

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA Y BIOLOGIA
MOLECULAR II**

**CARACTERIZACION DE NUEVAS SEÑALES
IMPLICADAS EN LA PROLIFERACION Y
DIFERENCIACION DE LOS ADIPOCITOS
MARRONES FETALES: UN NUEVO
MECANISMO TERMOGENICO**

María Teresa Teruel González

Madrid, 1996

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA Y BIOLOGIA
MOLECULAR II**

**CARACTERIZACION DE NUEVAS SEÑALES IMPLICADAS
EN LA PROLIFERACION Y DIFERENCIACION DE LOS
ADIPOCITOS MARRONES FETALES: UN NUEVO
MECANISMO TERMOGENICO**

**Memoria que presenta la Licenciada
María Teresa Teruel González
para aspirar al Grado de Doctor en Farmacia
Madrid, 1996**

Este trabajo ha sido realizado íntegramente en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II, Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la dirección de los Doctores Dña. Margarita Lorenzo Balado y D. Manuel R. Benito de las Heras durante los años 1991-1996.

A mi familia

Quisiera expresar mi agradecimiento a todas las personas (que son muchas) que durante los años de trabajo dedicados a esta Tesis me han ayudado, me han enseñado, me han ofrecido su amistad, sus palabras de ánimo y sus consejos, han compartido conmigo el día a día con sus momentos buenos y menos buenos, y con todo ello han contribuido a la realización del trabajo presentado.

ABREVIATURAS

-AMPc	Acido adenosín-3', 5'-monofosfórico cíclico
-dbAMPc	Dibutilil AMPc
-ATP	Acido Adenosín -5'-trifosfórico
-BAT	Tejido adiposo marrón
-BSA	Albúmina bovina sérica
-CoA	Coenzima A
-C/EBPs	Proteínas de unión a zonas intensificadoras de secuencia CCAAT
-c.p.m.	Cuentas por minuto
-(³² α-P) dCTP	α deoxicitidina-5'-trifosfato
-DAG	Diacil glicerol
-DEPC	Dietil Pirocarbonato
-DMSO	Dimetil sulfóxido
-DNA	Acido desoxirribonucleico
-cDNA	Acido desoxirribonucleico recombinante
-D.O	Densidad óptica
-d.p.m	Desintegraciones por minuto
-DTT	Ditiotreitol
-ECM	Matriz extracelular
-EDTA	Acido etilén diamino tetracético
-EGTA	Acido etilén-glicol-bis-(β-amino etil éter) N, N'tetracético
-EM	Enzima mállica
-FAS	Acido graso sintasa
-FCS	Suero fetal bovino
-GDP	Acido Guanosín 5'-difosfórico
-GTP	Acido Guanosín 5'-trifosfórico
-GH	Hormona de Crecimiento
-HEPES	Acido N-2-hidroxi-metil piperacina N' 2-etano-sulfónico
-IGF-1	Factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1
-IGF-1R	Receptor para el IGF-1
-IP2	Inositol 4, 5 difosfato
-IP3	Inositol 1, 4, 5 trifosfato
-IRS	Sustrato para el receptor de la insulina

-kb	Kilobases
-kDa	Kilodaltons
-MAP	Proteína asociada a microtúbulos
-MEM	Medio esencial mínimo
-MOPS	Acido Morfolino-propano sulfónico
-NA	Noradrenalina
-PC	Fosfatidil colina
-PCNA	Antígeno nuclear de células proliferativas
-PI	Fosfatidil inositol
-PKA	Proteína quinasa A
-PKC	Proteína quinasa C
-PMA	Acetato de miristato de forbol
-pRB	Proteína del gen de retinoblastoma
-RNA	Acido ribonucleico
-mRNA	Acido ribonucleico mensajero
-rRNA	Acido ribonucleico ribosómico
-tRNA	Acido ribonucleico de transferencia
-r.p.m.	Revoluciones por minuto
-SDS	Lauril sulfato sódico
-SEM	Error estándar de la media
-T3	Triiodotironona
-TGF- β	Factor de crecimiento transformante tipo β
-TNF- α	Factor de necrosis tumoral α
-Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
-Tyr-P	Tirosina fosforilada
-UP	Proteína desacoplante
-UTP	Acido Uridín 5'-trifosfato
-UV	Ultravioleta
-V	Voltios
-W	Wattios

INDICE

I.- INTRODUCCION.....	1
PLAN GENERAL DE TRABAJO.....	2
II.- ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS.....	3
2.1 EL TEJIDO ADIPOSO MARRON.....	3
2.1.1 Diferenciación termogénica: la UP.....	4
2.1.2 Diferenciación adipogénica.....	6
2.2 PROLIFERACION DE CELULAS MESENQUIMATICAS.....	9
2.3 SEÑALES IMPLICADAS EN PROLIFERACION Y DIFERENCIACION DE CELULAS MESENQUIMATICAS.....	11
2.3.1 IGF-1.....	11
2.3.1.1 El factor.....	11
2.3.1.2 El receptor.....	14
2.3.1.3 Vía de transducción de señales.....	17
2.3.1.4 Efectos biológicos.....	21
A) IGF-1 y proliferación.....	21
B) IGF-1 y diferenciación.....	23
2.3.2 TGF- β	24
2.3.2.1 El factor.....	24
2.3.2.2 Receptores.....	26
2.3.2.3 Efectos biológicos.....	28
A) TGF- β y proliferación.....	30
B) TGF- β y diferenciación.....	31
2.3.3 TNF- α	32
III.- MATERIAL Y METODOS:.....	35
3.1 ANIMALES DE EXPERIMENTACION.....	35
3.2 MEDIOS INSTRUMENTALES.....	35

3.3 PRODUCTOS.....	37
3.4 CULTIVO DE ADIPOCITOS MARRONES DE RATA.....	40
3.4.1 Obtención de tejido adiposo marrón y aislamiento de los adipocitos marrones fetales.....	40
3.4.2 Cultivo primario de adipocitos marrones fetales.....	41
3.5 ESTUDIOS CELULARES POR CITOMETRIA DE FLUJO.....	41
3.6 MEDIDA DE LA INCORPORACION DE GLUCOSA.....	42
3.7 ESTUDIOS DE SINTESIS DE DNA.....	43
3.7.1 Medida de la síntesis de DNA por incorporación de (³ H) - Timidina.....	43
3.7.2 Marcaje de núcleos con (³ H) - Timidina.....	43
3.8 ENSAYOS DE UNION DE LIGANDOS A SUS RECEPTORES.....	44
3.8.1 Estudios de desplazamiento.....	44
3.8.2 Unión irreversible.....	44
3.9 ESTUDIOS DE NIVELES DE PROTEINAS MEDIANTE LA TECNICA DE WESTERN-BLOT.....	45
3.9.1 Preparación de las muestras.....	45
3.9.2 Inmunoprecipitaciones.....	45
3.9.3 Electroforesis de proteínas en geles de poliadrilamida y transferencia a membranas de nylon.....	45
3.9.4 Inmunodetección de las proteínas.....	46
3.10 ENSAYO QUINASA "IN VITRO".....	46
3.11 AISLAMIENTO, ANALISIS Y MANEJO DEL RNA.....	47
3.11.1 Aislamiento del RNA total.....	47
3.11.2 Extracción del RNA poli A + por cromatografía de afinidad.....	48
3.11.3 Electroforesis del RNA en geles de agarosa-formaldehído y transferencia a membranas de nylon.....	49
3.12 OBTENCION DE LAS SONDAS DE cDNA.....	49
3.12.1 Procedencia y características de las sondas.....	49
3.12.2 Crecimiento bacteriano, extracción del DNA plasmídico y purificación de cDNAs.....	51
3.12.3 Marcaje radiactivo de los cDNAs.....	52
3.13 HIBRIDACIONES.....	53

3.14 ENSAYO DE TRANSCRIPCION "IN VITRO"	54
3.14.1 Aislamiento de núcleos.....	54
3.14.2 Elongación, extracción y purificación de los transcritos.....	55
3.14.3 Preparación de la membrana e hibridación.....	55
IV.- RESULTADOS Y DISCUSION.....	57
4.1 DIFERENCIACION DE ADIPOCITOS MARRONES FETALES DE RATA DURANTE EL ULTIMO PERIODO DE GESTACION: PAPEL DEL IGF-1.....	57
4.1.1 Caracterización por citometría de flujo de los adipocitos marrones durante el último periodo fetal: tamaño, fluorescencia endógena, contenido lipídico y ciclo celular.....	57
4.1.2 Expresión de genes implicados en la diferenciación adipogénica y termogénica de los adipocitos marrones durante el desarrollo fetal tardío.....	58
4.1.3 Expresión de IGF-1 e IGF-1R mRNAs en los adipocitos marrones durante el último período de desarrollo fetal.....	65
4.2 IGF-1 INDUCE PROLIFERACION EN ADIPOCITOS MARRONES FETALES EN CULTIVO.....	68
4.2.1 Los adipocitos marrones fetales de 20 días presentan un elevado número de receptores de alta afinidad para el IGF-1.....	68
4.2.2 El IGF-1 aumenta la síntesis de DNA, el número de células y el porcentaje de células en fases S, G2 y M del ciclo celular.....	70
4.2.3 El IGF-1 induce la expresión de genes y proteínas relacionadas con proliferación.....	74
4.3 EL IGF-1 Y TAMBIEN LA INSULINA PRODUCEN DIFERENCIACION ADIPOGENICA Y TERMOGENICA DE LOS ADIPOCITOS MARRONES FETALES.....	77
4.3.1 El IGF-1 induce la expresión de genes adipogénicos, aumenta el contenido lipídico y la incorporación de glucosa en los adipocitos marrones fetales.....	78
4.3.2 El IGF-1 y también la insulina aumentan la expresión de UP.....	83

4.3.3	La inducción de la FAS y de la UP por IGF-1 o insulina es dependiente del tiempo, siendo inhibida por la presencia de actinomicina D.....	83
4.3.4	El IGF-1 y también la insulina aumentan la transcripción " in vitro" de FAS y de UP.....	87
4.4	TNF- α INHIBE LA DIFERENCIACION ADIPOGENICA INDUCIDA POR INSULINA O IGF-1.....	89
4.4.1	El TNF- α inhibe la inducción de genes adipogénicos, la acumulación de lípidos y la incorporación de glucosa estimulada por insulina o IGF-1.....	89
4.4.2	El TNF- α bloquea la acción de la insulina inhibiendo la fosforilación del receptor.....	96
4.5	EL TGF- β INDUCE MITOGENESIS EN ADIPOCITOS MARRONES FETALES EN CULTIVO.....	99
4.5.1	Los adipocitos marrones fetales presentan varios tipos de receptores para TGF- β , al que unen con alta afinidad.....	99
4.5.2	El TGF- β aumenta la síntesis de DNA, el porcentaje de células en fases S y G2/M del ciclo celular y el número de células.....	99
4.5.3	El TGF- β induce la expresión de genes tempranos de proliferación, así como el contenido de las proteínas PCNA y p21-ras.....	104
4.6	TGF- β INDUCE LA EXPRESIÓN DE GENES ESPECIFICOS DE DIFERENCIACION DE ADIPOCITOS MARRONES FETALES.....	110
4.6.1	El TGF- β induce la expresión de UP mRNA de manera dependiente del tiempo y de la concentración.....	111
4.6.2	El TGF- β induce la expresión de genes lipogénicos y de fibronectina en cultivos primarios de adipocitos marronesfetales...	111
V.- CONCLUSIONES.....		117
VI.- BIBLIOGRAFIA.....		119

I.- INTRODUCCION

I.- INTRODUCCION

El tejido adiposo marrón (BAT) es un tejido exclusivo de mamíferos, cuya función principal es la producción de calor. Se sabe que en la rata el desarrollo de este tejido se produce perinatalmente, de modo que en el momento del nacimiento es plenamente funcional para hacer frente a la hipotermia postnatal. El proceso por el que genera calor se denomina termogénesis sin tiriteo, para el cual es necesaria por un lado la presencia de la proteína específica de este tejido: la proteína desacoplante (UP), capaz de desacoplar la fosforilación oxidativa, y por otro lado la maquinaria enzimática tanto lipogénica (que le permite acumular gotas de grasa) como lipolítica (para movilizar dicha grasa y obtener ácidos grasos que, además de generar equivalentes reductores que se incorporan a la cadena de transporte electrónico, también son activadores directos de la UP). Por todo ello, podemos decir que el proceso de diferenciación del BAT se produce en base a dos programas: un programa de diferenciación termogénica y un programa de diferenciación adipogénica.

Los estudios realizados por distintos grupos sobre el tejido adiposo marrón se han centrado fundamentalmente en la termogénesis y su regulación por noradrenalina (NA). Sin embargo, puesto que el sistema adrenérgico no es activo en el feto, el papel de la NA sólo es claro a nivel postnatal. Otras señales que inducen termogénesis del BAT son la triiodotironina (T3), una hormona posiblemente implicada en la diferenciación de este tejido durante el período fetal, y el ácido retinoico, para los cuales se han descrito recientemente elementos de respuesta en el gen de la UP.

Aunque la termogénesis es exclusiva, y por ello clave en el desarrollo del BAT, los procesos de proliferación y diferenciación adipogénica también juegan un papel fundamental a tener en cuenta a la hora de hacer un estudio completo sobre el desarrollo fetal del tejido adiposo marrón. Sin embargo, estos procesos han sido pobremente explorados, y no se conocen las señales implicadas.

Por todo ello, nos propusimos estudiar el desarrollo fetal tardío del BAT, profundizando en los procesos de proliferación y diferenciación, tanto adipogénica como termogénica, tratando de identificar posibles señales implicadas en dichos procesos. El trabajo se ha centrado en dos factores de crecimiento (IGF-1 y TGF- β) con un papel bien establecido en relación con el desarrollo fetal de distintos tejidos, regulando procesos de proliferación y diferenciación en células, entre otras, de origen mesenquimático.

Asímismo, hemos estudiado el papel del TNF- α , una citoquina que induce resistencia a la acción de la insulina y tiene marcados efectos antiadipogénicos.

De acuerdo con estos propósitos se trazó el siguiente **plan general de trabajo**:

1.- Caracterización de los adipocitos marrones fetales durante el último período de gestación en relación con su capacidad proliferativa y su estado de diferenciación adipogénica y termogénica.

2.- Papel diferencial del IGF-1 y de la insulina en la proliferación y la diferenciación de los adipocitos marrones.

3.- Efecto del TNF- α sobre la diferenciación adipogénica inducida por insulina o IGF-1 en los adipocitos marrones fetales.

4.- Papel del TGF- β en los procesos de proliferación y diferenciación de los adipocitos marrones.

II.- ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS

II- ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS

2.1.- EL TEJIDO ADIPOSO MARRON

En mamíferos existen dos tipos de tejido adiposo con funciones diferentes: el tejido adiposo blanco (WAT), que es el reservorio energético de la célula, y el tejido adiposo marrón (BAT), cuya función principal es la producción de calor mediante el mecanismo de "termogénesis sin tiriteo". El tejido adiposo marrón está constituido mayoritariamente por adipocitos marrones, células que presentan un elevado número de depósitos lipídicos multiloculares, así como gran cantidad de mitocondrias, en cuya membrana interna se encuentra la proteína desacoplante (UP), una proteína específica de estas células capaz de producir el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa liberándose la energía procedente del gradiente electroquímico de protones en forma de calor en lugar de sintetizarse ATP. El resto del tejido lo constituyen células endoteliales mesenquimatosas perivasculares, preadipocitos, mastocitos, fibroblastos y células de Schwan entre otras.

El BAT no está funcionalmente activo de manera permanente. De hecho, se activa vía sistema nervioso simpático en determinadas situaciones fisiológicas, tales como durante el período perinatal, por exposición y adaptación al frío, en el despertar de los animales hibernantes, y por adaptación a dietas hipercalóricas. Debido a su capacidad para desacoplar la respiración mitocondrial, el BAT juega un papel importante en el balance energético, disipando en forma de calor el exceso de energía en caso de sobrealimentación. Esto ha conducido a especulaciones sobre un posible papel preventivo de este tejido en la obesidad. De hecho, Lowell y col., (1993) han obtenido ratones transgénicos que expresan en el BAT la cadena A de la toxina diftérica o un mutante atenuado produciendo la ablación de dicho tejido, y estos ratones han desarrollado obesidad.

La estimulación de la termogénesis, que ocurre principalmente a través de receptores β -adrenérgicos, actúa sobre el adipocito marrón a varios niveles: se produce una activación de vías metabólicas asociadas a la respiración mitocondrial, un aumento en la transcripción de genes asociados con la termogénesis, y una hipertrofia del BAT. Por el contrario, si la termogénesis no es necesaria los niveles de proteína y mRNA de la UP disminuyen, al igual que el contenido mitocondrial, mientras que se produce una acumulación de lípidos con lo que el adipocito marrón va adquiriendo apariencia de grasa blanca. En mamíferos pequeños, como los roedores, el BAT mantiene su capacidad termogénica a lo largo de toda

la vida; sin embargo en especies mayores este tejido está presente al nacer, pero rápidamente pierde su naturaleza marrón y adquiere apariencia de WAT (Casteilla y col., 1989). Esto, unido al hecho de que se han detectado adipocitos marrones conteniendo UP en típicos depósitos de tejido adiposo blanco (Cousin y col., 1992), plantea la duda si los adipocitos marrones y blancos son realmente distintos o si existe una interconversión entre ambos tipos celulares.

La diferenciación del BAT en la mayoría de las especies se produce durante la etapa fetal de modo que el tejido es identificable en el momento del nacimiento, permitiendo al recién nacido compensar las pérdidas de calor que sufre al abandonar el seno materno (Nedergaard y col., 1986). Aunque no se conocen con exactitud las señales que determinan la diferenciación del BAT, se sabe que los adipocitos marrones fetales se originan a partir de las células mesenquimatosas asociadas a los vasos sanguíneos que empiezan a proliferar rápidamente al mismo tiempo que se desarrollan los vasos en el interior del tejido. Pequeñas inclusiones lipídicas crecen progresivamente en el citoplasma de los preadipocitos. Sus mitocondrias simultáneamente aumentan en número y tamaño, y su membrana interna se desarrolla muy activamente formando numerosas crestas. Los preadipocitos progresivamente pierden su capacidad de división, aunque el tejido sigue creciendo debido a la presencia de las células mesenquimatosas perivasculares que mantienen su capacidad proliferativa. Al final del proceso, la inervación simpática es plenamente funcional (Né Chad, 1986). Después de esta fase formativa, el BAT se desarrolla aumentando su peso húmedo, su contenido proteico y el número de mitocondrias, que se van enriqueciendo en UP y en los componentes de la cadena respiratoria (Sundin y Cannon, 1980). Todos estos cambios mitocondriales dan lugar a un gran aumento de la capacidad termogénica del tejido. La capacidad de comunicación entre los adipocitos también se ve incrementada (Né Chad, 1986). El desarrollo del tejido adiposo marrón, por tanto, conlleva un programa de diferenciación adipogénico, responsable de la síntesis y acumulación de lípidos en gotas de grasa multiloculares, y un programa termogénico, responsable de la expresión y acumulación de la proteína desacoplante mitocondrial. De ellos y de las posibles señales implicadas en su inducción y modulación vamos a tratar en los siguientes apartados.

2.1.1.- Diferenciación termogénica: la UP

Hay que distinguir la activación termogénica del BAT en situaciones fisiológicas, que es mediada principalmente por noradrenalina (NA), de lo que es la diferenciación termogénica del tejido, que comienza durante el último período de gestación (Porrás y col.,

1990) y que es independiente de NA, ya que la inervación del sistema nervioso simpático no está totalmente desarrollada en este momento. Como se ha comentado anteriormente, la capacidad termogénica del tejido adiposo marrón reside en la proteína desacoplante o termogenina, una proteína de 32 kDa característica y exclusiva de las mitocondrias de los adipocitos marrones, que comienza a expresarse entre los días 18 y 19 de vida fetal en la rata (Giralt y col., 1990). La UP está codificada por un gen nuclear que presenta un único lugar de iniciación de la transcripción. Sin embargo, en la rata, la adición alternativa de secuencias poli A+ da lugar a dos mRNAs: una especie de expresión mayoritaria de 1.6 kb y otra de expresión minoritaria de 1.9 kb (Kozak y col., 1988). Una región de 4.5 kb en el extremo 5' del gen de la UP se ha demostrado que contiene secuencias implicadas en la regulación hormonal de la expresión génica de esta proteína y en su especificidad celular. Estudios recientes han descrito dos regiones reguladoras en el gen de rata de la UP: un intensificador, no específico, localizado aproximadamente a 2.5 kb del lugar de iniciación de la transcripción, y una región proximal, que se ha propuesto contendría un silenciador específico de tejido y elementos de respuesta a cAMP. En esta región 5' proximal, que comprende los pares de bases desde -611 hasta +110, se han encontrado 9 dominios de unión a proteínas que incluyen los elementos para la actividad basal del promotor (elementos TATA y CCAAT), un elemento de respuesta a cAMP, dos sitios de unión para C/EBPs en las posiciones -457/-440 y -335/-318, y tres dominios de unión a proteínas no identificadas que comparten una secuencia común GCCCCT. Una región localizada entre los pares de bases -512/-487 ha sido identificada como el único elemento que liga proteínas nucleares presentes en BAT pero no en hígado. Este posible elemento específico de tejido en el gen de la UP contiene una secuencia idéntica a elementos de genes que unen miembros de la familia Ets de factores de transcripción (Yubero y col., 1994b). Análisis de la región intensificadora han revelado elementos de respuesta a hormonas tiroideas (Rabelo y col., 1995), así como al ácido retinoico (Alvarez y col., 1995).

Para estudiar el proceso de diferenciación termogénica del BAT "in vitro" se han desarrollado sistemas de cultivos primarios con adipocitos marrones inmaduros (tanto células precursoras procedentes de animales jóvenes o adultos, como células fetales), profundizando en la acción principalmente de la NA, pero también de otras hormonas como T3, insulina y dexametasona, que han demostrado ser esenciales para el proceso (Klaus y col., 1991; Casteilla y col., 1991; Shima y col., 1994). Sin embargo, son los cultivos primarios de adipocitos marrones fetales los que se acercan más y reproducen mejor el proceso de diferenciación que ocurre "in vivo" en el BAT durante el desarrollo fetal. Utilizando este sistema, Guerra y col. (1994) han demostrado que además de la NA, principal factor inductor de la UP, T3 es capaz de inducir "per se" la expresión de la

termogenina en ausencia de estímulo noradrenérgico, lo cual unido al hecho de que ya en el día 20 de vida fetal el BAT muestra una maduración completa del sistema tiroideo (Tuca y col., 1993) hace pensar en la T3 como uno de los posibles factores implicados en el establecimiento del fenotipo diferenciado de este tejido en el período fetal.

Aunque los cultivos primarios han sido empleados con éxito en estudios sobre regulación de los procesos de diferenciación en el BAT, su utilización conlleva inevitables limitaciones referentes a la variabilidad, cantidad de células disponibles y duración de los protocolos de experimentación, por lo que se ha intentado establecer líneas celulares permanentes. Ross y col. (1992) desarrollaron una línea celular (HIB-1B) derivada de un tumor de BAT (hibernoma) generado en un ratón transgénico que expresa el antígeno T (AgT) del virus SV40 bajo el control del promotor de la α P2, siendo la primera línea establecida capaz de expresar UP en respuesta a NA o cAMP, alcanzándose niveles comparables a los obtenidos con cultivos primarios (Klaus y col., 1994). También se han establecido múltiples líneas celulares de adipocitos marrones fetales de rata (la mayoría expresan UP) por transfección con construcciones génicas constitutivas o inducibles del AgT del virus SV40, sólo o en combinación con genes H-ras normales o transformantes. La variedad de líneas generadas podría corresponder a distintos estados del BAT durante el desarrollo (Benito y col., 1993)

2.1.2.- Diferenciación adipogénica

Hasta ahora hemos hablado de la diferenciación del BAT desde el punto de vista termogénico, considerando como marcador de diferenciación la presencia de UP. Sin embargo, la diferenciación de este tejido también conlleva un proceso de adipogénesis que todavía no se conoce en profundidad, aunque se han realizado estudios sobre flujo lipogénico y actividades de enzimas lipogénicas "in vivo" en BAT fetal (Pillay y Bailey, 1982; Roncero y col., 1987) así como estudios acerca de la regulación hormonal (principalmente por insulina, T3 y NA) de la expresión y actividades de dichas enzimas en cultivos primarios de adipocitos marrones fetales (Lorenzo y col., 1989; Valverde y col., 1992).

Por el contrario, la diferenciación de adipocitos blancos ha sido ampliamente investigada, sobre todo en líneas celulares establecidas de preadipocitos, siendo el modelo de las células 3T3-L1 uno de los más utilizados: durante el crecimiento, los preadipocitos tienen apariencia de fibroblastos. Sin embargo, cuando el crecimiento se detiene en presencia de suero se produce la diferenciación espontánea a adipocitos: las células se redondean y acumulan pequeñas gotas de grasa que posteriormente se fusionan dando ya una apariencia similar a las células del tejido adiposo blanco. La parada del crecimiento y/o

altas densidades celulares, bajo condiciones que favorecen la diferenciación, inducen la expresión de marcadores tempranos de diferenciación, tales como la lipoprotein lipasa (LPL) y la cadena $\alpha 2$ del colágeno VI (A2COL6/pOb24). La expresión de estos marcadores es independiente de las hormonas requeridas para la diferenciación terminal. Durante la fase terminal de diferenciación, los adipocitos presentan un marcado incremento en la lipogénesis de novo. Las actividades y los niveles de mRNA de enzimas como ATP citrato liasa, enzima málica (ME), acetil-CoA carboxilasa (ACC), ácido graso sintasa (FAS), glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (GPDH), gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), estearoil-CoA desaturasa (SCD1), y glicerol-fosfato aciltransferasa, entre otras, se incrementan entre 10 y 100 veces (Smas y Sul, 1995). El número de transportadores de glucosa y de receptores de insulina también aumenta, así como la sensibilidad a dicha hormona. De todos los transportadores de glucosa, los fibroblastos 3T3-L1 expresan el Glut 1. La diferenciación de estas células a adipocitos va acompañada de la expresión de una segunda isoforma de transportador de glucosa, Glut 4, que pasa a ser la mayoritaria. Los transportadores Glut 1 se encuentran presentes en la superficie celular en condiciones basales, y deben estar implicados fundamentalmente en el mantenimiento de la incorporación basal de glucosa. Sin embargo, los transportadores Glut 4 en condiciones basales se encuentran principalmente en depósitos intracelulares, y la insulina produce su traslocación a la superficie celular. Por tanto, los transportadores Glut 4 son los principales responsables de la estimulación en la incorporación de glucosa observada en respuesta a insulina (Czech y col., 1992). Esta hormona también ejerce una regulación sobre Glut 4 a largo plazo, aumentando su expresión (Weiland y col., 1991). En el tejido adiposo marrón la expresión de los genes Glut 1 y Glut 4 está regulada a lo largo del desarrollo. Durante la vida fetal se expresa predominantemente el Glut 1, mientras que la vida postnatal se caracteriza por una represión de esta isoforma, acompañada de un aumento en la expresión de Glut 4 (Santalucía y col., 1992).

Otras proteínas específicas del tejido adiposo, tales como la proteína de unión a ácidos grasos aP2, perilipina y adipsina también son sintetizadas por los adipocitos maduros. Además del aumento en los niveles de mRNAs de proteínas directamente relacionadas con el metabolismo lipídico, se producen alteraciones en el tipo y los niveles de componentes de matriz extracelular secretados, así cuando las células cambian su morfología fibroblástica por un aspecto típico adipocítico redondeado los niveles de actina y tubulina disminuyen (Smas y Sul, 1995).

De todas las proteínas que se inducen durante la diferenciación adipocítica vamos a detenernos en la FAS por jugar un papel fundamental en la lipogénesis de novo, ya que es un enzima multifuncional que cataliza 7 reacciones implicadas en la síntesis de palmitato a

partir de acetil-CoA y malonil-CoA. No se conoce regulación de este enzima por modificación covalente o efectores alostéricos. Sin embargo, su concentración es muy sensible a estímulos nutricionales, hormonales, y durante el desarrollo, siendo esta regulación fundamentalmente a nivel transcripcional. Durante la diferenciación de células 3T3-L1 a adipocitos, el aumento en la síntesis de FAS está mediado por procesos transcripcionales y postranscripcionales (Moustaid y Sul, 1991). En fibroblastos 3T3-L1, el IGF-1 a dosis fisiológicas (o la insulina a dosis farmacológicas) aumenta la actividad del promotor de la FAS, siendo la región entre los nucleótidos -67 y -19 la responsable de esta respuesta (Misra y col., 1994). Ya en adipocitos 3T3-L1 los niveles de mRNA de FAS aumentan en respuesta a insulina, y disminuyen en presencia de cAMP. En estas mismas células la triiodotironina también estimula la transcripción del gen de la FAS, indicando efectos independientes de insulina, T3 y cAMP sobre la expresión de esta enzima. Las secuencias responsables del efecto de la insulina sobre el promotor de la FAS en adipocitos 3T3-L1 se encuentran entre los nucleótidos -67 y -25. Esta región contiene, además de una secuencia consenso TATA, una zona de unión a proteínas nucleares que no comparte homología con secuencias consenso para factores de transcripción conocidos (Moustaid y col., 1994).

En los últimos años se han identificado varios factores transcripcionales como posibles reguladores del proceso de adipogénesis. De ellos, la familia de proteínas de unión a secuencias amplificadoras CCAAT (C/EBPs) ha sido la mejor caracterizada. Son factores transcripcionales (la mayoría actúa como activadores) con un dominio en la porción C terminal que contiene una región con estructura de cremallera de leucina y una región de naturaleza básica de unión al DNA. Se han descrito varias isoformas (C/EBP α , β , δ , γ), que forman homodímeros y heterodímeros entre ellas, con lo cual los efectos sobre la transcripción génica depende de las concentraciones relativas de las distintas isoformas de C/EBPs (Cao y col., 1991). Se piensa que las proteínas C/EBPs son esenciales para el establecimiento del fenotipo diferenciado de ciertos tipos celulares. Recientemente, Manchado y col., (1994) han caracterizado la expresión de C/EBP α y C/EBP β a nivel de mRNA y proteína en el tejido adiposo marrón, sugiriendo un papel para estos factores transcripcionales en el proceso de diferenciación del BAT. En el modelo de diferenciación de células 3T3-L1 se ha descrito un patrón temporal de expresión de las distintas isoformas de C/EBPs, acumulándose altos niveles de C/EBP δ y β durante la fase más temprana, mientras que en la fase de diferenciación terminal estas isoformas son reemplazadas por C/EBP α , un factor que se ha demostrado transactiva los promotores de algunos genes específicos (aP2, SCD1, Glut 4) que se inducen durante el proceso diferenciador (Kaestner y col., 1990). En el promotor del gen de C/EBP α se han encontrado sitios de unión a

C/EBPs, lo cual hace pensar que los miembros β y δ de la familia C/EBP sean responsables de la activación de la expresión del gen C/EBP α en la fase terminal (Cao y col., 1991). Recientemente, Yeh y col., (1995) han mostrado evidencias más claras acerca del papel de las isoformas β y δ en el proceso de diferenciación adipocítica. En cuanto al C/EBP α , existen datos concluyentes que le adjudican un papel esencial en la etapa terminal de este proceso, siendo su expresión no sólo necesaria, sino suficiente para inducir la diferenciación de preadipocitos (Lin y Lane, 1994).

La determinación del inicio del programa de diferenciación se produce típicamente en presencia de suero o plasma, aunque los factores responsables no se conocen con exactitud. Sin embargo, sí se han identificado varios reguladores positivos y negativos de la diferenciación adipocítica. Entre los reguladores positivos se encuentran (solos o en combinación): dexametasona, indometacina, factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-1), insulina, isobutilmetilxantina (IBMX). Entre los reguladores negativos de la adipogénesis se incluyen el factor de crecimiento transformante tipo β (TGF- β), el factor de necrosis tumoral (TNF), el factor preadipocito I (pref-1), el factor de crecimiento fibroblástico (FGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el ácido retinoico, y la interleukina-1 α (IL-1). En algunos casos los efectos de los reguladores negativos son indirectos como resultado de la estimulación del crecimiento, mientras que en otros casos son efectos independientes (Smyth y col., 1993).

Aunque los procesos de proliferación y diferenciación normalmente se consideran alternativos y mutuamente excluyentes, se han descrito señales capaces de estimular ambos procesos, así por ejemplo la insulina, que es necesaria para la diferenciación de la línea celular preadipocítica 3T3-F442A, también induce proliferación (Tang y col., 1995); y el IGF-1 puede estimular la proliferación y diferenciación de células precursoras de adipocitos de rata (Dexler y col., 1987). En el tejido adiposo marrón se ha descrito "in vivo" un aumento de la proliferación celular paralelo a la activación del programa de diferenciación termogénica en respuesta al frío, a través de la estimulación de receptores β adrenérgicos mediada por NA (Bukowieck y col., 1986).

2.2 PROLIFERACION DE CELULAS MESENQUIMATICAS

La proliferación celular es un proceso cuidadosamente regulado que responde a necesidades específicas del organismo. Las células, tanto en cultivo como "in vivo", crecen a medida que avanzan por las etapas del ciclo celular. Sin embargo, muchas células animales existen "in vivo" en estado quiescente, es decir, sin aumentar su masa o sin pasar

por el ciclo celular. En la primera fase del ciclo, denominada fase de crecimiento o fase G₁ las células aumentan de tamaño. Después replican todos sus cromosomas en la fase de síntesis o fase S. A continuación, se produce una segunda fase de crecimiento G₂ donde las células se preparan para la división, y finalmente se dividen en la fase M de mitosis. Las células hijas producto de la división celular pueden volver a entrar en el ciclo o pueden abandonarlo, pasando a una fase G₀ de quiescencia donde permanecen hasta el final de su vida o, bajo determinadas condiciones, son reinducidas a entrar en ciclo celular. La progresión de las células eucarióticas a través de las diferentes etapas del ciclo está mediada por la activación secuencial de un grupo de proteínas serina/treonina quinasas (Cdks) cuyas actividades son reguladas por proteínas que se asocian llamadas ciclinas, ya que sus concentraciones varían durante el ciclo celular.

Las señales extracelulares que inducen proliferación son fundamentalmente factores polipeptídicos y neuropéptidos o neurohormonas, las cuales actúan sobre la célula de manera endocrina, paracrina o autocrina. Dichas señales actúan sobre las distintas células en función de la existencia de receptores de membrana que las distinguen. Los receptores mitogénicos pueden dividirse en tres grandes grupos desde el punto de vista bioquímico: receptores con actividad tirosina quinasa en su dominio intracelular, receptores con siete dominios transmembranales y sin actividad tirosina quinasa, y receptores con un único dominio transmembranal sin actividad tirosina quinasa.

Son las señales mitogénicas ligadas a receptores con actividad tirosina quinasa las más difundidas en la generalidad de las células superiores. Dichas señales están acopladas al ciclo celular, de manera que una serie de señales son capaces de sacar a la célula de la fase G₀ de quiescencia e introducirla en la fase G₁ (señales de competencia celular entre las que se encuentran factores de crecimiento tales como PDGF, FGF y EGF), y otras que son capaces de hacer avanzar a la célula a lo largo de la fase G₁ e introducirla en la fase S de replicación del DNA (señales de progresión del ciclo entre las que destacan la insulina y el IGF-1). Ambos tipos de señales son necesarias para que la célula entre en el ciclo celular, progrese a lo largo del mismo y desemboque en la mitosis. Esto es al menos lo que ocurre en el modelo de células fibroblásticas BALB/c 3T3. No obstante, en otros sistemas celulares algunas señales mitogénicas son completas y capaces por sí mismas de producir proliferación. Tal es el caso del PDGF o de la bombesina en células mesenquimáticas de tipo fibroblástico, especialmente en líneas celulares establecidas en cultivo como las NIH-3T3 o las Swiss 3T3 (Blakeley y col., 1989; Rozengurt y Sinnott-Smith, 1983).

Aunque las líneas celulares establecidas han sido ampliamente utilizadas en estudios de proliferación, los resultados obtenidos en cultivos primarios se acercan más a lo que

realmente sucede "in vivo". IGF-I, IGF-II, TGF- β , TGF- α , aFGF, bFGF, y particularmente PDGF aumentan la síntesis de DNA en cultivos primarios de precursores de adipocitos, encontrando efectos sinérgicos cuando se añaden en combinación (Butterwith y Goddard, 1991; Butterwith y col., 1993). Los adipocitos marrones fetales de rata también proliferan en cultivo primario en respuesta, tanto a factores individuales como el IGF-I, como a combinaciones de factores tales como EGF más vasopresina más bombesina o suero fetal al 10% (Valverde y col., 1991).

2.3.- SEÑALES IMPLICADAS EN PROLIFERACION Y DIFERENCIACION DE CELULAS MESENQUIMATICAS

Durante el desarrollo fetal tienen un papel primordial los factores de crecimiento que actúan de forma autocrina/paracrina regulando los procesos de proliferación y diferenciación celular, de modo que el resultado es producto de la acción coordinada de distintas señales (positivas y negativas) sobre ambos procesos. Sobre células mesenquimáticas han demostrado tener especial importancia factores como el **IGF-1** (que es expresado por células de origen mesenquimático durante el desarrollo fetal, y en estudios "in vitro" e "in vivo" se ha corroborado su papel como inductor de la proliferación y diferenciación de células mesenquimáticas, que incluyen mioblastos, condrocitos, osteoblastos y preadipocitos), y el **TGF- β** (que se localiza durante la embriogénesis en regiones de reorganización mesenquimática, siendo un factor multifuncional implicado en los procesos de diferenciación del cartílago, hueso y células grasas, entre otros).

En los siguientes apartados se da una visión más amplia de las estructuras, modo de acción y efectos de ambos factores, así como de un tercero: el **TNF- α** que, aunque no tiene un papel demostrado durante el desarrollo fetal, sí está implicado en procesos de inhibición de la diferenciación adipocítica en estados patológicos como la diabetes y la caquexia.

2.3.1.- Factor de Crecimiento Similar a la Insulina (IGF-1)

2.3.1.1.- El factor

El factor de crecimiento similar a la insulina de tipo 1 (IGF-1) es un péptido aislado originalmente de la fracción Cohn de suero humano. Su nombre hace referencia al hecho de que presenta efectos mitogénicos a concentraciones del rango nanomolar "in vitro", así como que muestra efectos del tipo insulina en tejido adiposo y muscular (Rinderknecht y

Humbel, 1978). Se encuentra en el plasma sanguíneo a concentraciones de 20-80 nM y en la mayoría de los tejidos a concentraciones menores. La mayor parte del IGF-1 sérico se encuentra ligado a proteínas de unión específicas (IGFBPs), que prolongan la vida media del factor.

La estructura del IGF-1 es homóloga a la de la proinsulina. Es una cadena polipeptídica sencilla de 7.5 kDa de peso molecular, constituida por 70 aminoácidos. Consta de 4 dominios: B, C, A y D, de los cuales A y B presentan homología estructural con las cadenas A y B de la insulina. El dominio C es análogo al péptido C de la proinsulina, mientras que el dominio D no está presente en dicha hormona (Humbel, 1990). Existen 3 puentes disulfuro intracatenarios, localizados en posiciones análogas a las de la proinsulina (Rinderknecht y Humbel, 1978) (Figura I A). Mediante la expresión de mutantes de IGF-1 se ha identificado el extremo N-terminal del factor como el sitio de reconocimiento para las IGFBPs. La delección de los 3 primeros residuos o la sustitución de los residuos 3, 4, 15 y 16 disminuye drásticamente su afinidad por estas proteínas. Asimismo, los residuos aromáticos de las posiciones 23-25 han sido implicados como sitio de reconocimiento para el receptor de IGF-1 (Humbel, 1990). Estudios realizados por Bayne y col., (1990) han demostrado que Tyr²⁴, Tyr³¹ y Tyr⁶⁰ están relacionadas con la alta afinidad de unión del IGF-1 por su receptor. El IGF-1 no es sintetizado como tal, sino en su forma precursora, que consiste en: un péptido señal, los cuatro dominios (BCAD) que constituyen el factor de crecimiento maduro de 70 aminoácidos, y una región propéptido en el extremo C-terminal (péptido E). Además de la forma clásica de IGF-1 de 70 aminoácidos, se ha descrito en cerebro humano fetal y adulto, calostro de ternera y útero porcino una forma truncada del factor, que carece de los tres primeros residuos en el extremo amino terminal. Probablemente es el producto de un procesamiento diferencial del precursor. Esta forma truncada se ha visto que es 1.4-10 veces más potente que la clásica, pudiéndose deber a su reducida capacidad de unión a las IGFBPs (Humbel, 1990).

El IGF-1 es el producto de un único gen, localizado en humanos en el brazo largo del cromosoma 12. La organización de dicho gen ha sido extensamente estudiada en el hombre (Rotwein y col., 1986; De Pagter-Holthuisen y col., 1986) y en la rata (Shimatsu y Rotwein 1987). Las estructuras son muy similares, conteniendo ambos genes 6 exones. Este gen es transcrito y procesado de una manera compleja, de modo que da lugar a gran número de especies de mRNAs maduros, con tamaños comprendidos entre 0.7 y algo más de 7 kb como el resultado de procesos de corte y empalme alternativos, la existencia de diferentes sitios de poliadenilación y múltiples sitios de inicio de la transcripción.

El IGF-1 se expresa tanto postnatalmente como durante el desarrollo fetal. Durante la vida postnatal, el hígado es la principal fuente de IGF-1 circulante, que se encuentra a

una concentración de 200 ng/ml en el suero humano, actuando de forma endocrina sobre sus tejidos diana. Sin embargo, además del hígado, donde la síntesis y secreción de IGF-1 se encuentra bajo el control de la hormona de crecimiento (GH), se ha demostrado que una gran variedad de tejidos producen IGF-1 y contienen el mensajero de dicho factor, sugiriendo un papel autocrino/paracrino para el IGF-1 en estos tejidos, entre ellos, el tejido adiposo blanco (Peter y col., 1993), células de la granulosa del ovario (Hernández y col., 1989), y astrocitos (Komoly y col., 1992). La producción de IGF-1 extrahepática también es regulada por GH, aunque existen estudios que indican que ciertos factores locales pueden intervenir en esta regulación (McCarthy y col., 1995).

El IGF-1 no actúa únicamente como factor de crecimiento postnatal dependiente de GH, sino que también se ha visto que presenta acciones durante el desarrollo prenatal. En varias especies el IGF-1 es sintetizado durante la vida fetal. Tanto el factor como su mensajero han sido detectados en múltiples tejidos fetales de mamíferos (D'Ercole y col., 1980), predominantemente en células de origen mesenquimático. En la rata el nivel del RNA mensajero de IGF-1 aumenta casi 9 veces en la mitad del período gestacional (días 11-13), coincidiendo con la organogénesis y antes de que se inicie la expresión de GH, lo cual indica que debe ser regulado por otras señales diferentes a dicha hormona (Rotwein y col., 1987). Asimismo, en el embrión temprano de pollo se han encontrado receptores para IGF-1, y ya antes de que se establezca la circulación (también antes de la aparición de GH), se puede detectar el mRNA del factor (Caldés y col., 1991) (Kikuchi y col., 1991). Todo ello sugiere que el IGF-1 juega un papel importante en la regulación del crecimiento fetal.

Los factores de crecimiento similares a la insulina de tipo 1 y 2 se encuentran en plasma y otros fluidos extracelulares (linfa, líquido amniótico.....) ligados a proteínas de unión (IGFBPs) con alta afinidad y especificidad. Hasta ahora se han purificado y clonado 6 IGFBPs, para las cuales se han propuesto cuatro funciones esenciales que coordinan y regulan las actividades biológicas de los IGFs. Estas son: 1) actuar como proteínas transportadoras en plasma y controlar el flujo de IGFs desde el espacio vascular; 2) prolongar la vida media de los IGFs y regular su aclaramiento metabólico; 3) proporcionar el medio para una localización específica a nivel tisular y celular de estos factores de crecimiento; y 4) modular directamente la interacción de los IGFs con sus receptores y de esta forma controlar indirectamente sus acciones biológicas. Además existen evidencias de que las IGFBPs pueden tener efectos directos sobre funciones celulares, y al menos una de las IGFBPs se ha visto que es un ligando para un receptor celular específico. (Jones y Clemmons, 1995).

2.3.1.2.- El receptor de IGF-1

El receptor del IGF-1 (IGF-1R) es una glicoproteína transmembranal heterotetrámera con actividad tirosina quinasa, que liga IGF-1 con alta afinidad e IGF-2 con mucha menor afinidad. En estructura y acción, el IGF-1R es muy similar al receptor de la insulina. Ambos están formados por dos subunidades α que contienen regiones ricas en cisteína, y dos subunidades β , unidas por puentes disulfuro dando lugar a un complejo heterotetramérico $\alpha_2\beta_2$. Las subunidades α , responsables de la unión con el ligando, y una porción de las subunidades β constituyen el dominio extracelular del receptor, mientras que las porciones intracelulares de las subunidades β poseen los dominios tirosina quinasa que median la respuesta biológica (Ullrich y col., 1985, 1986) (Figura I B). El receptor del IGF-1 es sintetizado como un precursor de 1367 aminoácidos. Durante su traslocación al retículo endoplásmico elimina un péptido señal de 30 aminoácidos y sufre una ruptura proteolítica para dar lugar a las dos subunidades β (135 kDa) y las dos subunidades α glicosiladas (90kDa).

Los cDNAs del receptor humano de insulina y del receptor humano de IGF-1 han sido clonados y secuenciados, encontrándose un alto grado de homología (más del 50%) en la secuencia aminoacídica. Aunque la mayor similitud se encuentra en el dominio tirosina quinasa (84% de homología), las posiciones de los sitios de glicosilación y de los residuos de cisteína en el dominio extracelular también están altamente conservadas (Ullrich y col., 1986). A pesar de estas similitudes estructurales, los dos receptores difieren en especificidad de ligandos, distribución en tejidos y papeles biológicos. La insulina se liga al IGF-1R con una afinidad aproximadamente 100-1000 veces menor que con la que se liga a su propio receptor. Los mismos valores se pueden aplicar a la afinidad del IGF-1 por el receptor de la insulina (Czech, 1989). Con la utilización de receptores quiméricos insulina/IGF-1, se ha comprobado que los determinantes estructurales que definen la afinidad y especificidad por el ligando están localizados en distintos dominios dentro de las subunidades α de los receptores para insulina e IGF-1. Así, los 68 primeros residuos del extremo N-terminal y también los 400 de la zona C-terminal de la subunidad α del receptor de la insulina determinan su especificidad por dicha hormona, mientras que en el IGF-1R la zona responsable de la especificidad para IGF-1 es una región (entre el aminoácido 132 y el 315) del dominio rico en cisteína de la subunidad α . (Schumacher y col., 1991; Kjeldsen y col., 1991).

Aunque hay evidencias de la existencia de múltiples especies del IGF-1R, los datos publicados apuntan la existencia de un único gen que se encuentra localizado en humanos en el brazo largo del cromosoma 15 (Ullrich y col., 1986) y que consta de 21 exones, con

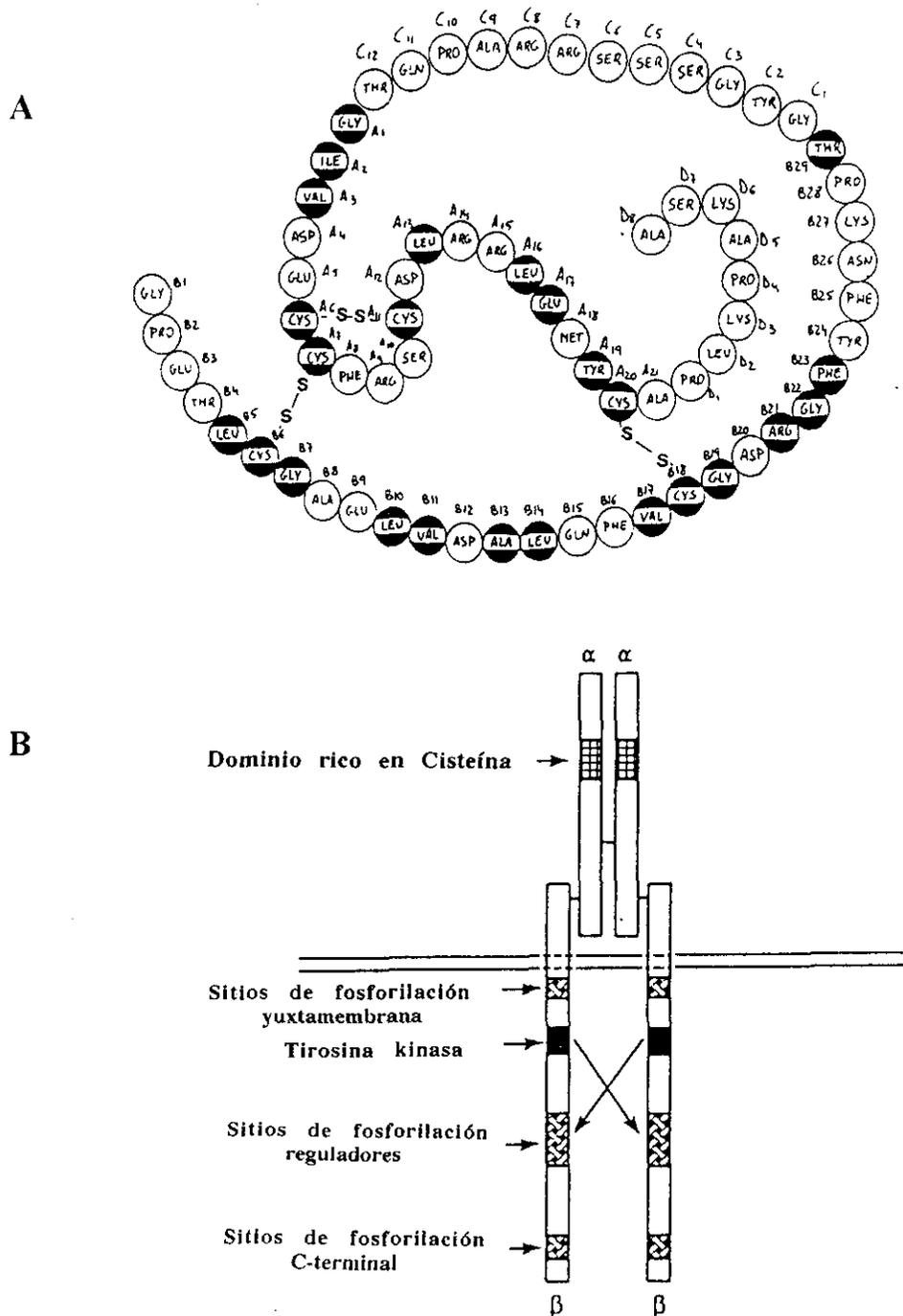


FIGURA I Secuencia aminoacídica del IGF-1 humano (A) y estructura de su receptor (B)

A) Los aminoácidos que forman parte de cada dominio (B,C,A y D) se encuentran indicados. Las posiciones que son idénticas a las de la insulina aparecen en negro.

B) Se muestra un modelo esquemático del receptor de IGF-1 con los diferentes dominios funcionales.

un sitio de corte y empalme alternativo en el extremo 5' del exon 14 (Abbot y col., 1992). Los mayores niveles de mRNA del receptor de IGF-1 se ven durante el estado embrionario, disminuyendo a niveles mucho menores en el animal adulto. Además el gen del IGF-1R durante el desarrollo en la rata es regulado de manera específica para cada tejido (Werner y col., 1989). La región promotora del gen ha sido clonada y secuenciada por varios grupos, y presenta similitudes con promotores de genes altamente regulados, lo cual apoya la hipótesis de que la expresión del IGF-1R es cuidadosamente regulada. (Werner y col., 1992). Estímulos patológicos y fisiológicos (como el estado nutricional, hormonas esteroídicas) tienen gran influencia sobre la expresión y actividad de este receptor. Los factores de crecimiento también modulan su expresión: así, tanto el bFGF como el PDGF incrementan los niveles del mRNA en células en cultivo.

Algunos trabajos utilizando métodos de análisis heterodúplex con digestión RNAsa han demostrado la existencia de dos mRNAs diferentes para el IGF-1R en varios tejidos y líneas celulares (Yee y col., 1989). Un transcrito es idéntico al receptor de IGF-1 clonado, mientras que el segundo carece de tres pares de bases (secuencia CAG) en la región codificante de la porción extracelular de la subunidad β . Este último mRNA es generado por un proceso de corte y empalme alternativo en el exon 14.

Recientes estudios a nivel de proteína han demostrado la existencia de dos receptores de IGF-1 distintos, que difieren en el peso molecular de la subunidad β y en los niveles de expresión relativos durante el desarrollo (Alexandrides y Smith, 1989). Por otro lado, en tejidos humanos y líneas celulares que expresan tanto receptores de insulina como de IGF-1, se ha descrito que una proporción de receptores existe como estructuras híbridas ($\alpha\beta\alpha'\beta'$) (Soos y Siddle, 1989; Moxham y col., 1989). Algunos datos apoyan la idea de que estos receptores híbridos están formados por un dímero $\alpha\beta$ del receptor de la insulina en asociación con un dímero $\alpha\beta$ del IGF-1R:

a.- Los tetrámeros híbridos pueden ser inmunoprecipitados por anticuerpos reactivos contra el receptor de la insulina o contra el del IGF-1, pero individualmente los dímeros $\alpha\beta$ reaccionan únicamente con anticuerpos específicos para un único receptor (Garofalo y Rosen, 1989; Moxham y col., 1989; Soos y Siddle, 1989).

b.- Mapas peptídicos de las dos subunidades β de varias líneas celulares (Moxham y col., 1989) y del cerebro de rata (Garofalo y Rosen, 1989) son distintos.

c.- Se han formado receptores híbridos in vitro (Treadway y col., 1989).

En cualquier caso estos receptores híbridos presentan unos perfiles de especificidad de ligando más comparables al IGF-1R que al receptor de la insulina.

Existe la creencia generalizada de que el receptor de la insulina es responsable de los efectos metabólicos, mientras que el IGF-1R genera la respuesta mitogénica. Sin embargo, se han descrito varios ejemplos en los cuales IGF-1 media acciones metabólicas a través de

su propio receptor (Poggi y col., 1979; Cascieri y col., 1986), y otros en los que la insulina promueve proliferación por unión al suyo (Massagué y col., 1982; Krett y col., 1987; Mamounas y col., 1989). Así, la idea que impera es que tanto el receptor de la insulina como el del IGF-1 pueden mediar efectos metabólicos y mitogénicos. No obstante, dos series de observaciones apuntan hacia una especificidad generada a nivel del receptor:

a.- En un estudio con receptores quiméricos consistentes en el dominio extracelular del receptor de la insulina, y el dominio intracelular del IGF-1R, Lammers y col. (1989), han sugerido que el dominio citoplásmico del receptor del IGF-1 es casi 10 veces más eficiente como receptor mitogénico que el receptor de la insulina.

b.- Utilizando una serie de sustratos sintéticos, Sahal y col (1988) han demostrado que las preferencias de sustrato para ambos receptores son diferentes.

Realmente, comparando las estructuras de los dos receptores, se identifican ciertas regiones de baja homología que serían las responsables de las funciones celulares específicas.

2.3.1.3.- Vía de transducción de señales

La unión del ligando al receptor del IGF-1 induce interacciones alostéricas de las dos mitades $\alpha\beta$, dentro del receptor estabilizado por puentes disulfuro. Este mecanismo podría explicar la existencia de los receptores híbridos anteriormente descritos. Después de la unión con el ligando, se produce una rápida activación de la actividad tirosina quinasa del receptor, que conduce a la autofosforilación en residuos de tirosina de las subunidades β (fosforilación cruzada de una subunidad β por la actividad tirosina quinasa de la otra) (Czech, 1989), así como a la fosforilación en tirosina de otras proteínas. Asimismo se han descrito fosforilaciones cruzadas entre receptores de insulina y receptores de IGF-1 (Duronio, 1990; Beguinot y col., 1988). Cantley y col (1991) han probado que la proteína quinasa src purificada fosforila al receptor de IGF-1, apuntando la posibilidad de que el IGF-1R puede ser activado de una manera independiente de ligando. Además, las fosforilaciones del dominio intracelular del IGF-1R también se producen sobre residuos de serina y treonina, mediante la acción de otras proteínas quinasa, como la PKA o la PKC. Estas fosforilaciones atenúan la actividad tirosina quinasa del receptor, indicando un posible mecanismo de modulación del mismo. Condorelli y col. (1992), han descrito que en células tiroideas FRTL 5, la TSH induce la actividad de una fosfatasa serina/treonina que defosforila los receptores de insulina y de IGF-1, aumentando de este modo su actividad quinasa endógena.

El principal sustrato descrito para la actividad tirosina quinasa de las subunidades β del receptor de la insulina o del IGF-1 es una proteína citosólica de 185 kDa, conocida como IRS-1 (sustrato para el receptor de la insulina-1) que contiene al menos 20 residuos

de tirosina susceptibles de fosforilación, 6 de los cuales pertenecen a una secuencia de aminoácidos capaz de interactuar con proteínas que poseen dominios SH2 (de homología con src). Después de ser fosforilada en múltiples residuos de tirosina por el receptor de la insulina o del IGF-1, el IRS-1 se une a varias proteínas con dominios SH2: Nck (una proteína adaptadora), Syp (una proteína tirosina fosfatasa conocida también como PTP1D, PTP2C o SHPTP2), Grb2 (implicada en la ruta de activación de Ras), y p85 (la subunidad reguladora de la PI 3-quinasa, un enzima que fosforila al fosfatidil inositol en la posición D-3 del anillo de inositol). Así, tanto el receptor de IGF-1 como el de la insulina pueden iniciar múltiples vías de señalización a partir de la fosforilación del IRS-1 (Myers y col., 1994). IRS-1 ha demostrado ser una proteína importante en la mitogénesis inducida por IGF-1 o insulina (Myers y col., 1994), y recientemente se ha visto que se asocia con el antígeno T del virus SV40 (Zhou-Li y col., 1995), lo cual puede ser importante para el papel de los receptores de IGF-1 en mitogénesis y transformación celular. A pesar de la clara importancia del IRS-1 en la vía de transducción del IGF-1 e insulina, estudios con ratones deficientes en IRS-1 (Araki y col., 1994) sugieren la existencia de vías alternativas. De hecho, una segunda proteína de la familia IRS (IRS-2) ha sido clonada recientemente por Sun y col., (1995).

A parte de la activación de la PI 3-quinasa a través del IRS-1, Yamamoto y col., (1992) han demostrado que, al menos "in vitro", el receptor del IGF-1 se asocia directamente con la PI 3-quinasa. En esta asociación están directamente implicados dominios SH2 de la subunidad p85, los cuales son un sustrato directo para la actividad tirosina quinasa del receptor. Por otro lado una proteína de 62 kDa, que parece ser un nuevo sustrato para el IGF-1R (Sánchez-Margalet y col., 1995), también ha sido implicada en una segunda ruta entre el receptor y la PI 3-quinasa, independiente de IRS-1.

Otra proteína que resulta fosforilada en tirosina por la actividad quinasa del receptor es Shc (proteína que contiene dominios de homología con src). La familia Shc está formada por tres proteínas de 46, 52 y 66 kDa que contienen un único dominio SH2. Al igual que el IRS-1, al fosforilarse en tirosina Shc se asocia con Grb2 (Sasaoka y col., 1994), una proteína que además de los dominios SH2 por los que interactúa con IRS-1 y Shc, presenta dos dominios SH3 por los que se une a SOS, una proteína intercambiadora de nucleótidos que es capaz de activar Ras por incrementar el cociente Ras-GTP (activo)/Ras-GDP (inactivo) (Bar-Sagi, 1994). La proteína p21-Ras, que es codificada por una familia de genes: H-, K- y N-ras, se encuentra anclada por farnesilación a la cara interna de la membrana plasmática. La importancia de p21-Ras en la vía mitogénica del IGF-1 ha sido demostrada en el proceso de maduración meiótica de los oocitos de *Xenopus*, que es inhibido cuando anticuerpos Y13-259 contra Ras se microinyectan en estas células (Korn y col., 1987). El ras-GTP activo pone en marcha la cascada de las MAP quinasas, que

comienza con la activación de Raf posiblemente a través de una interacción directa Ras-Raf, aunque el mecanismo no está todavía bien establecido. La Raf quinasa (una serina/treonina quinasa) activada fosforila y activa a la proteína MEK (también conocida como MAP quinasa quinasa), que a su vez activa y fosforila a la MAP quinasa (Avruch y col., 1994). Uno de los sustratos de este último enzima es la RSK (quinasa S6 ribosomal), una quinasa que tiene blancos tanto a nivel citosólico como nuclear (fosforila factores de transcripción como Nur 77, c-Fos, c-Jun, así como la histona H3 (Blenis, 1993)). Además MAP quinasa se puede translocar al núcleo, pudiendo ser éste otro de los mecanismos por el que toda esta cascada de transducción de señales a nivel citoplasmático conecte con el núcleo, donde se tiene que producir la activación mediante fosforilación de factores de transcripción. Así, MAP quinasa y RSK parecen ser un punto común para las vías mitogénicas y diferenciadoras. En la Figura II se muestra un esquema de esta vía de señalización.

Recientemente, se ha descrito una interacción directa de Ras-GTP con la subunidad catalítica de la PI 3-quinasa (Rodríguez-Viciano y col., 1994). La activación de Ras da lugar a fosforilaciones en la posición D del anillo de inositol del PI, PI(4)P y PI(4,5)P₂, originando PI(3)P, PI(3,4)P₂ y PI(3,4,5)P₃. Estos metabolitos se piensa que juegan un papel importante en el crecimiento celular y en el metabolismo, pero no son hidrolizados por ninguna fosfolipasa conocida y no parece que participen en la vía clásica de los fosfatidil inositoles. El PI(3,4,5)P₃ podría activar la proteína quinasa C ζ , estableciéndose así un nexo de unión con la vía de la PKC. Este enzima se ha visto activada por IGF-1 en varios tipos celulares y podría estar implicada en el efecto mitogénico del IGF-1 sobre astrocitos de rata (Tranque y col., 1992).

Igualmente, se ha demostrado que la PI 3-quinasa no sólo fosforila fosfatidilinositoles, sino que también funciona como una serina proteína quinasa. De este modo puede regular su propia actividad puesto que cuando la p85 (subunidad reguladora) se fosforila en serina se inactiva la subunidad catalítica de 110 kDa (Dhand y col., 1994). También se ha visto que fosforila al IRS-1 de manera independiente de insulina, aunque el papel regulador de esta fosforilación no está bien establecido (Lam y col., 1994). Por otro lado, este enzima se ha relacionado con la activación del transporte de glucosa inducido por insulina mediante la translocación del transportador Glut 4 desde depósitos intracelulares a la membrana plasmática (White y col., 1994).

A nivel nuclear se ha visto que cuando las células Swiss 3T3 son tratadas con IGF-1 se produce una rápida disminución de la cantidad de polifosfoinositoles dentro del núcleo, con un aumento del diacilglicerol nuclear y traslocación de la proteína quinasa C a la región nuclear. Puesto que estos efectos son casi máximos a los pocos minutos de la

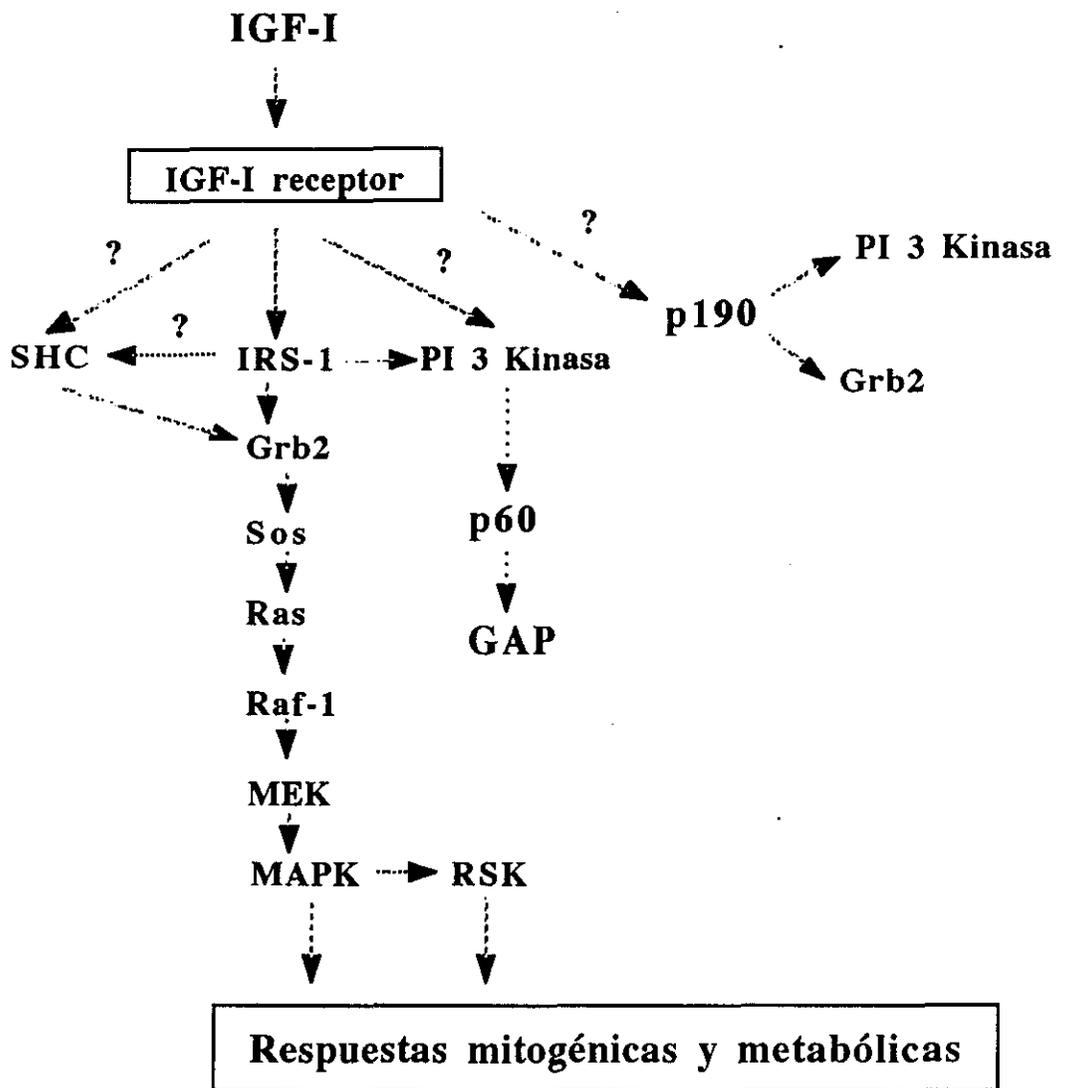


FIGURA II Esquema de la vía de señalización propuesta para el receptor del IGF-1

estimulación con IGF-1, están entre los sucesos intranucleares más tempranos descritos en respuesta a la activación tirosina quinasa y pueden representar una parte del mecanismo por el cual la información es transmitida desde la membrana plasmática al núcleo para iniciar la división celular (Divecha y col., 1991). En el núcleo celular también se ha demostrado que el IGF-1 produce una elevación del mRNA de c-fos en células L6 y adipocitos 3T3-L1. Chiou y Chang (1992) han descrito que en células BALB/c3T3, el IGF-1 estimula la transcripción del protooncogén c-jun, a la vez que estabiliza los mRNAs de dicha proteína ya existentes. En varias líneas celulares este factor también puede incrementar los niveles del mRNA de c-myc.

2.3.1.4.- Efectos biológicos

El IGF-1 muestra "in vitro" e "in vivo" efectos metabólicos a corto plazo similares a la insulina (tales como la estimulación del transporte de glucosa, síntesis de glucógeno y síntesis lipídica en tejido adiposo), pero sólo a concentraciones relativamente altas. La presencia de IGF-BPs en plasma previene la hipoglucemia en condiciones fisiológicas. Dimitriadis y col. (1992) han descrito que en músculo esquelético de rata "in vitro", el IGF-1 aumenta la velocidad de transporte de glucosa y su utilización independientemente de insulina, incrementa la velocidad de síntesis de glucógeno y puede estimular la glucólisis a nivel de la 6-fosfofructoquinasa. Sin embargo, los efectos biológicamente relevantes del IGF-1 a concentraciones nanomolar son la estimulación de la proliferación celular y, al menos en ciertos tejidos, la diferenciación celular.

A) IGF-1 y proliferación

La importancia del IGF-I durante el desarrollo fetal "in vivo" ha sido claramente demostrada en una serie de experimentos utilizando ratones a los que, mediante recombinación homóloga, se les ha creado mutaciones que anulan los genes que codifican para IGF-I, IGF-II, y el receptor de IGF-I (Liu y col., 1993; Baker y col., 1993). En todos los casos los animales presentaron retardo en el crecimiento, y su peso al nacer fue 30-65% del de los ratones normales control. Por otro lado, se han creado ratones transgénicos que sobreexpresan IGF-I, resultando en un incremento del peso corporal (30% sobre los ratones control) con un dramático aumento en el tamaño del cerebro. Los resultados obtenidos con animales transgénicos sugieren que el IGF-1 media la mayoría de los principales efectos de la hormona de crecimiento, y que las variaciones en la expresión local de IGF-1 puede producir un crecimiento desproporcionado de tejidos específicos (D'Ercole, 1993).

Los efectos mitogénicos del IGF-1 han sido descritos en una gran variedad de sistemas: linfocitos T, condrocitos, osteoblastos, queratinocitos, células de la granulosa, células de la médula ósea (Kooijman y col., 1992; Bohme y col., 1992; Barreca y col., 1992; Hernández y col., 1991; Merchav y col., 1992). En algunos, como por ejemplo en cultivos celulares de células tiroideas porcinas, el IGF-1 induce la proliferación por sí solo, no siendo necesaria la presencia de otros mitógenos (Takasu y col., 1989). En cultivos primarios de adipocitos marrones de fetos de 22 días el IGF-1 también es un factor de crecimiento completo, produciendo un incremento de la síntesis de DNA, el número de células y el contenido de DNA, RNA y proteínas, así como la inducción génica de la glucosa 6-P-deshidrogenasa (Valverde y col., 1991). Sin embargo en otros sistemas, como las células BALB/c3T3, se requiere la acción de varios factores de crecimiento en un orden determinado para que las células quiescentes lleguen a la fase S del ciclo celular: las células quiescentes, cuando se exponen a la acción de factores de competencia, como bFGF o PDGF, pasan de la fase G₀ a G₁, es decir, se hacen competentes para responder a factores de progresión como el IGF-1. Lu y Campisi (1992) han comprobado que p21 Ras es esencial para la capacidad del IGF-1 de estimular la entrada en fase S desde la fase G₁ tardía, y sin embargo no lo es para la capacidad de PDGF o EGF de inducir el mRNA de c-fos en la transición G₀/G₁. La función del PDGF como factor de competencia podría basarse en su capacidad para aumentar la expresión del receptor de IGF-1, puesto que se sabe que la sobreexpresión de receptores de IGF-1 en células BALB/c3T3 produce mitogénesis e induce el mRNA de cdc2 (una proteína quinasa implicada en la replicación del DNA y en la mitosis) en presencia de IGF-1, sin necesidad de PDGF (Surmacz y col., 1992). Otro factor de competencia, el bFGF, se ha visto que produce fosforilación en residuos de tirosina de la cadena β del receptor de IGF-1 en células BALB c3T3 que sobreexpresan dicho receptor (Yoshinouchi y col., 1993), pudiendo de esta forma sustituir al IGF-1 como factor de progresión. Por otro lado, transfectando células de modo que sobreexpresen EGF, el proto-oncogen c-myc o el antígeno T SV40 (estas manipulaciones hacen que la célula exprese suficiente IGF-1 para estimular su receptor de forma autocrina) se asegura la proliferación con la presencia únicamente de un factor de competencia (Travali y col., 1991, Porcu y col., 1992, Pietrzkowski y col., 1992). El IGF-1, bien como único factor en células humanas cancerígenas, o junto con PDGF en fibroblastos, induce la expresión de la ciclina D1 en el inicio de la fase G1 del ciclo celular, lo cual puede ser el principal mecanismo del IGF-1 como factor de progresión. Más tardíamente también aumenta la ciclina B1, cdc2 y cdk2 (Furlanetto y col., 1994). Complementariamente a sus efectos sobre proliferación, el IGF-1 también puede inhibir la muerte celular. Resultados

recientes sugieren para el IGF-1 un papel protector de apoptosis en fibroblastos deprivados de suero (Harrington y col., 1994).

En cultivos sin suero de células de la médula ósea, el IGF-1 estimula la proliferación de macrófagos a la vez que induce la formación de células multinucleadas (Scheven y Hamilton, 1991). El IGF-1 ha sido especialmente implicado en el control de la proliferación y diferenciación celular, como ocurre en el cartílago (Mc Quillan y col., 1986) y en las células de la granulosa (Adashi y col., 1985), lo cual podría indicar un giro en la señalización del receptor de IGF-1 similar al que ocurre en células de neuroblastoma. La insulina y el IGF-1 son potentes mitógenos para las células SH-SY5Y de neuroblastoma, que expresan receptores para ambos ligandos. Una vez que dichas células han diferenciado en presencia de PMA y suero, ni la insulina ni el IGF-1 pueden ya dar lugar a una respuesta mitogénica a pesar de la existencia de sus receptores. En cultivos diferenciados, la insulina o el IGF-1 inducen la autofosforilación de sus receptores, reorganización de actina y expresión de c-fos, mientras que respuestas tardías pre-replicas, como la expresión de c-myc y la activación de la ornitina descarboxilasa, no son inducidas. Además, la diferenciación de células SH-SY5Y inducida por PMA en medio libre de suero es fuertemente potenciada por concentraciones del rango nanomolar de IGF-1 (Pahlman y col., 1991).

B) IGF-1 y diferenciación

Se han descrito procesos de diferenciación inducidos por IGF-1 en varios sistemas celulares: células de la granulosa, condrocitos, osteoblastos. Este factor es un conocido inductor de la diferenciación miogénica terminal (Florini y col., 1991). También puede promover la diferenciación neuronal, siendo un factor no sólo diferenciador, sino también un posible factor de supervivencia para las neuronas. Robinson y col., (1994) recientemente han demostrado que la activación de p21 ras es necesaria para que la insulina y el IGF-1 promuevan la supervivencia y diferenciación de este tipo celular.

El papel del IGF-1 en adipogénesis tiene especial relevancia. La conversión de células fibroblásticas 3T3-L1 en adipocitos totalmente diferenciados muestra un requerimiento absoluto de insulina o IGF-1 (Rubin y col., 1978). Sin embargo, la expresión de oncogenes ras transfectados en estas células las diferencia a adipocitos en ausencia de insulina o IGF-1 (Benito y col., 1991). Otros oncogenes como src o trk no inducen dicho proceso diferenciador. Además, la transfección de mutantes de Ras dominantes negativos, bloquea específicamente el proceso diferenciador inducido por

insulina. Porras y col., (1992) han mostrado que en células 3T3-L1 no transfectadas, después de estimularlas con insulina, se produce una rápida estimulación en la formación del complejo activo Ras-GTP, así como una activación de MAP quinasa. Recientemente, se ha comprobado que en estas mismas células y tras estimulación con insulina también se activa la PI 3-quinasa (además de ras y MAP quinasa). Pretratando las células con wortmanina (un inhibidor de la PI 3-quinasa) se suprimen casi por completo todas estas activaciones, y como consecuencia se inhibe la diferenciación adipocítica (Uehara y col., 1995).

El IGF-1, a concentraciones fisiológicas, es capaz de aumentar la actividad del promotor de la ácido graso sintasa en fibroblastos 3T3-L1 (Misra y col., 1994). También muestra efectos metabólicos similares a la insulina, como la estimulación de la captación de glucosa y la síntesis de glucógeno y lípidos, aunque presenta menor potencia que la insulina. Sin embargo, en células 3T3-L1 la subunidad α de los receptores de insulina y de IGF-1 tiene una potencia similar para estimular la actividad y los niveles de mRNA del transportador de glucosa Glut 4 (Weiland y col., 1991). Existen datos que implican a la PI 3-quinasa, MAP quinasa y RSK en los efectos metabólicos de la insulina/IGF-1, aunque consideran que no son suficientes y sugieren la necesidad de otros mecanismos de señalización específicos activados únicamente en respuesta a insulina o IGF-1 (Wiese y col., 1995; Shepherd y col., 1995; Fingar y col., 1994).

2.3.2.- Factor de Crecimiento Transformante tipo β (TGF- β)

2.3.2.1.- El factor

Los TGF- β s pertenecen a una familia de proteínas inicialmente caracterizadas por su capacidad para promover el crecimiento de células normales no neoplásicas en agar blando, pero que actualmente se sabe que están implicados en una gran variedad de efectos celulares: estimulación/inhibición de crecimiento o diferenciación, transformación morfológica de células, y activación transcripcional de genes de respuesta temprana y genes que codifican para proteínas de matriz extracelular (Massagué, 1990; Moses y col., 1990). Son proteínas de 25 kDa con dos subunidades idénticas, habiéndose descrito 5 isoformas altamente homólogas, de las que sólo tres (TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3) se han purificado de sistemas de mamífero, mientras que la cuarta y quinta isoformas se han purificado de pollo y *Xenopus* respectivamente. Además de las formas homodiméricas se han aislado heterodímeros TGF- β 1.2 y TGF- β 2.3, aunque en mucha menor proporción.

El prototipo de la familia lo constituye el TGF- β 1, un dímero formado por dos cadenas idénticas de 112 aminoácidos unidos por puentes disulfuro. Cada cadena se

sintetiza como un precursor de 390 aminoácidos, que contiene una secuencia N-terminal hidrofóbica para la traslocación a través del retículo endoplásmico, una proregión con tres sitios de glicosilación, y el dominio activo C-terminal con 9 cisteínas (Derynck y col., 1985). Después de sintetizarse, dos cadenas de pro-TGF- β se asocian para formar un dímero unido por puentes disulfuro. Durante la secreción tiene lugar la ruptura proteolítica de los precursores, separándose las cadenas C-terminales (que constituyen el TGF- β maduro) de sus propéptidos aminotermiales, los cuales (conocidos también como LAP: proteína asociada a TGF- β latente) permanecen en forma dimérica asociados no covalentemente al TGF- β formando un complejo latente. Una fracción de TGF- β latente contiene además proteínas de alto peso molecular que se asocian a LAP, de las cuales la mejor caracterizada es la LTBP (proteína de unión a TGF- β latente). Esta proteína ha sido implicada en la asociación del TGF- β latente con la matriz extracelular. (Taipale y col., 1994). Para que el factor sea biológicamente activo se tiene que disociar de este complejo; "in vitro" se consigue mediante tratamientos físicos (calor) o químicos como exposición a pH ácido, pero el mecanismo de activación "in vivo" no se conoce, aunque podría estar mediado por ciertas glucosidasas y otras enzimas.

La mayoría de las células tienen la capacidad de expresar y secretar TGF- β y poseen receptores para este factor en su superficie, por lo cual se piensa que el TGF- β actúa de manera autocrina y paracrina. Además, puesto que el TGF- β se une a varias proteínas de la matriz extracelular, se puede asumir que la matriz extracelular y especialmente las membranas basales representan un reservorio del cual el TGF- β puede ser liberado para ejercer sus acciones sobre las células cercanas. La expresión del TGF- β está activada a lo largo del desarrollo embrionario y en el estado adulto (Heine y col., 1987; Thompson y col., 1989)). Si numerosos tipos de células expresan y pueden responder a estos factores, es de esperar que tanto la expresión como la actividad estén estrechamente controladas, control que se lleva a cabo mediante la regulación de la transcripción del gen, la producción de TGF- β en forma latente y el secuestro de los TGF- β s activados por proteínas circulantes o de matriz extracelular (Massagué, 1990).

El gen del TGF- β 1 contiene en su región 5' dos sitios de iniciación de la transcripción (Kim y col., 1989), entre los cuales se sitúa uno de los promotores del gen. El otro está localizado por delante del primer sitio de inicio transcripcional. En el primer promotor existe un sitio de unión para el complejo AP-1, y dos sitios en el segundo promotor. Se ha demostrado que TGF- β 1 regula positivamente su propia expresión a través de dicho complejo, y que los ésteres de forbol también inducen la expresión de TGF- β 1 vía AP-1. Esta activación puede ser fuertemente reprimida por los receptores del ácido retinoico (Salbert y col., 1993). También se ha descrito un efecto activador de la transcripción del gen para los glucocorticoides, el EGF, el NGF y el oncogén H-ras, así

como una regulación de la expresión mediada por la pRB en sentido positivo o negativo según el tipo celular.

2.3.2.2.- Receptores para TGF- β

Los TGF- β s ejercen sus diferentes acciones mediante unión a receptores específicos de membrana, que inicialmente se caracterizaron mediante experimentos de unión irreversible utilizando ^{125}I -TGF- β . De este modo se han identificado hasta seis tipos distintos de receptores con pesos moleculares diferentes, algunos de los cuales sólo se han encontrado en ciertos tipos celulares. Los más estudiados han sido los receptores tipo I, de 55 kDa (T β R-I), tipo II (T β R-II, 75 kDa), y tipo III, de 280 kDa (T β R-III), que aparecen en la mayoría de las células, y que ya han sido clonados. **El receptor tipo III**, conocido también como betaglicano, es un proteoglicano transmembranal con una región citoplásmica muy corta que carece de una función específica en la transducción de señales. Probablemente facilita los efectos del TGF- β por presentar el ligando a los receptores de tipo I y II que son los directamente implicados en la señalización del factor (López-Casillas y col., 1993). **T β R-I y T β R-II** son serina/treonina quinasas con un dominio extracelular corto que contiene gran cantidad de cisteínas, y una región citoplásmica larga principalmente constituida por el dominio quinasa. También es característico de estos receptores un grupo de tres cisteínas justo antes de la región transmembranal. El dominio quinasa del receptor tipo II se encuentra flanqueado por una extensión C-terminal y un segmento espaciador entre las secuencias transmembrana y quinasa. Se ha clonado un único T β R-II, cuya expresión coincide con la del TGF- β 1 durante el desarrollo. Sin embargo, se han propuesto varios receptores clonados como receptores de tipo I, los cuales son receptores serina/treonina quinasa, encontrándose sus estructuras estrechamente relacionadas. Se distinguen del tipo II en que los dominios extracelulares son más cortos, y en el dominio citoplásmico la extensión C-terminal contiene sólo unos pocos aminoácidos. Además, la región espaciadora entre los dominios transmembrana y quinasa contiene un motivo conservado SGSGSGLP (dominio GS) que no aparece en el receptor tipo II (Derynck, 1994) (Figura III). Los dominios quinasa de los diferentes receptores tipo I son más similares entre sí que si se comparan con el del T β R-II, con el que muestran una homología menor del 40%. Otra diferencia importante entre estos dos tipos de receptores reside en las propiedades de su unión a ligando: mientras el receptor tipo II puede unir TGF- β directamente del medio, los receptores tipo I reconocen únicamente el ligando que ya está unido al T β R-II. De este modo, la especificidad del ligando y su afinidad vienen determinados por el receptor tipo II (Ebner y col., 1993). Cada receptor tipo II puede

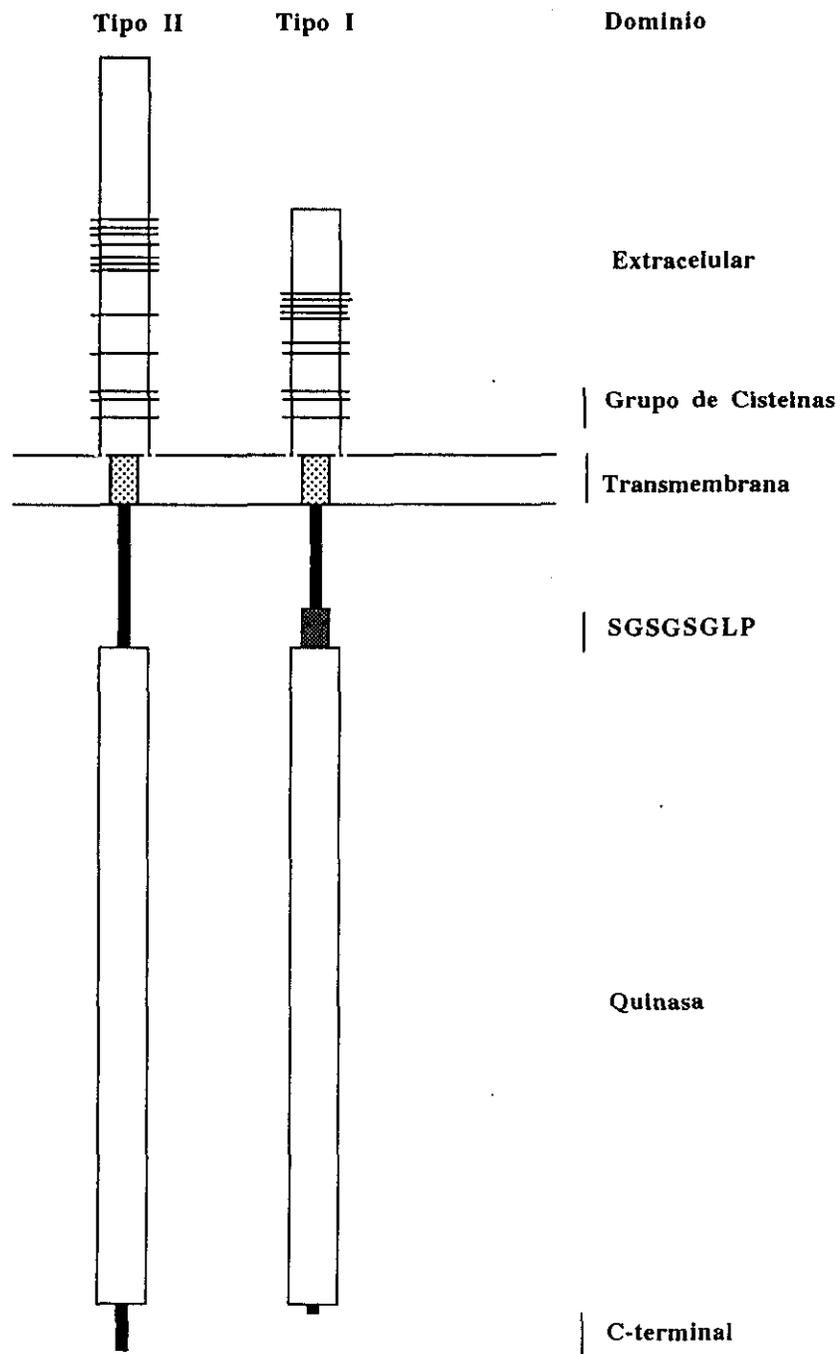


FIGURA III Representación esquemática de los receptores tipo I y tipo II para el TGF-β

Las líneas horizontales en los dominios extracelulares marcan las cisteínas. En el receptor tipo I cabe destacar la secuencia conservada SGSGLP que precede al dominio quinasas, así como la pequeña extensión de la región citoplasmática que sigue a dicho dominio.

interaccionar con distintos receptores de tipo I, formando diversas combinaciones de receptores heteroméricos con capacidades de señalización potencialmente diferentes.

Recientes avances han permitido desarrollar un modelo para el mecanismo de activación del receptor de TGF- β y una explicación al hecho de que sean necesarios los dos tipos de receptores (I y II) para generar una respuesta al factor (Wrana y col., 1994). Se ha demostrado que el T β R-II es una quinasa constitutivamente activa, cuya actividad no aumenta por unión al ligando. Sin embargo el TGF- β unido al receptor tipo II es reconocido por el T β R-I, que de esta forma se une al complejo. Una vez en el complejo, T β R-I es fosforilado por T β R-II en residuos serina y treonina del dominio GS (Figura IV). Mutaciones que impiden esta fosforilación bloquean la propagación de la señal. El receptor T β R-I no se autofosforila ni fosforila al receptor tipo II asociado, pero su actividad quinasa es esencial para la señalización (Bassing y col., 1994), sugiriendo que el receptor tipo I propaga la señal mediante fosforilación de otros sustratos. Aunque dichos sustratos no se han identificado todavía existen resultados que apoyan esta idea, como el hecho de que una forma de T β R-I constitutivamente activa sea capaz de generar respuestas antiproliferativas y transcripcionales, incluso en ausencia de TGF- β y T β R-II (Massagué y Polyak, 1995)

2.3.2.3.- Efectos biológicos

Desde que se describió al TGF- β como un factor que inducía fenotipo transformante en algunas líneas celulares fibroblásticas, se ha demostrado que el TGF- β tiene una amplia variedad de actividades biológicas que afectan a la proliferación y diferenciación en muchos tipos celulares. Es un claro ejemplo de factor multifuncional, cuya acción varía dramáticamente según el tipo celular y su estado de diferenciación, las condiciones de cultivo (como la densidad celular) y la presencia de otros factores en el medio de cultivo. También ha sido implicado en distintas respuestas asociadas a procesos inflamatorios y de reparación tisular : es un potente factor quimiotáctico para distintas células, especialmente monocitos y fibroblastos, que además induce la síntesis de proteínas de matriz extracelular, modula la expresión de proteasas e inhibidores de proteasas de matriz, aumenta la expresión de integrinas y de este modo favorece la adhesión celular (Derynck, 1994).

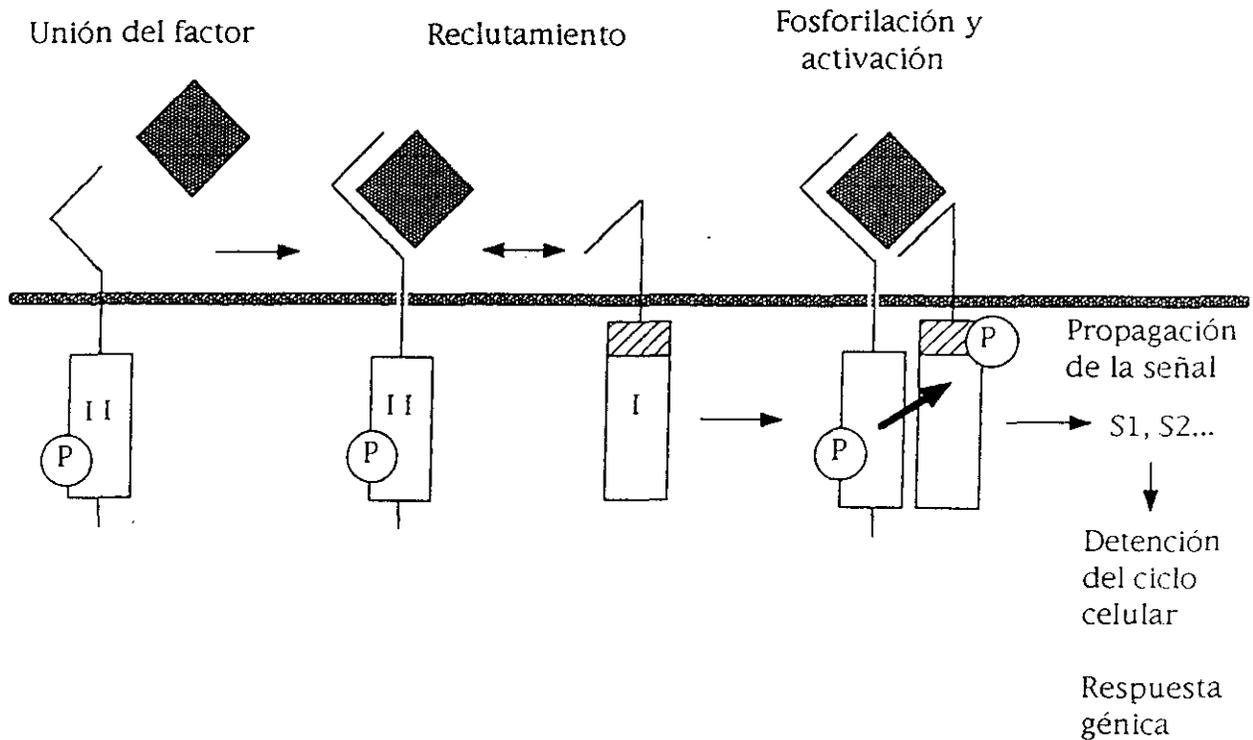


FIGURA IV Modelo de la iniciación de la transducción de señales para el receptor de TGF- β

El receptor tipo II, que es una serina treonina quinasa constitutivamente activa, constituye el receptor primario para el TGF- β , al que une (rombo) pudiendo así reconocer y reclutar al receptor tipo I. La subsiguiente fosforilación del receptor I por el II permite la propagación de la señal a través de sustratos todavía no conocidos que median los efectos del TGF- β .

A) TGF- β y proliferación

El TGF- β es predominantemente un inhibidor del crecimiento de células epiteliales (Moses y col., 1990), mientras que en células mesenquimáticas como condrocitos, precursores de adipocitos y células fibroblásticas estimula la proliferación (Vivien y col., 1993; Butterwith y Goddard, 1991; Kataoka y col., 1993). Los efectos del TGF- β sobre células osteoblásticas pueden variar, dependiendo de las concentraciones de TGF- β , densidad celular, y origen y estado de maduración de las células estudiadas. En osteoblastos normales estimula el crecimiento e induce cambios en la morfología celular y en la organización y síntesis de proteínas del citoesqueleto. El crecimiento inducido por TGF- β en estas células se ha asociado con una acumulación inmediata y transitoria del mRNA de c-fos (Machwate y col., 1995). Sobre fibroblastos humanos el TGF- β muestra un efecto bimodal: a bajas concentraciones es mitógeno, mientras que a mayores concentraciones la estimulación disminuye. Este efecto bimodal no se observa en fibroblastos de embrión de pollo, donde aumenta la síntesis de DNA incluso a altas concentraciones. En estas mismas células y otras de tipo fibroblástico la respuesta proliferativa al TGF- β parece ser indirecta mediada por la secreción autocrina de otros factores de crecimiento como el IGF-1 y el PDGF (Imbenotte y col., 1992), y favorecida por la síntesis de proteínas de matriz extracelular, todo ello inducido por el TGF- β .

En fibroblastos NIH 3T3 (que responden mínimamente al TGF- β) la expresión de la proteína de unión a nucleótidos de guanina $G_{i\alpha 1}$ confiere sensibilidad al factor, induciendo mitogénesis y transformación morfológica en respuesta a TGF- β (Kataoka y col., 1993). Otra proteína G, la proteína p21 ras, también ha sido implicada en el mecanismo de acción del TGF- β . En células epiteliales, donde actúa como inhibidor del crecimiento, el TGF- β activa p21 ras y también p44 mapk (Hartsough y Mulder, 1995). Sin embargo, Howe y col., (1993) han descrito una disminución en el estado de activación de p21 ras endógeno en respuesta a TGF- β en células epiteliales de pulmón. Además, la microinyección de p21 ras en estas células detenidas en el ciclo celular por acción del TGF- β , sobrepasa dicha inhibición del crecimiento y permite su progresión a través del ciclo celular.

La mayoría de los estudios sobre inhibición del crecimiento inducido por TGF- β se han centrado en sus efectos sobre el ciclo celular. Este factor sólo es capaz de detener el crecimiento cuando se añade durante la fase G1 temprana. El TGF- β impide la fosforilación de la proteína Rb, manteniéndola en un estado hipofosforilado que es incompatible con la progresión del ciclo celular. Para comprobar cómo el TGF- β afecta a la fosforilación de esta proteína, varios grupos han estudiado el efecto del factor sobre ciclinas y Cdks de fase G1. Otra proteína que parece estar implicada en la inhibición del crecimiento inducido por TGF-

β es c-Myc, puesto que TGF- β puede disminuir la expresión de este protooncogen en algunas líneas celulares que responden a los efectos antiproliferativos del factor. (Massagué y Polyak, 1995).

B) TGF- β y diferenciación

La diversidad de efectos del TGF- β sobre la proliferación celular sugiere la posibilidad de que el papel primario del TGF- β sea controlar el desarrollo celular, de forma que su efecto sobre la proliferación sea secundario a un efecto primario, más importante, sobre cambios morfológicos relacionados con el desarrollo.

A pesar de que los efectos del TGF- β sobre la diferenciación celular han sido examinados exhaustivamente, no son predecibles y parecen simplemente ser función del tipo celular o marcador de diferenciación que se esté estudiando. Sobre células mesenquimáticas se sabe que el TGF- β inhibe la diferenciación adipocítica, estimula la formación de condrocitos e inhibe o estimula la diferenciación de mioblastos y osteoblastos dependiendo de las condiciones fisiológicas y del estado de diferenciación de la célula. Miettinen y col., (1994) han demostrado que TGF- β tiene la capacidad de inducir en células epiteliales un proceso reversible de transdiferenciación epitelial-mesenquimático.

En cuanto a la diferenciación adipocítica, se han estudiado los efectos del TGF- β en modelos de diferenciación de células fibroblásticas o preadipocíticas, tipo 3T3 (Ignotz y Massagué, 1985; Sparks y col., 1992). En estos modelos el proceso de diferenciación comienza una vez que las células han detenido su crecimiento. Si el TGF- β se añade antes de que se inicie la diferenciación, es capaz de inhibirla potentemente aunque de forma reversible. Asimismo, inhibe la expresión de genes específicos de diferenciación, como la LPL y la GPD. Sin embargo, una vez que la diferenciación morfológica comienza, el factor ya no puede bloquearla. Sobre células totalmente diferenciadas el TGF- β tampoco es capaz de disminuir la expresión de genes específicos ni de causar desdiferenciación morfológica.

Parece que el TGF- β funciona de forma concertada con otros factores como proteínas de matriz extracelular y otros factores de crecimiento polipeptídicos para afectar a la diferenciación celular. Por otro lado, el TGF- β tiene un marcado efecto sobre la matriz extracelular, lo que probablemente juega un papel importante en los procesos de morfogénesis y desarrollo, reparación tisular y patogénesis de ciertas enfermedades fibróticas en las que está implicado este factor. En concreto, estimula la síntesis de componentes de la matriz, como la fibronectina, en un amplio número de sistemas celulares (Franzen y col., 1993). Además, modula la actividad proteolítica extracelular que puede

estar ligada a la regulación de la formación de matriz mediante la acción coordinada de activadores e inhibidores de plasminógeno.

2.3.3.- Factor de Necrosis Tumoral (TNF- α)

El factor de necrosis tumoral (TNF- α) o caquectina es una citoquina producida por macrófagos principalmente, pero también por otros tipos celulares. Es sintetizado como un precursor de 235 aminoácidos (26 kDa) que posteriormente sufre una ruptura dando lugar a la forma que se secreta de 17.3 kDa.

Presenta un amplio espectro de actividades biológicas que incluyen efectos sobre proliferación y diferenciación celular. Algunas de las respuestas mejor conocidas relacionadas con el TNF- α son el shock séptico, citotoxicidad, inflamación y caquexia. Este último es un síndrome asociado a enfermedades infecciosas crónicas y cáncer, que se caracteriza por una severa pérdida de masa corporal (fundamentalmente músculo), varios grados de depleción de los depósitos de grasa y alteraciones en el metabolismo de hidratos de carbono, proteínas y lípidos. En líneas celulares adipogénicas de ratón, como TA1 y 3T3L1, el TNF- α inhibe completamente el proceso de diferenciación, previniendo la expresión de genes específicos de adipocitos, tales como aP2, G3PD y Glut4 en células en proceso de diferenciación, y revirtiendo su expresión en células ya diferenciadas. Además, se ha comprobado que el TNF- α reduce los niveles de C/EBP α , un factor de transcripción que ha sido considerado como el principal regulador de la expresión de genes específicos de adipocitos (Williams y col., 1992). Estos efectos podrían contribuir a la atrofia del tejido adiposo en el síndrome de caquexia.

La inducción de las diferentes respuestas celulares mediadas por TNF es iniciada por su interacción con dos receptores distintos, uno de 55 kDa (TNF-R1), y otro de 75 kDa (TNF-R2). Ambos son glicoproteínas con un único segmento hidrofóbico transmembrana, y se expresan en la superficie de la mayoría de las células aunque en diferente proporción, siendo la presencia del TNF-R2 más restringida a células de origen hematopoyético. La mayoría de las respuestas conocidas del TNF- α se producen por la activación del receptor de 55 kDa, mientras que el TNF-R2 se ha visto implicado en la estimulación de proliferación de timocitos por TNF- α así como en los efectos citotóxicos y necróticos del factor.

La región citoplásmica de los dos tipos de receptores muestra una ausencia total de homología, sugiriendo diferentes vías de señalización para cada receptor. Tampoco presentan secuencias indicativas de actividad catalítica ni homología con otras proteínas conocidas (Heller y Krönke, 1994). Aunque se han implicado varios sistemas de segundos

mensajeros para la vía de transducción del TNF- α , la conexión entre éstos y el receptor es desconocida. Se sabe que a los pocos minutos de la unión del TNF- α al receptor de 55 kDa se estimula la producción de diacilglicerol (DAG) a partir de fosfatidilcolina (PC) por activación de una fosfolipasa C específica de PC, sin que se incrementen los niveles de Ca²⁺ intracelular. El DAG generado activa al menos dos enzimas de forma independiente: PKC (una isoforma no dependiente de Ca²⁺) y la esfingomielinasa (SMasa) ácida. La ceramida (uno de los productos de la hidrólisis de la esfingomielina) actúa como segundo mensajero mediando varias respuestas celulares. La activación por DAG de la SMasa ácida, que presumiblemente reside en compartimentos celulares acídicos como lisosomas y endosomas, podría ocurrir mediante una cointernalización de DAG con complejos TNF/TNFR. Por otro lado el TNF- α también activa una SMasa neutra ligada a la membrana plasmática, originando ceramida a este nivel, la cual activa una quinasa de membrana de 97 kDa que se conoce como proteína quinasa activada por ceramida y que fosforila sustratos peptídicos conteniendo el motivo Leu-Thr-Pro. La vía de la esfingomielina media la activación y traslocación del factor de transcripción NF- κ B al núcleo. TNF- α también activa las MAP quinasas de 42 y 44 kDa, y aumenta su fosforilación en tirosina así como su capacidad quinasa. A través de la vía de MAP quinasa el TNF- α puede activar otras moléculas como EGFR, PLA2 (con la consiguiente formación de ácido araquidónico implicado en procesos inflamatorios), ciclina B, S6 quinasa y varios factores de transcripción como c-myc y c-jun. (Kolesnick y Golde, 1994).

Aunque en principio el TNF- α producido por macrófagos fue reconocido por su capacidad de mediar respuestas a tumores, infecciones y lesiones, se han identificado nuevas fuentes y funciones para este factor. Así, ha sido recientemente implicado en modelos animales de obesidad y en la diabetes melitus resistente a insulina que acompaña a este trastorno. En cuatro modelos animales de obesidad y diabetes resistente a insulina la expresión del mRNA de TNF- α en tejido adiposo se veía incrementada, correspondiéndose con un aumento en la proteína, tanto a nivel local como sistémico. Además la neutralización del TNF- α en ratas obesas producía un aumento significativo en la captación de glucosa periférica en respuesta a insulina (Hotamisligil y col., 1993). La administración de TNF- α *in vivo* induce un estado de hiperglucemia sin disminución en los niveles de insulina, lo cual indica resistencia a la acción de la insulina.

Actualmente se está centrando la atención hacia el mecanismo por el cual el TNF- α interfiere en la vía de transducción de la insulina induciendo resistencia a la hormona. Feinstein y col., (1993) han encontrado que células Fao de hepatoma de rata pretratadas con TNF- α presentan una disminución del 65% en la fosforilación inducida por insulina

tanto de la cadena β del receptor como de su principal sustrato citosólico, IRS-1. Similares resultados se han obtenido en células adipocíticas 3T3-L1 y F442A, en las que el tratamiento con TNF- α causa una moderada disminución en la autofosforilación del receptor de la insulina y una dramática disminución en la fosforilación de IRS-1, así como una reducción en el transporte de glucosa estimulado por insulina (Hotamisligil y col., 1994).

III.- MATERIAL Y METODOS

III-MATERIAL Y METODOS

3.1.- ANIMALES DE EXPERIMENTACION

Para todos los estudios se utilizaron fetos de 20, 21 ó 22 días de gestación de ratas de la raza Wistar, procedentes del animalario del Instituto de Bioquímica, de la Facultad de Farmacia, de la Universidad Complutense de Madrid.

Para controlar la edad gestacional, las ratas se sometían a cohabitación con machos fértiles durante una noche, siendo examinadas la mañana siguiente. Las hembras que presentaban espermatozoides en el frotis vaginal, eran apartadas, considerándose primer día de gestación el día siguiente al cruce.

Estas ratas permanecían en el animalario, con unas condiciones de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ de temperatura, 45-55% de humedad, ritmo de luz-oscuridad de 12-12 horas, y alimento y bebida "ad libitum".

El 80% de las ratas gestantes así obtenidas, cuando se les permitía llegar al parto, lo hacían entre las 14-16 horas del día 22 de gestación.

3.2.- MEDIOS INSTRUMENTALES

Balanzas:

- Sartorius modelo 1405 (Sartorius Werke GMBH, Alemania)
- de precisión modelo ER-120A (A&B Co, Tokyo).

pHmetro: tipo Crison D-501 (Crison, España).

Agitadores:

- magnético (Selecta, España).
- de tubos, Heidolph modelo REAX 200 (Selecta, España).
- orbital, de la marca New Brunswick Scientific Co. Inc. (Edison N.J., USA), para el crecimiento bacteriano.

Baños:

- Grant (Grant Inst, Inglaterra) dotado de sistema de agitación lineal, para las incubaciones.

- Selecta (España), modelo Univeba, para hervir muestras.

Centrífugas:

- microcentrífuga Eppendorf modelo 5414 (Eppendorf, Alemania).
- de mesa Sorvall modelo GLC-1 (Sorvall, Dupont Inst. USA.).
- refrigerada Sorvall modelo RC-5 (Sorvall, Dupont Inst. Alemania).
- Kontron, modelo Centrikon H-401 (Kontron, Suiza).

Pipetas automáticas:

- Gilson (Francia) modelos p-20, p-100, p-200 y p-1000.
- Eppendorf (Alemania) modelo p-10.

Espectrofotómetro: Shimadzu, modelo UV-60, (Shimadzu, Japón).

Citómetro de flujo: Modelo Facscan, de la firma Beckton-Dickinson (U.S.A).

Contadores:

- de centelleo líquido, LKB wallac, modelo 1209 Rackbeta (Suecia)
- de radiactividad tipo Geiger, uno marca Berthold, monitor LB 1210 D, y el otro de la firma Mini-Instruments (Inglaterra), modelo mini-monitor tipo 5.10.
- de radiación γ , modelo Cobra II Autogamma de la firma Packard

Aparatos de esterilización:

- autoclave Selecta, modelo Clino-Matic (Selecta, España), para material de cultivo, soluciones, etc.
- filtros Millipore GS de 0.22 μm , para las sustancias termolábiles .
- Horno Selecta, modelo 210 (Selecta, España) para el tratamiento del material de vidrio para posterior uso con RNA.

Microscopios:

- _ de luz directa de la firma Will (Heerburg, Suiza).
- _ de luz invertida de la firma Nikon, (Japón).

Laboratorio de cultivos dotado de:

- Cabina de flujo laminar vertical.- Assab, modelo V4 (Assab, Suecia).
- Incubador termostatzado.- con gaseo de CO₂, de la firma Assab modelo T-304 GF (Assab, Suecia).

Equipos de electroforesis y transferencia:

- Cubeta horizontal sumergida para ácidos nucleicos, de la firma Bio-Rad y E-C Apparatus Corporation (Florida, USA).
- Equipo Mini Protean II de los laboratorios Bio-Rad (Richmond, U.S.A), para electroforesis de proteínas.
- La fuente de alimentación para electroforesis.- modelo 200/2.0 de la firma Bio-Rad.

- Equipo de transferencia.- VacuGene XL de Pharmacia para transferencia por vacío de los ácidos nucleicos, desde geles de agarosa-formaldehído a membranas de nylon, acoplado a una bomba de vacío de la misma casa comercial.

- Equipo de transferencia Trans-blot SD Semy-dry Transfer Cell para transferencia de proteínas (Bio-Rad).

- Aparato de Slot-Blot de la firma Bio-Rad (U.S.A.), para la transferencia directa por vacío del DNA plasmídico a las membranas de nylon usadas en el ensayo de transcripción "in vitro".

- Lámpara de luz U.V.- Spectroline modelo ENF 280 C/F. (Spectronics Corporation, U.S.A.), para la fijación de los ácidos nucleicos transferidos a la membrana de nylon.

Horno de hibridación.- modelo FDH-12 de la casa Ecogen (España).

Equipo fotográfico: Polaroid, modelo MP 4-Land, dotado de transiluminador de la firma Vilber Lourmat, TF-35M (Francia). Las películas fotográficas de la firma Polaroid, modelo 667.

Revelador: Agfa, modelo Curix 60 (Alemania)

Cassettes para autorradiografías: Kodak, modelo X-Omatic. Las películas utilizadas en autorradiografía eran de la casa Kodak, modelo OMAT X-AR.(U.S.A.). Para la detección de núcleos marcados con (^3H)-Timidina se usaron del modelo Kodak AR 10 stripping film.

Densitómetro láser: Molecular Dynamics (Sunnyvale, C.A.)

3.3.- PRODUCTOS

Todos los productos químicos usados eran, al menos, de calidad para análisis. Los tampones, soluciones salinas y reactivos en general se prepararon con productos de la casa Sigma Chemical Co. (U.S.A.), Merck (Alemania), Panreac (Barcelona, España) y Bio-Rad (U.S.A.). El agua empleada fue de dos calidades, destilada o "pura" para cultivos, y "ultra-pura" para biología molecular; obtenidas a través de un sistema Mill-RO 6 Plus para el agua pura y además Milli-Q Plus para el agua ultrapura, de la casa Millipore.

- Para los cultivos celulares se usaron:

Medio de cultivo, Medio esencial mínimo (MEM), soluciones salinas de lavado y de recogida de células, bicarbonato sódico estéril, glutamina y suero fetal de ternera, suministrados por Flow (U.S.A.). La albúmina bovina libre en ácidos grasos, fracción V, procedió de Sigma Chemical Co. (U.S.A.).

La colagenasa fue suministrada por Boehringer Mannheim (Alemania).

Antibióticos: La penicilina-G y estreptomina de Sigma Chemical Co. (U.S.A.).

La gentamicina fue cedida por Antibióticos S.A. (España).

El IGF-1 y TGF- β fueron suministrados por Austral Biologicals (San Ramón, U.S.A.). El TNF- α procedía de Boehringer Mannheim (Alemania). La insulina, el dibutiril AMPc, la dexametasona y la actinomicina-D eran de la casa Sigma Chemical CO (U.S.A.).

-En los estudios celulares por citometría de flujo se utilizaron:

0.05% Tripsina-0.02% EDTA de Imperial Laboratories (U.K.).

Rojo Nilo suministrado por Sigma Chemical Co. (U.S.A.).

“Cycle Test-DNA reagent Kit”, de la firma Beckton-Dickinson (U.S.A.).

- Para medida del transporte de glucosa la 2-Deoxi-D-(1- 3 H) Glucosa (11 Ci/mmol) utilizada procedía de Amersham (U.K.)

- Para los análisis de síntesis de DNA:

La (3 H)-Timidina de 27 Ci/mmol procedía de Amersham Internacional (U.K.)

Líquido de centelleo; se empleó el cocktail 22-Normascint, de la firma Scharlau Ferosa (España).

Para el revelado de las películas en la técnica del marcaje de núcleos se usó la solución reveladora Kodak D-19 y la solución fijadora Kodak Hypam.

- En los estudios de unión a receptores :

Los factores iodados procedían de Amersham Internacional (U.K.)

El Disuccinimil Suberato (DSS) fue suministrado por Pierce Chemical Co. (Rockford, IL).

-Para la electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida e inmunodetecciones:

El reactivo de determinación de proteínas y el patrón de albúmina eran de Bio-Rad (Richmond, U.S.A.). Todos los productos utilizados en la preparación de geles de poliacrilamida, así como los patrones de proteínas procedían de dicho laboratorio.

Las membranas a las que se transferían las proteínas una vez finalizada la electroforesis eran de nylon immobilon-P de Millipore (España).

Los anticuerpos utilizados en Western fueron monoclonales de ratón: anti-antígeno nuclear de células proliferativas (anti-PCNA), procedente de la casa Boehringer Mannheim (Alemania); el anticuerpo Ab-1 anti-p21-ras, de la casa Oncogene Science (U.S.A.); y el anticuerpo anti-Tyr(P) (Py72), generosamente cedido por el Dr. E. Rozengurt (ICRF, Londres).

Para las inmunoprecipitaciones se utilizó el anticuerpo Ab-3 monoclonal de ratón dirigido contra la cadena β del receptor de la insulina (Oncogene Science, U.S.A.) e inmunoglobulinas IgG anti-ratón unidas a agarosa, de la casa Sigma. El (32 γ -P)-ATP

(3000 Ci/mmol) utilizado en los ensayos quinasa "in vitro" procedía de Amersham Internacional

El kit de ECL, que incluye el anticuerpo secundario unido a peroxidasa y los reactivos para su detección, era de Amersham (U.K.)

-En los estudios de expresión de mRNAs y en los ensayos de transcripción "in vitro":

El DEPC, β -mercaptoetanol, Ditioneitol (DTT), espermina, espermidina, proteinasa K y DNA de esperma de salmón eran de Sigma Chemical Co. (U.S.A.); el tiocianato de Guanidina, de Fluka (Suiza); RNA de transferencia de E. coli, de Boehringer-Mannheim (Alemania); y DNAsa I libre de RNAsa, de BRL (U.K.).

El reactivo para la extracción de RNA pertenecía a la firma Cinna/Biotex Lab. (Texas, U.S.A.).

Para el aislamiento de RNA Poli A+ se utilizaron columnas de polipropileno Econo-column, de Bio-Rad ; y oligo(dT)-celulosa procedente de Collaborative Research (Bedford, MA).

Los geles se prepararon con agarosa de Bio-Rad, empleando formaldehído de la firma Fluka (Suiza) y formamida desionizada de Clontech Lab. Inc. (California, U.S.A.).

La membrana de nylon GeneScreen, empleada como soporte sólido de los ácidos nucleicos transferidos, era de la firma Dupont (Boston, MA).

Para el marcaje de sondas por Random Primer utilizamos el kit "Multiprime DNA Labelling System" y (32 α -P) dCTP de 3000 Ci/mmol, ambos procedentes de Amersham Internacional. También de esta casa era el (32 α -P)-UTP de 3000 Ci/mmol utilizado en el ensayo de transcripción "in vitro".

El Sephadex G-50, empleado en la preparación de la columna de purificación cromatográfica de sondas radiactivas y transcritos marcados, procedía de Pharmacia (Suecia), así como también los nucleótidos ATP, CTP, GTP, utilizados en el ensayo de transcripción "in vitro".

-Para la obtención de cDNAs, utilizamos:

Tetraciclina y Ampicilina, de Sigma Chemical Co. (U.S.A.) y Beecham (España), respectivamente.

Reactivos para el aislamiento plasmídico.- kit "Quiagen-Pack 500" de la firma Quiagen (Alemania).

Enzimas de restricción y marcadores de pesos moleculares de DNA procedentes de Boehringer Mannheim (Alemania).

Los colorantes, xileno cianol y azul de bromo fenol, de las casas Sigma Chemical Co. y Bio-Rad respectivamente.

3.4.- CULTIVO DE ADIPOCITOS MARRONES FETALES DE RATA

3.4.1.- Obtención del tejido adiposo marrón y aislamiento de los adipocitos marrones fetales

Las ratas gestantes eran sacrificadas por dislocación cervical. Mediante cesárea, se extraían los fetos y se sacrificaban por decapitación para proceder a la extracción del tejido adiposo marrón interescapular con unas pinzas curvas estériles, en cabina de flujo laminar.

El aislamiento de los adipocitos marrones se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Lorenzo y col., (1988). Una vez extraído el tejido, éste era finamente troceado con tijeras curvas estériles, y colocado en viales de plástico, donde se llevaba a cabo la digestión enzimática. A cada vial se añadían 3 ml de medio de aislamiento (NaCl 123 mM, KCl 5 mM, CaCl₂ 1.3 mM, Glucosa 5 mM, HEPES 100 mM, albúmina sérica bovina libre de ácidos grasos (BSA) al 4% (p/v), Penicilina-G 120 µg/ml, y Estreptomicina 100 µg/ml) y Colagenasa de actividad específica 0.218 U/mg, en la proporción 2 mg/ml. Los viales eran incubados a 37°C en un baño con agitación lineal de 90-100 oscilaciones/minuto, y cada 10 minutos se agitaban vigorosamente con un agitador mecánico durante 10 segundos para facilitar la dispersión celular. A los 30 minutos de incubación, si el tejido ya se había digerido bien, se añadía a cada vial 1.5 ml de medio de aislamiento y 0.5 ml de EGTA 2 mM (agente complejante del calcio), para inhibir la acción de la colagenasa; y se mantenía en incubación 5 minutos más. Posteriormente la mezcla era filtrada a través de una malla de nylon de 100 µm de tamaño de poro, para eliminar el tejido no digerido. El filtrado se colocaba en tubos de plástico estériles y se centrifugaba 5 minutos a 500 rpm, obteniéndose un sedimento celular y un sobrenadante, que se eliminaba por aspiración estéril.

El precipitado de adipocitos marrones se resuspendía en medio de aislamiento, centrifugándose de nuevo en las mismas condiciones. Finalmente el sedimento celular obtenido se resuspendía en un volumen conocido de medio de cultivo (Medio Esencial Mínimo MEM 1X, HEPES 20 mM, Glutamina 2 mM, NaHCO₃ 2.2 g/l, Penicilina-G 120 µg/ml, Estreptomicina 100µg/ml, Gentamicina 50 µg/ml), suplementado con suero fetal de ternera al 10%. Para determinar el número de células obtenidas y la viabilidad de las mismas, se tomaba una alícuota de la suspensión celular final, y se diluía 3 veces con una solución de azul de tripano al 0.2% en NaCl al 0.9%. El recuento se realizaba por duplicado en una cámara de Neubauer, teniendo en cuenta que, al ser el azul de tripano un colorante de exclusión, las células teñidas se consideran inviables.

3.4.2.- Cultivo primario de adipocitos marrones fetales

Las células se sembraban en placas de cultivo de 60 mm de diámetro en un volumen final de 2.5 ml de medio de cultivo suplementado con 10% de suero fetal. A continuación los platos se introducían en un incubador, a 37°C y con una atmósfera de 7% de CO₂, 93% de aire y 80% de humedad. A las 5 horas de la siembra, cuando las células ya se han adherido a la superficie de cultivo, el medio era aspirado mediante una pipeta Pasteur estéril conectada a una trompa de vacío, y las células se sometían a dos lavados consecutivos con 2.5 ml de medio de lavado (PBS Dulbeccos's Fórmula modificado, de Flow 1X, pH 7.4) con el fin de eliminar las células hematopoyéticas, los adipocitos no adheridos y los restos que pudieran quedar de suero. Este es el tiempo 00 de cultivo. Posteriormente se añadía a cada plato 2.5 ml de medio de cultivo, sin suero y suplementado con 0.2% (p/v) de albúmina bovina sérica (BSA) y se dejaban incubando durante 20 horas (tiempo 0 de cultivo, que define el punto de inicio para la estimulación de las células con diferentes factores). Las células eran incubadas a partir de este momento en ausencia o presencia de las hormonas, factores de crecimiento y citoquinas en estudio, siendo recogidas después de distintos tiempos de estimulación, según el experimento que se fuera a llevar a cabo. El medio y los aditivos eran renovados cada 24 horas.

3.5.- ESTUDIOS CELULARES POR CITOMETRIA DE FLUJO.

Varios parámetros celulares, tales como tamaño, fluorescencia endógena, contenido citoplasmático de lípidos y análisis del ciclo celular, fueron determinados mediante la técnica de citometría de flujo, para lo cual las células tenían que ser recogidas y preparadas para su posterior análisis: se lavaban con PBS y se les añadía 1 ml de una solución que contenía tripsina 0.05% y EDTA 0.02%, agitando para que la tripsina actuara por toda la superficie. En seguida se retiraba la solución y las placas se dejaban incubando durante 2-3 minutos, observándose que las células se iban despegando de la superficie de cultivo. A continuación se añadía 2.5 ml de medio de cultivo suplementado con suero fetal al 10% con el objeto de parar la tripsinización, ya que el suero inhibe la actividad de la tripsina. De este modo se obtenía una suspensión de células, que se pasaba a tubos eppendorf, centrifugándose a 4.000 rpm durante 4-5 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante se aspiraba, y el precipitado de células obtenido era lavado con 1 ml de PBS. Se centrifugaba de nuevo, y finalmente las células se resuspendían en 200 μ l de un medio compuesto por citrato sódico, sucrosa y dimetilsulfóxido, quedando guardadas a -20 °C hasta el momento del análisis. Si el análisis era inmediato se resuspendían en PBS sin calcio y magnesio.

Todas las determinaciones de citometría de flujo fueron realizadas utilizando una luz de excitación de 488 nm de longitud de onda. Las señales de tamaño (FSC-H) fueron medidas a través de un filtro BP 488/10 nm y la fluorescencia verde de flavinas endógenas (FL1-H) se midió a través de un filtro BP 530/30 nm. El contenido de triglicéridos citoplásmicos puede ser determinado por análisis de la fluorescencia celular mediante el colorante fluorescente Rojo Nilo (9 dietilamino 5H-benzo α fenoxacin 5-ona) (Greenspan y col., 1985). Dicho colorante hidrofóbico emite fluorescencia amarilla cuando se disuelve en lípidos de naturaleza neutra tales como los triglicéridos, y fluorescencia roja cuando se disuelve en lípidos de naturaleza anfipática (lípidos de membrana). Para este ensayo las células, recogidas y resuspendidas en 200 μ l de PBS libre de calcio y magnesio, se tiñeron con Rojo Nilo a una concentración de 10 μ g por ml de suspensión celular.

Para el estudio del ciclo celular por tinción del DNA con yoduro de propidio, las muestras recogidas se preparaban según el protocolo indicado en el kit cycle-test de la firma Beckton-Dickinson. Las células se sometían a tratamiento con tripsina con objeto de facilitar la disgregación celular y la solubilización de las membranas. A continuación, se paraba la acción de la tripsina y se trataban las células con RNasa para digerir el RNA. Finalmente se añadía yoduro de propidio y las muestras se mantenían en hielo y protegidas de la luz hasta que se analizaban en el citómetro de flujo con objeto de determinar el porcentaje de células que se encontraban en cada fase del ciclo celular.

3.6.- MEDIDA DE LA INCORPORACION DE GLUCOSA

Esta medida se llevó a cabo en dos condiciones:

A largo plazo, durante el período de cultivo.- Al tiempo que se estimulaban las células con IGF-I o insulina (llevando un control sin tratar), se les añadía en el medio de cultivo 2-deoxi-D(1-³H)-glucosa 500 nCi/ml. Transcurridas 24 horas se eliminaba el medio radiactivo y se lavaban las células 2 veces con tampón KRP (NaCl 135 mM, KCl 5.4 mM, CaCl 1.4 mM, MgSO₄ 1.4 mM y Pirofosfato Sódico 10 mM, pH 7.4). Finalmente se solubilizaban en 1 ml de SDS 1% y se medía una alícuota de 200 μ l en un contador de centelleo.

Medida del transporte de glucosa inducido por factores.- Células control o pretratadas con TNF- α durante una noche, se lavaban 3 veces con medio KRP y se incubaban durante 10 minutos a 37°C en 1 ml de KRP en presencia o ausencia de factores. Después se añadía 2-deoxy-D (1-³H)-glucosa a una concentración final de 0.1 mM y 500 nCi/ml, continuando la incubación durante 5 minutos a 37°C. Las células eran entonces lavadas 3 veces con KRP frío y solubilizadas en 1 ml de SDS 1%. La radiactividad de una alícuota de 200 μ l se determinaba en un contador de centelleo. Los valores obtenidos en

presencia del inhibidor del transporte de glucosa, la citocalasina B ($10 \mu\text{M}$) fueron restados para corregir la cantidad de glucosa captada por procesos independientes del transporte.

3.7.- ESTUDIOS DE SINTESIS DE DNA

3.7.1.- Medida de la síntesis de DNA por incorporación de (^3H)-Timidina

Tras diferentes tiempos de cultivo en las distintas condiciones experimentales, se procedía a medir la síntesis de DNA, según el método descrito por Mosley y col. (1981). Se retiraba el medio de cultivo y se añadía medio fresco de cada condición, suplementado con $0.2 \mu\text{Ci/ml}$ de (^3H)-Timidina. En estas condiciones se mantenían las células durante las cuatro últimas horas de cultivo. Pasado este tiempo, se eliminaba el medio de cultivo radiactivo, y se lavaba cada plato dos veces con PBS. A continuación se añadía 1 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 10% (v/v), y las placas se mantenían 20 minutos a 4°C . Posteriormente se retiraba el ácido y se lavaban las placas dos veces con etanol frío al 70% (v/v), dejándose secar bien. A continuación se añadía 1 ml de una solución que contenía NaOH 0.1 N, carbonato sódico 2% y SDS 1%, y las placas se dejaban a 37°C durante 10 minutos. La radiactividad de cada plato se medía por duplicado en el contador de centelleo, tomando alícuotas de $100 \mu\text{l}$. Los resultados se expresan como dpm/placa de cultivo.

3.7.2.- Marcaje de núcleos con (^3H)-Timidina

El marcaje de núcleos se realizó siguiendo el método descrito por Rozengurt (1991). Las células quiescentes (20 horas deprivadas de suero) eran incubadas durante 48 horas en distintas condiciones de cultivo, conteniendo el medio en todos los casos (^3H)-Timidina ($2 \mu\text{Ci/ml}$; $1 \mu\text{M}$). Transcurrido este tiempo, se aspiraba el medio y se añadía a las placas una solución NaCl 0.08M, Na_2SO_4 0.1M, formaldehído 10% (v/v), manteniéndolas 20 minutos a 4°C con el fin de fijar las células al plato. Posteriormente se lavaban 2 veces con una solución salina fría NaCl 13mM, KCl 5mM, Na_2HPO_4 0.7mM, D-glucosa 5mM, Trizma base 24mM y se dejaban 4 minutos más a 4°C en TCA al 5% (v/v); tras lo cual se lavaban 3 veces con etanol frío al 70% (v/v). Las placas se dejaban secar y se cubrían con un film (Kodak AR 10 stripping film), manteniéndolas en oscuridad dos semanas, transcurridas las cuales se revelaban, pudiéndose apreciar al microscopio los núcleos que habían incorporado (^3H)-Timidina. Posteriormente esas mismas placas eran teñidas con Giemsa, lo que permitía contar el total de núcleos. Los resultados se expresan como

porcentaje de núcleos marcados con (^3H)-Timidina respecto al total de núcleos, después de contar al menos 10 campos distintos de una misma placa.

3.8.- ENSAYOS DE UNION DE LIGANDOS A SUS RECEPTORES

3.8.1.- Estudios de desplazamiento

Para estudios de unión de ligandos a sus receptores utilizamos células en monocapa que, después del plaqueo, fueron mantenidas 20 horas en medio libre de suero (tiempo 0 de cultivo). Estas células se incubaron 3 horas a 20°C con trazas del ligando radiactivo en 1 ml de PBS tamponado con Hepes 25 mM (pH 7.4) y que contenía 1 mg/ml de BSA, en ausencia o presencia de concentraciones crecientes de ligando frío. Transcurrido el tiempo de incubación, las placas se lavaban rápidamente 3 veces con PBS frío (sin calcio y magnesio) suplementado con 1 mg/ml de BSA, o bien el primer lavado se hacía con acetato sódico 0.3M frío, pH 4.5 (conteniendo ClNa 0.15 M). Finalmente las células se solubilizaban en 1 ml de una solución NaOH 0.1N, SDS 1%, Na_2CO_3 2% y se medía la radiactividad unida en un contador γ . La radiactividad asociada a células sometidas al lavado ácido, representando el ligando radiactivo internalizado, fue despreciable (menos del 5%). La unión no específica se define como la radiactividad que permanece unida en presencia de un exceso de 1000 veces de ligando no radiactivo.

3.8.2.- Unión irreversible

Este ensayo se realizó según el método descrito por Massagué (1987) con algunas modificaciones. Las células se incubaron de igual forma que para los estudios de desplazamiento, con ligando radiactivo en presencia o no de un exceso de ligando frío. Tras 3 horas de incubación, se lavaban 3 veces con PBS tamponado con Hepes 25 mM (pH 7.4), y posteriormente se procedía, a 4°C durante 15 minutos y con agitación, a la reacción de unión irreversible con Disuccinimil Suberato 0.25 mM en 2 ml del mismo medio de lavado. Finalmente las células se lavaban de nuevo 2 veces y se solubilizaban en el tampón NaCl 125 mM, Tris 10 mM (pH 7.4), Triton X-100 1%, EDTA 1 mM, PMSF 0.3 mM y 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de leupeptina. Después de una incubación de 30 minutos a 4°C, las muestras se centrifugaban a 4°C durante 15 minutos a 12000 rpm y el sobrenadante se sometía a electroforesis en geles 6-8% SDS-PAGE. Finalizada la electroforesis los geles se secaban durante 2 horas a 80°C y se exponían a un film de rayos X pudiendo identificar, al revelarlo, las proteínas que unían el factor en estudio.

3.9.- ESTUDIO DE NIVELES DE PROTEINAS MEDIANTE LA TECNICA DE WESTERN-BLOT

3.9.1.- Preparación de las muestras

Las células se lavaban dos veces con PBS frío, posteriormente se recogían en ese mismo medio mediante raspado y se centrifugaban a 5000 rpm durante 5 minutos. El precipitado de células obtenido se resuspendía en 100 μ l de tampón de lisis (EDTA 5 mM, NaCl 50 mM, pirofosfato sódico 30 mM, NaF 50 mM, Na_3VO_4 100 μ M, Triton X-100 1% , PMSF 1 mM, y Tris 10 mM, pH 7.6). Para favorecer la lisis celular, se dejaban las muestras 30 minutos a 4°C, agitando cada 10 minutos. Después se centrifugaban a 12000 rpm durante 10 minutos a 4°C y el sobrenadante se recogía para determinar la cantidad de proteína de cada muestra mediante el método de Bradford (1976), utilizando albúmina para construir la curva patrón. Una vez valoradas se tomaba el volumen de cada muestra que contuviera 20 μ g de proteína, y se mezclaba en proporción 1:1 con un tampón cuya composición era Tris 72 mM pH 7.6, glicerol 10% (v/v), SDS 1% (p/v), azul de bromofenol 0.002% (p/v), y β -mercaptoetanol 2 mM. Así se podían quedar guardadas a -20°C hasta el momento de la electroforesis.

3.9.2.- Inmunoprecipitaciones

Las células (5×10^6 células / placa de cultivo de 100 mm de diámetro) eran lisadas a 4°C en 1 ml de tampón de lisis y recogidas en eppendorfs. Se centrifugaban a 12000 rpm durante 10 minutos y los sobrenadantes se transferían a tubos nuevos para determinar el contenido de proteínas. Cantidades iguales de proteína (600 μ g) se incubaban a 4°C con el anticuerpo anti-receptor de insulina durante 4 horas y los complejos inmunes eran precipitados durante una noche con inmunoglobulinas anti ratón unidas a agarosa. Si los inmunoprecipitados iban a ser analizados mediante Western-blot, se lavaban tres veces con tampón de lisis y se separaban de la agarosa mediante tratamiento a 95°C durante 10 minutos en tampón SDS-PAGE 2X (200 mM tris/HCl, 6% SDS, 2 mM EDTA, 2 mM β -mercaptoetanol, 10% glicerol, pH 6.8).

3.9.3.- Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida y transferencia a membranas de nylon

La composición del gel concentrador era acrilamida 5%, bisacrilamida 0.13%, Tris 125 mM pH 6.8, SDS 0.1% (p/v), persulfato amónico 0.1% (p/v), y TEMED 0.243%. El

gel separador se preparaba con acrilamida al 8% y bisacrilamida al 0.265% en tampón Tris 375 mM pH 8.8, SDS 0.1% (p/v), persulfato amónico 0.1%, y TEMED 0.243%. Las muestras, ya preparadas, se hervían a 100°C durante 5 minutos y se cargaban en el gel. Asimismo se cargaba un patrón de pesos moleculares, que contenía una mezcla de proteínas de tamaños conocidos: miosina (199 kDa), β -galactosidasa (120 kDa), albúmina bovina sérica (87 kDa) y ovoalbúmina (48 kDa). El tampón utilizado en el desarrollo de la electroforesis tenía la siguiente composición: Tris 25 mM pH 8.3, glicina 192 mM y SDS 0.1% (p/v).

Una vez finalizada la electroforesis se procedía a la transferencia de las proteínas, mediante paso de corriente eléctrica, desde el gel a membranas Immobilon-P de nylon. Para ello se utilizaba el equipo de transferencia Trans-blot SD Semy-dry, y un tampón compuesto por glicina 198 mM, metanol al 20% (v/v) y Tris 25 mM pH 8.3.

3.9.4.- Inmunodetección de las proteínas

Finalizada la transferencia, se realizaba el bloqueo o saturación de todos los sitios de unión inespecíficos a proteínas del nylon. Para ello, las membranas se incubaban 1 hora con agitación suave en tampón TBS (NaCl 150 mM, Tris 10 mM pH 7.3) suplementado con leche en polvo desnatada 5% (p/v). Posteriormente se eliminaba este tampón y se añadía el primer anticuerpo (anti-PCNA, anti-p21ras, o anti-Tyr(P)) en TBS conteniendo 1% de leche en polvo desnatada y 1% Tween-20, dejándose a 4°C durante toda la noche. Tras la incubación con el primer anticuerpo se realizaban 3 lavados sucesivos de 10 minutos cada uno con el tampón de lavado (TBS, leche en polvo desnatada 1%, Tween-20 1%). A continuación se añadía el segundo anticuerpo (un anticuerpo de cabra dirigido contra las inmunoglobulinas de ratón, y conjugado con la peroxidasa) y con él se incubaba la membrana de nylon durante 2 horas, tras las cuales se realizaban 3 lavados. La fase de revelado consistía en la detección de la peroxidasa fijada, mediante la técnica de quimioluminiscencia, según el protocolo que distribuye Amersham.

3.10.- ENSAYO QUINASA "IN VITRO"

Para medir la actividad quinasa de los inmunoprecipitados obtenidos como se ha descrito en el apartado 3.9.2 se procedía de la siguiente manera: los inmunoprecipitados se lavaban en primer lugar con tampón de lisis, después con un tampón 0.1 M Tris, 1 mM EDTA, 0.5 M LiCl pH 7.5 y finalmente con un tampón 25 mM Tris, 1 mM EDTA, 0.1 M NaCl pH 7.5. Los complejos inmunes se incubaban entonces en 20 μ l de un tampón que contenía 20 mM Hepes, 3 mM MnCl₂, 10 mM MgCl₂, y 20 μ Ci de (³² γ -P)-ATP (a una

concentración final de 5 μ M) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaban dos veces con PBS y se resuspendían en tampón 2X SDS-PAGE, hirviéndose durante 10 minutos para separar las proteínas de la agarosa. Las muestras se sometían a electroforesis en geles SDS-PAGE y se transferían a membranas de nylon que se exponían a un film de rayos X para poder detectar la incorporación de (32 P)-fosfato a proteínas.

3.11.- AISLAMIENTO, ANALISIS Y MANEJO DEL RNA

Con el objetivo de inhibir la acción de las RNAsas que podrían degradar las muestras de RNA, se tomaban una serie de precauciones, como el uso de guantes, la utilización de reactivos de uso exclusivo para RNA, someter todo el material de vidrio a 140°C durante 12 horas y el tratamiento con DEPC al 0.1% del agua empleada en la preparación de soluciones: el agua se trataba con DEPC durante 30 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se autoclavaba.

3.11.1.- Aislamiento del RNA total

La extracción del RNA se realizó según el método descrito por Chomzynski y Sacchi (1987), bien sobre adipocitos recién aislados o sobre células en cultivo. En ambos casos las células, después de lavarse con PBS, se lisaban directamente con 0.5 ml de RNazol (Cinna/Biotex Lab, Texas, USA) por cada 10^6 células. Este reactivo, mezcla de guanidina, fenol y β -mercaptoetanol, consigue la lisis celular y la solubilización del RNA. La extracción del RNA a partir del lisado se realizaba añadiendo 0.1 ml de cloroformo (cloroformo:alcohol isoamílico, 24:1) por cada ml de lisado y se agitaba vigorosamente durante 30 segundos, dejándolo posteriormente en reposo durante 15 minutos en hielo. Transcurrido este tiempo, las muestras eran centrifugadas a 12.000 rpm durante 15 minutos a 4°C, obteniéndose 2 fases bien diferenciadas: la fase superior acuosa en la que se encontraba solubilizado el RNA, y una fase inferior orgánica (fenol-cloroformo) que contenía el DNA. Ambas fases se encontraban separadas por una banda blanquecina de naturaleza proteica.

La fase superior, que contenía el RNA solubilizado, era separada con cuidado de no arrastrar proteínas ni DNA, y se colocaba en un nuevo tubo Eppendorf, donde se procedía a la precipitación del RNA con un volumen igual de alcohol isopropílico. Las muestras se mantenían a -20°C durante 30-45 minutos, transcurridos los cuales se centrifugaban a 12.000 rpm durante 15 minutos a 4°C, obteniéndose un pequeño precipitado blanco de RNA que se lavaba con etanol al 75% (v/v) y finalmente se resuspendía en un volumen conocido de EDTA 1 mM pH 7. Las muestras de RNA se mantenían de este modo a -80°C

hasta su procesamiento, o bien (si iban a ser almacenadas durante varios meses) se guardaba el precipitado a -20°C en 1 ml de etanol al 75% (v/v). De la muestra resuspendida se tomaba una alícuota para determinar espectrofotométricamente la cantidad de RNA obtenido y su pureza.

3.11.2.- Extracción de RNA Poli A+ por cromatografía de afinidad

Una vez reunidos al menos 700 μg de RNA total de cada condición, se procedía a extraer los mRNAs mediante cromatografía de afinidad, utilizando columnas de oligo(dT)-celulosa. En todo el proceso se tomaban las máximas precauciones para evitar la degradación de los RNAs.

Las columnas de propileno utilizadas (Econo-column, Laboratorios Bio-Rad, Richmond, CA) eran lavadas durante una hora con NaOH 0.1 N. Posteriormente se pasaba varias veces agua tratada con DEPC para eliminar restos de NaOH. La columna era empaquetada con 0.075 g de oligo(dT)-celulosa que había sido previamente hidratada durante 2-3 horas a 4°C con 2 ml de agua tratada con DEPC. Una vez empaquetada, se lavaba la columna con agua tratada con DEPC y posteriormente se equilibraba con Tampón de Ligamiento 1X (Tris HCl 0.01 M, pH 7.5; NaCl 0.5 M; EDTA 1 mM y SDS 0.5%), hasta comprobar que el pH era inferior a 8.

Las muestras de RNA se resuspendían en 500 μl de agua tratada con DEPC y se desnaturalizaban sometiéndolas a un baño de 65°C durante 5 minutos. Inmediatamente se introducían en hielo para evitar la renaturalización. Se añadían entonces 500 μl de Tampón de Ligamiento 2X y todo ello se pasaba por la columna. El líquido recogido se volvía a calentar 5 minutos, enfriándose inmediatamente en hielo y se pasaba de nuevo por la columna. Este proceso se repetía 3 veces con el fin de asegurarnos que los RNA mensajeros, a través de su cola de poli A⁺, quedaran fijados a la columna mediante enlaces por puentes de hidrógeno.

Posteriormente se llevaba a cabo un lavado con aproximadamente 7 ml de Tampón de Ligamiento 1X para arrastrar el RNA ribosómico, recogiendo distintas fracciones que se valoraban espectrofotométricamente. Comprobábamos que el rRNA aparecía fundamentalmente en las primeras fracciones y progresivamente íbamos obteniendo cantidades menores. Cuando se consideraba que las cantidades de RNA ribosómico retenidas en la columna eran insignificantes, se procedía a la elución de los mRNAs. Para ello se añadían 1 a 1 un total de 4 ml de Tampón de Elución (Tris HCl 0.01 M, pH 7.5; EDTA 1 mM y SDS 0.05%) a 37°C , recogándose 4 fracciones de las cuales las 2 primeras son generalmente las más ricas en mRNAs. Para valorar las muestras recogidas, utilizamos cubetas de cuarzo de 1 ml de capacidad que habían permanecido durante más de 2 horas en

metanol:ClH₂O(1:1). Se valoraba la muestra entera, que después se recuperaba, precipitándola con 1/10 volúmenes de Acetato sódico 3 M pH 5.35 y 2.5 volúmenes de etanol absoluto. Así quedaba guardado a -20 °C hasta el momento de la electroforesis.

3.11.3.- Electroforesis del RNA en geles de agarosa-formaldehído y transferencia a membranas de nylon

El RNA total aislado de las placas de cultivo en las distintas condiciones experimentales, o bien el RNA poli A purificado, se sometía a electroforesis según el método descrito por Sambrook y col. (1989). Se preparaban geles al 0.9% de agarosa, fundiendo la agarosa en tampón de electroforesis 20 mM MOPS, 5 mM Acetato sódico y 1 mM EDTA, pH 7. Una vez fundida, se dejaba enfriar hasta 60°C, añadiéndose entonces formaldehído al 37% de modo que quedara a una concentración final de 0.66 M.

A las muestras de RNA, ya resuspendidas en EDTA 1mM, se añadían 25 µl de la mezcla de carga (50% Formamida desionizada, 20 mM MOPS, 2.2 M Formaldehído, 6% Glicerol y 10/10000 de azul de bromofenol) y 1 µl de bromuro de etidio (1 mg/ml), se calentaban a 65°C durante 15 minutos y a continuación se ponían inmediatamente en hielo para asegurar la completa desnaturalización del RNA. Por último se cargaban en el gel y se realizaba la electroforesis a 50-60 voltios durante 2-3 horas.

Una vez finalizada la electroforesis, se procedía a la transferencia de los RNAs desde el gel a filtros de nylon por medio de vacío, utilizando la técnica del Vacuum-Blot (Pharmacia, Suecia). La membrana de nylon (Gene-Screen) debía ser previamente hidratada durante 5 minutos con agua estéril y a continuación otros 5 minutos con tampón de transferencia SSC 10X (87.65 g NaCl y 44.1 g citrato sódico por litro de solución, pH 7). La transferencia se realizaba durante 2-3 horas, pasadas las cuales se procedía a la unión covalente del RNA transferido al filtro mediante irradiación con luz ultravioleta (254 nm) durante 7 minutos. Después se introducía en una carpeta de papel Whatman 3MM y se secaba en estufa a 60°C durante 1 hora. Así quedaba el filtro listo para realizar la hibridación.

3.12.- OBTENCION DE LAS SONDAS DE cDNA

3.12.1.- Procedencia y características de las sondas

La sonda utilizada para la detección del mRNA de fos fue un fragmento de cDNA de ratón de 1 kb (Van Straaten y col., 1983), comercializado por Comercial Oncor.

El cDNA del protooncogén **c-myc**, humano, de tamaño 0.9 kb, se encontraba insertado en un lugar de corte para Eco RI y Cla I del plásmido pBR322. (Alitalo y col., 1983).

El cDNA de **H-ras**, de tamaño 0.7 kb, se encontraba en un lugar de corte para el enzima de restricción Eco RI de la construcción pMex-Neo (Lacal y col., 1984). La cepa bacteriana que contenía dicho plásmido fue generosamente cedida por el Dr. Santos (National Institutes of Health, Bethesda, U.S.A.).

La sonda usada para la detección del mRNA de la **cdc2 quinasa** fue un fragmento de 1 kb insertado en un punto de corte para BamHI (Lee y Nurse, 1987).

El cDNA de la **β -actina** de tamaño 0.9 kb se encontraba insertado en un lugar de corte para Hind III en el plásmido pBR322 (Cleveland y col., 1980). La cepa bacteriana que contenía dicho plásmido fue generosamente cedida por el Dr. Santos (National Institutes of Health, Bethesda, U.S.A.).

El cDNA de la **Fibronectina**, de 2.6 kb se encontraba en el plásmido pGEM-2 en un sitio de corte para Eco RI (Schwarzbauer y col., 1983).

El cDNA de la **ácido graso sintasa**, de 0.8 kb, se encontraba insertado en un lugar de corte para Eco RI y Hind III del plásmido pUC 12 (Amy y col., 1989) y el cDNA de la **glicerol 3-fosfato deshidrogenasa**, de 0.78 kb de tamaño, en el plásmido pBR322 en un lugar de corte para Pst I (Ireland y col., 1986).

El cDNA del transportador de glucosa **Glut 4**, de 2.47 kb se encontraba en un sitio de corte para Eco RI del plásmido pBluescript KS+ (Birnbaum 1989).

El cDNA de la **proteína desacoplante** de tamaño 1 kb, se encontraba insertado en el plásmido pBR322 en un lugar de corte para el enzima de restricción Pst I (Bouillaud y col., 1985). El glicerolizado de la cepa bacteriana portadora de dicho plásmido recombinante fue generosamente cedido por el Dr. Ricquier (Paris)

El cDNA de la **enzima málica**, de tamaño 1 kb, se encontraba insertado en un lugar de corte para el enzima de restricción Eco RI en el plásmido pUC 13-JM103 de tamaño 2.7 kb (Magnuson y Nikodem, 1983). La cepa bacteriana que contenía dicho plásmido fue generosamente cedida por la Dra. Nikodem (National Institutes of Health, Bethesda, U.S.A.).

El cDNA de la **glucosa 6-fosfato-deshidrogenasa**, de tamaño 2.4 kb, se encontraba insertado en el plásmido Pks (blue script) de 3 Kb, en un lugar de corte para el enzima de restricción Eco RI (Ho y col., 1988). El glicerolizado de la cepa bacteriana portadora de dicho plásmido recombinante fue generosamente cedido por el Dr. Ye-Shih Ho (Duke University medical Centre, Durham, North Caroline, U.S.A.).

El cDNA de la **fosfoenol piruvato carboxiquinasa** (PEPCK) de tamaño 0.9 kb se encontraba insertado en un lugar de corte para el enzima de restricción Pst I en el

plásmido pPCK10 de tamaño 6.9 kb. La cepa bacteriana que contenía dicho plásmido fue generosamente cedida por el Dr. R. W. Hanson (School of Medicine, Cleveland, Ohio, U.S.A.).

La sonda empleada para la detección del mRNA del **receptor de IGF-1**, fue un fragmento de cDNA humano, de tamaño 0.4 kb, que se encontraba insertado en un lugar de corte para Eco RI y Hind III en el plásmido PGEM 3. El cDNA del **IGF-1**, de 0.5 kb, también se encontraba inserto en este mismo plásmido, en un punto de corte para Hind III y Bam HI (Hernández y col., 1991). Las cepas bacterianas fueron generosamente cedidas por el Dr. Hernández (Madrid, España).

Los cDNAs de los **C/EBPs (isoformas α , β y δ)** de ratón, de tamaños 1.8kb, 1.5 kb y 1 kb respectivamente, se encontraban insertados: la isoforma α en pEMBL 19 en el lugar de corte para Eco RI y Pst 1, mientras que las formas β y δ estaban insertadas en bluescript, en el lugar de corte para Eco RI y BamHI. Cedidos por el Dr. McKight. C/EBP α (Landschulz y col., 1988) y C/EBP β y C/EBP δ (Cao y col., 1991).

Las bacterias en cuyos plásmidos estaban insertados los distintos cDNAs se conservaban a -70°C en un tampón que contenía: Tris 0.01M, MgCl_2 0.01M y glicerol al 50% (v/v).

3.12.2.- Crecimiento bacteriano, extracción del DNA plasmídico y purificación de cDNAs

Para la obtención de los cDNAs a partir de los glicerolizados de cepas bacterianas, se procedía al crecimiento de dichas bacterias en medio LB (10 g Bacto-Triptona, 10 g NaCl y 5 g Bacto-Yeast por litro, pH 7, esterilizado en autoclave) a 37°C con agitación hasta obtener una D.O. de 1.2. Este medio siempre se suplementaba con el antibiótico al cual fuera resistente la bacteria que contenía el plásmido de interés: ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) o bien tetraciclina (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Las bacterias se centrifugaban entonces a 7.000 rpm durante 15 minutos a 4°C en una centrífuga Sorvall (rotor GSA), y el precipitado obtenido se sometía a una lisis alcalina para extraer los cDNAs plasmídicos (Sambrook y col., 1989), siguiendo el protocolo indicado en el kit de la firma Quiagen, con columnas Pack-500 y Tip-500 (Quiagen, Alemania). El DNA plasmídico así obtenido se conservaba a -20°C , resuspendido en tampón TE (1mM EDTA, 10 mM Tris, pH 8).

Una vez aislado el DNA plasmídico, era necesario digerirlo con los enzimas de restricción apropiados para obtener el inserto de interés. La reacción se llevaba a cabo durante 2-3 horas con el tampón de digestión más adecuado para el enzima que se iba a utilizar, y el enzima o los enzimas, según el caso, teniendo en cuenta que una unidad de enzima de restricción se define como la cantidad de enzima capaz de digerir 1 μg de DNA

durante 1 hora a 37°C. Para comprobar si la digestión había sido completa, se tomaban alícuotas de las muestras digeridas, y se sometían a electroforesis en geles de agarosa utilizando un tampón (Tris 40 mM, ácido acético glacial 20 mM y EDTA 1 mM, pH 8) al que se añadía 0.5 µg de bromuro de etidio por cada ml. Para comprobar asimismo el tamaño del inserto, en el gel también se cargaba una cantidad conocida de algún marcador de pesos moleculares (el cromosoma del fago lambda digerido con el enzima Hind III o bien el DNA del fago φX174 RF digerido con el enzima Hae III si el fragmento tenía un tamaño muy pequeño). Exponiendo el gel a la luz ultravioleta, se podían visualizar y fotografiar los distintos fragmentos de DNA gracias al bromuro de etidio.

Si la digestión había sido satisfactoria, se procedía a purificar el inserto de DNA que posteriormente serviría como sonda. Para ello, el DNA plasmídico digerido se sometía a electroforesis tal como se ha descrito anteriormente, y una vez que las bandas correspondientes al plásmido y al inserto de cDNA estaban suficientemente separadas, se cortaba lo más finamente posible el fragmento de agarosa que contenía el inserto, introduciéndolo en unos tubos Eppendorf agujereados en su parte inferior que contenían una bolita de papel Whatman GF/C (microfibras de vidrio), y que a su vez estaban introducidos en otros tubos Eppendorf sin agujerear. Así se mantenían a -80°C durante un mínimo de dos horas. Transcurrido el tiempo, se centrifugaba inmediatamente a 12.000 rpm durante 15 minutos a temperatura ambiente, obteniéndose en el Eppendorf inferior una solución que contenía el cDNA, mientras que los restos de agarosa habían quedado retenidos en el papel del Eppendorf superior. La solución que contenía el cDNA se precipitaba con un 10% (v/v) de acetato sódico 3M, pH 5.35 y 3 volúmenes de etanol durante 12 horas a -20°C o durante 1 hora a -80°C. Después se centrifugaba a 12.000 rpm durante 15 minutos a 4°C, se eliminaba el sobrenadante y el precipitado se lavaba con etanol al 75% (v/v). Una vez eliminado el etanol, el cDNA se resuspendía en un volumen pequeño de tampón TE (Tris ClH 10mM y EDTA 1 mM a pH 8). Con 1 µl de la muestra eluída y una cantidad conocida de marcador de pesos moleculares de DNA, se corría un gel de agarosa para comprobar el tamaño y hacer una estimación de la cantidad de cDNA obtenido. El resto quedaba guardado a -20 °C.

3.12.3.- Marcaje radiactivo de los cDNAs

Las sondas de DNA, bien comerciales u obtenidas por digestión y elución a partir de plásmidos, se marcaron radiactivamente con (³²α-P)dCTP por el método de Random-Primer utilizando el Kit "Multiprime DNA Labelling system" comercializado por Amersham.

Se partía de 50 ng de cDNA, que se llevaba hasta un volumen de 10 μ l con agua tratada con DEPC. Para desnaturalizar el cDNA, se sometía a 95-100°C durante 2 minutos, introduciéndolo inmediatamente en hielo con el fin de evitar la renaturalización. La reacción se iniciaba añadiendo a los tubos los siguientes reactivos:

-10 μ l de la Solución 1 (mezcla de los nucleótidos no marcados dATP, dGTP, y dTTP en un tampón Tris/ClH pH 7-8, MgCl₂ y 2-Mercaptoetanol)

-5 μ l de la solución 2 (que contiene al cebador hexanucleotídico en una solución acuosa con BSA libre de nucleasas, 4-7 μ l de (³² α -P)dCTP de una actividad específica 3000 Ci/mmol (10 μ Ci/ μ l)

-2 μ l de la Solución 3 (1 unidad de DNA polimerasa I, fragmento Klenow, en 50 mM de fosfato potásico pH 6.5, 10 mM 2-Mercaptoetanol y 50% de glicerol)

-agua tratada con DEPC hasta completar un volumen de 50 μ l.

La reacción se llevaba a cabo a temperatura ambiente durante 2-3 horas. Transcurrido este tiempo, la muestra se pasaba por una columna de Sephadex G-50 de 10 cm de longitud, que había sido empaquetada y equilibrada con un tampón estéril que contenía NaCl 150 mM, EDTA 10 mM, SDS 0.1% (p/v) y Tris/ClH 50 mM pH 7.5. Una vez cargada la muestra en la columna, ésta se centrifugaba a 1.500 rpm durante 4 minutos. La muestra eluída contenía el cDNA marcado, mientras que los nucleótidos radiactivos no incorporados quedaban retenidos en la columna. La radiactividad presente en una alícuota de 1 μ l del eluído, a la que se añadía 12 ml de líquido de centelleo, se determinaba en el contador de centelleo.

3.13.- HIBRIDACIONES

Las prehibridaciones e hibridaciones se realizaron siguiendo el método de Amasino (1986), con algunas modificaciones. Los filtros de nylon que contenían los RNAs transferidos, se introducían en cilindros de metacrilato a los que se añadía solución de hibridación (50% de Formamida desionizada, 250 mM Na₃PO₄ (pH 7.2), 250 mM NaCl, 1 mM EDTA, 7% de SDS, y 100 μ g/ml de esperma de salmón) en una proporción de 0.2 ml/cm² de membrana, y se dejaban rotando en un horno de hibridación a 42°C durante 2-4 horas. Tras el período de prehibridación, se añadía el DNA marcado a razón de 2x10⁶ dpm/ml de solución de hibridación. Este cDNA marcado se había desnaturalizado previamente calentándolo a 95-100°C durante 10 minutos y pasándolo inmediatamente a hielo. Una vez añadida la sonda, se introducían de nuevo los cilindros en el horno de hibridación a 42 °C durante 24 horas. Transcurrido el tiempo de hibridación, las membranas se sometían a sucesivos lavados con una solución que contenía SSC 2X y

0.1% SDS para eliminar la hibridación inespecífica de la sonda a la membrana. Posteriormente el filtro se exponía en un cassette de autorradiografía bajo un film de rayos X de la marca Kodak X-AR Omat a -70 °C que, pasado el tiempo conveniente, se revelaba.

Una vez realizada la hibridación y el revelado de un filtro de nylon, dicho filtro podía volver a hibridarse con otro cDNA diferente eliminando previamente la sonda anterior. Para ello, se preparaba una solución que contenía 10 mM Tris, 1 mM EDTA (pH 7.5-8) y 1% SDS (p/v), y se hervía en ella la membrana durante 20-30 minutos. Después, se exponía la membrana bajo un film de rayos X para comprobar que la marca radiactiva anterior había desaparecido, tras lo cual la membrana podía volver a ser hibridada con una nueva sonda. En caso contrario, se hervía de nuevo en solución fresca con mayor contenido de SDS (3-5%, p/v).

3.14.- ENSAYO DE TRANSCRIPCIÓN “IN VITRO”.

Esta técnica permite medir la tasa de transcripción de un determinado gen en una célula. Los transcritos de RNA nuclear de células eucarióticas que se han iniciado “in vivo” pueden elongar sus cadenas “in vitro”, incorporando ($^{32}\alpha$ -P)UTP. El RNA marcado sintetizado por los núcleos se extrae y se le hace hibridar con las secuencias de DNA cuya transcripción se desea conocer, fijadas en un filtro de nylon. La intensidad de la señal resultante dependerá del número de moléculas de RNA polimerasa unidas al gen en el momento de la extracción de los núcleos.

3.14.1.- Aislamiento de núcleos

Para el aislamiento de núcleos se siguió el método descrito por Roberts y Bentley (1992). Tras un período de incubación en distintas condiciones experimentales, las células se lavaban con PBS frío 2 veces y se recogían de la placa de cultivo mediante raspado con una espátula de goma. Se centrifugaban durante 5 minutos a 2000 rpm a 4°C, y el precipitado celular era resuspendido lentamente y mediante agitación suave en un medio Tris 10 mM (pH 7.5), KCl 10 mM, espermidina 0.5 mM, espermina 0.15 mM, Nonidet-P40 0.1%, DTT 1 mM y PMSF (50 μ g/ml). Tras dejar reposar 5 minutos en hielo se procedía a la lisis por agitación vigorosa durante 30 segundos. Posteriormente el lisado se centrifugaba a 2000 rpm, 5 minutos a 4°C, obteniendo un sedimento de núcleos que se resuspendía en 100 μ l de un tampón que contenía glicerol 40%, glutamato potásico 125 mM, Hepes 10 mM (pH 8), EDTA 1 mM, DTT 2 mM, espermidina 0.5 M y espermidina 0.15 mM, y se guardaba de esta forma a -80°C hasta su utilización.

3.14.2.- Elongación, extracción y purificación de los transcritos

Para realizar este ensayo, según el método descrito por Brooks y col.(1991), era necesario disponer de núcleos procedentes de un total de 20×10^6 de células por cada condición experimental. Las suspensiones nucleares se llevaban a un volumen de 200 μ l con glicerol 40%, $MgCl_2$ 5 mM, EDTA 0.1 mM, Tris 50 mM (pH 8.3), y se añadían otros 200 μ l de un tampón Tris 10 mM (pH 8), $MgCl_2$ 5 mM, KCl 0.3 M, DTT 5 mM, ATP 1 mM, CTP 1 mM, GTP 1 mM, y 100 μ Ci ($^{32}\alpha$ -P) UTP, incubándose a 30°C durante 30 minutos para que tuviera lugar la reacción de elongación de los transcritos. Posteriormente se añadían 100 unidades de DNasa I libre de RNasa en 600 μ l de un tampón NaCl 0.5 M, $MgCl_2$ 50 mM, $CaCl_2$ 2 mM, Tris 10 mM (pH 7.4). La reacción de digestión del DNA tenía lugar a 30°C durante 5 minutos, tras los cuales se añadía a cada muestra 200 μ l de una solución SDS 5%, Tris 0.5 M (pH 7.4) y EDTA 0.125 M (pH 8); 200 μ g de Proteinasa K y 50 μ g de RNA de transferencia, y se dejaba incubando 30 minutos a 42°C.

El RNA nuclear de cada condición se aisló mediante una extracción fenol/cloroformo, añadiendo 3.6 ml de solución D (Tiocianato de guanidina 4 M, citrato sódico 25 mM, sarcosil 0.5% y β -mercaptoetanol 0.72%), 0.5 ml de acetato sódico 3M (pH 5.2), 3.6 ml de fenol (pH 7) y 0.72 ml de cloroformo:isoamilalcohol (49:1). Después de agitar vigorosamente y dejar en reposo 30 minutos a 4°C se centrifugaba durante 10 minutos a 2000 rpm, quedando bien diferenciadas dos fases: una inferior, orgánica, y la fase superior acuosa donde se encontraba el RNA solubilizado. Esta última fase se separaba y el RNA se precipitaba con un volumen igual de isopropanol a -20°C durante toda una noche. Después de centrifugar a 9000 rpm durante 20 minutos, el precipitado de RNA se resuspendía en 500 μ l de solución D y se precipitaba de nuevo con 50 μ l de acetato sódico y 500 μ l de isopropanol a -20°C durante 1 hora. Se centrifugaba, y el precipitado obtenido, después de lavarlo con etanol al 70% (v/v), se disolvía en 50 μ l de agua tratada con DEPC y se pasaba a través de una columna de Sephadex G-50 para eliminar los nucleótidos no incorporados.

3.14.3.- Preparación de la membrana e hibridación

Se utilizaron membranas de nylon previamente hidratadas y equilibradas durante 10 minutos en solución SSC 6X.

Antes de transferir el DNA a las membranas era necesario linearizarlo mediante digestión con el enzima de restricción adecuado y posteriormente desnaturalizarlo por tratamiento con NaOH 0.4N a 65°C durante 1 hora. Después se pasaba a hielo y se añadía un volumen igual de SSC 12X frío. Finalmente, mediante un sistema de vacío de slot-blot,

se transferían en cada pocillo 2 μ g de plásmido conteniendo el cDNA de interés. El DNA ligado a la membrana se fijaba por exposición durante 5 minutos a luz ultravioleta de 254 nm. Posteriormente se metía en un horno a 80°C durante 2 horas. La prehibridación e hibridación se realizó de igual forma que la descrita en la sección 3.13, teniendo en cuenta que hay que poner la misma cantidad de transcritos marcados para cada condición. Pasado el tiempo necesario para la hibridación los filtros se lavaban con una solución SSC 2X y SDS 0.1%, y se exponían bajo un film de rayos X.

IV.- RESULTADOS Y DISCUSION

IV-RESULTADOS Y DISCUSION

4.1.- DIFERENCIACION DE ADIPOCITOS MARRONES FETALES DE RATA DURANTE EL ULTIMO PERIODO DE GESTACION: PAPEL DEL IGF-1

La diferenciación del BAT en la mayoría de las especies se produce durante la etapa fetal. Por ello, nos propusimos estudiar la diferenciación adipogénica y termogénica de este tejido en la rata durante el desarrollo fetal tardío mediante técnicas de citometría de flujo y expresión génica, así como determinar posibles señales implicadas en dichos procesos. Este estudio se centró en los días 20, 21 y 22 de desarrollo fetal, que coinciden aproximadamente con el último trimestre de gestación en humanos. Se extrajo el tejido adiposo marrón interescapular de fetos de las distintas edades gestacionales, y a partir de él se aislaron los adipocitos marrones tal y como se describe en el apartado 3.4.1 de Material y métodos, utilizándolos para distintos ensayos. Todas las determinaciones se realizaron a partir de tres experimentos diferentes en los cuales, para cada edad gestacional, se tomaron 4 camadas de similar número y tamaño de animales.

Aunque la cantidad de tejido adiposo marrón obtenido a partir de fetos de 22 días fue mayor (30 mg/ feto) que la de fetos de 20 días (10 mg/ feto), el rendimiento de adipocitos marrones aislados fue el mismo en ambos casos (1×10^6 células/feto), indicando que en la transición entre el día 20 y 22 del desarrollo fetal se produce un aumento en el tamaño celular pero no en el número de células.

4.1.1.- Caracterización por citometría de flujo de los adipocitos marrones durante el último período fetal: tamaño, fluorescencia endógena, contenido lipídico y ciclo celular

Los adipocitos marrones aislados a partir de fetos de 20-22 días fueron utilizados para determinar, mediante la técnica de citometría de flujo, su tamaño, fluorescencia endógena, contenido citoplasmático de lípidos (Figura 1) y porcentaje de células en las distintas fases del ciclo celular (Tabla 1).

Las señales de tamaño celular dieron un amplio pico de pequeño tamaño para adipocitos marrones fetales de 20 días, mientras que las células de 22 días mostraron un

mayor tamaño (Figura 1a). La medida de fluorescencia endógena (fluorescencia de flavinas) nos da idea del estado metabólico de las células. Las flavinas emiten fluorescencia cuando se encuentran en estado oxidado, desapareciendo dicha fluorescencia al reducirse (Thorell, 1983). El alto contenido en mitocondrias que presentan los adipocitos marrones hace posible la detección de fluorescencia endógena en estas células. Los adipocitos de 20 días mostraron un pico agudo de baja fluorescencia, mientras que en los adipocitos marrones fetales de 22 días se observaba la presencia de un pico de mayor fluorescencia (Figura 1b), que podría indicar mitocondrias maduras con flavinas en estado oxidado. La fluorescencia que emite el Rojo Nilo sirve para detectar el contenido de lípidos citoplásmicos, y nos permite monitorizar el programa de diferenciación adipocítica (Smith y Wharton, 1992). Los adipocitos marrones de fetos de 20 días mostraron un pico de baja fluorescencia de Rojo Nilo con una larga cola. Las intensidades medias de fluorescencia de Rojo Nilo aumentaron gradualmente en adipocitos de 21 y 22 días de vida fetal, siendo en células de 22 días casi el doble que en adipocitos de 20 días (Figura 1c).

Paralelamente a estos cambios que parecen indicar un aumento en la complejidad celular y un proceso de diferenciación, observamos que la capacidad proliferativa de estas células disminuye entre los días 20 y 22 del desarrollo fetal. En adipocitos marrones fetales de 20 días el porcentaje de células en fases S+G2/M del ciclo celular es del 16.8%, disminuyendo a un 9.7% y 5.2% en los días 21 y 22 respectivamente (Tabla 1).

4.1.2.- Expresión de genes implicados en la diferenciación adipogénica y termogénica de los adipocitos marrones durante el desarrollo fetal tardío

Como ya se ha comentado en la Introducción y en el apartado de Antecedentes, la diferenciación del tejido adiposo marrón tiene lugar en base a dos programas: un programa de diferenciación termogénica y un programa de diferenciación adipogénica.

Puesto que los datos de fluorescencia de Rojo Nilo indicaban un aumento en el contenido citoplasmático de lípidos en los adipocitos marrones fetales al final de la gestación, se llevó a cabo un estudio mediante análisis por Northern-blot de la expresión de varios genes implicados en adipogénesis, entre ellos FAS, G3PDH, ME, G6PD y Glut4 (Figura 2). Los análisis densitométricos correspondientes se muestran en la Tabla 2. Los niveles de mRNA de FAS fueron bajos en adipocitos marrones fetales de 20 días, aumentando 5 veces entre los días 20 y 21 y permaneciendo altos en el día 22. Las células fetales de 20 días también expresan constitutivamente G3PDH, pero su expresión no sufre cambios significativos durante el último período de gestación. La ME y G6PD están

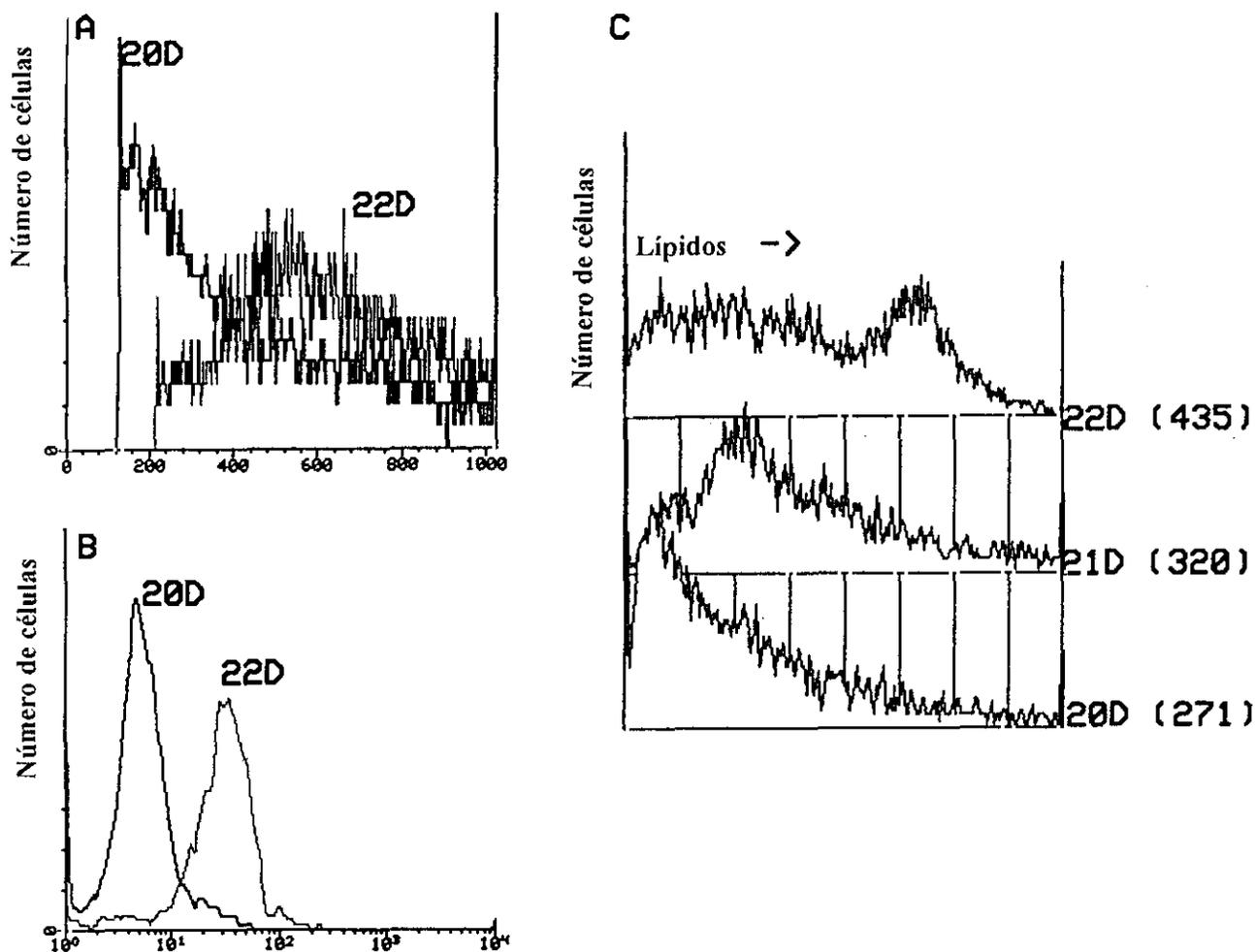


Figura 1.- Caracterización mediante citometría de flujo de los adipocitos marrones durante el último período de vida fetal: tamaño, fluorescencia endógena y contenido lipídico

Los adipocitos marrones fueron aislados a partir de fetos de 20, 21 y 22 días y se caracterizaron por citometría de flujo en cuanto a: a) tamaño, b) fluorescencia endógena, y c) contenido citoplasmático de lípidos determinado por fluorescencia de Rojo Nilo. En todos los casos está representado el número de células frente a intensidad de fluorescencia. En el apartado c además se muestran, expresadas como unidades arbitrarias, las medias de las intensidades de fluorescencia de Rojo Nilo de un experimento representativo.

FASE DEL CICLO CELULAR	CELULAS EN FASE (%)			
	Edad fetal (días)	20	21	22
G0/G1		83.2	90.3	94.8
S		10.1	5.0	2.8
G2/M		6.7	4.7	2.4

Tabla 1.- Análisis del ciclo celular por citometría de flujo en los adipocitos marrones fetales durante el último período de gestación.

A partir de fetos de 20, 21 y 22 días se aislaron adipocitos marrones. El estudio del ciclo celular fue realizado después de la tinción de los núcleos con yoduro de propidio y el análisis de la intensidad de fluorescencia por citometría de flujo. Se muestran los resultados de un experimento representativo expresados como porcentaje de células en fases G₀/G₁, S y G₂/M del ciclo celular.

implicadas indirectamente en la lipogénesis por ser enzimas que generan NADPH. Los niveles de mRNA de ambas fueron muy bajos en adipocitos marrones de 20 días, pero aumentaron progresivamente entre los días 20 y 22 con un incremento total de 13 veces para la ME y de 35 para la G6PD. La expresión del transportador de glucosa Glut4 fue muy baja tanto en el día 20 como el 21. Sin embargo, aumentó significativamente (11 veces) en adipocitos marrones fetales de 22 días. Todos estos cambios en la expresión génica de proteínas implicadas en adipogénesis se correlacionan con el aumento de las actividades enzimáticas de la FAS, ME y G6PD, así como del flujo lipogénico total entre los días 20 y 22 del desarrollo fetal encontrado en estudios previos de nuestro grupo de trabajo. La expresión de la PEPCCK, un marcador de diferenciación muy tardío en adipocitos blancos, permaneció muy baja en los adipocitos marrones en este período fetal.

Simultáneamente al programa de diferenciación adipocítica estudiamos la expresión del gen específico del tejido, marcador del programa termogénico: la proteína desacoplante (UP). Los adipocitos marrones fetales de 20 días ya contienen niveles considerables del mRNA de la UP, incrementándose 6 veces entre los días 20 y 22 de gestación. (Figura 2; Tabla 2).

La expresión de ciertos factores nucleares durante el último período de vida fetal podría estar implicada en los procesos de diferenciación. Entre ellos, una familia de factores de transcripción, los C/EBPs (isoformas α , β y δ) parece estar relacionada con la diferenciación adipogénica en el modelo de preadipocitos 3T3-L1 (Yeh y col., 1995), así como en la diferenciación termogénica del tejido adiposo marrón (Manchado y col., 1994). Por tanto, hemos estudiado el patrón de expresión de C/EBPs en los días 20, 21 y 22 del desarrollo fetal en adipocitos marrones (Figura 2; Tabla 2), encontrando que las tres isoformas ya se expresan el día 20 y se modulan durante el último período de gestación: la expresión de C/EBP α disminuye entre los días 20 y 22, dando paso a un aumento sustancial en la expresión de las isoformas β y δ .

Todos los resultados descritos hasta ahora muestran un proceso de diferenciación en los adipocitos marrones en el último período de vida fetal. Entre los días 20 y 22 de gestación estas células fetales aumentan de tamaño e incrementan su contenido mitocondrial y la cantidad de lípidos citoplasmáticos, mientras que su capacidad proliferativa disminuye. Paralelamente, se observa una inducción en la expresión de genes relacionados con procesos de diferenciación tanto lipogénica como termogénica, dando como resultado unos adipocitos marrones fetales de 22 días maduros, repletos de gotas de grasa dispuestas en depósitos multiloculares característicos de estas células (Figura 3a) y que expresan el marcador específico de tejido (la UP) no sólo a nivel de mRNA sino también de proteína, detectada en las mitocondrias por inmunofluorescencia (Figura 3b). Sin embargo, estas

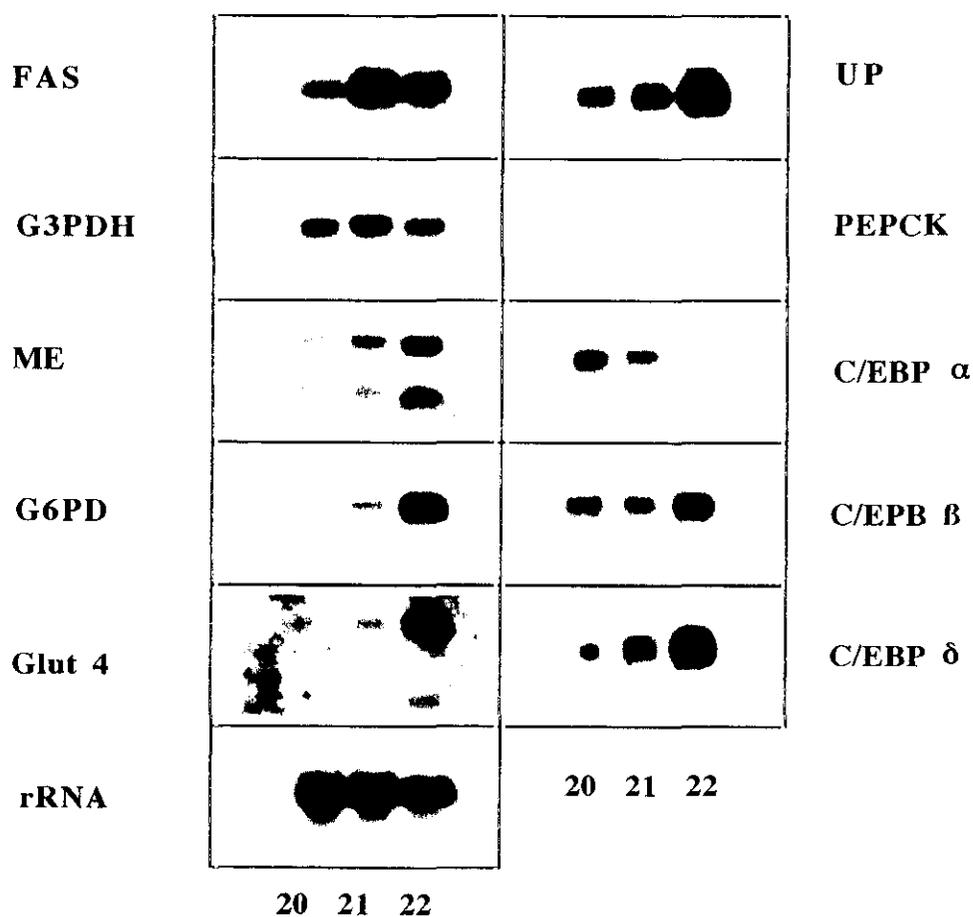


Figura 2.- Expresión génica en los adipocitos marrones de 20, 21 y 22 días de vida fetal.

RNA total (20 μ g) de adipocitos marrones fetales de 20, 21 y 22 días fue analizado por Northern-blot e hibridado con diferentes sondas. En la figura se muestra un autorradiograma representativo de tres experimentos independientes.

Edad fetal (días)	Expresión de mRNA (unidades arbitrarias)		
	20	21	22
FAS	27±5	151±17*	149±25*
G3PDH	40±9	66±12	49±9
ME	15±4	71±10*	201±30*, +
G6PD	9±3	28±7*	319±40*, +
GLUT4	36±10	38±9	435±70*, +
UP	60±13	98±17*	374±36*, +
PEPCK	4±1	6±2	7±3
C/EBP α	48±5	34±3*	22±3*, +
C/EBP β	35±6	30±5	98±13*, +
C/EBP δ	30±8	79±9*	196±23*, +

Tabla 2.- Análisis densitométrico de la expresión de distintos mRNAs en adipocitos marrones durante los últimos días de desarrollo fetal

Autorradiografías correspondientes a la figura 2 fueron sometidas a análisis densitométrico. El contenido en mRNA se expresa como unidades arbitrarias después de normalizar con la cantidad de 18 S rRNA, y los resultados son las medias \pm S.E.M. de tres experimentos independientes. Se indican los valores significativamente distintos según el test de Student, comparando los días 21/22 con el día 20 (*) y el día 22 con el 21 (#); *, # $p < 0.05$.

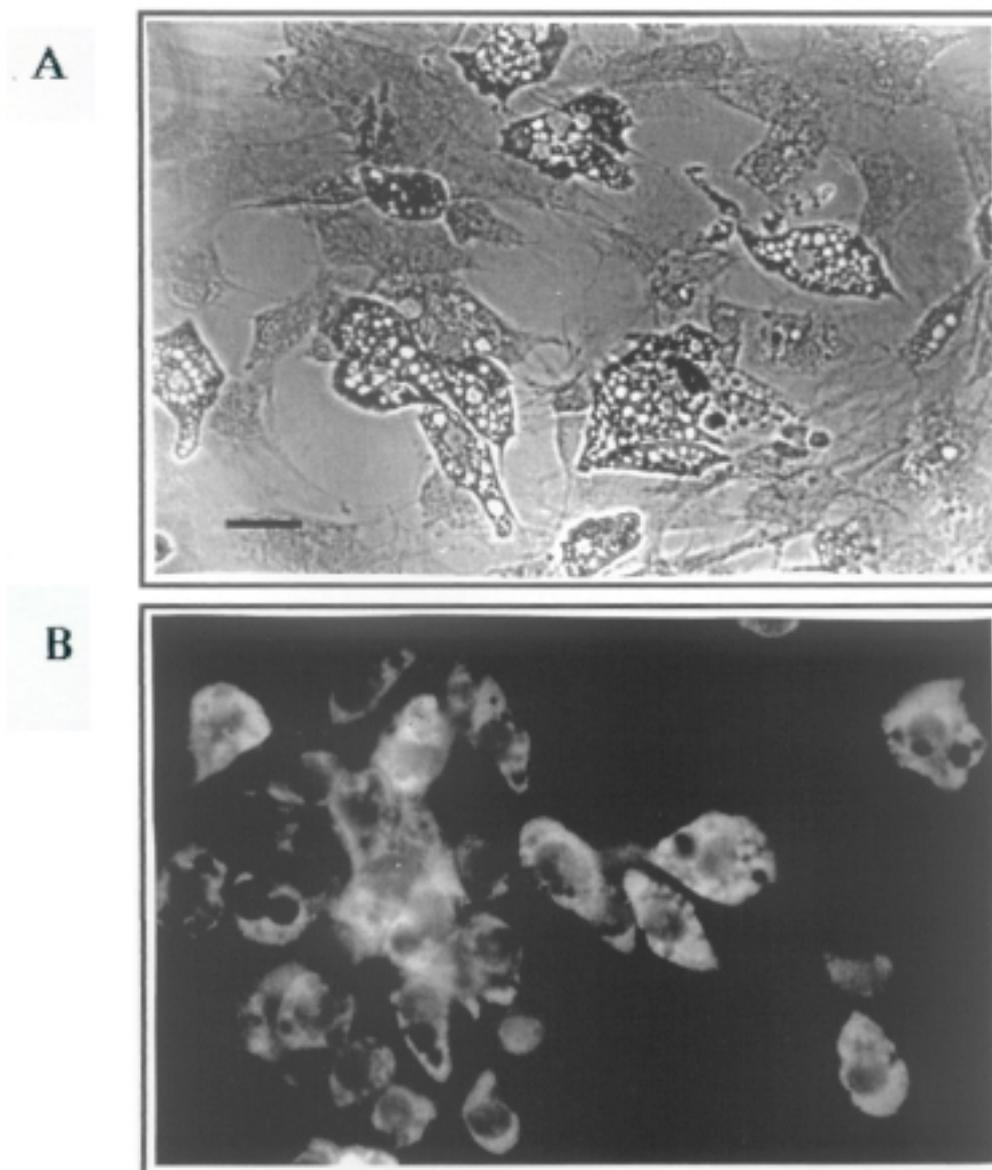


Figura 3.- Caracterización por microscopía de los adipocitos marrones fetales maduros.

Los adipocitos marrones fueron obtenidos a partir de fetos de 22 días, siendo sembrados y mantenidos en placas de cultivo durante 4 horas a 37°C. A) La presencia de gotas de grasa multiloculares fue confirmada mediante tinción de las células con Oil-Red O. B) La presencia de proteína desacoplante fue detectada por inmunofluorescencia con suero específico anti-UP.

células no están totalmente diferenciadas puesto que todavía no expresan PEPCK y además “in vitro” pueden proliferar en respuesta a mitógenos específicos (Valverde y col., 1991).

Factores transcripcionales de la familia de C/EBPs podrían ser los determinantes del fenotipo diferenciado del tejido adiposo marrón, transactivando genes cuya expresión marca el estado diferenciado de estas células. La presencia de los mRNAs de C/EBP α , β y δ en los adipocitos marrones de 20 días coincide con la expresión inicial del gen de la UP, lo cual sugiere que las proteínas C/EBPs podrían estar implicadas en la regulación transcripcional de la proteína desacoplante, como se ha descrito recientemente (Yubero y col., 1994). Wang y col., (1995) han puesto de manifiesto la relación entre la proteína desacoplante y el C/EBP α “in vivo”, en un trabajo donde ratones que han sufrido una delección del gen C/EBP α muestran niveles de expresión de UP reducidos. Por otro lado, la expresión de las isoformas β y δ aumenta entre los días 20 y 22, de forma similar a lo que ocurre con el gen de la UP. En tejido adiposo marrón se ha descrito un aumento en la expresión de C/EBP β paralelo a la inducción de UP después de una exposición al frío (Manchado y col., 1994). En relación con la adipogénesis, en el modelo de diferenciación adipocítica 3T3-L1, se ha descrito un patrón secuencial de expresión de C/EBPs: durante la fase temprana de diferenciación se acumulan altos niveles de las isoformas β y δ que van disminuyendo a lo largo de la fase terminal para ser reemplazados por un tercer miembro de la familia, C/EBP α (Yeh y col., 1995). Sin embargo, en los adipocitos marrones hemos observado una expresión temprana de C/EBP α en el día 20 del desarrollo fetal que disminuye posteriormente, con un aumento en la expresión de C/EBP β y δ entre los días 20 y 22. No se puede establecer una relación directa entre el patrón de expresión de las distintas isoformas de C/EBPs y el proceso de adipogénesis de las células marrones.

4.1.3.- Expresión de IGF-1 e IGF-1R mRNAs en los adipocitos marrones durante el último período de desarrollo fetal

Aunque las señales implicadas en el inicio de los procesos de diferenciación adipogénica/termogénica del BAT no se conocen, la insulina y/o IGF-1 podrían ser potenciales candidatos. El IGF-1 es expresado por diferentes células de origen mesenquimático durante el desarrollo fetal y se ha demostrado claramente “in vivo” su importancia durante este período (Liu y col., 1993; Baker y col., 1993). Este factor ha sido implicado tanto en procesos de proliferación como de diferenciación de distintos tipos celulares. Preadipocitos en cultivo primario y diferentes líneas celulares preadipocíticas expresan IGF-1 y su receptor (Boney y col., 1994), y son capaces de proliferar (Butterwith y col., 1993) y diferenciar a adipocitos en presencia de este factor (Rubin y col., 1978).

Nosotros hemos estudiado en adipocitos marrones la expresión de IGF-1 e IGF-1R durante el último período gestacional. Las células fetales de 20 días expresan constitutivamente altos niveles de IGF-1 y su receptor, como se muestra en el Northern-blot realizado con poli A+mRNAs (Figura 4). El gen del IGF-1 es transcrito y procesado de manera compleja, dando lugar a gran número de especies de mRNA maduros. En los adipocitos marrones se detectaron las tres isoformas mayoritarias del mRNA del IGF-1 de 7.5, 1.8 y 0.8-1.2 kb, así como un mRNA de 7-7.5 kb para el IGF-1R. De los tres transcritos para el IGF-1 los dos de menor tamaño fueron los más abundantes, a diferencia del hígado de rata y fibroblastos, donde las especies predominantes son las de 7.5 y 0.8-1.2 kb (Hepler y col., 1990; Lowe y col., 1990). El perfil de expresión de las isoformas de 1.8 y 0.8-1.2 kb no sufrió cambios entre los días 20 y 22 del desarrollo fetal, mientras que los niveles de la especie de mayor tamaño disminuyeron fuertemente. Sin embargo, esto no debería afectar a la cantidad de péptido producido por los adipocitos marrones, ya que en polisomas sólo se han encontrado las especies de menor tamaño (Foyt y col., 1991). En cuanto a la expresión del receptor de IGF-1, sus niveles fueron 3 veces mayores en adipocitos de 22 días en comparación con células fetales del día 20 (Figura 4).

Puesto que la activación del sistema adrenérgico inducido por la hipotermia postnatal, es posterior en el tiempo a la ontogénesis y activación del BAT en el feto, otras señales deben estar implicadas en el desarrollo del tejido en este período. Así, Guerra y col., (1994) han descrito una inducción directa por T3 de la expresión de UP en cultivos primarios de adipocitos marrones fetales, proponiendo para esta hormona un papel en la diferenciación termogénica del BAT durante el período fetal. El hecho de que estas células expresen de forma constitutiva tanto el IGF-1 como su receptor, con un aumento en los niveles de éste último entre los días 20 y 22 de vida fetal paralelo a la diferenciación del BAT, sugiere que el IGF-1, de manera autocrina/paracrina, podría constituir un importante factor de desarrollo de este tejido.

Con objeto de profundizar en el papel del IGF-1 en el desarrollo del BAT durante la etapa fetal hemos estudiado el efecto de dicho factor en cultivos primarios de adipocitos marrones fetales de 20 días, tanto sobre procesos de proliferación como de diferenciación. Paralelamente, hemos estudiado el papel de la insulina sobre dichos procesos.

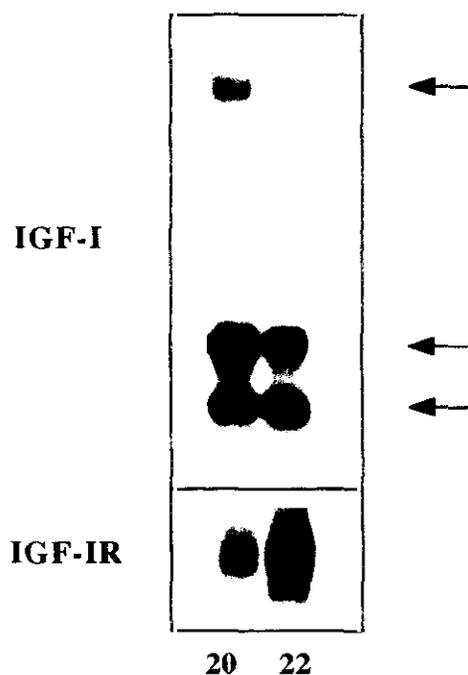


Figura 4.- Expresión de IGF-I e IGF-IR mRNAs en los adipocitos marrones fetales durante el último período de gestación

A partir del RNA total de adipocitos marrones fetales de 20 y 22 días se aislaron los poli A+mRNAs. 10 μ g de los mismos se sometieron a electroforesis y análisis por Northern-blot. Las hibridaciones se realizaron con cDNAs de IGF-I e IGF-IR marcados radiactivamente. En la Figura se muestra una autorradiografía representativa, señalándose con flechas las isoformas del mRNA de IGF-I correspondientes a 7.5, 1.8 y 0.8-1.2 kb.

4.2.- IGF-1 INDUCE PROLIFERACION EN ADIPOCITOS MARRONES FETALES EN CULTIVO

La importancia del IGF-1 como factor de crecimiento durante el desarrollo de los mamíferos ha sido claramente demostrada en experimentos realizados con ratones delecionados para el gen del IGF-1, los cuales presentan un severo retraso en el crecimiento (Baker y col., 1993). En células de origen mesenquimático, entre las que se encuentran los preadipocitos, se ha visto que el IGF-1 es capaz de inducir proliferación, por lo que nos planteamos si también tendría efectos mitogénicos sobre los adipocitos marrones fetales.

Comenzamos el estudio caracterizando el sistema de receptores de IGF-1 con objeto de comprobar que estas células no sólo lo expresaban a nivel de mRNA, sino que realmente presentaban receptores en la superficie celular y éstos unían IGF-1.

4.2.1.- Los adipocitos marrones fetales de 20 días presentan un elevado número de receptores de alta afinidad para el IGF-1

Los estudios de desplazamiento con IGF-1 marcado con ^{125}I y posterior análisis de Scatchard revelan un elevado número de sitios de unión de alta afinidad ($K_d=4.8$ nM) para el IGF-1 (190.000 receptores/célula) en los adipocitos marrones fetales de 20 días (Figura 5A). En paralelo se llevaron a cabo estudios de unión con ^{125}I -insulina para determinar el número y la afinidad de los receptores para insulina presentes en estas células. Los resultados muestran un menor número de receptores para insulina (40.000 sitios/célula) y de afinidad algo más baja ($K_d=18.2$ nM) (Figura 5B) que los obtenidos para IGF-1, lo cual es coherente por tratarse de adipocitos fetales todavía inmaduros. En los modelos de diferenciación adipocítica tipo 3T3-L1, los fibroblastos se caracterizan por tener receptores para IGF-1, pero apenas tienen para insulina. Sin embargo, el proceso de diferenciación a adipocitos conlleva un aumento en el número de receptores para insulina. Comparando con estos modelos, podemos decir que nuestras células fetales estarían en un punto intermedio del proceso de diferenciación, puesto que aunque el número de receptores para IGF-1 es mayor, también presentan en su superficie un número considerable de receptores para insulina, constituyendo un sistema de células primarias adipocíticas único, donde coexisten ambos tipos de receptores.

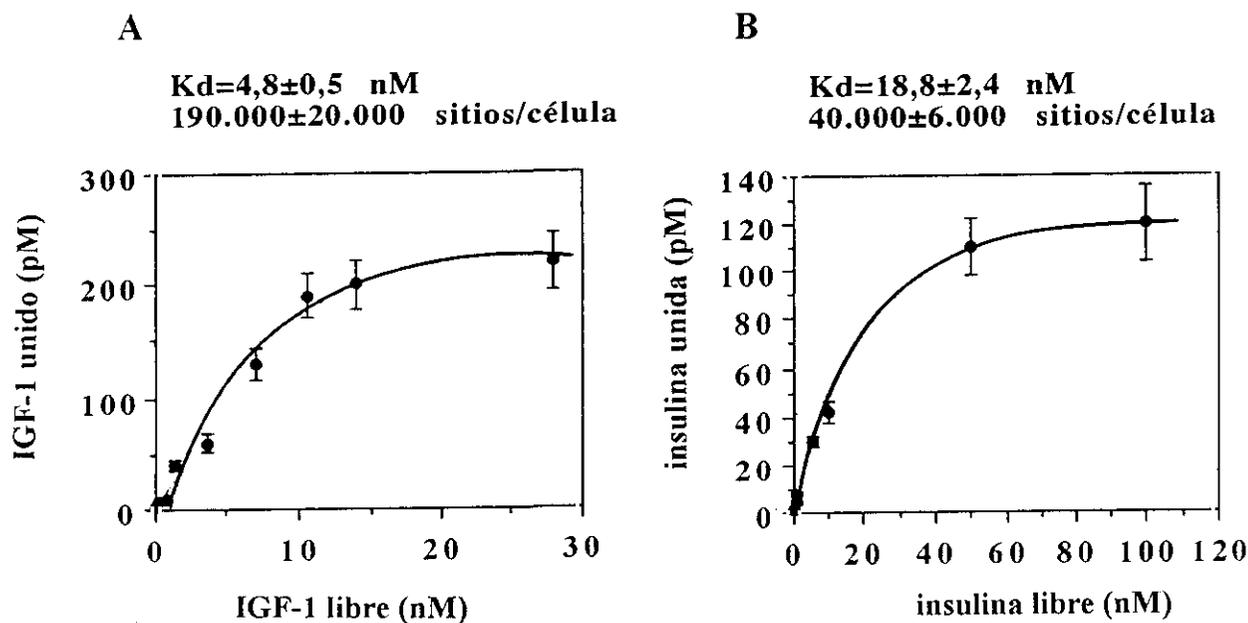


Figura 5.- Estudios de unión específica de IGF-1 e insulina a sus receptores

Los adipocitos marrones quiescentes fueron incubados durante 3 horas con ^{125}I -IGF-1 en ausencia o presencia de concentraciones crecientes de IGF-1 frío (A) o con trazas de ^{125}I -insulina en ausencia o presencia de concentraciones crecientes de insulina no radiactiva (B) como se describe en Material y métodos. En las gráficas se representa el ligando unido frente al ligando libre (medias \pm S.E.M. de tres experimentos diferentes). Los datos de K_d y número de receptores se calcularon mediante el análisis de Scatchard.

4.2.2.- El IGF-1 aumenta la síntesis de DNA, el número de células y el porcentaje de células en fases S, G2 y M del ciclo celular

Como se ha descrito en el apartado 4.1.1, los adipocitos marrones fetales de 20 días recién aislados (tiempo 00 de cultivo) presentan una competencia mitogénica intrínseca (17% de células en fases S+G2/M del ciclo celular) que se inhibe si se mantienen 20 horas en ausencia de suero (el porcentaje de células en ciclo celular disminuye hasta menos del 5%), siendo en este momento susceptibles de responder al estímulo mitogénico de distintas señales (tiempo 0).

En estudios dosis-respuesta realizados con IGF-1 e insulina sobre la incorporación de (³H)-Timidina a síntesis de DNA se observó que IGF-1 aumentaba la incorporación de (³H)-Timidina de forma dosis dependiente (Figura 6A), siendo la estimulación máxima a la concentración de 10 ng/ml (1.4 nM), por lo que en todos los experimentos posteriores se empleó dicha concentración. La insulina, en cambio, mostró un débil efecto sobre la incorporación de (³H)-Timidina incluso a dosis elevadas.(Figura 6B).

Como parámetros indicadores de proliferación se determinaron la síntesis de DNA mediante incorporación de (³H)-Timidina, el número de células y el porcentaje de células en las distintas fases del ciclo celular, llevando el suero fetal (FCS) como control positivo de proliferación. El IGF-1 (1.4 nM) tras 24 y 48 horas de cultivo, incrementó todos los parámetros estudiados de forma similar al 10% FCS cuando se comparaban con los de las células control (Tabla 3).

Mediante técnicas autorradiográficas (Rozengurt, 1991) se puede conocer la proporción de células que están sintetizando DNA en un período de tiempo determinado. Los adipocitos marrones quiescentes (20 horas deprivados de suero) fueron incubados durante 48 horas con (³H)-Timidina, en ausencia o presencia de IGF-1 o 10% de FCS, con objeto de determinar el porcentaje de núcleos marcados tal como se describe en Material y Métodos. En las células control el porcentaje de núcleos marcados con (³H)-Timidina fue de 13.6±0.7. La presencia de IGF-1 incrementó este porcentaje hasta un 45.9±0.8, mientras que las células tratadas con 10% FCS mostraron un 48.5±2.0% de núcleos radiactivos. En la figura 7 se muestran autorradiografías de adipocitos marrones incubados 48 horas en presencia de IGF-1 y (³H)-Timidina, donde se pueden apreciar a los adipocitos con sus típicos depósitos de grasa multiloculares que han dado positivo al marcaje nuclear.

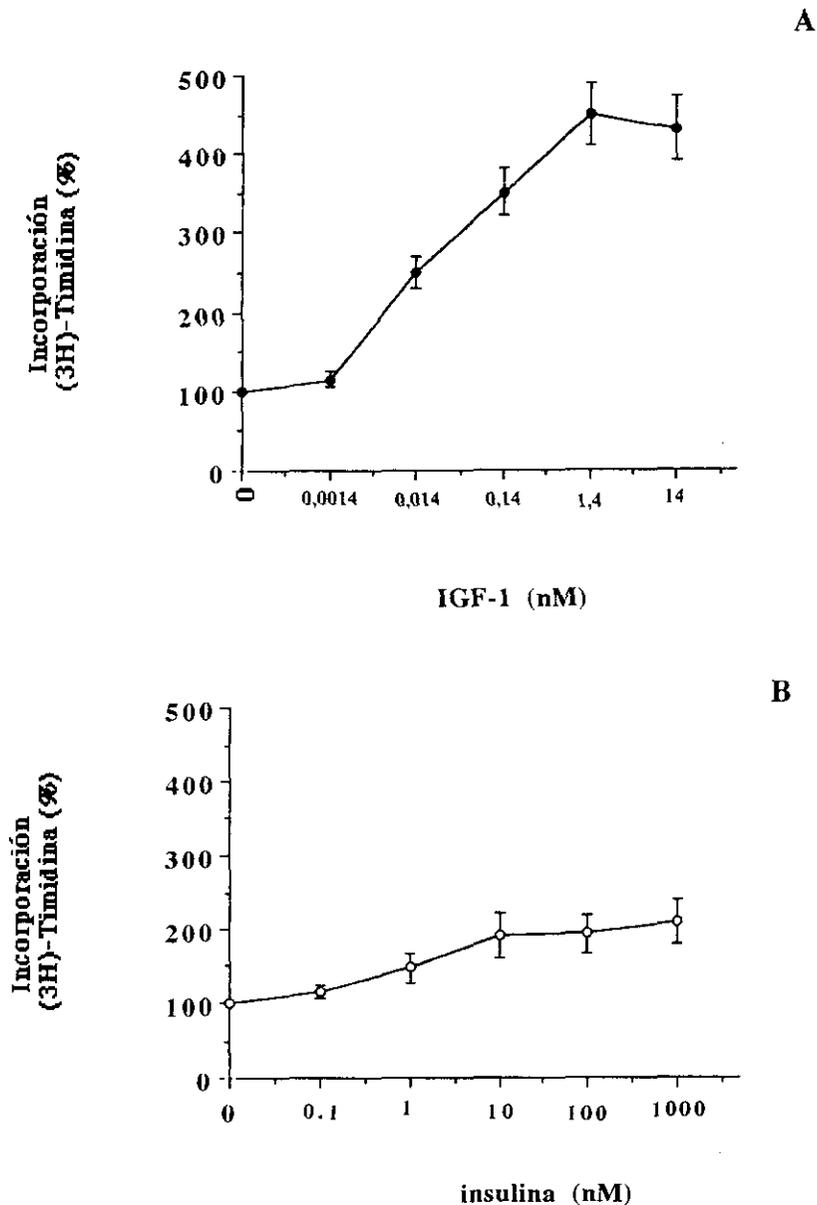


Figura 6.- Efectos del IGF-1 y de la insulina sobre la síntesis de DNA: estudio dosis-respuesta

Células quiescentes (20 horas deprivadas de suero) fueron incubadas durante 24 horas en presencia de concentraciones crecientes de IGF-1 (A) o de insulina (B), midiéndose la incorporación de (^3H) -Timidina durante las 4 últimas horas de cultivo. Los resultados son la media \pm S.E.M ($n=4$) y están expresados como porcentaje de radiactividad incorporada por células sin tratar (100).

TIEMPO (H)	24			48		
	Control	IGF-1	FCS	Control	IGF-1	FCS
Número de células ($\times 10^{-5}$ células/placa)	7.1 \pm 0.6	12.2 \pm 1.1	13.4 \pm 1.5	6.2 \pm 0.5	15.2 \pm 1.4	17.3 \pm 1.5
Ciclo celular (%S+G2/M)	5.1 \pm 0.7	10.5 \pm 1.0	10.1 \pm 1.1	4.7 \pm 0.6	14.2 \pm 1.3	15.1 \pm 1.9
(3 H)-Timidina ($\times 10^{-3}$ dpm/placa)	26.8 \pm 2.5	86.7 \pm 8.2	132.3 \pm 12.6	16.2 \pm 0.9	122.0 \pm 10.5	135.6 \pm 13.2

Tabla 3 El IGF-1 aumenta la síntesis de DNA, el porcentaje de células en ciclo celular y el número de células

Los adipocitos marrones quiescentes se trataron durante 24 y 48 horas con IGF-1 (1.4 nM), ó 10% FCS, o bien se mantuvieron en ausencia de señales como control de quiescencia celular. A los dos tiempos de cultivo se determinaron los siguientes parámetros: síntesis de DNA mediante incorporación de (3 H)-Timidina durante las 4 últimas horas de cultivo, porcentaje de células en las distintas fases del ciclo celular y número de células mediante citometría de flujo. Los resultados son la media \pm S.E.M de tres experimentos distintos.

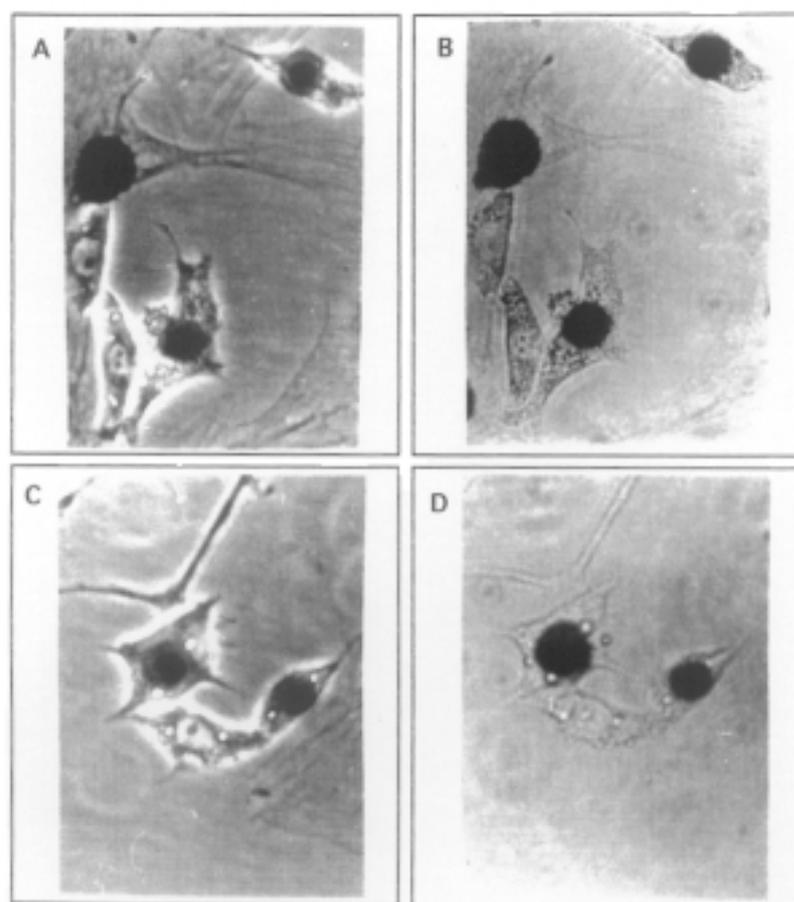


Figura 7.- El IGF-1 induce el marcaje de núcleos en los adipocitos marrones fetales

Células quiescentes (20 horas deprivadas de suero) se incubaron 48 horas en presencia de IGF-1 y (3H)-Timidina, como se describe en Material y métodos. Las placas fueron cubiertas con una película "Kodak AR 10 stripping", expuestas durante 2 semanas y reveladas. (A y C) son microfotografías en contraste de fase. (B y D), son microfotografías de campo claro.

4.2.3.- El IGF-1 induce la expresión de genes y proteínas relacionadas con proliferación

Células quiescentes fueron incubadas durante 30 minutos, 2, 4, 6, 8, y 24 horas en presencia o ausencia de IGF-1 o 10% de FCS, aislándose el RNA total de cada condición a los distintos tiempos estudiados y analizándose posteriormente la expresión de varios mRNAs mediante la técnica de Northern-blot. Los resultados normalizados de los análisis densitométricos de las diferentes autorradiografías se presentan en la Tabla 4.

La presencia de IGF-1 durante 30 minutos aumentó 10 veces los niveles de mRNA de c-fos, comparando con células quiescentes sin tratar. La expresión de c-myc se vio incrementada 3.5 veces después de 2 horas de tratamiento con IGF-1, disminuyendo progresivamente estos niveles con el tiempo. Sin embargo, volvimos a ver un segundo pico de expresión tras 24 horas de tratamiento con el factor. La β -actina mostró un patrón de expresión a lo largo del tiempo similar al de c-myc. IGF-1 aumentó la expresión de H-ras a 4 y 24 horas 3 veces, comparando con células no tratadas. También a 24 horas los niveles de mRNA de G6PD aumentaron en respuesta a IGF-1.

Además del patrón de expresión de genes relacionados con proliferación, se llevó a cabo un estudio del efecto de IGF-1 sobre los niveles de 2 proteínas también implicadas en procesos proliferativos: la PCNA (cofactor de la DNA polimerasa δ , una proteína marcadora de la fase S del ciclo celular) (Baserga, 1991) y p21-ras (una proteína que interviene en la ruta de transducción del IGF-1, posiblemente implicada en la progresión G1/S del ciclo celular). Los niveles de estas dos proteínas se determinaron mediante la técnica de Western-blot tras 24 horas de tratamiento con IGF-1 o 10% FCS, comparándose con los de las células quiescentes control (Figura 8). El IGF-1 aumentó 3 veces los niveles de p21-ras y 4 veces los de PCNA tras 24 horas de estimulación.

Los resultados presentados demuestran que en cultivos primarios de adipocitos marrones fetales el IGF-1, a dosis 1.4 nM, puede comportarse como un mitógeno "per se" y mimetizar los efectos de 10% FCS, aumentando la síntesis de DNA, el porcentaje de células en ciclo celular, y el número de células. Además, el análisis autorradiográfico de los núcleos marcados con timidina tritiada demuestra que células con fenotipo de gotas de grasa multilocular presentan núcleos tritiados en respuesta al tratamiento durante 48 horas con IGF-1, sugiriendo que las células diferenciadas son capaces de proliferar en respuesta a IGF-1. Por otro lado, el IGF-1 como único factor añadido exógenamente aumenta la expresión de un grupo de genes relacionados con la proliferación de forma gradual en el tiempo: c-fos a 30 minutos, c-myc a 2 y 24 horas, H-ras a 4 y 24 horas y G6PDH (implicada en la síntesis de ribosa-fosfato para la replicación del DNA) a 24 horas.

Tiempo(h)	0.5		2		4		6		8		24	
	I	F	I	F	I	F	I	F	I	F	I	F
fos	10	25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
myc	1.1	1.3	3.5	3	3	1.3	2	2.1	1.1	1.1	2.2	1.8
H-ras	1	1	1.4	1	3	0.8	1.8	1.3	1.3	1	3	1.9
G6PDH	-	-	1	1	1.6	0.5	1.4	0.7	1	0.5	4	1.2
β -actina	2	1.6	2.1	2	1.8	1	1.4	1.3	1	1.2	2	2.3

Tabla 4 Inducción de distintos genes implicados en proliferación a lo largo del tiempo por IGF-1 y 10% FCS

Los adipocitos marrones quiescentes fueron tratados durante 30 minutos, 2, 4, 6, 8 y 24 horas con IGF-1 (1.4 nM), ó 10% FCS, o bien se mantuvieron quiescentes en ausencia de ambos, aislándose el RNA total de las distintas condiciones estudiadas. Después del análisis por Northern-blot y sucesivas hibridaciones, las autorradiografías se leyeron en un densitómetro. Los resultados se expresan como el aumento de la expresión (ya normalizada) en número de veces respecto a las células no tratadas (unidad arbitraria 1) a los distintos tiempos de cultivo.

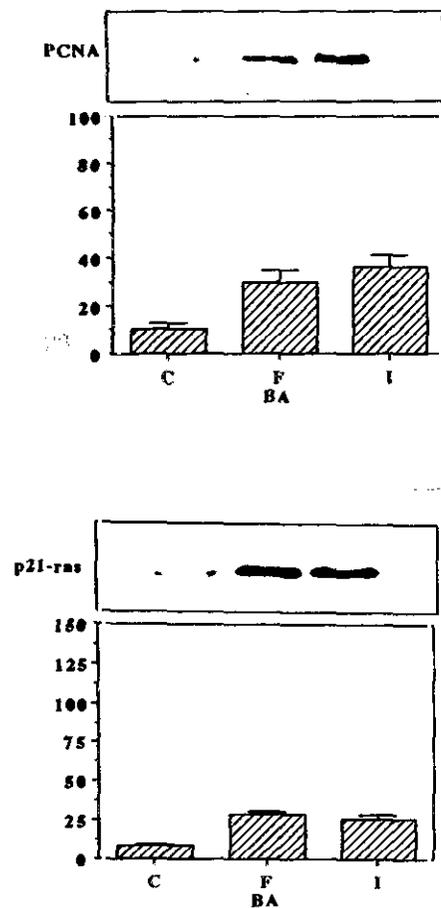


Figura 8.- El IGF-1 aumenta los niveles de las proteínas PCNA y p21-ras en los adipocitos marrones fetales.

Células quiescentes (20 horas deprivadas de suero) fueron incubadas durante 24 horas en presencia de 1.4 nM IGF-1 (I) o de 10% de suero fetal (F), comparándose con células sin tratar (C). 20 μ g de proteína total de cada condición fueron sometidos a 8% SDS-PAGE, transferidos a membranas de nylon, inmunodetectados con anticuerpos monoclonales contra las proteínas PCNA (panel superior) y p21-ras (panel inferior) y revelados con ECL-quimioluminiscencia. Se muestran dos autorradiografías representativas y sus correspondientes análisis densitométricos expresados como unidades arbitrarias (medias \pm S.E.M. de tres experimentos distintos).

La inducción temprana de los tres primeros genes también se produce en respuesta al suero, un mitógeno completo, en fibroblastos de ratón (Greengerg y Ziff, 1984; Mulcahy y col., 1985). Sin embargo, en el modelo de las células Balb/3T3, el PDFG (que se comporta como factor de competencia) aumenta la expresión de c-fos y c-myc, pero no es capaz de inducir la de H-ras. Para ello es necesaria la presencia de IGF-1 (un factor de progresión en este modelo) que aumenta la expresión de H-ras, hecho absolutamente necesario para que las células progresen a través de la fase G1 y entren en fase S (Lu y Campisi, 1992). El aumento en la expresión de c-fos y c-myc como genes tempranos de proliferación en respuesta a un estímulo mitogénico ha sido ampliamente documentado (Johnson, 1992). Los productos de dichos protooncogenes son factores de transcripción que se unen a secuencias de DNA y regulan la transcripción de distintos genes que son expresados durante la transición G0-G1 o algo más tarde, en G1, y que regulan la progresión a través del ciclo celular. En cuanto a ras, recientes experimentos de microinyección con anticuerpos anti-ras han revelado un punto en la fase G1 tardía donde esta proteína es absolutamente necesaria para la progresión de células Balb/c 3T3 en el ciclo celular (Dobrowolski y col., 1994). Por otro lado, la activación de la proteína p21 ras se ha descrito como uno de los pasos claves en la vía de transducción de la insulina o IGF-1 que tiene lugar a los pocos minutos del tratamiento con dichas señales, y que es necesario para la estimulación de la expresión de genes tempranos como c-fos o c-jun por insulina (Burgering y col., 1991). La inducción de la expresión de H-ras en cultivos primarios de adipocitos marrones tanto a 4 como a 24 horas de tratamiento con IGF-1, así como el aumento en el contenido de p21-ras paralelo al de PCNA, una proteína directamente implicada en la replicación del DNA, ponen de manifiesto la importancia de la proteína ras en la vía mitogénica del IGF-1 en este sistema celular.

Todos los datos presentados nos llevan a proponer al IGF-1 como un mitógeno para los adipocitos marrones fetales en cultivo, siendo éste un proceso en el que parece estar implicada la proteína p21-ras.

4.3.- EL IGF-1 Y TAMBIEN LA INSULINA PRODUCEN DIFERENCIACION ADIPOGENICA Y TERMOGENICA DE LOS ADIPOCITOS MARRONES FETALES

El IGF-1, además de ser un factor de crecimiento que induce proliferación en una gran variedad de tipos celulares (entre los que podemos incluir los adipocitos marrones, como ha quedado demostrado en el apartado anterior), tiene también un papel claro en la diferenciación celular (Smith y col., 1988; Boney y col., 1994; Jones and Clemmons,

1995), por lo que nos planteamos estudiar el efecto del IGF-1 sobre la diferenciación tanto termogénica como adipogénica de los adipocitos marrones fetales en cultivo, llevando la insulina en paralelo como control positivo de diferenciación adipogénica. El sistema de cultivo utilizado para los estudios de diferenciación fue el mismo que para los estudios de proliferación: células sembradas y mantenidas 5 horas en medio conteniendo 10% FCS (tiempo 00) y posteriormente deprivadas 20 horas de suero (tiempo 0) antes de estimularlas con los factores.

4.3.1.- El IGF-1 induce la expresión de genes adipogénicos, aumenta el contenido lipídico y la incorporación de glucosa en adipocitos marrones fetales

En el apartado 2.1.2 de Antecedentes Bibliográficos se han descrito los cambios a nivel génico, morfológico y bioquímico que sufren los preadipocitos durante el proceso de diferenciación a adipocitos. Así, se inducen los genes que codifican para enzimas lipogénicas como la FAS, G3PD, EM así como el transportador de glucosa Glut 4. Estos mismos genes aumentan su expresión en el tejido adiposo marrón durante el último período de gestación, indicando un proceso de diferenciación adipogénica. Los adipocitos marrones fetales de 20 días en cultivo a tiempo 00 presentan niveles considerables de mRNA para la FAS y la G3PD, pero apenas expresan Glut 4 y PEPCK (Figura 9). Tras 20 horas en ausencia de suero la expresión de estos genes disminuyó o al menos no se modificó, a excepción de la PEPCK que se indujo espontáneamente a la largo del tiempo de cultivo. A partir de este momento, las células se incubaron 24 horas más en ausencia o presencia de IGF-1 (1.4 y 14 nM) o insulina (1 y 10 nM). La presencia de 1.4 nM IGF-1 produjo un aumento de 2 veces sobre la expresión de la FAS, comparando con células control. A la dosis de 14 nM el incremento fue de 5 veces, alcanzándose niveles incluso superiores a los de las células a tiempo 00. La respuesta a la insulina fue mayor tanto a concentración 1 nM (que produjo un aumento de 6 veces), como a 10 nM que incrementó 7 veces la expresión de la FAS. El IGF-1 también fue capaz de inducir la expresión de G3PD y de Glut 4 de forma dosis-dependiente, aumentando 1.8 y 2.5 veces los niveles de mRNA de la primera, y 3 y 4 veces los de Glut 4 a concentraciones 1.4 nM y 14 nM, respectivamente. En ambos casos la insulina fue más potente que el IGF-1, siendo su efecto también dependiente de la dosis. El IGF-1, al igual que la insulina, produjo efectos represores sobre la expresión de la PEPCK. Dando el valor de 100 a los niveles de PEPCK mRNA presentes en células control, el IGF-1 (1.4 nM) los disminuyó un 21%, mientras que la inhibición en respuesta a 14 nM IGF-1 fue del 60%. Los efectos de la insulina en este caso también fueron

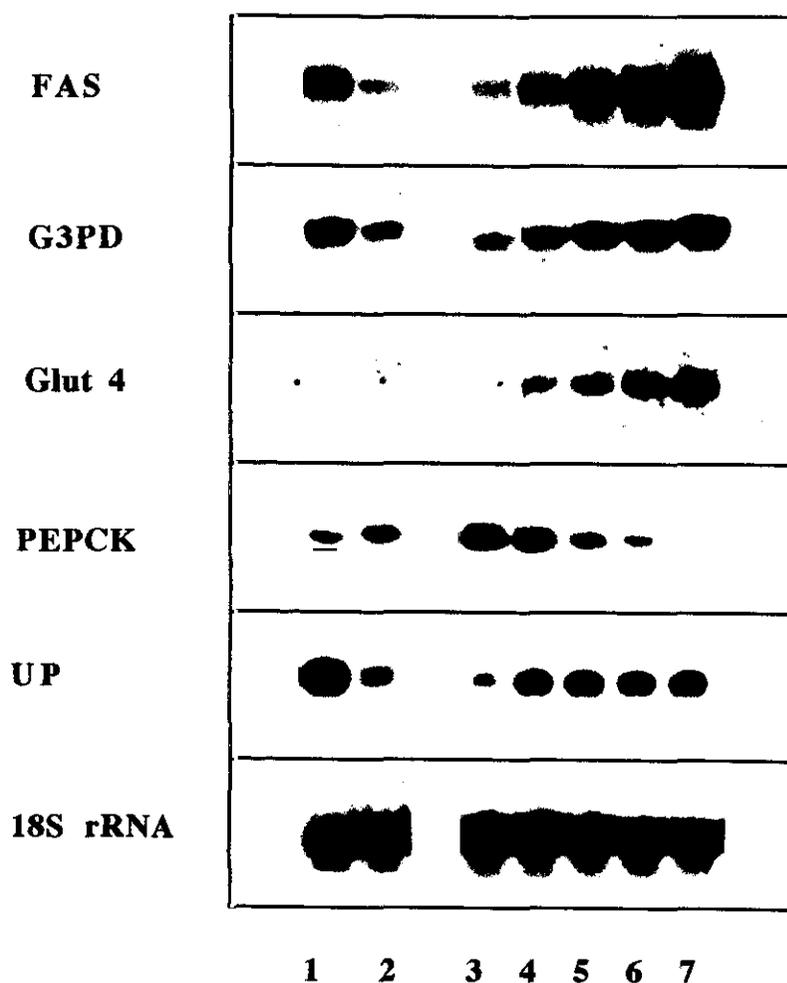


Figura 9.- Efectos del IGF-1 sobre la expresión de genes relacionados con la diferenciación adipogénica y termogénica: comparación con la insulina

Los adipocitos marrones fetales fueron sembrados y mantenidos 5 horas en medio 10% FCS (1). Posteriormente se les privó de suero 20 horas (2) y se les sometió a tratamiento durante 24 horas: células sin tratar (3), estimuladas con 1.4 nM IGF-1 (4), 14 nM IGF-1 (5), 1nM insulina (6) y 10 nM insulina (7). 15 μ g de RNA de cada condición se sometieron a análisis por Northern-blot, hibridándose con diferentes sondas. En la figura se muestran las correspondientes autorradiografías representativas.

mayores que los del IGF-1 (una disminución del 74% a la concentración 1 nM y del 90% a la de 10 nM).

IGF-1 por tanto es capaz de aumentar la expresión de FAS, G3PD y Glut 4 (todas ellas proteínas implicadas en la lipogénesis) aunque en menor grado que la insulina. La PEPCK es un enzima gliceroneogénica en adipocitos, que se considera un marcador muy tardío de diferenciación. La acción sobradamente conocida de la insulina sobre el gen de PEPCK es inhibitoria, habiéndose encontrado secuencias de respuesta a la hormona en el promotor de dicho gen (Beale y col., 1992). Los resultados presentados sobre la expresión de PEPCK en adipocitos marrones están en concordancia con la literatura existente y, puesto que las vías de transducción de insulina e IGF-1 son similares, y la PI 3-quinasa ha sido implicada en la regulación de la expresión de PEPCK por insulina (Sutherland y col., 1995), los efectos del IGF-1 podrían ser mediados a través de la misma vía de señalización.

Aunque la inducción de genes marcadores de adipogénesis es una prueba de la acción positiva del IGF-1 sobre el programa de diferenciación de los adipocitos marrones, es necesario apoyarla con manifestaciones fenotípicas que son consecuencia de los efectos a nivel génico. Una forma clara de monitorizar el proceso de diferenciación adipogénica es medir el contenido citoplasmático de lípidos mediante fluorescencia de Rojo Nilo. Según la intensidad de esta fluorescencia se pueden dividir las células en poblaciones de bajo, medio y alto contenido en lípidos citoplásmicos. El tratamiento de los adipocitos marrones con IGF-1 durante 48 horas produjo una disminución de 6 veces en el porcentaje de células con bajo contenido lipídico, mientras que triplicó el número de células que dieron alta fluorescencia de Rojo Nilo, sin apenas variar el porcentaje de células con contenido lipídico medio. Se puede decir, por tanto, que el IGF-1 produce un desplazamiento de la población celular hacia la zona de alta intensidad de fluorescencia, indicadora de mayor contenido citoplasmático de lípidos, de forma similar a como lo hace la insulina (Figura 10). Paralelamente a este incremento en el contenido lipídico se produce un aumento en la incorporación de glucosa (necesaria para la síntesis de ácidos grasos y triglicéridos) de 3 y 5 veces en respuesta a IGF-1 e insulina, respectivamente, tomando como control células sin tratar (Figura 11). Esta medida se realizó a largo plazo, es decir, de forma acumulativa durante las 24 horas de tratamiento, pudiendo deberse la incorporación de glucosa no sólo a la traslocación del transportador dependiente de insulina, Glut 4, a la membrana plasmática, sino también a la síntesis "de novo" de Glut 4 puesto que está aumentada su expresión génica. Asimismo, también podría estar interviniendo el otro transportador de glucosa descrito en adipocitos marrones: el Glut 1.

TRATAMIENTOS

% células con contenido lipídico	control	IGF-1	insulina
bajo	36	6	13,9
medio	45,5	47,5	34,3
alto	17,5	46,5	51,8

Figura 10.- IGF-1 e insulina aumentan el contenido lipídico de los adipocitos marrones fetales.

Células deprivadas de suero 20 horas fueron tratadas durante 48 horas con IGF-1 (1.4 nM) o insulina (1 nM) y comparadas con células sin estimular. Después de tñirlas con Rojo Nilo, se midió la fluorescencia de dicho colorante en el citómetro de flujo. Se muestra un experimento representativo con los porcentajes de las distintas poblaciones celulares (con alto, medio y bajo contenido lipídico) según la intensidad de fluorescencia emitida, tras los distintos tratamientos.

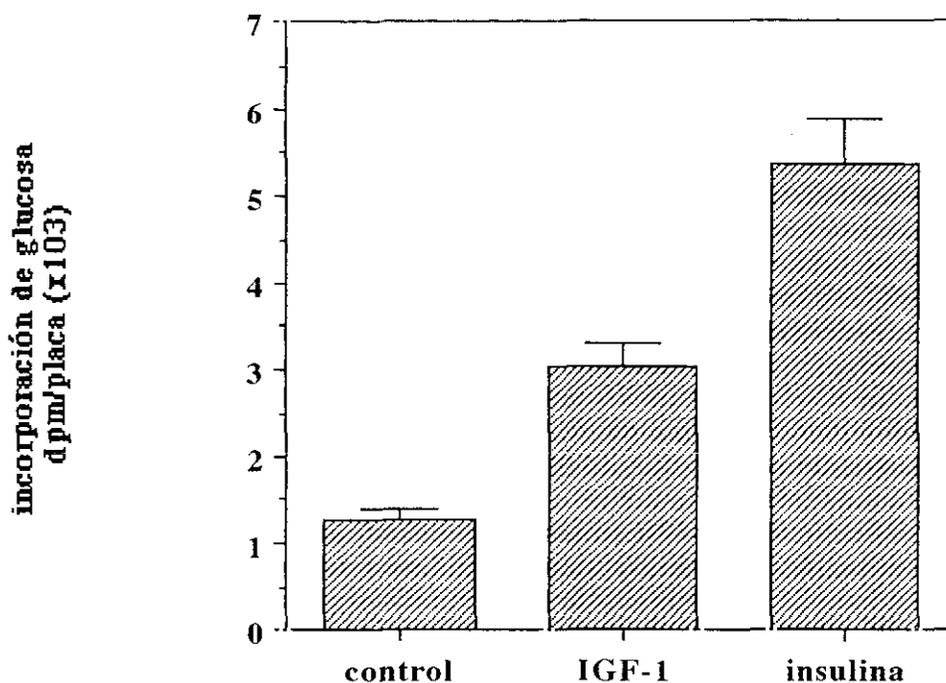


Figura 11.- IGF-1 e insulina aumentan la incorporación de glucosa en los adipocitos marrones fetales en cultivo

Para los estudios de incorporación de glucosa las células deprivadas de suero se incubaron durante 20 horas en medio de cultivo conteniendo 2-deoxi-D(1-³H)-glucosa, en ausencia o presencia de IGF-1 (1.4 nM) o insulina (1nM). Los resultados se expresan como dpm/placa (x10³) y son la media \pm S.E.M. de tres experimentos distintos.

4.3.2.- El IGF-1 y también la insulina aumentan la expresión de UP

El gen de la UP se estudió como marcador de diferenciación termogénica (Figura 9). Los adipocitos marrones fetales de 20 días a tiempo 00 de cultivo expresan considerables niveles de UP, que disminuyen tras 20 horas en ausencia de suero. El tratamiento con IGF-1 o insulina durante 24 horas consiguió elevar estos niveles. Sin embargo, a diferencia de los genes relacionados con la adipogénesis, la inducción de la expresión de UP fue similar en respuesta a IGF-1 o insulina a cualquiera de las dos concentraciones estudiadas (en todas las condiciones la inducción fue de 4 veces respecto a las células control).

4.3.3.- La inducción de la FAS y de la UP por IGF-1 o insulina es dependiente del tiempo siendo inhibida por la presencia de actinomicina D.

Con el fin de profundizar en la inducción de la expresión génica mediada por insulina e IGF-1, nos propusimos estudiar la FAS y la UP como marcadores de diferenciación adipogénica y termogénica, respectivamente. Para ello, realizamos un estudio de expresión de los mRNAs a lo largo del tiempo (Figuras 12 y 13). Los adipocitos marrones fueron incubados durante 1, 3, 6 y 24 horas en ausencia o presencia de IGF-1 (1.4 nM) o insulina (1nM). La inducción de ambos genes mediada tanto por IGF-1 como por insulina fue dependiente del tiempo, observándose ya efectos tras una hora de tratamiento. La insulina a cualquier tiempo fue más potente que el IGF-1 sobre la expresión de la FAS. Sin embargo, la insulina mostró efectos mayores que el IGF-1 sobre la expresión de UP a tiempos cortos, siendo similares a tiempos más largos.

La inducción tan temprana de los niveles de la FAS y de la UP hizo pensar en la posibilidad de un mecanismo a nivel transcripcional. Como un primer abordaje a este estudio nos planteamos la prueba indirecta de estimular las células con IGF-1 o insulina, habiéndolas tratado previamente con un inhibidor de la transcripción génica como es la actinomicina D. Otra señal que se incluyó en este estudio fue el dbAMPc, conocido activador transcripcional de la UP, que se llevó como control positivo sobre la expresión de UP (Figura 14). El pretratamiento con actinomicina D inhibió por completo la expresión de FAS. Sin embargo, la inhibición sobre la expresión de UP fue parcial, lo cual nos sugirió que posiblemente otros mecanismos postranscripcionales, tales como la estabilización del mensajero, también pudieran actuar sobre la expresión de este gen.

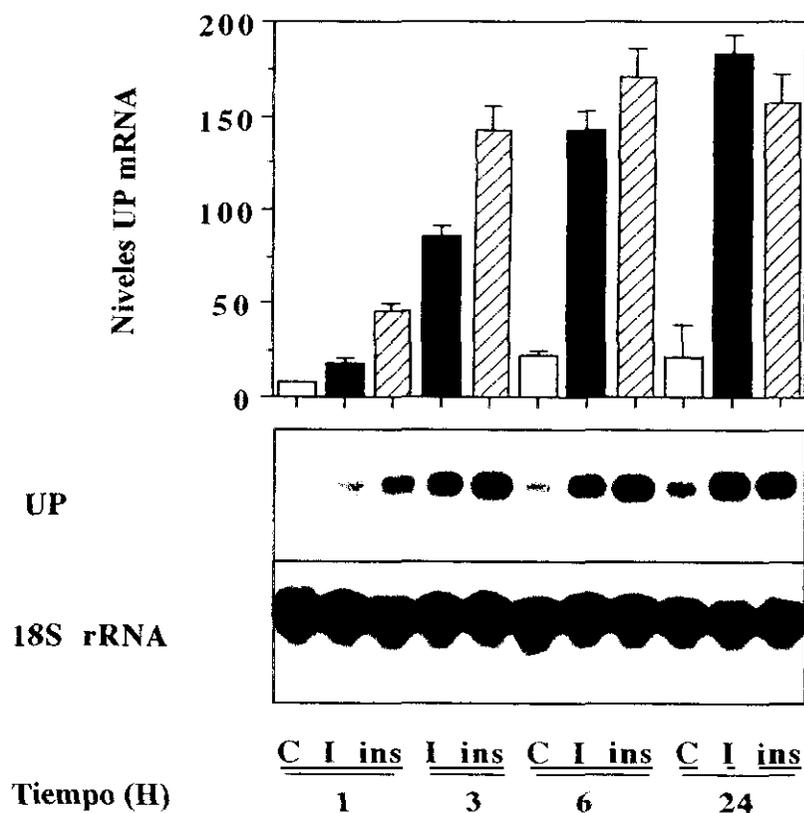


Figura 12.- Estudio de la inducción con el tiempo de los niveles de mRNA de la UP por IGF-1 e insulina

Los adipocitos marrones deprivados 20 horas de suero fueron estimulados con 1.4 nM IGF-1 (I) o 1 nM insulina (ins) durante 1, 3, 6, y 24 horas y comparados con células control. Se muestra una autorradiografía representativa, así como los niveles de UP en unidades arbitrarias después de normalizar con el RNA ribosomal 18S. Los resultados son la media \pm S.E.M. de tres experimentos.

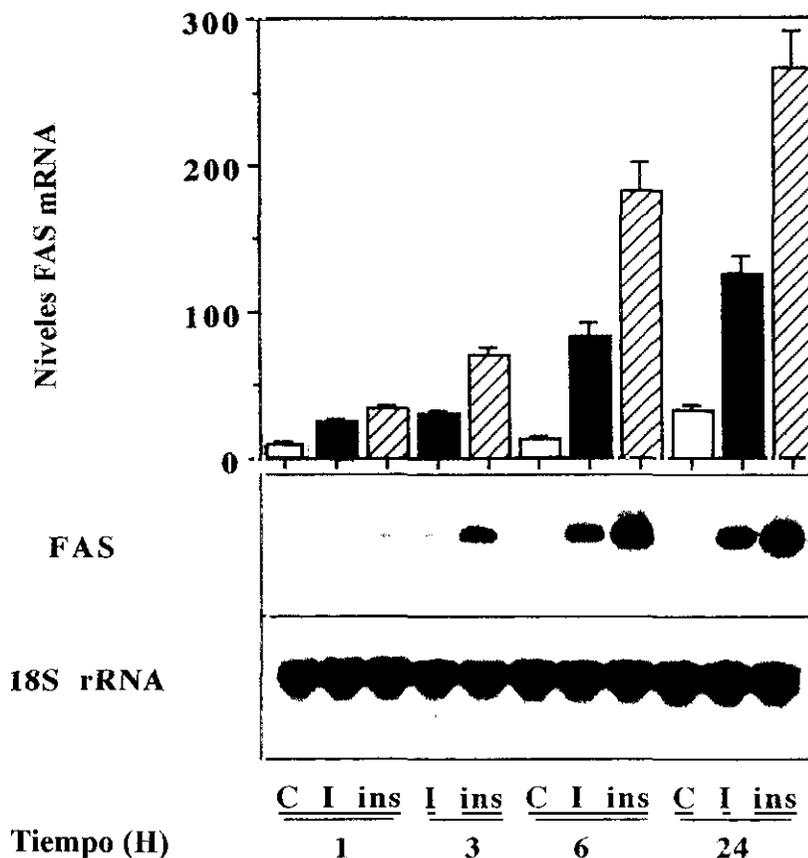


Figura 13.- Estudio de la inducción con el tiempo de los niveles del mRNA de la FAS por IGF-1 e insulina

Los adipocitos marrones fueron tratados durante 1, 3, 6, y 24 horas con 1.4 nM IGF-1 (I) o 1 nM de insulina (ins), o se mantuvieron en ausencia de señales externas (C). Se muestra una autorradiografía representativa, así como los niveles de FAS en unidades arbitrarias tras normalización con RNA ribosomal 18S. Los resultados son la media \pm S.E.M. de tres experimentos distintos.

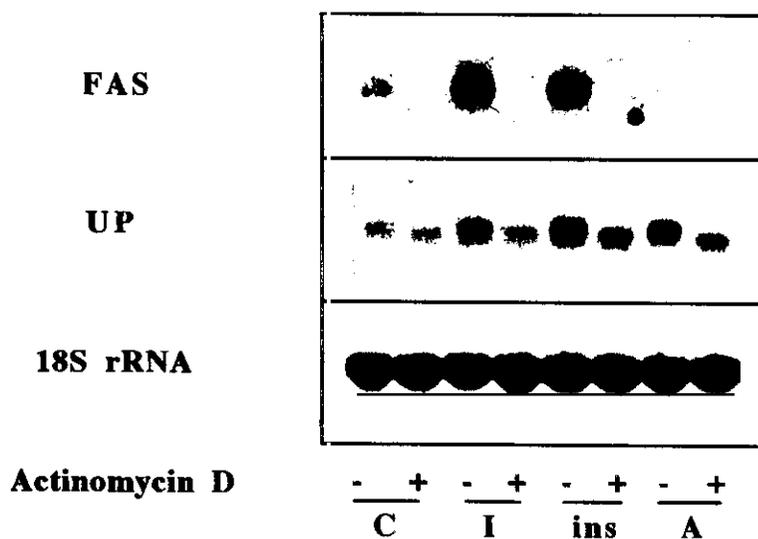


Figura 14.- Efecto de la Actinomicina D sobre la inducción de la expresión de los mRNAs de UP y FAS por IGF-1 e insulina

Los adipocitos marrones deprivados de suero durante 20 horas sufrieron un pretratamiento de 14 horas con actinomicina D ($5 \mu\text{g/ml}$) antes de ser estimulados durante 5 horas con 1.4 nM IGF-1 (I), 1 nM insulina (ins) ó 0.5 mM dbAMPc (A), o permanecer en ausencia de señales adicionales (C). Se aisló el RNA total de cada condición, así como de células estimuladas o no con IGF-1, insulina o dbAMPc sin haber sido previamente sometidas a tratamiento con actinomicina. Se muestran Northern-blot representativos tras hibridación con las sondas radiactivas de FAS y de UP.

4.3.4.- El IGF-1 y también la insulina aumentan la transcripción "in vitro" de FAS y de UP

Los ensayos de transcripción "in vitro" (Figura 15) en núcleos aislados a partir de células incubadas en ausencia o presencia de IGF-1 o insulina durante 2 horas, muestran un aumento de 3 veces en la velocidad de transcripción del gen de la FAS en respuesta a IGF-1, al compararla con la de las células sin tratar. La estimulación con insulina produjo un aumento de 5 veces en la transcripción de dicho gen. En el caso de la UP, las células estimuladas tanto con IGF-1 como con insulina presentaron niveles de transcripción similares a los inducidos por dbAMPc (3 veces superiores a los de las células no tratadas).

Resumiendo todos los datos presentados en este apartado podemos decir que el IGF-1 produce diferenciación adipogénica de los adipocitos marrones fetales en cultivo, induciendo la expresión de genes relacionados con la lipogénesis, tales como la FAS, la G3PD y el Glut 4, lo cual conduce a un aumento en la captación de glucosa y en el contenido citoplasmático de lípidos. Los efectos sobre la expresión de FAS se producen a nivel transcripcional, de igual forma que en respuesta a insulina, para la cual se han descrito elementos de respuesta en el promotor de dicho gen (Moustaid y col., 1994). Sobre el programa de diferenciación termogénica, tanto IGF-1 como insulina son capaces de inducir la expresión de UP de forma similar al dbAMPc, debiéndose este efecto, al menos en parte, a un aumento en la velocidad de transcripción del gen.

A la vista de los resultados obtenidos se puede concluir que el IGF-1 es una señal importante en el desarrollo del BAT, capaz de inducir la proliferación y la diferenciación en cultivos primarios de adipocitos marrones fetales. Aunque dichos procesos se consideran mutuamente excluyentes, existen trabajos que describen efectos duales del IGF-1 sobre proliferación y diferenciación de mioblastos (Quinn y col., 1994) y de adipocitos 3T3-L1 (Weiland y col., 1991). En los últimos años se ha puesto de manifiesto la importancia de la proteína ras en la ruta de transducción del IGF-1, tanto en procesos de proliferación como de diferenciación. En adipocitos marrones el IGF-1 aumenta la expresión de H-ras así como los niveles de proteína p21-ras, sugiriéndose un papel clave para esta proteína en la inducción de ambos procesos.

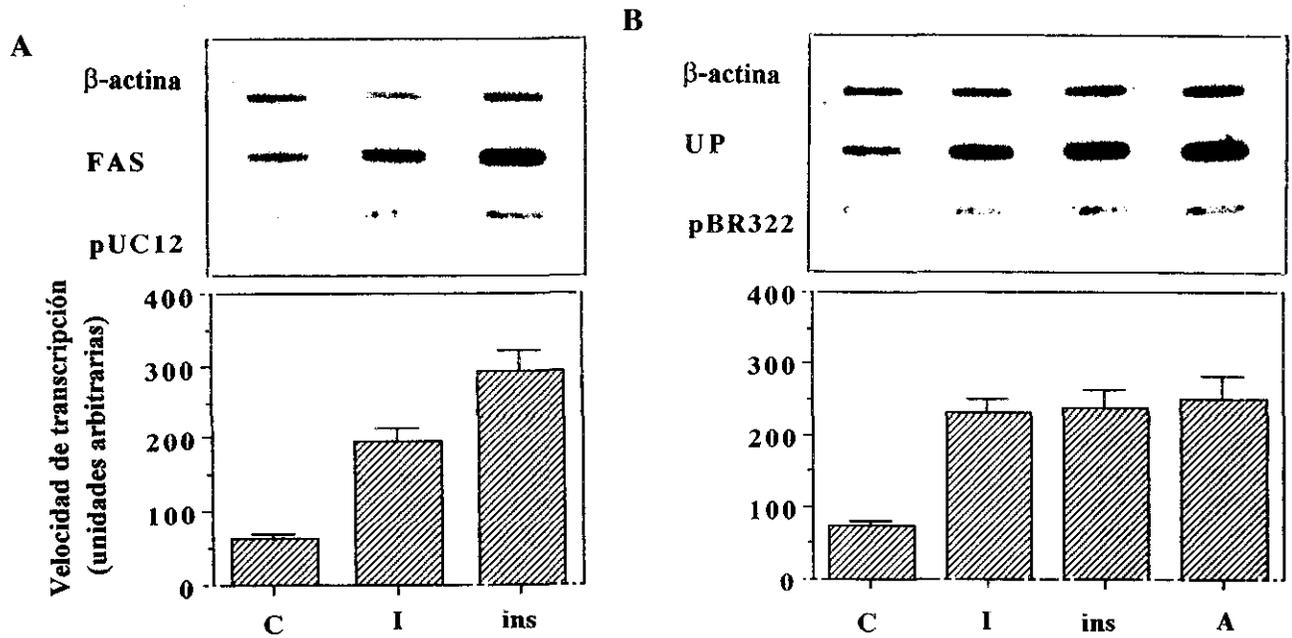


Figura 15.- Aumento de la velocidad de transcripción del gen de la UP y de la FAS en adipocitos marrones en presencia de IGF-1 o insulina

Los adipocitos marrones deprivados 20 horas de suero fueron mantenidos en ausencia de señales (C), o estimulados con 1.4 nM IGF-1 (I), 1 nM insulina (ins) ó dbAMPc 0.5 mM (A) durante 2 horas. Se aislaron núcleos de cada condición y con ellos se realizaron ensayos de transcripción “in vitro” e hibridaciones con 2 μ g de cada DNA fijados en membranas de nylon, tal como se describe en Material y Métodos. En los paneles superiores se muestran autorradiografías representativas, y en los paneles inferiores la representación de las medias de los niveles de transcripción en unidades arbitrarias tras la lectura densitométrica de tres experimentos \pm S.E.M. A la lectura de todas las bandas se les restó la lectura del plásmido portador de las sondas (pUC12 en el caso de la FAS) y (pBR322 en el de la UP) y se normalizó con la correspondiente señal de β -actina.

4.4.- TNF- α INHIBE LA DIFERENCIACION ADIPOGENICA INDUCIDA POR INSULINA O IGF-1

Hasta aquí, se han estudiado señales positivas en relación con la diferenciación de los adipocitos marrones fetales. Sin embargo, el desarrollo de un tejido se produce no sólo en función de señales que actúan positivamente sobre el proceso, sino también de factores que lo inhiben. La diferenciación adipogénica es claramente inhibida por el TNF- α (Torti y col., 1989; William y col., 1992), un factor que además se ha demostrado produce resistencia a la acción de la insulina (Hotamisligil y col., 1993), por lo que nos planteamos estudiar el efecto de esta citoquina sobre la diferenciación adipogénica inducida por insulina o IGF-1 en adipocitos marrones fetales.

4.4.1.- El TNF- α inhibe la inducción de genes adipogénicos, la acumulación de lípidos y la incorporación de glucosa estimulada por insulina o IGF-1

En el apartado 4.3.1 hemos descrito un aumento en la expresión de la FAS, la G3PD y el Glut 4 en los adipocitos marrones fetales de 20 días en cultivo tratados durante 24 horas con IGF-1 o insulina, así como un incremento en el contenido de lípidos y en la incorporación de glucosa en respuesta a cualquiera de las dos señales. Para estudiar los efectos del TNF- α sobre la diferenciación adipogénica inducida por IGF-1 o insulina, las células fueron sembradas y privadas de suero durante 20 horas, manteniéndolas a continuación otras 24 horas en presencia o ausencia de IGF-1 (1.4 nM) o insulina (1 nM), siendo comparadas frente a células sometidas a los mismos tratamientos, pero en presencia de TNF- α (10 ng/ml).

Estudiamos el efecto del TNF- α , en primer lugar, sobre la expresión de genes relacionados con adipogénesis (Figura 16). La presencia de TNF- α disminuyó un 75% y un 50% los niveles del mRNA de la FAS inducidos por IGF-1 e insulina, respectivamente. Porcentajes similares de inhibición fueron observados sobre la expresión de la G3PD y del transportador de glucosa Glut 4 (Figura 17), todos ellos genes implicados en la diferenciación adipogénica de los adipocitos marrones. Sin embargo, el TNF- α no produjo efecto alguno sobre la expresión génica de PEPCK mediada por IGF-1 o insulina, aunque “*per se*” también fue capaz de disminuir los niveles del mRNA de la PEPCK encontrados en las células control (Figura 16).

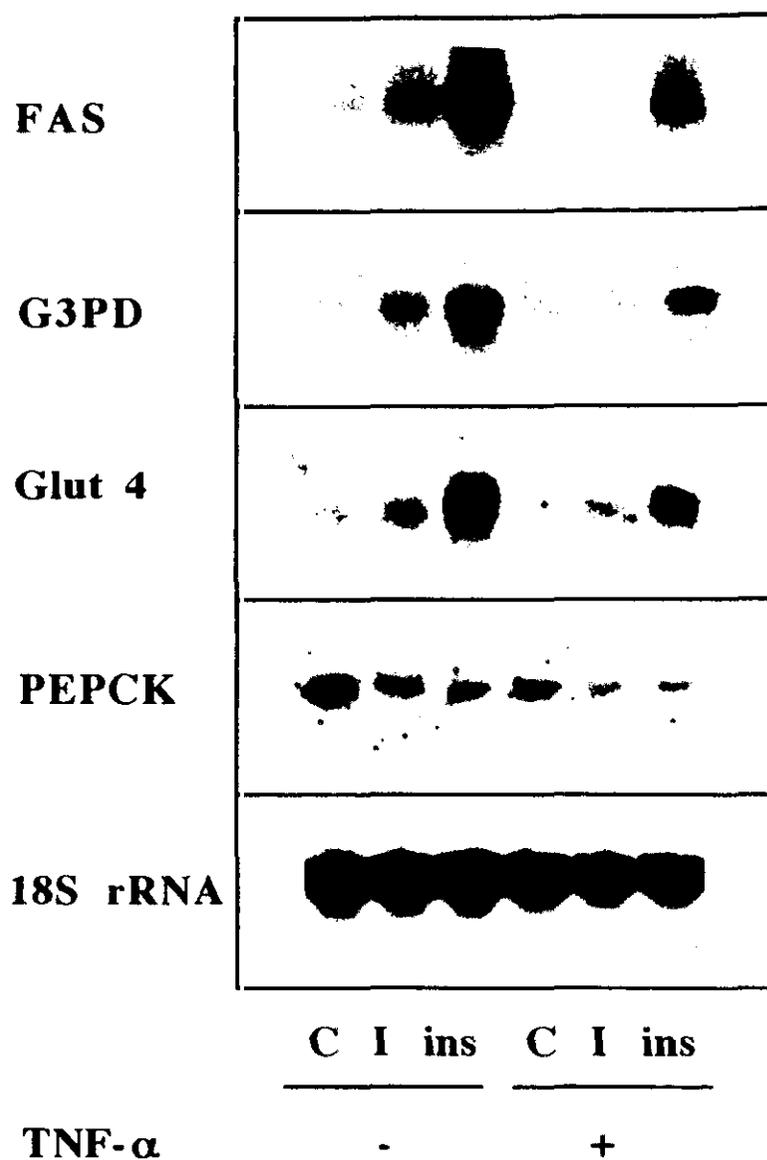


Figura 16.- Efectos inhibidores del TNF- α sobre la expresión de genes implicados en la diferenciación adipogénica de los adipocitos marrones

Los adipocitos marrones procedentes de fetos de 20 días fueron incubados 20 horas en medio sin suero, y posteriormente 24 horas más en presencia o ausencia de IGF-1 (1.4 nM) o insulina (1nM) y /o TNF- α (0.6 nM). 15 μ g de RNA total de cada condición fueron sometidos al análisis del Northern-blot, hibridándose con sucesivos cDNAs marcados radiactivamente. Se muestran autorradiografías representativas.

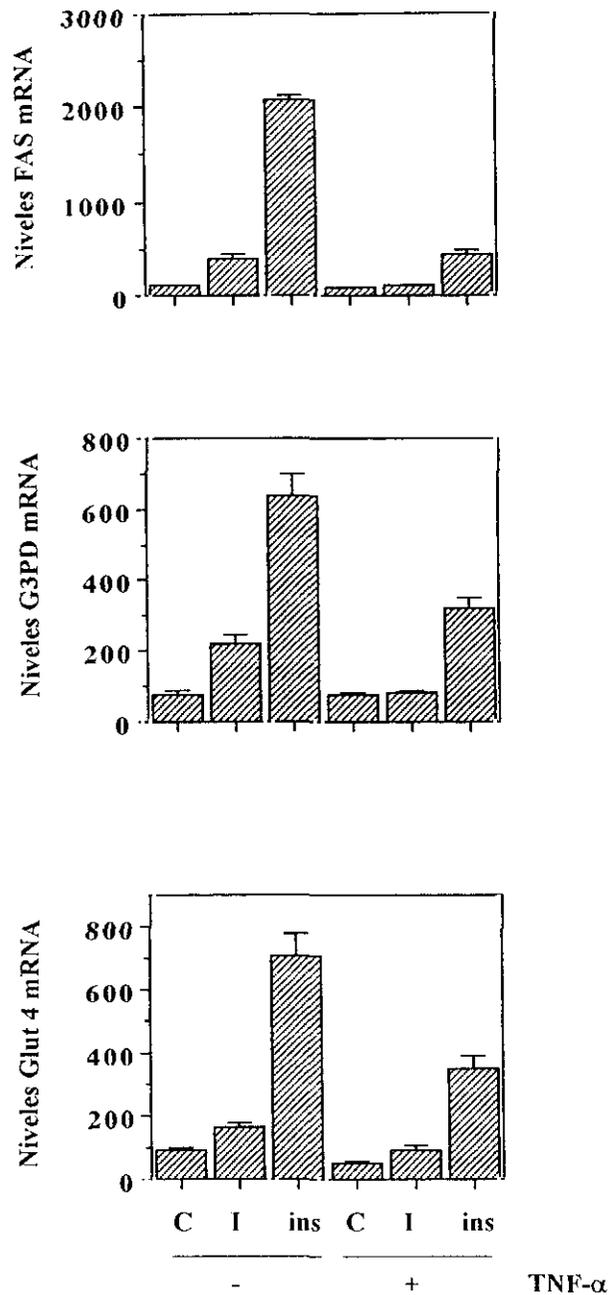


Figura 17.- Análisis densitométrico de los niveles de mRNAs modulados por TNF- α

Las autorradiografías de la Figura 16 fueron sometidas a análisis densitométrico. Los resultados se expresan como unidades arbitrarias después de normalizar con el RNA ribosomal 18S, y son media \pm S.E.M. de tres experimentos diferentes.

Además de genes relacionados con adipogénesis, también quisimos estudiar cómo afectaba el TNF- α a la expresión del marcador de diferenciación termogénica de los adipocitos marrones, la UP, encontrando que la presencia de dicha citoquina no modifica o en todo caso aumenta levemente tanto los niveles de UP inducidos por IGF-1 o insulina como los de las células control (Figura 18).

Aunque el TNF- α mostró efectos inhibidores sobre la inducción de genes lipogénicos mediada tanto por IGF-1 como por insulina, nuestra atención se centró en los efectos de dicha citoquina sobre la acción de la insulina, ya que los efectos de esta hormona sobre la diferenciación adipogénica de los adipocitos marrones son más potentes que los del IGF-1, y además existía abundante literatura que implicaba al TNF- α en fenómenos de resistencia a la acción de la insulina. Para ello, estudiamos otros parámetros relacionados con la diferenciación adipogénica, tales como el contenido en lípidos citoplasmáticos y el transporte de glucosa. Las células sin estimular o tratadas 24 horas con insulina en ausencia o presencia de TNF- α fueron teñidas con Rojo Nilo, y la fluorescencia emitida por dicho colorante se determinó en un citómetro de flujo. En la Figura 19 se muestra un experimento representativo con las medias de intensidad de fluorescencia indicadoras del contenido de lípidos citoplasmáticos en cada condición. Como puede apreciarse, la presencia de TNF- α produjo una inhibición del 40% sobre la acumulación de lípidos citoplasmáticos inducida por insulina.

Aunque los efectos de la insulina sobre la incorporación de glucosa los hemos visto en el apartado 4.3.1 a largo plazo y de forma acumulada, para estudiar el efecto del TNF- α sobre el transporte de glucosa inducido por insulina debido a la traslocación de Glut 4 nos planteamos una estimulación puntual con insulina, de 10 minutos, habiendo pretratado o no las células con TNF- α . Como se muestra en la Figura 20A, el pretratamiento con TNF- α produjo un ligero aumento en el transporte basal de glucosa, seguramente debido al transportador Glut 1, con una disminución paralela en la capacidad de la insulina para estimular el transporte adicional de glucosa, dando como resultado una inhibición del 60% en el transporte de glucosa inducido por insulina 1 nM, y del 40% en el estimulado por insulina 10 y 100 nM (Figura 20B).

Todos los datos presentados hasta ahora demuestran que el TNF- α es capaz de inhibir el proceso de diferenciación adipogénica en adipocitos marrones fetales, impidiendo la inducción de genes lipogénicos mediada por IGF-1 o insulina, así como la acumulación de lípidos y el transporte de glucosa inducidos por insulina.

Aunque las vías de transducción del TNF- α todavía no están bien definidas, estudios recientes han demostrado que esta citoquina interfiere con la señalización de la insulina inhibiendo la fosforilación en tirosina del receptor y de su principal sustrato citosólico: el IRS-1 (Feinstein y col., 1993; Hotamisligil y col., 1994).

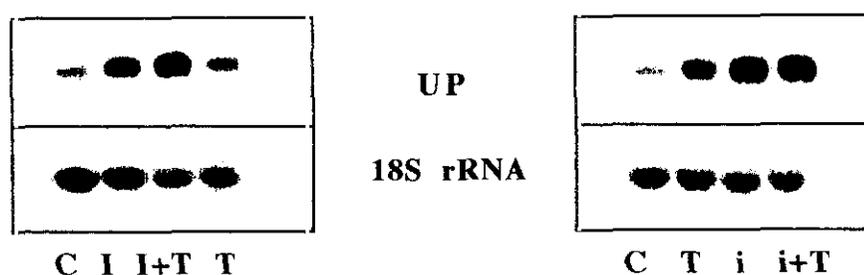


Figura 18.- Efectos del TNF- α sobre la expresión de la UP

Los adipocitos marrones deprivados de suero 20 horas fueron incubados durante 24 horas en ausencia de señales (C) o estimuladas con TNF- α 0.6 nM (T), insulina 1 nM (i), IGF-1 1.4 nM (I), TNF- α +insulina (i+T) o TNF- α +IGF-1 (I+T). 15 μ g de RNA total de cada condición fueron sometidos a análisis por Northern-blot e hibridados con el cDNA de la UP, marcado radiactivamente. Se muestran autorradiografías representativas.

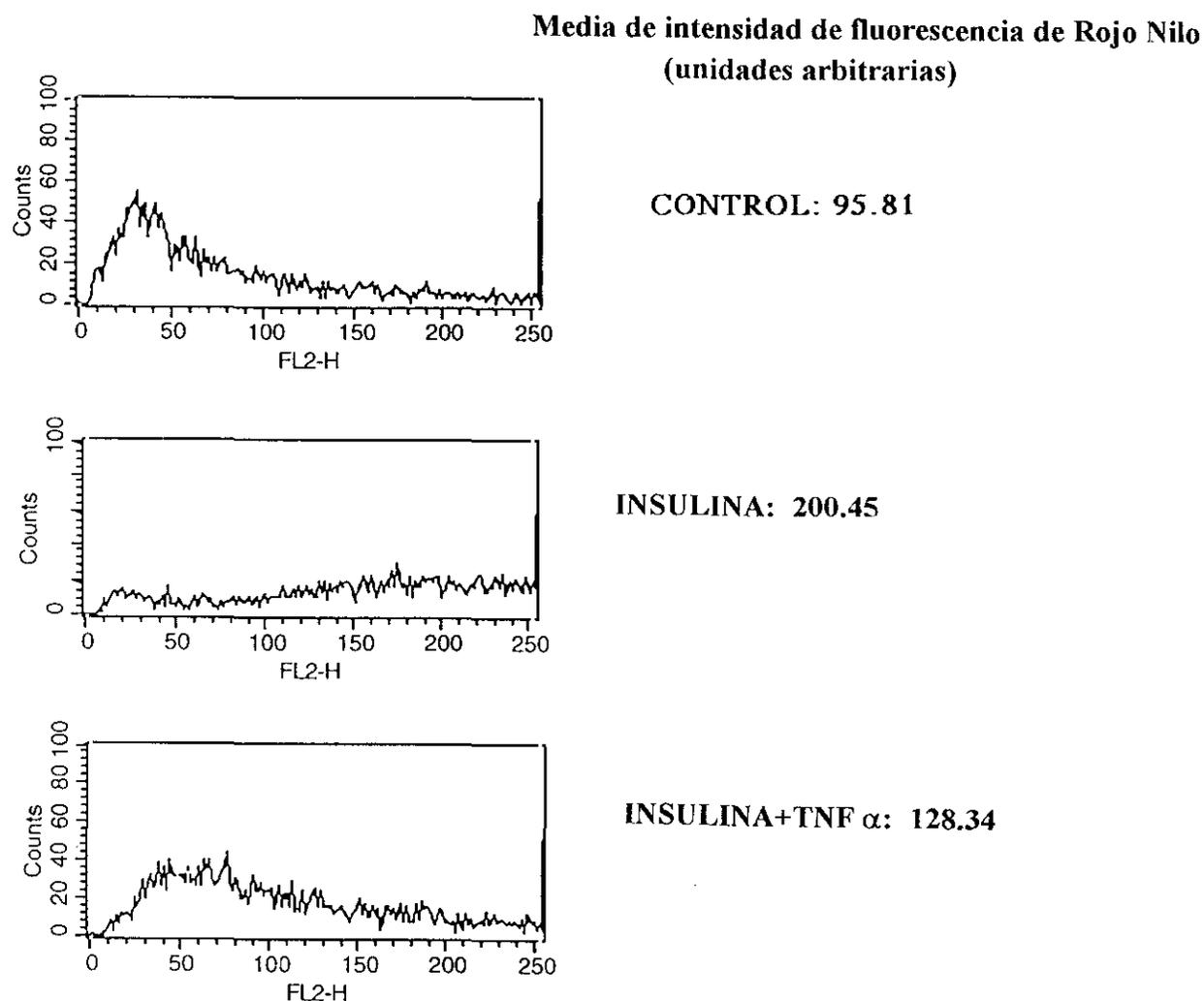


Figura 19.- TNF- α impide la acumulación de lípidos inducida por insulina

Los adipocitos marrones quiescentes fueron tratados con o sin insulina (1 nM), en presencia o ausencia de TNF- α durante 24 horas. El contenido de lípidos citoplasmáticos se determinó mediante la tinción con Rojo Nilo y la medida de la fluorescencia emitida en un citómetro de flujo. Se muestra un experimento representativo con las medias de las intensidades de fluorescencia expresadas como unidades arbitrarias

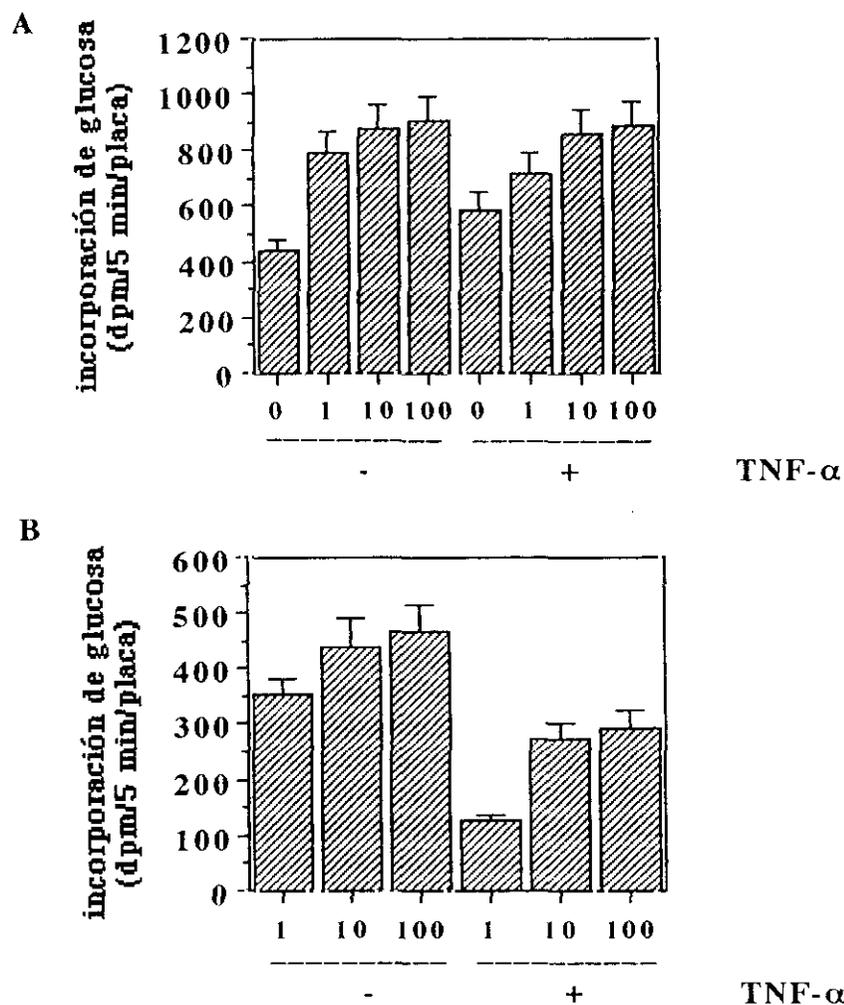


Figura 20.- El TNF- α inhibe el transporte de glucosa inducido por insulina en los adipocitos marrones en cultivo.

Los adipocitos marrones fetales quiescentes fueron incubados durante 20 horas en presencia o ausencia de TNF- α (0.6 nM), y posteriormente fueron estimulados con distintas dosis de insulina (0, 1, 10, y 100 nM), procediéndose a medir a continuación la incorporación de 2-deoxy-D (1- ^3H)-glucosa durante 5 minutos. En el panel A se representa la incorporación de glucosa (dpm/placa) de cada condición, y en el panel B el transporte de glucosa inducido por insulina a las distintas dosis (dpm de ^3H -glucosa incorporados/placa, después de restar el transporte basal, que corresponde a la glucosa incorporada en ausencia de insulina).

Por ello, nos propusimos estudiar si los efectos inhibitorios que veíamos del TNF- α sobre las acciones adipogénicas de la insulina en adipocitos marrones se debían al bloqueo en algún punto de la vía de transducción de la insulina.

4.4.2.- El TNF- α bloquea la acción de la insulina inhibiendo la fosforilación del receptor

El primer paso en la vía de señalización de la insulina tras su unión con el receptor, es la estimulación de la actividad tirosina quinasa del mismo que conduce a la autofosforilación en residuos de tirosina de la cadena β del receptor.

Para estudiar el efecto del TNF- α sobre la fosforilación del receptor de la insulina en los adipocitos marrones fetales, las células privadas de suero fueron pretratadas con TNF- α durante 20 horas antes de estimularlas 10 minutos con insulina. Realizamos inmunoprecipitaciones con el anticuerpo dirigido contra la cadena β del receptor de la insulina y con dichos inmunoprecipitados se llevaron a cabo dos tipos de ensayos: ensayos de Western-blot con anticuerpos anti-fosfotirosina (Figura 21) y ensayos de actividad quinasa "in vitro" (Figura 22). El primero revela los niveles de fosforilación de la cadena β del receptor y el segundo la actividad autofosforilante del receptor. En ambos ensayos pudimos apreciar que en células pretratadas con TNF- α se producía una inhibición del 45% en la fosforilación de la cadena β inducida por insulina, pudiendo ser éste un mecanismo por el cual el TNF- α ejerza su efecto antiadipogénico en relación con la insulina.

Por otro lado, el TNF- α , a través de su propia vía de señalización, podría estar activando segundos mensajeros que serían responsables de los efectos "*per se*" de la citoquina, tales como el aumento en el transporte basal de glucosa, la represión de la PEPCK y los efectos inductores sobre la expresión de UP.

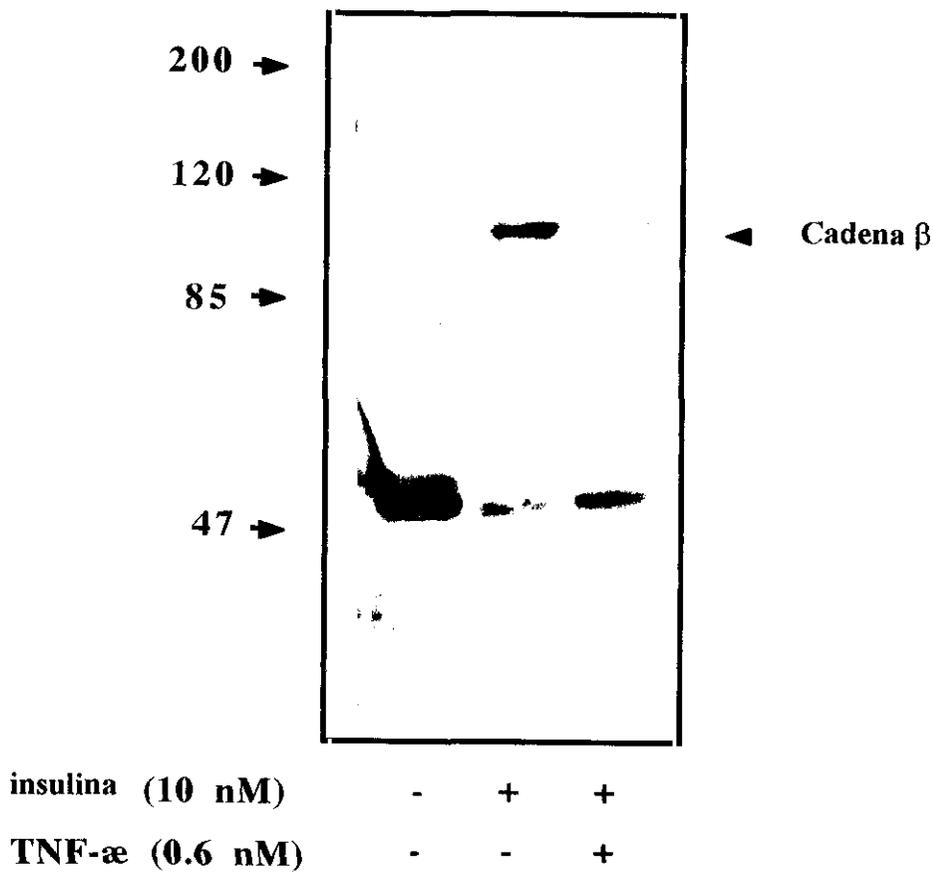


Figura 21.- El TNF- α inhibe la fosforilación en tirosina de la cadena β del receptor de la insulina

Los adipocitos marrones fetales cultivados 20 horas en ausencia o presencia de TNF- α (0.6 nM) fueron estimulados durante 5 minutos con o sin insulina 10 nM. 600 μ g de proteína total de cada condición fueron inmunoprecipitados con el anticuerpo anti-cadena β del receptor de la insulina, sometidos a electroforesis en geles 8% SDS-PAGE y analizados mediante Western-blot con anticuerpos anti-Tyr(P).

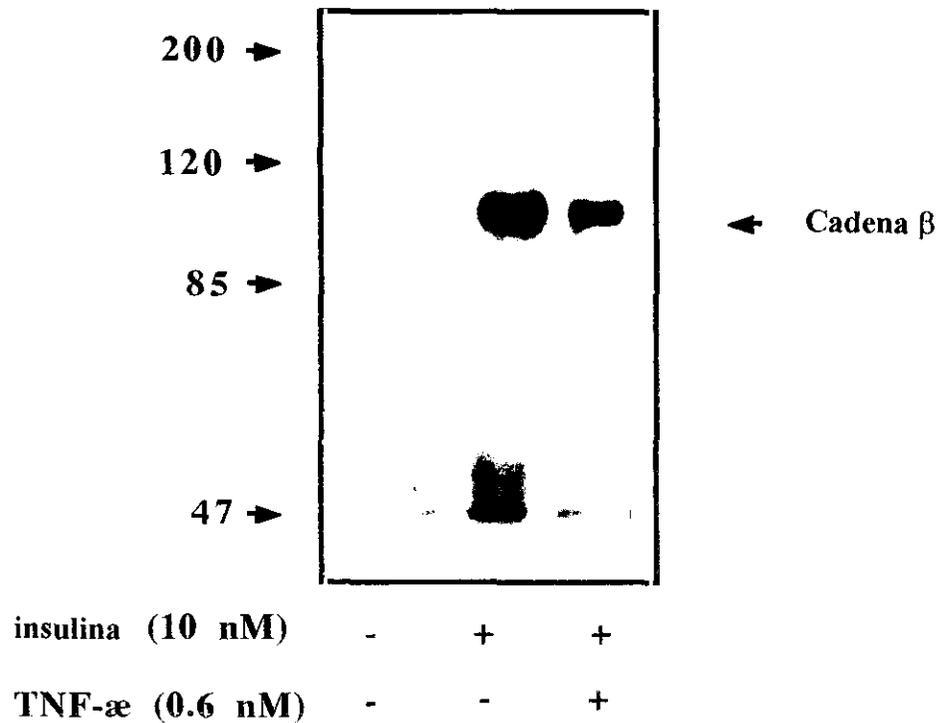


Figura 22.- Efectos del TNF- α sobre la actividad quinasa del receptor de la insulina

Las células se sometieron al mismo tratamiento que en la Figura 21. 600 μ g de proteína total de cada condición fueron inmunoprecipitados con el anticuerpo anti-cadena β del receptor de la insulina, realizándose un ensayo de actividad quinasa "in vitro" en dichos inmunoprecipitados. Se muestra una autorradiografía representativa donde se aprecia la autofosforilación de la cadena β del receptor de la insulina tras el ensayo quinasa y posterior electroforesis.

4.5.- EL TGF- β INDUCE MITOGENESIS EN ADIPOCITOS MARRONES FETALES EN CULTIVO

Además del IGF-1, al que por los resultados presentados en apartados anteriores se le propone como una señal importante en el desarrollo del BAT durante el período fetal, otros factores de crecimiento como el TGF- β podrían estar también implicados. El TGF- β pertenece a una superfamilia de factores multifuncionales que presenta una gran variedad de efectos, incluyendo la estimulación/inhibición del crecimiento y diferenciación celular. Es expresado por tejidos mesenquimáticos y hematopoyéticos durante el desarrollo fetal, y actúa a través de receptores específicos que han sido identificados en células de una gran variedad de tejidos: conectivo, epitelial, condrogénico, miogénico, hematopoyético y adipogénico. Por todo ello, nos propusimos estudiar la posibilidad de que los adipocitos marrones fetales presentaran receptores para TGF- β en su superficie que les capacitara para responder a dicho factor, así como estudiar los efectos de TGF- β sobre los procesos de proliferación y diferenciación de estas células.

4.5.1.- Los adipocitos marrones fetales presentan varios tipos de receptores para TGF- β , al que unen con alta afinidad

Los adipocitos marrones fetales de 20 días en cultivo presentan en su superficie 13.600 ± 1.600 sitios de unión para el TGF- β , al que ligan con muy alta afinidad ($K_d = 52.6 \pm 4.0$ pM). Dichos datos han sido calculados por análisis de Scatchard a partir de la curva de saturación representada en la Figura 23A. Estudios de unión irreversible con (^{125}I)-TGF- β revelaron la existencia de los receptores tipo I, II y III como las principales especies presentes en los adipocitos marrones, así como la presencia de una especie minoritaria que mostró un tamaño de aproximadamente 140 kDa, similar a la isoforma de 135 kDa descrita en fibroblastos de ratón 3T3-L1 (Igotz y Massagué, 1985) (Figura 23B). Todos estos datos apuntan hacia el TGF- β como una señal que, de manera autocrina/paracrina, podría estar actuando sobre el BAT durante el desarrollo fetal.

4.5.2.- El TGF- β aumenta la síntesis de DNA, el porcentaje de células en fases S y G2/M del ciclo celular y el número de células

Para estudiar los efectos del TGF- β sobre la proliferación de adipocitos marrones se siguió el mismo esquema de cultivo que en el caso del IGF-1. Las células se sembraban a baja densidad (10×10^5 células/placa de 60 mm de diámetro) en medio MEM suplementado

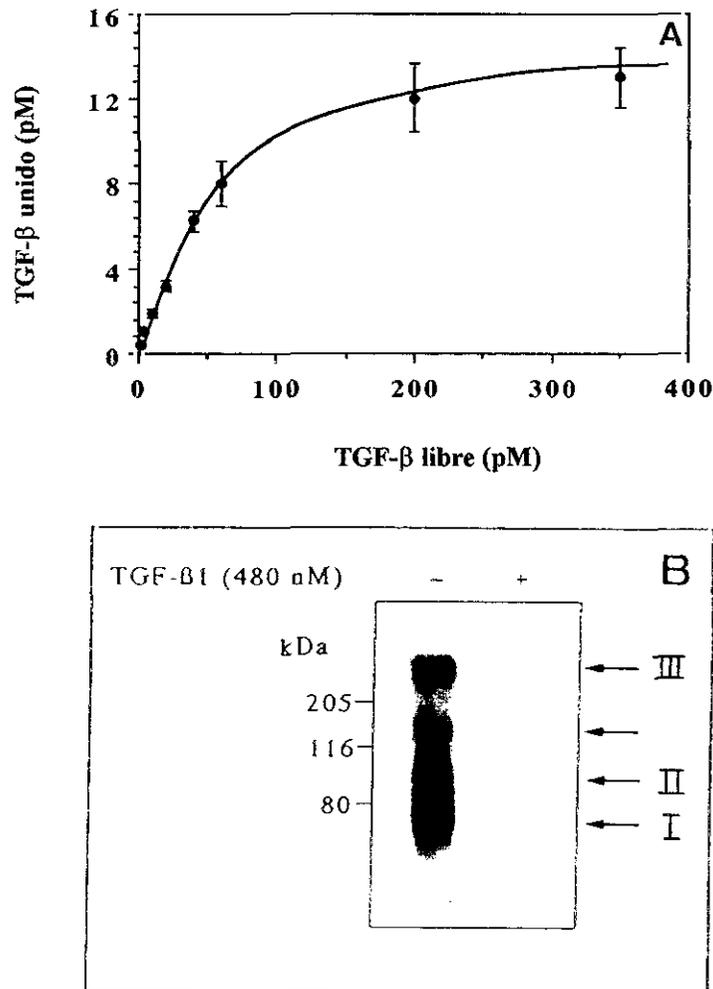


Figura 23.- Caracterización del sistema de receptores para TGF- β en los adipocitos marrones fetales

(A) Después de mantener los adipocitos marrones 20 horas en ausencia de suero, éstos fueron incubados durante 3 horas a 20°C con (^{125}I)-TGF- β en ausencia o presencia de concentraciones crecientes de TGF- β frío para los estudios de desplazamiento, tal y como se indica en el apartado 3.8.1 de Material y métodos. La gráfica representa al TGF- β unido frente al ligando libre (medias \pm S.E.M. de tres experimentos diferentes). (B) Para los experimentos de unión irreversible, las células deprivadas de suero durante 20 horas fueron incubadas durante 3 horas con (^{125}I)-TGF- β en ausencia o presencia de un exceso de ligando frío, tal y como se describe en la sección 3.8.2 de Material y métodos. Se muestra un experimento representativo de tres, donde las flechas indican las diferentes especies moleculares de los receptores de TGF- β .

con 10% FCS durante 5 horas, tiempo necesario para la adhesión al plato. A continuación, se lavaban las placas dos veces con PBS con objeto de eliminar las células hematopoyéticas y los adipocitos no adheridos a la placa de cultivo, con lo cual quedaban aproximadamente el 60% del total de las células sembradas (tiempo 00 de cultivo). Posteriormente, se incubaban las células remanentes durante 20 horas en ausencia de suero (tiempo 0 de cultivo), período de tiempo en el que se pierden alrededor del 24% de células. A partir de este momento las células eran mantenidas en ausencia de señales o estimuladas con TGF- β u otros factores mitogénicos conocidos.

Puesto que el TGF- β presenta efectos tanto estimuladores como inhibidores del crecimiento dependiendo del tipo celular, el primer paso fue determinar si en nuestro sistema los efectos del TGF- β sobre la proliferación eran positivos o negativos, midiendo la incorporación de (3 H)-Timidina a síntesis de DNA en presencia de distintas concentraciones del factor. Los adipocitos marrones quiescentes tratados durante 24 horas con TGF- β aumentaron la incorporación de (3 H)-Timidina en comparación con células control. Los mayores efectos se obtuvieron a la concentración de 1 pM en los estudios de dosis-respuesta (Figura 24, panel superior), por lo que esta concentración fue la utilizada en todos los experimentos posteriores. El potencial mitogénico del TGF- β en adipocitos marrones se comparó con el de otros mitógenos ya conocidos para estas células (Figura 24, panel inferior). El TGF- β aumentó 6 veces la incorporación de (3 H)-Timidina, siendo este efecto similar al producido por el 10% FCS y superior al del IGF-1 (1.4 nM). La combinación de TGF- β e IGF-1 no produjo efectos sinérgicos sobre la síntesis de DNA.

Para estudiar en profundidad los efectos positivos del TGF- β sobre el crecimiento de adipocitos marrones fetales en cultivo se determinaron a dos tiempos (24 y 48 horas de estimulación) varios parámetros relacionados con la proliferación. La incorporación de (3 H)-Timidina se vió significativamente incrementada por la presencia de TGF- β (1pM) durante 24 y 48 horas (6 y 9 veces, respectivamente comparando con células control). Paralelamente a este aumento en la síntesis de DNA, el porcentaje de células en fases S+G2/M del ciclo celular también fue mayor en células tratadas 24 y 48 horas con TGF- β que en adipocitos marrones no estimulados (1.5 y 3.2 veces respectivamente). En cuanto al número de células, TGF- β incrementó 1.8 veces a 24 horas y 3 veces a 48 horas el número de células/placa comparando con células quiescentes no tratadas a los mismos tiempos de cultivo. Todos los efectos del TGF- β sobre los parámetros estudiados: incorporación de (3 H)-Timidina a DNA, porcentaje de células en fases S+G2/M del ciclo celular y número de células, fueron similares a los producidos por el 10% FCS (control positivo de proliferación) y se muestran en la Tabla 5.

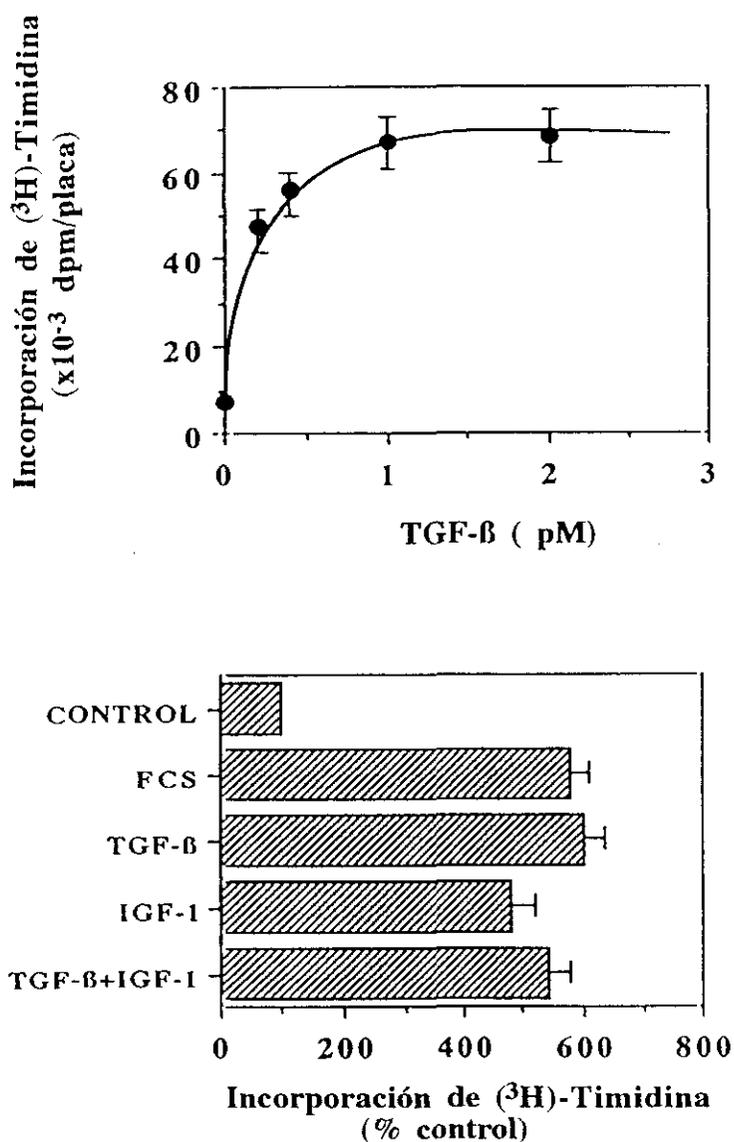


Figura 24.- Efectos del TGF-β sobre la síntesis de DNA en adipocitos marrones fetales: dosis-respuesta y comparación con otros mitógenos

(Panel superior): Células quiescentes (20 horas deprivadas de suero) fueron incubadas durante 24 horas en presencia de concentraciones crecientes de TGF-β. La incorporación de ³H)-Timidina se determinó durante las 4 últimas horas de cultivo. Los resultados se expresan como dpm/placa y son la media ± S.E.M. de tres experimentos distintos. (Panel inferior): Células quiescentes fueron cultivadas durante 24 horas en ausencia o presencia de TGF-β (1pM), o IGF-I (1.4 nM), o TGF-β + IGF-I, ó 10% de suero fetal, y se midió la incorporación de ³H)-Timidina como se ha descrito anteriormente. Los resultados están expresados como porcentaje de radiactividad incorporada respecto a células control sin tratar (100%), y son la media ± S.E.M. de tres experimentos independientes.

TIEMPO (H)	00		0			24		48	
	—	—	—	TGF-β1	FCS	—	TGF-β1	FCS	
Número de células (x10 ⁻⁵ células/placa)	5.9±1.1	4.5±0.5	3.2±0.3	5.6±0.5*	5.5±0.6+	2.9±0.3	8.6±0.6*	8.7±0.8+	
Ciclo celular (%S+G2/M)	15.0±3.0	5.9±1.2	5.5±0.7	14.1±2.0*	15.0±1.9+	4.5±0.6	14.4±1.3*	15.1±1.9+	
(³ H)-Timidina (x10 ⁻³ dpm/placa)	.	12±2	9±1	63±6*	59±5+	9±1	93±14*	87±8+	

Tabla 5 Efectos del TGF-β a 24 y 48 horas sobre la incorporación de (³H)-Timidina, el ciclo celular y el número de células

Las células fueron sembradas a una densidad de 10×10^5 células/placa, y después de 4 horas en presencia de suero (tiempo 00) se les privó del mismo durante 20 horas (tiempo 0). Posteriormente se incubaron 24 ó 48 horas en medio libre de suero en ausencia o presencia de TGF-β (1 pM) ó 10% de suero (FCS). A los distintos tiempos de cultivo se determinaron varios parámetros: la incorporación de (³H)-Timidina se expresa como dpm/placa, el ciclo celular como porcentaje de células en fases S+G2/M del ciclo celular, y el número de células como células/placa. Todos los resultados son la media ± S.E.M. de tres experimentos distintos. Los valores en presencia de TGF-β o en presencia de 10% FCS que fueron significativamente diferentes, según el test de Student, de sus controles a los tiempos de cultivo correspondientes se indican como * y + respectivamente (*, + p<0.05).

Realizando ensayos autorradiográficos de marcaje nuclear con (^3H)-Timidina en ausencia y presencia de TGF- β durante 48 horas se observó un porcentaje de núcleos marcados de 11.3 ± 0.7 en células sin tratar y de 50.2 ± 1.9 en células estimuladas con TGF- β (Figura 25,A,B,C,D). Se muestran también microfotografías magnificadas de los adipocitos marrones, presentando el fenotipo de gotas de grasa multiloculares que han dado positivo y negativo al marcaje nuclear con (^3H)-Timidina en presencia de TGF- β . (Figura 25,E,F).

4.5.3.- El TGF- β induce la expresión de genes tempranos de proliferación, así como el contenido de las proteínas PCNA y p21 ras

Se llevó a cabo un estudio del efecto del TGF- β sobre la expresión de genes relacionados con proliferación (c-fos, c-myc, cdc2, H-ras, G6PD y β -actina) a lo largo del tiempo de cultivo, comparándolo con el de las células sin tratar. En la Figura 26 se muestran diferentes Northern-blots representativos. Los análisis densitométricos de los mismos, tras normalización con el RNA ribosomal 18S se muestran en la Tabla 6. La expresión de c-fos fue detectada únicamente en las células tratadas con TGF- β durante 30 minutos, permaneciendo casi indetectable bajo otras condiciones experimentales. El TGF- β aumentó significativamente (2.2 veces) los niveles de mRNA de c-myc a 2 horas, así como 2 veces la expresión de H-ras y G6PD tras 4 y 8 horas de tratamiento. Las dos isoformas de mRNA para la cdc2 quinasa (Dalton, 1992) aumentaron de forma coordinada en respuesta a TGF- β (3 y 2 veces tras 4 y 8 horas, respectivamente). El gen de la β -actina en adipocitos marrones también se transcribe dando dos isoformas de mRNA, de las cuales la de expresión mayoritaria sufrió un pequeño aumento (< 2 veces) después de 2 y 4 horas de tratamiento con TGF- β .

Además de este estudio sobre expresión génica, se determinaron los niveles de dos proteínas relacionadas con la proliferación (PCNA y p21 ras) tras 12 horas de tratamiento con TGF- β . Los resultados pusieron de manifiesto una inducción de 6 veces en el contenido de la PCNA y de 2 veces en el de la proteína p21 ras en respuesta a TGF- β (Figura 27).

Todos los resultados presentados demuestran que el TGF- β a la concentración de 1 pM induce mitogénesis en los adipocitos marrones fetales de rata en cultivo primario, incrementando la síntesis de DNA, el porcentaje de células en fases S+G2/M del ciclo celular, y el número de células tras 24 horas de cultivo de forma similar al 10% FCS. Además, el efecto del TGF- β a 48 horas sobre la incorporación de (^3H)-Timidina a DNA y

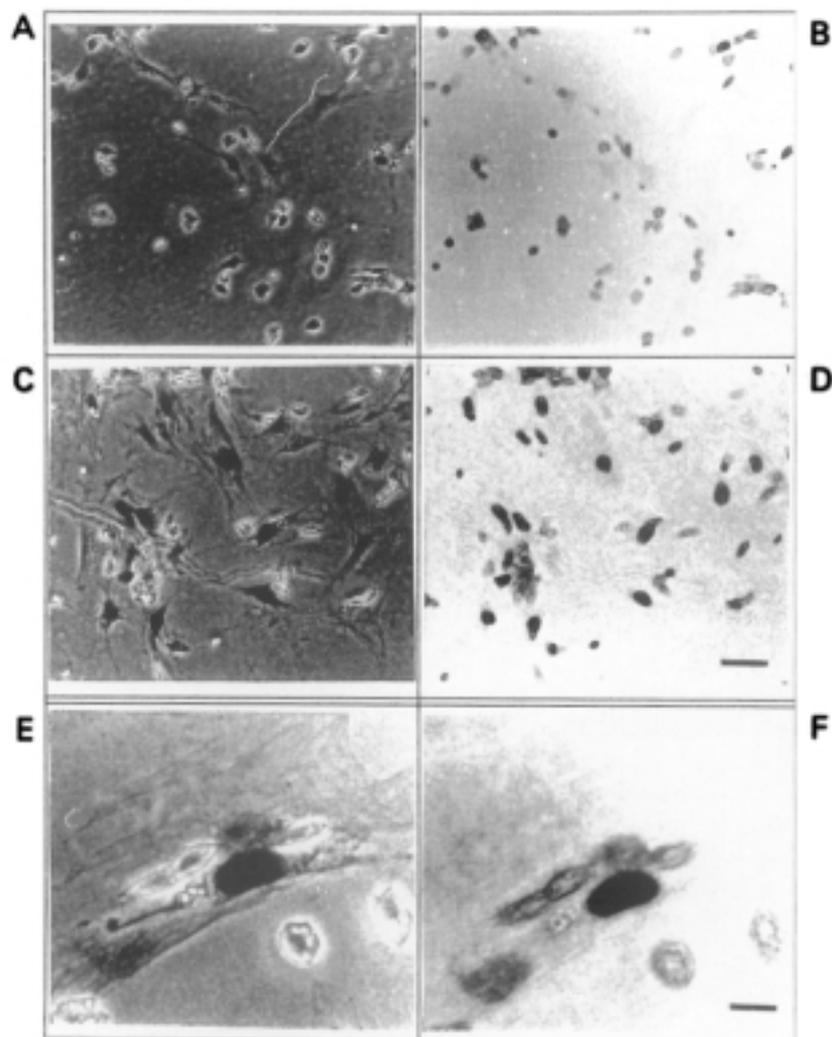


Figura 25.- El TGF- β incrementó el número de núcleos marcados en los adipocitos marrones fetales

Células quiescentes (20 horas deprivadas de suero) fueron incubadas durante 48 horas en ausencia (A, B) o en presencia de 1 pM de TGF- β (C, D, E, F), con la presencia continua de (^3H)-Timidina, como se describe en la sección 3.7.2 de Material y Métodos. Las placas fueron cubiertas con un film (Kodak AR 10 stripping film), expuestas durante 2 semanas, y reveladas. Los núcleos se tiñeron con Giemsa. A, C, E: Microfotografías en contraste de fase. B, D, F: Microfotografías de campo claro. La magnificación para A, B, C y D se muestra en D (la barra equivale a 20 μm). La magnificación para E y F se muestra en F (la barra equivale a 40 μm).

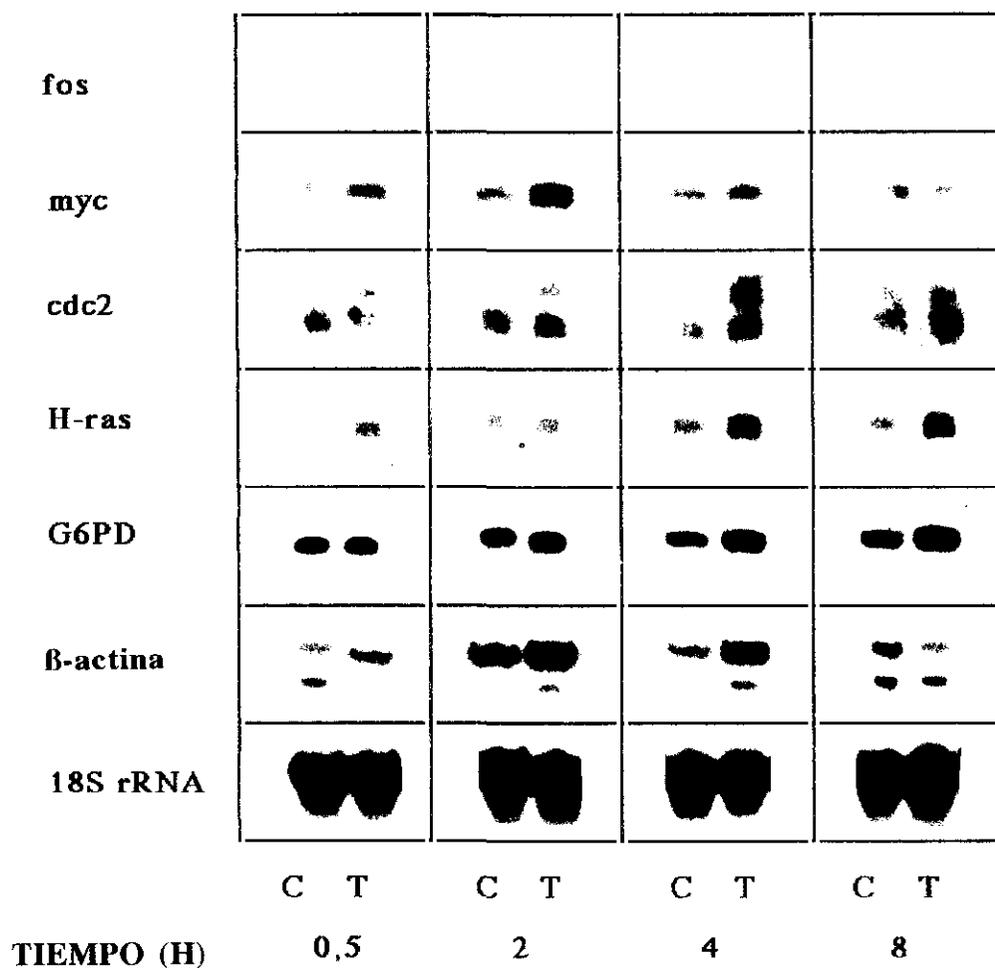


Figura 26.- Análisis por Northern-blot de los efectos del TGF- β sobre la expresión de genes tempranos de proliferación

Células privadas de suero 20 horas fueron tratadas durante 30 minutos, 2, 4 y 8 horas con 1 pM TGF- β (T) o bien se mantuvieron quiescentes sin estimular (C). 10 μ g de RNA total de cada condición fue sometido a análisis de Northern-blot, hibridándose con varios cDNAs marcados radiactivamente. Se muestran autorradiografías representativas.

TIEMPO (H)	0.5		2		4		8	
	-	+	-	+	-	+	-	+
myc	2.0±0.3	2.9±0.5	2.4±0.3	5.4±0.5*	2.4±0.4	2.5±0.5	1.3±0.2	1.0±0.2
cdc2	1.1±0.3	1.0±0.2	1.5±0.3	1.6±0.3	1.3±0.3	4.2±0.5*	1.8±0.2	3.5±0.4*
H-ras	1.0±0.1	1.2±0.2	1.1±0.3	1.2±0.3	1.4±0.2	2.8±0.3*	1.0±0.2	2.2±0.3*
G6PD	1.0±0.1	1.0±0.2	1.1±0.2	1.1±0.3	1.2±0.2	2.3±0.3*	1.6±0.3	3.1±0.4*
β-actina	1.0±0.2	1.8±0.4	2.5±0.3	4.2±0.5*	1.7±0.2	3.0±0.4*	1.9±0.3	1.3±0.3

Tabla 6 Cuantificación de los niveles de expresión de genes tempranos de proliferación inducidos por TGF-β a distintos tiempos

Las autorradiografías de la figura 25 se sometieron a análisis densitométricos y se normalizaron con la cantidad de rRNA 18S. Los resultados se expresan como unidades arbitrarias y son las medias ± S.E.M. de tres experimentos independientes. Los valores en presencia de TGF-β que fueron significativamente distintos de sus controles a los tiempos correspondientes por el test de Student se indican con * ($p < 0.05$).

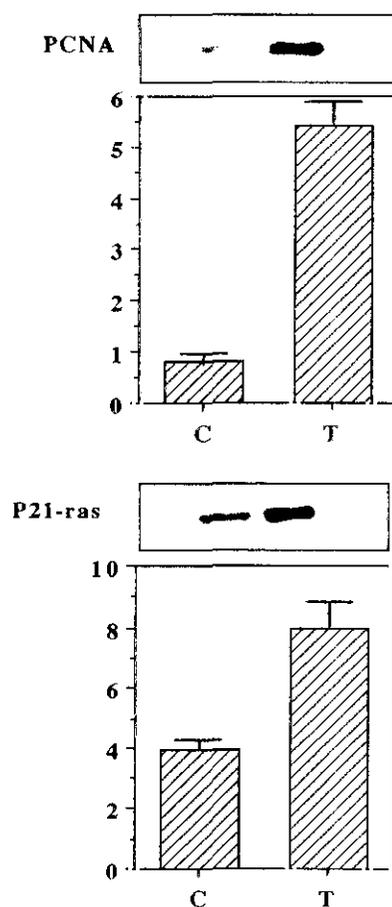


Figura 27.- El TGF- β aumenta los niveles de las proteínas PCNA y p21-ras en los adipocitos marrones fetales.

Células quiescentes (20 horas deprivadas de suero) fueron incubadas durante 12 horas en presencia de 1 pM TGF- β (T) y comparadas con células sin tratar (C). 20 μ g de proteína total de cada condición fueron sometidos a 8% SDS-PAGE, transferidos a membranas de nylon, inmunodetectados con anticuerpos monoclonales contra las proteínas PCNA (panel superior) y p21-ras (panel inferior) y revelados con ECL-quimioluminiscencia. Se muestran autorradiografías representativas y análisis densitométricos expresados como unidades arbitrarias (medias \pm S.E.M. de tres experimentos distintos).

sobre el número de células fue mayor que a 24 horas, con un porcentaje similar de células en fases S+G2/M del ciclo celular. Dichos resultados sugieren que la misma población de células pudiera experimentar dos vueltas al ciclo celular. Puesto que la presencia de TGF- β durante 48 horas duplicó el número de células presentes a tiempo 0 de estimulación, parece que este factor actúa como un mitógeno en adipocitos marrones fetales en cultivo. Además, adipocitos marrones mostrando el fenotipo de gotas de grasa en depósitos multiloculares resultaron ser positivos en el ensayo de marcaje nuclear con (3H)-Timidina, lo cual nos sugirió que células diferenciadas son capaces de proliferar en cultivo en respuesta a TGF- β .

Aunque los resultados presentados indican que TGF- β en ausencia de otros factores de crecimiento exógenos es un mitógeno directo para los adipocitos marrones, no se puede excluir la posibilidad de que estuviera actuando como un factor de supervivencia que permitiera a las células responder a mitógenos producidos endógenamente a lo largo del cultivo. Este, de hecho, es el mecanismo más aceptado por el que se explican los efectos estimuladores del crecimiento del TGF- β en algunos tipos celulares (Moses y col., 1990). Sin embargo, en cultivos primarios de precursores de adipocitos de pollo se han descrito efectos proliferativos para el TGF- β mostrando evidencias de una acción directa no mediada por otros factores autocrinos (Butterwith and Goddard, 1991).

Por otro lado, el TGF- β (1pM) como único factor añadido exógenamente, induce en los adipocitos marrones fetales la expresión de genes muy tempranos de proliferación, tales como c-fos (30 minutos) y c-myc (2 horas), y genes tempranos como cdc2 y H-ras (a 4 y 8 horas) con una cinética similar a la del 10% FCS o IGF-1 (1.4 nM) descrita ya en el apartado 4.2.3., hecho que apoya la idea de que el TGF- β está actuando como un mitógeno directo en este sistema celular. La expresión temprana de c-fos, c-myc y H-ras se considera un suceso fundamental para la proliferación celular en respuesta a factores de crecimiento. Recientemente, la inducción de c-fos ha sido implicada en el efecto mitogénico del TGF- β sobre células osteoblásticas (Machwate y col., 1995). La expresión de c-fos y c-myc es necesaria para rescatar a las células quiescentes de la fase G0 e introducir las en la fase G1 del ciclo celular, mientras que la expresión de H-ras es necesaria para que progresen hacia la fase S y dupliquen su DNA (Heidin y Westermarck, 1990; Lu y Campisi, 1992). Los resultados presentados sugieren la importancia de la expresión temprana de c-fos, c-myc, y H-ras, así como la expresión de cdc2 quinasa, un gen inducible que se expresa en cada vuelta del ciclo celular durante la transición G1/S (Welch y Wang, 1992), para la proliferación de células mesenquimáticas (adipocitos marrones) estimulada por TGF- β . Además, TGF- β aumenta a 12 horas el contenido proteico de la PCNA (una proteína nuclear necesaria para la replicación del DNA) y de p21-ras. Aunque las vías mitogénicas inducidas por TGF- β no se conocen, y los efectos positivos de este factor sobre el crecimiento celular se atribuyen a acciones indirectas a través de otros factores de

crecimiento y proteínas de matriz extracelular inducidas por TGF- β , nuestros resultados, mostrando un aumento coordinado en la expresión de cdc2 quinasa y H-ras a 4 y 8 horas, y en el contenido proteico de la PCNA y de la proteína p21-ras tras 12 horas de tratamiento con TGF- β , sugieren que la expresión de H-ras y la proteína p21-ras sintetizada “de novo” podrían estar implicadas en la estimulación de la proliferación por TGF- β , permitiendo a las células progresar desde la fase G1 a la fase S del ciclo celular, y sintetizar DNA, como previamente se ha sugerido para el crecimiento celular de fibroblastos (Lu y col., 1989) y para los adipocitos marrones (apartado 4.2.3 de esta sección) estimulados con IGF-1. De hecho, recientemente se ha descrito que la microinyección de p21-ras en células epiteliales de pulmón detenidas en el ciclo celular por acción del TGF- β hace que las células superen esa inhibición y progresen hacia la fase S, apoyando la idea que la proteína p21-ras está directamente implicada en la progresión de las células a través del ciclo celular, dando como resultado la estimulación de la síntesis de DNA (Howe y col., 1993). Aunque los resultados presentados lo sugieren, no se puede afirmar que la estimulación del crecimiento mediada por TGF- β en adipocitos marrones se produzca a través de una vía en la que esté directamente implicada la activación y/o expresión de ras.

4.6.- TGF- β INDUCE LA EXPRESION DE GENES ESPECIFICOS DE DIFERENCIACION DE ADIPOCITOS MARRONES FETALES

Aunque el TGF- β es considerado como un factor inhibidor de la adipogénesis puesto que previene la diferenciación de preadipocitos 3T3-L1 si se añade antes de que comience el proceso, no es capaz de bloquearla una vez iniciada ni de producir desdiferenciación de adipocitos ya maduros (Igotz y Massagué, 1985; Sparks y col., 1992). Sobre la diferenciación de adipocitos marrones, sin embargo, no se han descrito efectos del TGF- β por lo que se planteó dicho estudio sobre los dos programas de diferenciación que caracterizan a estas células: el termogénico y el adipogénico. Para ello se utilizaron adipocitos marrones fetales de 20 días que, como ya hemos visto, son un modelo adecuado tanto para estudios de proliferación como de diferenciación.

4.6.1. El TGF- β induce la expresión de UP mRNA de manera dependiente del tiempo y de la concentración

Mediante la técnica de Northern-blot se estudiaron los efectos del TGF- β sobre la expresión de UP como gen específico del tejido adiposo marrón y marcador de la diferenciación termogénica del mismo. En primer lugar se llevaron a cabo experimentos dosis-respuesta, para lo cual las células deprivadas de suero 20 horas fueron incubadas durante 24 horas en presencia de concentraciones crecientes (0-1nM) de TGF- β . En la figura 28 se muestra una autorradiografía representativa (panel superior) con el correspondiente análisis densitométrico (panel inferior). Los niveles de expresión de UP a tiempo 00 disminuyeron drásticamente tras 20 horas en ausencia de suero (C0), siendo prácticamente indetectables 24 horas más tarde. Sin embargo, la presencia de TGF- β durante estas 24 últimas horas produjo una reinducción en los niveles de UP mRNA de manera dosis dependiente, alcanzando a la concentración de 100 pM los máximos efectos (niveles 2.5 veces mayores que los detectados a tiempo 00 y 25 veces mayores que los del correspondiente control a 24 horas), por lo que en todos los experimentos posteriores se utilizó dicha concentración.

Para estudiar el efecto inductor del TGF- β sobre la expresión de UP a lo largo del tiempo, los adipocitos marrones fetales deprivados de suero 20 horas fueron tratados con el factor durante 30 minutos, 2, 4, 8 y 24 horas y se cuantificaron los niveles de UP mRNA comparándolos con los de las células no estimuladas (Figura 29). La inducción de la expresión de UP mediada por TGF- β mostró ser dependiente del tiempo, alcanzando niveles 10 y 24 veces mayores que sus correspondientes controles a las 8 y 24 horas, respectivamente. Tratamientos más largos (48 y 72 horas) con TGF- β no produjeron mayores efectos sobre la expresión de UP.

4.6.2. El TGF- β induce la expresión de genes lipogénicos y de fibronectina en cultivos primarios de adipocitos marrones fetales

A parte del programa termogénico, se llevó a cabo un estudio de los efectos del TGF- β sobre la expresión de marcadores adipogénicos relacionados con la síntesis lipídica, así como de la fibronectina, que aunque no es gen específico de ningún tejido sí se sabe que su expresión es modulada por TGF- β (Schwarzbauer, 1991; Stampfer y col., 1993).

Adipocitos marrones a tiempo 00 de cultivo presentan niveles significativos de FAS y G3PDH mRNAs mientras que la expresión de ME y G6PD es mucho menor. Tras 44 horas de cultivo en ausencia de suero y otros factores externos la expresión de FAS, G3PDH y ME fue prácticamente indetectable, permaneciendo los niveles de G6PD mRNA

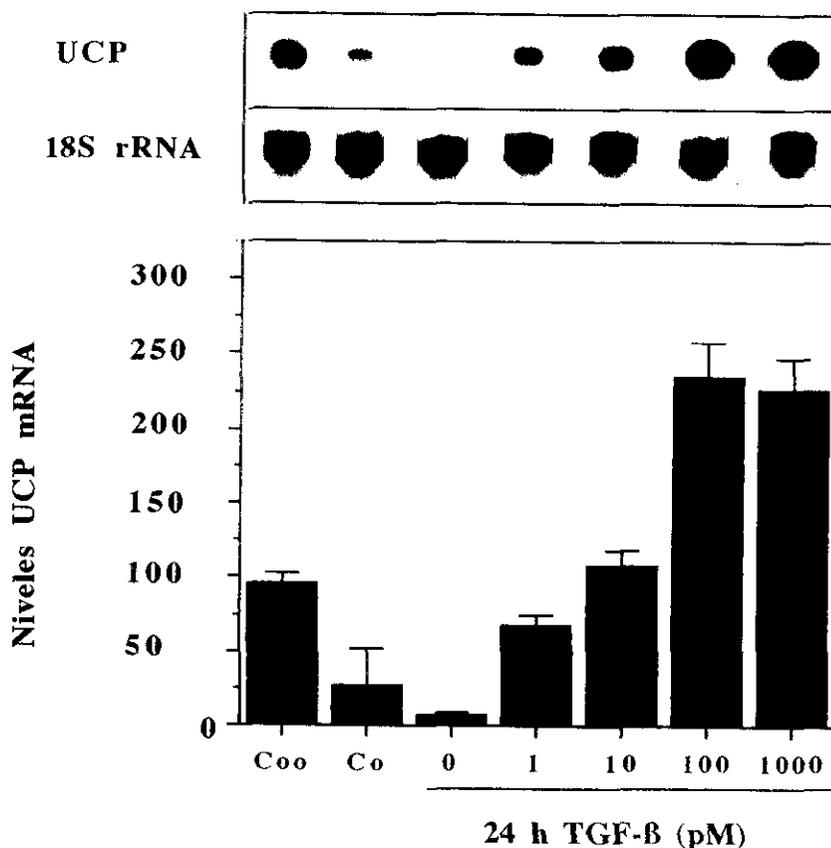


Figura 28.- El TGF-β aumenta la expresión génica de UCP de forma dosis-dependiente.

Las células, después de sembradas y mantenidas 4 horas en medio MEM suplementado con 10% de suero fetal (Coo), fueron deprivadas de suero durante 20 horas (Co) y posteriormente incubadas 24 horas en medio sin suero en ausencia o presencia de concentraciones crecientes de TGF-β. 10 μg de RNA total de cada condición fue analizado por la técnica de Northern-blot e hibridado con las sondas radiactivas de UCP (panel superior), y 18 S rRNA (panel central). En el panel inferior se representan los niveles (la media ± S.E.M. de tres experimentos independientes) del mRNA de la UCP (unidades densitométricas arbitrarias) después de normalizar con la banda de rRNA 18S.

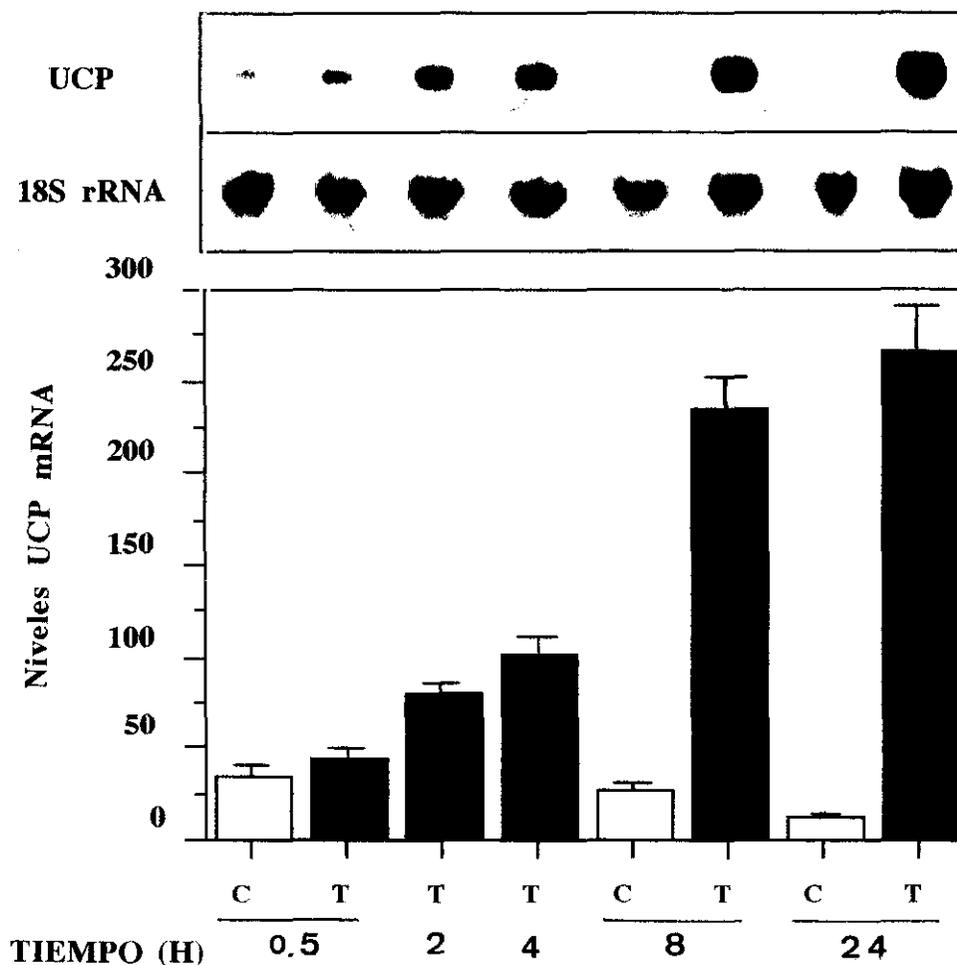


Figura 29.- Estudio del efecto del TGF- β sobre la expresión de UCP mRNA a lo largo del tiempo.

Los adipocitos marrones fetales deprivados 20 horas de suero fueron estimulados durante 30 minutos, 2, 4, 8, y 24 horas con TGF- β 100 pM (T) en ausencia de suero, y comparados con células sin tratar a los tiempos correspondientes (C). El RNA total (10 μ g) de cada condición fue analizado por Northern-blot e hibridado con el cDNA de la UCP (panel superior) y el cDNA del rRNA 18S (panel central). Los niveles de mRNA de UCP (unidades densitométricas arbitrarias) son la media \pm S.E.M. de tres experimentos independientes, después de normalizar con la banda del rRNA 18S (panel inferior).

invariables. Sin embargo, la presencia de TGF- β durante las 24 últimas horas de cultivo incrementó la expresión de los genes adipogénicos comparando con las células sin tratar (Figura 30). Los niveles de FAS y ME mRNAs aumentaron 5 y 6 veces, respectivamente, mientras que la inducción sobre G3PDH y G6PD fue alrededor del 80%. Así, la expresión de FAS y G3PDH en adipocitos tratados con TGF- β alcanzó niveles similares a los encontrados en las células a tiempo 00 de cultivo. En cuanto a la expresión de fibronectina, ésta fue indetectable en adipocitos marrones a tiempo 00, mientras que 44 horas más tarde en ausencia de suero se pudieron apreciar dos isoformas de mRNA para fibronectina. La presencia de TGF- β durante las 24 últimas horas incrementó 5 veces la expresión de este gen, comparando con células sin estimular (Figura 30).

Los resultados presentados demuestran que el TGF- β induce de forma dosis dependiente la expresión del gen específico del tejido adiposo marrón implicado en el programa termogénico: la UP. Dicha inducción también es dependiente del tiempo, comenzando ya a las 2 horas de tratamiento y alcanzando el máximo nivel a las 24 horas. Asimismo, el TGF- β aumenta la expresión de genes relacionados con el programa de diferenciación adipogénico, tales como la FAS, la G3PDH, la ME y la G6PD, lo cual sugiere un papel para el TGF- β en el inicio y/o mantenimiento del proceso de diferenciación de los adipocitos marrones fetales. Estos resultados podrían resultar contradictorios, puesto que es bien conocido el papel inhibitorio del TGF- β sobre la diferenciación de los adipocitos blancos. Sin embargo, los efectos antiadipogénicos del TGF- β se producen sólo cuando el factor se añade antes de que comience el proceso de diferenciación, no siendo capaz de bloquearlo una vez iniciado (Ignatz y Massagué, 1985; Sparks y col., 1992), y como ya se ha descrito en el apartado 4.1 de esta sección, los adipocitos marrones fetales de 20 días se encuentran en un estado intermedio del proceso de diferenciación, puesto que expresan varias enzimas lipogénicas pero no marcadores de diferenciación terminal como la PEPCK.

En los adipocitos marrones el TGF- β aumenta la expresión de fibronectina, una proteína de la matriz extracelular, de igual modo que lo hace en un amplio número de sistemas celulares. Este es un efecto sobradamente conocido del factor que ha sido relacionado con procesos de morfogénesis y desarrollo. También los efectos positivos del TGF- β sobre proliferación celular han sido atribuidos en parte a un aumento en las proteínas de matriz extracelular (ECM). Sin embargo, existen trabajos que sugieren que los efectos del TGF- β sobre ECM son independientes y mediados por distintas vías de sus efectos sobre proliferación y/o diferenciación (Stampfer y col., 1993; Franzén y col., 1993).

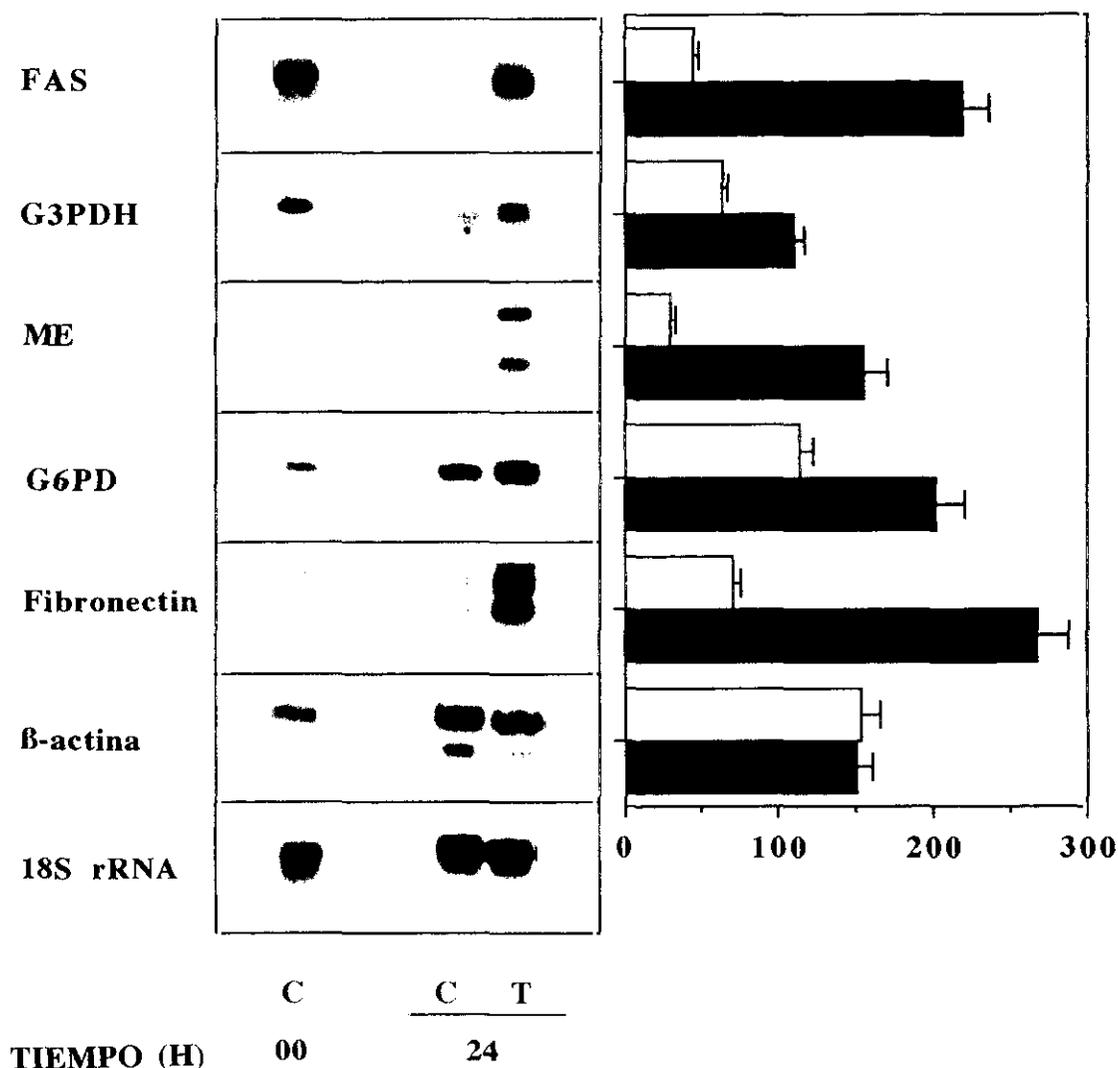


Figura 30.- El TGF- β aumenta la expresión de enzimas lipogénicas y de la fibronectina en los cultivos primarios de adipocitos marrones fetales.

Las células sembradas y mantenidas 4 horas en medio con 10% de suero fetal (Coo) fueron deprivadas de suero durante 20 horas y, posteriormente, incubadas 24 horas en medio sin suero en ausencia (C24) o presencia de TGF- β 100 pM (T24). 10 μ g de RNA total de cada condición fue separado por electroforesis, transferido a membranas de nylon e hibridado con diferentes sondas. Los niveles de los distintos mRNAs a 24 horas en ausencia (barras blancas) o presencia de TGF- β (barras negras) se expresan como unidades densitométricas arbitrarias después de normalización con la banda de 18S rRNA, y son la media \pm S.E.M. de tres experimentos independientes (panel derecho).

A partir de todos los datos expuestos en estos dos últimos apartados, respecto a la acción del TGF- β sobre adipocitos marrones fetales en cultivo, se deduce que es un factor que induce la mitogénesis, así como la expresión de genes implicados en diferenciación adipogénica y termogénica. Aunque los efectos sobre proliferación parecen ser directos, no se puede descartar la posibilidad de que se estén produciendo a través de la inducción de factores autocrinos, o que el aumento en la expresión de fibronectina pueda favorecer el proceso. El cuanto a la diferenciación, a pesar de que sólo se han realizado estudios de expresión génica, éstos muestran claramente que el TGF- β es capaz de inducir genes, tanto del programa lipogénico como termogénico de diferenciación de los adipocitos marrones fetales, sugiriendo un papel para este factor en el desarrollo fetal del tejido adiposo marrón.

V.- CONCLUSIONES

V-CONCLUSIONES

1.- Los adipocitos marrones fetales de rata entre los días 20 y 22 de la gestación pierden capacidad proliferativa y sufren un proceso de maduración termogénica y adipogénica, aumentando la expresión de genes específicos de ambos procesos y adquiriendo un fenotipo de célula diferenciada.

2.- Los adipocitos marrones fetales de 20 días expresan los mRNAs para IGF-1 y su receptor, aumentando la expresión de éste último al final del período gestacional. Asimismo, presentan un elevado número de receptores para IGF-1e insulina.

3.- El IGF-1 es un mitógeno para los adipocitos marrones fetales en cultivo, aumentando la síntesis de DNA , el porcentaje de células en ciclo celular y el número de células. Además, induce la expresión de un grupo de genes tempranos relacionados con proliferación, así como las proteínas p21-ras y PCNA.

4.-El IGF-1 induce la expresión de genes relacionados con la diferenciación adipogénica y termogénica, así como el transporte de glucosa y el contenido lipídico.

5.- El TNF- α tiene un papel claramente antiadipogénico sobre los adipocitos marrones fetales, produciendo resistencia a la acción de la insulina. Dicho efecto antiadipogénico puede ser debido a una hipofosforilación de la cadena β del receptor de la insulina.

6.- El TGF- β presenta en los adipocitos marrones fetales los tres tipos de receptores más universales para TGF- β . En dichas células, es un mitógeno, aumentando parámetros e induciendo la expresión de genes tempranos de proliferación, así como el contenido de las proteínas p21-ras y PCNA.

7.- Asimismo, el TGF- β es capaz de inducir la expresión de genes específicos relacionados con la diferenciación adipogénica y termogénica de los adipocitos marrones.

Conclusión final

Todos los resultados expuestos nos llevan a proponer al IGF-1 y al TGF- β como dos señales que de manera autocrina/paracrina podrían estar implicadas en el desarrollo del tejido adiposo marrón “in vivo”.

VI.- BIBLIOGRAFIA

VI-BIBLIOGRAFIA

- Abbott, A.M., Bueno, R., Pedrini, M.T., Murray, J.M., and Smith, R.J. (1992). **"Insulin-like Growth Factor I Receptor gene Structure"**. J. Biol. Chem. 267, 10759-10763.

- Adashi, E. Y., Resnick, C.E., D'ercole, A.J., Svoboda, M.E., and Van Wyk, J.J. (1985). **"Insulin-Like Growth Factors as Intraovarian Regulators of Granulosa Cell Growth and Function"**. Endocr. Rev. 6, 400-420.

- Alexandrides, T.K., and Smith, R.J. (1989). **"A Novel Fetal Insulin-like Growth Factor (IGF) I Receptor"**. J. Biol. Chem. 264, 12922-12930.

- Alitalo, K., Schwab, M., Lin, C.C., Varmus, H.E., and Bishop, J.M. (1983). **"Homogeneously staining chromosomal regions contain amplified copies of an abundantly expressed cellular oncogene (c-myc) in malignant neuroendocrine cells from a human colon carcinoma"**. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 80, 1707-1711.

- Alvarez, R., de Andrés, J., Yubero, P., Viñas, O., Mampel, T., Iglesias, R., Giralt, M., and Villarroya, F. (1995). **"A novel regulatory pathway of brown fat thermogenesis"**. J. Biol. Chem. 270, 5666-5673.

- Amasino, R.M. (1986). **"Acceleration of nucleic acid hybridization rate by polyethylene glycol"**. Anal. Biochem. 152, 304-307.

- Amy, C.M., Witkowski, A., Naggert, J., Williams, B., Randhawa, Z., and Smith, S.(1989). **"Molecular cloning and sequencing of cDNAs encoding the entire rat fatty acid synthase"**. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86, 3114-3118.

- Araki, E., Lipes, M.A., Patii, M-E., Bruning, J.C., Haag, B.L., Johnson, R.S., and Kahn, C.R. (1994). **"Alternative pathway of insulin signaling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene"**. Nature 372, 186-190.

-
- Avruch, J., Zhang X-F and Kyriakis, J.M. (1994). **"Raf meets Ras: completing the framework of a signal transduction pathway"**. TIBS 19, 279-283.
- Baker, J., Liu, J-P, Robertson, E.J., and Efstratiadis, A. (1993). **"Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth"**. Cell 75, 73-82
- Barreca, A., De Luca, M., Del Monte, P., Bondanza, S., Damonte, G., Cariola, G., Di Marco, E., Giordano, G., Gancedda, R., and Minuto, F. (1992). **"In vitro paracrine regulation of human keratinocyte growth by fibroblast-derived insulin-like growth factors"**. J. Cell. Physiol. 151, 262-268.
- Bar-Sagi, D. (1994). **"The SOS (son of sevenless) Protein"**. TEM 5, 165-169.
- Baserga, R. (1991). **"Growth regulation of the PCNA gene"**. J. Cell. Sci. 98, 433-436
- Bassing, C.H., Yingling, J.M., Howe, D.J., Wang, T., He, W.W., Gustafson, M.L., Shah, P., Donahoe, P.K., Wang, X-F. (1994). **"A transforming growth factor β type I receptor that signals to activate gene expression"**. Science 263, 87-89.
- Bayne, M.L., Applebaum, J., Chicchi, G.G., Miller, R.E., and Cascieri, M.A. (1990). **"The Roles Of Tyrosines 24, 31, and 60 in the High Affinity Binding of Insulin-like Growth Factor-I to the Type 1 Insulin-like Growth Factor Receptor"**. J. Biol. Chem. 265, 15648-15652.
- Beale, E.G., Clouthier, D.e., and Hammer, R.E. (1992). **"Cell-specific expression of cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase in transgenic mice"**. FASEB J. 6, 3330-3337.
- Beguinot, F., Smith, R.J., Kahn, C.R., Maron,R., Moses, A.C. and White, M.F. (1988). **"Phosphorylation of Insulin-like Growth Factor I Receptor by Insulin Receptor Tyrosine Kinase in Intact Cultured Skeletal Muscle Cells"**. Biochemistry 27, 3222-3228.

-
- Benito, M., Porras, A., Nebreda, A.R. and Santos, E. (1991). "**Differentiation of 3T3-L1 Fibroblasts to Adipocytes Induced By Transfection of ras Oncogenes**". *Science* 253, 565-568.
- Benito, M., Porras, A., and Santos, E. (1993). "**Establishment of permanent brown adipocyte cell lines achieved by transfection with SV40 large T antigen and ras genes**". *Exp. Cell. Res.* 209, 248-254
- Birnbaum, M.J. (1989). "**Identification of a Novel Gene Encoding an Insulin-Responsive Glucose Transporter Protein**". *Cell* 57, 305-315.
- Blakeley, D.M., Corps, A.N., and Brown, K.D. (1989). "**Bombesin and platelet-derived growth factor stimulate formation of inositol phosphates and Ca²⁺ mobilization in Swiss 3T3 by different mechanisms**". *Biochem. J.* 258, 177-185.
- Blenis, J. (1993). "**Signal transduction via the MAP kinases: proceed at your own RSK**". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 5889-5892.
- Bohme, K., Conscience egli, M., Tschan, T., Winterhalter, K.H., and Bruckner, P. (1992). "**Induction of proliferation or hypertrophy of chondrocytes in serum-free culture: the role of insulin-like growth factor I, insulin, or thyroxine**". *J. Cell. Biol.* 116, 1035-1042.
- Boney, C.M., Moats-Staats, B.M., Stiles, A.D., and D'Ercole, A.J. (1994). "**Expression of Insulin-Like Growth Factor-I (IGF-I) and IGF-Binding Proteins during Adipogenesis**". *Endocrinology* 135, 1863-1868.
- Bouillaud, F., Ricquier, D., Thibault, J., and Weissenbach, J. (1985). "**Molecular approach to thermogenesis in brown adipose tissue: cDNA cloning of the mitochondrial uncoupling protein**". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82, 445-448
- Bradford, M. (1976). "**A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding**". *Anal. Biochem.* 72, 248-254

-
- Brooks, S.F., Herget, T., Erusalimsky, J.D., and Rozengurt, E. (1991). "**Protein kinase C activation potently down-regulates the expression of its major substrate, 80K, in Swiss 3T3 cells**". EMBO J. 10, 2497-2505

 - Bukowiecki, L., Géloen, A., and Collet, A.J. (1986). "**Proliferation and differentiation of brown adipocytes from interstitial cells during cold acclimation**". Am. J. Physiol. 250, C880-C887.

 - Burgering, B.M.T., Medema, R.H., Maassen, J.A., van de Wetering, M.L., van der Eb, A.J., McCormick, F. and Bos, J.L. (1991). "**Insulin stimulation of gene expression mediated by p21 ras activation**". EMBO J. 10, 1103-1109.

 - Butterwith, S.C., and Goddard, C. (1991). "**Regulation of DNA synthesis in chicken adipocyte precursor cells by insulin-like growth factors, platelet-derived growth factor and transforming growth factor- β** ". J. Endocrinol. 131, 203-209.

 - Butterwith, S.C., Peddie, C.D., and Goddard, C. (1993). "**Regulation of adipocyte precursor DNA synthesis by acidic and basic fibroblast growth factors: interaction with heparin and other growth factors**". J. Endocrinol. 137, 369-374

 - Caldés, T., Alemany, J., Robcis, H.L., and de Pablo, F. (1991). "**Expression of Insulin-like Growth Factor I in Developing Lens Is Compartmentalized**". J. Biol. Chem. 266, 20786-20790.

 - Cantley, L.C., Auger, K.R., Carpenter, C., Duckworth, B., Graziani, A., Kapeller, R., and Soltoff, S. (1991). "**Oncogenes and signal transduction**". Cell 64, 281-302.

 - Cao, Z., Umek, R.M., and McKnight, S.L. (1991). "**Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells**". Genes Dev. 5, 1538-52.

 - Cascieri, M. A., Chicchi, G.G., Hayes, N.S., and Strader, C.D. (1986). "**(Thr-59)-insulin like growth factor I stimulates 2-deoxyglucose transport in BC3H1 myocytes through the insulin-like growth factor receptor, not the insulin receptor**". Biochim. Biophys. Acta. 886, 491-499.

-
- Casteilla, L., Champigny, O., Bouillaud, F., Robelin, J., and Ricquier, D. (1989). **"Sequential changes in the expression of mitochondrial protein mRNA during the development of brown adipose tissue in bovine and ovine species"**. *Biochem. J.* 257, 665-671.
- Casteilla, L., Nougues, J., Reyne, Y., and Ricquier, D. (1991). **"Differentiation of ovine brown adipocyte precursor cells in a chemically defined serum-free medium"**. *Eur. J. Biochem.* 198, 195-199
- Chiou, S. and Chang, W. (1992). **"Insulin-Like Growth Factor I Stimulates Transcription of the c-jun Proto-oncogene in Balb/c 3T3 Cells"**. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 183, 524-531.
- Chomczynski, K., and Sacchi, N. (1987). **"Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction"**. *Anal. Biochem.* 162, 156-159.
- Cleveland, D., Lopata, M.A., Mac Donald, R.J., Cowan, N.J., Rutter, W.J., and Kirschner, M.W. (1980). **"Number and Evolutionary Conservation of α - and β -Tubulin and Cytoplasmic β - and γ -Actin Genes Using Specific Cloned cDNA Probes"**. *Cell* 20, 95-105.
- Condorelli, G., Formisano, P., Miele, C. and Beguinot, F. (1992). **"Thyrotropin Regulates Autophosphorylation and Kinase Activity of Both the Insulin and the Insulin-like Growth Factor-I Receptors in FRTL5 Cells"**. *Endocrinology* 130, 1615-1625.
- Cousin, B., Cinti, S., Morroni, M., Raimbault, S., Ricquier, D., Pénicaud, L., and Casteilla, L. (1992). **"Occurrence of brown adipocytes in rat white adipose tissue: molecular and morphological characterization"**. *J. Cell. Sci.* 103, 931-942.
- Czech, M. (1989). **"Signal transmission by the insulin-like growth factors"**. *Cell* 59, 235-238.

-
- Czech, M.P., Clancy, B.M., Pessino, A., Woon, C-W., and Harrison, S. (1992). **"Complex regulation of simple sugar transport in insulin-responsive cells"**. TIBS 17, 197-200

 - Dalton, S. (1992). **"Cell cycle regulation of the human cdc2 gene"**. EMBO J, 11, 1797-1804.

 - D'Ercole, A.J., Applewhite, G.T., and Underwood, L.E. (1980). **"Evidence that somatomedin is synthesized by multiple tissues in the fetus"**. Dev. Biol. 75, 315-328.

 - D'Ercole, A.J. (1993). **"Expression of insulin-like growth factor-I in transgenic mice"**. Ann. N.Y. Acad. Sci. 692, 149-160.

 - Derynck, R., Jarret, J.A., Chen, E.Y., Eaton, D.H., Bell, J.R., Assoian, R.K., Roberts, A.B., Sporn, M.B., and Goeddel, D.V. (1985). **"Human TGF- β complementary DNA sequence and expression in normal and transformed cells"**. Nature 316, 701-705.

 - Derynck, R. (1994). **"TGF- β -receptor-mediated signaling"**. TIBS 19, 548-553.

 - Deslex, S., Negrel, R., and Ailhaud, G. (1987). **"Development of a chemically defined serum-free medium for differentiation of rat adipose precursor cells"**. Exp. Cell. Res. 168, 15-30.

 - De Pagter-Holthuizen, P., Van Schaik, F.M.A., Verduijn, G.M., Van Ommen, G.J.B., Bouma, B.N., Jansen, M., and Sussenbach, J.S. (1986). **"Organization of the human genes for insulin-like growth factors I and II"**. FEBS Lett 195, 179-184.

 - Dhand, R., Hiles, I., Panayotou, G., Roche, S., Fry, M.G., Goug, I., Totty, N.S., Truong, O., Vicendo, P., Yonezawa, K., Kasuga, M., Courtneige, S., Waterfield, M.D. (1994). **"The phosphatidylinositol-3 kinase is a dual specificity enzyme : Autoregulation by an intrinsic protein serine kinase activity"**. EMBO J. 13, 522-533

-
- Dimitriadis, G., Parry-Billings, M., Bevan, S., Dunger, D., Piva, T., Krause, U., Wegener, G. and Newsholme, E.A. (1992). "Effects of insulin-like growth factor I on the rates of glucose transport and utilization in rat skeletal muscle in vitro". *Biochem. J.* 285, 269-274.
- Divecha, N., Banfic, H. and Irvine, R.F. (1991). "The polyphosphoinositide cycle exists in the nuclei of Swiss 3T3 cells under the control of a receptor (for IGF-I) in the plasma membrane, and stimulation of the cycle increases nuclear diacylglycerol and apparently induces translocation of protein kinase C to the nucleus". *EMBO J.* 10, 3207-3214.
- Dobrowolski, S., Harter, M., and Stacey, D.W. (1994). "Cellular ras activity is required for passage through multiple points of the G0/G1 phase in Balb/c 3T3 cells". *Mol. Cell. Biol.* 14, 5441-5449.
- Duronio, V. (1990). "Insulin receptor is phosphorylated in response to treatment of HepG2 cells with insulin-like growth factor I". *Biochem. J.* 270, 27-32.
- Ebner, R., Chen, R-H., Lawler, S., Zioncheck, T., and Derynck, R. (1993). "Determination of type I receptor specificity by the type II receptors for TGF- β or activin". *Science* 262, 900-902.
- Feinstein, R., Kanety, H., Papa, M.Z., Lunenfeld, B., and Karasik, A. (1993). "Tumor Necrosis Factor - α Suppresses Insulin-induced Tyrosine Phosphorylation of Insulin Receptor and Its Substrates". *J. Biol. Chem.* 268, 26055-26058.
- Fingar, D.C., and Birnbaum, M.J. (1994). "Characterization of the mitogen-activated protein kinase/90-kilodalton ribosomal protein S6 kinase signaling pathway in 3T3-L1 adipocytes and its role in insulin-stimulated glucose transport". *Endocrinology* 134, 728-735.
- Florini, J.R., Ewton, D.Z., and Roof, S.L. (1991). "Insulin-like growth factor I stimulates terminal myogenic differentiation by induction of the myogenin gene expression". *Mol. Endocrinol.* 5, 718-724.

-
- Foyt, H.L., LeRoith, D., and Roberts, Jr . (1991). "**Differential Association of Insulin-like Growth Factor I mRNA Variants with Polysomes in vivo**". J. Biol. Chem. 266, 7300-7305
- Franzen, P., Ichijo, H., and Miyazono, K. (1993). "**Different Signals Mediate Transforming Growth Factor- β 1-Induced Growth Inhibition and Extracellular Matrix Production in Prostatic Carcinoma Cells**". Exp. Cell. Res. 207, 1-7
- Furlanetto, R.W., Harwell, S.E., Frick, K.K. (1994). "**Insulin-like growth factor-I induces cyclin-D1 expression in MG63 human osteosarcoma cells in vitro**". Mol. Endocrinol. 8, 510-517.
- Garofalo, R.S., and Rosen, O.M. (1989). "**Insulin and Insulin like Growth factor 1 (IGF-1) Receptors during Central Nervous System Development: Expression of Two Immunologically Distinct IGF-1 Receptor β Subunits**". Mol. Cell. Biol. 9, 2806-2817.
- Giralt, M., Martín, I., Iglesias, R., Viñas, O., Villarroya, F., and Mampel, T. (1990). "**Ontogeny and perinatal modulation of gene expression in rat brown adipose tissue**". Eur. J. Biochem. 193, 297-302.
- Greenberg, M.E., and Ziff, E.B. (1984). "**Stimulation of 3T3 cells induces transcription of the c-fos proto-oncogene**". Nature 311, 433-438.
- Greespan, P., Mayer, E.P., and Fawles, S.D. (1985). "**Nile Red: A selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets**". J. Cell. Biol. 100, 965-973
- Guerra, C., Porras, A., Roncero, C., Benito, M., and Fernández, M. (1994). "**Triiodothyronine Induces the Expression of the Uncoupling Protein in Long Term Fetal Rat Brown adipocyte Primary Cultures: Role of Nuclear Thyroid Hormone Receptor Expression**". Endocrinology 134, 1067-1074.
- Harrington, E.A., Bennet, M.R., Fanidi, A., and Evan, G.I. (1994). "**c-Myc-induced apoptosis in fibroblasts is inhibited by specific cytokines**". EMBO J. 13, 3286-3295.

-
- Hartsough, M.T., and Mulder, K.M. (1995). "**Transforming Growth Factor β Activation of p44^{mapk} in Proliferating Cultures of Epithelial Cells**". J. Biol. Chem 270, 7117-7124.
- Heidin, C-H, and Westermark, B. (1990). "**Signal transduction by the receptor for platelet derived growth factor**". J. Cell. Sci. 96, 193-196
- Heine, U.I., Muñoz, E.F., Flanders, K.C., Ellinsworth, L.R., Lam, H.Y.P. (1987). "**Role of TGF- β in the development of the mouse embryo**". J. Cell. Biol. 105, 2861-2876.
- Heller, R.A., and Krönke, M. (1994). "**Tumor Necrosis Factor Receptor-mediated Signaling Pathways**". J. Cell. Biol. 126, 5-9.
- Hepler, J.E., Van Wyk, J.J., and Lund, P.K. (1990). "**Different half-lives of Insulin-like growth factor mRNAs that differs in length of 3'untranslated sequence**". Endocrinology 127, 1550-1552
- Hernández, E.R., Roberts, C.T.Jr, LeRoith, D., and Adashi, E. (1989). "**Rat ovarian insulin-like growth factor (IGF-I) gene expression is granulosa cell-selective: 5'-untranslated mRNA variant representation and hormonal regulation**". Endocrinology 125, 572-574.
- Hernández, E.R., Hurwitz, A., Botero, L., Ricciarelli, E., Werner, H., Jr Roberts, C.T., LeRoith, D., and Adashi, E.Y. (1991). "**The insulin-like growth factor receptor gene family in the rat ovary: divergent regulation of distinct receptor species**". Mol. Endocrinol. 5, 1799-1805.
- Ho, Y-S., Howard, A.J., and Crapo, J.D. (1988). "**Cloning and sequence of a cDNA encoding rat glucose-6-phosphate dehydrogenase**". Nucleic. Acids Res. 16.7746
- Hotamisligil, G.S., Shargill, N.S., and Spiegelman, B.M. (1993). "**Adipose Expression of Tumor Necrosis Factor- α : Direct Role in Obesity-Linked Insulin Resistance**." Science 259, 87-91.

-
- Hotamisligil, G.S., Murray, D.L., Choy, L.N., and Spiegelman, B.M. (1994). **"Tumor necrosis factor α inhibits signaling from the insulin receptor"**. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 4854-4858.
- Howe, P.H., Dobrowolski, S.F, Reddy, K.B., and Stacey, D.W.(1993). **"Release from G1 Growth Arrest by Transforming Growth Factor β 1 Requires Cellular ras Activity"**. J. Biol. Chem. 268, 21448-21452.
- Humbel, R.E. (1990) **"Insulin-like growth factors I and II"**. Eur. J. Biochem. 190, 445-462.
- Igotz, R.A., and Massagué, J. (1985). **"Type β transforming growth factor controls the adipogenic differentiation of 3T3 fibroblasts"**. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 8530-8534.
- Imbenotte, J., Liu, L., Desauty, G., and Harel, L. (1992). **"Stimulation by TGF- β of Chick Embryo Fibroblasts-Inhibition by an IGFBP-3"**. Exp. Cell. Res. 199, 229-233
- Ireland, R.C., Kotarski, M.A., Johnston, L.A., Stadler, U., Birkenmeier, E., and Kozak, L.P. (1986).**"Primary structure of the mouse glycerol-3-phosphate dehydrogenase gene"**. J. Biol. Chem. 261, 11779-11785.
- Johnson, L.F. (1992). **"G1 events and the regulation of genes for S-phase enzymes"**. Current Opinion in Cell Biology 4, 149-154.
- Jones, J.I., and Clemmons, D.R. (1995). **"Insulin-Like Growth Factors and Their Binding Proteins: Biological Actions"**. Endocrine Reviews.16, 3-34
- Kaestner, K.H., Christy, R.J., and Lane, M.D. (1990). **"Mouse insulin-responsive glucose transporter gene: characterization of the gene and transactivation by the CCAAT/enhancer binding protein"**.Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 87, 251-255
- Kataoka, R., Sherlock, J., and Lanier, S.M. (1993). **"Signaling Events Initiated by Transforming Growth Factor- β 1 That Require $G_{i\alpha 1}$."** J. Biol. Chem. 268, 19851-19857

-
- Kikuchi, K., Buonomo, F.C., Kajimoto, Y. and Rotwein, P. (1991). **"Expression of Insulin-Like Growth Factor-I during Chicken Development"**. *Endocrinology* 128, 1323-1328.
- Kim, S.J., Glick, A., Sporn, M.B., Roberts, A.B. (1989). **"Characterization of the promoter region of the human TGF- β 1 gene"**. *J. Biol. Chem.* 264, 402-408.
- Kjeldsen, T., Andersen, A.S., Wiberg, F.C., Rasmussen, J.S., Schaffer, L., Balschmidt, P., Moller, K.B., and Moller, N.P. (1991). **"The ligand specificities of the insulin receptor and the insulin-like growth factor I receptor reside in different regions of a common binding site"**. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 4404-4408.
- Klaus, S., Cassard-Doulcier, A-M., and Ricquier, D. (1991). **"Development of Phodopus Sungorus brown preadipocytes in primary cell culture: effect of an atypical beta-adrenergic agonist, insulin, and triiodothyronin on differentiation, mitochondrial development, and expression of the uncoupling protein UCP"**. *J. Cell. Biol.* 115, 1783-1790
- Klaus, S., Choy, L., Champigny, O., Cassard-Doulcier, A-M., Ross, S., Spiegelman, B., and Ricquier, D. (1994). **Characterization of the novel brown adipocyte cell line HIB 1B"**. *J. Cell. Sci.* 107, 313-319.
- Kolesnick, R., and Golde, D.W. (1994). **"The Sphingomyelin Pathway in Tumor Necrosis Factor and Interleukin-1 Signaling"**. *Cell* 77, 325-328.
- Komoly, S., Hudson, L.D., Webster, J.F., and Bondy, C.A. (1992). **"Insulin-like growth factor I gene expression is induced in astrocytes during experimental demyelination"**. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89, 1894-1898.
- Kooijman, R., Willems, M., Rijkers, G.T., Brinkman, A., Van Buul Offers, S.C., Heijnen, C.L., and Zeger, B.J. (1992). **"Effects of insulin-like growth factors and growthhormone on the in vitro proliferation of T lymphocytes"**. *J. Neuroimmunol.* 38, 95-104.

-
- Korn, L.J., Siebel, C.W., McCormick, F., and Roth, R.A. (1987). "**Ras p21 as a Potential Mediator of Insulin Action in Xenopus Oocytes**". *Science* 236, 840-843.

 - Kozak, L.P., Britton, J.H., Kozak, U.C., and Wells, J.M. (1988). "**The Mitochondrial Uncoupling Protein Gene**". *J. Biol. Chem.* 263, 12274-12277.

 - Krett, N.L., Heaton, J.H., and Gelehrter, T.D. (1987). "**Mediation of Insulin-Like Growth Factor Actions by the Insulin Receptor in H-35 Rat Hepatoma Cells**". *Endocrinology* 120, 401-408.

 - Lacal, J.C., Santos, E., Notario, V., Barbacid, M., Yamazaki, S., Kung, H-F., Seamans, C., Mc Andrew, S., and Crowl, R. (1984). "**Expression of normal and transforming H-ras genes in Escherichia coli and purification of their encoded p21 proteins**". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 5305-5309.

 - Lam, K., Carpenter, C.L., Ruderman, N.B., Friel, J.C. and Kelly, K. (1994). "**The phosphatidylinositol-3 kinase serine kinase phosphorylates IRS-1. Stimulation by insulin and inhibition by wortmannin**". *J. Biol. Chem.* 269, 20648-20652.

 - Lammers, R., Gray, A., Schlessinger, J., and Ullrich, A. (1989). "**Differential signalling potential of insulin and IGF-1-receptor cytoplasmic domains**". *EMBO J* 8, 1369-1375.

 - Landschulz, H.W., Johnson, P.F., Adashi, E.Y., Graves, B.J., and McKnight, S.L. (1988). "**Isolation of a recombinant copy of the gene encoding C/EBP**". *Genes Dev.* 2, 786-800.

 - Lee, M.G., and Nurse, P. (1987). "**Complementation used to clone a human homologue of the fission yeast cell cycle control gene cdc2**". *Nature* 327, 31-35

 - Lin, F-T., and Lane, M.D. (1994). "**CCAAT/enhancer binding protein α is sufficient to initiate the 3T3-L1 adipocyte differentiation program**". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 91, 8757-8761.

-
- Liu, J-P, Baker, J., Perkins, A.S., Robertson, E.J., and Efstratiadis, A. (1993). "Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r)." *Cell* 75, 59-72
- López-Casillas, F., Wrana, J.L., and Massagué, J. (1993). "Betaglycan presents ligand to the TGF- β signaling receptor". *Cell* 73, 1435-1444
- Lorenzo, M., Roncero, C., Fabregat, I., and Benito, M. (1988). "Hormonal regulation of rat foetal lipogenesis in brown adipocyte primary cultures". *Biochem. J.* 251, 617-620.
- Lorenzo, M., Fabregat, I., and Benito, M. (1989). "Hormonal regulation of malic enzyme expression in primary cultures of foetal brown adipocytes". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 163, 341-347.
- Lowe, W.L., Kummer, M., Karper, C.W., and Wu, X.D. (1990). "Regulation of insulin-like growth factor 1 messenger ribonucleic acid levels by serum in cultured rat fibroblast". *Endocrinology* 127, 2854-2861.
- Lowell, B.B., S-Susulic, V., Hamann, A., Lawitts, J.A., Himms-Hagen, J., Boyer, B.B., Kozak, L.P., and Flier, J.S. (1993). "Development of obesity in transgenic mice after genetic ablation of brown adipose tissue". *Nature* 366, 740-742.
- Lu, K., Levine, R.A., and Campisi, J. (1989). "c-ras-Ha gene expression is regulated by insulin or insulin-like growth factor and epidermal growth factor in murine fibroblast". *Mol. Cell. Biol.* 9, 3411-3417
- Lu, K., and Campisi, J. (1992). "Ras proteins are essential and selective for the action of insulin-like growth factor 1 late in the G₁ phase of the cell cycle in BALB/ c murine fibroblasts". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 3889-3893.
- Machwate, M., Jullienne, A., Moukhtar, M., Lomri, A., and Marie, P.J. (1995). "c-fos Protooncogene Is Involved in the Mitogenic Effect of Transforming Growth Factor- β in Osteoblastic Cells". *Mol. Endocrinol.* 9, 187-198
- Magnuson, M.A., and Nikodem, V.M. (1983). "Molecular Cloning of a cDNA Sequence for Rat Malic Enzyme". *J. Biol. Chem.* 258, 12712-12717.

-
- Mamounas, M., Gervin, D., and Englesberg, E. (1989). "**The insulin receptor as a transmitter of a mitogenic signal in Chinese hamster ovary CHO-K1 cells**". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 9294-9298.
- Manchado, C., Yubero, P., Viñas, O., Iglesias, R., Villarroya, F., Mampel, T., and Giralt, M. (1994). "**CCAAT/enhancer-binding proteins α and β in brown adipose tissue: evidence for a tissue-specific pattern of expression during development**". Biochem. J. 302, 695-700.
- Massagué, J., Blinderman, L.A., and Czech, M.P. (1982). "**The High Affinity Insulin Receptor Mediates Growth Stimulation in Rat Hepatoma Cells**". J. Biol. Chem. 257, 13958-13963.
- Massagué, J. (1987). "**Identification of receptor of type β transforming growth factor**". Methods. Enzymol. 146, 174-195.
- Massagué, J. (1990). "**The transforming growth factor- β family**". Annu. Rev. Cell. Biol. 6, 597-641.
- Massagué, J., and Polyak, K. (1995). "**Mammalian antiproliferative signals and their targets**". Curr. Opin. Gen. and Dev. 5, 91-96
- McCarthy, T.L., Thomas, M.J., Centrella, M., and Rotwein, P. (1995). "**Regulation of insulin-like growth factor I transcription by cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate (cAMP) in fetal rat bone cells through an element within exon 1: protein kinase A-dependent control without a consensus AMP response element**". Endocrinology 136, 3901-3908.
- Merchav, S., Silvan Drachsler, I., Tatarsky, I., Lake, M., and Skottner, A. (1992). "**Comparative studies of the erythroid-potentiating effects of biosynthetic human insulin-like growth factors-I and -II**". J. Clin. Endocrinol. Metab. 74, 447-452.
- Miettinen, P.J., Ebner, R., Lopez, A.R., and Derynck, R. (1994). "**TGF- β Induced Transdifferentiation of Mammary Epithelial Cells to Mesenchymal Cells: Involvement of Type I Receptors**". J. Cell. Biol. 127, 2021-2036.

-
- Misra, S., Sakamoto, K., Moustaid, N., and Sul, H.S. (1994). **"Localization of sequences for the basal and insulin-like growth factor-I inducible activity of the fatty acid synthase promoter in 3T3-L1 fibroblasts"**. *Biochem. J.* 298, 575-578.
- Moses, H.L., Yang, E.Y., and Pietenpol, J.A. (1990). **"TGF- β stimulation and inhibition of cell proliferation: new mechanistic insights"**. *Cell* 63, 245-247
- Mosley, S.T., Goldstein, J.L., Brown, M.S., Flack, J.R., and Anderson, R.G.W. (1981). **"Targeted killing of cultured cells by receptor dependent photosensitization"**. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 5717-5721.
- Moustaid, N., and Sul, H.S. (1991). **"Regulation of expression of the fatty acid synthase gene in 3T3-L1 cells by differentiation and triiodothyronine"**. *J. Biol. Chem.* 266, 18550-18554.
- Moustaid, N., Beyer, R.S., and Sul, H.S. (1994). **"Identification of an insulin response element in the fatty acid synthase promoter"**. *J. Biol. Chem.* 269, 5629-5634.
- Moxham, C.P., Duronio, V. and Jacobs, S. (1989). **"Insulin-like Growth Factor I Receptor β -Subunit Heterogeneity"**. *J. Biol. Chem.* 264, 13238-13244.
- Mulcahy, L.S., Smith, M.R., Stacey, D.W., (1985). **"Requirement of the ras proto-oncogen function during serum-stimulated growth of NIH 3T3 cells"**. *Nature* 313, 241-243
- Myers, M.G. Xiao, Jr J.S. and White M.F. (1994). **"The IRS-1 signalling system"**. *TIBS* 19, 289-294.
- Néchad, M. (1986). **"Structure and development of brown adipose tissue"**. en **"Brown adipose Tissue"**. (Trayhurn, P., y Nicholls, D. eds) pp 1-30 Ed. Edward Arnold. London.

-
- Nedergaard, J., Connolly, E., and Cannon, B. (1986). **"Brown adipose tissue in the mammalian neonate"**.en "Brown adipose Tissue". (Trayhurn, P., y Nicholls, D. eds) pp 152-213 Ed. Edward Arnold. London.
- Pahlman, S., Meyerson, G., Lindgren, E., Schalling, M. and Johansson, I. (1991). **"Insulin-like growth factor I shifts from promoting cell division to potentiating maturation during neuronal differentiation"**. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 9994-9998.
- Peter, M.A., Winterhalter, K.H., Boni-Schnetzler, M., Froesch, E.R., and Zapf, J. (1993). **"Regulation of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-Binding proteins by growth hormone in rat white adipose tissue"**. Endocrinology 133, 2624-2631.
- Pietrzkowski, Z., Lammers, R., Carpenter, G., Soderquist, A. M., Limardo, M., Phillips, P. D., Ullrich, A., and Baserga, R. (1992). **"Constitutive expression of insulin-like growth factor 1 and insulin-like growth factor 1 receptor abrogates all requirements for exogenous growth factors"**. Cel. Growth. Diff. 3, 199-205.
- Pillay, D., and Bailey, E. (1982). **"Perinatal lipogenesis in the liver and brown adipose tissue of the rat"**. Int. J. Biochem. 14, 511-517
- Poggi, C., Le Marchand-Brustel, Y., Zapf, J., Froesch, R., and Freychet, B. (1979). **"Effects and Binding of Insulin-Like Growth Factor I in the Isolated Soleus Muscle of Lean and Obese Mice: Comparison with Insulin"**. Endocrinology 105, 723-730.
- Porcu, P., Ferber, A., Pietrzkowski, Z., Roberts, C. T., Adamo, M., LeRoith, D., and Baserga, R. (1992). **"The growth-stimulatory effect of simian virus 40 T antigen requires the interaction of insulinlike growth factor 1 with its receptor"**. Mol. Cel. Biol. 12, 5069-5077.
- Porras, A., Peñas, M., Fernández, M., and Benito, M. (1990). **"Development of the uncoupling protein in the rat brown-adipose tissue during the perinatal period"**. Eur. J. Biochem. 187, 671-675.

-
- Porras, A., Nebreda, A. R., Benito, M., and Santos, E. (1992). "**Activation of Ras by Insulin in 3T3 L1 Cells Does Not Involve GTPase-activating Protein Phosphorylation**". J. Biol. Chem. 267, 21124-21131.
- Quinn, L.S., Steinmetz, B., Maas, A., Ong, L., and Kaleko, M. (1994). "**Type-1 insulin-like growth factor receptor overexpression produces dual effects on myoblast proliferation and differentiation**". J. Cell. Physiol. 159, 387-398
- Rabelo, R., Schifman, A., Rubio, A., Sheng, X., and Silva, J.E. (1995). "**Delineation of thyroid hormone-responsive sequences within a critical enhancer in the rat uncoupling protein gene**". Endocrinology 136, 1003-1013.
- Rinderknecht, E., and Humbel, R. (1978). "**The Amino Acid Sequence of Human Insulin-like Growth Factor I and Its Structural Homology with Proinsulin**". J. Biol. Chem 253, 2769-2776.
- Roberts, S., and Bentley, D. (1992). "**Distinct modes of transcription read through or terminate at the c-myc attenuator**". EMBO J. 11, 1085-93
- Robinson, L.J., Leitner, W., Draznin, B., and Heidenreich, K.A. (1994). "**Evidence that p21 ras mediates the neurotrophic effects of insulin-like growth factor I in chick forebrain neurons**". Endocrinology. 135, 2568-2573.
- Rodriguez-Viciano, P., Warne, P.H., Dhand, R., Vanhaesebroek, B., Gout, I., Fry, M.J., Waterfield, M.D., Downward, J. (1994). "**Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras**". Nature 370, 527-532.
- Roncero, C., Lorenzo, M., and Benito, M. (1987). "**Regulation of rat foetal lipogenesis in brown adipose tissue in vivo and in isolated brown adipocytes during the last day of, and after prolonged, gestation**" Biochem. J. 243, 617-620
- Ross, S.R., Choy, L., Graves, R.A., Fox, N., Solevjeva, V., Klaus, S., Riquier, D., and Spiegelman, B.M. (1992). "**Hibernoma formation in transgenic mice and isolation of a brown adipocyte cell line expressing the uncoupling protein gene**". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 7561-7565

-
- Rotwein, P., Pollock, K.M., Didier, D.K., and Krivi, G.G.(1986). **"Organization and Sequence of the Human Insulin-like Growth Factor I"**. J. Biol. Chem. 261, 4828-4832.
- Rotwein, P., Pollock, K.M., Watson, M., and Milbrandt, J.D. (1987). **"Insulin-like growth factor gene expression during rat embryonic development"**. Endocrinology 121, 2141-2144.
- Rozengurt, E., and Sinnott-Smith, J. (1983) **"Bombesin stimulation of DNA synthesis and cell division in cultures of Swiss 3T3 cells"**. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 80, 2936-2940.
- Rozengurt, E. (1991). **"Measurement of the proliferative effects of cytokines"**. In Cytokines: a practical approach. F.R. Balkwill, editor. IRL Press at Oxford University Press, Oxford. 253-259
- Rubin, C.S., Hirach, A., Fung, C., and Rosen, O.M. (1978). **"Development of Hormone Receptors and Hormonal Responsiveness *in Vitro*"**. J. Biol. Chem. 253, 7570-7578.
- Sahal, D., Ramachandran, J., and Fujita-Yamaguchi, Y. (1988). **"Specificity of Tyrosine Protein Kinases of the Structurally Related Receptors for Insulin and Insulin-like Growth Factor I: Tyr-Containing Synthetic Polymers as Specific Inhibitors or Substrates"**. Arch. Biochem. Biophys. 260, 416-420.
- Salbert, G., Fanjul, A., Piedrafita, F.J., Lu, X.P., Kim, S-J., Tran, P., and Pfahl, M. (1993). **"Retinoic acid receptors and retinoid X receptor- α down-regulate the transforming growth factor- β 1 promoter by antagonizing AP-1 activity"**. Mol. Endocrinol. 7, 1347-1356
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989) in **"Molecular cloning. A laboratory manual"**. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, New York.
- Sánchez-Margalet, V., Zoratti, R., Sung, C.K. (1995). **"Insulin-like growth factor stimulation of cells induces formation of complexes containing**

phosphatidylinositol-3-kinase, guanosine triphosphate-activating protein (GAP) and p62 GAP-associated protein". *Endocrinology* 136, 316-321.

-Santalucía, T., Camps, M., Castelló, A., Muñoz, P., Nuel, A., Testar, X., Palacín, M., and Zorzano, A. (1992). "Developmental regulation of Glut-1 (erythroid/HepG2) and Glut-4 (muscle/fat) glucose transporter expression in rat heart, skeletal muscle, and brown adipose tissue". *Endocrinology* 130, 837-846

- Sasaoka, T., Draznin, B., Leitner, J.W., Langlois, W.J., Olefsky, J.M. (1994). "She is the predominant signaling molecular coupling insulin receptors to activation of guanine nucleotide releasing factor and p21ras-GTP formation". *J. Biol. Chem.* 269, 10734-10736.

- Scheven, B.A.A. and Hamilton, N.J. (1991). "Stimulation of Macrophage Growth and Multinucleated Cell Formation in Rat Bone Marrow Cultures by Insulin-Like Growth Factor I". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 174, 647-653.

- Schumacher, R., Mosthaf, L., Schlessinger, J., Brandenburg, D., and Ullrich, A. (1991). "Insulin and Insulin-like Growth Factor-1 Binding Specificity Is Determined by Distinct Regions of Their Cognate Receptors". *J. Biol. Chem.* 266, 19288-19295

- Schwarzbauer, J.E. (1991). "Fibronectin: from gene to protein". *Curr. Opin. Cell. Biol.* 3, 786-791.

- Schwarzbauer, J.E., Tamkun, J.W., Lemischka, I.R., and Hynes, R.O. (1983) "Three different fibronectin mRNAs arise by alternative splicing within the coding region". *Cell* 35, 421-431.

- Shepherd, P.R., Navé, B.T., and Siddle, K. (1995). "Insulin stimulation of glycogen synthesis and glycogen synthase activity is blocked by wortmannin and rapamycin in 3T3-L1 adipocytes: evidence for the involvement of phosphoinositide 3-kinase and p70 ribosomal protein-S6 kinase". *Biochem. J.* 305, 25-28.

-
- Shima, A., Shinohara, Y., Doi, K., and Terada, H. (1994). **"Normal differentiation of rat brown adipocytes in primary culture judged by their expressions of uncoupling protein and the physiological isoform of glucose transporter"**. *Biochem. Biophys. Acta.* 1223, 1-8
- Shimatsu, A., and Rotwein, P. (1987). **"Mosaic Evolution of the Insulin-like Growth Factors"**. *J. Biol. Chem* 262, 7894-7900.
- Smas, C.M. and Sul, H.S. (1995). **"Control of adipocyte differentiation"**. *Biochem. J.* 309, 697-710.
- Smith, P.J., Wise, L.S., Berkowitz, R., Wan, C., and Rubin, C.S. (1988). **"Insulin-like growth factor-I is an essential regulator of the differentiation of 3T3-L1 adipocytes"**. *J. Biol. Chem.* 263, 9402-9408
- Smyth, M., and Wharton, W., (1992). **"Differentiation of A31T6 proadipocytes to adipocytes: a flow cytometric analysis"**. *Exp. Cell. Res.* 199, 29-38
- Smyth, M.J., Sparks, R.L., and Wharton, W. (1993). **"Proadipocyte cell lines: models of cellular proliferation and differentiation"**. *J. Cell. Sci.* 106, 1-9.
- Soos, M.A., and Siddle, K. (1989). **"Immunological relationships between receptors for insulin and insulin-like growth factor I"**. *Biochem J.* 263, 553-563.
- Sparks, R.L., Allen, B.J., and Strauss, E.E. (1992). **"TGF- β Blocks Early but Not Late Differentiation-Specific Gene Expression and Morphologic Differentiation of 3T3 T Proadipocytes"**. *J. Cell. Physiol.* 150, 568-577.
- Stampfer, M.R., Yaswen, P., Alhadeff, M., and Hosoda, J. (1993). **"TGF- β induction of extracellular matrix associated proteins in normal and transformed human mammary epithelial cells in culture is independent of growth effects"**. *J. Cell. Physiol.* 155, 210-221.
- Sun, X.J., Wang, L-M., Zhang, Y., Yenush, L., Myers Jr, M.G., Glasheen, E., Lane, W.S., Pierce, J.H., and White, M. (1995). **"Role of IRS-2 in insulin and cytokine signalling"**. *Nature* 377, 173-177.

-
- Sundin, U., and Cannon, B. (1980). **"GDP-binding to the brown fat mitochondria of developing and cold-adapted rats"**. *Comp. Biochem. Physiol.* B65, 463-471.

 - Surmacz, E., Nugent, P., Pietrkowski, Z., and Baserga, R. (1992). **"The Role of the IGF1 Receptor in the Regulation of cdc2 mRNA Levels in Fibroblasts"**. *Exp. Cell Res.* 199, 275-278.

 - Sutherland, C., O'Brien, R.M., and Granner, D.K. (1995). **"Phosphatidylinositol 3-kinase, but not p70/p85 ribosomal S6 protein kinase, is required for the regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) gene expression by insulin"**. *J. Biol. Chem.* 270, 15501-15506.

 - Taipale, J., Miyazono, K., Heldin, C-H, and Keski-Oja, J. (1994). **"Latent Transforming Growth Factor- β 1 Associates to Fibroblast Extracellular Matrix via Latent TGF- β Binding Protein"**. *J. Cell. Biol.* 124, 171-181.

 - Takasu, N., Takasu, M., Komiya, I., Nagasawa, Y., Asawa, T., Shimizu, Y. and Yamada, T. (1989). **"Insulin-like Growth Factor I Stimulates Inositol Phosphate Accumulation, a Rise in Cytoplasmic Free Calcium, and Proliferation in Cultured porcine Thyroid Cells"**. *J. Biol. Chem* 264, 18485-18488.

 - Tang, B., Jeoung, D-I., and Sonenberg, M. (1995). **"Effect of human growth hormone and insulin on (3 H)thymidine incorporation, cell cycle progression, and cyclin D expression in 3T3-F442A preadipose cells"**. *Endocrinology* 136, 3062-3069.

 - Thompson, N.L., Flanders, K.C., Smith, J.M., Ellingsworth, L.r., Roberts, A.B., Sporn, M.B. (1989). **"Expression of TGF- β 1 in specific cells and tissues of adult and neonatal mice"**. *J. Cell. Biol.* 108, 661-669.

 - Thorell, B. (1983). **"Flow-cytometric monitoring of intracellular flavins simultaneously with NAD(P)H levels"**. *Cytometry* 4, 61-65

-
- Torti, F.M., Torti, S.V., Larrick, J.W., and Ringold, G.M. (1989). **“Modulation of adipocyte differentiation by tumor necrosis factor and transforming growth factor beta”**. *J. Cell. Biol.* 108, 1105-1113
- Tranque, P.A., Calle, R., Naftolin, F. and Robbins, R. (1992). **“Involvement of protein kinase-C in the mitogenic effect of insulin-like growth factor-I on rat astrocytes”**. *Endocrinology* 131, 1948-1954.
- Travali, S., Reiss, K., Ferber, A., Petralia, S., Mercer, W.E., Calabretta, B., and Baserga, R. (1991). **“Constitutively expressed c-myc abrogates the requirement for insulin-like growth factor I in 3T3 cells”**. *Mol. Cell. Biol.* 11, 731-736.
- Treadway, J.L., Morrison, B.D., Goldfine, I.D., and Pessin, J.E. (1989). **“Assembly of Insulin/Insulin-like Growth Factor-1 Hybrid Receptors in Vitro”**. *J. Biol. Chem.* 264, 21450-21453.
- Tuca, A., Giralt, M., Villarroya, F., Viñas, O., Mampel, T., and Iglesias, R. (1993). **“Ontogeny of thyroid hormone receptors and c-erbA expression during brown adipose tissue development: evidence of fetal acquisition of the mature thyroid status”**. *Endocrinology* 132, 1913-1920.
- Uehara, T., Tokumitsu, Y., and Nomura, Y., (1995). **“Wortmannin inhibits insulin-induced Ras and mitogen-activated protein kinase activation related to adipocyte differentiation in 3T3-L1 fibroblasts”**. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 210, 574-580.
- Ullrich, A., Bell, J.R., Chen, E.Y., Herrera, R., Petruzzelli, L.M., Dull, T.J., Gray, A., Coussens, L., Liao, Y-C, Tsubokawa, M., Mason, A., Seeburg, P.H., Grunfeld, C., Rosen, O.M., and Ramachandran, J. (1985). **“Human insulin receptor and its relationship to the tyrosine kinase family of oncogenes”**. *Nature* 313, 756-761.
- Ullrich, A., Gray, A., Tam, A.W., Yang-Feng, T., Tsubokawa, M., Collins, C., Henzel, W., Le Bon, T., Kathuria, S., Chen, E., Jacobs, S., Francke, U., Ramachandran, J., and Fujita-Yamaguchi, Y. (1986). **“Insulin-like growth factor I receptor primary structure: comparison with insulin receptor suggests**

structural determinants that define functional specificity". EMBO J 5, 2503-2512.

- Valverde, A.M., Benito, M., and Lorenzo, M. (1991). **"Proliferation of Fetal Adipocyte Primary Cultures: Relationship with the Genetic Expression of Glucose 6 Phosphate Dehydrogenase"**. Exp. Cell Res. 194, 232-237.

- Valverde, A.M., Benito, M., and Lorenzo, M. (1992). **"Hormonal regulation of malic enzyme and glucose-6-phosphate-dehydrogenase expression in fetal brown-adipocyte primary cultures under non-proliferative conditions"**. Eur. J. Biochem. 203, 313-319.

- Van Straaten, F., Müller, R., Curran, T., Van Beveren, C., and Verma, I.M. (1983) **"Complete nucleotide sequence of a human c-onc gene: Deduced amino acid sequence of the human c-fos protein"**. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 3183-3187.

- Vivien, D., Petitfrere, E., Martiny, L., Sartelet, H., Galera, P., Haye, B., and Pujol, J-P. (1993). **"IPG (Inositolphosphate Glycan) as a Cellular Signal for TGF- β 1 Modulation of Chondrocyte Cell Cycle"**. J. Cell. Physiol. 155, 437-444

- Wang, N-d, Finegold, M.J., Bradley, A., Ou, C.N., Abdelsayed, S.V., Wilde, M.D., Taylor, L.R., Wilson, D.R., Darlington, G.J. (1995). **"Impaired energy homeostasis in C/EBP α Knockout mice"**. Science 269, 1108-1112.

- Weiland, M., Bahr, F., Hohne, M., Schurmann, A., Ziehm, D., and Joost, H.G. (1991). **"The signaling potential of the receptors for insulin and insulin-like growth factor I (IGF-I) in 3T3-L1 adipocytes: comparison of glucose transport activity, induction of oncogene c-fos, glucose transporter mRNA, and DNA-synthesis"**. J. Cell. Physiol. 149, 428-435.

- Welch, P.J., and Wang, J.Y.J. (1992). **Coordinated synthesis and degradation of cdc2 in the mammalian cell cycle"**. Proc. Natl. Acad. Sci USA 89, 3093-3097.

- Werner, H., Woloschak, M., Adamo, M., Shen-Orr, Z., Roberts, C.T., Jr. and LeRoith, D. (1989). **"Developmental regulation of the rat insulin-like growth factor I receptor gene"**. Proc Natl Acad. Sci. USA. 86, 7451-7455.

-
- Werner, H., Bach, M.A., Stannard, B., Roberts Jr, C.T, LeRoith, D. (1992) **“Structural and functional analysis of the insulin-like growth factor I receptor gene promoter”**. Mol. Endocrinol. 6, 1545-1558
- White, M. and Kahn, C.R. (1994). **“The insulin signaling system”**. J. Biol. Chem. 269, 1-4
- Wiese, R.J., Mastick, C.C., Lazar, D.F., and Saltiel, A.R. (1995). **“Activation of mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3'-kinase is not sufficient for the hormonal stimulation of glucose uptake, lipogenesis, or glycogen synthesis in 3T3-L1 adipocytes”**. J. Biol. Chem. 270, 3442-3446.
- Williams, P.M., Chang, D.J., Danesch, U., Ringold, G.M., and Heller, R.A. (1992). **“CCAAT/Enhancer Binding Protein Expression Is Rapidly Extinguished in TAI Adipocyte Cells Treated with Tumor Necrosis Factor”**. Mol. Endocrinol. 6, 1135-1141.
- Wrana, J.L., Attisano, L., Wieser, R., Ventura, F., and Massagué, J. (1994). **“Mechanism of activation of the TGF- β receptor”**. Nature 370, 341-347.
- Yamamoto, K., Altschuler, D., Wood, E., Horlick, K., Jacobs, S. and Lapetina, E.G. (1992). **“Association of Phosphorylated Insulin-like Growth Factor-I Receptor with the SH2 Domains of Phosphatidylinositol 3-Kinase p85”**. J. Biol. Chem. 267, 11337-11343.
- Yee, D., Lebovic, G.S., Marcus, R.R., and Rosen, N. (1989). **“Identification of an Alternate Type I Insulin-like Growth Factor Receptor β subunit mRNA Transcript”**. J. Biol. Chem. 264, 21439-21441.
- Yeh, W-C., Cao, Z., Classon, M., and McKnight, S.L. (1995). **“Cascade regulation of terminal adipocyte differentiation by three members of the C/EBP family of leucine zipper proteins”**. Genes & Dev. 9, 168-181.
- Yoshinouchi, M., Miura, M., Gaozza, E., Li, S-W, and Baserga, R. (1993). **“Basic fibroblast growth factor stimulates DNA synthesis in cells overexpressing the insulin-like growth factor-1 receptor”**. Mol. Endocrinol. 7, 1161-1168.

-
- Yubero, P., Manchado, C., Cassard-Doulcier, A-M., Mampel, T., Viñas, O., Iglesias, R., Giralt, M., and Villarroya, F. (1994 a). **“CCAAT/Enhancer binding proteins α and β are transcriptional activators of the brown fat uncoupling protein gene promoter”**. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 198, 653-659.
- Yubero, P., Viñas, O., Iglesias, R., Mampel, T., Villarroya, F., and Giralt, M. (1994b). **“Identification of tissue-specific protein binding domains in the 5'-proximal regulatory region of the rat mitochondrial brown fat uncoupling protein gene”**. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 204, 867-873.
- Zhou-Li, F., D'Ambrosio, C., Li, S., Surmacz, E., Baserga, R. (1995). **“Association of insulin receptor substrate 1 with simian virus 40 large T antigen”**. *Mol. Cell. Biol.* 15, 4232-4239.