

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

00562

3

2ei

Facultad de Química.

División de Estudios de Posgrado

ACCIONES Y MECANISMOS DE ACCION DE LA TOXINA PERTUSSIS

T E S I S

PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS QUIMICAS
(BIOQUIMICA)

PRESENTA EL Q.F.B.:

JOSE JUAREZ AYALA.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MEXICO

1988



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.

RESUMEN

"ACCIONES Y MECANISMOS DE ACCION DE LA TOXINA PERTUSSIS".

La presente tesis consta fundamentalmente de cuatro trabajos en los que se aborda el estudio de las acciones y los mecanismos de acción de la toxina pertussis.

1.- Previamente, se había reportado que la vacuna pertussis produce serias alteraciones en el metabolismo lipídico. En el presente estudio, demostramos que el principal componente responsable de estas alteraciones es la toxina pertussis, que causa hiperlipemia, cetosis e hígado graso.

2.- En el segundo estudio, demostramos que los ésteres de fórbol en tejido adiposo de hamster, no afectan el brazo inhibitorio de la enzima adenilato ciclasa como se ha descrito para plaquetas. Se realizó un estudio comparativo con la toxina pertussis.

3.- Posteriormente, estudiamos los efectos de los ésteres de fórbol sobre la respuesta hormonal en tejido adiposo de rata. El PMA es capaz de estimular la lipogénesis de una manera dependiente de la concentración, disminuye significativamente el efecto antilipolítico de la insulina, bloquea la activación de la respuesta alfa-1 adrenérgica, e incrementa el marcaje de la fosfatidilcolina y del ácido fosfatídico. Tampoco en este tejido el PMA bloquea el brazo inhibitorio de la enzima adenilato ciclasa como lo hace la toxina pertussis.

4.- Finalmente, empleando métodos sencillos obtuvimos una preparación acelular con una razonable purificación en el componente de toxina pertussis, la cual fue capaz de inducir protección en el ratón. Esta vacuna acelular, está constituida principalmente por toxina pertussis y hamaglutinina fibrosa.

ABSTRACT

"ACTIONS AND MECHANISMS OF ACTION OF THE PERTUSSIS TOXIN".

The present thesis, includes four separate manuscripts, aimed to study the actions and mechanisms of action of the pertussis toxin.

1.- It was previously reported that the administration of pertussis vaccine to hamsters markedly disturbs their lipid metabolism. In the present study we demonstrated that pertussis toxin induces fatty liver, hyperlipemia and ketosis.

2.- In this study, we demonstrated that the active phorbol ester in hamster adipocytes does not impair the inhibitory pathway of adenylate cyclase. The action of PMA was compared to the effect of pertussis toxin.

3.- Then, we studied effect of phorbol esteres on the hormonal responsiveness of isolated white fat cells. PMA was able to stimulate lipogenesis in a dose-depend fashion, it significantly diminished the antilipolytic effect of insulin and inhibited the alpha-1 adrenergic activation of phosphatidylinositol turnover. PMA was without significant effect on the labeling of phosphatidylinositol and phosphatidylethanolamine but increased the labeling phosphatidylcholine and its precursor phosphatidic acid.

4.- Finally, using simple methods, we obtained an acellular preparation with a reasonable purification of pertussis toxin, which was able to induce protection in the mice. This acellular vaccine is formed mainly by pertussis toxin and filamentous hemagglutinin.

INDICE

INTRODUCCION	1
CAPITULO I GENERALIDADES	5
1.-Toxinas producidas por la <u>Bordetella pertussis</u>	5
a) Toxina adenilato ciclasa	5
b) Aglutinógenos	6
c) Toxina dermonecrótica	7
d) Hemaglutinina filamentosa	7
e) Lipopolisacáridos y Componentes asociados	8
f) Citotoxina traqueal	9
2.- Sistema adenilato ciclasa y toxina pertussis	10
a) Receptores estimulatorios e inhibitorios	10
b) Componentes del Sistema adenilato ciclasa	11
c) Mecansimo de activación e inhibición	12
d) Mecanismo de acción molecular de la toxina pertussis.	15
e) Estructura de la toxina pertussis.	16
f) Toxina pertussis y su efecto sobre el estado de afinidad para agonistas	17
g) Efectos de la toxina pertussis sobre algunos tejidos.	19
h) Toxina pertussis como antígeno.	25
3.- Sistema fosfatidilinositol	28
a) Antecedentes.	28
b) Esteres de fórbol y Proteína cinasa-C	34
c) Componentes del Sistema Fosfatidilinositol	36

4.- Objetivos de la presente tesis.	37
CAPITULO II. MATERIAL Y METODOS	38
CAPITULO IIIa. RESULTADOS.	40
CAPITULO IIIb. RESUMEN DE LOS RESULTADOS	38
CAPITULO IV. DISCUSION Y CONCLUSIONES	45
CAPITULO V. BIBLIOGRAFIA	52

INTRODUCCION

El funcionamiento de los organismos multicelulares requiere por una parte, de mantener cierta constancia del medio interno, y por otra parte, de la adaptación al medio externo. Por lo tanto, el medio interno además de ser estable dentro de un límite tolerado por las células, deberá adaptarse a las variaciones del medio externo; para lo cual es fundamental que exista una amplia comunicación entre las diversas células que conforman al organismo como un todo.

La integración pluricelular depende de dos sistemas cuya organización es más compleja a medida que aumenta filogénicamente. El sistema nervioso, central y autónomo, es el responsable de una adaptación rápida y directa. Mientras que el sistema endocrino, proporciona un sistema de control más suave y continuo. Aunque los dos forman unidades en apariencia diferentes, comparten muchas características biológicas, y además están íntimamente relacionados entre sí. De tal manera, que una respuesta de adaptación puede involucrar en forma extensa a ambos sistemas.

El sistema endocrino, comprende a las glándulas que se encargan de producir a las hormonas, las cuales a través del sistema circulatorio, alcanzan su sitio de acción que puede ser distante; por ello actúan como mensajeros de la información de un grupo de células a otro, para beneficio de toda la unidad. Aparentemente, la esencia del sistema endocrino es diferente al sistema nervioso, pero en ambos lo común es que utilizan a las mismas sustancias químicas como mensajeros. En el primero, el

mensajero viaja por vía sanguínea, mientras que en el otro lo hace a través del espacio intersináptico, para finalmente interaccionar con sus receptores específicos que pueden estar localizados en la superficie de la membrana plasmática o en el interior de la célula.

Recientemente, la relación que existe entre los dos sistemas de comunicación se ha hecho más aparente, debido a que hay evidencias en el sentido de que varios de los mensajeros empleados por un sistema, también son utilizados por el otro. Este hecho constituye el punto clave de contacto más íntimo entre los dos sistemas de integración, generándose con ello el sistema neuroendocrino.

La manera como se regulan estos sistemas es a través de mecanismos dinámicos de retroalimentación positiva y negativa. Existen evidencias de que estos sistemas de regulación pueden ser alterados seriamente por las toxinas producidas por un gran número de organismos procariontes. En la actualidad, se conocen algunas de las acciones y los mecanismos de acción de estas toxinas. Pero es de vital importancia, profundizar más en este campo por varias razones. En primer término, porque hay situaciones en que está claramente demostrado que las toxinas son las principales responsables en producir los síntomas y se involucran en la patogénesis de algunas enfermedades; esto plantea la posibilidad de prevenir o disminuir el riesgo de contraer la enfermedad mediante una vacunación oportuna con la toxina, en forma de toxoide. En segundo término, varias de estas toxinas bacterianas son importantes porque son herramientas muy poderosas en la investigación de la regulación de las señales

transmembranales en células animales.

Estas toxinas por lo general, son compuestos proteicos que presentan pesos moleculares elevados y algunas de ellas se pueden clasificar como toxinas del tipo A-B. Donde es frecuente encontrar un fragmento B con capacidad de reconocer a receptores específicos sobre la célula blanco, que es un paso fundamental para que el fragmento A o activo pueda lograr la penetración hacia el interior de la célula.

Existe además otro tipo de toxinas, las cuales para generar el daño celular tienen su punto de acción a nivel de la membrana plasmática. El mecanismo de acción para estas toxinas parece que radica en su capacidad de producir canales que alteran de manera significativa la continuidad de la membrana plasmática, y con ello el medio interno celular. Mientras que, otras toxinas alteran el funcionamiento de los canales iónicos naturales de las células.

La toxina del cólera, las enterotoxinas termolábiles bacterianas y la toxina pertussis, son capaces de modificar covalentemente a las proteínas acopladoras que unen nucleótidos de guanina del sistema adenilato ciclasa, como son G_{12} y G_{11} , respectivamente. La modificación covalente consiste en una ADP-ribosilación de residuos de arginina y cisteína presentes en estas proteínas regulatorias. La acción conjunta de dichas toxinas tiene un efecto sinérgico sobre la estimulación máxima de la adenilato ciclasa.

Con respecto a la toxina diftérica, esta es capaz de inhibir la síntesis de proteínas en células eucariotas, debido

e que altera de manera significativa la acción del factor de elongación 2 (eEF-2), (otra proteína N) por medio de una modificación covalente, tratándose también de una ADP-ribosilación.

Una de las toxinas producida por las shigellas, también inhibe la síntesis de proteínas afectando a la subunidad ribosomal 60S, la inactivación es aparentemente enzimática, pero aún se desconoce que parte de la subunidad se modifica.

Finalmente, entre las toxinas que producen daño membranar están principalmente las neurotoxinas, y entre otras, a las toxinas producidas por los géneros Staphylococcus, Pneumococcus.

CAPITULO I GENERALIDADES

Características más sobresalientes de las toxinas producidas por la Bordetella pertussis:

Toxina adenilato ciclasa.

Algunas especies de Bordetella producen una enzima adenilato ciclasa con propiedades nuevas. Es liberada por la bacteria al medio de cultivo durante la fase de crecimiento exponencial (1,2,3,) y su actividad se ve aumentada 1000-veces por una proteína de eucariotes que une calcio, denominada calmodulina (4). Se sabe además que esta enzima es capaz de penetrar en las células de eucariotes, y una vez dentro cataliza la conversión de ATP a AMPc (3,5-9). Se han identificado al menos dos formas de esta enzima de Bordetella pertussis (3,7,9). La primera, llamada enzima adenilato ciclasa, presenta solo actividad de adenilato ciclasa, lo cual se puede cuantificar in vitro, y no tiene efecto sobre células eucariotes. La segunda, es la toxina adenilato ciclasa y esta posee tanto actividad enzimática como la capacidad de penetrar a las células eucariotes. Esta enzima fue purificada originalmente a partir del sobrenadante del medio de cultivo, encontrándose que tiene un peso molecular de aproximadamente 70 Kdaltones (Kd) (2).

A pesar de que los estudios bioquímicos indican que la enzima adenilato ciclasa y la toxina existen en formas diferentes, los datos genéticos sugieren un origen común. Varios de los mutantes Tn5 inicialmente identificados como no-hemolíticos, también se encontraron deficientes en la actividad tanto de la enzima adenilato ciclasa como de la toxina

(2,10,11,); quedando solo por demostrar, la relación del producto precursor de las dos formas.

Aglutinógenos

El sistema de serotipos para Bordetella pertussis mejor conocido y más ampliamente empleado es el desarrollado por Eidering et al (12) a fines de la década de los cincuenta. El suero tipo específico se preparó por inmunización de conejos con tres cepas heterólogas (12). Los aglutinógenos se definieron serológica y operacionalmente como los determinantes de superficie que levantan anticuerpos y que son capaces de aglutinar a la bacteria completa. Con el fin de fungir como aglutinógenos, tales antígenos deben estar unidos a la superficie para que el anticuerpo divalente entrecruce a dos bacterias. Por esta razón, la bacteria debe ser serológicamente positiva (que posea el antígeno sobre la superficie) pero aglutinación negativa. Es importante tener presente que los anticuerpos contra la toxina pertussis y la hemaglutinina filamentososa (FHA) son componentes de superficie, no aglutinan a la bacteria (13), quizá debido a que estos antígenos están laxamente unidos a la superficie o están presentes en cantidades muy bajas.

Los seis serotipos definidos por Eidering, fueron reevaluados por Preston et al en 1982 (14). Ellos concluyen que los serotipos 1, 2 y 3 son los principales aglutinógenos de la Bordetella pertussis. Mientras que 4, 5 y 6 los clasifican como menores, debido a que cada uno de ellos presentó una respuesta débil.

Algunos de los serotipos antígenos o aglutinógenos ya han sido identificados. El aglutinógeno 2 es de origen fimbrial con subunidades de 22 Kd (12,15-17). El antisuero para la proteína purificada, aglutina únicamente a cepas con serotipo 2 antígeno. Los antisueros no reaccionan con una hemaglutinina filamentososa y los antígenos fimbriales no causan hemaglutinación (17).

Toxina dermonecrotica.

La toxina dermonecrotica de Bordetella pertussis conocida tambien como termolábil, letal para el ratón, causa lesiones necroticas cuando es inyectada subcutáneamente a dosis bajas y letal cuando es a dosis altas (18). Se tienen evidencias de que se encuentra localizada en el citoplasma del organismo (20), datos recientes indican que alguna porción de la toxina está expuesta a la superficie (19). Nakase y Endoh (21) purificaron a la toxina y demostraron que tiene un peso molecular de 102 Kd, con subunidades de 30 y 24 Kd. Esta preparación es capaz de producir vasoconstricción en vasos sanguíneos periféricos expuestos quirúrgicamente, seguidos por una isquemia local, diapedesis de leucocitos y hemorragia petequiral. En un sistema diferente de ensayo, la toxina inhibe la actividad de la ATPasa de sodio-potasio, encintrándose que la cinética de esta enzima no es el blanco principal para esta toxina.

Hemaglutinina filamentososa

Esta es una proteína fibrosa que ha sido purificada en varios laboratorios (22,23). Se llama así por su capacidad de aglutinar

a eritrocitos de diversas especies; esta actividad se caracteriza por la sensibilidad a ser inhibida por el colesterol (23). El material purificado a menudo presenta varias bandas en electroforesis en gel de poliacrilamida con lauril sulfato de sodio (SDS-PAGE), y la mayoría de las bandas son reconocidas por medio de anticuerpos monoclonales contra esta proteína (22). Para la hemaglutinina filamentosa no se han demostrado aún actividades de toxina.

Lipopolisacáridos y componentes asociados.

El lipopolisacárido de Bordetella pertussis posee nuevas características estructurales y funcionales que lo hacen distintivo de la endotoxina de otros organismos gram-negativos. Está formado por dos diferentes lípidos, el lípido A y el X; y dos cadenas distintas de oligosacáridos (tipo I y II) que contienen de 12-14 unidades de monosacáridos cada una (24,25). Varios grupos han demostrado que Bordetella pertussis tiene dos lipopolisacáridos inmunológicamente diferentes (24,26). Las dos formas no cambian con variaciones de fase o modulación fenotípica (27).

El polisacárido intacto de Bordetella pertussis tiene actividades similares a las endotoxinas de otros organismos gram-negativos; por ejemplo su pirogenicidad. Es comparable con la toxina de Salmonella y todo parece indicar que también promueve la hipersensibilidad a histamina (28). Es poco común en su capacidad de inducir resistencia no-específica a infecciones virales en ratones normales y atímicos (29), pero no los protege de la endotoxina (30); siendo ésta la razón atribuible de sus

nuevas propiedades. La fracción del lípido X posee la clásica actividad de endotoxina, pero el lípido A tiene poca pirogenicidad y toxicidad (21). El lípido A por otro lado, tiene actividades antivirales y de potente adyuvante. La fracción oligosacárida es mitogénica para los linfocitos de ratón, incluyendo la cepa O3H/hof que es resistente a la endotoxina (22); es además un activador polifuncional de los esplenocitos de conejo (23); y estimula la secreción de interleucina-1 en monocitos humanos (24). Otro componente de la Bordetella pertussis con actividad poco común es un lípido que contiene ornitina, descrito recientemente. La molécula intacta tiene propiedades de hemaglutinación, pero desprendiendo la porción del ácido hexadecanoico del lípido, pierde esta actividad (25,26). La forma modificada, es sin embargo hemolítica. Esta actividad de Bordetella pertussis jamás se había caracterizado bioquímicamente, es posible que esta nueva molécula sea la responsable de tal efecto biológico.

Citotoxina traquesal.

La citotoxina traquesal es un péptido pequeño descrito y aislado por Goldman y colaboradores (27). Su composición de aminoácidos indica que puede ser un derivado de la molécula de peptidoglicano bacteriano, y que lo producen tanto las cepas virulentas como las avirulentas (28). La toxina es específicamente tóxica para las células ciliadas; aparentemente inhibe la síntesis del ADN, pero su mecanismo molecular de acción y la base para la especificidad de sus células blanco aún se desconocen (29).

SISTEMA ADENILATO CICLASA Y TOXINA PERTUSSIS

La estimulación de los receptores para hormonas, neurotransmisores y factores de crecimiento es fundamental para que se haga presente la respuesta celular a un estímulo externo. De este último, existe gran variedad de señales y solo en número limitado están presentes los segundos mensajeros dentro de la célula. El AMP cíclico fue el primero de los segundos mensajeros en ser descrito (29) y pertenece al sistema adenilato ciclasa.

A la fecha se conocen gran número de receptores que afectan la formación del AMPc, los cuales se clasifican dentro de dos subtipos: Los receptores R_s , que incrementan la concentración del nucleótido cíclico, debido a que estimulan a la enzima adenilato ciclasa, y los receptores R_i que disminuyen la concentración del AMPc inhibiendo a esta enzima.

Los receptores para catecolaminas del tipo beta-1 y beta-2, para la hormona adrenocorticotrópica, el glucagón, la secretina, la hormona luteinizante, la hormona foliculo estimulante y la hormona estimulante de la tiroides son del tipo R_s . Mientras que los receptores para las catecolaminas del tipo alfa-2, para la acetilcolina del tipo muscarínico (M), para los péptidos opiáceos y la somatostatina son del tipo R_i .

Este sistema está constituido principalmente por cinco componentes, representados esquemáticamente en la figura No. 1, y son los siguientes: los receptores estimulatorios (R_s), los receptores inhibitorios (R_i), las proteínas acopladoras estimulatorias que unen GTP (N_s), proteínas reguladoras inhibitorias que unen GTP (N_i) y el componente catalítico de la enzima adenilato ciclasa.

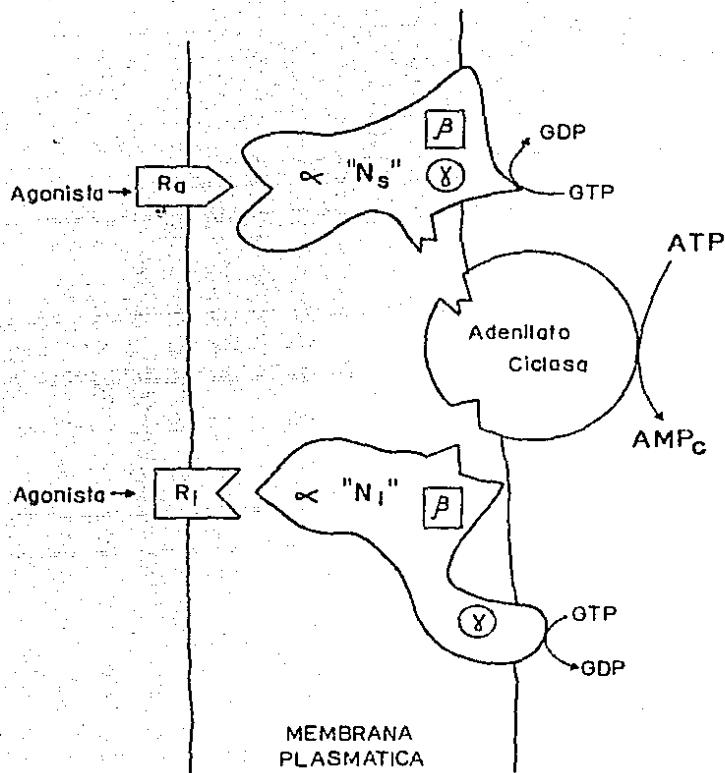


FIGURA No. 1. SISTEMA DE LA ADENILATO CICLASA.

Los componentes del sistema están designados como: Ra, receptor activatorio; Ri, receptor inhibitorio; Ns, proteína reguladora dependiente de nucleótidos de guanina que participa en la estimulación de la adenilato ciclasa; Ni, proteína reguladora dependiente de nucleótidos de guanina que participa en la inhibición de la adenilato ciclasa.

Las dos proteínas que unen GTP (Ns y Ni) son las responsables del acoplamiento entre el receptor activado y la regulación de la adenilato ciclasa (40,41).

Ambas proteínas, son heterotrímeros formados por las subunidades alfa, beta y gamma (42-44). Las subunidades alfa de Ns y Ni que unen nucleótidos de guanina, difieren en estructura (42,45,46); Ni-alfa tiene un peso molecular de 41,000 daltones, mientras que para Ns-alfa se han reportado valores de 42-45,000 y de 47-52,000 daltones (42,45,46).

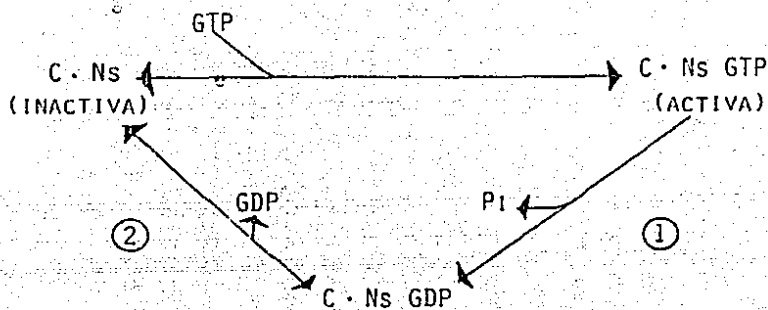
La activación de la adenilato ciclasa por la proteína Ns parece que requiere la disociación del complejo inactivo a Ns-alfa y N-beta-gamma (42,46); Ns-alfa en presencia de GTP o algún análogo no hidrolizable activa a la unidad catalítica (42,46). La inactivación de Ns-alfa viene acompañada con la hidrólisis del GTP y la reasociación de Ns-GDP con N-beta-gamma, para dar como resultado la especie inactiva (42,46-49). Los agonistas estimulatorios como el isoproterenol aceleran la liberación del GDP de las especies inactivas, por lo tanto, favorecen la unión del GTP (49,50). Por aumentar la formación del Ns-alfa-GTP, estos agentes aceleran la hidrólisis del GTP por la proteína Ns, la cual posee actividad intrínseca de GTPasa.

La activación de la adenilato ciclasa por la ADP-ribosilación de la proteína Ns catalizada por la toxina del cólera, resulta principalmente de dos efectos. El primero, la velocidad de hidrólisis del GTP por Ns-alfa ADP-ribosilada está disminuida, prolongando de este manera la vida de las especies activas de Ns-alfa-GTP (51). Segundo, la velocidad de liberación del GDP a partir de Ns-alfa-GDP está aumentada (52,53). Ver la

figura No. 2.

Por otra parte, la interacción de agonistas inhibitorios con sus receptores específicos da por resultado la activación de Ni, que consiste en la disociación de Ni-alfa y N-beta-gamma. Este último es el complejo que tanto Ni como Ns comparten en común (42,44,54,55). Se piensa que la inhibición de la unidad catalítica es el resultado de la combinación de dos mecanismos (42,55-57). El primero, la disociación de Ni aumenta las reservas de N-beta-gamma, por lo tanto, aumenta la asociación de este compuesto con la especie activa Ns-alfa, para dar la especie inactiva (42,55,56). Un segundo mecanismo está basado sobre datos que demuestran que la inhibición hormonal ocurre en membranas obtenidas de la línea celular de linfoma carentes de la Ns (56,57). Debido a que en esta línea celular la inhibición, vía la asociación de N-beta-gamma con Ns no es posible, se propuso que la supresión de la actividad catalítica haya resultado del efecto directo de Ni-alfa sobre la unidad catalítica de la adenilato ciclasa. De manera similar con Ns o brazo estimulador de la adenilato ciclasa, la forma Ni-alfa-GDP para pasar a su forma activa requiere de la liberación del GDP y la unión del GTP. De tal forma, que los agonistas inhibitorios estimulan específicamente la liberación del guanil-nucleótido unido y dejan disponible el sitio para que sea ocupado por el GTP (58-61).

La subunidad Ni es sensible a la toxina pertussis, esta última como ya se mencionó anteriormente es un producto de secreción de la *Bordetella pertussis*; se trata de una proteína oligomérica de peso molecular 117 kd, compuesta por cinco

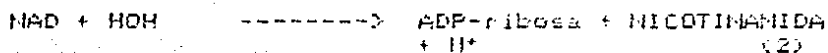
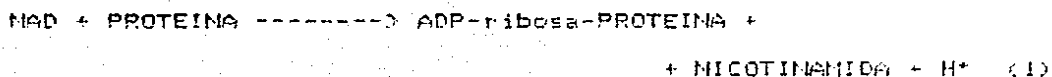


- ① LA INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE GTPASA PROLONGARÍA LA VIDA MEDIA DEL COMPLEJO ACTIVO.
- ② LA LIBERACIÓN ACELERADA DEL GDP FAVORECERÍA LA UNIÓN DEL GTP Y LA GENERACIÓN DEL COMPLEJO ACTIVO.

Figura No. 2. ACTIVACION DE LA ENZIMA ADENILATO CICLASA POR LA TOXINA DEL COLERA. La definición para Ns y C se muestra en la figura No. 1. La reacción No. 1: es la hidrólisis del GTP unido al complejo C-Ns para producir C-Ns-GDP. La reacción No. 2: es la liberación del GDP a partir del complejo C-Ns-GDP para dar C-Ns. Se cree que la toxina del cólera activa a Ns porque estabiliza y a la vez favorece la formación del complejo Ns-GTP.

subunidades diferentes con los siguientes pesos moleculares: subunidad 1 ó S-1 (29 Kd), S-2 (23 Kd), S-3 (22 Kd), S-4 (11.7 Kd) y S-5 (9.3 Kd). Esta proteína hexamérica presenta la estequiometría de 1:1:1:2:1, como se muestra en la figura No.3

En los estudios de reconstitución hechos por Tamura y colaboradores (62), se observó que la toxina pertussis es del tipo de las toxinas clasificadas como A-B. Donde el protomero activo corresponde al compuesto de peso molecular más alto o sea la subunidad-1. Esta subunidad cataliza la transferencia de ADP-ribosa de la molécula del NAD a un residuo crítico de asparagina o cisteína en la molécula de Ni-alfa, produciendo la inactivación (Reacción No. 1) (63-65,71). En ausencia de un aceptor proteico para la ADP-ribosa, la toxina cataliza la hidrólisis del NAD a ADP-ribosa y nicotinamida (Reacción No. 2).



Con respecto al componente B de la toxina pertussis, hasta el momento se desconoce el mecanismo de fijación y los componentes moleculares que reconocen a este compuesto. Vale la pena mencionar que el fragmento B tiene algunas acciones biológicas como son: estimular la división celular en linfocitos y aumentar la oxidación de la glucosa en adipocitos (72). Estas acciones del fragmento B aparentemente se deben a la interacción con elementos de la superficie plasmática de las células.

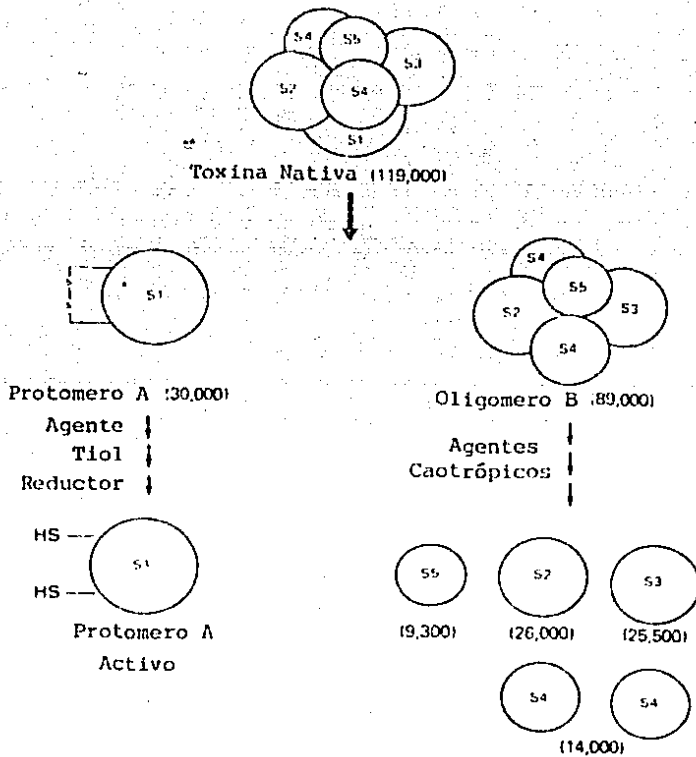


Figura No. 3. REPRESENTACION ESQUEMATICA DE LAS SUBUNIDADES ESTRUCTURALES QUE CONFORMAN A LA TOXINA PERTUSSIS.

La toxina pertussis en su forma nativa está conformada por cuatro o quizá cinco subunidades heterogéneas. El tratamiento de la toxina con agentes desnaturalizantes da por resultado una completa disociación de ésta, pudiendo observarse a sus componetes que constituyen al protomero A y B.

A diferencia de las acciones mediadas por el fragmento A, las que se deben al fragmento B no requieren de un período de latencia y hasta donde sabemos, no involucran la modificación covalente de componentes membranales.

Además de las funciones regulatorias de las proteínas N_{α} y N_{β} sobre la modulación de la actividad de la adenilato ciclasa (40,41). Existen evidencias claras que indican, que la interacción de los receptores con estas proteínas regulatorias dan lugar a la formación del complejo receptor-N. Este complejo presenta un aumento significativo en la afinidad del receptor por el agonista, generándose de esta manera, la posibilidad de encontrar a los receptores (para los neurotransmisores, los autacoides y las hormonas) en dos estados extremos de afinidad para agonistas; por ejemplo, para alta afinidad (Ra) y baja afinidad (Rb), habiendo interconversión entre ambos estados. Explicándose ésta así, el receptor aislado se encuentra en estado de baja afinidad (Rb), pero al asociarse con el complejo Ni-GDP pasa al de alta afinidad Ra-Ni-GDP. La acción del agonista (H) estimula el recambio GDP-GTP a nivel de Ni, que resulta en una disociación de la unión entre el receptor y la proteína Ni; pasa por lo tanto el receptor a su forma libre o de baja afinidad (Rb) y la proteína Ni a su forma activa o sea Ni-GTP, capaz de inhibir a la subunidad catalítica de la adenilato ciclasa. Esta forma activa de Ni pasa a la forma inactiva (Ni-GDP) al realizarse la hidrólisis del GTP unido (Por la actividad intrínseca de GTPasa que tiene Ni) (72). Ver la figura No. 4.

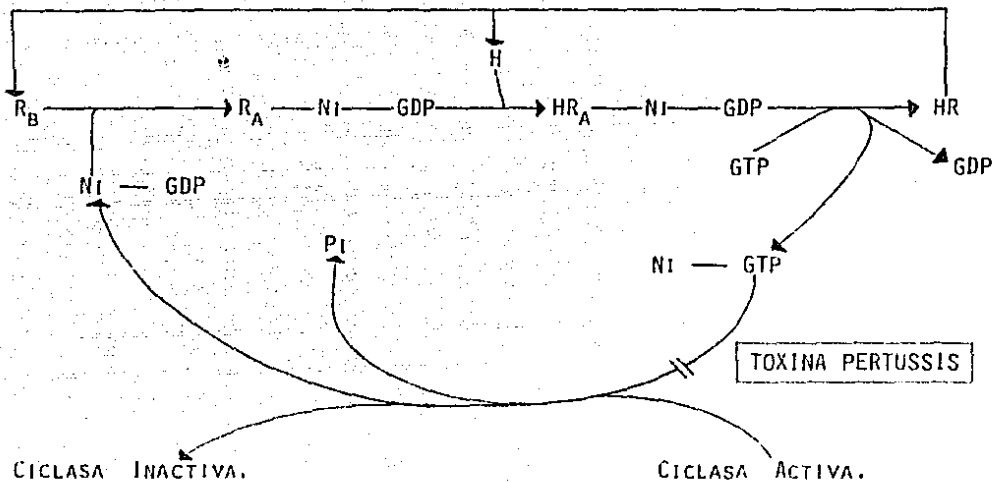


Figura No. 4. REPRESENTACION ESQUEMATICA DE LA ACCION DE LA TOXINA PERTUSSIS SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA ADENILATO CICLASA. H, hormona; Ni, proteína reguladora dependiente de nucleótidos de guanina que participa en la inhibición de la adenilato ciclasa; R, receptor; R_A, configuración de alta afinidad para agonistas; R_B, configuración de baja afinidad para agonistas.

En presencia de la toxina pertussis la interconvertibilidad entre los dos estados de afinidad para agonistas, se ve seriamente afectado, quedando el equilibrio desplazado hacia la formación del estado de baja afinidad (74-79). El modelo cinético presentado en la figura No. 4, sugiere que lo que hace la toxina pertussis al ADP-ribosilar a la Ni-alfa, es impedir la interacción de Ni-GTP (forma activa) con la subunidad catalítica de la adenilato ciclasa; dejando a la Ni en su forma activa, pero incapaz de ejercer su acción inhibitoria.

Efecto de la toxina pertussis sobre algunos tejidos.

Como se mencionó anteriormente, uno de los nombres con que se conoció a la toxina pertussis es el de IAP (Islet Activating Protein) o proteína activadora de los islotes pancreáticos. La administración de la toxina pertussis produce un incremento en la respuesta a los agentes que estimulan la secreción de insulina y un bloqueo en la acción de los agentes que la inhiben; ello resulta en hiperinsulinismo e hipoglucemia (80-82).

En tejido adiposo se abaten, igualmente, las acciones de los agentes que inhiben la lipólisis al inhibir a la adenilato ciclasa y se incrementan las acciones de las hormonas lipolíticas (83-86, 143).

La administración de dosis tan pequeñas como un μg por cada 100 g de peso en el hamster, dió por resultado el bloqueo de la inhibición de la adenilato ciclasa en los adipocitos, por los agentes que actúan a través de procesos dependientes de GTP acoplados al receptor, tales como las aminas alfa-2 adrenérgicas, las prostaglandinas, la fenilisopropiladenosina, y el ácido

nicotínico (144).

Algunas observaciones adicionales, como la acción inhibitoria del 2', 5'-dideoxiadenosina sobre la acumulación del AMPc no es afectada por la toxina pertussis (144); esto es consistente con la idea de que estas acciones de la adenosina sobre la actividad de adenilato ciclasa en tejido adiposo está mediada a través de tres tipos de receptores, que son el activatorio (Ra), el inhibitorio (Ri) - sensible a toxina pertussis y el purinérgico (P) insensible a la toxina pertussis (87). La adenosina es especialmente importante en adipocitos, porque es un regulador endógeno de la lipólisis (88,89). También se ha observado que la toxina pertussis (90) aumenta la lipólisis basal en los adipocitos provenientes de animales tratados cuando se comparan con el control. Esta acción de la toxina se debe al menos a un efecto adverso de la inhibición endógena de la lipólisis producida por la adenosina (90). Este aumento en la lipólisis tiene repercusiones a nivel fisiológico *in vivo* muy importantes, debido a que causa alteraciones graves en el metabolismo de los lípidos. Se ha observado que la administración de la vacuna (y en esta tesis se demuestra que ello es debido a la toxina pertussis) a hamsters les produce un severo hígado graso, hiperlipemia y cetosis (91,92). Todos estos datos se pueden explicar como el resultado de la alteración en la regulación de la lipólisis produciendo aumentos considerables en los niveles de ácidos grasos libre en el plasma (91,92), por lo que se intensifica la captura de estos metabolitos por el hígado (se sabe que esta captura es directamente proporcional a la

concentración a la cual se expone). Los ácidos grasos pueden ser oxidados o esterificados en el hígado, ambas rutas están favorecidas en animales tratados con la toxina. El aumento en la oxidación se ve reflejado en un incremento en la producción de cuerpos cetónicos (cetosis), y un aumento en la esterificación resultó en la producción de triacilglicéridos (hipertriacilglicerolemia) y finalmente ello favorece la acumulación de estos lípidos en el hígado (hígado graso).

Segundo, la acción de los agentes que activan a la adenilato ciclase, tales como las aminas beta-adrenérgicas, ACTH, o forskolina fue incrementada significativamente en adipocitos de animales tratados con la toxina pertussis (10 ug/100 g tres días antes de la realización del experimento), cuando fueron comparados con el control (146). Esto se puede explicar como la carencia en la capacidad de frenar la actividad de la adenilato ciclase por la proteína Ni, ya que ésta ha sido ADP-ribosilada por la toxina pertussis.

La activación de los receptores alfa-1 adrenérgicos en adipocitos produce un notable incremento en el marcado del fosfatidilinositol y del ácido fosfatídico (24,93-95). Interesantemente, en adipocitos de ratas tratadas con toxina pertussis la respuesta alfa-1 adrenérgica se observa seriamente disminuida (96). Estos resultados despiertan cierta intriga, debido a que los receptores alfa-1 adrenérgicos no están acoplados al sistema adenilato ciclase. También es importante mencionar que la administración de la toxina pertussis no bloquea la acción antilipolítica de la insulina, en contraste al bloqueo que sufren los agentes antilipolíticos (96-101).

Toxina Hepática.

La adrenalina induce hiperglicemia y este efecto está claramente disminuido tanto en roedores como en humanos después de la administración de la vacuna pertussis (102-104) y también en pacientes infectados con *Bordetella pertussis* (105). Este fenómeno puede deberse a varias causas: hiperinsulinemia, un defecto de la glucogénesis hepática o ambas.

Los receptores alfa-1 adrenérgicos son el principal tipo de adreno-receptores que controlan el metabolismo hepático en ratas normales. La acción ureogénica de la epinefrina en rata normal adulta es medida a través de la activación de este tipo de receptores. En hepatocitos de ratas tratadas con la toxina pertussis, los receptores beta-adrenérgicos, además de los alfa-adrenérgicos pueden estar involucrados en mediar los efectos de esta amina (98). En animales tratados con la toxina pertussis, la acumulación del AMPc en respuesta a epinefrina o a isoproterenol está considerablemente aumentado en relación con el control; un efecto similar lo presenta también el glucagón. El marcaje del fosfatidilinositol fue de manera muy parecida tanto en hepatocitos de rata normal como de tratada con la toxina pertussis (98). Estos datos indican que a) la respuesta alfa-1 adrenérgica en hepatocitos no se ve modificada por la acción de la toxina y b) la acción de los agentes que estimulan a la adenilato ciclase, tales como glucagón y agonistas beta-adrenérgicos se ve notablemente incrementada.

Sistema Cardiovascular.

El sistema cardiovascular de la rata presenta receptores alfa-1 y 2 adrenérgicos; por medio de la activación de estos receptores se regula la respuesta presora (106). De tal forma, que este es un modelo útil en el estudio de los efectos de la toxina pertussis sobre el mecanismo de acción de las aminas adrenérgicas. También se ha observado que el efecto presor mediado por los receptores alfa-2 adrenérgicos es afectado de manera significativa por los antagonistas del calcio (107).

Con la toxina pertussis también se ha visto en este modelo, que la respuesta presora debida a los agentes selectivos alfa-1 adrenérgicos (como metoxamina) no se ve afectada, pero está notablemente disminuido el efecto de los agentes selectivos alfa-2 adrenérgicos (como clonidina), donde este efecto fue dependiente de la dosis (108). Estos datos indican varias cosas : a) que la respuesta alfa-1 adrenérgica no está afectada por la toxina como lo está la respuesta alfa-2 adrenérgica, b) el mecanismo de transmisión de la señal a través de receptores alfa-1 y 2 adrenérgico son diferentes.

Riñón.

En membranas obtenidas de riñón de rata, se pudieron identificar receptores adrenérgicos del tipo alfa-1 y 2 (94). Estos subtipos de receptores adrenérgicos parecen estar localizados en estructura diferentes e involucrados en funciones también diferentes. De tal forma que los alfa-1 regulan el control de la gluconeogénesis, mientras que los alfa-2, modulan la liberación de renina y los flujos hídricos (109). Ambos tipos

de receptores son regulados por nucleótidos de guanina en sus estados de afinidad para agonistas (94), lo que hace al modelo más atractivo en el estudio de los efectos de la toxina pertussis.

Los resultados obtenidos en animales tratados con la toxina pertussis indican que no hay cambio en el número de receptores alfa-1 ó 2 sobre membranas de corteza renal o su afinidad por antagonistas. En cambio, la afinidad para la adrenalina en los receptores alfa-2 adrenérgicos, fue notablemente disminuida; además la capacidad de los nucleótidos de guanina para regular la afinidad, se vio seriamente afectada en membranas de animales que habían sido tratados con la toxina pertussis (75). Por otro lado, el receptor alfa-1 adrenérgico no presentó tales cambios (75), lo que sugiere que la modulación de la afinidad de los receptores alfa-1 y 2 adrenérgicos por nucleótidos de guanina es probablemente ejercida a través de diferentes entidades moleculares.

La activación de los receptores beta-adrenérgicos, estimula la liberación de renina, mientras que la activación de los alfa-2 adrenérgicos, la inhiben (109). Se ha observado que la liberación de renina, como se reflejó por la actividad de renina en plasma, es notablemente afectada por la administración de la toxina pertussis (110). La administración de epinefrina no modifica la actividad de la renina en plasma de animales control, pero de manera significativa la incrementa en animales tratados con la toxina pertussis (110).

Se ha estudiado también el efecto de la toxina pertussis sobre la regulación hormonal de los flujos hídricos

renales; observándose un bloqueo de la acción inhibitoria de la prostaglandina E₂ (111). Estos datos claramente indican que la acción de la toxina tiene repercusión a nivel fisiológico.

Ileon.

Este tejido es uno de los modelos más estudiados en las acciones farmacológicas para los opiáceos y las aminas alfa-2 adrenérgicas. Estos agentes modulan la liberación de la acetilcolina (la cual es el neurotransmisor que dispara la contracción) por las neuronas motoras del plexo mesentérico del ileon. Estos receptores parece que están acoplados inhibitoriamente a la adenilato ciclasa (112), pero aun no se dispone de pruebas directas. La administración de la toxina pertussis produce un bloqueo de la acción inhibitoria de la morfina y de los agentes alfa-2 adrenérgicos sobre la contracción muscular (113).

La Toxina Pertussis como Adyuvante

La vacuna contra la tosferina (o antipertussis) consiste en una suspensión de Bordetella pertussis y generalmente se asocia a los toxoides diftérico y tetánico en forma de vacuna triple o DPT. La vacuna ha sido elemento de primordial importancia en la lucha contra la tosferina. Sin embargo, no está exenta de riesgos y molestias. Podemos considerarla, por lo tanto, como una herramienta indispensable de salud pública, buena, pero perfectible (114).

La vacuna usada en todo el mundo contiene toxina pertussis activa, por supuesto en cantidades muy inferiores a

las necesarias para producir alteraciones en niños sanos; sin embargo, es capaz de producir alteraciones en sujetos hipersensibles. Lo primero que se antojaría es eliminar este componente tóxico de la vacuna. Sin embargo, sucede que esta toxina es posiblemente el principal antígeno (115-117). De hecho, parece que las bacterias en sí son de poca importancia en la protección conferida por la vacuna y que los elementos importantes son los que se encuentran libres en el líquido en el que están suspendidas (toxina pertussis, hemaglutinina filamentosa y ciclasa extracelular). La toxina pertussis, además de ser el principal antígeno, está posiblemente involucrada en la patogénesis de la enfermedad y parece ser la responsable de las reacciones adversas que produce la vacuna.

El gobierno del Japón, desde hace algunos años, ha desarrollado una vacuna pertussis de tipo acelular. La vacuna está formada por toxina pertussis y hemaglutinina fibrosa y se encuentra actualmente en fase de uso masivo (117). Sin embargo, la producción de esta vacuna es compleja y costosa, y no hay información comparativa respecto a la vacuna tradicional en relación con la cantidad de toxina pertussis activa remanente ni la protección que confiere (117).

En colaboración con los miembros del Instituto Nacional de Higiene de la Secretaría de Salud hemos desarrollado un extracto acelular, producible a bajo costo, capaz de pasar las pruebas de toxicidad y de proteger al ratón contra el desafío intracerebral con Bordetella pertussis viva (118,119). Este extracto contiene toxina pertussis activa y hemaglutinina fibrosa, además de otros componentes. Un objetivo es lograr la

caracterización de los componentes y la total destoxificación
(sin abatir la antigenicidad) de esta potencial vacuna acelular.

SISTEMA FOSFATIDILINOSITOL.

La respuesta celular se manifiesta cuando una amplia gamma de ligandos extracelulares interactúan con receptores expuestos sobre la superficie de la membrana plasmática: tales estímulos extracelulares, incluyen hormonas peptídicas y aminas, neurotransmisores, factores del crecimiento, antígenos y algunos derivados lipídicos como prostanoideas y el factor activador de las plaquetas, entre otros.

Entre los mecanismos de transducción de señal que se conocen, está el sistema adenilato ciclasa, (que se revisó anteriormente), la activación de proteínas cinasas y la apertura de canales iónicos. En 1953 Mabel N. y Lowell E. Hokin (120), observaron que la administración de la acetilcolina a células secretoras del páncreas, aumentaba la incorporación de grupos fosfato radiactivos (grupo PO_4 que contiene fósforo-32) a compuestos como fosfatidilinositol (PI), uno de los fosfolípidos que conforman la membrana celular. En forma similar a otros lípidos de membrana, el fosfatidilinositol (PI) presenta una parte hidrofóbica (dos cadenas de ácidos grasos esterificando a una molécula de glicerol) unida a un parte hidrofóbica, en este caso, el inositol fosfato como "cabeza de grupo". El estímulo debido a la acetilcolina, originó el rompimiento de este compuesto en dos unidades. De tal forma que el aumento en la incorporación de ^{32}P observado por los Hokin (120) fue un evento secundario a la síntesis de novo del fosfatidilinositol (PI).

El punto clave fue, que una señal externa había estimulado tal recambio (hidrólisis y resíntesis) de un lípido de membrana. Así, los Hokin (120) postularon que un aumento en el

recambio de este lípido tenía algunas veces que ir acompañado con un mecanismo de exocitosis, por el cual las células del páncreas liberaban a las enzimas digestivas. Después los estudios han establecido como conclusión, que el incremento al recambio se presenta en respuesta a una variedad de estímulos, no necesariamente con activación de la función secretoria. Desprendiéndose el concepto de que, el recambio de lípidos de membrana juega un papel más general en la vida celular.

Los estudios de los Hokin establecieron muchas de las características claves en la estimulación de fosfolípidos (120). Posteriormente, se encaminaron los estudios hacia la indagación del papel que pueden jugar el metabolismo de los fosfolípidos en la transmisión de la señal hormonal transmembranal.

La serie de evidencias más prominentes que han tenido como base fundamental la necesidad de proponer la existencia de un nuevo sistema de transducción, son las siguientes:

1.- Existen ciertos receptores, principalmente colinérgicos muscarínicos y alfa - adrenérgicos, que regulan la activación del metabolismo de los fosfolípidos en varios tejidos, y no parece ser de manera paralela entre la presentación de esta respuesta metabólica y cualquier tipo particular de respuesta celular (como contracción, secreción, flujos iónicos, etc) (121-125).

2.- Los receptores que activan el metabolismo del inositol, por lo general no hacen lo mismo con la enzima adenilato ciclasa: por lo tanto, el mecanismo de transducción de la señal posreceptor era desconocido. (121,125-128).

3.- Por medio de estudios farmacológicos y fisiológicos indirectos parece que estos receptores, por lo general, causan un incremento en los iones calcio en el citoplasma de células estimuladas (121,125).

4.- A partir de evidencias restringidas, principalmente estudios en médula adrenal, plaquetas y glándulas paratiroides, se sugiere que el disparo en la elevación de iones calcio mediada por el receptor no fue el activador celular del metabolismo del inositol. La posibilidad más obvia es que alguna etapa en la activación del metabolismo del inositol por el receptor pueda actuar como una reacción de acoplamiento, sirviendo como eslabón entre la activación del receptor y la movilización de los iones calcio (121,125).

5.- La etapa enzimática en el metabolismo del inositol que es activada por los receptores estuvo con incertidumbre. Los Hokin (120) sugirieron que pudiera tratarse de una fosforilación del 1,2-diacilglicerol por la diacilglicerol-cinasa o la hidrólisis del fosfatidilinositol (PtdIns) a 1,2-diacilglicerol e inositol-1-fosfato, por una fosfolipasa C específica para este compuesto (121).

Sin embargo, Durell (127), fue el primero en argumentar el papel que pudiera jugar la fosfolipasa C, la cual cataliza la hidrólisis del fosfatidilinositol. El modelo de Mitchell en la década de los sesenta, propone que la movilización del calcio acoplado a la estimulación de los receptores incorpora una fosfolipasa C encargada de hidrolizar a los fosfoinosítidos, la reacción más posiblemente acoplada a la activación del receptor (121-125).

La hidrólisis del fosfatidilinositol ocurre tan rápidamente que se aproxima a los requerimientos solicitados para la reacción de comunicación involucrada en la acción de los receptores, los cuales muestran un retardo electrofisiológico de una fracción substancial de un segundo. (121,124).

7.- Las respuestas fisiológicas como la contracción en el músculo liso, a menudo muestran una "reserva de receptor", i.e. se presentan completamente por aumentos en la concentración de mensajeros intracelulares, que se pueden lograr mediante la activación de una fracción reducida de receptores celulares para un estímulo en particular. La estimulación del rompimiento del fosfatidilinositol 3 Pídnos, muestra una dosis respuesta que se relaciona con la ocupación del receptor por el agonista adecuado, de lo cual se espera que se generen los segundos mensajeros intracelulares (122-125).

8.- La estimulación de la respuesta celular a través de los iones calcio puede también correlacionarse con la proliferación tanto en células normales como transformadas (123). Esto es de interés particular, debido a que existen evidencias en el sentido de que en el crecimiento los iones calcio pueden jugar un papel de señal en el control de la división celular.

La primera evidencia reportada acerca de la importancia de los fosfoinosítidos sobre la movilización de los iones calcio regulada por la activación del receptor, fue dada por Fair y Berridge (129) en 1979. Ellos reportaron que la capacidad de la 5-hidroxitriptamina en estimular la movilización de los iones calcio en las glándulas salivales de la mosca, se

perdida por la estimulación prolongada, pero que esta respuesta podía restablecerse si las glándulas desensibilizadas se incubaban en un medio rico en inositol.

Los adelantos en la década de los ochentas se han llevado a un ritmo acelerado, actualmente tiene una buena aceptación el hecho de que en la estimulación del metabolismo de los polifosfoinosítidos pudieran estar involucrada de la siguiente manera: la hidrólisis del fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PtdInos (4,5) P₂) es catalizada por la polifosfoinosítido fosfodiesterasa (una fosfolipasa C) que a su vez está regulada por una proteína que une nucleótidos de guanina, llamada Np. Esta proteína, aunque comparte muchas similitudes tanto estructurales como funcionales con las proteínas Ns y Ni descritas en el sistema adenilato ciclasa, la susceptibilidad ser inactivada por la toxina pertussis aún está en debate, debido a que existen algunos sistemas que son sensibles y otros que no lo son (130). Los productos de la reacción catalizada por la fosfolipasa C son los siguientes, por una parte se genera el 1,2-diacilglicerol y por otra, el inositol 1,4,5-trifosfato o IP₃. El 1,2-diacilglicerol interactúa con la proteína cinasa-C (PK-C) causando la activación, posible translocación hacia la membrana y la fosforilación de varias proteínas blanco dentro de la célula (131). El inositol trifosfato o IP₃, por otra parte, se une a un receptor intracelular, localizado en la membrana del retículo endoplásmico liso (132), el cual posiblemente también este regulado por proteínas reguladoras que unen GTP, aunque al respecto faltan pruebas fehacientes para demostrarlo (130,133). La ocupación de este receptor libera calcio al citosol por un

mecanismo todavía no bien entendido. La elevación en el calcio intracelular, disparado por esta vía, es transitorio pero indudablemente suficiente para generar cambios metabólicos rápidos, observados en tejidos como hígado y músculo cuando son expuestos a hormonas que movilizan calcio. En diferentes células estas elevaciones de calcio pueden mostrar un segundo componente, que se caracteriza por ser sostenido (se trata pues, de una respuesta bifásica); la cual parece ser dependiente de la concentración del calcio extracelular (134-135). Estos flujos de calcio que cruzan la membrana plasmática y una vez dentro de la célula tienen funciones que apoyan la teoría propuesta por Michell (121) donde la estimulación del metabolismo de fosfolípidos de inositol tienden a la apertura de canales para calcio en la membrana plasmática, el mecanismo por el cual suceden estos eventos aún no está muy claro. Se ha propuesto que el inositol trifosfato ó IP_3 puede actuar sobre un subtipo específico de vesículas, que determinan el almacén intracelular del calcio, y que hacen posible el acceso al medio extracelular (entrada de calcio extracelular) (137). Ver la figura No.5.

Recientemente, se ha demostrado que un número de fosfatos de inositol, producen un incremento rápido después de una estimulación hormonal a células (124-128). Estando entre ellos, $Ins(1,3,4)P_3$, que es el precursor del $Ins(1,3,4,5)P_4$ ó IP_4 . Para este último compuesto, Irvine y Moor (132) han aportado evidencias en el sentido de que puede controlar a nivel de la membrana plasmática la entrada de los iones calcio extracelulares. Pero es importante disponer de un número mayor de

datos que puedan demostrar sin temor a equivocación esta hipótesis. Porque como se sabe, los iones calcio y el diacilglicerol, al igual que el AMPc, tienen la propiedad de activar proteínas cinasas específicas, que son las responsables de fosforilar a otras proteínas, por medio de las cuales se ejerce el control intracelular. Un ejemplo, es la proteína cinasa-C (PK-C), dependiente de iones calcio y fosfolípidos, particularmente fosfatidilserina, que es activada por el diacilglicerol generado transitoriamente, como ya se mencionó, por la hidrólisis de los fosfolípidos de membrana en respuesta a la activación específica del receptor. En la mayoría de los sistemas, la movilización de iones calcio y la activación de la proteína cinasa-C parece ser de una manera sinérgica para generar una respuesta biológica en particular.

El mecanismo por el cual se activa la proteína cinasa-C aún no está del todo claro. Sin embargo, se acepta en la actualidad lo siguiente: el diacilglicerol ó los ésteres de fórbol activos estabilizan un complejo cuaternario que está formado además por la enzima (PK-C), los iones calcio y los fosfolípidos de membrana (139-141). Hay además una alternativa para la activación de la proteína cinasa-C (PK-C), que es mediante tratamiento proteolítico, del cual resulta un producto que tiene un peso molecular aproximado de 50 Kdaltones y presenta actividad de proteína cinasa-C en ausencia de los iones calcio y los fosfolípidos (142,143).

Recientemente, Jacobs y colaboradores (144) reportaron que los ésteres de fórbol activos, pueden afectar la rama inhibitoria sensible a hormonas de la adenilato ciclasa. Este

efecto puede deberse a una fosforilación de la proteína acopladora que une nucleótidos de guanina (Ni), la cual es catalizada por la proteína cinasa-C (145).

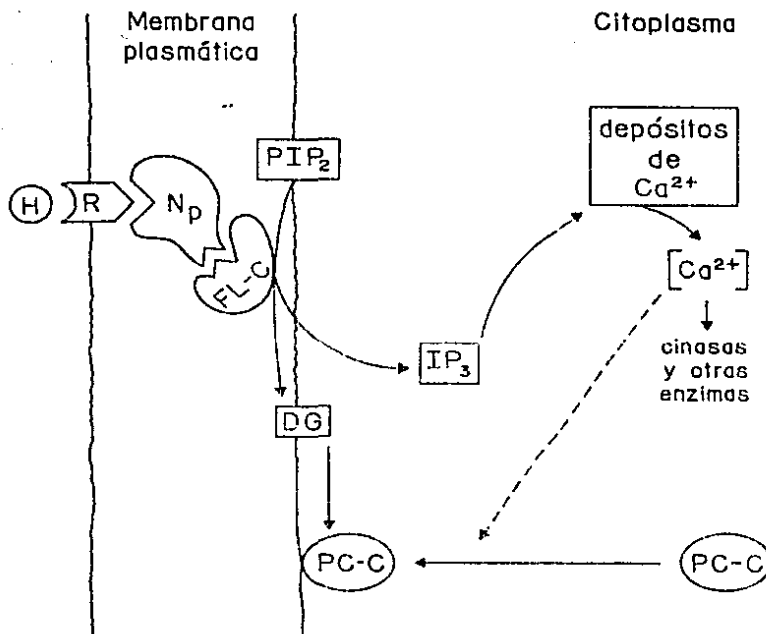


Figura No. 5. REPRESENTACION ESQUEMATICA DEL SISTEMA DE TRANSDUCCION CALCIO FOSFOINOSITIDOS.

EL Receptor (R) activa a la proteína transdutora Np, ésta a su vez activa a una fosfolipasa C que hidroliza al fosfatidilinositol bifosfato (PIP₂) de la membrana, para convertirlo en el diacilglicerol (DG) e inositol trifosfato (IP₃). El (IP₃) a su vez activa la liberación de calcio del retículo endoplásmico. Mientras que el diacilglicerol activa a una proteína cinasa-C.

OBJETIVOS DE LA PRESENTE TESIS

En el presente trabajo se planteó el siguiente objetivo general: Avanzar en el conocimiento acerca de las acciones y los mecanismos de acción de la toxina pertussis.

Como objetivos específicos están los siguientes:

- 1.- Estudiar la acción de la toxina pertussis purificada sobre la concentración de los lípidos y los cuerpos cetónicos en el hígado y el suero como un reflejo del metabolismo lipídico en general en el animal íntegro.
- 2.- Estudiar de manera comparativa las acciones de la toxina pertussis y de los ésteres de fórbol activos sobre la regulación hormonal de la adenilato ciclasa en adipocitos de hamster.
- 3.- Estudiar los efectos de los ésteres de fórbol activos sobre la respuesta hormonal en adipocitos de rata.
- 4.- Contribuir en el desarrollo a nivel laboratorio de una vacuna antitosferina de tipo acelular.

CAPITULO II. MATERIAL Y METODOS

Los materiales y las metodologías empleadas en la presente tesis se proporcionan en cada uno de los trabajos respectivos. Sin embargo, se muestra en las siguientes líneas un resumen de las principales metodologías empleadas.

Para la purificación de la toxina pertussis, se hizo de acuerdo al método descrito por Martínez-Olmedo y García-Sáinz (1983) o por el método de Sakura et al (1983).

La cuantificación de los triacilglicéridos tanto séricos como hepáticos se hizo por el método de Gottfried y Rosenberg (1973). Los ácidos grasos libres se cuantificaron por el método de Novak (1965). Los cuerpos cetónicos fueron cuantificados enzimáticamente por el método de Mellanby y Williamson, (1965). El colesterol fue cuantificado por el método de Bartlett (1959). Los fosfolípidos totales por el método de Nybenga y Inkpen (1974). La electroforesis de lipoproteínas séricas se realizó de acuerdo al método de Lees y Hatch (1963).

El aislamiento de los adipocitos se realizó de acuerdo al método descrito por Martínez-Olmedo y García-Sáinz, (1983) o por el método de Rodbell (1964). La cuantificación del AMPcíclico se llevó a efecto de acuerdo al método descrito por Martínez-Olmedo y García-Sáinz, (1983) o por el método de Gilman (1970). La extracción de lípidos se hizo por el método de Dole (1961). El marcaje de los fosfolípidos se hizo de acuerdo a García-Sáinz et al (1980, 1983). Para mayores detalles ver el texto de los trabajos.

CAPITULO IIIa. RESULTADOS.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis se muestran a continuación en los siguientes artículos:

- 1.- García-Sáinz, J. A., Juárez-Ayala, J. y Valles, V.E. (1987). PERTUSSIS TOXIN INDUCES FATTY LIVER, HYPERLIPEMIA AND KETOSIS IN HAMSTERS. *Toxicon* 25:4,603-607.
- 2.- Juárez-Ayala, J. y García-Sáinz, J.A. (1987). PHORBOL ESTERS DO NOT IMPAIR THE INHIBITORY PATHWAY OF ADENYLATE CYCLASE IN HAMSTERS ADIPOCYTES. *Archivos de Investigación Médica, IMSS-MEXICO* 18:4, 279-282.
- 3.- García-Sáinz, J.A. y Juárez-Ayala, J. (1988) EFFECT OF PHORBOL ESTERS ON THE HORMONAL RESPONSIVINESS OF ISOLATE WHITE FAT CELLS. *Eur. J. Pharmacol.* 146: ,193-199.
- 4.- García-Sáinz, J.A., Ruiz-Puente, J., Juárez-Ayala, J., Jiménez-Paredes, J., Quiroga, I., Hernández-Fuga, A. y Villalva-Posada, H. (1986). VACUNA ANTI-TOSFERINA ACELULAR: AVANCES EN SU DESARROLLO. Simposio. Avances en el uso de vacunas 1985-1985. Ed. Juan Garza Ramos y Guadalupe Franco de Guzmán. p.116, MEXICO.

NOTA: En el capítulo IIIb, se presenta un resumen de los resultados obtenidos en cada uno de estos trabajos.

CAPITULO IIIb. RESUMEN DE LOS RESULTADOS

TRABAJO No. 1: El objetivo de este trabajo fue estudiar los efectos de la toxina pertussis purificada sobre el metabolismo lipídico en hamsters. Obteniéndose los resultados siguientes:

a) La administración de la toxina pertussis a hamsters, les produjo cambios muy marcados en el color del hígado en un lapso de 2 a 3 días, como previamente se había observado con la vacuna celular completa.

b) De acuerdo con la curva dosis respuesta para la toxina pertussis, encontramos que con 100 ug/100 g de peso corporal se presenta un incremento de 12.5 veces en la concentración de triacilglicéridos hepáticos cuando se compararon contra el control. A esta misma concentración de la toxina pertussis, otros lípidos se vieron afectados; por ejemplo, el colesterol se incrementó en un 30% y los fosfolípidos totales, lo hicieron en un 20%.

c) Con el fin de obtener mayor información sobre los cambios en el metabolismo lipídico inducido por la toxina pertussis, se cuantificó en suero la concentración de los lípidos y de los cuerpos cetónicos. En términos generales, se puede decir, que los cambios presentados en el suero se suscitaron en forma paralela a los ocurridos en el hígado. Sin embargo, cabe mencionar que la administración de tan sólo 1 ug de la toxina pertussis fue suficiente de incrementar significativamente la concentración de triacilglicéridos en el suero.

También se observaron incrementos en el colesterol (50%), fosfolípidos (2 veces), ácidos grasos libres (3 veces) y

cuerpos cetónicos (20 veces). Estos cambios en los lípidos séricos estuvieron asociados con un patrón electroforético de lipoproteínas alterado en forma significativa. Observándose además, que la cantidad relativa de las beta-lipoproteínas estaba incrementada, mientras que la de las alfa, estaba disminuida.

TRABAJO No. 2: El objetivo de este trabajo fue estudiar de manera comparativa, las acciones de la toxina pertussis y de los ésteres de férhol activos sobre la regulación hormonal de la adenilato ciclasa en adipocitos de hamster. Obteniéndose los siguientes resultados:

a) La curva dosis respuesta para isoproterenol en células control en presencia y ausencia de los ésteres de férhol activos a una concentración de $10E-6M$, y en células provenientes de animales tratados previamente con 10 ug de la toxina pertussis por cada 100 g de peso corporal, se observó un comportamiento muy similar salvo por un discreto aumento en la respuesta a isoproterenol en células de animales tratados con la toxina pertussis.

b) La adrenalina, la cual tiene la capacidad de activar tanto a los receptores alfa-2 adrenérgicos y beta-adrenérgicos, produce una acumulación pequeña del nucleótido cíclico en células control. En contraste, el tratamiento con la toxina pertussis permite observar una notable y completa actividad beta-adrenérgica con un aumento de aproximadamente unas 5 veces con respecto al control. Los ésteres de férhol activos o PMA, no fueron capaces de reproducir los efectos de la toxina pertussis.

c) Con la finalidad de obtener mayor información, se estudió la acción de otros receptores acoplados inhibitoriamente a la enzima adenilato ciclasa, por ejemplo, los receptores R_i para la adenosina. En otros estudios la acumulación del AMPc fue estimulado por isoproterenol a una concentración de $10E-6$ M. En células control, el análogo no hidrolizable de la adenosina como lo es el PIA y de una manera dependiente de la concentración disminuyó notablemente la acumulación del AMPc. Este efecto fue casi abatido en células provenientes de animales tratados con la toxina pertussis. Una vez más los ésteres de fórbol activos fueron incapaces de reproducir los efectos producidos por la toxina pertussis.

TRABAJO No. 3: El objetivo de este trabajo fue estudiar los efectos de los ésteres de fórbol activos sobre la respuesta hormonal en adipocitos de rata. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

a) El PMA no tiene efecto sobre la acumulación basal del AMPc o la lipólisis. De igual forma, fue incapaz de modificar la acumulación del AMPc inducido por el isoproterenol o por la forskolina.

b) El PMA no tuvo efecto sobre la inhibición de la acumulación del AMPc y la lipólisis inducido por la prostaglandina E_2 o por la fenilisopropiladenosina.

c) El PMA fue capaz de estimular la lipogénesis de una manera dependiente de la concentración.

d) El PMA no es capaz de bloquear el efecto de la concentración máxima efectiva de la insulina sobre la

lipogénesis o el marcaje al fosfatidilinositol. Sin embargo, el PMA disminuye significativamente el efecto antilipolítico de la insulina.

e) El factor de crecimiento epidérmico produce una pequeña estimulación de la lipogénesis y del marcaje al fosfatidilinositol, los cuales no se vieron afectados por el PMA.

f) El PMA inhibe de manera notable el marcaje del fosfatidilinositol generado por la activación de la respuesta alfa-1 adrenérgica. Esta inhibición se efectúa de una manera dependiente de la concentración.

g) El PMA por sí mismo no presentó efecto significativo sobre el marcaje del fosfatidilinositol y fosfatidiletanolamina, pero en cambio logró incrementar el marcaje a la fosfatidilcolina y a su precursor el ácido fosfatídico.

TRABAJO No. 4: El objetivo de este trabajo fue contribuir en el desarrollo a nivel laboratorio de una vacuna antitosferina de tipo acelular. Obteniéndose los siguientes resultados:

a) La vacuna acelular obtenida por este procedimiento, tuvo una purificación en el componente de toxina pertussis de aproximadamente 200 veces y muestra una potencia que oscila en el orden de 50 y 200 veces más, (ésto en base a proteína) que la vacuna pertussis tomada como referencia del Instituto Nacional de Higiene, de la Secretaría de Salubridad y Asistencia.

b) Al comparar el efecto protector de dos cepas de la Bordetella pertussis, la cepa 509 y la 165 con múltiples lotes de

producción, se observó que la cepa 509 tiene propiedades protectoras mejores que la cepa 165.

c) El patrón de elusión de la vacuna acelular utilizando una columna cromatográfica de Sephadex G-200, presentó tres picos y que para su descripción se denominarán componentes. El componente I, tuvo actividad de hemaglutinina y baja actividad de toxina pertussis; mientras que el componente II presentó alta actividad de toxina pertussis. Al componente III, no fue posible detectarle alguna actividad biológica.

d) La electroferesis practicada sobre geles de poliacrilamida a un pH de 4.5, mostró dos componentes, uno de los cuales corresponde a la toxina pertussis y el otro pudiera corresponder a la hemaglutinina filamentosa.

e) La electroforesis practicada sobre geles de poliacrilamida con lauril sulfato de sodio, presentó entre 15 y 20 bandas (ésto dependiendo de la preparación). En este gel se pueden apreciar claramente a las subunidades de la toxina pertussis, así como otras bandas de peso molecular mayor, las cuales pudieran corresponder por una parte a la hemaglutinina filamentosa y, por otra a un componente que actualmente desconocemos sus origen.

f) Los resultados de exploración obtenidos con la microscopia electrónica, presentaron partículas con geometría esférica y los agregados característicos de la toxina pertussis, así como escasos elementos fibrosos que pudieran corresponder a la hemaglutinina filamentosa.

CAPITULO IV. DISCUSION Y CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis, demuestran claramente que la toxina pertussis purificada es capaz de producir alteraciones en el metabolismo de los lípidos. De tal manera, que se favorece la formación del hígado graso, la hiperlipemia y la cetosis. Fenomenologías que ya habían sido observadas con la vacuna completa (91), por lo que se concluye, que la toxina pertussis es el principal componente responsable de estas alteraciones.

En la actualidad, se sabe que el mecanismo de acción de esta toxina, es através de una modificación covalente, se trata específicamente, de una ADP-ribosilación sobre la proteína acopladora Ni del sistema adenilato ciclasa (63-65, 71, 147 y 148). Esto ocasiona que la lipólisis, bajo estas condiciones, se vea activada. De tal forma, que la mayoría de los inhibidores endógenos de esta ruta metabólica, como son la adrenalina a través de los receptores alfa-2 adrenérgicos, la adenosina por medio de los receptores Ri y las prostaglandinas, estén en gran parte inhibidas (84, 87, 97, 146 y 147). Mientras que la acción de los activadores de la lipólisis esté aumentada (84, 87, 97, 146 y 147).

Es posible, que el papel central en la génesis de estas alteraciones recaiga sobre la concentración de los ácidos grasos libres producidos bajo los efectos de la toxina pertussis; apoyamos ésto, en la evidencia de que la captura de estos compuestos por el hígado es directamente proporcional a la concentración a la cual es expuesto. Así, una concentración alta

de ácidos grasos libres en el plasma puede aumentar su captura y su metabolismo por el hígado. De tal manera, que estos compuestos pueden ser oxidados y/o esterificados, ya que ambos procesos metabólicos están notablemente favorecidos en los animales tratados con la toxina pertussis. Este fenómeno se puede ver reflejado en la concentración de los cuerpos cetónicos, los triacilglicéridos y la evidente inducción de hígado graso.

La producción de hígado graso, es un fenómeno biológico muy complejo, en el que la síntesis acelerada de los triacilglicéridos excede a la capacidad de secreción. Curiosamente, se pudo observar que la toxina pertussis no tiene efecto sobre la síntesis de las proteínas en este tejido. En cuanto al aspecto histológico, se observó que la distribución de los lípidos es periportal; ello nos recuerda a otros agentes hepatotóxicos, como el tetracloruro de carbono (149). Toda esta serie de alteraciones metabólicas, también tuvieron repercusiones sobre el patrón de las lipoproteínas séricas, causando cambios en su movilidad electroforética, desconociendo en la actualidad las posibles causas de ello.

Otro grupo de lípidos como el colesterol y los fosfolípidos, también se vieron seriamente afectados. Los incrementos observados se pudieran explicar indirectamente, por un aumento en la disponibilidad de los precursores metabólicos, como son la Acil-CoA y la hidroximetil glutaril-CoA; aunque ésto, deberá ser determinado directamente en el futuro.

Está claro que para producir estos efectos en el hamster, se necesitó de dosis altas de toxina pertussis; y es poco probable

que un ser humano reciba tal dosis al ser vacunado. Sin embargo, es bueno tener presente que la toxina pertussis es un componente potencialmente tóxico y que las condiciones personales (como susceptibilidad, medicación, etc) o la potenciación por otros componentes que están presentes en la vacuna, pueden desencadenar alteraciones metabólicas similares a las que se presentan en esta tesis.

Dada la importancia que ha tenido la vacunación masiva en el control de la tosferina y al hecho de que, la vacuna actual presenta algunas reacciones colaterales indeseables, se ha tratado de obtener en todo el mundo una vacuna con igual eficacia, pero con mejor dirección inmunogénica, es decir, que contengan principalmente a los antígenos importantes para la inducción de protección y que provoque menos reacciones indeseables. Bajo procedimientos tecnológicamente sencillos, logramos obtener un vacuna acelular con un alto grado de purificación en el componente de toxina pertussis, siendo esta purificación más potente que el de la vacuna tomada como referencia del Instituto Nacional de Higiene. Se pudo observar además, que el efecto protector es variable de cepa a cepa de Bordetella pertussis.

Las características fisicoquímicas presentadas por este material purificado, concuerdan enormemente a las mostradas principalmente por la toxina pertussis y la hemaglutinina filamentosas; lo cual nos habla de una similitud en lo que respecta a los elementos fundamentales de que consta la vacuna acelular japonesa. Es conveniente mencionar, que el grado de avance hasta la fecha es aceptable, pero que aún quedan varios

objetivos por cumplir, como son la destoxificación y el escalamiento industrial.

Anteriormente, se hizo alusión a la importancia de la toxina pertussis como herramienta importantísima en la investigación que comprende a los mecanismos de regulación de las señales a nivel de la membrana plasmática. Al respecto, se compararon los efectos de los ésteres de fórbol activos. Encontrándose que en el tejido adiposo, los efectos de la toxina pertussis son completamente diferentes a los obtenidos con los ésteres de fórbol activos en plaquetas (144). En este último sistema, se presentan evidencias claras en el sentido de que los ésteres de fórbol son capaces de afectar el brazo inhibitorio de la enzima adenilato ciclasa, por medio de una fosforilación sobre la proteína Ni, catalizada por la enzima proteína cinasa-C (145). Hasta el momento, no tenemos una explicación razonable de esta marcada diferencia. Sin embargo, se evaluaron algunas posibilidades como las siguientes: a) es poco probable, que este efecto se deba a una ausencia de la proteína cinasa-C, debido a que esta enzima está ampliamente distribuida entre los tejidos. Además existen evidencias de que los ésteres de fórbol activan a la enzima en tejido adiposo (150, 151). b) otra posibilidad, es que las acciones de los ésteres de fórbol sean tan heterogéneas de tejido a tejido; como lo demuestran los resultados previamente obtenidos (152). Esto nos habla, de que los ésteres de fórbol pueden alterar la acción regulatoria de las hormonas sobre la enzima adenilato ciclasa en varias formas; tomando en consideración la posibilidad de que pueden existir variaciones de tejido a tejido en tipos de

proteína cinasa-C o en los sustratos y a la vez poseer múltiples sitios de acción.

Esta situación fue uno de los principales motivos que nos llevó a estudiar los efectos de los ésteres de fórbol sobre la respuesta hormonal en adipocitos aislados de rata. En estos estudios encontramos diferencias y similitudes con respecto a los resultados obtenidos en otros modelos. Por ejemplo, se sabía que los ésteres de fórbol favorecen la fosforilación del receptor beta-adrenérgico con el concomitante fenómeno de desensibilización de la adenilato ciclasa (153). Por otro lado, y en contra de lo anterior, hay evidencias de que existe un aumento de la respuesta beta adrenérgica en varios sistemas de estudio (153, 154).

En la presente tesis, no observamos ni desensibilización ni aumento en la respuesta beta adrenérgica. Reiterando que la primera, es consecuencia de la fosforilación del receptor; mientras que la segunda, se puede presentar en un sitio lejano a éste. Hecho que nos deja sin posibilidades de entender la acción de la proteína cinasa-C sobre la actividad de la adenilato ciclasa como un modelo universal.

Aunque existen evidencias en el sentido de que, los éteres de fórbol pueden alterar el brazo inhibitorio de la adenilato ciclasa (144, 145), también las hay en el sentido opuesto (155-157); donde estos últimos datos, están de acuerdo con nuestros resultados obtenidos del estudio de acumulación del AMPc y de la lipólisis.

Por otro lado, nuestros resultados confirman hallazgos previos de otros grupos, en el sentido de que, los ésteres de

fórbol pueden estimular la lipogénesis (151, 158). Observándose además, que los ésteres de fórbol no disminuyen el efecto de la concentración máxima efectiva de la insulina para estimular la lipogénesis y el marcaje al fosfatidilinositol, pero en cambio si alteran significativamente la acción antilipolítica de la insulina. Existen algunos péptidos que presentan algunas acciones en común con la insulina, como lo sería el factor de crecimiento epidérmico. Para este compuesto, se observó que los ésteres de fórbol no tienen efecto sobre la capacidad limitada que presentan para estimular a la lipogénesis y a el marcaje del fosfatidilinositol.

La modificación de la respuesta alfa-1 adrenérgica por los ésteres de fórbol en tejido adiposo, es otra de las similitudes observadas entre el presente trabajo con otros sistemas de estudio (159, 160). Para esto se dispone de evidencias, que apoyan la hipótesis de que la inhibición de la respuesta alfa-1 adrenérgica por los ésteres de fórbol se debe a una fosforilación del receptor alfa-1 adrenérgico (161).

También se observó, que los ésteres de fórbol favorecen el marcaje de la fosfatidilcolina y de su precursor metabólico, el ácido fosfatídico; compartiendo este hecho, similitudes con hallazgos previos en otros sistemas celulares (162-164).

En resumen, los resultados obtenidos en la presente tesis nos conducen a las siguientes conclusiones:

a) La toxina pertussis es el principal componente de la vacuna pertussis, capaz de producir alteraciones en grado considerable sobre el metabolismo de los lípidos.

b) Nuestra preparación de vacuna pertussis acelular, resultó ser más potente que la vacuna pertussis tomada como referencia, y es un candidato promisorio para la producción industrial de vacuna acelular. Entre los principales componentes que conforman a esta vacuna acelular, son la toxina pertussis y la hemaglutinina filamentosa.

c) En el tejido adiposo, los efectos producidos por la toxina pertussis son completamente diferentes a los obtenidos por los ésteres de fórbol. Estos resultados son diferentes a los observados en plaquetas.

d) Los ésteres de fórbol estimulan la lipogénesis y bloquean la acción alfa-1 adrenérgica en el tejido adiposo. No alteran la regulación hormonal de la acumulación del AMP cíclico, ni la lipólisis. Esto último está en marcado contraste con los efectos debidos a la toxina pertussis.

CAPITULO V. BIBLIOGRAFIA

- 1.- Hewlett, E.L., Urban, M.A., Mandlark, C.R., Wolff, J. (1975). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73:1926-30.
- 2.- Hewlett, E.L., Wolff, J. (1975). J. Bacteriol. 127:890-98.
- 3.- Neiss, A.A., Myres, G.A., Crane, J.K., Hewlett, E.L. (1985). In Microbiology. Ed. L. Leive pp 70-74 Washington, D.C. Am. Soc. Microbiol.
- 4.- Wolff, J., Cook, G.H., Goldhammer, A.R., Berkowitz, S.A. (1980). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:3341-44.
- 5.- Confer, D.L., Eaton, J.N. (1982). Science 217:948-50.
- 6.- Connor, J.D., (1981). In medical Microbiology and Infectious diseases, Ed. A.I. Brande, C.E. Davis, J. Fiene. pp 900-08. Philadelphia-Saunders.
- 7.- Hanski, E., Farfel, Z. (1985). J. Biol. Chem. 290:5525-32.
- 8.- Hewlett, E.L., (1984). Ann. Intern. Med. 101:653-666.
- 9.- Hewlett, E.L., Neiss, A.A., Crane, J.C., Pearson, R.D., Anderson, H.J. et al. (1985). Proc. 4th Int. Symp. Pertussis, Geneva, 1984. Dev. Biol. Stand. 61:21-26.
- 10.- Neiss, A.A., Hewlett, E.L., Myers, G.A., Falkow, S. (1983). Infect. Immun. 42:33-41.
- 11.- Neiss, A.A., Hewlett, E.L., Myers, G.A., Falkow, S. (1984). J. Infect. Dis. 150:219-22.
- 12.- Eidering, G., Hornbeck, C., Baker, J., (1957). J. Bacteriol. 74:133-136.

- 13.- Cowell, J.L., Uriasu, A., Zhang, J.M., Steven, A.C., Manclark, C.R. (1986). In Microbiology-1986, Ed. L. Leive pp 55-58. Washington, D.C. Am. Soc. Microbiol.
- 14.- Preston, N.M., Surapatana, N., Carter, E.J., (1982). J. Hyg. 88:39-46.
- 15.- Irons, L.I., Ashworth, L.A.E., Robison, A., (1986). Proc. 4th Int. Symp. Pertussis, Geneva, 1984. Dev. Biol. Stand. 61:152-62.
- 16.- Zhang, J.M., Cowell, J.L., Steven, A.C., Carter, P.H., McGrath, P.P., et al. (1985). Infect. Immun. 48:422-27.
- 17.- Zhang, J.M., Cowell, J.L., Steven, A.C., Carter, P.H., McGrath, P.P., et al. (1986). Proc. 4th Int. Symp. Pertussis, Geneva-1984. Dev. Biol. Stand. 61:173-86.
- 18.- Mallory, F.B., Honnor, A.A., (1912). J. Med. Res. 27:115-23.
- 19.- Livery, I., Mandlaw, A.C (1984). J. Med. Microbiol 17:91-103.
- 20.- Cowell, J.L., Hewlett, E.L., Manclark, C.R., (1979). Infect. Immun. 25:895-901.
- 21.- Nakase, Y., Endoh, M., (1986). Proc. 4th. Int. Symp. Pertussis, Geneva, 1984. Dev. Biol. Stand. 61:93-102.
- 22.- Irons, L.I., Ashworth, L.A.E., Milton-Smith, P., (1983). J. Gen. Microbiol. 129:2769-78.
- 23.- Sato, Y., Cowell, J.L., Sano, H., Burstyn, D.G., Manclark, C.R. (1983). Infect. Immun. 41:313-20.

- 24.- Le Deen, A., Chaby, R., Szabo, L., (1980). *J. Bacteriol.* **143**:78-88.
- 25.- Moreau, M., Chaby, R., Szabo, L., (1984). *J. Bacteriol.* **159**:611-17.
- 26.- Peppler, M.S., (1984). *Infect. Immun.* **43**:224-32.
- 27.- Peppler, M.S., Schrupf, M.E. (1984). *Infect. Immun.* **43**:217-23.
- 28.- Munoz, J.J., Bergman, R.K., Robbins, K.E. (1978) *Infect. Immun.* **22**:292-294.
- 29.- Minters, A. L., Baggett, D.W., Benjamin, N.R., Brown, H.K., Klein, T. H. (1985). *Infect. Immun.* **47**:587-91.
- 30.- Minters, A.L., Baggett, D.W., Lee, J.D., Sloan, G.L., Lemmon, R.D., et al. (1986). *Proc. 4th Int. Symp. Pertussis, Geneva, (1984). Dev. Biol. Stand.* **61**:233-40.
- 31.- Ayme, G., Caroff, M., Chaby, R., Haeffner-Cavaillon, N., Le Dur, A., et al (1980). *Infect. Immun.* **27**(3):739-45.
- 32.- Girard, R., Chaby, R., Bordenave, G. (1981). *Infect. Immun.* **31**:122-26.
- 33.- Haeffner-cavaillon, N., Cavaillon, J.-M., Szabo, L. (1982) *Cell. Immunol.* **74**:1-13.
- 34.- Haeffner-Cavaillon, N., Cavaillon, J.-m., Moreau, M., Szabo, L. (1984). *Mol. Immunol.* **21**:389-95.
- 35.- Kawai, Y., Moribayashi, H., Yano, I. (1982). *J. Bacteriol.* **152**:907-10.
- 36.- Kawai, Y., Suzuki, K., Hagiwara, T. (1985). *Eur. J. Biochem.* **147**:367-70.

- 37.- Goldman, N. E., Klapper, D.G., Baseman, J.B.
(1982). *Infect. Immun.* 36:782-94.
- 38.- Goldman, N.E. (1985). In *Microbiology-1986*, ed L. Leive,
pp 45-59.
- 39.- Gutherland, E.N. (1972). *Science* 177:401.
- 40.- Rodbell, M., (1980). *Nature (London)* 284:17-22.
- 41.- Gilman, A.G., (1984). *Cell* 36:577-79.
- 42.- Gilman, A.G. (1984). *J. Clin. Invest.* 73:1
- 43.- Lefkowitz, R.L., Canon, M.G., Stiles, G.L. (1984).
N. Engl. J. Med. 310:1570.
- 44.- Hildebrandt, J.D., Codina, J., Risinger, R.,
Birnbosmer, L. (1984). *J. Biol. Chem.* 259:2039.
- 45.- Bokoch, G.M., Katada, T., Nothrup, J.K., Ui, M.,
Gilman, A.G. (1984). *J. Biol. Chem.* 259:3560.
- 46.- Northup, J.K., Smigel, M.D., Sternweis, P.C.,
Gilman, A.G. (1983). *J. Biol. Chem.* 258:11369.
- 47.- Cassel, D., Selinger, Z (1976). *Biochim. Biophys.
Acta* 452:538.
- 48.- Brandt, D.R., Asano, T., Pedersen, S.E., Ross, E.M.
(1983). *Biochemistry* 22:4357.
- 49.- Cassel, D., Selinger, Z. (1978). *Proc. Natl. Acad.
Sci. USA.* 75:4155.
- 50.- Pike, L. J., Lefkowitz, R.L. (1981). *J. Biol. Chem.*
256:2207.
- 51.- Cassel, D., Selinger, Z. (1977). *Proc. Natl. Acad.
Sci. USA* 74: 3307.

- 52.- Burns, D.L., Moss, J., Vaughan, M (1982). J. Biol. Chem. 257:32.
- 53.- Burns, D.L., Moss, J., Vaughan, M. (1983). J. Biol. Chem. 258:1116.
- 54.- Northup, J.K., Sternweis, P.C., Gilman, A.G. (1983). J. Biol. Chem. 258:11361.
- 55.- Katada, T., Northup, J.K., Bokoch, G.M., Ui, M., Gilman, A.G. (1984) J. Biol. Chem. 259:3578.
- 56.- Katada, T., Bokoch, G.M., Smigel, M.D., Ui, M., Gilman, A.G. (1984). J. Biol. Chem. 259:3586.
- 57.- Hildebrandt, J.D., Sekura, R.D., Codina, J., Iyengar, R., Manclark, C.R., Birnbaumer, L. (1983). Nature. (London) 302:706.
- 58.- Motulsky, H.J., Insel, P.A. (1983). FEBS Lett. 164:13.
- 59.- Aktories, K., Schultz, G., Jakobs, K.H. (1981). FEBS Lett 130:235.
- 60.- Michel, T., Lefkowitz, R.J. (1982). J. Biol. Chem. 257:13557.
- 61.- Murayama, T., Ui, M. (1983). J. Biol. Chem. 258:3319.
- 62.- Tamura, M., Hagiwara, K., Murai, S., Yajima, M., Ito, K., Katada, T., Ui, M., Ishii, S. (1982) Biochem. J. 21:5516-5522.
- 63.- Katada, T., Ui, M. (1982). Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 79:3129.
- 64.- Katada, T., Ui, M. (1982). J. Biol. Chem. 257:7210.

- 65.- Manning, D.R., Fraser, B.A., Kahn, R.A., Gilman, A.G. (1984). *J. Biol. Chem.* 259:749.
- 66.- Watkins, P.A., Moss, J., Burns, D.L., Hewlett, E.L., Vaughan, M. (1984). *J. Biol. Chem.* 259:1378.
- 67.- Tamura, M., Nogimori, K., Murai, S., Yajima, M., Ito, K., Katada, T., Ui, M., Ishii, S. (1982). *Biochemistry.* 21:5516.
- 68.- Sekura, R.D., Fish, F., Mandlark, C.R., Meade, B., Zhang, Y.L. (1983). *J. Biol. Chem.* 258:14847.
- 69.- Katada, T., Ui, M. (1980). *J. Biol. Chem.* 255:9580.
- 70.- Hazeki, O., Ui, M. (1981). *J. Biol. Chem.* 256:2856.
- 71.- Katada, T., Ui, M. (1981). *J. Biol. Chem.* 256:8310.
- 72.- Tamura, M., Nogimori, K., Yajima, M., Ase, K., Ui, M. (1983). *J. Biol. Chem.* 258:8758-8761.
- 73.- Sunyer, T., Codina, J., Birnbaumer, L. (1984). *J. Biol. Chem.* 259:15447-51.
- 74.- Kurose, H., Katada, T., Amano, A., Ui, M. (1983). *J. Biol. Chem.* 258:4870.
- 75.- Boyer, J.L., Garcia, A., Posadas, C., Garcia-Sainz, J.A. (1984). *J. Biol. Chem.* 259: 8076.
- 76.- Garcia-Sainz, J.A., Boyer, J.L., Michel, D., Sawyer, G.L., Dohmen, H., Lefkowitz, R.L. (1984). *FEBS Lett.* 172:95.
- 77.- Kurose, H., Ui, M. (1984). *J. Cycl. Nucl. Prot. Phosph. Res.* 9:305
- 78.- Boyer, J.L., Martinez-Carcano, M., Honroy-Sánchez, J.A., Posadas, C., Garcia-Sainz, J.A. (1986). *Eur. J. Pharm.* 127:49.

- 79.- Boyer, J.L., Martínez-Cárcamo, M., Monroy-Sánchez, J.A., Juárez-Ayala, J., Pastelín, G., Posadas, C., García-Sáinz, J.A. (1986). *Life Sciences*. 39:603.
- 80.- Gulbenkian, A.L., Schobert, C. Nixon e IA Tabachnick. (1968) *Endocrinol* 83:885-892.
- 81.- Sumi, Y., Ui, M. (1975). 97:352-358.
- 82.- Katada, T., Ui, M. (1979). *J. Biol. Chem.* 254:469-479.
- 83.- Martínez-Olmedo, M.A., García-Sáinz, J.A. (1984). 99:115-118.
- 84.- Moreno, F.L., Mills, I., García-Sáinz, J.A., Fain, J.N. (1983). *J. Biol. Chem.* 258:10938-10943.
- 85.- Fain, J.N., O'Donnell, J., García-Sáinz, J.A. (1983). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 116:651-656.
- 86.- Murayama, T., Ui, M. (1984). *J. Biol. Chem.* 259:761-769.
- 87.- García-Sáinz, J.A., Torner, L. (1985) *Biochem. J.* 232:439-443.
- 88.- Schwabe, U., Ebert, R., Erbier, H.C. (1975) *Adv. Cyclic. Nucl. Res.* 5:559.
- 89.- Fain, J.N., Malbon, C.C. (1979). *Mol. Cell. Biochem.* 25:143.
- 90.- García-Sáinz, J.A. (1981) *FEBS Lett.* 126:306.
- 91.- Villalobos-Molina, R., García-Sáinz, J.A. (1981). *life Sci.* 29:1021.
- 92.- García-Sáinz, J.A., Juárez-Ayala, J., Valles, O. (1987). *Toxicol* (En prensa).
- 93.- Fain, J.N., García-Sáinz, J.A. (1980). *Life. Sci.* 26:1193.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- 94.- García-Sáinz, J.A., Hoffman, B.B., Li, S.,
Lefkowitz, R.J., Fain, J.N. (1980) Life Sci. 27:953.
- 95.- García-Sáinz, J.A., Fain, J.N. (1980). Biochem. J.
186:781.
- 96.- García-Sáinz, J.A. (1983) Eur. J. Pharmacol. 87:159.
- 97.- García-Sáinz, J.A. (1981) FEBS Lett 126:305-308.
- 98.- Pushpendran, C.K., Corvera, S., García-Sáinz, J.A.
(1983) FEBS Lett. 140:199.
- 99.- Kather, H., Aktories, K., Schultz, G., Jakobs, K.H.
(1983) FEBS Lett. 161:149.
- 100.- Houslay, M.D. (1983) Nature 303:133.
- 101.- García-Sáinz, J.A., Juárez-Ayala, J. (Trabajo
enviado a publicación).
- 102.- Kayler, K.F., Fishel, C.H. (1967). J. Bacteriol.
94:804.
- 103.- Tabachnick, I.I.A., Gulbenkian, A. (1969). Eur. J.
Pharmacol. 7:196.
- 104.- Sen, D.R., Arora, S., Gupta, S., Sanyal, R.K.
(1971). J. Allergy Clin. Immunol. 54:25.
- 105.- Badr-El-Din, M.K., Aref, G.H., Mazloum, H., El-
Towesy, Y.A., Kassem, A.S., Abdel-Honeim, M.A., Amr-
Abbasey, A (1976). J. Trop. Med. Hyg 79: 213.
- 106.- Timmermans, P.B.M.H.M., Van Zwieten, P. (1980) Eur.
J. Pharmacol. 63:199.
- 107.- Van Meel, J.C.A., De Jonge, A., Kackman, H.O.,
Milffert, B., Timmermans, P.B.M.H.M., Van Zwieten, P.A.
(1981).Eur. J. Pharmacol. 69:205.

- 108.- Boyer, J.L., Cárdenas, C., Posadas, C., García-Sáinz, J.A (1983). *Life Sci.* **33**:2627.
- 109.- Keeton, T.K., Campell, N.B., (1981) *Pharmacol. Rev.* **31**:81.
- 110.- Pedraza-Chaverrí, J., García-Sáinz, J.A. (1984). *Life Sci.* **35**:1633.
- 111.- Anderson, R.J., Wilson P.D., Dillingham, M.A., Bruckner, U., Schwertschlag, U., García-Sáinz, J.A. (1985) *Kidney Internatl.* **27**:252.
- 112.- Collier, H.O.J. (1980) *Nature* **283**:625.
- 113.- Luján, M., López, E., Ramírez, R., Aguilar, H., Martínez-Olmedo, M.A., García-Sáinz, J.A. (1984) *Eur. J. Pharmacol.* **100**:377.
- 114.- García-Sáinz, J. A (1985) *Ciencia* **36**:97-103
- 115.- Robinson, A., Iron, L.I. (1983) *Infect. Immun.* **40**:523-528.
- 116.- Muñoz, J.J., Anai, H., Cole, R.L. (1981). *Infect. Immun.* **32**:243-250.
- 117.- Sato, H., Sato, Y. (1984) *Infect. Immun.* **46**:415-421.
- 118.- García-Sáinz, J.A., Ruiz-Puente, J., Jiménez-Paredes, J., González-Pacheco, M., Villalva-Posada, H. (1985) *Vaccine* **3**:23-26.
- 119.- García-Sáinz, J.A., Ruiz-Puente, J., Juárez-Ayala, J., Jiménez-Paredes, J., Quiroga, I., Hernández-Puga, A., Villalva-Posada, H. (1985). *Simpósio en el uso de vacunas 1985-1985* (eds. Juan Garza Ramos y Guadalupe Franco de Guzman) p.116. México.

- 120.- Hokin, M.R., Hokin, L.E. (1953). *J. Biol. Chem.* 203:967-977.
- 121.- Michell, R.H. (1975). *Biochim. Biophys. Acta* 415:81
- 122.- Michell, R.H., Jafferji, S.S., Jones, L.M. (1976) *FEBS Lett.* 69:1-5.
- 123.- Michell, R.H., Jafferji, S.S., Jones, L.M. (1977) in *Function and Biosynthesis of Lipids* (Bazan, N.G., Brenner, R.R., Giusto, N.M. eds) pp 447-464. Plenum, New York.
- 124.- Michell, R.H., Jones, L.M., Jafferji, S.S. (1977). *Biochem.Soc.Trans.* 5:77-882.
- 125.- Jones, L.M., Michell, R.H. (1978). *Biochem. Soc. Trans.* 6:673-688.
- 126.- Lepetina, E.G., Michell, R.H. (1973) *FEBS Lett.* 31:1.
- 127.- Durell, J., Garland, J.T., Friedel, R.O. (1969). *Science* 165:862-866.
- 128.- Michell, R.H. (1979) *Trends Biochem. Sci.* 4:128-131.
- 129.- Fain, J.N., Berridge, M.J. (1979). *Biochem. J.* 182:669-76.
- 130.- Cockcroft, S. (1987). *TIBS* 12:75.
- 131.- Nishizuka, Y. (1983) *Trends Biochem. Sci.* 8:13-16.
- 132.- Spat, A., Fabiato, A., Rubin, R.F. (1985). *Biochem. J.* 233:929-932.
- 133.- Houslay, M.D. (1987). *TIBS* 12:1.
- 134.- Putney, J.W. (1978). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 198:375-384.
- 135.- Joseph, S.K., Coll, K.E., Thomas, A.P., Williamson. J.R. (1985). *J. Biol. Chem.* 260:12508-12515.

- 136.- Hesketh, T.R., Moore, J.P., Morris, J.D.H., Taylor, M.U., Rogers, J., Smith, G.A., Metcalfe, J.C. (1985) *Nature* **313**:481-484.
- 137.- Putney, J.W. (1986). *Cell Calcium* **7**:1-12.
- 138.- Irvine, R.F., Moor, R.M. (1986) *Biochem. J.* **240**:917-920.
- 139.- May, N.S., Sahyoun, N., Wolf, M., Cuatrecasas, P. (1985). *Nature* **317**:549-551.
- 140.- Wolf, M., Le Vine, H., May, N.S., Cuatrecasas, P., Sahyoun, N (1985) *Nature* **317**:546-549.
- 141.- Wolf, M., Cuatrecasas, P., Sahyoun, N. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**:15718-15722.
- 142.- Inoue, M., Kishimoto, A., Takai, T., Nishizuka, Y. (1977) *J. Biol. Chem.* **252**:7810-7816.
- 143.- Kishimoto, A., Kajikawa, N., Shiota, M., Nishizuka, Y (1983) *J. Biol. Chem.* **258**:1156-1164.
- 144.- Jakobs, K.H., Bauer, S., Hatanabe, T. (1985). *Eur. J. Biochem.* **151**:425-430.
- 145.- Katada, T., Gilman, A.G., Hatanabe, T., Bauer, S., Jakobs, K.H. (1985). *Eur. J. Biochem.* **151**:431-437.
- 146.- Martínez-Olmedo, M.A., García-Sainz, J.A. (1983). *Biochem. Biophys. Act.* **760**:215-220.
- 147.- Murayama, T., Ui, M. (1983). *J. Biol. Chem.* **258**:3319.
- 148.- Olanow, L., Myers, G. A., Pohl, S.L., Hewlett, E.L. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**:6547.
- 149.- Grootuis, G.M.M., Hardonk, M.J., Meijer, D.K.F. (1975) *Trends Pharmacol. Sci.* **6**:322.

- 150.- Hall, M., Taylor, S.J., Saggerson, E.D. (1985) FEBS Lett
179:351-354.
- 151.- Van der Merwe, G., Proietto, J., Jeanrenaud, B. (1985)
Biochem. J. 225:523-527.
- 152.- Garcia-Sainz, J.A., Mendlovic, F., Martinez-Olmedo, M.A.
(1985) Biochem. J. 228:277-280
- 153.- Sibley, D.R., Nambi, P., Peters, J.R., Lefkowitz, R.J.
(1984) Biochem. Biophys. Res. Commun. 121:973-979.
- 154.- Kelliher, D.J., Pessin, J.E., Ruoho, A.E., Johnson, G.L.
(1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:4316-4320.
- 155.- Bell, J.D., Buxton, I.L.O., Brunton, L.L. (1985).
J. Biol. Chem. 260:2625-2628.
- 156.- Cronin, M.J., Summers, S.T., Sorino, M.A., Hewlett,
E.L. (1985) J. Biol. Chem. 261:13932-13935.
- 157.- Sibby, D.R., Jeffs, R.A., Daniel, K., Nambi, P.,
Lefkowitz, R.J. (1986) Arch. Biochem. Biophys. 244:373-
381.
- 158.- Cherqui, G., Canon, M., Niecek, D., Lascols, O., Capeau,
J., Picard, J. (1986) Endocrinology 118:1759-1769.
- 159.- Corvera, S., Garcia-Sainz, J.A. (1984) Biochem. Biophys.
Res. Commun. 119:1126-1132.
- 160.- Garcia-Sainz, J.A. (1985) Trends. Pharmacol. Sci. 6:349-
350.
- 161.- Leeb-Lundberg, L.H.F., Colletchia, S., Lomasney, J.W., De
Bernards, J.F., Lefkowitz, R.J., Canon, M.G. (1985)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:5651-5655.
- 162.- Corvera, S., Schwanz, K.R., Graham, R.H., Garcia-Sainz,
J.A. (1985). J. Biol. Chem. 261:520-526.

- 163.- Monaco, M.E., Mufson, R.A. (1986) *Biochem. J.* 236:171-75
- 164.- Daniel, L.N., Naite, M., Nykie, R.L. (1986) *J. Biol. Chem.* 261:9128-9132.

PERTUSSIS TOXIN INDUCES FATTY LIVER, HYPERLIPEMIA AND KETOSIS IN HAMSTERS

J. ADOLFO GARCÍA-SÁINZ¹, JOSÉ JUÁREZ-AYALA¹ and VICTORIA E. VALLES²

¹Departamento de Bioenergética, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-248; 04510 México, D.F., and

²Departamento de Diabetes y Metabolismo de Lípidos, Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán" México 14000, D.F.

(Accepted for publication 8 December 1986)

J. ADOLFO GARCÍA-SÁINZ, JOSÉ JUÁREZ-AYALA and VICTORIA E. VALLES. Pertussis toxin induces fatty liver, hyperlipemia and ketosis in hamsters. *Toxicon* 25, 603-609, 1987.—Pertussis toxin markedly affects lipid metabolism in hamsters. The toxin induces a time-dependent and dose-dependent accumulation of triacylglycerols in the liver (fatty liver) and moderate increases in cholesterol and phospholipids. This toxin produced dramatic increases in the amounts of triacylglycerols, free fatty acids and ketone bodies in the serum and small increases in cholesterol and phospholipids. It is suggested that an enhanced and unregulated lipolysis may play a key role in the induction of these alterations by the toxin.

INTRODUCTION

ADMINISTRATION of pertussis vaccine to hamsters markedly disturbs their lipid metabolism inducing fatty liver, hyperlipemia and ketosis (VILLALOBOS-MOLINA and GARCÍA-SÁINZ, 1981). It was suggested that this effect could be due to pertussis toxin (VILLALOBOS-MOLINA and GARCÍA-SÁINZ, 1981). Pertussis vaccine is not a purified preparation; it consists of a suspension of dried *Bordetella pertussis* and obviously contains multiple components (ROBINSON *et al.*, 1985). Furthermore, *Bordetella pertussis* produces several toxins some of which have not yet been fully characterized (WARDLAW and PARTON, 1983). Therefore, the role of pertussis toxin has to be experimentally demonstrated.

Pertussis toxin, is an exotoxin produced by *Bordetella pertussis*, which blocks the action of agents whose receptors are coupled in an inhibitory fashion to adenylate cyclase (for reviews see UI, 1984; GARCÍA-SÁINZ, 1985). It has been observed that administration of pertussis vaccine (GARCÍA-SÁINZ, 1981) or purified pertussis toxin (MARTINEZ-OLMEDO and GARCÍA-SÁINZ, 1983) to animals, markedly alters the hormonal responsiveness of their fat cells. The toxin stimulates basal lipolysis which possibly results in the above mentioned alterations of adenylate cyclase activity (GARCÍA-SÁINZ, 1981; MORENO *et al.*, 1983; MURAYAMA and UI, 1983; OLANSKY *et al.*, 1983; GARCÍA-SÁINZ and TORNER, 1985).

We studied the effect of purified pertussis toxin on the lipid metabolism of hamsters. Our results are consistent with what we observed using the whole pertussis vaccine and indicate a causative role of pertussis toxin in these alterations.

MATERIALS AND METHODS

Pertussis toxin was purified from vaccine concentrates as previously described (MARTINEZ-OLMEDO and GARCÍA-SÁINZ, 1983) or by the method of SEKURA *et al.* (1983). Both methods resulted in preparations with

identical activities and potencies, but the second was simpler and faster. Beta-hydroxybutyrate dehydrogenase, co-enzymes and 1-nitroso 2-naphthol were obtained from Sigma Chemical Company. Other chemicals used were analytical reagents.

Male golden hamsters fed *ad libitum* were administered pertussis toxin i.p. in a volume of 0.25-0.50 ml. Control animals were injected with the same amount of the vehicle in which the toxin was dissolved. Hepatic and serum triacylglycerols were quantified by the method of GOTTFRIED and ROSENBERG (1973) free fatty acids according to the method of NOVAK (1965). Blood ketone bodies were quantified enzymatically (MELLANBY and WILLIAMSON, 1965; WILLIAMSON and MELLANBY, 1965). Cholesterol and total phospholipids were quantified by standard methods (BARTLETT, 1959; WYBENGA and INKPEN, 1974).

Electrophoresis of serum lipoproteins was performed according to the procedure of LEES and HATCH (1963). In order to visualize the accumulation of lipids in the liver, sections of the organ were processed for optical microscopy using the oil red O staining method. Statistical significance between comparable groups was determined by the Student's *t*-test.

RESULTS

Administration of Pertussis toxin to hamsters produced marked color changes in the liver in 2-3 days, as previously observed with the whole cell vaccine (VILLALOBOS-MOLINA and GARCÍA-SÁINZ, 1981). This change in color is mainly due to an accumulation of lipids in the hepatocytes (fatty liver). Figure 1 presents the dose-response curve for this effect; it can be observed that administration of 1-10 μg of pertussis toxin/100 g body weight produced only small increases in the amount of triacylglycerols in the liver, i.e. a 25% increase with 1 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ (statistically insignificant) and a 32% increase with 10 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ ($P < 0.001$ as compared to the controls). However, higher doses produced a much more dramatic accumulation of triacylglycerols in the liver: a 7-fold increase in liver triacylglycerols with 30 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ and a 12.5-fold increase with 100 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ (Fig. 1). The

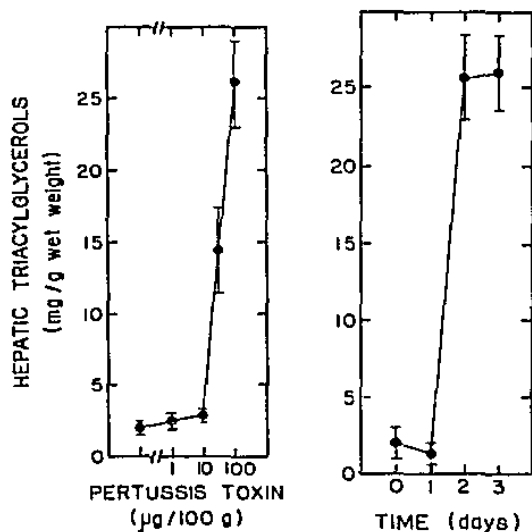


FIG. 1. EFFECT OF PERTUSSIS TOXIN ON HEPATIC TRIACYLGLYCEROLS. Left: Hamsters were injected with different doses of pertussis toxin and sacrificed 72 hr after its administration. Plotted are the means \pm S.E.M. (5-10 animals). Right: Hamsters were injected with 100 μg of pertussis toxin/100 g body weight and sacrificed at the times indicated. Plotted are the means \pm S.E.M. (5-10 animals).

TABLE 1. EFFECT OF PERTUSSIS TOXIN ON HEPATIC LIPIDS

Lipid	Control	Pertussis
Triacylglycerols (mg/g wet weight)	2.05±0.13 (6)	26±3* (6)
Cholesterol (µg/g wet weight)	194±1 (10)	253±1* (20)
Phospholipids (mg P/g wet weight)	0.65±0.03 (20)	0.78±0.04†

Hamsters were sacrificed two days after they were injected with pertussis toxin (100 µg/100 g). Results are the means ± S.E.M. with the number of animals in parenthesis.

*P < 0.001 compared to the control group.

†P < 0.01 compared to the control group.

effect of higher doses is not presented since only a few experiments were performed due to the expenses involved and the high mortality observed.

The results described above were obtained in animals treated with the toxin 3 days before the determinations. The time-course of the effect is also presented in Fig. 1. It can be observed that even 2 days after the administration of the toxin the animals have a maximal accumulation of triacylglycerols. The amount of other lipids was also increased in the liver of hamsters treated with pertussis toxin. Thus, cholesterol increased ≈30% and total phospholipids ≈20% (Table 1). Staining with oil red of thin sections of the liver showed clearly the toxin-induced accumulation of lipids in the liver; most of the lipids accumulated in the periportal zone (not shown).

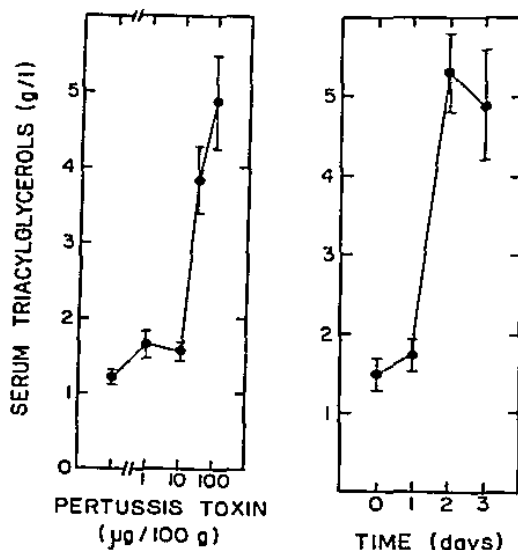


FIG. 2. EFFECT OF PERTUSSIS TOXIN ON SERUM TRIACYLGLYCEROLS. Indications as in Fig. 1. Conditions as in Fig. 1.

TABLE 2. EFFECT OF PERTUSSIS TOXIN ON SERUM LIPIDS AND KETONE BODIES

Parameter	Control	Pertussis
Triacylglycerols (g/l)	1.24±0.07 (5)	5.29±0.48* (6)
Free fatty acids (mEq/L)	1.04±0.21 (10)	3.30±0.31* (20)
Cholesterol (mg/100 ml)	52±4 (15)	80±9† (18)
Phospholipids (mg P/100 ml)	3.34±0.16 (20)	6.67±0.36* (30)
Acetoacetate (μmol/100 ml)	27±7 (5)	432±22* (5)
Hydroxybutyrate (μmol/100 ml)	29±4 (10)	711±4* (10)

Hamsters were sacrificed two days after they were injected with pertussis toxin (100 μg/100 g). Results are the means ± S.E.M. with the number of animals in parenthesis.

*P < 0.001 compared to the control group.

†P < 0.05 compared to the control group.

In order to obtain more information on the changes in the lipid metabolism induced by pertussis toxin, the amount of lipids and ketone bodies in serum were quantified. Figure 2 presents the responses to the toxin and the time-course of the effect on the amount of triacylglycerols in serum. In general, the changes observed in serum parallel those in the liver. However, it should be mentioned that with as little as 1 μg of toxin per 100 g body weight a significant ($P < 0.02$) increase in serum triacylglycerols was observed.

The administration of the toxin also increases serum cholesterol (≈50%) phospholipids (≈2-fold) free fatty acids (≈3-fold) and ketone bodies (≈20-fold) (Table 2). These changes in serum lipids were associated with a significantly altered electrophoretic pattern of lipoproteins (Fig. 3). It was observed that administration of the toxin increased the relative amount of beta lipoproteins whereas it decreased that of alpha lipoproteins (Fig. 3).

DISCUSSION

The present results clearly indicate that administration of pertussis toxin induces marked alterations in the lipid metabolism. The alterations were similar to those described previously with the whole vaccine (VILLALOBOS-MOLINA and GARCÍA-SÁINZ, 1981) which suggest that pertussis toxin is the component of the vaccine responsible for these effects.

In vivo, lipolysis is regulated through a balance between activation and inhibition of lipolysis. The action of most of the endogenous inhibitors of lipolysis, such as adrenaline through alpha₂-adrenoceptors, adenosine through R_i-receptors and prostaglandins is inhibited (GARCÍA-SÁINZ, 1981; MARTÍNEZ-OLMEDO and GARCÍA-SÁINZ, 1983; MORENO *et al.*, 1983; MURAYAMA and Ui, 1983; OLANSKY *et al.*, 1983; GARCÍA-SÁINZ and TORNER, 1985) and the action of activators of lipolysis is enhanced by the toxin (GARCÍA-SÁINZ, 1981; MARTÍNEZ-OLMEDO and GARCÍA-SÁINZ, 1983; MORENO *et al.*, 1983; MURAYAMA and Ui, 1983; OLANSKY *et al.*, 1983; GARCÍA-SÁINZ and TORNER, 1985). It is



FIG. 3. ELECTROPHORETIC PATTERN OF SERUM LIPOPROTEINS OF CONTROL AND PERTUSSIS TOXIN TREATED HAMSTERS. Pertussis toxin 100 μ g/100 g body weight was administered 48 hr before sacrifice. Representative of 5 determinations with identical results.

possible that the enhanced lipolysis (evidenced by the increased level of free fatty acids in serum) may play a key role in the genesis of the alterations. It is known, that the uptake of fatty acids by the liver is proportional to the concentration to which it is exposed. Thus, the increased level of free fatty acids in serum might increase their uptake and metabolism by the liver. Fatty acids can be either oxidized or esterified; both processes seem to be markedly activated in pertussis toxin-treated hamsters as reflected by the serum level of ketone bodies and triacylglycerols and the induction of fatty liver.

The accumulation of triacylglycerols in the liver suggests that the synthesis of these lipids exceeded the liver capacity of secretion. No effect of pertussis toxin-treatment was observed on the synthesis of proteins as reflected by the incorporation of [3 H]-leucine into acid-precipitable material (results not shown). The histologic aspect of the lipid accumulation, i.e. the periportal distribution, resembles that produced by other agents which induce liver cell damage such as carbon tetrachloride (GROOTHUIS *et al.*, 1975). The reason for the alteration in the serum lipoprotein pattern is presently unknown but suggests significant changes in their composition. The increased levels of cholesterol and phospholipids could also be a secondary result of the metabolic alterations mentioned above, i.e. increased availability of metabolic products such as acyl-CoA and hydroxymethyl glutaryl-CoA.

The amount of toxin required to produce these effects is large. We have previously observed that in hamsters 3–10 µg of toxin/100 g of body weight is enough to block the action of agents that inhibit adenylate cyclase in adipocytes (MARTÍNEZ-OLMEDO and GARCÍA-SÁINZ, 1983). However, in these studies adipocytes were mainly obtained from epididymal and perirenal fat pads and no information is available about the effect on adipocytes in other regions. It is possible that a large amount of the adipocytes needs to be affected by the toxin in order to produce these effects. It is also possible that direct effects of the toxin on the liver and other organs (such as endocrine glands) may participate in producing the effects. In addition the possibility that other components of the whole vaccine may magnify the effect of pertussis toxin can not be ruled out.

Pertussis toxin is one of the components of the pertussis vaccines currently available; as mentioned in methods, we purified the toxin from vaccine concentrates. It is clear that the amount of toxin required to produce the effects here described is very large and it is very unlikely that a human being would ever receive such a dose of toxin. However, it should be kept in mind that it is a potentially toxic component and that the conditions of the individual (susceptibility, medication, etc.) or potentiation by other components of the vaccine may lead to metabolic disturbances such as those here described. New acellular vaccines are being developed (SATO *et al.*, 1984; GARCÍA-SÁINZ *et al.*, 1985). The study of metabolic alterations should be considered in the development of safer pertussis vaccines.

Acknowledgements — The authors express their gratitude to Dr ALFONSO CÁRABEZ and Mr JORGE SEPÚLVEDA for performing the optical microscopy studies. We also thank Ms GUADALUPE RAMÍREZ for skillfully typing the manuscript. J.A. GARCÍA-SÁINZ is a 1985 Guggenheim Fellow. This research was partially supported by a Grant from CONACyT (PCSABNA 22620).

REFERENCES

- BARTLETT, G.R. (1959) Phosphorus assay in column chromatography. *J. biol. Chem.* **234**, 466.
- GARCÍA-SÁINZ, J.A. (1981) Decreased sensitivity to alpha-adrenergic amines, adenosine and prostaglandins in white fat cells from hamsters treated with pertussis vaccine. *FEBS Lett.* **126**, 306.
- GARCÍA-SÁINZ, J.A. (1985) Effect of pertussis toxin on the hormonal responsiveness of different tissues. In: *Pertussis Toxin*, p. 205, SEKURA, R. (MOSS, J. and VAUGHAN, M., Eds). New York: Academic Press.
- GARCÍA-SÁINZ, J.A. and TORNER, M.L. (1985) Rat fat cells have three types of adenosine receptors (Ra, Ri and P). Differential effects of pertussis toxin. *Biochem. J.* **232**, 439.
- GARCÍA-SÁINZ, J.A., RUIZ-PUENTE, J., JIMÉNEZ-PAREDES, J., GONZÁLEZ-PACHECO, M. and VILLALVA-POSADA, H. (1985) Comparative biological activities of whole cell pertussis vaccine and a new acellular preparation. *Vaccine* **3**, 23.
- GOTTFRIED, S.P. and ROSENBERG, B. (1973) Improved manual spectrophotometric procedure for determination of serum triglycerides. *Clin. Chem.* **19**, 1077.
- GROOTHUIS, G.M.M., HARDONK, M.J. and MEIJER, D.K.F. (1975) Hepatobiliary transport of drugs: do periportal and perivenous hepatocytes perform the same job? *Trends Pharmac. Sci.* **6**, 322.
- LEES, R.S. and HATCH, F.I. (1963) Sharper separation of lipoprotein species by paper electrophoresis in albumin containing buffer. *J. Lab. clin. Med.* **61**, 418.
- MARTÍNEZ-OLMEDO, M.A. and GARCÍA-SÁINZ, J.A. (1983) Effect of pertussis toxin on the hormonal regulation of cyclic AMP levels in hamster fat cells. *Biochim. biophys. Acta* **760**, 215.
- MELLANBY, J. and WILLIAMS, D.H. (1965) Acetoacetate. In *Methods of Enzymatic Analysis*, p. 454 (BERGMAYER, H.U., Ed.). New York: Academic Press.
- MORENO, F.J., MILLS, I., GARCÍA-SÁINZ, J.A. and FAIN, J.N. (1983) Effect of pertussis toxin treatment on the metabolism of rat adipocytes. *J. biol. Chem.* **258**, 10938.
- MURAYAMA, T. and Uti, M. (1983) 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.* **258**, 3319.
- NOVAK, M. (1965) Colorimetric ultramicro method for the determination of free fatty acids. *J. Lipid. Res.* **6**, 431.
- OLANSKY, L., MYERS, G.A., POHL, S.L. and HEWLETT, E.L. (1983) Promotion of lipolysis in rat adipocytes by pertussis toxin; reversal of endogenous inhibition. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.* **80**, 6547.

- ROBINSON, A., IRONS, L.I. and ASHWORTH, L.A.E. (1985) Pertussis vaccine: present status and future prospects. *Vaccine* **3**, 11.
- SATO, Y., KIMURA, M. and FUKUMI, H. (1984) Development of a pertussis component vaccine in Japan. *Lancet* **1**, 122.
- SEKURA, R.D., FISH, F., MANCLARK, C.R., MEADE, B. and ZHANG, Y-L. (1983) Pertussis toxin. Affinity purification of a new ADP-ribosyltransferase. *J. biol. Chem.* **258**, 14647.
- UI, M. (1984) Islet-activating protein, pertussis toxin: a probe for functions of the inhibitory guanine nucleotide regulatory component of adenylate cyclase. *Trends Pharmac. Sci.* **7**, 277.
- VILLALOBOS-MOLINA, R. and GARCÍA-SÁINZ, J.A. (1981) Effects of pertussis vaccine on the lipid metabolism of hamsters. *Life Sci.* **29**, 1021.
- WARDLAW, A.C. and PARTON, R. (1983) Bordetella pertussis toxins. *Pharm. Ther.* **19**, 1.
- WILLIAMSON, D.H. and MELLANBY, J. (1965) Beta-hydroxybutyrate. In: *Methods of Enzymatic Analysis*, p.459 (BERGMEYER, H.U., Ed.). New York: Academic Press.
- WYBENGA, D.R. and INKPEN, J.A. (1974) *Lipids in Clinical Chemistry: Principle and Technics*, p. 1421 (HENRY, R.J., CANNON, D.C. and WINKELMAN, J.W., Eds). New York: Harper and Row.

Recibido: 16 de marzo de 1987
Aceptado: 18 de junio de 1987

Received: march 16th, 1987
Accepted: June 18th, 1987

JOSE JUAREZ-AYALA
ADOLFO GARCIA-SAINZ

el forbol miristrato acetato no altera la rama inhibitoria de la adenilato ciclasa en adipocitos de hamster.

José Juárez-Ayala y Adolfo García Sainz, Departamento de Bioenergética, Instituto de Fisiología Celular Universidad Nacional Autónoma de México.

Solicitud de sobretiros: (request for reprints): *J.A. García-Sainz*, Instituto de Fisiología Celular; Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-600, 04510 México, D.F. MEXICO.

phorbol myristate acetate does not impair the inhibitory branch of adenylate cyclase in hamster adipocytes

Resumen

La activación de alfa₁-adrenoreceptores o R1-adenosinreceptores en células adiposas disminuyó considerablemente la acumulación de AMP cíclico inducido por el agonista beta-adrenérgico isoprenalina. Esta acción casi fue abolida en células de hamster tratadas con toxina de la tosferina. El ester forbol activo, forbol 12-miristrato 13 acetato, fue incapaz de reproducir el efecto de la toxina en este modelo. Los datos indican que la activación de la proteínaquinasa C en este modelo celular no altera la rama inhibitoria de la adenil ciclasa.

Abstract

Activation of alpha₁-adrenoceptors or R1-adenosine receptors in fat cells markedly decreased the accumulation of cyclic AMP induced by the beta-adrenergic agonist, isoprenaline. This action was nearly abolished in cells from pertussis toxin-treated hamsters. The active phorbol ester, Phorbol 12-myristate 13-acetate, was unable to reproduce the effects of the toxin in this model. The data indicate that activation of protein kinase C in this cellular model does not impair the inhibitory branch of adenylate cyclase.

The activity of adenylate cyclase is modulated by activatory and inhibitory receptors coupled to adenylate cyclase through the guanine nucleotide-binding regulatory proteins (Ns and Ni). During the last five years, the action and the mechanism of action of pertussis toxin, an exotoxin produced by *Bordetella pertussis*, have been extensively studied.¹ This toxin catalyzes the ADP-ribosylation of the alpha subunit of Ni and thus, blocks the actions of inhibitory receptors¹ on adenylate cyclase. In some cells an enhancement by pertussis toxin-treatment of the actions of activatory receptors has been observed.¹

Phorbol esters are a series of tumor promoters that act through the activation of protein kinase C.² The activity of this protein kinase plays a key role in modulating the cell responsiveness to a variety of hormones, neurotransmitters and autacoids.³ Recently, Jakobs and coworkers⁴ reported that phorbol esters impair the hormone-sensitive inhibitory pathway of platelet adenylate cyclase. This effect seems to be due to protein kinase C-catalyzed phosphorylation of Ni.²

Hamster adipocytes are one of the most widely used models for studying adenylate cyclase; these cells have receptors coupled to adenylate in both activatory and inhibitory fashions (see⁵) and the guanine nucleotide-binding regulatory proteins Ns, Ni and No.⁶ We studied comparatively the actions of pertussis toxin and the active phorbol ester, phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) on the hormonal regulation of adenylate cyclase; our results indicate that PMA is unable to mimic the actions of pertussis toxin in hamster adipocytes.

Materials and methods

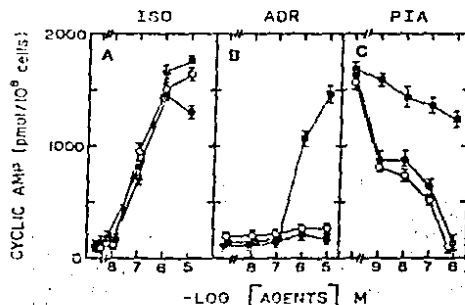
(—) Adrenaline, (—) isoprenaline, theophylline, adenosine deaminase (150-200 units per mg protein) and PMA were obtained from Sigma Chemical Co. *N*-Phenylisopropyl adenosine was from Boehringer. Bovine serum albumin (fraction V) and collagenase (type II) were obtained from Reheis and Cooper Biomedical respectively. [³H] Adenosine 3'5' cyclic phosphate was from New England Nuclear. Pertussis toxin was purified from pertussis vaccine concentrates (generously provided by the National Institute of Hygiene of Mexico) as described.⁵

Male hamsters (≈ 100 g body weight), fed *ad libitum* were used. Pertussis toxin (10 μ g/100 g) was administe-

red i.p. 3 days before sacrifice.⁵ Adipocytes were isolated from pieces of adipose tissue by the use of collagenase as described,⁵ the cells were incubated in Krebs Ringer phosphate buffer of the following composition: 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.2 mM MgSO₄, 1.2 mM CaCl₂, 10 mM NaH₂PO₄ supplemented with 3 per cent bovine serum albumin. The buffer was prepared freshly each day and adjusted to pH 7.4 with NaOH. The cells (approx. 10⁶ cells) were incubated at 37°C with 0.5 μ g of adenosine deaminase, 100 μ M theophylline in a total volume of 1 ml. After 10 min the incubation was terminated by the addition of 2 mM HCl and cyclic AMP determined as described.⁵

Results

In fat cells activation of beta-adrenoceptors results in a marked increase in the concentration of cyclic AMP. It can be observed in Fig. 1, (panel A) that isoprenaline, a pure beta-adrenergic agonist, induces a dose-dependent increase in cyclic AMP levels in adipocytes. Neither PMA nor pertussis toxin-treatment alter significantly the response to the beta-adrenergic agonist (Fig. 1, panel A).



the actions of isoprenaline (panel A) Adrenaline (Panel B) and phenylisopropyl adenosine (Panel C) on cyclic amp levels in hamster adipocytes.

Adipocytes from pertussis toxin-treated hamsters (closed square) or cells from control animals in the absence (closed circle) or presence of 10⁻⁶ M PMA (open circles) were incubated in the presence of different concentrations of isoprenaline (ISO) (panel A), adrenaline (ADR) (panel B) or with 10⁻⁶ M isoprenaline plus different concentrations of phenylisopropyl adenosine (PIA) (panel C). Plotted are the means and vertical lines represent the S.E.M. of 6-8 different cell preparations.

Hamster fat cells⁹ as human fat cells¹⁰ have both alpha₁ and beta-adrenergic receptors. Alpha₁-adrenoceptors inhibit adenylate cyclase^{9,11} and therefore oppose the beta-adrenergic action. It can be observed that adrenaline, which has both alpha₁ and beta-adrenergic activity, induces a small accumulation of cyclic AMP in fat cells (Fig. 1, panel B). In contrast, the full beta-adrenergic effect of adrenaline can be observed when the alpha₁-adrenergic action is blocked by inducing the ADP-ribosylation of Ni with pertussis toxin (Fig. 1, panel B). It can also be observed in this figure that PMA was completely unable to reproduce the action of pertussis toxin.

In order to further document the findings, the actions of an activator of Ri-adenosine receptors (phenylisopropyladenosine), which also inhibits adenylate cyclase activity, was studied. In these studies the accumulation of cyclic AMP was stimulated with 10⁻⁶ M isoprenaline; it can be observed that in control cells phenyl-isopropyl-adenosine markedly and in a concentration dependent manner decreased the accumulation of cyclic AMP (Fig. 1, panel C); as expected, this effect was nearly abolished in cells from hamsters treated with pertussis toxin (Fig. 1, panel C). PMA was again unable to reproduce the effect of pertussis toxin (Fig. 1, panel C). Pretreatment of the adipocytes for 10-60 min with PMA (before the addition of PIA and/or the adrenergic agents) was also unable to mimic the actions of pertussis toxin (data not shown).

Discussion

The present results using adipocytes differ from those of Jakobs and coworkers⁴ with platelets. These authors have presented clear evidence of impairment of the inhibitory pathway of adenylate cyclase by PMA (blockade of the inhibitory action of GTP and

the alpha₁-adrenergic effect of adrenaline). Furthermore, Katada *et al.*³ have shown that purified protein kinase C induces the phosphorylation of a Mr = 41 KDa protein and suggested that the alpha subunit of Ni may be a physiological substrate of protein kinase C. The reason for the difference between our results and those of Jakobs *et al.*,⁴ is presently unknown. Absence of this protein kinase in adipocytes seems to be an unlikely explanation; protein kinase C is widely distributed among tissues¹² and effects of phorbol esters, likely due to protein kinase C activation, have been reported in adipocytes.^{13,14}

The actions of phorbol esters seem to vary significantly among tissues. Thus, it has been reported that phorbol esters block alpha₁-adrenergic actions in hepatocytes, smooth muscle and hippocampal slices but not in rabbit aorta.^{15,16}

Similarly, the actions of phorbol esters on adenylate cyclase vary markedly. In platelets these agents impair the hormone-sensitive inhibitory pathway.^{4,5} Phorbol esters can also magnify the action of agents that stimulate adenylate cyclase activity^{19,21} through a mechanism different to that of pertussis toxin.²¹ In contrast, in other systems the tumor promoters diminish hormone-stimulated adenylate cyclase activity.^{16,22,23} As shown here, in fat cells no action of these tumor promoters on adenylate cyclase was observed.

Protein kinase C activity seems to modulate the responsiveness of the cells to many external stimuli.³ The variability in the type of responses observed is intriguing. Recently, the isolation of several forms of this protein kinase was reported.²⁴ It is possible that these forms of the enzyme might subserve different functions in the cells and that they could be differentially distributed among tissues.

Referencias References

1. SEKURA, R.D.; MOSS, J.; VAUGHAN, M.: Pertussis toxin, Academic Press, Orlando, U.S.A. 1985 1-250.
2. CASTAGNA, M.; TAKAI, Y.; KAIBUCHI, K.; SANO, K.; KIKKAWA, U.; NISHIZUKA, Y.: *Direct activation of calcium-activated, phospholipid-*

dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. J. Biol. Chem., 1982; 257:7847.

3. NISHIZUKA, Y.: *Studies and perspectives of protein kinase C.* Science, 1986; 233:305.
4. JAKOBS, K.H.; BAUER, S.; WATANABE, Y.: *Modulation of adenylate cyclase of human platelets by*

- phorbol ester. Impairment of the hormone-sensitive inhibitory pathway.* Eur. J. Biochem., 1985; 151:425.
5. KATADA, T.; GILMAN, A.G.; WATANABE, Y.; BAUER, S.; JAKOBS, K.H.: *Protein kinase C phosphorylates the inhibitory guanine-nucleotide-binding regulatory component and apparently suppresses its function in hormonal inhibition of adenylate cyclase.* Eur. J. Biochem., 1985; 151:431.
 6. FAIN, J.N.; GARCIA-SAINZ, J.A.: *Adrenergic regulation of adipocyte metabolism.* J. Lipid Res., 1983; 24:945.
 7. MALBON, C.C.; RAPIEJKO, P.J.; GARCIA-SAINZ, J.A.: *Pertussis toxin catalyzes the ADP-ribosylation of two distinct peptides, 40 kDa and 41 kDa in rat fat cell membranes.* FEBS Lett., 1984; 176:301.
 8. MARTINEZ-OLMEDO, M.A.; GARCIA-SAINZ, J.A.: *Effect of pertussis toxin on the hormonal regulation of cyclic AMP levels in hamster fat cells.* Biochim. Biophys. Acta, 1983; 760:215.
 9. GARCIA-SAINZ, J.A.; HOFFMAN, B.B.; LI, S.; LEFKOWITZ, R.J.; FAIN, J.N.: *Role of alpha₂ adrenoceptors in the regulation of cyclic AMP accumulation in hamster adipocytes.* Life Sci., 1980; 27:953.
 10. BURNS, F.W.; HOFFMAN, P.E.; TERRY, B.E.; BYLUND, D.B.; HOFFMAN, B.B.; HARP, M.D.; LEFKOWITZ, R. J.; GARCIA SAINZ, J.A.: *Pharmacological characterization of adrenergic receptors in human adipocytes.* J. Clin. Invest., 1981; 67:467.
 11. FAIN, J.N.; GARCIA-SAINZ, J.A.: *Role of phosphatidylinositol turnover in alpha₂ effects of catecholamines.* Life Sci., 1980; 26:1183.
 12. KUO, J.F.; ANDERSSON, R.G.G.; WISE, H.C.; MACKERLOVA, L.; SALOMONSSON, I.; BRACKETT, N.L.; KATOH, N.; SHOJI, M.; WRENN, R.W.: *Calcium-dependent protein kinase: widespread occurrence in various tissues and phyla of the animal kingdom and comparison of effects of phospholipid, calmodulin, and dihydropyridine.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1980; 77:7039.
 13. HALL, M.; TAYLOR, S.J.; SAGGERSON, E.D.: *Persistent activity modification of phosphatide phosphohydrolase and fatty acyl-CoA synthase on incubation of adipocytes with the tumour promoter 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate.* FEBS Lett., 1985; 179:351.
 14. VAN DE WERVE, G.; PROIETTO, J.; JEANRENAUD, B.: *Tumour-promoting phorbol esters increase basal and inhibit insulin-stimulated lipogenesis in rat adipocytes without decreasing insulin binding.* Biochem. J., 1985; 225:523.
 15. COERBERA, S.; GARCIA-SAINZ, J.A.: *Phorbol esters inhibit alpha₂-adrenergic stimulation of glycolipolysis in isolated rat hepatocytes.* Biochem. Biophys. Res. Commun., 1984; 119:1128.
 16. GARCIA-SAINZ, J.A.; MENDLOVIC, F.; MARTINEZ-OLMEDO, M.A.: *Effect of phorbol esters on alpha₂-adrenergic-mediated and glucagon-mediated actions in isolated rat hepatocytes.* Biochem. J., 1985; 228:227.
 17. GARCIA-SAINZ, J.A.: *Alpha₂-adrenergic and M₂-muscarinic actions and signal propagation.* Trends Pharmacol. Sci., 6, 349-350.
 18. GARCIA-SAINZ, J.A.; VILLALOBOS-MOLINA, R.; CORVERA, S.; HUERTA-BAHENA, J.; TSUJIMOTO, G.; HOFFMAN, B.B.: *Differential effects of adrenergic agonists and phorbol esters on the alpha₂ adrenoceptors of hepatocytes and aorta.* Eur. J. Pharmacol., 1985; 112:393.
 19. BELL, J.D.; BUXTON, I.L.O.; BRUNTON, L.L.: *Enhancement of adenylate cyclase activity in S49 lymphoma cells by phorbol esters.* J. Biol. Chem., 1984; 259:2625.
 20. HOLLINGSWORTH, E.B.; UKENA, D.; DALY, J.W.: *The protein kinase C activator phorbol-12-myristate-13-acetate enhances cyclic AMP accumulation in pheochromocytoma cells.* FEBS Lett., 1986; 196:131.
 21. CRONIN, M.J.; SUMMERS, S.T.; SORTINO, M.A.; HEWLETT, E.L.: *Protein kinase C enhances growth hormone releasing factor (1-40)-stimulated cyclic AMP levels in anterior pituitary.* J. Biol. Chem., 1986; 261:13932.
 22. HEYWORTH, C.M.; WHELTON, A.D.; KINSELLA, A.R.; HOUSLAY, M.D.: *The phorbol ester, TPA inhibits glucagon-stimulated adenylate cyclase activity.* FEBS Lett., 1984; 170:38.
 23. MEURS, H.; KAUFFMAN, H.F.; TIMMERMANS, A.; VAN AMSTERDAM, F.T.M.; KOETER, G.H.; DE VRIES, K.: *Phorbol 12-myristate 13-acetate induces beta-adrenergic receptor uncoupling and non-specific desensitization of adenylate cyclase in human mononuclear leukocytes.* Biochem. Pharm., 1986; 35:4217.
 24. HUANG, K-P.; NAKABAYASHI, H.; HUANG, F.L.: *Isozymic forms of rat brain Ca²⁺-activated and phospholipid dependent protein kinase.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1986; 83:8535.

EJP 50112

Effect of phorbol esters on the hormonal responsiveness of isolated white fat cells

J. Adolfo García-Sáinz * and José Juárez-Ayala

Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-248, 04510 Mexico D.F., Mexico

Received 18 June 1987, revised MS received 30 October 1987, accepted 10 November 1987

Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) did not alter the basal cyclic AMP accumulation or lipolysis in isolated rat fat cells. Similarly, PMA was unable to modify the cyclic AMP accumulation induced by isoprenaline and forskolin or the inhibition of cyclic AMP accumulation and lipolysis induced by prostaglandin E₂ and phenylisopropiladenosine. PMA inhibited the α_1 -adrenergic increase in the labeling of phosphatidylinositol in a dose-dependent fashion. By itself, PMA was without significant effect on the labeling of phosphatidylinositol and phosphatidylethanolamine but increased the labeling of phosphatidylethanolamine and its precursor phosphatidic acid.

Phorbol esters; α_1 -Adrenoceptors; cAMP; Adipocytes

1. Introduction

Phorbol esters form a series of tumor promoters which induce a great variety of effects in many different cells and tissues. It is currently accepted that most of their actions are produced through the activation of protein kinase C (Castagna et al., 1982). It has been observed that activation of this protein kinase alters hormonal responsiveness in many tissues and that this effect is usually associated with phosphorylation of hormone receptors and transducing proteins. Thus, it has been observed that activation of protein kinase C increases the phosphorylation of the insulin receptor (Takayama et al., 1984), the EGF receptor (Cochet et al., 1984; Davis and Czech, 1984; Iwashita and Fox, 1984), the β -adrenoceptor

(Kelleher et al., 1984; Sibley et al., 1984) and the α_1 -adrenoceptor (Leeb-Lundberg et al., 1985).

In addition, recent data indicate that the activity of the guanine nucleotide binding regulatory protein involved in the inhibition of adenylate cyclase (Ni) is blocked by phorbol esters in the same way as by pertussis toxin (Bauer and Jakobs, 1986; Jakobs et al., 1985; Watanabe et al., 1985). This effect is associated with increased phosphorylation of the α subunit of Ni (Katada et al., 1985).

Fat cells are sensitive to many hormones; they have β -adrenoceptors, α_1 -adrenoceptors, insulin receptors and receptors for EGF. Furthermore, these cells have receptors for several hormones coupled to adenylate cyclase in an inhibitory fashion through Ni. Recently, it was reported that in three cells, as in other models, phorbol esters induce a prompt depletion of protein kinase C activity in the cytosol and the appearance of activity in membrane extracts, i.e. cytosol membrane translocation (Glynn et al., 1986). We now report on the effect of phorbol esters on the hormonal responsiveness of rat adipocytes.

* To whom all correspondence should be addressed: IFC-UNAM, Apartado Postal 70-248, 04510 Mexico, D.F., Mexico.

2. Materials and methods

(-)-Isoprenaline, (-)-adrenaline, adenosine deaminase, prostaglandin E_2 , theophylline, soy bean trypsin inhibitor, phorbol 12-myristate-13-acetate (PMA) and epidermal growth factor (EGF) were obtained from Sigma Chemical Company. N^6 -Phenylisopropyl adenosine (PIA) was obtained from Boehringer Mannheim. Forskolin was from Calbiochem. Collagenase and bovine serum albumin (fraction V) were obtained from Cooper Biomedical and Armour, respectively. [3H]Adenosine 3',5'-cyclic phosphate (32 Ci/nmol) [UL- ^{14}C]glucose (346 mCi/nmol) and [^{32}P]Pi (carrier-free) were obtained from New England Nuclear. Pertussis toxin was purified from vaccine concentrates by the method of Sekura et al. (1983).

Male Wistar rats (approximately 220-250 g) fasted for 24 h were used. Adipocytes were isolated by the method of Rodbell (1964). The cells were isolated and incubated in Krebs-Ringer phosphate buffer supplemented with 3% albumin; the buffer was prepared daily and was adjusted to pH 7.4 with NaOH. Usually, $1-2 \times 10^5$ cells were incubated in a volume of 1 ml. Free fatty acid release was used as an index of lipolysis since no re-esterification takes place under the conditions employed (fasted animals and absence of glucose). Free fatty acids were quantified by the method of Novak (1965). Cyclic AMP accumulation was quantified by the method of Gilman (1970). Lipogenesis was estimated by measurement of the incorporation of [UL- ^{14}C]glucose into lipids as follows: fat cells were incubated in buffer supplemented with 10 mM glucose (containing 1 μ Ci of radioactive glucose per ml) for 60 min; lipids were extracted by the method of Dole and Meinertz (1960) and an aliquot was counted. Phospholipid labeling was studied as described before (García-Sáinz, 1983; García-Sáinz and Fain, 1980). In brief, the cells were incubated in Krebs-Ringer tris buffer containing 10 μ Ci of [^{32}P]Pi per ml for 60 min; cell lipids were extracted with chloroform/methanol (2:1) and phospholipids were separated by one-dimensional thin-layer chromatography. The radioactivity in silica gel scrapings of each phospholipid was counted.

3. Results

3.1. Activation and inhibition of cyclic AMP accumulation

It has been observed that, in some systems, phorbol esters markedly enhance the accumulation of cyclic AMP induced by hormones and neurotransmitters (Bell et al., 1985; Cronin and Canonico, 1985; Nabika et al., 1985; Sibley et al., 1986; Sugden et al., 1985). We found that both isoprenaline and forskolin produced marked dose-dependent increases in cyclic AMP accumulation in fat cells. Phorbol esters failed to alter the response to any of these agents (results not shown).

The inhibition of adenylate cyclase was studied. Both prostaglandin E_2 and PIA inhibited dose dependently the accumulation of cyclic AMP induced by 1 μ M isoprenaline (fig. 1). PMA failed to alter the ability of these two agents to decrease cyclic AMP accumulation (fig. 1). In contrast, the effect of PIA and prostaglandin E_2 was nearly blocked in cells from rats treated with pertussis toxin (fig. 1 and Martínez-Olmedo and García-Sáinz, 1983). A wide range of PMA concentrations (1 nM-10 μ M) had no effect on these parameters (results not shown). In the experiments shown in fig. 1, PMA and the agents tested were present simultaneously with the cells for only 10 min. The possibility was considered that a preincubation with PMA could be required to obtain an effect. However, preincubation of the cells with 1 μ M PMA for as long as 60 min was without effect on these parameters (results not shown).

3.2. Lipolysis

The ability of prostaglandin E_2 and PIA to inhibit the release of free fatty acids induced by 0.5 mM theophylline plus 0.5 μ g/ml adenosine deaminase was tested in control cells, cells incubated with 1 μ M PMA and cells from pertussis toxin-treated rats. Both prostaglandin E_2 and PIA inhibited dose dependently the release of free fatty acids in control cells and PMA was without any effect (fig. 2). Prostaglandin E_2 was unable to alter the release of free fatty acids in cells from pertus-

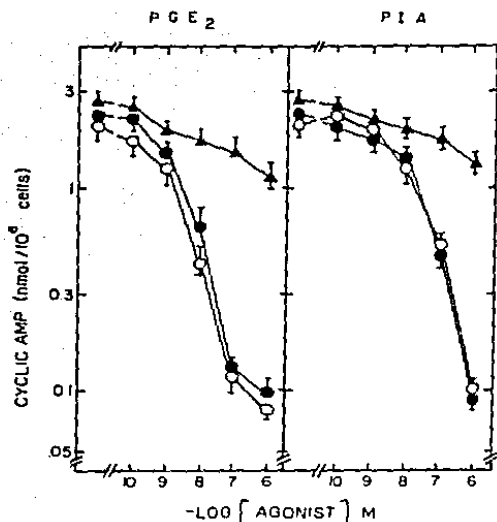


Fig. 1. Effect PMA and pertussis toxin treatment on the inhibition of isoprenaline-induced cyclic AMP accumulation by prostaglandin E₂ (PGE₂) or phenylisopropyl adenosine (PIA). Fat cells were incubated in the presence of 0.5 mM theophylline, 0.5 μ g/ml adenosine, deaminase 10⁻⁶ M isoprenaline and different concentrations of PGE₂ (left panel) or PIA (right panel) for 10 min. Control cells (open circles); 10⁻⁶ M PMA (solid circles); cells from pertussis toxin-treated rats (solid triangles). The basal cyclic AMP was as follows: control cells 90 \pm 16 pmol/10⁶ cells; cells incubated with 10⁻⁶ M PMA 90 \pm 12 pmol/10⁶ cells; cells from pertussis toxin-treated rats 100 \pm 13 pmol/10⁶ cells. The means were plotted and vertical lines represent the S.E.M. of 6-8 determinants on different cell preparations.

sis toxin-treated rats whereas PIA significantly ($P < 0.005$) enhanced lipolysis (fig. 2). This effect of PIA is due to activation of Ra-adenosine receptors in cells from pertussis toxin-treated rats (García-Sáinz and Torner, 1985).

The antilipolytic effect of insulin was also studied and the results are presented in fig. 3. Insulin produced a marked inhibition of lipolysis in control cells and this effect of the peptide hormone was not altered in cells from pertussis toxin-treated rats in agreement with previous findings (Kather et al., 1983; Moreno et al., 1983). In contrast, 1 μ M PMA significantly ($P < 0.001$) re-

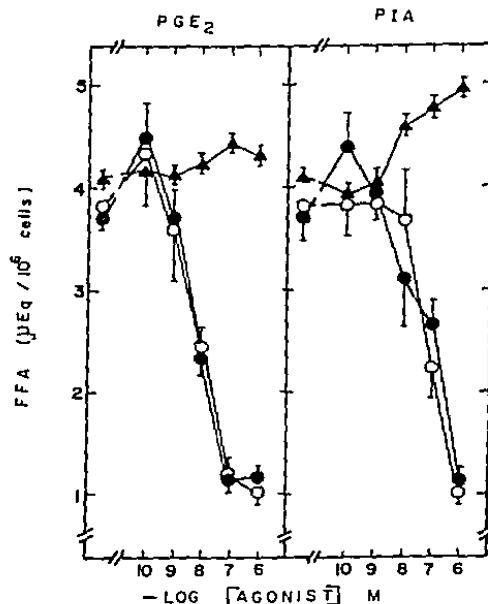


Fig. 2. Effect of PMA and pertussis toxin treatment on the inhibition of free fatty acid release by PGE₂ and PIA. Fat cells were incubated in the presence of 0.5 mM theophylline, 0.5 μ g/ml adenosine deaminase and different concentrations of PGE₂ (left panel) or PIA (right panel). Control cells (open circles); 10⁻⁶ M PMA (solid circles); cells from pertussis toxin-treated rats (solid triangles). The means were plotted and vertical lines represent the S.E.M. of 8-10 determinations on different cell preparations.

duced the antilipolytic effect of insulin and the dose-response curve for insulin became rather flat. PMA itself was without effect on either basal lipolysis or that stimulated by 0.5 mM theophylline plus 0.5 μ g/ml adenosine deaminase (results not shown).

3.3. Lipogenesis

It was consistent with results obtained by others (Cherqui et al., 1986; Van de Werve et al., 1985) that by itself, PMA produced a consistent stimulation of lipogenesis of 49 \pm 5% over basal with a maximal stimulation at a concentration of 1 μ M. Insulin (10 nM) also stimulated lipogenesis dose

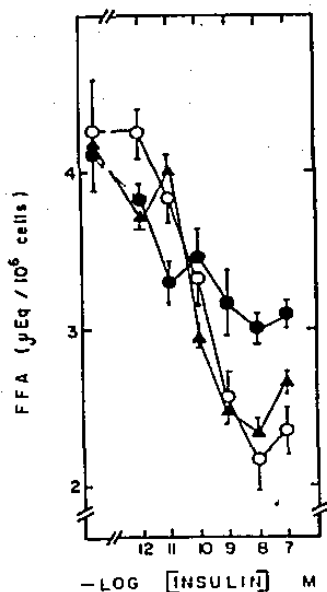


Fig. 3. Effect of PMA and pertussis toxin treatment on the inhibition of free fatty acid release by insulin. Fat cells were incubated in the presence of 0.5 mM theophylline, 0.5 μ g/ml adenosine deaminase and different concentrations of insulin. Control cells (open circles); 10^{-6} M PMA (solid circles); cells from pertussis toxin-treated rats (solid triangles). Other details as in fig. 2.

independently but was much more potent ($188 \pm 15\%$ over basal) than PMA. The effect of insulin was not blocked by PMA and the action of PMA plus insulin was slightly less than additive ($216 \pm 18\%$ over basal).

Haystead and Hardie (1986) recently reported that EGF stimulates lipogenesis in isolated adipocytes. We studied the effect of EGF on this parameter and observed a very small but consistent $17 \pm 2\%$ increase over basal ($P < 0.005$). Interestingly, the effect of maximal effective concentrations of PMA (1μ M) and EGF (10 nM) was additive ($64 \pm 5\%$ over basal).

3.4. Phospholipid labeling

Incubation of fat cells with PMA resulted in a dose-dependent increase in labeling with [32 P]Pi

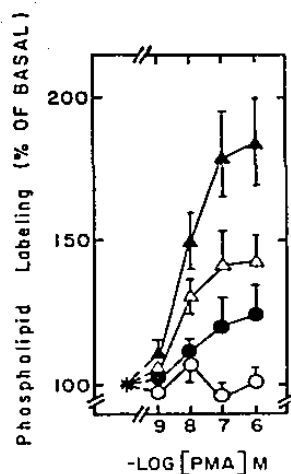


Fig. 4. Effect of PMA on the labeling with [32 P]Pi of different phospholipids. Fat cells were incubated in the absence or presence of different concentrations of PMA. Basal labeling of phospholipids was as follows: phosphatidic acid (closed triangles) 3500 ± 250 cpm/ 10^6 cells; phosphatidylcholine (open triangles) 4510 ± 450 cpm/ 10^6 cells; phosphatidylinositol (closed circles) 2180 ± 150 cpm/ 10^6 cells and phosphatidylethanolamine (open circles) 840 ± 80 cpm/ 10^6 cells. The means were plotted and vertical lines represent the S.E.M. of 8-9 experiments with different cell preparations.

of phosphatidic acid ($\approx 50\%$ increase $P < 0.005$) and phosphatidylcholine ($\approx 80\%$ increase, $P < 0.001$) (fig. 4). No significant effects of PMA were observed on the labeling of phosphatidylinositol and phosphatidylethanolamine (fig. 4).

α_1 -Adrenergic activation markedly stimulates the labeling of phosphatidylinositol in fat cells (García-Sáinz, 1983; García-Sáinz and Fain, 1980). Figure 5 shows the effect of adrenaline on the labeling of phosphatidylinositol and the ability of PMA to block this effect; the inhibitory action of PMA was dose-dependent (fig. 5).

Insulin also stimulates the labeling of phosphatidylinositol in fat cells (De Torregueti and Berthet, 1966; Farese et al., 1982; 1985; 1986; García-Sáinz and Fain, 1980; Stein and Hales, 1974). This stimulation by insulin was not blocked by PMA (results not shown). EGF also slightly stimulated phosphatidylinositol labeling and again

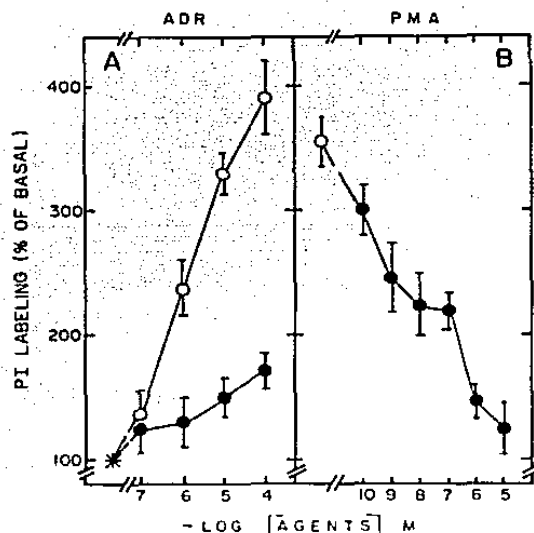


Fig. 5. Effect of adrenaline and PMA on phosphatidylinositol labeling. (A) Cells were incubated in the absence (open circles) or presence of 10^{-6} M PMA (closed circles) and different concentrations of adrenaline. (B) Cells were incubated with 10^{-6} M adrenaline in the absence (open circles) or presence (closed circles) of different concentrations of PMA. Other details as in fig. 4.

the effect was not blocked by PMA (results not shown).

4. Discussion

We now studied the effect of PMA, the most active phorbol ester, on the hormonal responsiveness of isolated rat adipocytes. Significant differences in the effects of phorbol esters have been observed depending on the tissue. In some cells, phorbol diesters promote β -adrenoceptor phosphorylation and adenylate cyclase desensitization (Kelleher et al., 1984; Sibley et al., 1984). In contrast, enhancement of β -adrenergic action has been observed in other cells (Bell et al., 1985; Nabika et al., 1985; Sugden et al., 1985). We observed neither desensitization nor enhancement of the β -adrenergic action in fat cells.

Jakobs and coworkers (Bauer and Jakobs, 1986;

Jakobs et al., 1985; Katada et al., 1985; Watanabe et al., 1985) have presented evidence indicating that, in platelets, phorbol esters block the inhibition of adenylate cyclase, possibly through phosphorylation of Ni. In contrast, several groups have provided evidence that indicates that the Ni action in other models is not blocked by phorbol ester (Cronin et al., 1986; Sibley et al., 1986). Our data obtained with fat cells indicate that neither the activation nor the inhibition of the adenylate cyclase complex is altered by the action of phorbol esters; both cyclic AMP accumulation and lipolysis were studied. The report of Hall et al. (1985) that PMA did not alter either basal or noradrenaline-stimulated lipolysis was consistent with our findings. Recently Naghshineh et al. (1986) reported that purified protein kinase C can activate adipocyte adenylate cyclase. Our data and those of Hall et al. (1985) suggest that the in vitro changes reported by Naghshineh et al. (1986) do not occur in intact cells.

We confirmed the ability of PMA to stimulate lipogenesis, that had been described by Van de Werve et al. (1985) and Cherqui et al. (1986). Van de Werve et al. (1985) reported that PMA inhibited the lipogenic action of submaximal but not maximal concentrations of insulin. We observed that PMA did not diminish the ability of maximally effective concentrations of insulin to stimulate lipogenesis or phosphatidylinositol labeling but that, in contrast, the antilipolytic action of insulin was significantly diminished by PMA. The slight effect of EGF on lipogenesis and phosphatidylinositol labeling was not affected by PMA. It has been observed that EGF has insulin-like actions in many cell types (Bosch et al., 1986; García-Sáinz et al., 1986; Haystead and Hardie, 1986). Both similarities and differences in the actions of these peptides have been observed (Bosch et al., 1986; García-Sáinz et al., 1986). We observed that both EGF and insulin produce some stimulation of phosphatidylinositol labelling in fat cells but no stimulation in liver cells (García-Sáinz et al., 1986).

We initially described the ability of phorbol ester to inhibit α_1 -adrenergic action in hepatocytes (Corvera and García-Sáinz, 1984). This finding was confirmed and extended for many other cell

types (see García-Sáinz, 1985 for references). The inhibition seems to be due to α_1 -adrenoceptor phosphorylation (Leeb-Lundberg et al., 1985). Recently, Schimmel et al. (1986) reported that phorbol esters inhibit the α_1 -adrenergic stimulation of phosphoinositide turnover in brown fat cells. Our present findings extend the observation to white fat cells.

PMA increased the labeling of phosphatidylcholine and its metabolic precursor phosphatidic acid in fat cells; similar observations have been made with isolated liver cells (Corvera et al., 1986) in WRK-1 cells (Monaco and Mufson, 1986) and in the MDCK cell line (Daniel et al., 1986). Interestingly, Daniel et al. (1986) observed that PMA stimulated the incorporation of both [32 P]Pi and [methyl- 3 H]choline into phosphatidylcholine. These authors also observed that PMA enhanced the release of radioactive choline from prelabeled cells. Their data indicate that PMA stimulates the cyclic breakdown and resynthesis of phosphatidylcholine which constitutes a novel mechanism for diacylglycerol formation.

It is puzzling that the actions of phorbol esters vary depending on the tissue studied. The existence of several isozymic forms of protein kinase C has recently been reported (Huang et al., 1986). It seems of importance to determine if these forms have identical substrate specificities and tissue distribution in order to better understand the role(s) of protein kinase(s) C in the modulation of cellular activity.

Acknowledgements

The authors thank Ms. Guadalupe Ramirez for typing the manuscript. This research was partially supported by a grant from CONACyT (PC SABNA 22620).

References

Bauer, S. and K.H. Jakobs, 1986, Phorbol ester treatment impairs hormone- but not stable GTP analog-induced inhibition of adenylate cyclase, *FEBS Lett.* 198, 43.
 Bell, J.D., J.L.O. Buxton and L.L. Brunton, 1985, Enhancement of adenylate cyclase activity in S49 lymphoma cells by phorbol esters, *J. Biol. Chem.* 260, 2625.

Bosch, F., B. Bousearel, J. Slaton, P.F. Blackmore and J.H. Exton, 1986, Epidermal growth factor mimics insulin effects in rat hepatocytes, *Biochem. J.* 239, 523.
 Castagna, M., Y. Takai, K. Kaibuchi, K. Sano, U. Kikkawa and Y. Nishizuka, 1982, Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters, *J. Biol. Chem.* 257, 7847.
 Cherqui, G., M. Caron, D. Wiecek, O. Lascels, J. Capeau and J. Picard, 1986, Insulin stimulation of glucose metabolism in rat adipocytes: Possible implication of protein kinase C, *Endocrinology* 118, 1759.
 Cochet, C., G.N. Gill, J. Meisenhelder, J.A. Cooper and T. Hunter, 1984, C-Kinase phosphorylates the epidermal growth factor receptor and reduces its epidermal growth factor-stimulated tyrosine protein kinase activity, *J. Biol. Chem.* 259, 2553.
 Corvera, S. and J.A. García-Sáinz, 1984, Phorbol esters inhibit α_1 -adrenergic stimulation of glycogenolysis in isolated rat hepatocytes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 119, 1128.
 Corvera, S., K.R. Schwarz, R.M. Graham and J.A. García-Sáinz, 1986, Phorbol esters inhibit α_1 -adrenergic effects and decrease the affinity of liver α_1 -adrenergic receptors for (-) epinephrine, *J. Biol. Chem.* 261, 520.
 Cronin, M.J. and P.L. Canonico, 1985, Tumor promoters enhance basal and growth hormone releasing factor stimulated cyclic AMP levels in anterior pituitary cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 129, 404.
 Cronin, M.J., S.T. Summers, M.A. Sortino and E.L. Hewlett, 1986, Protein kinase C enhances growth hormone releasing factor (1-40)-stimulated cyclic AMP levels in anterior pituitary, *J. Biol. Chem.* 261, 13932.
 Daniel, L.W., M. Waite and R.L. Wykle, 1986, A novel mechanism of diglyceride formation, *J. Biol. Chem.* 261, 9128.
 Davis, R.J. and M.P. Czech, 1984, Tumor-promoting phorbol diesters mediate phosphorylation of the epidermal growth factor receptor, *J. Biol. Chem.* 259, 8545.
 De Torreguetti, D. and J. Berthet, 1966, The action of insulin on the incorporation of 32 P phosphate the phospholipids of rat adipose tissue, *Biochim. Biophys. Acta* 116, 477.
 Dole, V.P. and H. Meinertz, 1960, Microdetermination of long-chain fatty acids in plasma and tissues, *J. Biol. Chem.* 235, 2595.
 Farese, R.V., J.S. Davis, D.E. Barnes, M.L. Standaert, J.S. Babichkin, R. Hoek, N.K. Rosie and R.J. Pollet, 1985, The de novo phospholipid effect of insulin is associated with increases in diacylglycerol, but not inositol phosphates or cytosolic Ca^{2+} , *Biochem. J.* 231, 269.
 Farese, R.V., R.E. Larson and M.A. Sabir, 1982, Insulin acutely increases phospholipids in the phosphatidate-inositide cycle in rat adipose tissue, *J. Biol. Chem.* 257, 4042.
 Farese, R.V., J. Yuan Kuo, J.S. Babichkin and J.S. Davis, 1986, Insulin provokes a transient activation of phospholipase C in the rat epididymal fat pad, *J. Biol. Chem.* 261, 8569.
 García-Sáinz, J.A., 1983, Characterization of the α_1 -adren-

- ceptors of rat white fat cells, *European J. Pharmacol.* 87, 159.
- García-Sáinz, J.A., 1985. Alpha₁-adrenergic and M₂-muscarinic actions and signal propagation. *Trends Pharmacol. Sci.* 6, 349.
- García-Sáinz, J.A. and J.N. Fain, 1980. Effect of insulin, catecholamines and calcium ions on phospholipid metabolism in isolated white fat cells. *Biochem. J.* 186, 781.
- García-Sáinz, J.A. and M.L. Torner, 1985. Rat fat cells have three types of adenosine receptors (R_a, R_i and P). Differential effects of pertussis toxin. *Biochem. J.* 232, 439.
- García-Sáinz, J.A., M.J. Tussió-Luna and S.M.T. Hernández-Sotomayor, 1986. Insulin-like effect of epidermal growth factor in isolated rat hepatocytes. Modulation of the alpha₁-adrenergic stimulation of ureagenesis. *Biochim. Biophys. Acta* 889, 266.
- Gilman, A.G., 1970. A protein binding assay for adenosine 3':5'-cyclic monophosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 67, 305.
- Glynn, B.P., J.W. Colliton, J.M. McDermott and L.A. Witters, 1986. Phorbol esters, but not insulin, promote depletion of cytosolic protein kinase C in rat adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 135, 1119.
- Hall, M., S.J. Taylor and E.D. Saggerson, 1985. Persistent activity modification of phosphatidate phosphohydrolase and fatty acyl-CoA synthetase on incubation of adipocytes with the tumour promoter 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate. *FEBS Lett.* 179, 351.
- Haystead, T.A. and D.G. Hardie, 1986. Both insulin and epidermal growth factor stimulate lipogenesis and acetyl-CoA carboxylase activity in isolated adipocytes. *Biochem. J.* 234, 279.
- Huang, K.-P., H. Nakabayashi and F.L. Huang, 1986. Isozymic forms of rat brain Ca²⁺-activated and phospholipid-dependent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 8535.
- Iwashita, S. and C.F. Fox, 1984. Epidermal growth factor and potent phorbol tumor promoters induce epidermal growth factor receptor phosphorylation in a similar but distinctively different manner in human epidermoid carcinoma A431 cells. *J. Biol. Chem.* 259, 2559.
- Jakobs, K.H., S. Bauer and Y. Watanabe, 1985. Modulation of adenylate cyclase of human platelets by phorbol ester. Impairment of the hormone-sensitive inhibitory pathway. *European J. Biochem.* 151, 425.
- Katada, T., A.G. Gilman, Y. Watanabe, S. Bauer and K.H. Jakobs, 1985. Protein kinase C phosphorylates the inhibitory guanine-nucleotide-binding regulatory component and apparently suppresses its function in hormonal inhibition of adenylate cyclase. *European J. Biochem.* 151, 431.
- Kather, H., K. Aktories, G. Schulz and K.H. Jakobs, 1983. Islet-activating protein discriminates the antilipolytic mechanism of insulin from that of other antilipolytic compounds. *FEBS Lett.* 161, 149.
- Kelleher, D.J., J.E. Pessin, A.E. Ruoho and G.L. Johnson, 1984. Phorbol ester induces desensitization of adenylate cyclase and phosphorylation of the α -adrenergic receptor in turkey erythrocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81, 4316.
- Leeb-Lundberg, L.M.F., S. Cotecchia, J.W. Lomasney, J.F. DeBernardis, R.J. Lefkowitz and M.G. Caron, 1985. Phorbol esters promote α_1 -adrenergic receptor phosphorylation and receptor uncoupling from inositol phospholipid metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82, 5651.
- Martínez-Olmedo, M.A. and J.A. García-Sáinz, 1983. Effect of pertussis toxin on the hormonal regulation of cyclic AMP levels in hamster fat cells. *Biochim. Biophys. Acta* 760, 215.
- Monaco, M.E. and R.A. Mufson, 1986. Phorbol ester inhibition of the hormone-stimulated phosphoinositide cycle in WRK-1 cells. *Biochem. J.* 236, 171.
- Moreno, F.J., I. Mills, J.A. García-Sáinz and J.N. Fain, 1983. Effect of pertussis toxin treatment on the metabolism of rat adipocytes. *J. Biol. Chem.* 258, 10938.
- Nabika, T., Y. Nara, Y. Yamori, W. Lovenberg and J. Endo, 1985. Angiotensin II and phorbol ester enhance isoproterenol- and vasoactive intestinal peptide (VIP)-induced cyclic AMP accumulation in vascular smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 131, 30.
- Naghshineh, S., M. Noguechi, K.-P. Huang and C. London, 1986. Activation of adipocyte adenylate cyclase by protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 261, 14534.
- Novak, M., 1965. Colorimetric ultramicro method for the determination of free fatty acids. *J. Lipid Res.* 6, 431.
- Rodbell, M., 1964. Metabolism in isolated fat cells. I. Effects of hormones on glucose metabolism and lipolysis. *J. Biol. Chem.* 239, 375.
- Schimmel, R.J., D. Dzierzanowski, M.E. Elliot and T.W. Honeymann, 1986. Stimulation of phosphoinositide metabolism in hamster brown adipocytes exposed to α_1 -adrenergic agents and its inhibition with phorbol esters. *Biochem. J.* 236, 757.
- Sekura, R.D., F. Fish, C.R. Manclark, B. Meade and Y.-L. Zhang, 1983. Pertussis toxin. Affinity purification of a new ADP-ribosyltransferase. *J. Biol. Chem.* 258, 14647.
- Sibley, D.R., R.A. Jeffs, K. Daniel, P. Nambi and R.J. Lefkowitz, 1986. Phorbol diester treatment promotes enhanced adenylate cyclase activity in frog erythrocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* 244, 373.
- Sibley, D.R., P. Nambi, J.R. Peters and R.J. Lefkowitz, 1984. Phorbol diesters promote α -adrenergic receptor phosphorylation and adenylate cyclase desensitization in duck erythrocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 121, 973.
- Stein, J.M. and C.N. Hales, 1974. The effect of insulin of ³²P_i incorporation into rat fat cell phospholipids. *Biochim. Biophys. Acta* 337, 41.
- Sugden, D., J. Vanecek, D.C. Klein, T.P. Thomas and W.B. Anderson, 1985. Activation of protein kinase C potentiates isoprenaline-induced cyclic AMP accumulation in rat pinealocytes. *Nature* 314, 359.
- Takayama, S., M.F., White, V. Lauris and C.R. Kahn, 1984. Phorbol esters modulate insulin receptor phosphorylation and insulin action in cultured hepatoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81, 7797.
- Van de Werve, G., J. Proietto and B. Jeanrenaud, 1985. Tumor-promoting phorbol esters increase basal and inhibit insulin-stimulated lipogenesis in rat adipocytes without decreasing insulin binding. *Biochem. J.* 225, 523.
- Watanabe, Y., F. Horn, S. Bauer and K.H. Jakobs, 1985. Protein kinase C interferes with N₁-mediated inhibition of human platelet adenylate cyclase. *FEBS Lett.* 192, 23.

VACUNA ANTI-TOSFERINA ACELULAR: AVANCES EN SU DESARROLLO

J. Adolfo García-Sáinz
Juvencio Ruiz-Puente
José Juárez-Ayala
Jaime Jiménez-Paredes
Inés Quiroga
Armando Hernández-Puga
Héctor Villalva-Posada

Introducción

La tosferina es una enfermedad infecto-contagiosa causada por la *Bordetella pertussis*. Este germen es un bacilo pequeño gram negativo, aislado y caracterizado como agente causal de la enfermedad por Bordet y Gengou en 1906. El germen no es invasivo y su infección se limita exclusivamente al epitelio ciliado del tracto respiratorio. La enfermedad es altamente contagiosa (estimándose que hasta un 90% de los susceptibles expuestos pueden adquirir la enfermedad), y se caracteriza por un periodo de incubación de una a dos semanas, seguido por una fase catarral con signos y síntomas inespecíficos de un padecimiento del tracto respiratorio superior. Después de estas etapas se desarrolla el cuadro característico con tos paroxística cianósica que puede acompañarse de expulsión de material mucoso acumulado en las vías respiratorias y de vómito. La gravedad de la enfermedad, sobre todo en niños menores de un año, se debe a las complicaciones y secuelas que se presentan; entre éstas encontramos: periodos de apnea, pneumonia, sangrado intracerebral y alteraciones neurológicas persistentes, bronquiectasias, retardo mental, alteraciones auditivas y del lenguaje. La evolución natural de la enfermedad lleva a la fase convaleciente caracterizada por disminución progresiva de los paroxismos de tos. La mortalidad reportada es

variable pero se estima entre el 5 y 15%.^{1,3}

La tasa de morbilidad antes del inicio de la vacunación masiva era en México de aproximadamente 100-130 por cada 100,000 habitantes.⁴ En la Unión Soviética la tasa reportada era tan alta como 350-400 por cada 100,000 habitantes.⁵ Con el advenimiento de la vacunación masiva en la etapa de los cincuentas en los países desarrollados y de los sesentas en países subdesarrollados se ha logrado abatir paulatinamente la incidencia de la enfermedad (ver referencia 5). Para el periodo de 1964 a 1966 la incidencia por 100,000 habitantes era de la siguiente forma en América: A. del Norte 6.2, A. Central 64 y A. del Sur 152.⁵ En nuestro país en la etapa de los ochenta se ha mantenido con una tendencia a la disminución entre el 5 y 2 por 100,000 habitantes. Es indiscutible que la vacunación masiva ha jugado un papel clave en estos logros. Aunada a la vacunación masiva han ocurrido mejoras en las condiciones sociales y de salud de los pueblos, ello ha llevado a diversos autores a cuestionar la importancia de la vacunación.

Debemos mencionar, que en países en los que por diversas circunstancias (ver más adelante) se ha suspendido o disminuido la vacunación se han producido en forma casi inmediata brotes epidémicos de tosferina.^{6,7} Ello nos habla claramente de la importancia de las campañas de vacunación masiva.

La vacuna actualmente en uso en la mayoría de los países consiste en una suspensión de *Bordetella pertussis* muerta por calentamiento. Esta vacuna es generalmente asociada a los toxoides tetánico y diftérico para la producción de la vacuna triple o DPT. La vacuna pertussis usada en nuestro país es producida en forma casi exclusiva por el Instituto Nacional de Higiene de acuerdo a los criterios que la Organización Mundial de la Salud ha establecido y con tecnología en gran parte desarrollada en el propio Instituto.

La vacuna antitosferina actual se estima tiene un índice de protección de aproximadamente 90%.^{7,9} Es más, se ha reportado que cuando un niño vacunado sufre la infección, ésta es mucho menos severa, de menor duración y con menos complicaciones y secuelas en comparación con la que sufren niños no vacunados.¹⁰

A pesar de la clara evidencia de la utilidad y eficacia de la vacuna actual, existe en todo el mundo un claro interés por desarrollar una vacuna anti-tosferina mejorada. Ello se debe a varios factores: En primer lugar, la vacuna actual, no está exenta de reacciones indeseables. Estas reacciones son generalmente leves (fiebre e irritabilidad 10-30%), pero se han reportado reacciones severas como son: crisis de llanto, convulsiones, taquicardia paroxística y daño cerebral permanente. Estas reacciones ocurren con muy baja frecuencia (entre 1 por 10,000 ó 100,000 vacunados, dependiendo del tipo de reacción adversa seria). Ello nos habla claramente de que la balanza riesgo-beneficio está totalmente desplazada hacia el beneficio. Sin embargo, la existencia de estas reacciones aunada a campañas poco escrupulosas han causado verdaderos desastres al desalentar la vacunación. Tanto en Japón como en Inglaterra ha habido grandes epidemias al disminuir la vacunación.⁶⁻¹⁰ Ello ha llevado a las autoridades de salud de diversos países a buscar una vacuna mejorada. Como mencionamos anteriormente la vacuna consiste en una suspensión de gérmenes. Por lo tanto, está formada por miles de componentes. Algunos de estos componentes son antígenos im-

portantes en la inducción de protección contra la enfermedad, pero la mayoría de ellos son innecesarios. El avance en la bioquímica y la inmunología ha permitido identificar algunos de estos antígenos, importantes en la inducción de una respuesta inmune protectora, y en el caso de los que tienen actividad biológica tóxica, descubrir su mecanismo de acción y diseñar métodos para su detoxificación.

Ello ha permitido tratar de desarrollar una nueva vacuna que sea atóxica, constituida por componentes conocidos, en cantidades cuantificables y significativos desde el punto de vista de inmunoprotección.

Principales antígenos

Varios son los antígenos de *Bordetella pertussis* que han sido caracterizados desde el punto de vista molecular; los principales son: a) la toxina pertussis, b) la hemaglutinina fibrosa o filamentososa, c) la adenilato ciclasa extracitoplásmica y d) otros antígenos que incluyen a las proteínas de la membrana externa, a la toxina dermonecrótica y a algunos aglutinógenos. A continuación discutiré brevemente algunas características de ellos:

a) *Toxina pertussis*: La toxina pertussis es una exotoxina presente en el medio en que se cultiva la *Bordetella pertussis*. Se trata de una proteína oligomérica con peso molecular aproximado de 117 KDaltones.¹¹ Esta toxina está compuesta de seis subunidades. Se ha propuesto que la subunidad S1 es el protómero activo, es decir, con actividad enzimática, mientras que el resto de las subunidades, es decir las subunidades S2, S3, 2S4, y S5 sirven para la fijación (Binding) a la superficie de las células.¹¹ La toxina pertussis ejerce su acción en múltiples sistemas celulares bajo una acción específica bloqueando al componente regulador inhibitorio (Ni) de la enzima adenilato ciclasa.¹²⁻¹⁴ Esta enzima es la transdutora de la señal de una gran cantidad de hormonas, neurotransmisores y autacoides. Ello explica la multiplicidad de efectos de esta toxina. La modificación de Ni se realiza por la ADP-ribosilación de la proteína usando el NAD endógeno de la célula.¹³⁻¹⁵ Las múltiples acciones de

esta toxina ocasionaron que se le dieran una gran cantidad de nombres que describían básicamente sus efectos y así fue llamada: factor promotor de la linfocitosis (LPF), factor sensibilizante a la histamina (HSF). Proteína activadora de los Islotes de Langerhans (IAP) y factor tóxico de aparición tardía (LAT). Es acerca de esta toxina y sus acciones que contamos con más información. Recientemente se han publicado varias revisiones al respecto.^{16,18} Al ser vista al microscopio electrónico esta toxina presenta un aspecto esférico.¹⁹ La toxina pertussis parece ser responsable de algunos de los efectos indeseables de la vacuna^{17,18} y se antojaría eliminarla de la misma. Sin embargo, parece ser el principal antígeno presente en la vacuna. Varias líneas de evidencia señalan este hecho: a) la administración de toxina pertussis purificada es capaz de inducir protección activa en el ratón, siempre y cuando sea parcialmente detoxificada;^{20,22} b) se ha demostrado la capacidad de los anticuerpos antitoxina pertussis de producir inmunidad pasiva²³ y c) la administración de vacunas tradicional induce la producción de anticuerpos anti-toxina pertussis en el humano.

b) *La hemaglutinina fibrosa*: Esta proteína debe su nombre al aspecto de fibra que presenta al ser examinada al microscopio electrónico.¹⁹ El peso molecular de esta proteína ha sido estimado en 130 KDa por ultracentrifugación.¹⁹ El análisis electroforético en geles de poli-acrilamida con lauril sulfato de sodio (SDS) muestra que la proteína es heterogénea con pesos desde 220 KDa hasta 58 KDa.²⁵

La hemaglutinina fibrosa carece de toxicidad y aunque no protege por sí misma contra el desafío con *Bordetella pertussis*, se ha observado que incrementa la capacidad protectora de la toxina pertussis.^{21, 22}

c) *Adenilato Ciclasa Extracelular*: Esta proteína representa una adenilato ciclasa aparentemente no relacionada con la enzima de los mamíferos. Se trata de una proteína de peso molecular de 70 KDa aproximadamente²⁶ y es capaz de alterar los niveles de AMP cíclico al penetrar en algunas células.²⁷ Se ha propuesto que esta enzima juega un papel impor-

tante en la patogenia de la enfermedad y se ha observado que mutantes de *Bordetella pertussis* carentes de la enzima son prácticamente avirulentas.²⁸

d) *Otros antígenos*: Se han aislado seis proteínas de la superficie de la *Bordetella pertussis* con pesos de 90, 86, 92, 33, 31 y 30 KDa.²⁹ Asimismo los aglutinógenos 2 y 3 aparentemente tienen origen fimbrial.³⁰ Dado que tanto las proteínas de superficie como las de la fimbria juegan un papel muy importante en la adhesión de la bacteria al epitelio respiratorio son potencialmente antígenos de importancia. Por otro lado, la toxina dermonecrotica o toxina termolábil es una proteína intracelular de la cual tenemos poca información. Esta toxina no parece tener un papel importante en la inducción de protección. Sin embargo, se ha mencionado que pudiera participar en la producción de algunos efectos indeseables de la vacuna.⁵

Vacunas acelulares

Desde hace 30 años se ha tratado de preparar vacunas anti-pertussis de tipo acelular. Se han intentado extractos obtenidos por sonicación, extracción con detergentes, urea y alta salinidad. La mayoría de ellos no han sido llevados a las pruebas de campo.

La vacuna acelular actualmente en uso clínico es la desarrollada en Japón, la cual se está aplicando masivamente en ese país desde 1981. La primera publicación formal acerca de esta vacuna (aunque con información escasísima) aparece hasta 1984.⁶ Consiste básicamente en toxina pertussis (detoxificada con formalina) y hemaglutinina fibrosa. Los datos obtenidos en las pruebas de campo y en laboratorio muestran que la protección que confiere es satisfactoria y que su toxicidad es notablemente baja.⁶ Sin embargo, no está carente de problemas: a) La metodología empleada es costosa para ser incorporada a nivel industrial pues incluye centrifugación en gradiente de sacarosa;⁶ b) La cantidad total y la proporción de los componentes varía considerablemente entre lotes.⁶ Es importante mencionar que a pesar de estos problemas es la mejor vacuna acelu-

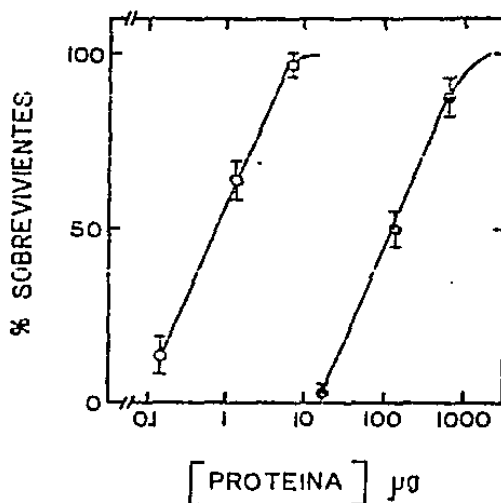
lar en uso masivo. Una excelente revisión acerca de los últimos avances en vacunas anti-tosferina apareció recientemente.³¹

Vacuna acelular mexicana: estado actual

Durante los dos últimos años hemos desarrollado un procedimiento tecnológicamente sencillo capaz de producir un extracto acelular que induce protección en el ratón contra el desafío intracerebral por *Bordetella pertussis*.³² Este extracto se obtiene de la siguiente forma: El germen es crecido en medio Stainer líquido por aproximadamente 48 h. a 35°C (hasta que el cultivo llega a un pH de 8.2). El producto es concentrado por precipitación con ácido cítrico³³ neutralizado y detoxificado a 56°C por 30 minutos. Las bacterias son eliminadas por centrifugación y el sobrenadante se ajusta a pH 3. El precipitado ácido se resuspende y neutraliza.³² Este procedimiento sencillo produce una purificación significativa de la toxina pertussis (aproximadamente 200 veces) y resulta en un extracto que es entre 50 y 200 veces más potente (en base a proteína) que la vacuna de referencia del Instituto Nacional de Higiene; es decir, se requiere administrar una cantidad mucho menor de proteína para lograr una protección similar (ver figura 1).

Se han realizado experimentos con dos cepas de *Bordetella pertussis*, la 509 y la 165 y con múltiples lotes de producción. Hemos observado que el extracto acelular obtenido de la cepa 509 produce consistentemente buena protección con una ED₅₀ de entre 0.5 y 5 µg por ratón (ver Figura 2). Por el contrario, los extractos de la cepa 165, la cual produce una mayor cantidad de toxina pertussis,³⁴ inducen protección parcial a dosis bajas; pero al aumentar la dosis la propia toxicidad de la preparación (evidenciada por pérdida de peso) nos evita lograr la protección total de los animales. Ello nos habla de la necesidad de detoxificar en una forma más enérgica los extractos obtenidos a partir de cultivos de esta cepa, con el fin de lograr determinar su potencial como inmunógeno protector. Es importante mencionar aquí que la preparación ace-

Figura 1
INDUCCION DE PROTECCION POR LAS VACUNAS PERTUSSIS CELULAR Y ACELULAR. Se trataron grupos de 16 ratones con las concentraciones de vacuna tradicional (●) o del extracto acelular (○) 14 días antes de ser retados con *Bordetella pertussis* (cepa 18323) a una dosis de 300-400 LD₅₀. Se presenta el promedio de 3 experimentos y las barras indican el error estándar.



lular obtenida de la cepa 509 pasa las pruebas rutinarias de toxicidad³² pero que si se aumenta la cantidad de proteína administrada a dosis supra-protectoras logramos observar claramente cierta toxicidad. Ello no es sorprendente pues contiene toxina pertussis activa. Dada la presencia de toxina pertussis activa en el extracto acelular la preparación causa una marcada leucocitosis y sensibilización a la histamina.³² La inducción de leucocitosis ha sido considerada como un índice capaz de predecir la potencia protectora de una vacuna.³⁵ Actualmente estamos trabajando en procedimientos sencillos que nos puedan permitir obtener una preparación totalmente atóxica que induzca una buena protección.

Hemos procedido a la caracterización qui-

Figura 2

Inducción de protección por vacuna acelular obtenida de dos lotes de la cepa 509 y uno de la cepa 165. Cepa 509 (Lote 29-170) (O), cepa 509 (Lote 29-369) (●) y cepa 165 (Δ). Otras indicaciones como en la Figura 1.

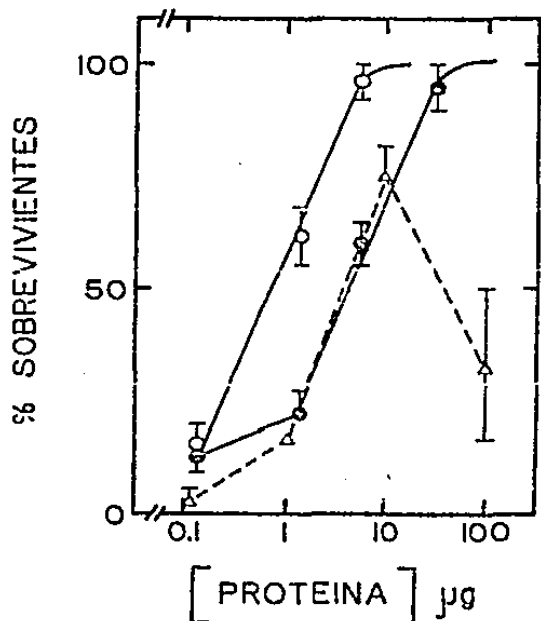


Figura 3

Perfil de elución de la vacuna acelular usando Sephadex G 200.

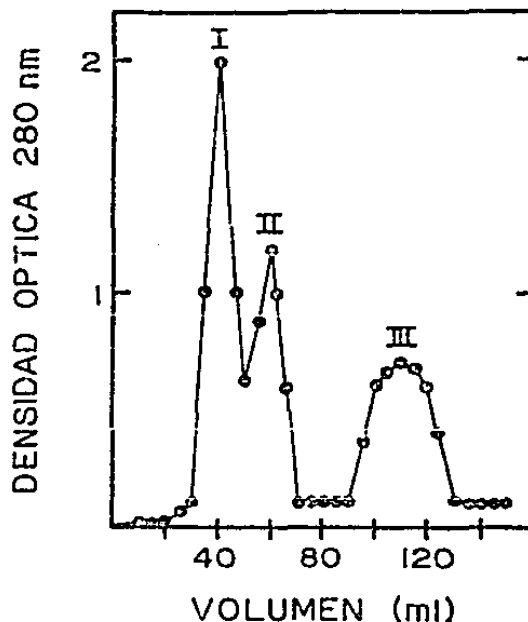


Figura 4

Patrón electroforético de la vacuna acelular en gel de poliacrilamida a pH 4.5



mica de la preparación. Se encuentra constituida básicamente por proteínas. La filtración molecular con Sephadex G200 mostró la presencia de 3 componentes (Figura 3). Los dos componentes de más alto peso molecular no se resolvieron totalmente. El componente I tuvo actividad de hemaglutinina y baja actividad de toxina pertussis mientras que el componente II tuvo alta actividad de toxina pertussis. Al componente III no se le pudo detectar actividad biológica alguna.

La electroforesis en gel de poliacrilamida a pH 4.5 (Fig. 4) mostró dos componentes, uno de los cuales corresponde a la toxina pertussis y el otro pudiera corresponder a la hemaglutinina fibrosa. La electroforesis en geles con lauril sulfato de sodio mostró entre 15 y 20

bandas (dependiendo de la preparación) (Fig. 5). Se observaron las subunidades de la toxina pertussis,^{11, 19} bandas de peso molecular alto que pudieran corresponder a hemaglutinina fibrosa¹⁹ y otras bandas cuyo origen desconocemos.

Figura 5
Patrón electroforético de la vacuna acelular en gel de poliacrilamida con lauril sulfato de sodio. Las flechas indican las subunidades de la toxina pertussis.



El examen con microscopio electrónico mostró una preparación heterogénea en la cual se aprecian las partículas esféricas y los agregados característicos de la toxina pertussis,¹⁹ elementos fibrosos que pudieran corresponder a hemaglutinina fibrosa y aunque escasas algunas estructuras de mayor tamaño que pudieran representar fragmentos celulares (Fig. 6).

Nuestra preparación presenta los dos elementos básicos de la vacuna acelular japonesa. Presenta además otros componentes en proporción menor cuya importancia es imposible valorar por el momento. Es capaz de inducir protección en el ratón. En principio, pudiéramos decir que se trata de una vacuna acelular en fase de laboratorio, que puede prepararse con tecnología sencilla y a bajo costo.

Figura 6
Microscopia electrónica de la preparación acelular.



Confiamos en optimizar la preparación y en poderla llevar a la fase de producción industrial y a los estudios de campo en un futuro no muy lejano.

Agradecimientos

Los autores agradecen a los Doctores Antonio Peña (Instituto de Fisiología Celular) y Juan Garza Ramos (Gerencia General de Biológicos y Reactivos) su continuo apoyo para la realización de este proyecto y al Dr. Alfonso Cárabez por el estudio de microscopia electrónica. Agradecemos a la Sra. Guadalupe Ramírez su excelente ayuda secretarial. Este proyecto está siendo apoyado por el CONACyT (BCCBBNA 021425) y el PUIC. J. A. García Sáinz es becario (1985-1986) de la Fundación John Simon Guggenheim.

Referencias

1. BD Davis, R Dulbeco, HN Eisen, HS Ginsberg, WB Wood, Jr: *The Hemophilus-bordetella group en Microbiology*. Harper and Row, New York 1967; pp. 789-800.
2. L Weinstein: *Pertussis en Harrison's Principles of Internal Medicine* (MW Wintrobe, GW Thorn, RD Adams, IL Bennett, Jr E Braundwarld, KJ Isseibackew RG Petersdorf eds) Mc Graw-Hill Book Company, New York 1970; pp 820-824.
3. D. Gómez: *Tosferina en Conceptos Clínicos de Infectología Pediátrica* (E. Calderon Jaimes, ed.) Impresiones Modernas, S.A., México, D.F. 1973; pp 97-105.
4. Dirección General de Epidemiología, Secretaría de Salud 1985.
5. JJ Muñoz, RK Bergman en *Bordetella pertussis*; Immunology series (N Rose, ed.) Marcel Dekker, Inc. Vol. 4, 1977; pp 1-10.
6. Y Sato, M Kumura, H Fukumi: *Development of a pertussis component vaccine in Japan*. Lancet 1984; 1: 122-126.
7. ND Noah: *Attack rates of notified whooping cough in immunized and unimmunized children*. Brt Med J 1976; 1: 123-131.
8. R Pollard: *Relation between vaccination and notification rates for whooping cough in England and Wales*. Lancet 1980; 1: 1180-1182.
9. MA Church: *Evidence of whooping cough vaccine efficacy from the 1978 whooping cough epidemic in Hertfordshire*. Lancet 1979; 2: 188-191.
10. PR Grobb, MJ Crowder, JF Robbins: *Effect of vaccination on severity and dissemination of whooping cough* Brt J Med 1981; 282: 1925-1930.
11. M Tamura, K Nogimori, S Murai, M Yahima, K Ito, T Katada, M Ui, S Ishii: *Subunit structure of Islet-Activating Protein: Pertussis toxin, in conformity with the A-B model*. Biochemistry 1982; 21: 5516-5522.
12. JA García-Sáinz: *Decreased sensitivity to alpha₂-adrenergic amines, adenosine and prostaglandins in white fat cells from Hamsters treated with pertussis vaccine*. FEBS Lett 1981; 126: 305-308.
13. O Hazeki, M Ui: *Modification by Islet-activating protein of receptor mediated regulation of cyclic AMP accumulation in isolated rat heart cells*. J Biol Chem 256: 2856-2862.
14. T Katada, M Ui: *Direct modification of the membrane adenylate cyclase system by Islet-activating protein due to ADP-ribosylation of a membrane protein*. Proc Natl Acad Sci USA 79: 3129-3133.
15. CC Mulbon, PJ Rapiejko, JA García-Sáinz: *Pertussis toxin catalyzes the ADP-ribosylation of two distinct peptides, 19 kDa and 41 kDa in rat fat cell membranes*. FEBS Lett 1984; 176: 301-306.
16. M Ui: *Islet-activating protein, pertussis toxin: a probe for function of the inhibitory guanine nucleotide regulatory component of adenylate cyclase*. Trends Pharmacol Sci 1984; 5: 277-279.
17. JA García-Sáinz: *Effect of Pertussis toxin on the hormonal responsiveness of different tissues in Pertussis toxins* (R Sekura, J Moss y M Vaughan eds.) Academic Press, en prensa.
18. JA García-Sáinz: *La toxina pertussis un arma para la profilaxis contra la tosferina y para estudiar los mecanismos de acción de algunas hormonas*. Ciencia, en prensa.
19. H Arai, Y Sato: *Separation and Characterization of two distinct hemagglutinins contained in purified Leukocytosis promoting factor from Bordetella pertussis*. Biochim Biophys Acta 1976; 444: 765-762.
20. JJ Muñoz, H Arai, RK Bergman, PL Sadowski: *Biological Activities of Crystalline pertussigen from Bordetella pertussis* Infect Immun 1981; 33: 820-826.
21. A Robinson, LI Irons: *Synergistic effect of Bordetella pertussis Lymphocytosis-promoting factor on protective activities of isolated Bordetella antigens in Mice*. Infect Immun 1983; 40: 523-528.
22. H Sato, Y Sato: *Bordetella pertussis infection in Mice: correlation of specific antibodies against two antigens, pertussis toxin and filamentous hemagglutinin with mouse protectivity in an Intracerebral or aerosol challenge system*. Infect Immun 1984; 46: 115-121.
23. H Sato, A Ito, J Chiba, Y Sato: *Monoclonal antibody against pertussis toxin: effect on toxin activity and pertussis infection*. Infect Immun 1984; 46: 422-428.
24. DG Burstyn, LJ Baraff, MS Pepplep, RD Leake, J St Geme Jr, CR Manclark: *Serological response to filamentous hemagglutinin and Lymphocytosis-promoting toxin from Bordetella pertussis*. Infect Immun 1983; 41: 1150-1156.
25. LI Irons, LAE Ashworth, P Wilton-Smith: *Heterogeneity of the filamentous haemagglutinin of Bordetella pertussis studied with monoclonal antibodies* J Gen Microbiol 1983; 129: 2769-2774.
26. EL Hewlett, J Wolff: *Soluble adenylate cyclase from the culture medium of Bordetella pertussis: purification and characterization*. J Bacteriol 1976; 127: 890-896.
27. EL Hwelett, DL Smith, GA Myers, D Pearson, HD Kay: *In vitro inhibition of human natural killer cell (NK) cytotoxicity by Bordetella cyclase and pertussis toxin*. Clin Res 1983; 31: 365.
28. AA Weiss, EL Hewlett, GA Myers, S Falkow: *Pertussis toxin and Extracytoplasmic adenylate cyclase as virulence factors of Bordetella pertussis*. J

- Infect Dis 1984; 150: 219-222.
29. A Robinson, DC Hawkins: *Structure and Biological properties of solubilized envelope proteins of Bordetella pertussis* Infect Immun 1983; 39: 590-598.
 30. LAE Ashworth, LI Irons, AB Dowsett: *The antigenic relationship between serotype specific agglutinogens and fimbriae of Bordetella pertussis*. Infect Immun 1982, 37: 1278-1284.
 31. A Robinson, LI Irons, LAE Ashworth: *Pertussis vaccine: present status and future prospects*. Vaccine 1985; 3: 11-22.
 32. JA García-Sainz, J Ruiz-Puente, J Jiménez-Paredes, M González-Pacheco, H Villalva-Posada. Vaccine 1985; 3: 23-26.
 33. TA Mora Ayala, H Rodríguez, A Lemos Pastrana: *Concentración de vacuna pertussis con ácido cítrico*. Sal Publ Mex 1981; 23: 585-589.
 34. RD Sekura, F Fish, CR Manclark, M Beade, YL Zhang: *Pertussis toxin. Affinity purification of a new ADP-ribosyltransferase*. J Biol Chem 1983; 258: 14647-14651.
 35. EH Relyveld, J Bellalou: *Studies on the production of B. pertussis toxins and protective antigens in Bacterial protein toxins* (JE Alouf, FJ Fehrenbach, JH Freer y J Jeltaszewicz, eds) Academic Press New York. 1984; 255-256.