliza la transferencia de la fracción ADP-ribosa del NAD del citoplasma a una proteína de  $M_r = 41\ 000$  en membranas. Este péptido de  $M_r = 41\ 000$  parece ser una de las proteínas que unen guanín-nucleótidos, y sin embargo, resulta ser distinta a los péptidos que son los sustratos de ADP-ribosilación similares catalizados por la toxina del cólera, reflejando una marcada diferencia entre la toxina pertussis y la toxina del cólera en sus acciones en el sistema adenilato ciclase en la membrana. Últimamente, se ha demostrado que este péptido de  $M_r = 41\ 000$  que sirve como sustrato de la ADP-ribosilación catalizada por la toxina pertussis es una de las subunidades de la proteína reguladora de guanín nucleótidos (Ni) que está involucrada en la inhibición de la ciclase. Así, la toxina pertussis interfiere con las funciones de Ni desacoplando la comunicación mediada por ella entre los receptores inhibitorios y la unidad catalítica de la ciclase. (11).

Por lo anteriormente expuesto, la toxina pertussis parece ser un arma prometedora para estudiar los mecanismos mole-

culares involucrados en la regulación de la adenilato ciclasa por hormonas y neurotransmisores.

## ADENOSINA

La adenosina es un nucleósido de purina; puede ser tan importante como las hormonas en la regulación de la adenilato ciclasa. De hecho, parece ser un regulador endógeno particularmente importante de la adenilato ciclasa en cerebro, músculo liso y adipocitos principalmente.

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

Puede ser removida de las células por su liberación al fluido extracelular por síntesis de nucleótidos de adenina, o por degradación de productos finales de purinas. La adenosina es activamente degradada a inosina por la enzima adenosina deaminasa; la remoción de adenosina puede ocurrir también a través de su conversión a nucleósidos de monofosfato en una reacción catalizada por adenosina cinasa. También es posible que la adenosina sea removida por una fosforólisis reversible directa a adenina. Se sabe que ciertos tejidos, como miocardio y tejido adiposo son capaces de liberar adenosina.

Muchas propiedades biológicas de adenosina han sido identificadas: es tóxica para células de mamíferos y bacterianas, y su presencia está asociada con la inhibición de la respuesta inmune, vasodilatación coronaria, neurotransmisión retar-

dada, inhibición o estimulación de la secreción de hormonas y cambios en el metabolismo de varios tejidos. La adenosina produce varios efectos bioquímicos incluyendo la activación directa de la adenilato ciclasa, la inhibición de la biosíntesis de pirimidinas, y la disminución de la síntesis del fosforribosil pirofosfato (PR-ribosil P).

La adenosina es tóxica a una amplia variedad de células. Como se sabe que los niveles muy elevados de AMP cíclico inhiben a la respuesta inmune así como a la inmunocitolisis, se ha propuesto que la acumulación de AMP cíclico puede intervenir en los efectos inmunosupresores y la toxicidad de adenosina. También se piensa que la toxicidad sea el resultado de una elevación de los niveles de ATP, la cual inhiba la formación de UTP. (12)

La adenosina juega un papel muy significativo como un modulador endógeno de la acumulación de AMP cíclico y la lipólisis en adipocitos aislados. Se asume que los efectos de adenosina son mediados por la interacción con un receptor presente en la membrana plasmática de las células.

Se encontró que la adenosina así como sus análogos aumentan la concentración de AMP cíclico por estimulación de la actividad de la adenilato ciclasa en varios tejidos tales como cerebro, células de neuroblastoma de ratón, células de miocardio, células adrenales y células tumorales de Leydig. De hecho se vió que en estos tejidos la adenosina estimula a la adenilato ciclasa a bajas concentraciones (0.01 - 20  $\mu\text{M}$ ) mientras que altas concentraciones ( $> 100 \mu\text{M}$ ) inhiben la actividad de la adenilato ciclasa.

En varios sistemas el efecto de la adenosina en la adenilato ciclase parece ser únicamente inhibitorio siendo esto reportado en corteza renal, hígado y principalmente en tejido adiposo. (13)

Dole en 1961 (14) reportó que la adenosina y otros nucleósidos conteniendo adenosina inhibía la lipólisis estimulada por hormonas en tejido adiposo. Posteriormente este reporte fue confirmado y extendido hasta incluir la inhibición de la acumulación del AMP cíclico estimulada por hormonas. Londres, Cooper y Wolf (15) observaron en un estudio farmacológico que existen tres tipos de receptores para adenosina, evidenciándolos mediante diferentes análogos de este nucleósido:

i) El sitio "P", con una estricta especificidad estructural respecto del anillo de purina de la molécula. Este sitio "P" se postula que está localizado en la cara intracelular de la membrana plasmática, y media algunos efectos inhibitorios de la adenilato ciclase.

ii) Dos subclases de receptores externos para adenosina, los cuales poseen una especificidad estructural para la ribosa de la molécula, y que por lo tanto se les llama sitios "R". Una de estas subclases media la activación de la adenilato ciclase (R<sub>a</sub>), mientras que la otra subclase media la inhibición (R<sub>i</sub>). Estas subclases de receptores han sido elucidadas empleando agonistas de adenosina selectivos.

Fain y Malbon sugirieron que los sitios "R" son los que median los efectos fisiológicos de adenosina; en contraste, el sitio "P" parece ser un sitio para nucleótidos de adenina o desoxiadenosina y requiere mayores concentraciones de adeno-

sina o los desoxianálogos. (13)

En el sitio "P" se requiere que el análogo de adenosina posea el anillo de purina intacto para que haya efecto, pero se pueden hacer modificaciones de la parte que contiene a la ribosa; estas modificaciones generalmente aumentan la potencia del análogo. De éstos el más potente es la 2',5'-didesoxi adenosina.

Los sitios "R" requieren que la porción de ribosa de la molécula permanezca intacta, por lo que las alteraciones a la misma pueden introducirse en el anillo de purina; de estos análogos Cooper y colaboradores encontraron que la N<sup>6</sup>-fenil isopropil adenosina (PIA) es específica para el sitio "R1", y la 5' N-etil carboxamida adenosina (NECA) es específica para el sitio "Ra". (15)

Estudios anteriores indicaban la existencia de sólo dos de estos tres tipos de receptores para adenosina en células adiposas: el sitio "P" y el sitio "R1", los cuales median los efectos inhibitorios de la adenilato ciclasa. Nosotros en este estudio demostramos la presencia del sitio "Ra" en adipocitos, además de los otros dos sitios ya mencionados.

## INSULINA

La insulina es una hormona proteica producida en las células  $\beta$  de los islotes de Langerhans del páncreas. La molécula consiste de dos cadenas peptídicas conectadas por puentes disulfuro. También hay un puente intradisulfuro en la ca

dena A. La molécula de insulina posee una porción no polar y todos los residuos polares están contenidos en la estructura superficial. Cualquier modificación de la insulina que altere su estructura tridimensional resulta en una pérdida marcada de su actividad biológica.

En general, la insulina promueve las funciones anabólicas así como disminuye la velocidad de las vías degradativas. La insulina aumenta el transporte de glucosa al interior de la célula adiposa; de hecho, este es uno de los pasos limitantes de la velocidad del metabolismo de glucosa en el adipocito. También aumenta la velocidad de la glucólisis y aumenta la velocidad de la esterificación; esto es particularmente importante en el control de la movilización de ácidos grasos. Se sabe que la insulina aumenta la velocidad de la síntesis de triglicéridos ya sea a partir de glucosa o de acetato.

La vía de acetil-CoA a acil-CoA, así como la vía glicolítica son estimuladas por insulina, la que también promueve un aumento en la velocidad de la vía de las pentosas fosfato, siendo esta vía la responsable de la generación de gran parte del poder reductor (NADPH) necesario para la síntesis de ácidos grasos.

La insulina es la hormona antilipolítica por excelencia. Se sabe que disminuye la velocidad de liberación de ácidos grasos y glicerol del tejido adiposo; también incrementa la actividad de la lipoprotein lipasa y consecuentemente facilita la toma de triglicéridos del plasma. (16)

Se piensa que las acciones de insulina se inician cuando la hormona se une a un receptor en la membrana plasmática.



Inmediatamente el receptor se encapsula y subsecuentemente se internaliza en forma de vesículas por un proceso energético. (17)

No se ha logrado dilucidar aún el mecanismo a través del cual actúa la insulina; recientemente (18) se ha demostrado que la insulina provoca un aumento en las concentraciones de ácido fosfatídico y fosfoinosítidos en tejido adiposo. También se ha sugerido que la insulina pueda producir uno o varios segundos mensajeros; se piensa que pudiera ser un péptido y que regulara la actividad de fosfatasas y cinasas, lo que afectaría una gran variedad de procesos alterando el estado de fosforilación de proteínas blanco, sin embargo, hay serias anomalías en contra de esta hipótesis. (19)

Se ha visto que la insulina activa a una fosfodiesterasa de alta afinidad por el AMP cíclico asociada a la membrana plasmática de hepatocitos. En tejido adiposo, la estimulación por la insulina de la fosfodiesterasa y una subsecuente disminución en las concentraciones de AMP cíclico se han propuesto para explicar los efectos de la insulina pero ésto último no ha sido demostrado en su totalidad, ya que hay reportes en los que se muestra que la insulina no tiene efecto o inclusive umenta los niveles de AMP cíclico en músculo o adipocitos, mientras que activa a la glucógeno sintetasa en músculo o inhibe la lipólisis en el adipocito.

Houslay recientemente (20) propuso que una especie de proteína reguladora de guanín nucleótidos pudiera mediar el efecto de la insulina sobre la cinasa de la membrana plasmática y sobre la fosfodiesterasa, pudiendo ser de la misma naturaleza de las proteínas reguladoras Na y Ni; sin embargo, es

poco probable que Ni sea idéntica a esta supuesta proteína reguladora involucrada en la acción de la insulina.

## 2. OBJETIVOS DEL PRESENTE ESTUDIO.

i) Uno de los objetivos fue el estudio de los efectos "insulin-like" de adenosina, explorando si había una potenciación en los efectos de insulina inducida por adenosina, ya que se encontraron reportes de Joost y Steinfeldt (21) en el sentido de que la adenosina es capaz de modificar los efectos de la insulina en el metabolismo de los adipocitos sensibilizando las células a la acción de la hormona.

ii) Confirmando los estudios de nuestro laboratorio (22), Kather, Aktories, Schulz y Jakobs reportaron que la acción antilipolítica de insulina no sólo era preservada, sino aumentada en células de ratas tratadas con la toxina pertussis, lo cual resultaba muy interesante en vista del hecho de que no se conoce todavía el mecanismo de acción de la insulina y hay controversia en cuanto a su efecto sobre los niveles de AMP cíclico en adipocitos aislados. Estos efectos pudieran resultar de un aumento en la actividad de la fosfodiesterasa de AMP cíclico sensible a insulina o podría estar relacionado a un efecto inhibitorio de la insulina sobre la actividad de la adenilato ciclasa. (23, 24)

Houslay propuso que una especie específica de proteína reguladora de guanín nucleótidos pudiera mediar el efecto de insulina sobre la cinasa de la membrana plasmática y sobre la fosfodiesterasa, observando sin embargo que la toxina pertussis aunque bloquea la acción de  $N_i$ , no bloquea la activación

de la fosfodiesterasa por insulina. (20)

Por todo lo anterior, se decidió comprobar si realmente el efecto de insulina era aumentado en células de ratas tratadas con toxina pertussis como un esfuerzo para colaborar en la comprensión de los mecanismos de acción de dicha hormona.

iii) Otro objetivo surgió a medida que se avanzó en el estudio, y que se planteó en base a los resultados obtenidos sobre lipólisis. Este objetivo fue el de determinar en células tratadas con la toxina pertussis los agentes inhibidores de la ciclase que pudieran estimular a la misma adenilato ciclase, implicando un probable acoplamiento con  $N_6$  al estar bloqueada la subunidad reguladora  $N_1$ . Como hipótesis alterna, se sugería la posibilidad de que hubiera receptores  $R_a$  para adenosina presentes en células adiposas, hecho que no se había reportado antes para este tipo de células.

### 3. MATERIALES Y METODOS.

#### SUBSTANCIAS.

Las sustancias utilizadas se obtuvieron de los siguientes laboratorios: Insulina de Lilly, Adenosina y Adenosina deaminasa de Sigma, [ $^{14}\text{C}$ ]-glucosa y [ $^3\text{H}$ ]-AMPc de New England Nuclear, Hidróxido de Hiamina de Amersham, Colagenasa y Albúmina sérica bovina (fracción V) de Worthington y Armour respectivamente, N<sup>6</sup>-fenil isopropil adenosina (PIA) de Boehringer Mannheim, 5'-N-etil carboxamida adenosina (NECA) de Byk-Gulden Pharmaceutica, Prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) y Epinefrina de Sigma; 2'-5'-dideoxiadenosina (DDA) de PL Biochemicals. La toxina pertussis fue purificada de concentrados de vacuna pertussis proporcionados por el Instituto Nacional de Higiene de México.

#### ANIMALES.

Se usaron ratas macho de la raza Wistar de 250 - 300 g. alimentadas ad libitum con alimento para ratas Purina.

Algunos animales fueron inyectados con toxina pertussis ( = 10 µg por 100 g) intraperitonealmente 3 días antes de ser sacrificados.

#### AISLAMIENTO DE ADIPOCITOS.

Las ratas fueron muertas por anestesia con cloroformo, extrayéndose el tejido del pániculo adiposo del epididimo y del pániculo perirrenal. Acto seguido, se fragmentó el tejido

con tijeras y se incubó en Krebs-ringer bicarbonato con albúmina al 3% conteniendo 1 mg/ml de colagenasa, por aproximadamente media hora a 37°C, en un baño con agitación, de acuerdo al método de Rodbell (25).

Al término de la digestión, las células se filtraron a través de una malla de nylon y se lavaron 2 veces con el buffer centrifugando 15" a baja velocidad en una centrifuga clinica.

#### PARAMETROS METABOLICOS.

Para los parámetros metabólicos estudiados se incubaron 1 ml de suspensión de células con las hormonas y los agentes a estudiar en medio Krebs-Ringer bicarbonato en atmósfera de 95% oxígeno 5% CO<sub>2</sub> en tubos de plástico tapados, en un baño con agitación constante a 37°C por 60 minutos. Las células se ajustaron a una concentración de  $\approx 2 \times 10^5$  células. La incubación se terminó colocando la suspensión en agua helada.

##### 1) Incorporación de [<sup>14</sup>C]-Glucosa a lípidos totales.

Las células se incubaron en tubos de plástico tapados, en medio Krebs-Ringer bicarbonato con albúmina al 3%, suplementado con glucosa fría 0.1 mM y [<sup>14</sup>C]-glucosa 1  $\mu$ Ci/ml.

A la suspensión de células se agregan 2 ml de metanol absoluto y 4 ml de cloroformo; se mezclan los tubos, se agregan 3 ml de buffer de fosfatos 100 mM (pH = 6), se agitan los tubos y se centrifugan.

Se descartó la fase superior (acuosa) por aspiración y se repite el proceso con la parte inferior; se retira con cuidado la pasta de proteínas precipitadas, y se transfiere la fase inferior a viales, en los cuales se dejan evaporar las

muestras toda la noche y se agrega posteriormente líquido de centelleo para el conteo de radiactividad.

ii) Producción de  $^{14}\text{CO}_2$  (Oxidación de  $^{14}\text{C}$ -glucosa).

Las células se incubaron en medio Krebs-Ringer bicarbonato con albúmina al 3%, suplementado con glucosa fría 0.1 mM y  $^{14}\text{C}$ -glucosa 1  $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ . Se emplearon tapones especiales conteniendo un pocito aereo para colocar un pequeño tubo conteniendo 75  $\mu\text{l}$  de hidróxido de hiamina con el objeto de captar el  $\text{CO}_2$  liberado del medio de incubación.

Al término de la incubación, se agregó 0.2 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  5N a cada tubo sellado y se incubó una hora a  $37^\circ\text{C}$  con agitación. Al término de esto los tubos con hiamina se transfirieron a viales, agregándoles líquido de centelleo.

iii) Lipólisis.

Las células se incubaron en medio Krebs-Ringer bicarbonato con albúmina al 3%, sin glucosa, por 60 minutos. Como índice de lipólisis se determinó la cantidad de ácidos grasos libres de acuerdo al método propuesto por Novák (26).

iv) AMP cíclico.

Las células se incubaron durante 10 minutos en medio Krebs-Ringer fosfato, parándose la reacción con HCl; posteriormente se hirvió un minuto la suspensión, se dejó enfriar y se neutralizó con NaOH. La cuantificación de AMP cíclico se hace por el método de Gilman (27).

**ESTADISTICA:**

Los resultados se expresan como la media  $\pm$  error standard de entre 4 y 6 determinaciones por duplicado empleando diferentes preparaciones de células en cada caso.



#### 4. RESULTADOS

Se midió la incorporación de  $[^{14}\text{C}]$ -glucosa a lípidos totales estimulada por diferentes concentraciones de insulina, en presencia de adenosina deaminasa (0.5  $\mu\text{g/ml}$ ) para observar el efecto neto de insulina, o en presencia de adenosina  $10^{-6}\text{M}$  con objeto de ver si había alguna potenciación en el efecto de insulina inducida por adenosina, ya que Joost y Steinfeldt (21) habían reportado que la adenosina es capaz de modificar los efectos de la insulina en el metabolismo de los adipocitos sensibilizando las células a la acción de la hormona.

En la figura 4-1 se observa que tanto en adipocitos de ratas controles como de ratas tratadas con la toxina, la curva dosis-respuesta para insulina mas adenosina  $10^{-6}\text{M}$  se encuentra ligeramente desplazada hacia la izquierda con respecto de la curva de insulina mas adenosina deaminasa, lo que indica un mayor efecto, sin embargo no se puede hablar de una potenciación del efecto por adenosina ya que ambas curvas no parten del mismo valor basal, siendo mayor el basal encontrado para adenosina  $10^{-6}\text{M}$  sola.

Se hizo una curva dosis-respuesta a adenosina en adipocitos de ratas controles y de ratas tratadas con la toxina (Fig. 4-2). En los adipocitos de ratas controles se observa un claro efecto de adenosina obteniéndose alrededor de 250 % de efecto máximo; en adipocitos de ratas tratadas con la toxi

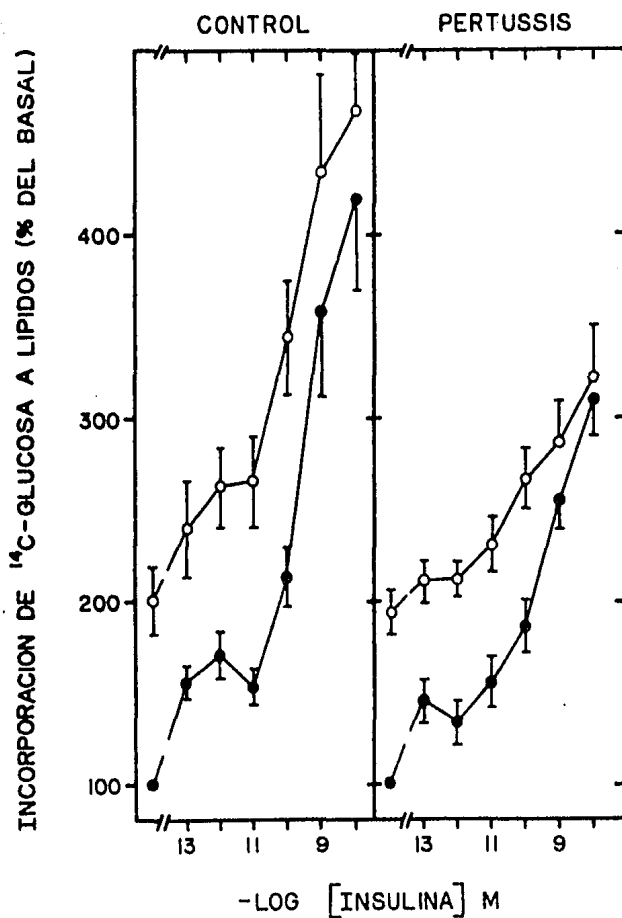


FIG. 4-1. EFECTO DE INSULINA SOBRE LA INCORPORACION DE <sup>14</sup>C-GLUCOSA A LIPIDOS TOTALES, EN ADIPECITOS DE RATAS CONTROL Y RATAS TRATADAS CON TOXINA PERTUSSIS.

Los adipocitos se incubaron por 60 min. en presencia de Adenosina deaminasa 0.5 µg/ml (●) ó de adenosina 10<sup>-6</sup> M (○).

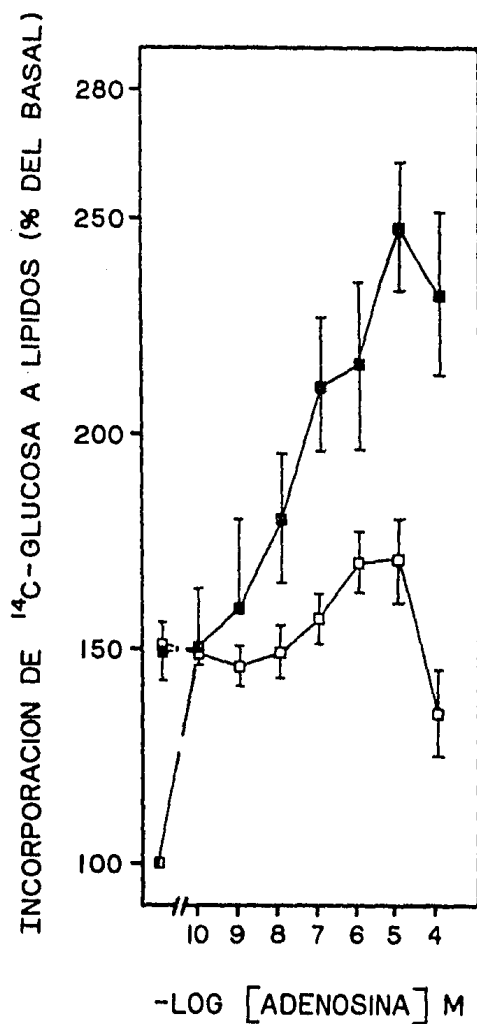


FIG. 4-2. EFECTO DE ADENOSINA SOBRE LA INCORPORACION DE <sup>14</sup>C-GLUCOSA A LIPIDOS EN ADIPOSITOS DE RATAS CONTROL Y RATAS TRATADAS CON LA TOXINA PERTUSSIS.

Se incubaron por 60 min. los adipocitos de ratas control (■) o tratadas con toxina pertussis (□).

na casi no hay estimulación y ésta es casi completamente inhibida a la dosis máxima probada ( $10^{-4}$  M).

Además, es interesante observar que si tomamos en cuenta como valor basal el % de adenosina endógena (cuantificada en base a un control con adenosina deaminasa) se comprueba que el valor basal de síntesis de lípidos varía muy poco, siendo esta síntesis casi completamente bloqueada por efecto de la ribosilación de la subunidad reguladora Ni producida por la toxina pertussis.

Como segundo parámetro metabólico a estudiar se midió la producción de  $^{14}\text{CO}_2$  a partir de  $[^{14}\text{C}]$ -glucosa estimulada por la insulina, en presencia de adenosina deaminasa (0.5  $\mu\text{g/ml}$ ) o de adenosina  $10^{-6}$  M (Fig. 4-3).

Se observa también un desplazamiento hacia la izquierda de la curva correspondiente a insulina mas adenosina  $10^{-6}$  M en adipocitos de ratas controles y tratadas con toxina, con respecto de la curva de insulina mas adenosina deaminasa. También en este caso los valores basales correspondientes a la primera curva (que corresponden a células mas adenosina  $10^{-6}$  M), se encuentran por encima de los basales que corresponden al 100% y que son de células incubadas con adenosina deaminasa únicamente; por ello, no se puede hablar claramente de una potenciación del efecto de insulina inducida por adenosina.

Asimismo, en adipocitos de ratas tratadas con la toxina las curvas dosis-respuesta para insulina mas adenosina e insulina mas adenosina deaminasa se encuentran más aplanadas, indicando una ligera disminución del efecto por consecuencia de la acción de la toxina pertussis en ambos casos.

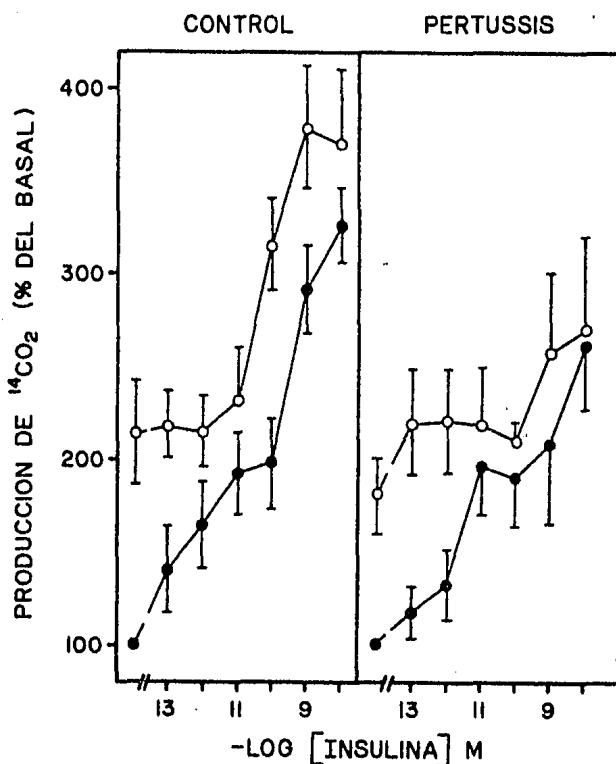


FIG. 4-3. EFECTO DE INSULINA Y ADENOSINA SOBRE LA PRODUCCION DE <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> EN ADIPOCITOS DE RATAS CONTROL Y RATAS TRATADAS CON TOXINA PERTUSSIS.

Los adipocitos se incubaron 60 min. en presencia de adenosina deaminasa (0.5 µg/ml) (●) o adenosina 10<sup>-6</sup> M (○).

Para comprobar la acción de la toxina pertussis se hicieron curvas dosis-respuesta a adenosina. En adipocitos de ratas controles se observa un claro efecto de adenosina, llegando a un valor de 300% por arriba del basal la producción de  $\text{CO}_2$  (Fig. 4-4), en cambio, en adipocitos de ratas tratadas con la toxina se observa primero una ligera disminución y después el retorno a valores similares al basal de adenosina endógena, quedando siempre por encima del valor basal con adenosina deaminasa.

Se midió el índice de lipólisis como otro parámetro a estudiar, en base a la cantidad de ácidos grasos libres (en  $\text{uEq}/10^6$  células). En células de ratas controles la cantidad basal de ácidos grasos libres es muy pequeña ( $0.80 \text{ uEq}/10^6$  células) por lo que no se podía detectar la actividad antilipolítica de insulina por el método de Novák; al probar insulina mas adenosina deaminasa pudimos detectar un aumento en la cantidad de ácidos grasos libres ( $2.60 \text{ uEq}/10^6$  células) y \* consecuentemente se pudo obtener una curva dosis-respuesta, observándose la inhibición de la lipólisis por insulina. Esto podría sugerir una potenciación del efecto antilipolítico de insulina por acción de la adenosina endógena, la cual es constantemente liberada por los adipocitos (Fig. 4-5).

En ratas tratadas con la toxina pertussis se ha reportado por el laboratorio (28) un aumento en la lipólisis basal, lo cual fue básicamente confirmado en este estudio, observándose un aumento de 2.34 veces el valor basal de ácidos grasos libres en adipocitos de ratas tratadas con la toxina (respecto de adipocitos de ratas controles) en presencia de adeno-

( \* Tabla 4-1)

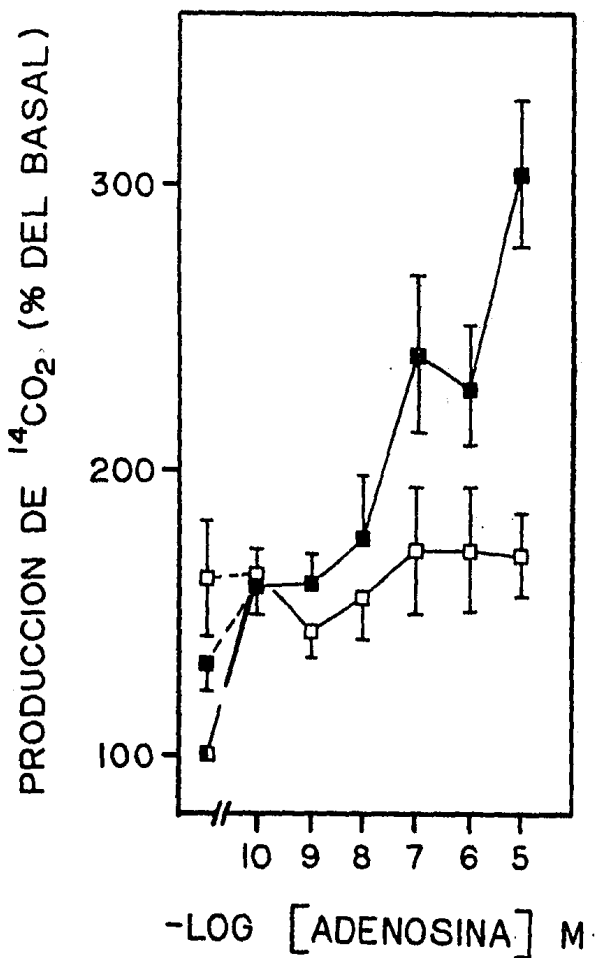


FIG. 4-4. EFECTO DE ADENOSINA SOBRE LA PRODUCCION DE  $^{14}\text{CO}_2$  EN ADIPOCITOS DE RATAS CONTROL Y RATAS TRATADAS CON TOXINA PERTUSSIS.

Se incubaron adipocitos de ratas control (■) o ratas tratadas con toxina pertussis (□).

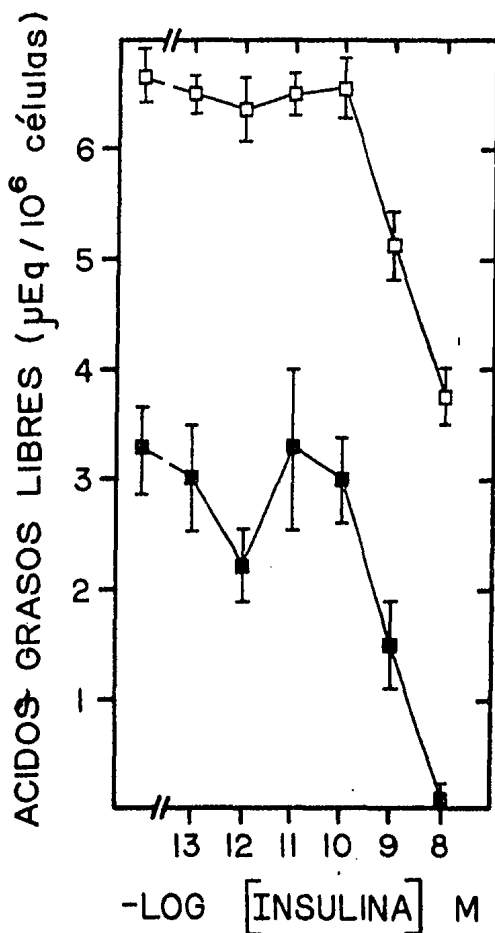


FIG. 4-5. EFECTO DE INSULINA SOBRE LA LIPOLISIS EN ADIPOCITOS DE RATAS CONTROL Y RATAS TRATADAS CON TOXINA PERTUSSIS.

Los adipocitos se incubaron en presencia de adenosina deaminasa 0.5 µg/ml de ratas control (■) o ratas tratadas con toxina pertussis (□).



sina deaminasa, y de 12.87 veces sin adenosina deaminasa.

Se decidió estimular la lipólisis con epinefrina  $10^{-6}M$  en adipocitos de ratas controles con objeto de hacer más factible la observación de los efectos antilipolíticos de los agentes probados. Así, se observa en la figura 4-6, una reducción de la lipólisis similar probando insulina mas epinefrina  $10^{-6}M$  e insulina mas adenosina  $10^{-6}M$  mas epinefrina  $10^{-6}M$ ; aquí practicamente no se observa ningún aumento del efecto por adenosina, probablemente por estar estimulada la lipólisis al máximo.

En adipocitos de ratas tratadas con la toxina se observa un efecto antilipolítico similar en dosis-respuestas a insulina y a insulina mas adenosina mas adenosina  $10^{-6}M$ , donde tampoco se puede observar potenciación del efecto de adenosina por insulina. Además, se observa que las dos gráficas son similares, por lo que no hay prácticamente efecto por la toxina pertussis.

En curvas dosis-respuesta a adenosina, se observa en ratas control un claro efecto antilipolítico de adenosina, siendo éste mucho menor en adipocitos de ratas tratadas con la toxina (Fig. 4-7).

De estos últimos estudios surgió un dato muy interesante; en ratas controles el valor basal de ácidos grasos libres aumenta en presencia de adenosina deaminasa, por degradación de la adenosina endógena, y se esperaba que en adipocitos de ratas tratadas con la toxina no hubiese efecto pero sorprendentemente se encontró que el valor basal de ácidos grasos libres sin adenosina deaminasa (esto significa por acción de adenosina endógena) resultaba mucho mayor (1.7 veces) al valor

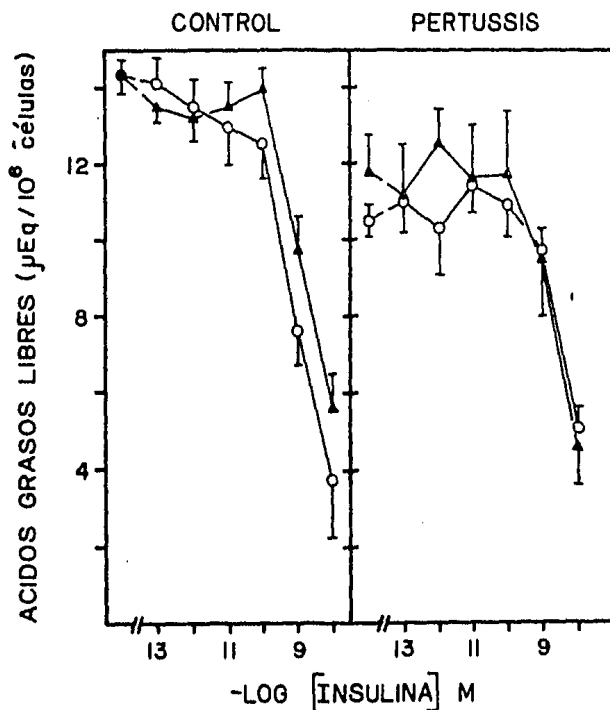


FIG. 4-6. EFECTO DE ADENOSINA E INSULINA SOBRE LA LIPOLISIS EN ADIPOCITOS DE RATAS CONTROL Y RATAS TRATADAS CON TOXINA PERTUSSIS.

Los adipocitos se incubaron 60 min. en presencia de adenosina deaminasa 0.5 µg/ml (○) o de adenosina 10<sup>-6</sup> M (▲). En ratas controles se estimuló la lipólisis con epinefrina 10<sup>-6</sup> M.

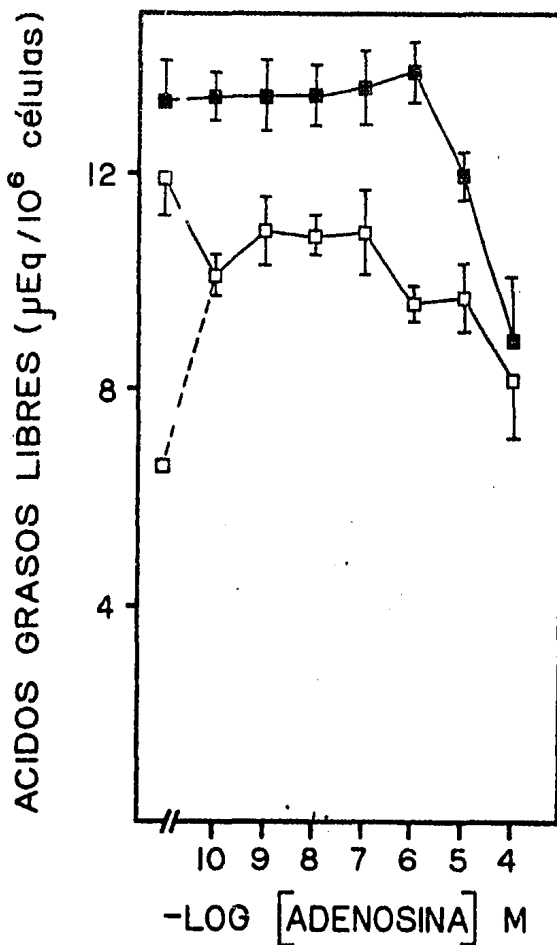


FIG. 4-7. EFECTO DE ADENOSINA SOBRE LA LIPOLISIS EN ADIPOCITOS DE RATAS CONTROL Y RATAS TRATADAS CON TOXINA PERTUSSIS.

Las células se incubaron por 60 min. siendo (■) adipocitos de ratas control y (□) adipocitos de ratas tratadas con toxina pertussis.

basal mas adenosina deaminasa; esto sugería que la adenosina en ratas tratadas pudiera estar teniendo una actividad estimuladora de la lipólisis, al contrario de su acción inhibitoria en ratas normales (Tabla 4-1).

Estos efectos de adenosina podían explicarse de dos maneras:

- i) una, que la activación de los receptores  $R_i$  de adenosina en los adipocitos de ratas tratadas con la toxina resultara en una estimulación de la adenilato ciclasa, probablemente por un acoplamiento con la subunidad  $N_s$  regulatoria al estar bloqueada  $N_i$ .
- ii) otra, el que hubiera receptores  $R_a$  para adenosina presentes en los adipocitos.

Se hicieron curvas dosis-respuesta con un análogo de adenosina,  $N^6$ -fenil isopropil adenosina (PIA), el cual tiene la ventaja de no ser hidrolizado por adenosina deaminasa, encontrándose que en células tratadas con la toxina, PIA estimula la lipólisis, siendo que en células normales ésta era inhibida por la misma PIA (Fig. 4-8).

Para investigar la primera posibilidad se probó la acción de prostaglandina  $E_2$  ( $PGE_2$ ), el cual es un agente inhibidor de la ciclasa y por lo tanto actúa a nivel de  $N_i$ .  $PGE_2$  resultó incapaz de estimular el efecto lipolítico que se observó con PIA en ratas tratadas con la toxina (Tabla 4-1).

La segunda posibilidad se investigó empleando un agonista selectivo para receptores  $R_a$  : 5'-N etil carboxamida adenosina (NECA), encontrándose que este agente también era capaz de estimular la lipólisis, y aun más, resultaba más potente

TABLA 4 - 1v

EFEECTO DE ADENOSINA DEAMINASA, PENID-ISOPROPIL ADENOSINA (PIA) Y PROSTAGLANDINA E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) SOBRE LA LIPOLISIS EN ADIPOCITOS DE RATAS CONTROL Y TRATADAS CON TOXINA PERTUSSIS.

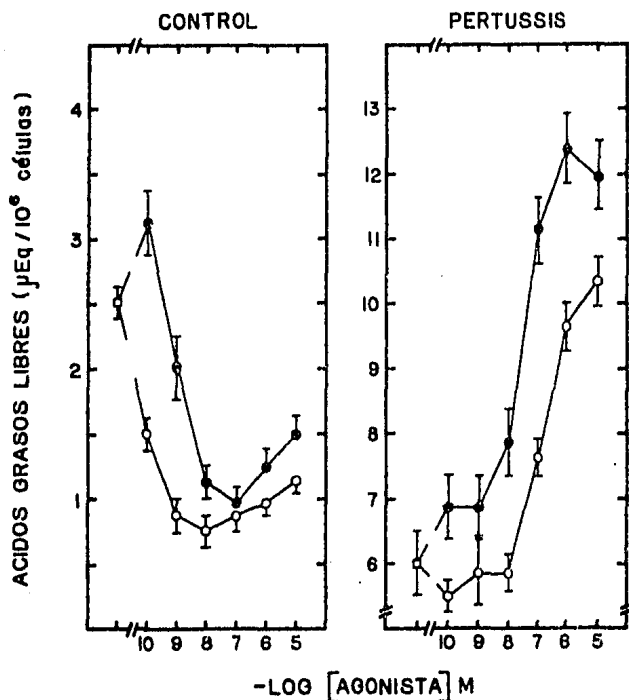
	Ac. grasos libres (uEq/10 <sup>6</sup> células)	
	Control	Pertussis
Basal	0.80 ± 0.05	10.30 ± 0.50
Adenosina Deaminasa (1 ug/ml)	2.60 ± 0.30	6.10 ± 0.40
Adenosina Deaminasa + PIA 1 μM	0.95 ± 0.10	9.70 ± 0.30
Adenosina Deaminasa + PGE <sub>2</sub> 10 μM	ND	6.50 ± 0.50

ND - no determinado.

Los adipocitos se incubaron por 60 min. bajo las condiciones descritas en Materiales y Métodos. Los resultados se expresan como la media ± E.S. de al menos 8 determinaciones usando diferentes preparaciones de células.

que PIA para activar la lipólisis. En células de ratas control, se observó que PIA era más potente que NECA para inhibir la lipólisis. (Fig. 4-8)

Resultados similares se obtuvieron al determinar los niveles de AMP cíclico en presencia de PIA y NECA (Fig. 4-9) ; en adipocitos de ratas tratadas con la toxina NECA y PIA resultaron capaces de estimular los niveles de AMP cíclico, siendo de igual modo NECA más potente que PIA. En ratas controles am



**FIG. 4-8. EFECTO DE AGONISTAS DE ADENOSINA SOBRE LA LIPOLISIS EN ADIPOCITOS DE RATAS CONTROL Y RATAS TRATADAS CON TOXINA PERTUSSIS.**

Los adipocitos se incubaron en presencia de adenosina desaminasa 1 µg/ml y diferentes concentraciones de PIA (○) o NECA (●).

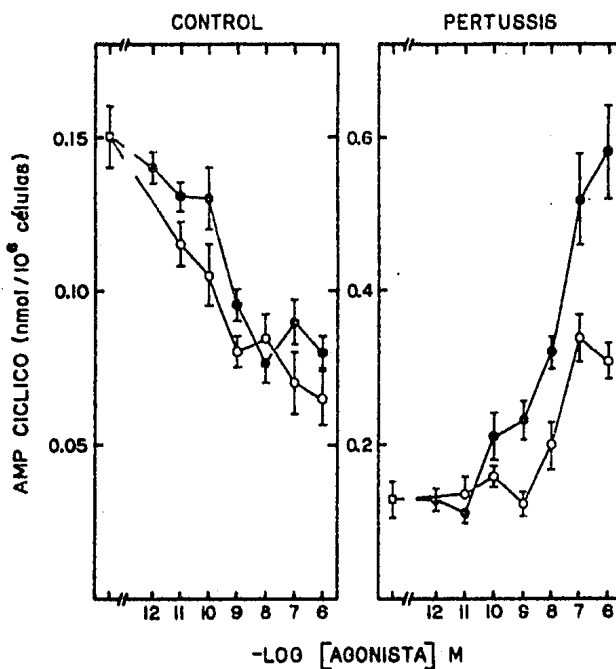


FIG. 4-9. EFECTO DE AGONISTAS DE ADENOSINA SOBRE LOS NIVELES DE AMP CÍCLICO EN ADIPOCITOS DE RATAS CONTROL Y RATAS TRATADAS CON TOXINA PERTUSSIS.

Los adipocitos se incubaron por 10 min. en presencia de adenosina deaminasa 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  a diferentes concentraciones de PIA (○) o NECA (●).

bos PIA y NECA fueron capaces de disminuir los niveles basales de AMP cíclico resultando PIA más potente que NECA para producir este efecto. De todos estos resultados se deduce la existencia de receptores  $R_a$  para adenosina en adipocitos.

Como control se hicieron curvas dosis-respuesta a PIA en presencia de Isoproterenol  $10^{-7}M$ , el cual es un agonista ( $\beta$  -adrenérgico que estimula a la adenilato ciclase, con la consiguiente elevación de AMP cíclico. Se observa que en adipocitos de ratas tratadas con toxina pertussis la estimulación es mayor que en adipocitos de ratas controles (Fig. 4-10) confirmando reportes anteriores. Además, en estas células se observa que PIA inhibe de manera dosis-dependiente la acumulación de AMP cíclico producida por isoproterenol, siendo este efecto bloqueado por la toxina pertussis.

Se evidenció la presencia de receptores  $P$  para adenosina por medio del agonista 2'5'-dideoxiadenosina (DDA), el cual es específico para este tipo de receptores; DDA disminuyó la acumulación de AMP cíclico (Fig. 4-11) producida por isoproterenol  $10^{-7}M$  tanto en células de ratas tratadas con ~~toxina~~ toxina pertussis como en células de ratas control evidenciando que la habilidad de DDA para inhibir a la adenilato ciclase no es afectada por la toxina pertussis.



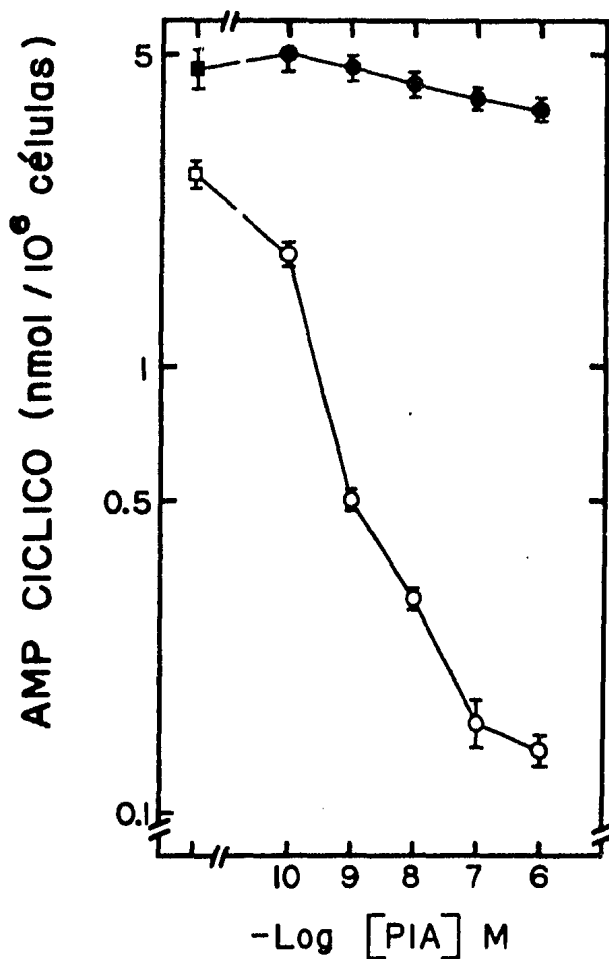


FIG. 4-10. EFECTO DE FENIL ISOPROPIL ADENOSINA (PIA) SOBRE LA ACUMULACION DE AMP CICLICO PRODUCIDA POR ISOPROTERENOL EN ADIPOCITOS DE RATAS CONTROL Y RATAS TRATADAS CON TOXINA PERTUSSIS.

Los adipocitos de ratas control (○) y de ratas tratadas con toxina pertussis (●) se incubaron 10 min. en presencia de adenosina deaminasa 1  $\mu\text{g/ml}$  e isoproterenol  $10^{-7}$  M.

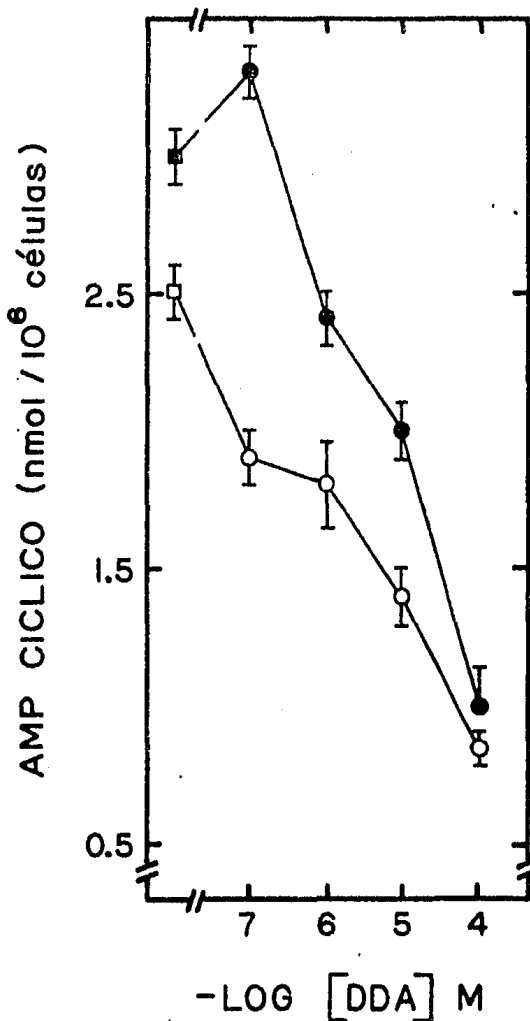


FIG. 4-11. EFECTO DE DIDEOXIADENOSINA (DDA) SOBRE LA ACUMULACION DE AMP CICLICO PRODUCIDA POR ISOPTERENOL EN ADIPOCITOS DE RATAS CONTROLES Y RATAS TRATADAS CON TOXINA PERTUSSIS.

Se incubaron los adipocitos de ratas control (○) y de ratas tratadas con toxina pertussis (●) por 10 min. en presencia de adenosina deaminasa 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  e isoproterenol  $10^{-7} \text{ M}$ , a diferentes concentraciones de DDA.

## 5. DISCUSION

De los tres parámetros en que se estudió el efecto de la toxina pertussis sobre la acción de insulina se observó que ésta modifica sólo de manera parcial los efectos de insulina. Tanto en la incorporación de glucosa a lípidos totales como en la oxidación de glucosa se observa una disminución discreta del efecto sin quedar abolido sin embargo. Esto es interesante ya que Aktories, Jakobs y colaboradores habían reportado que la acción antilipolítica de insulina era aumentada en células de ratas tratadas con la toxina pertussis (23). Nosotros observamos que el efecto de insulina está discretamente disminuído al medir directamente la lipólisis después del tratamiento con la toxina pertussis; la disminución de los efectos que observamos pudieran deberse a la falta de acción tónica inhibitoria de Ni, y por lo tanto la probable influencia que pudiera ejercer sobre la adenilato ciclase sería necesariamente a través de un mecanismo secundario de acción, y no por regulación inhibitoria de la ciclase.

El efecto de insulina es ligeramente modificado o aumentado por adenosina, aunque no se puede hablar claramente de una potenciación del efecto, ya que las gráficas parten de diferentes valores basales.

Se observa claramente que el efecto de adenosina sobre el metabolismo de lípidos es bloqueado por la toxina pertussis,

en la porción secundaria de la curva, pero queda un efecto de muy baja concentración de adenosina. Los valores basales en adipocitos de ratas tratadas con toxina pertussis tanto en incorporación de glucosa a lípidos totales, producción de  $\text{CO}_2$  (oxidación de glucosa) y lipólisis que corresponden al efecto de adenosina endógena son mayores a los valores encontrados cuando se quita esta adenosina endógena con adenosina deaminasa, por lo que, aunque se bloquea la acción inhibitoria de adenosina por la toxina, persiste otra acción "tónica", la cual probablemente esté mediada por los receptores  $R_a$  para adenosina, o bien, por acción metabólica.

La toxina pertussis desenmascara la presencia de otro receptor a adenosina en los adipocitos: el receptor  $R_a$ . De hecho, se observó que la toxina pertussis afecta de un modo distinto la acción de cada tipo de receptor:

- i) las acciones mediadas por  $R_a$  son magnificadas.
- ii) las acciones mediadas por  $R_i$  son inhibidas.
- iii) las acciones mediadas por P no son afectadas.

Se sabía de la presencia de receptores  $R_i$  y P en los adipocitos (13); con la toxina pertussis pueden diferenciarse claramente ya que al actuar está modificando covalentemente a  $N_i$ , quedando bloqueada la acción a través de  $R_i$ , el receptor P parece interaccionar directamente con la adenilato ciclasa sobre pasando a  $N_i$ , por lo que las acciones a través de este receptor no se modifican. Las acciones a través del receptor  $R_a$  no se hacen evidentes en células normales, tal vez debido a la predominancia de receptores  $R_i$  en ellas, sin embargo, al bloquear las acciones de  $R_i$  se hacen presentes los efectos mediados por  $R_a$ . De hecho, es posible que la toxina pertussis

provoque al mismo tiempo un aumento en las acciones de adenosina mediadas por los receptores Ra.

## 6. BIBLIOGRAFIA

1. A. Goodman Gilman, L.S. Goodman, A. Gilman. "Las bases farmacológicas de la terapéutica". 6a. edición. Ed. Médica Panamericana. México 1982. pp. 93-95; 1337-1340.
2. Thomas, Alexander, Williamson. Relationship between inositol polyphosphate production and the increase of cytosolic  $Ca^{2+}$  induced by Vasopressin in isolated hepatocytes. *J. Biol. Chem.* (1984) 259, 5574-5584.
3. García-Sáinz, Fain. Regulation of adipose tissue metabolism by catecholamines; roles of  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  and beta adrenoceptors. *TIPS* (1982) may, pp 1-3.
4. Rodbell. The role of hormone receptors and GTP-regulatory proteins in membrane transduction. *Nature* (1980) 284, 17-22.
5. Codina, Hildebrandt, Iyengar, Birnbaumer, Sekura, Manclark. Pertussis toxin substrate, the putative Ni component of adenylyl cyclases, is an  $\alpha\beta$  heterodimer regulated by guanine nucleotide and magnesium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1983) 80, 4276-4280.
6. Sekura, Fish, Manclark, Meade, Yan-ling Zhang. Pertussis toxin. Affinity purification of a new ADP-ribosyl transferase. *J. Biol. Chem.* (1983) 258, 23: 14647-14651.
7. Moss, Stanley, Burns, Hsia, Yost, Myers, Hewlett. Activation by thiol of the latent NAD-glycohydrolase and ADP

- ribosyl transferase activities of *Bordetella pertussis* toxin. (Islet activating protein). *J. Biol. Chem.* (1983) 258, 19: 11879-11882.
8. Kurose, Katada, Amano, Ui. Specific uncoupling by islet activating protein, pertussis toxin, of negative signal transduction via  $\alpha$ -adrenergic, cholinergic and opiate receptors in Neuroblastoma X Glioma hybrid cells. *J. Biol. Chem.* (1983) 258, 8 : 4870-4875.
  9. García-Sáinz, J.A. Decreased sensitivity to  $\alpha_2$  adrenergic amines, adenosine and prostaglandins in white fat cells from hamsters treated with pertussis vaccine. *FEBS Letters* (1981) 126, 2 : 306-308.
  10. Martínez-Olmedo, García-Sáinz. Effect of pertussis toxin on the hormonal regulation of cyclic AMP levels in hamster fat cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, (1983), 760 : 215-220.
  11. Murayama, Ui. Loss of the inhibitory function of the guanine nucleotide regulatory component of adenylate cyclase due to its ADP-ribosylation by islet-activating protein, pertussis toxin, in adipocyte membranes. *J. Biol. Chem.* (1983) 258, 5 : 3319-3325.
  12. Fox, Kelley. The role of adenosine and 2'-deoxyadenosine in mammalian cells. *Ann. Rev. Biochem.* (1978) 47: 655-686.
  13. Fain, Malbon. Regulation of adenylate cyclase by adenosine. *Molecular & Cellular Biochemistry* (1979) 25, 3 : 143 - 169.
  14. Dole, V.P. *J. Biol. Chem.* (1961) 236, 3125-3130.
  15. Londres, Cooper, Wolf. Subclasses of external adenosine receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1980) 77, 5: 2551 -2554.

16. Newsholme, Start. in "Regulation in Metabolism". John Wiley & Sons, England 1974. PP. 331-332.
17. Seals, Czech. Cellular dynamics of insulin action. Federation Proceedings 41, 11, Symposium (1982) sept.
18. Farese, Larson, Sabir. Insulin acutely increases phospholipids in the phosphatidate-inositide cycle in rat adipose tissue. J. Biol. Chem. (1982) 257, 8:4042-4045.
19. Zhang, Shi, Ho. Cyclic AMP-lowering mediator of insulin. Generation, quantitation and properties. J. Biol. Chem. (1983) 258, 10: 6471-6476.
20. Houslay, Heyworth. Insulin; in search of a mechanism. Trends in Biochemical Sciences. (1983) 8, 12: 449-452.
21. Joost, Steinfelder. Modulation of insulin sensitivity by adenosine. Effects on glucose transport, lipid synthesis and insulin receptors of the adipocyte. Molecular Pharmacology (1982) 22: 614-618.
22. Moreno, Mills, García-Sáinz, Fain. Effects of pertussis toxin treatment on the metabolism of rat adipocytes. J. Biol. Chem. (1983) 258, 18: 10938-10943.
23. Kather, Aktories, Schulz, Jakobs. Islet activating protein discriminates the antilipolytic mechanism of insulin from that of other antilipolytic compounds. FEBS Letters (1983) 161, 1: 149-152.
24. Joost, GÜke. Effects of islet-activating protein on insulin and isoprenaline stimulated glucose transport in isolated rat adipocytes. FEBS Letters (1984) 167, 1 : 5-9.
25. Rodbell, M. (1964) J. Biol. Chem. 239: 375-380.
26. M. Novák. Colorimetric ultramicro method for the deter



- mination of free fatty acids. *J. of Lipid research* (1965) 6: 431-433.
27. Gilman, A.G. A protein binding assay for adenosine 3'5'-cyclic monophosphate. *Proc. Nat. Acad. Sciences.* (1970) 67, 1: 305-312.
28. Villalobos Molina, García-Sáinz. Effects of pertussis vaccine on the lipid metabolism of hamsters. *Life Sciences* (1981) 29, 10: 1021-1026.

RAT FAT CELLS HAVE THREE TYPES OF ADENOSINE RECEPTORS  
(R<sub>a</sub>, R<sub>i</sub> and P). DIFFERENTIAL EFFECTS OF PERTUSSIS TOXIN<sup>\*</sup>.

J. Adolfo García-Sáinz

and

M. Luz Torner

Departamento de Bioenergética; Centro de Investigaciones en Fisiología  
Celular. Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-600;  
04510, México, D.F.

\* This research was partially supported by a Grant from Fondo de Estudios  
e Investigaciones "Ricardo J. Zevada".

**Running Title:**

**Fat cells, adenosine receptors and Pertussis toxin.**

## Summary

Activation of rat adipocyte Ri-adenosine receptors by phenyl-isopropyl-adenosine resulted in decreased cyclic AMP levels and lipolysis; this effect was blocked in cells from pertussis toxin-treated rats. In contrast, the ability of 2'5' dideoxy-adenosine to decrease cyclic AMP levels was not affected by pertussis toxin treatment.

Addition of adenosine deaminase to the medium in which adipocytes from control animals were incubated resulted in activation of lipolysis. Interestingly adipocytes from toxin-treated rats (which had an already increased basal lipolysis) responded in an opposite fashion to the addition of adenosine deaminase, i.e. the enzyme decreased lipolysis, which suggested that adenosine might be increasing lipolysis in these cells. Studies with the selective agonists N-ethyl-carboxamide-adenosine and phenyl-isopropyl-adenosine indicated that adenosine increases lipolysis and cyclic AMP accumulation in these cells and that these actions are mediated through Ra-adenosine receptors.

Adenosine-mediated accumulation of cyclic AMP was also observed in cells pre-incubated with pertussis toxin (2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) for 3 hours. In these studies N-ethyl-carboxamide-adenosine was also more effective than phenyl-isopropyl-adenosine. The data suggest that the toxin "unmask" the action of Ra-adenosine receptors. The action of these receptors is not observed in cells from control animals probably because of an enormous preponderance of the action of Ri-adenosine receptors.

Our results indicate that there are three types of adenosine receptors in fat cells whose actions are affected differently by

pertussis toxin, i.e. Ri-mediated actions are abolished, Ra-mediated actions are enhanced and P-mediated actions are not affected.

## INTRODUCTION

Dole (1) was the first to report that adenosine reduces the lipolytic effect of epinephrine in rat fat pads. Later on, many other groups confirmed his results and demonstrated that not only adenosine but also other related compounds (such as ATP, ADP, AMP, NAD, NADP, etc.) inhibited hormone-induced lipolysis in adipose tissue.

A second significant advance in our understanding of adenosine action of fat cells was the finding by Schwabe and coworkers that this nucleoside is continuously released by adipocytes into the incubation medium in amounts which inhibit cyclic AMP accumulation and lipolysis (2-4). This has been confirmed and extended by many other groups (5-8).

Another important achievement was the study of the pharmacology of adenosine action by Londos and coworkers (9-11). These authors observed, using different adenosine analogs, that there are three types of adenosine receptors: A) P-sites with strict structural specificity with respect to the purine moiety of the molecule; these sites mediate inhibition of adenylate cyclase and are putatively located on the intracellular face of the plasma membrane and B) two subclasses of external adenosine receptors which have structural specificity for the ribose moiety of the molecule (thus, termed "R"-sites); one of these subclasses of receptors mediates activation of adenylate cyclase (Ra), whereas the other mediates inhibition (Ri). These receptor subclasses have been discriminated using selective

adenosine agonists (9-11).

Current ideas indicate that only two of these three types of adenosine receptors (P and Ri sites), both of which mediate inhibition of adenylate cyclase, are present in fat cells (12,13). We have performed a systematic study of the actions of pertussis toxin on the effects of adenosine in fat cells and observed that pertussis toxin blocks the inhibition of cyclic AMP accumulation and lipolysis produced by phenyl-isopropyl-adenosine (PIA)<sup>1</sup> a selective Ri-agonist (14-16). This pertussis toxin-mediated reversal of the endogenous inhibition of lipolysis by adenosine has been suggested as an in vitro assay for the toxin (17-19). The inhibition of cyclic AMP accumulation in fat cells produced by DDA, a selective P-adenosine agonist, is not blocked by pertussis toxin (15). To our surprise, we observed some effects of adenosine on lipolysis and cyclic AMP accumulation that could not be explained on the basis of our previous findings; these results are here presented and clearly indicate that fat cells contain the three types of adenosine receptors and that their actions are affected differently by pertussis toxin.

#### MATERIALS AND METHODS

PIA was obtained from Boehringer Manheim, DDA from PL Biochemicals and NECA was a generous gift by Byk-Gulden Pharmazeutika. Adenosine deaminase and PGE<sub>2</sub> were from Sigma Chemical Co. Collagenase and bovine serum albumin (fraction V) were obtained from Worthington and Armour respectively. [<sup>3</sup>H]Cyclic AMP was from New England Nuclear. Pertussis toxin was purified from pertussis vaccine concentrates (generously

provided by the National Institutes of Hygiene of Mexico) as previously described (15,16) or by the method of Sekura et al (17). Both methods resulted in preparations with identical purity and potency but the later was simpler and faster.

Male Wistar rats fed ad libitum were used. Pertussis toxin (10 µg/100 g) was administered i.p. to the animals 3-6 days before the experiment was performed. Adipocytes were obtained by collagenase digestion of epididymal and perirenal fat pads (20). The pads were digested and the cells incubated in Krebs-Ringer-bicarbonate buffer supplemented with 3% bovine serum albumin, pH 7.4 at 37°C under an atmosphere of 95% O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub>. Incubations were in 1 ml of buffer at a cell density of  $\approx 2 \times 10^5$  cells/ml. The incubation were carried out for 10 minutes to determine cyclic AMP accumulation and for 60 minutes for free fatty acid release which was considered as an index of lipolysis, since under the conditions described (absence of glucose) no reesterification occurred (21). Cyclic AMP accumulation was determined by the method of Gilman (22) as modified by Brown et al (23). Free fatty acid were quantified by the method of Novak (24).

In the experiments presented in Fig. 5, isolated adipocytes were incubated for 3 hours in the absence or presence of pertussis toxin. After this pre-incubation the cells were washed and incubated for 10 min with the agents indicated to determine cyclic AMP accumulation.

## RESULTS

Stimulation of fat cells from control animals with  $10^{-7}$ M isoproterenol produced a significant accumulation of cyclic AMP (Fig. 1). Such stimulation was even bigger in cells from pertussis toxin-treated rats ( $p < 0.001$ , Fig. 1) confirming our previous

finding that pertussis toxin magnifies the action of agents that stimulate adenylate cyclase (15,16,25). PIA inhibited in a dose-dependent fashion the accumulation of cyclic AMP produced by  $10^{-7}$  M isoproterenol (Fig. 1). In contrast, nearly no decrease in the level of cyclic AMP was produced by PIA in cells from pertussis toxin-treated animals.

DDA significantly decreased the accumulation of cyclic AMP produced by beta-adrenergic activation in adipocytes from both control and pertussis toxin-treated animals (Fig. 2). Both the shape of the curve and the magnitude of the effect, indicated that the ability of DDA to inhibit adenylate cyclase is not affected by pertussis toxin (Fig. 2).

These data essentially confirm our previous findings (14-16,20). However, when lipolysis was studied, some surprising results were observed which are listed in Table 1. As expected, basal lipolysis was increased in cells from pertussis toxin-treated rats as compared to the controls (Table 1) putatively by blocking adenosine action through  $R_i$ -adenosine receptors. Removal of endogenous adenosine by addition of adenosine deaminase to the medium resulted in increased lipolysis in cells from control animals (Table 1) but to our surprise adenosine deaminase significantly decreased basal lipolysis in cells from toxin-treated rats (Table I). This result was particularly puzzling and was confirmed many times using different concentrations of adenosine deaminase and different lots of the enzyme. We finally accepted the evidence; removal of endogenous adenosine resulted in decreased basal lipolysis in these cells. Furthermore, addition of PIA (which, normally decreased the stimulation of lipolysis due to adenosine



deaminase (Table 1) stimulated lipolysis in cells from toxin-treated rats (Table 1).

Two possibilities were considered to explain these findings. Firstly, that activation of Ri-adenosine receptors in cells from toxin-treated rats could result in stimulation of adenylate cyclase activity and secondly, the presence of Ra-adenosine receptors in fat cells.

In order to evaluate the first possibility the action of other agents that inhibit adenylate cyclase in fat cells was studied.  $PGE_2$  is one of such agents. This agent was absolutely unable to mimic the lipolytic effect of PIA (Table 1).

In order to evaluate the possible existence of Ra-adenosine receptors in fat cells experiments with the selective Ra-agonist, NECA were performed. It was observed that in cells from control animals both PIA and NECA were able to decrease basal cyclic AMP levels (Fig.3). As expected PIA was more potent than NECA for this effect. In cells from toxin-treated rats both adenosine agonists produced dose-dependent increases of cyclic AMP levels (Fig. 3). Interestingly, NECA and PIA had similar potencies for this effect but NECA was significantly more effective than PIA, i.e. NECA increased cyclic AMP levels 4.7-fold whereas PIA only increased them 2.7-fold.

Similar contrasting results were observed when lipolysis was studied (Fig.4): both adenosine agonists inhibited lipolysis in cells from control animals whereas they stimulated lipolysis in cells from toxin-treated rats (Fig.4). PIA was more potent than NECA for inhibiting lipolysis whereas NECA was more potent and effective than PIA for activating lipolysis (Fig.4). All these results clearly indicate

the existence of Ra-adenosine receptors in fat cells from toxin-treated rats.

The effect was reproduced incubating isolated adipocytes with the toxin (2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  for 3 hours). Under these conditions the cells increased their cyclic AMP levels in response to adenosine analogs; NECA was significantly more effective than PIA (6-fold increase as compared to 2.9-fold increase) (Figure 5). It was observed that lipolysis was maximally stimulated by the toxin and no further stimulation was produced.

#### DISCUSSION

This paper is the first to show the presence of Ra-adenosine receptors in fat cells. The data are consistent with the present model for the actions of adenosine on adenylate cyclase activity; i.e. Ra receptors are linked to stimulation of adenylate cyclase and Ri and P receptors are linked to inhibition. Pertussis toxin affects differently the action of each type of receptor, i.e. Ra-mediated actions are magnified, Ri-mediated actions are inhibited and P-mediated actions are not affected. Pertussis toxin seems to exert its actions by ADP-ribosylation of  $\text{Ni}^2$  (27,28). This covalent modification of  $\text{Ni}$  blocks the actions of receptors that are coupled to adenylate cyclase through it, such as the Ri-adenosine receptors. The P-adenosine receptor seems to interact directly with the cyclase bypassing  $\text{Ni}$ ; thus its action is not affected by pertussis toxin. The enhanced action of receptors coupled activatorily to adenylate cyclase, such as the Ra-adenosine receptor is probably the result of an altered

interplay of the subunits of the guanine nucleotide regulatory proteins (Ni and Ns), induced by the covalent modification of Ni by pertussis toxin (29,30).

The action of adenosine through Ra-adenosine receptors is not evident under basal conditions probably because of an enormous predominance of Ri-adenosine receptors in the cells. However, blockage of Ni by pertussis toxin evidences the presence of Ra-adenosine receptors. It should be mentioned, however, that the accumulation of cyclic AMP produced by activation of Ra-adenosine receptors is rather small as compared to that produced by beta-adrenergic agents. This suggest that either the number of this type of receptors is relatively small or that their coupling is not very efficacious.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

We want to thank Drs. Garza and Villalva for the generous donation of pertussis vaccine concentrates, Dr. T. Dunwiddie for the gift of some substances and Mrs. Guadalupe Ramirez for carefully typing the manuscript.

## REFERENCES

- 1.- Dole, V.P. (1961) *J. Biol. Chem.* 236, 3125-3130.
- 2.- Schwabe, U., Ebert, R. and Erbler, H.C. (1973). *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 276, 133-148.
- 3.- Schwabe, U. and Ebert, R. (1974) *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 282, 33-44.
- 4.- Schwabe, U., Ebert, R. and Erbler, H.C. (1975) in *Advances in Cyclic Nucleotide Research* (Drummond, G.I., Greengard, P. and Robison, G.A. eds.) Vol. 5 pp 569-584. Raven Press, New York.
- 5.- Fain, J.N., Pointer, R.H. and Ward, W.F. (1972) *J. Biol. Chem.* 247, 6866-6872.
- 6.- Fain, J.N. (1979) *Biochim. Biophys. Acta* 573, 510-520.
- 7.- Turpin, B.P., Duckworth, W.C. and Solomon, S.S. (1977) *J. Clin. Invest.* 60, 442-448.
- 8.- Fredholm, B.B. and Hjemdahl, P. (1979) *Acta Physiol. Scand.* 105, 257-267.
- 9.- Londos, C. and Wolff, J. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71, 5482-5486.
- 10.- Londos, C., Cooper, D.M.F., Schlegel, W. and Rodbell, M. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 5362-5366.
- 11.- Londos, C., Cooper, D.M.F. and Wolff, J. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 2551-2554.
- 12.- Fain, J.N. and Malbon, C.C. (1979) *Mol. Cell. Biochem.* 25, 143-169.
- 13.- Fain, J.N. (1973) *Mol. Pharmacol* 9, 595-604.
- 14.- Garcia-Sáinz, J.A. (1981) *FEBS Lett.* 126, 306-308.

- 15.- Martfnez-Olmedo, M.A. and Garcfa-Sáinz, J.A. (1983) *Biochim. Biophys. Acta* 760, 215-220.
- 16.- Martfnez-Olmedo, M.A. and Garcfa-Sáinz, J.A. (1984) *Eur. J. Pharmacol* 99, 115-118.
- 17.- Sekura, R.D., Fish, F., Manclark, C.R., Meade, B. and Zhang, Y. L. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 14647-14651.
- 18.- Endoh, M., Soga, M. and Nakase, L. (1980) *Microbiol. Immunol.* 24, 887-890.
- 19.- Olansky, L., Myers, G.A., Pohl, S.L. and Hewlett, E.L. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 6547-6551.
- 20.- Rodbell, M. (1964) *J. Biol. Chem.* 239, 375-380.
- 21.- Vaughan, M. (1962) *J. Biol. Chem.* 237, 3354-3358.
- 22.- Gilman, A.G. (1970) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 67, 305-312.
- 23.- Brown, B.L., Albano, J.D.M., Elkins, P.R., Sgherzi, A.M. and Tampion, W. (1971) *Biochem. J.* 121, 561-562.
- 24.- Novak, M. (1965) *J. Lipid. Res.* 6, 431-433 (1965).
- 25.- Garcfa-Sáinz, J.A., Boyer, J.L., Michel, T., Sawyer, D., Stiles, G.L., Dohlman, H. and Lefkowitz, R.J. (1984) *FEBS Lett.* 172, 95-98.
- 26.- Rodbell, M. (1980) *Nature* 284, 17-22.
- 27.- Katada, T. and Ui, M. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 3129-3133.
- 28.- Malbon, C.C., Rapiiejko, P.J. and Garcfa-Sáinz, J.A. (1984) *FEBS Lett.* in press.
- 29.- Katada, T., Bokoch, G.M., Smigel, M.D., Ui, M. and Gilman, A.G. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 3586-3595.
- 30.- Rich, K.A., Codina, J., Floyd, G., Sekura, R., Hildebrandt, J.D. and Iyengar, R. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 7893-7901.

**Notes:**

1.- The abbreviations used are:

PIA, N<sup>6</sup>-phenyl-isopropyl-adenosine

DDA, 2'5' dideoxy-adenosine

NECA, 5'-N-Ethyl carboxamide-adenosine

PGE<sub>2</sub>, prostaglandin E<sub>2</sub>

2.- The terminology suggested by Rodbell (26) was used, i.e. Ni refers to the inhibitory guanine nucleotide regulatory protein whereas Ns refers to the stimulatory guanine nucleotide regulatory protein.

Figure 1.

EFFECT OF PHENYL-ISOPROPYL-ADENOSINE (PIA) ON THE CYCLIC AMP ACCUMULATION PRODUCED BY ISOPROTERENOL IN FAT CELLS FROM CONTROL AND PERTUSSIS TOXIN-TREATED RATS.

Adipocytes were incubated for 10 min in the presence of 1  $\mu\text{g/ml}$  of adenosine deaminase,  $10^{-7}\text{M}$  isoproterenol and different concentrations of PIA. Basal cyclic AMP levels in the absence of isoproterenol were  $0.15 \pm 0.01$  and  $0.13 \pm 0.01$  nmol/ $10^6$  cells in cells from control and pertussis toxin-treated rats, respectively. Control cells (open symbols) cells from toxin-treated rats (closed symbols). Results are the mean  $\pm$  S.E.M. of 8 determinations using different preparations in each case.

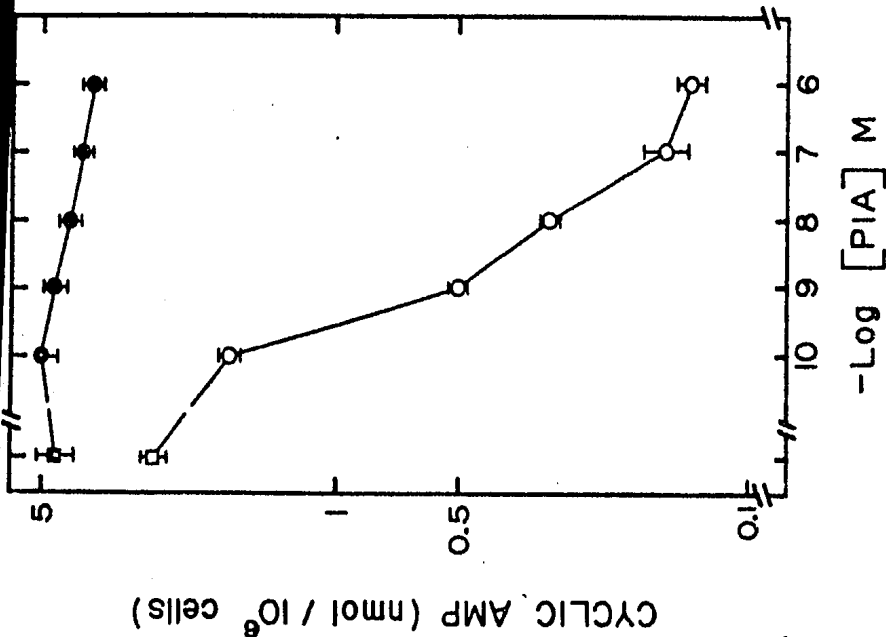


Figure 2.

EFFECT OF DIDEOXYADENOSINE (DDA) ON THE CYCLIC AMP ACCUMULATION PRODUCED BY ISOPROTERENOL IN FAT CELLS FROM CONTROL AND PERTUSSIS TOXIN-TREATED RATS.

Adipocytes were incubated for 10 min in the presence of 1  $\mu\text{g/ml}$  adenosine deaminase,  $10^{-7}$  M isoproterenol and different concentrations of DDA. Control cells (open symbols), cells from toxin-treated rats (closed symbols). Other indications as in Fig. 1.

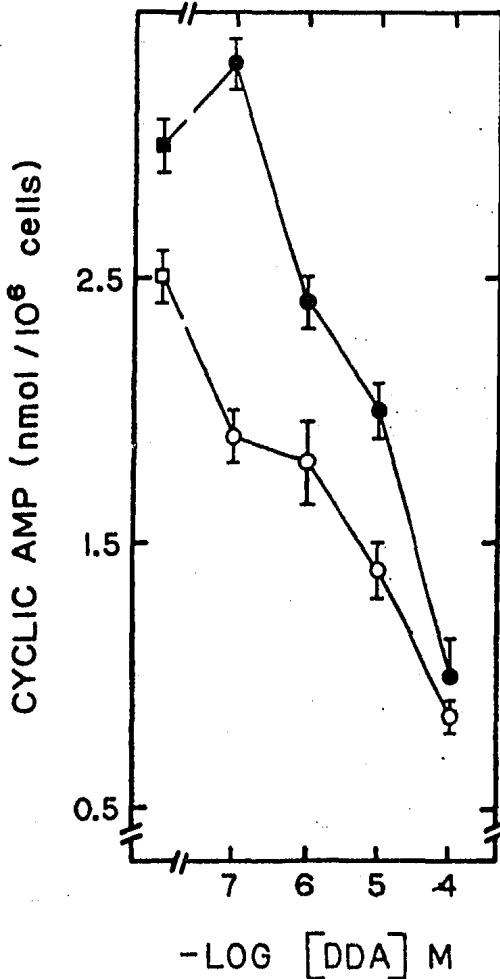




Figure 3.

EFFECT OF ADENOSINE AGONISTS ON CYCLIC AMP LEVELS IN FAT CELLS FROM CONTROL AND PERTUSSIS TOXIN-TREATED RATS.

Adipocytes were incubated for 10 min in the presence of 1  $\mu\text{g/ml}$  of adenosine deaminase and different concentrations of PIA (open circles) or NECA (closed circles). Other indications as in Fig. 1.

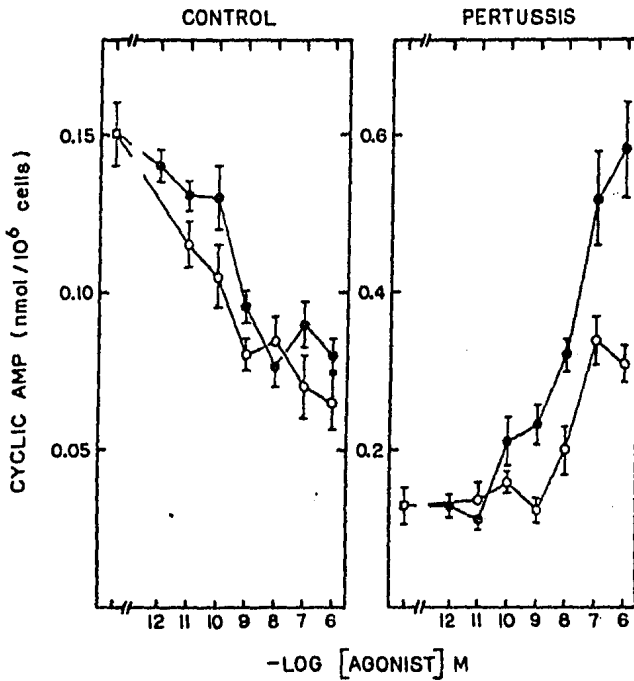


Figure 4.

EFFECT OF ADENOSINE AGONISTS ON FREE FATTY ACID RELEASE IN FAT CELLS FROM CONTROL AND PERTUSSIS TOXIN-TREATED RATS.

Adipocytes were incubated for 60 min in the presence of 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of adenosine deaminase and different concentrations of PIA (open circles) or NECA (closed circles). Basal values for free fatty acid release are presented in squares and in Table I. Other indications as in Fig. 1.

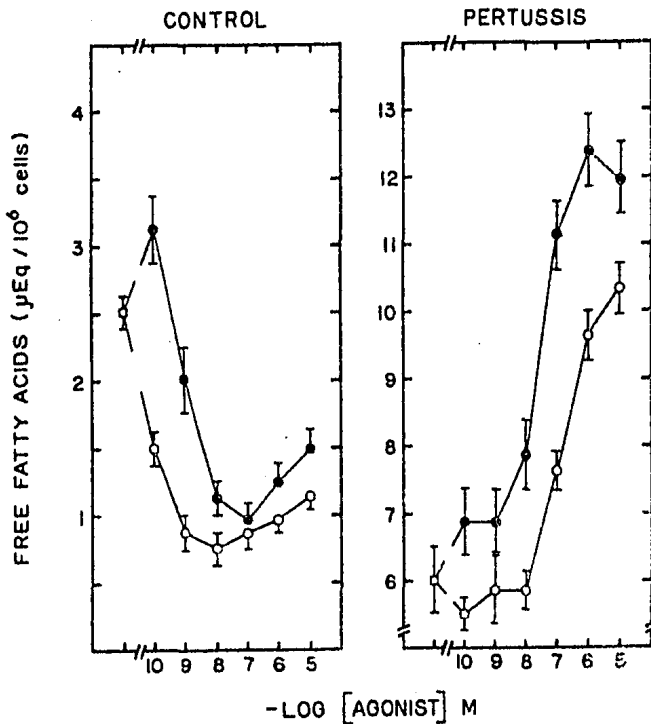


Figure 5.

EFFECT OF ADENOSINE AGONISTS ON CYCLIC AMP LEVELS IN FAT CELLS INCUBATED IN THE ABSENCE OR PRESENCE OF PERTUSSIS TOXIN.

Adipocytes were incubated in the absence or presence of pertussis toxin (2  $\mu\text{g/ml}$ ) for 3 hours. After this period, the cells were washed and incubated as indicated in Fig. 3. Other indications as in Fig. 1.

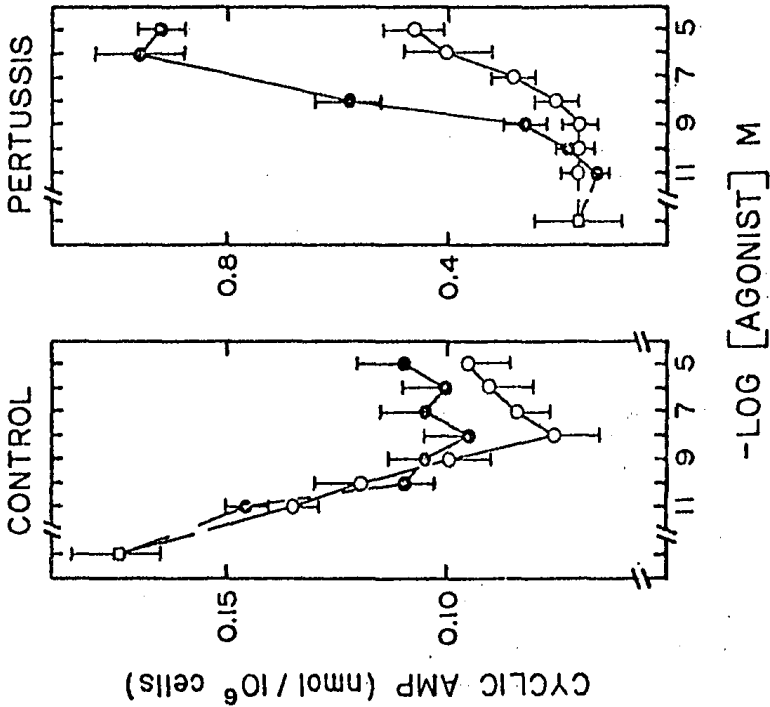


TABLE I.

EFFECT OF ADENOSINE DEAMINASE, PHENYL-ISOPROPYL-ADENOSINE (PIA) AND PROSTAGLANDIN E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) ON LIPOLYSIS IN FAT CELLS FROM CONTROL AND PERTUSSIS TOXIN-TREATED RATS.

Adipocytes were incubated for 60 min under the conditions described under Materials and Methods. Results are expressed as the means  $\pm$  S.E.M. of at least 8 determinations using different cell preparations.

	Free Fatty Acids ( $\mu$ Eq/10 <sup>6</sup> cells)	
	Control	Pertussis
Basal	0.80 $\pm$ 0.05	10.30 $\pm$ 0.50 <sup>a</sup>
Adenosine deaminase (1 $\mu$ g/ml)	2.60 $\pm$ 0.30 <sup>b</sup>	6.10 $\pm$ 0.40 <sup>b</sup>
Adenosine deaminase + PIA 1 $\mu$ M	0.95 $\pm$ 0.10 <sup>c</sup>	9.70 $\pm$ 0.30 <sup>c</sup>
Adenosine deaminase + PGE <sub>2</sub> 10 $\mu$ M	ND	6.50 $\pm$ 0.50

<sup>a</sup>p < 0.001 compared to basal controls

<sup>b</sup>p < 0.001 compared to its respective basal group

<sup>c</sup>p < 0.001 compared to its respective adenosine deaminase group

ND - not determined