

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE FARMACIA**  
**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular**



**Proliferación y diferenciación celular en cultivos primarios de  
adipocitos marrones fetales**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR**

**Ángela María Martínez Valverde**

**Directores**

**Margarita Lorenzo Balado**

**Manuel Benito de las Heras**

**Madrid 2005**

**ISBN: 978-84-8466-891-6**

**© Ángela María Martínez Valverde, 1991**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE FARMACIA**

**PROLIFERACION Y DIFERENCIACION CELULAR EN  
CULTIVOS PRIMARIOS DE ADIPOCITOS MARRONES**

**TESIS DOCTORAL**

**Angela María Martínez Valverde**

**Junio 1991**

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

**PROLIFERACION Y DIFERENCIACION CELULAR EN CULTIVOS  
PRIMARIOS DE ADIPOCITOS MARRONES**

*Memoria presentada por la Licenciada  
ANGELA MARIA MARTINEZ VALVERDE, para  
aspirar al Grado de Doctor en Farmacia.*

*Madrid 1991*

Este trabajo ha sido realizado íntegramente en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II, de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la dirección de los Doctores Dña. Margarita Lorenzo Balado y D. Manuel Benito de las Heras durante los cursos: 1988-89, 1989-90 y 1990-91.

Para la realización de este trabajo se concedió una Beca del Plan Nacional de Formación del Personal Investigador del C.S.I.C.

Deseo expresar mi más sincero y profundo agradecimiento a los Dres. Margarita Lorenzo Balado y Manuel Benito de las Heras, directores de esta Tesis por su constante estímulo, ayuda y dedicación, por su contribución a mi formación científica y por sus buenos consejos.

A la Dra. Isabel Fabregat por su valiosa colaboración en el trabajo de las purificaciones enzimáticas, así como por todo el tiempo que me ha dedicado y la amistad que me ha brindado.

A Almudena Porras, Cristina Molero, Carmen de Juan, Carmen Guerra, Margarita Fernandez y César Roncero por su ayuda, amistad y por los momentos tan agradables que hemos disfrutado juntos en el laboratorio.

A Javier Arroyo, Alfonso Mendoza y Alberto Alvarez del Departamento de Microbiología y a Fernando de Jesús del Departamento de Química Inorgánica por su valiosa colaboración.

A todo el resto de mis compañeros y amigos del Departamento, en especial a Teresa Lupiani y Julia Navarro por su ayuda y amistad durante todos estos años.

A mi familia y amigos por darme todo el ánimo y comprensión que he necesitado para la realización de este trabajo.

*A Fernando*  
*A mis padres*

## ABREVIATURAS

ADP	adenosín difosfato
A <sub>s</sub>	actividad enzimática específica
ATP	adenosín trifosfato
BSA	albúmina bovina sérica
cAMP	3'5' adenosín monofosfato cíclico
cDNA	ácido desoxirribonucleico recombinante
D	daltons
DEPC	dietil pirocarbonato
DNA	ácido desoxirribonucleico
DO	densidad óptica
DPM	desintegraciones por minuto
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilén-diamino-tetracético
EGTA	ácido etilén-glicol-bis-(β-aminoetileter) N,N'tetracético
G <sub>i</sub>	proteína G inhibidora
G6PD	glucosa 6-fosfato deshidrogenasa
GTP	guanosín 5' trifosfato
Hepes	ácido N-2 hidroximetil-piperacina-N'2-etano-sulfónico
IBMX	isobutil-metil-xantina
Kb	kilobases
KD	kilodaltons
MOPS	ácido morfolino-propano-sulfónico



## INDICE

### I- INTRODUCCION

Plan general de trabajo

### II- ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS

<b>2.1 <u>BASES MOLECULARES DE LA PROLIFERACION CELULAR</u></b>	<b>1</b>
2.1.1 Ciclo celular	1
2.1.2 Factores de crecimiento: estructura y función	3
2.1.2.1 Factor de crecimiento epidérmico	3
2.1.2.2 Factor de crecimiento derivado de plaquetas	6
2.1.2.3 Factores de crecimiento insulínicos tipos I y II	8
2.1.2.4 Factores de crecimiento implicados en la transformación	12
2.1.2.4.1 TGF- $\alpha$	12
2.1.2.4.2 TGF- $\beta$	13
2.1.2.5 Factores de crecimiento fibroblásticos	16
2.1.2.6 Bombesina	17
2.1.2.7 Vasopresina	20
2.1.2.8 Endotelina	21
2.1.2.9 Papel del cAMP en la proliferación celular	22
<b>2.2 <u>CARACTERISTICAS GENERALES DEL TEJIDO ADIPOSEO MARRON</u></b>	<b>25</b>
2.2.1 Desarrollo y diferenciación del tejido adiposo marrón en la rata	26
2.2.2 Función termogénica del tejido adiposo marrón	27
2.2.3 Función lipogénica del tejido adiposo marrón	29
2.2.3.1 Regulación de la expresión genética de la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa	32
2.2.3.2 Regulación de la expresión genética de la enzima málica	34
<b>III- MATERIAL Y METODOS</b>	<b>38</b>
3.1 Animales de experimentación	38
3.2 Medios instrumentales	38
3.3 Productos	40

3.4	Condiciones del animalario y control de la edad gestacional	41
3.5	Obtención del tejido adiposo marrón	42
3.6	Cultivo primario de adipocitos marrones fetales de rata	42
3.6.1	Soluciones y medios de cultivo	42
3.6.2	Aislamiento de adipocitos marrones	43
3.6.3	Cultivo de adipocitos marrones	44
3.7	Determinación de actividades enzimáticas	45
3.7.1	Determinación de la actividad enzima málica	46
3.7.2	Determinación de la actividad G6PD	46
3.7.3	Determinación de proteínas	47
3.7.4	Expresión de resultados y tratamiento estadístico de los mismos	47
3.8	Purificación de la enzima málica y G6PD	48
3.8.1	Purificación de la enzima málica	49
3.8.2	Purificación de la G6PD	50
3.9	Electroforesis en geles de poliacrilamida	52
3.10	Preparación de los antisueros	53
3.10.1	Ensayo de doble inmunodifusión	53
3.10.2	Titulación de los anticuerpos obtenidos	54
3.11	Transferencia de proteínas a filtros de nitrocelulosa	54
3.12	Inmunodetección de las proteínas	55
3.13	Ensayo de inmunotitulación con células en cultivo	56
3.14	Medida de la síntesis de DNA en adipocitos marrones en cultivo	57
3.15	Contaje de células de las placas de cultivo y estudio del ciclo celular	57
3.16	Determinación del contenido en DNA de las placas de cultivo	58
3.17	Aislamiento de los cDNAs	59
3.18	Obtención de los DNAs plasmídicos	60
3.19	Digestión del DNA plasmídico	61
3.20	Electroforesis de los DNAs en geles de agarosa	62

3.21 Electroelución de los cDNAs	63
3.22 Aislamiento de los RNAs de las placas de cultivo	64
3.23 Electroforesis del RNA en geles de agarosa-formaldehido	65
3.24 Transferencia de los RNAs a filtros de nitrocelulosa	66
3.25 Marcaje radiactivo de los cDNAs	66
3.26 Prehibridación e hibridación de los filtros de nitrocelulosa	67
3.27 Revelado de las autorradiografías	68
3.28 Rehibridación de los filtros de nitrocelulosa	68
3.29 Ensayo de Dot-Blot	69
3.30 Tinción de los filtros de nitrocelulosa con azul de metileno	69
<b>IV RESULTADOS Y DISCUSION</b>	<b>70</b>
4.1 <u>ESTUDIO DE LA PROLIFERACION DE LOS ADIPOCITOS MARRONES FETALES DE RATA EN CULTIVO PRIMARIO</u>	70
4.1.1 Efecto de los factores de crecimiento sobre la síntesis de DNA y parámetros asociados	70
4.1.2 Efecto de los factores de crecimiento sobre la expresión genética de la G6PD	76
4.2 <u>REGULACION HORMONAL DE LA EXPRESION GENETICA DE LA ENZIMA MALICA Y G6PD EN CULTIVOS PRIMARIOS DE ADIPOCITOS MARRONES FETALES DE RATA EN CONDICIONES NO PROLIFERATIVAS</u>	81
4.2.1. Regulación hormonal de la expresión genética de la enzima málica en cultivos primarios de adipocitos marrones fetales de rata en condiciones no proliferativas	82
4.2.2. Regulación hormonal de la expresión genética de la G6PD en cultivos primarios de adipocitos marrones fetales de rata en condiciones no proliferativas	85
<b>V CONCLUSIONES</b>	<b>89</b>
<b>VI BIBLIOGRAFIA</b>	<b>92</b>

## **I-INTRODUCCION**

Durante el desarrollo embrionario-fetal tienen lugar procesos de proliferación celular dirigidos por factores de crecimiento y protooncogenes. La quiescencia celular, con carácter general, permite el inicio de los procesos de diferenciación que hacen posible la organogénesis, es decir, una distribución orgánico-funcional de los organismos superiores.

Las células fetales de mamíferos tienen y mantienen una competencia proliferativa a lo largo de su desarrollo. Dicha competencia proliferativa se basa en la existencia de receptores celulares que permiten a las mismas recibir las diferentes señales de su entorno. Estas señales se generan en las propias células produciéndose efectos autocrinos, en células vecinas a través de efectos paracrinos y, finalmente, en células distantes a través de efectos endocrinos. Dichas señales tienen un carácter fundamentalmente embriogénico, potenciando inicialmente la proliferación celular. En una segunda fase, algunas de estas mismas señales desencadenan la diferenciación de las células generadas en la fase anterior. De esta manera, las células embrionarias como los fibroblastos, pluripotentes, son capaces de diferenciarse en células de tejidos con una función especializada.

Aunque las señales extracelulares son de origen muy diverso, las vías que transducen dichas señales hasta el núcleo, bien con objeto de iniciar el ciclo celular o con objeto de iniciar la expresión génica diferenciadora, están muy integradas. Por ello, los productos de expresión de los protooncogenes celulares, tanto citoplasmáticos como nucleares, forman parte de esas vías de transmisión de señales mitogénicas o diferenciadoras, pudiendo tener ambas funciones que se ejercitan separadamente.

En consecuencia, la mayoría de las células de mamíferos presentan en su programa de desarrollo una dualidad proliferación/diferenciación.

La Memoria de Tesis Doctoral que se presenta pretende abordar experimentalmente dicha cuestión de fondo. Por ello, se va a estudiar en cultivos de células primarias fetales, procedentes de rata, su capacidad proliferativa y su capacidad madurativo-diferenciadora. Efectivamente, nuestro modelo celular de adipocitos marrones de

feto de rata ya han alcanzado un cierto grado de diferenciación celular. Sin embargo, dichas células pueden ser reinducidas hacia un programa de proliferación celular que detenga su diferenciación, o por el contrario pueden ser inducidas a un programa diferenciador que amplifique su perfil de expresión génica una vez que dichas células han sido previamente mantenidas en estado quiescente.

Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto el objetivo de esta Tesis Doctoral ha sido doble. Por un lado se ha pretendido establecer un modelo experimental para la realización de los estudios de proliferación celular de adipocitos marrones fetales de rata, caracterizando los principales factores de crecimiento implicados en la respuesta proliferativa de estas células.

Por otro lado, en adipocitos marrones fetales en quiescencia, donde las células presumiblemente expresan un fenotipo diferenciado altamente lipogénico, se ha estudiado la expresión genética de dos enzimas lipogénicas: la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa y la enzima málica, así como el efecto de las hormonas que controlan el flujo lipogénico ejercen sobre dichas enzimas.

De acuerdo con los objetivos anteriormente expuestos nos propusimos el siguiente **plan de trabajo**:

**1-Establecimiento de un modelo experimental de proliferación celular en adipocitos marrones fetales de rata.**

1.1 Estudio de la síntesis de DNA por incorporación de  $^3\text{H}$ -Timidina, número de células y contenido en DNA.

1.2 Estudio de los factores de proliferación sobre la síntesis de DNA.

1.3 Caracterización de las células proliferantes por citometría de flujo.

1.4 Expresión génica de la G6PD como enzima marcadora de proliferación celular

**2- Expresión genética de enzimas lipogénicas en adipocitos marrones fetales en quiescencia**

2.1 Efecto de la insulina,  $T_3$  y noradrenalina sobre la actividad enzimática, cantidad de proteína y concentración de mRNA de la enzima málica a 6 y 10 días de cultivo.

2.2 Efecto de la insulina,  $T_3$  y noradrenalina sobre la actividad enzimática, cantidad de proteína y concentración de mRNA de la G6PD a 6 y 10 días de cultivo.

## **II-ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS**

## **2.1 BASES MOLECULARES DE LA PROLIFERACION CELULAR**

La proliferación celular es un proceso cuidadosamente regulado que responde a necesidades específicas del organismo. Sin embargo, los estudios relacionados con la división celular han avanzado despacio y todavía hoy continúan estableciéndose las etapas claves para comprender los elementos que contribuyen a estimular y controlar los procesos de crecimiento. Es en este aspecto donde nos vamos a detener con el fin de analizar los estudios realizados en estos últimos años sobre los factores que inducen o inhiben la proliferación celular , así como su mecanismo de acción.

### **2.1.1 Ciclo celular**

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 un 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  $G_1$  las células aumentan de tamaño. Después, replican todos sus cromosomas en la fase de síntesis o fase S. A continuación sucede una segunda fase de crecimiento  $G_2$  donde las células se preparan para la división celular y finalmente se dividen en la fase M de mitosis para posteriormente llegar a una bifurcación tras la división del citoplasma (citocinesis). Todas las células hijas producto de la división celular pueden volver a entrar en el ciclo y dividirse de nuevo.

La duración del ciclo celular varía de unas células a otras. La mayoría de las líneas celulares mantenidas en cultivo a 37°C emplean entre 18 y 24 horas. Las

fases  $G_1$ , S y  $G_2$  se denominan en conjunto interfases.  $G_1$  y S suelen durar entre 8 y 10 horas,  $G_2$  dura aproximadamente 4-5 horas, mientras que las células experimentan la división celular en un tiempo muy corto, alrededor de una hora. Sin embargo, una célula hija también puede abandonar el ciclo celular y entrar en la fase  $G_0$  o quiescencia donde se diferencia hasta adquirir la capacidad para desempeñar la tarea que le corresponda en alguno de los tejidos del organismo.

Recientes estudios sobre la regulación del ciclo celular indican que la fase de mitosis es inducida mediante la activación de un complejo denominado MPF que contiene la proteína  $p34^{cdc2}$  y las ciclinas. La proteína  $p34^{cdc2}$  presenta gran analogía con proteínas kinasas conocidas. Su concentración no varía durante el ciclo celular aunque sí lo hace su actividad serina-treonina kinasa, capaz de fosforilar la histona H1. Las ciclinas son las moléculas reguladoras del complejo MPF. Estas moléculas presentan pesos moleculares de 45-55 KD y se aislaron inicialmente de embriones procedentes de invertebrados marinos. Estas proteínas se sintetizan de manera continua durante la interfase, degradándose rápidamente al final de la mitosis (Draetta, 1990,; Glotzer y col., 1991; Freeman y Donoghue, 1991).

En la fase  $G_1$  del ciclo celular, la proteína  $p34^{cdc2}$  se encuentra defosforilada y carece de actividad kinasa. Sin embargo, cuando las células pasan por las fases S y  $G_2$  se inicia una progresiva fosforilación de la molécula en residuos tirosina y treonina. Recientemente se ha descrito que en células humanas HeLa el producto del oncogén *src*, que posee actividad kinasa, es capaz de fosforilar los residuos tirosina de la proteína  $p34^{cdc2}$ . Paralelamente, la ciclina B acumulada durante las fases S y  $G_2$  forma un complejo con  $p34^{cdc2}$ . Al final de  $G_2$  el complejo se activa defosforilándose en residuos tirosina la proteína  $p34^{cdc2}$  y fosforilándose la ciclina, de manera que presenta su máxima actividad en la fase M. Cuando la célula abandona la fase mitótica, se inicia una progresiva degradación de la ciclina B por mecanismos todavía poco claros que conduce a la inactivación del complejo MPF (Glotzer y col, 1991). También se ha encontrado un complejo  $p34^{cdc2}$ -ciclina A activo en las fases  $G_2$  y S pero ausente en la mitosis. De esta manera, se ha descrito en el ciclo celular humano una activación del complejo  $p34^{cdc2}$ -ciclina A previa a la activación de  $p34^{cdc2}$ -ciclina B (Draetta, 1990; Freeman y Donoghue,

1991).

Además del complejo MPF existen otras moléculas reguladoras del ciclo celular. Recientemente se ha descrito la proteína p105-RB de 105 KD, producto del gen supresor del tumor de retinoblastoma, como una proteína nuclear que actúa inhibiendo la proliferación celular (Buchkovich y col., 1989). En la fase G<sub>1</sub> la proteína p105-RB se encuentra defosforilada y activa impidiendo la progresión de las células en el ciclo celular. Sin embargo, cuando la proteína se fosforila en las fases S y G<sub>2</sub> pierde su actividad inhibidora de la proliferación celular. En el esquema 1 se muestra el proceso global de regulación del ciclo celular.

Cuando células quiescentes se someten a una serie de estímulos, conocidos globalmente como mitógenos, entran de nuevo en ciclo celular y se dividen.

### **2.1.2 Factores de crecimiento: estructura y función**

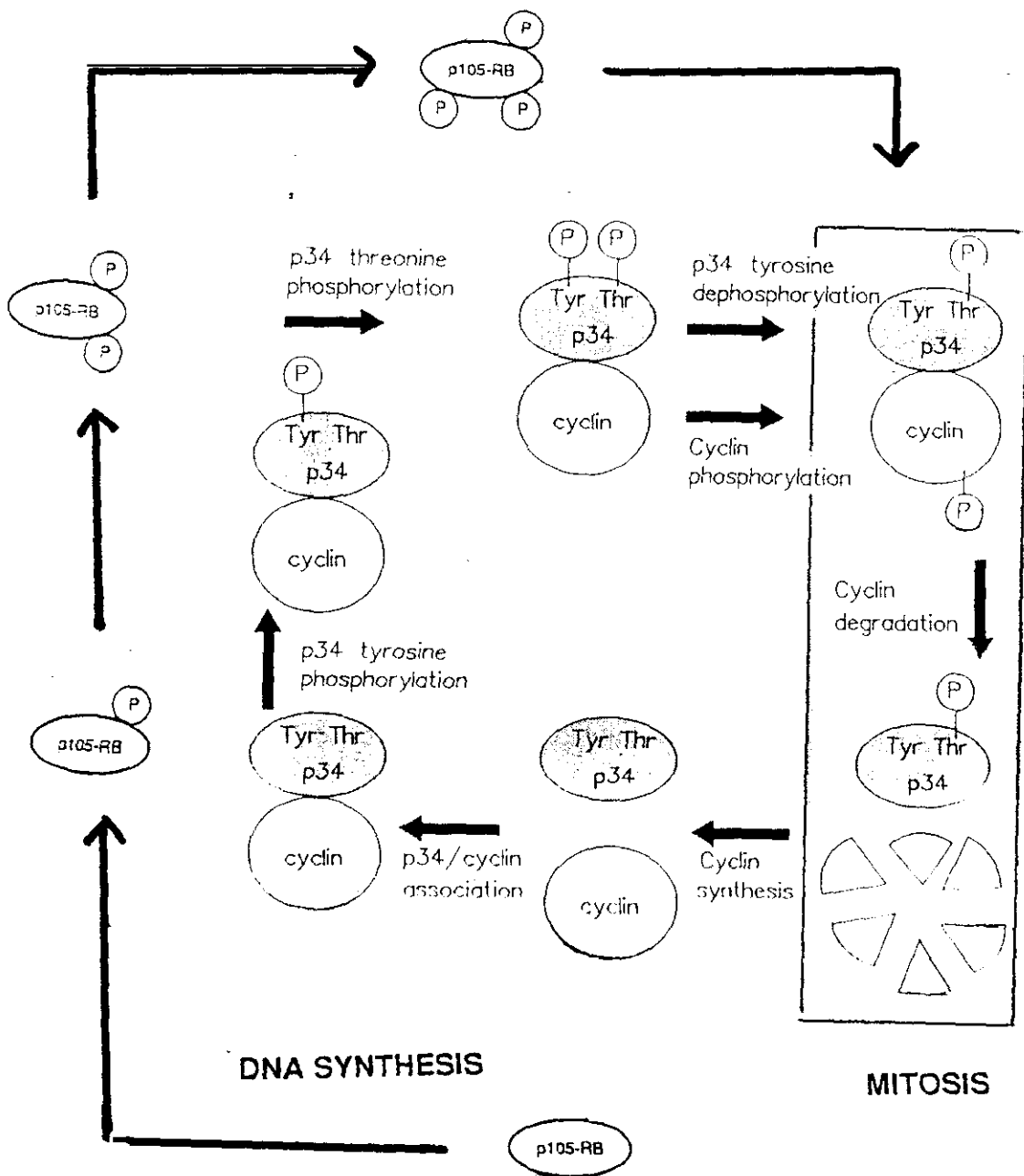
Los factores de crecimiento constituyen un amplio grupo de moléculas polipeptídicas cuyo peso molecular oscila entre 1000 y 40.000 D. Sus efectos fisiológicos "in vivo" están relacionados con la estimulación del crecimiento embrionario y fetal durante el desarrollo, la regulación de los procesos de proliferación-diferenciación de tejidos que regeneran continuamente y finalmente la estimulación de los procesos de reparación tisular (Heldin y Westermarck, 1989).

La aplicación de las técnicas de la Biología Molecular ha proporcionado una amplia información sobre la estructura tanto de los factores de crecimiento como de los receptores a los que estos se unen. Asimismo, se han podido relacionar factores de crecimiento y receptores con productos oncogénicos. Finalmente, se han podido conocer los mecanismos celulares que proporcionan la respuesta mitogénica.

#### **2.1.2.1 Factor de crecimiento epidérmico**

El factor de crecimiento epidérmico (EGF) es un polipéptido constituido por una cadena sencilla de 53 residuos aminoacídicos con un peso molecular de alrededor

**ESQUEMA 1** Esquema del proceso de regulación del ciclo celular



de 6.000 D y punto isoelectrico 4.6. En su estructura carece de alanina, fenilalanina y lisina y posee tres puentes disulfuro que deben estar intactos para mantener su actividad biológica. Por tanto, la presencia de mercaptoetanol y urea u otros agentes reductores transforman el EGF en un polipéptido carente de actividad biológica (Carpenter y Cohen, 1979).

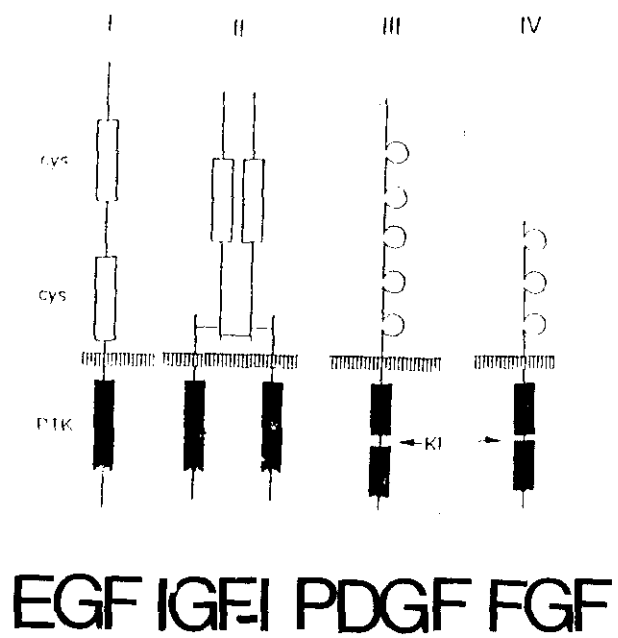
El EGF suele aislarse de la glándula submaxilar del ratón adulto macho como un componente de una molécula compleja de 1.200 residuos que posee en la región carboxilo terminal una secuencia hidrofóbica característica de una proteína de membrana . Sin embargo, los mecanismos por los cuales la molécula precursora libera el EGF no se conocen todavía. Algunas células, como es el caso de ciertas células renales, acumulan la molécula precursora que es capaz de retener la actividad biológica del EGF (Carpenter y Cohen, 1990).

El receptor de EGF se compone de una cadena polipeptídica sencilla de 1.186 aminoácidos y un peso molecular de 170.000 D. En su estructura (esquema 2) existen tres regiones o dominios. Un dominio extracelular por donde se une la molécula de EGF, un dominio hidrofóbico transmembranal y un dominio citoplasmático poseedor de una actividad tirosina kinasa que es común en numerosos productos oncogénicos (Ullrich y col., 1984).

El dominio extracelular del receptor de EGF es el responsable de la unión al ligando y contiene 10-11 cadenas de oligosacáridos y un 10% de residuos cisteina. Se ha propuesto que la región implicada en la unión al ligando estaría comprendida entre la dos zonas ricas en residuos cisteina existentes en el dominio extracelular (Carpenter y Cohen, 1990).

El dominio citoplásmico del receptor del EGF presenta una alta homología con el producto del oncogén erbB del virus de la eritroblastosis de aves (Ullrich y col., 1984). En la región carboxilo terminal existen cuatro sitios de autofosforilación en tirosina que desempeñan un papel fundamental en la regulación de la proliferación celular. Asimismo, se han descrito siete lugares de fosforilación en serina y treonina próximos a la región tirosina kinasa. Las fosforilaciones en serina y treonina se han atribuido a otras kinasas tales como la proteína kinasa C y se ha descrito que dichas fosforilaciones atenúan la actividad tirosina kinasa del dominio citoplásmico y en algunas células resulta también afectado el dominio extracelular (Carpenter y

**ESQUEMA 2 Receptores de los factores de crecimiento**



Cohen, 1990).

La unión del EGF a su receptor produce una inmediata activación de la actividad tirosina kinasa fosforilándose el propio receptor además de otros sustratos exógenos. Se han descrito algunas moléculas que son sustratos exógenos de la actividad tirosina kinasa del receptor del EGF: la fosfolipasa C- $\gamma$ 1, la fosfoinositol-3-kinasa, la proteína GAP y las serina-treonina kinasas MAP-kinasa y raf-kinasa. De todas ellas la fosfolipasa C- $\gamma$ 1 ha sido la mejor caracterizada y constituye una de las isoenzimas que hidroliza el fosfatidilinositol 4,5-difosfato en inositol 3-fosfato y diacilglicerol (Rhee y col., 1989). Asimismo se ha descrito que el receptor de insulina, poseedor también de una actividad tirosina kinasa intrínseca, no es capaz de fosforilar la fosfolipasa C- $\gamma$ 1 (Meisenhelder y col., 1989).

La proteína GAP se ha descrito como un activador de la actividad GTPásica del oncogén ras siendo su fosforilación por el receptor de EGF paralela a la traslocación de GAP a la membrana (Molloy y col., 1990).

Además de la activación de la tirosina kinasa producida como consecuencia de la unión del EGF a sus receptores de membrana algunos autores como Pike y Eakes (1987) han descrito un rápido aumento de las concentraciones de inositol-3-fosfato en células A431s estimuladas por EGF.

Las acciones biológicas ejercidas por el EGF han sido objeto de numerosas investigaciones. Mediante la utilización de los cultivos celulares se ha encontrado un aumento en la síntesis de DNA en presencia de EGF en: células epiteliales de la lente de conejo, células fibroblásticas humanas y de ratón, células epiteliales de mamíferos, células endoteliales humanas y bovinas, células renales de mono, hepatocitos de rata etc... En estas células blanco, el EGF aumenta la velocidad de crecimiento y de división celular. Como cabría esperar, hay un aumento generalizado en la biosíntesis de DNA, RNA y proteínas. También se producen cambios a nivel de membrana plasmática y aumentos en la síntesis y secreción de prostaglandinas. El EGF produce asimismo respuestas anabólicas rápidas similares a los efectos de la insulina. El transporte de glucosa, de aminoácidos y de precursores de ácidos nucleicos está aumentado así como la actividad Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPasa (Carpenter y Cohen, 1979)

En células fetales se han descrito efectos del EGF como la estimulación de la

síntesis de surfactante en células fibroblásticas de pulmón de ratón (Nielsen, 1989) así como la proliferación de células hepáticas fetales de rata (Henderson y col., 1989).

#### **2.1.2.2. Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)**

Es un mitógeno que se encuentra en dichas células liberándose durante la reacción de coagulación de la sangre y constituye el principal factor de crecimiento para células mesenquimáticas, de músculo liso y de células gliales (Ross y col., 1986). Estructuralmente es un dímero de 30.000 D de peso molecular compuesto por dos cadenas polipeptídicas A y B unidas entre sí por puentes disulfuro (Heldin y Westermark, 1989). Las subunidades A y B aunque son codificadas por distintos genes presentan un 56% de homología entre sí siendo la cadena B un producto del gen *c-sis* del cual procede el oncogén denominado *v-sis* del virus del sarcoma de simios. Asimismo, la proteína producto de *v-sis* se ha denominado  $p^{28sis}$ , tiene un peso molecular de 28.000 D y presenta un 95% de homología con la cadena B del PDGF (Hannik y Donoghue, 1989). Se han encontrado las tres isoformas del PDGF: PDGF AA, PDGF BB y PDGF AB tanto en plaquetas como en células transformadas. Estas tres isoformas difieren entre sí en su actividad biológica. Por ejemplo, a diferencia del PDGF AB, el PDGF AA tiene poca actividad mitogénica en fibroblastos humanos (Nistér y col., 1988) pero es un potente mitógeno para células Swiss 3T3 (Heldin y Westermark, 1989). Estas diferencias fundamentales entre las distintas moléculas de PDGF se deben a la existencia de dos tipos de receptores para este mitógeno. El receptor tipo A liga las tres isoformas con igual afinidad y el receptor tipo B liga solo PDGF BB con alta afinidad, mientras que la afinidad de este receptor por el PDGF AB es mucho menor y prácticamente nula para el PDGF AA (Heldin y col., 1988; Hart y col., 1988). A diferencia con el propio PDGF, solo se ha encontrado un gen que codifica para ambos tipos de receptores y todavía no se conocen las diferencias estructurales que podrían justificar las diferencias funcionales entre ambos tipos de receptores. Su estructura es semejante a la de otros receptores transmembranales conocidos y consiste en un

dominio extracelular de unión al ligando, una región hidrofóbica de transmembrana y un dominio intracelular con actividad tirosina Kinasa (esquema 2). Por tanto, se han encontrado fosforilaciones de proteínas como consecuencia de la estimulación de fibroblastos quiescentes con PDGF. Sin embargo, no se conoce todavía el mecanismo por el cual estas fosforilaciones están implicadas en el proceso mitogénico. Además de la activación de la tirosina kinasa del receptor del PDGF, se han encontrado otros mecanismos celulares tras la estimulación de células quiescentes con este factor tales como alteraciones en el transporte iónico, modificaciones en los elementos del citoesqueleto, activación de serina-treonina kinasas como la proteína kinasa C y la S6 kinasa así como la activación de la vía de los inositoles fosfato (Hannik y Donoghue, 1989). En células Swiss 3T3 se ha descrito una rápida hidrólisis de los lípidos inositoles de membrana en respuesta a PDGF (Berridge y col., 1984). Sin embargo, recientemente Cattaneo y Vicentini (1989) han descrito que a diferencia del receptor de bombesina, la estimulación de la fosfolipasa C por PDGF no estaría mediada por proteínas G estimuladoras pudiendo estar implicada la actividad tirosina kinasa de su receptor. Estos autores proponen la necesidad de realizar nuevos estudios que relacionen la activación de la fosfolipasa C por factores que se unen a receptores tipo tirosina kinasa como es el caso del PDGF.

La presencia de PDGF puede alterar los receptores de otros factores de crecimiento. En fibroblastos tratados con PDGF se ha descrito un incremento en la expresión de los receptores de IGF-1 (Clemmons y col., 1980). Por el contrario, la afinidad del EGF por su receptor disminuye en presencia de PDGF, probablemente como consecuencia de la fosforilación por la proteína kinasa C del receptor de EGF (Hunter y col., 1984).

El PDGF también regula la expresión genética a nivel de transcripción. Así, la transcripción de algunos proto-oncogenes celulares como c-myc y c-fos se activa como consecuencia del tratamiento de células quiescentes con PDGF (Hannik y Donoghue, 1989).

### 2.1.2.3 Factores de crecimiento insulínicos tipo I y II

Son dos polipéptidos aislados de la fracción Cohn del suero humano con efecto mitogénico "in vitro" a concentraciones del rango de nanomolar en muchos tipos celulares. Asimismo, presentan efectos tipo insulina en los tejidos adiposo y muscular ya que su estructura es muy semejante a la del precursor de esta hormona (Rinderknecht y Humbel, 1978). También se conocen con el nombre de somatomedinas. Estructuralmente son cadenas polipeptídicas sencillas de 7.500 D de peso molecular que constan de 70 aminoácidos el IGF-I y 67 el IGF-II y circulan en plasma a concentraciones de 20-80 nM. El IGF circulante se produce en hígado, mientras que el IGF tisular es de producción local. La expresión del IGF-I y en menor grado del IGF-II se encuentran reguladas por la hormona de crecimiento (GH) siendo principalmente el IGF-I un inhibidor por retroalimentación a nivel pituitario de la GH (Humbel, 1990).

Las cadenas polipeptídicas de los IGFs contienen cuatro regiones denominadas B, C, A y D de las cuales las regiones A y B son homólogos estructurales de las cadenas A y B de la insulina. Asimismo, la región C es análoga al péptido C existente en la proinsulina. Sin embargo, la región D no se ha encontrado en dicha hormona (Humbel, 1990). En la estructura de estos factores de crecimiento cabe destacar la existencia de tres puentes disulfuro localizados en idénticas posiciones que las descritas para la insulina (Rinderknecht y Humbel, 1978).

Estas cadenas polipeptídicas son producto de un único gen que se localiza en humanos a nivel del cromosoma 12 para el IGF-I y en el 11 para el IGF-II en posición contigua al gen de la insulina. Rotwein (1986) ha descrito dos mRNAs diferentes como resultado de la transcripción del gen que codifica para el IGF-I, siendo el producto de la traducción de ambos la molécula polipeptídica precursora de dicho factor.

Se han descrito algunas moléculas similares estructuralmente a los IGFs pero carentes de algunos residuos aminoacídicos. Por ejemplo, existe un derivado del IGF-I en cerebro fetal y adulto humano que ha perdido los tres primeros aminoácidos del extremo N-terminal. En estas células este derivado es aún mas potente que la molécula de IGF-I completa. Asimismo, en el fluido espinal de

humanos existe un derivado del IGF-II de 9 kilodaltons (Humbel, 1990).

El receptor de IGF-I es un análogo estructural del receptor de la insulina y consiste en un heterotetrámero glicosilado compuesto por dos subunidades  $\alpha$  y dos subunidades  $\beta$  de 115 y 90 KD respectivamente unidas por puentes disulfuro (esquema 2) (Kasuga y col., 1981). Las subunidades  $\alpha$  son responsables de la unión del ligando y las  $\beta$  contienen los dominios transmembranal e intracelular. Este último posee actividad tirosina kinasa. El receptor de IGF-II es estructuralmente distinto y consiste en un monómero de 250 KD carente de actividad tirosina kinasa aunque puede ser sustrato de tirosinas kinasa asociadas a la membrana ya que el 92% de la secuencia de este receptor está orientada hacia el lado extracelular de la misma. Recientemente se ha encontrado una analogía entre este receptor y el de la manosa 6-fosfato, implicado en el transporte de enzimas que contienen manosa 6-fosfato a los lisosomas (Von Figura y Hasilik, 1986).

En la especie humana, los genes que codifican para los receptores de insulina, IGF-I e IGF-II se encuentran localizados en los cromosomas 19, 15 y 6 respectivamente (Humbel, 1990).

En la mayoría de las células coexisten los tres tipos de receptores de manera que las afinidades de los tres ligandos correspondientes se han descrito en numerosos tipos celulares de la siguiente manera;

receptor de insulina: insulina >> IGF-II > IGF-I

receptor de IGF-I: IGF-I > IGF-II >> insulina

receptor de IGF-II: IGF-II > IGF-I (no une insulina)

Se ha encontrado que la manosa 6-fosfato se une al receptor del IGF-II aunque lo hace en un lugar diferente a este factor (Waheed y col., 1988). Sin embargo, no está todavía claro si la unión de ambos ligandos al mismo receptor es independiente o si la unión de uno de ellos altera la unión del otro.

Experimentos realizados con células que sobreexpresan los receptores de insulina o del IGF-I han mostrado que ambos pueden mediar las respuestas metabólicas y mitogénicas tanto de la insulina como del IGF-I (Humbel, 1990). Sin embargo, "in vivo" la insulina regula principalmente los efectos metabólicos y el IGF-I los mitogénicos. Resultaría difícil establecer las diferencias fisiológicas entre ambos

teniendo en cuenta las similitudes entre sus receptores y mecanismos de transmisión de señales. Así, son necesarios anticuerpos específicos contra estos receptores para poder establecer cuales podrían mediar los efectos de cada uno de los ligandos. Estudios realizados por Kadowaki y col. (1986) en células KB de citoesqueleto que poseen receptores de insulina e IGF-I y carecen de receptores de IGF-II, muestran que IGF-I e insulina actúan a través de sus propios receptores mientras que el IGF-II lo haría indistintamente con ambos. Sin embargo, estos autores señalan la necesidad de realizar experimentos con nuevos tipos celulares con el fin de poder establecer los efectos mediados por los distintos receptores.

La unión del ligando al receptor del IGF-I origina la autofosforilación en tirosina de las subunidades  $\beta$  además de las fosforilaciones en tirosina de otras proteínas. También se han descrito fosforilaciones en residuos serina-treonina y se ha postulado la existencia de fosforilaciones cruzadas entre las cadenas  $\beta$  de los receptores de IGF-I e insulina (Beguinot y col., 1988). Por el contrario, no se conoce todavía la cascada de eventos posteriores a la unión de IGF-II/manosa 6-fosfato al receptor tipo II. Recientemente se ha postulado la posible implicación de proteínas G en la transmisión de la señal (Braulke y col., 1989).

El 95% de los IGFs circulantes se encuentran ligados a unas proteínas específicas conocidas con el nombre de proteínas de unión a IGFs cuyos pesos moleculares oscilan entre 24-150 KD. Se han descrito tres proteínas distintas que se unen a estos factores. Las proteínas tipo I y II presentan en su estructura un 40% de homología y son ricas en residuos cisteína. El tipo I presenta mayor afinidad por IGF-I mientras que el tipo II liga preferentemente el IGF-II. Por el contrario, la proteína tipo III presenta la misma afinidad por ambos IGFs.

Las proteínas de unión a IGFs son capaces de estimular o inhibir los efectos del IGF-I en distintas células en cultivo. Se han descrito efectos inhibitorios en el endometrio, células foliculares del tiroides de rata, células hiperestimuladas de la granulosa humana y células cartilaginosa de la pelvis de embrión de pollo (Koistien y col., 1990). Estos mismos autores han purificado la proteína tipo I de fluido amniótico humano y han observado que aunque es capaz de inhibir la unión del  $^{125}\text{I}$ -IGF-I a sus receptores, amplifica la incorporación de  $^3\text{H}$ -Timidina en estas células. Asimismo, Liu y col. (1991) han descrito una inhibición de la síntesis de DNA

producida por el IGF-I en presencia de la proteína de unión a IGF tipo I en cultivos primarios de fibroblastos de embrión de pollo. Por tanto, se puede decir que dependiendo de los distintos tipos celulares, una misma proteína puede estimular o inhibir la síntesis de DNA.

Los efectos "in vivo" de estos factores de crecimiento se han descrito como efectos a corto plazo tipo insulina como la estimulación del transporte de glucosa y la síntesis lipídica en tejido adiposo y efectos mitogénicos a largo plazo entre los que se encuentran la estimulación de la síntesis de DNA, RNA, proteínas y la proliferación celular. Sin embargo, hay que recordar que la insulina es 5-10 veces mas potente que los IGFs en la estimulación de los parámetros metabólicos, mientras que estos últimos son 100 veces mas potentes como mitógenos (Humbel, 1990).

Los efectos mitogénicos de los IGFs han sido descritos en una gran variedad de sistemas. En algunos, como por ejemplo en cultivos celulares de células tiroideas porcinas, el IGF-I induce la proliferación por sí solo, no siendo necesaria la presencia de otros mitógenos (Takasu y col., 1989). Asimismo, estos autores han descrito en estas mismas células un aumento en los niveles de inositoles fosfato y calcio intracelulares tras añadir IGF-I al medio de cultivo.

Otro efecto de gran importancia descrito para el IGF-I es su papel en la diferenciación celular. Se han realizado numerosos estudios utilizando la línea celular preadipocítica 3T3-L1 donde se produce la conversión de estas células fibroblásticas a adipocitos totalmente diferenciados donde enzimas marcadoras lipogénicas se expresan en respuesta a IGF-I (Smith y col., 1988; Schmidt y col., 1990).

Resulta interesante destacar el papel desempeñado por los IGFs como reguladores del crecimiento en la transición fetal-neonatal. Las concentraciones séricas de IGF-I e IGF-II varían según la especie en estudio. Así, en rata la expresión genética del IGF-II es alta en una gran variedad de tejidos fetales encontrándose altos niveles de este factor en suero fetal. Sin embargo, tras el nacimiento se produce un rápido descenso en la expresión del gen del IGF-II en todos los tejidos exceptuando el cerebro encontrándose muy bajos niveles de este factor, lo que sugiere que el IGF-II podría desempeñar un importante papel como

factor de crecimiento embrionario y fetal (Straus y col., 1991). El gen del IGF-I se expresa en embrión de pollo durante la organogénesis temprana siendo los tejidos extrahepáticos la principal fuente de este factor antes del nacimiento (Serrano y col., 1990). En la rata, el gen del IGF-I se ha encontrado también expresado en una gran variedad de tejidos fetales y se ha relacionado un retardo en el crecimiento fetal con bajas concentraciones séricas de IGF-I (Straus y col., 1991). Asimismo, a diferencia de IGF-II, los niveles séricos de IGF-I en ratas adultas son elevados (Humbel, 1990). En humanos ambos factores son bajos en suero fetal mientras que los niveles de IGF-II se mantienen elevados en estado adulto. Durante la pubertad se ha descrito un aumento de 2-3 veces en los niveles de IGF-I probablemente debido a un aumento en la secreción de GH (Humbel, 1990).

Ballesteros y col. (1990) han estudiado la expresión del mensajero del receptor de IGF-II/manosa 6-fosfato durante el periodo perinatal en diversos tejidos de la rata. Estos autores han descrito un descenso muy significativo a partir del día 9 de vida postnatal no detectando niveles de mensajero a partir del día 21, por lo que sugieren un papel importante de este receptor en la transición fetal-neonatal.

#### **2.1.2.4 Factores de crecimiento implicados en la transformación**

Constituyen un grupo heterogéneo de péptidos que son capaces de producir un fenotipo transformante en células normales así como de inducir el crecimiento de fibroblastos en agar blando de forma independiente de anclaje.

Dentro de este grupo se encuentran los factores de crecimiento implicados en la transformación tipo  $\alpha$  y  $\beta$  (TGF- $\alpha$  y TGF- $\beta$ ). Ambos constituyen el prototipo de factores que actúan de manera autocrina. Aunque su denominación es prácticamente la misma ya que ambos se expresan en células transformadas, su estructura y funciones biológicas presentan grandes diferencias.

##### **2.1.2.4.1. TGF- $\alpha$**

Es un polipéptido descubierto en el medio de cultivo de células fibroblásticas transformadas por ciertos retrovirus que presenta un peso molecular de 5-20 KD

dependiendo de las diferentes especies que lo secretan. La forma mas pequeña que contiene 50 aminoácidos posee un 30% de homología estructural con el EGF y conserva los tres puentes disulfuro característicos de esta molécula lo que le permite ejercer sus funciones biológicas a través del mismo receptor (esquema 2) (Massagué, 1983).

La molécula precursora del TGF- $\alpha$  es una glicoproteína de membrana que contiene un dominio extracelular de 100 aminoácidos que incluye el extremo N-terminal así como la secuencia de 50 aminoácidos del TGF- $\alpha$ , un dominio hidrofóbico transmembranal y un dominio citoplásmico de 35 aminoácidos que contiene el extremo carboxilo terminal y es rico en residuos cisteína (Lyons y Moses, 1990). Se ha descrito que la molécula precursora posee actividad biológica y se sintetiza como una proteína transmembranal. Dependiendo de la acción proteolítica sobre el precursor, se obtienen las diferentes moléculas del TGF- $\alpha$  (Derynck, 1988).

El gen que codifica para el TGF- $\alpha$  se expresa en una gran variedad de células transformadas por ciertos retrovirus. Sin embargo, el TGF- $\alpha$  no es "per se" un producto oncogénico aunque su síntesis se encuentra regulada por diversos oncogenes tales como mos, ras, fms... (De Larco y Todaro, 1978). Asimismo, la expresión del TGF- $\alpha$  se ha detectado también en células no transformadas durante el desarrollo embrionario de ratón y rata y en células adultas entre las que se encuentran queratinocitos de piel, células pituitarias, macrófagos y en determinadas áreas del cerebro (Derynck, 1988).

El descubrimiento de la producción de TGF- $\alpha$  y respuesta al mismo por células adultas no transformadas parece indicar que la proliferación celular puede también regularse de manera autocrina. Sin embargo, no puede excluirse la posibilidad de que la producción no controlada de este factor tenga un papel importante en la transformación neoplásica (Lyons y Moses, 1990).

#### **2.1.2.4.2 TGF- $\beta$**

Es un polipéptido compuesto por dos subunidades idénticas de 112 aminoácidos unidas entre sí por puentes disulfuro. El dímero presenta 25 KD de peso molecular

y es la molécula biológicamente activa. El TGF- $\beta$  se sintetiza a partir de un precursor de 390 aminoácidos de los cuales los 112 del extremo C-terminal son los correspondientes a este factor. También se han descrito glicosilaciones en la región N-terminal del precursor (Lyons y Moses, 1990).

Recientemente se han descrito diversas moléculas dentro de la familia de factores conocidos como TGF- $\beta$ . La molécula que inicialmente se aisló de plaquetas humanas se ha denominado TGF- $\beta$ 1. A partir de plaquetas porcinas y células óseas bovinas se ha aislado el TGF- $\beta$ 2. Mediante técnicas de clonaje se han identificado las moléculas de TGF- $\beta$ 3 y TGF- $\beta$ 4 de las cuales la última no ha sido purificada todavía (Lyons y Moses, 1990). Aunque todas estas moléculas presentan una estructura semejante, recientemente se han encontrado diferencias en sus actividades biológicas. Así, el TGF- $\beta$ 3 es más potente que TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 2 como inhibidor del crecimiento en la línea de células epiteliales de pulmón Mv1Lu. Sin embargo, en una línea de células endoteliales de corazón bovino (FBHE), TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 3 son 50 veces más potentes que el TGF- $\beta$ 2 como inhibidores del crecimiento celular (Cheifetz y col., 1990).

Existen receptores que ligan TGF- $\beta$  tanto en células normales como neoplásicas. Todavía no está claro si estas proteínas son receptores de membrana o simplemente proteínas de unión. Se han descrito tres tipos de receptores con pesos moleculares de 50-80 KD (Tipo I), 115-140 KD (Tipo II) y 280-330 KD (Tipo III). Este último es un proteoglicano con un 50% de restos de heparín-sulfato y condroitín-sulfato. Las moléculas de TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3 se unen a los tres tipos de receptores. Sin embargo, las afinidades de las distintas moléculas de TGF- $\beta$  por estos receptores varían en los distintos tipos celulares (Barnard y col., 1990).

Los procesos intracelulares que acontecen tras la interacción ligando-receptor no son del todo conocidos. No se han descrito implicaciones del TGF- $\beta$  en la activación de proteínas kinasa ni cambios en el flujo de iones. Sin embargo, Howe y Leof (1989) han descrito una proteína G que podría estar relacionada con la transmisión de la señal en la línea celular AKR-2B de células fibroblásticas de embrión de ratón. Asimismo, recientemente se ha descrito la fosforilación de proteínas nucleares por TGF- $\beta$ 1 en células pulmonares CCL 64 (Kramer y col.,

1991).

Los efectos biológicos descritos para el TGF- $\beta$  son numerosos y diversos. Se han encontrado los mRNAs de TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3 en una gran variedad de tejidos del ratón adulto: bazo, testículos, riñón, hígado, pulmón, cerebro, corazón, tejido adiposo, glándula submaxilar y placenta. Asimismo, la familia de los TGF- $\beta$  presenta un importante papel en el desarrollo embrionario. Por ejemplo, se han encontrado los mRNAs de los TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 2 en embriones de ratón (Barnard y col., 1990).

Dependiendo de los tipos celulares el TGF- $\beta$  puede ejercer efectos diferentes. En células fibroblásticas AKR-2B es un mitógeno indirecto debido a la inducción por este factor del mRNA del oncogén c-sis así como del PDGF, conocido mitógeno de estas células. Sin embargo en otros tipos celulares, el TGF- $\beta$  es un potente inhibidor del crecimiento (Leof y col., 1986). Los mecanismos moleculares de esta inhibición son objeto de actuales investigaciones. Se ha utilizado una línea celular de queratinocitos de ratón para intentar dilucidar estos procesos. En presencia de TGF- $\beta$ 1 estas células experimentan un descenso en la expresión de c-myc, no modificándose los niveles de c-fos (Barnard y col., 1990). Recientemente se ha descrito que la inhibición de la expresión de c-myc por TGF- $\beta$  en células epiteliales estaría mediada por la síntesis de una proteína que interaccionaría con un elemento regulador de la transcripción (TRE) en la región 5' de c-myc inhibiendo el inicio de la transcripción de este gen. Se ha propuesto que la proteína nuclear p105-RB, producto del gen supresor del tumor de retinoblastoma, podría ser la molécula en este proceso (Moses y col., 1990). TGF- $\beta$  también puede alterar la respuesta a otros factores de crecimiento como EGF o PDGF a nivel de interacción ligando-receptor. Asimismo, se ha empleado otra línea celular de queratinocitos de ratón transformados con el virus del sarcoma de Kirstein para el estudio de los efectos de TGF- $\beta$  en células transformadas. En estas células el TGF- $\beta$  actúa inhibiendo el crecimiento. Sin embargo, en otras líneas celulares transformadas el TGF- $\beta$  no ejerce efecto inhibitorio probablemente por una alteración en el receptor tipo I que impide la transmisión de la señal negativa de crecimiento (Lyons y Moses, 1990). También se ha especulado la posibilidad de la pérdida del control de la proliferación celular como consecuencia de la pérdida de elementos reguladores negativos por

mutación o delección del gen que codifica para el TGF- $\beta$  .

Este polipéptido también es capaz de inhibir el crecimiento celular "in vivo". Así, la inyección intravenosa de TGF- $\beta$ 1 o TGF- $\beta$ 2 inhibe la proliferación de hepatocitos de rata tras una hepatectomía parcial (Russel y col., 1988). Estos estudios junto con otros que han sido descritos apuntan a un papel importante del TGF- $\beta$  como un modulador fisiológico del crecimiento celular.

Los efectos del TGF- $\beta$  en la diferenciación celular han sido también objeto de controversia. Este factor induce la diferenciación de células epiteliales de bronquio así como de células de carcinoma de colon humano. Sin embargo, el TGF- $\beta$  no afecta a la diferenciación de otras células epiteliales como queratinocitos de ratón o células del epitelio intestinal de rata. También puede ser un potente inhibidor de la diferenciación de adipocitos y mioblastos. Se ha formulado una explicación a estos fenómenos teniendo en cuenta la acción de otros factores y proteínas de matriz extracelular que junto con el TGF- $\beta$  afectan a la diferenciación celular (Barnard y col., 1990).

Por último, se ha descrito un papel importante del TGF- $\beta$  en el sistema inmune donde inhibe el crecimiento de células B y T (Barnard y col., 1990).

#### **2.1.2.5 Factores de crecimiento fibroblásticos**

Constituyen una familia de factores de los cuales los mas conocidos son los factores de crecimiento fibroblástico (FGF) ácido y básico. Se trata de monómeros de 17 KD de peso molecular con un 55% de homología estructural y son mitógenos de células endoteliales (Gospodarowicz y col., 1986). Ambos comparten la propiedad de tener una gran afinidad por la heparina lo que ha simplificado su purificación y caracterización (Folkman y Klagsbrun, 1987). Asimismo se unen a un mismo receptor poseedor de actividad tirosina kinasa cuyo peso molecular es 130 KD (esquema 2) (Gospodarowicz y col., 1986). Estos factores se purificaron originalmente de cerebro y glándula pituitaria aunque posteriormente se han encontrado en una gran variedad de células normales y transformadas.

Resulta interesante conocer las diferencias entre ambos factores en cuanto a su capacidad de transformación. Mientras que el gen que codifica para el FGF básico

es un potente proto-oncogén, las células transfectadas con el cDNA del FGF ácido presentan una baja capacidad tumorigénica (Rogelj y col., 1988, Jaye y col., 1988).

Los otros tres miembros adicionales de esta familia son los productos de los genes *int-2*, *hst/KS3* y *FGF-5*. Estas moléculas presentan un 40% de homología estructural con los otros dos factores de crecimiento fibroblástico descritos. El gen *hst/KS3* ha sido aislado de células de carcinoma gástrico humano y en sarcoma de Kaposi. Su producto promueve el crecimiento de células endoteliales y células NIH 3T3. El gen *FGF-5* ha sido identificado por su capacidad de transformar células NIH 3T3. Su producto es un factor de crecimiento para fibroblastos y presenta alta afinidad por la heparina. Finalmente el gen *int-2* ha sido aislado en células neoplásicas inducidas por el virus de tumores de mama de ratón aunque todavía no se conoce sobre que tipos celulares actúa (Heldin y Westermark, 1989).

A continuación describiremos brevemente una serie de moléculas peptídicas aisladas en los últimos años a partir de cerebro y tracto gastro-intestinal entre otros tejidos, con multiplicidad de funciones biológicas entre las que se encuentra la inducción de la proliferación en varios tipos celulares.

#### **2.1.2.6 Bombesina**

Es un tetradecapéptido aislado en un principio a partir de la piel de anfibios aunque presenta propiedades inmunológicas comunes con otros péptidos caracterizados en mamíferos como por ejemplo el GRP (péptido liberador de gastrina) originariamente aislado de intestino de cerdo y posteriormente de cerebro y pulmón humano adulto y fetal. Ambas moléculas son potentes mitógenos en células Swiss 3T3 y pueden actuar de manera autocrina en células de carcinoma de pulmón (Rozengurt y Sinnet-Smith, 1983). La estimulación de la síntesis de DNA producida por este tipo de péptidos implica la puesta en marcha de una serie de mecanismos intracelulares que comienzan tras la unión ligando-receptor. El receptor común a esta familia de moléculas se ha caracterizado como una glicoproteína de peso molecular 75-85 KD (Zachary y Rozengurt, 1987). Sin

embargo, Cirillo y col.(1986) han descrito una proteína de 115 KD que se fosforila en tirosina en respuesta a bombesina , pudiendo estar asociada al receptor de la misma. Esta proteína no ha sido encontrada por Isacke y col. (1986). Estudios realizados en el laboratorio del Dr Rozengurt apuntan la existencia de una proteína G, insensible a toxina pertusis, ligada al receptor de bombesina implicada en la transmisión de la señal ya que el derivado no hidroxilable GTP- $\gamma$ S aumenta la velocidad de disociación del complejo receptor -  $^{125}$ I-GRP de manera específica y dosis dependiente (Coffer y col., 1990).

Los procesos intracelulares que acontecen tras la unión ligando-receptor han sido objeto de recientes estudios. Se sabe que una de las primeras respuestas que se producen tras la interacción bombesina o GRP con su receptor es un incremento de los flujos iónicos de  $Ca^{++}$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$  e  $H^+$  a través de la membrana plasmática. Estos péptidos estimulan la entrada de  $Na^+$  al interior celular vía antiporte  $Na^+/H^+$  sensible a amilorido con lo que se alcaliniza el citoplasma y se activa la bomba  $Na^+/K^+$  que incrementa los niveles de  $K^+$  intracelulares restaurando el gradiente electroquímico. Asimismo, como consecuencia de la activación de la vía de los inosítoles fosfato se produce la salida de  $Ca^{++}$  del retículo endoplásmico al citoplasma celular. Por último, Rozengurt y col. también han estudiado la activación de la proteína kinasa C por estos factores y han descrito una proteína de peso molecular 80 KD como sustrato específico de la proteína kinasa C en estas células (Rodríguez-Peña y col., 1986). Asimismo, la proteína kinasa C está implicada en la regulación de la afinidad del EGF por su receptor. De esta manera, la unión del  $^{125}$ I-EGF a sus receptores específicos de membrana en células Swiss 3T3 disminuye en presencia de bombesina. Zachary y Rozengurt (1985) han atribuido este efecto a un descenso en la afinidad del EGF por sus propios receptores y lo han explicado como consecuencia de su fosforilación por la proteína kinasa C tanto "in vivo" como "in vitro". Este fenómeno conocido con el nombre de transmodulación parece ser debido a una modificación covalente producida en el receptor de EGF que es catalizada por la proteína kinasa C.

Recientemente se han presentado estudios de la bombesina que parecen indicar que existe una relación directa entre la estimulación de la proteína kinasa C y la acumulación de cAMP en células Swiss 3T3 expuesta a agentes que elevan los

niveles de cAMP como forskolina o toxina del cólera. Así, la adición de bombesina en presencia de forskolina o toxina del cólera produce un aumento en la acumulación de cAMP en cultivos de células Swiss 3T3. Este aumento es revertido mediante el pre-tratamiento de las células con ésteres de forbol con lo cual se implica a la proteína kinasa C en la regulación de este proceso. Lo mismo ocurre tras el pre-tratamiento con indometazina, un inhibidor de la cicloxigenasa que impide la liberación de prostaglandinas quedando también estas moléculas implicadas en el proceso. Los efectos producidos por ésteres de forbol e indometazina son aditivos lo que sugiere que la activación de la proteína kinasa C y la liberación de prostaglandinas son dos caminos diferentes implicados en el aumento de los niveles de cAMP en presencia de bombesina (Millar y Rozengurt, 1988). Asimismo, estos autores describen una inhibición de los niveles de cAMP producidos por bombesina en presencia de toxina pertusis que produce ADP ribosilación e inactivación de la proteína G inhibidora, por lo que se han establecido varias hipótesis. La proteína kinasa C podría fosforilar la subunidad alfa de  $G_i$  y cambiar su función de inhibidora a activadora. Alternativamente se ha propuesto que la modulación de la producción de cAMP por la proteína kinasa C podría estar mediada por una proteína G aún sin identificar que acoplaría la activación de la proteína kinasa C con la producción de cAMP posiblemente actuando sobre la adenilato ciclasa. En su forma fosforilada, la proteína G podría activar la subunidad catalítica de la proteína kinasa A y su fosforilación (por la kinasa C) podría prevenirse en presencia de toxina pertusis (Millar y Rozengurt, 1988).

En cultivos celulares de fibroblastos quiescentes Swiss 3T3 la bombesina estimula la síntesis de DNA no siendo necesaria la presencia de otro/s factores de crecimiento. Este efecto se potencia en presencia de insulina, colchicina, PDGF y FGF. Sin embargo, ni el nonapéptido neuronal vasopresina ni los esteres de forbol que son mitogénicos para estas células, son capaces de potenciar el efecto mitogénico de la bombesina en células Swiss 3T3. Asimismo, los agentes que elevan los niveles de cAMP intracelulares como 8-Br-cAMP, la toxina del cólera o el IBMX tampoco potencian dicho efecto (Rozengurt y Sinnet-Smith, 1983).

Por último, se han encontrado altos niveles de moléculas pertenecientes a esta familia en carcinomas de células pequeñas de pulmón lo cual podría implicar a estas

moléculas en mecanismos autocrinos de estimulación de la proliferación celular (Rozengurt, 1988; Woll y Rozengurt, 1989).

### 2.1.2.7 Vasopresina

Se trata de un nonapéptido cíclico secretado por el hipotálamo, conducido a la hipófisis posterior y finalmente vertido a la circulación sanguínea. La vasopresina actúa en el organismo como hormona antidiurética, tiene efecto vasoconstrictor sobre la musculatura lisa de las arterias y estimula la gluconeogénesis hepática. "In vitro", es un potente mitógeno para células Swiss 3T3 actuando sinérgicamente con la insulina. "In vivo" facilita la respuesta proliferativa de los vasos sanguíneos ante una hemorragia, así como del hígado después de una hepatectomía parcial. También se ha relacionado con el control del desarrollo cerebral en fetos de rata. Los efectos mitogénicos producidos por esta molécula son el resultado de su unión a receptores específicos de membrana. Se han descrito dos tipos de receptores de vasopresina. Los receptores  $V_1$  son responsables de los efectos hepáticos y vasculares mediante la activación de la vía de los inositoles fosfato. Por el contrario, los receptores  $V_2$  median la acción antidiurética y se encuentran acoplados al sistema de la adenilato ciclasa. En la línea celular Swiss 3T3 la vasopresina ejerce su efecto mitogénico mediante la interacción con los receptores  $V_1$ . Sin embargo, la estructura molecular de los mismos no ha sido todavía establecida (Woll y Rozengurt, 1989).

La adición de vasopresina a cultivos quiescentes de fibroblastos Swiss 3T3 origina un aumento significativo en la síntesis de DNA que se encuentra potenciado por insulina, EGF y/o FGF. Sin embargo, no se han observado efectos sinérgicos con esteroides de forbol o diacilglicérols, lo que sugiere que estas moléculas presentan mecanismos semejantes de transmisión de señales (Rodríguez-Peña y Rozengurt, 1986). Sin embargo, se sabe que como consecuencia de la interacción de la vasopresina con su receptor tipo  $V_1$ , se estimula la entrada de  $Na^+$  al interior celular, así como la bomba  $Na^+/K^+$  y en consecuencia se produce alcalinización del citoplasma (Mendoza y col., 1980). Además también se ha descrito una inducción del relevo de fosfatidil inositoles de membrana y una movilización de los depósitos

de  $\text{Ca}^{++}$  intracelulares (Lopez-Rivas y Rozengurt, 1984)

Además de estos mecanismos también se ha descrito la activación de la proteína kinasa C en respuesta a vasopresina. Ya hemos señalado la falta de efecto *sinérgico* entre vasopresina, esteres de forbol y diacilgliceroles sintéticos y la posibilidad de que todas estas moléculas pudieran compartir una misma vía de transmisión de señales. Tanto los ésteres de forbol como los diacilgliceroles son potentes activadores de la proteína kinasa C. En efecto, Rodríguez-Peña y col. (1986) han observado un rápido aumento en la fosforilación de la proteína de 80 KD, sustrato de la proteína kinasa C, tras la adición de vasopresina a cultivos quiescentes de fibroblastos Swiss 3T3. Este efecto es dependiente del tiempo y de la concentración pudiéndose detectar la fosforilación de esta proteína 30 segundos después de la adición de la hormona. Asimismo, el efecto máximo se obtiene con la concentración de vasopresina de 20 ng/ml. Esta fosforilación es rápidamente revertida retirando la vasopresina del medio de cultivo (Rodríguez-Peña y Rozengurt, 1986).

Recientemente se ha descrito la pérdida del efecto mitogénico de la bombesina como consecuencia del tratamiento prolongado de fibroblastos Swiss 3T3 con vasopresina (Millar y Rozengurt, 1989). Estos autores han atribuido este fenómeno a una desensibilización heteróloga mediada por el receptor de vasopresina ya que este efecto revierte en presencia de inhibidores de esta hormona. Además no se encuentran afectados el número, afinidad y capacidad de internalización de los receptores por lo que la inhibición del efecto mitogénico de la bombesina ocurre a nivel de transmisión de señales tempranas, concretamente impidiendo la liberación de ácido araquidónico (Millar y Rozengurt, 1990).

#### **2.1.2.8 Endotelina**

Es un péptido de 21 aminoácidos aislado del medio de cultivo de células endoteliales de aorta porcina. Pertenece a una nueva familia de mitógenos entre los que se encuentra el péptido contractor intestinal vasoactivo (VIC). Posee una potente actividad vasoconstrictora y se ha descrito como mitógeno en células de la musculatura lisa de los vasos sanguíneos y células gliales de rata. En cultivos

celulares de fibroblastos quiescentes Swiss 3T3 la endotelina potencia el efecto mitogénico de bombesina, vasopresina y esteres de forbol. Asimismo se han descrito efectos sinérgicos entre endotelina y EGF. Sin embargo, este péptido no potencia significativamente los efectos mitogénicos de insulina e IGF-I (Brown y Littlewood, 1989). Estos autores han descrito un aumento en la concentración intracelular de inositoles fosfato en respuesta a endotelina. Asimismo, Takuwa y col. (1989) han observado un aumento en la fosforilación de la proteína de 80 KD, sustrato de la proteína kinasa C. Aunque la endotelina comparte con la vasopresina y bombesina la capacidad de estimular la hidrólisis de fosfatidil inositoles de membrana, presenta diferencias con estas moléculas como el sinergismo con ésteres de forbol y la falta de sinergismo con insulina. Estos resultados apuntarían la posibilidad de la activación de distintas vías de transmisión de señales por estas moléculas (Brown y Littlewood, 1989).

Recientemente Fabregat y Rozengurt (1990) han descrito una inhibición tanto de la movilización de calcio como de los efectos mitogénicos producidos por la endotelina en presencia del derivado ( D-Arg<sup>1</sup>, D-Phe<sup>5</sup>, D-Trp<sup>7-9</sup>, Leu<sup>11</sup>) del neuropéptido conocido como sustancia P, un potente antagonista de la bombesina.

#### **2.1.2.9 Papel del cAMP en la proliferación celular**

El papel del cAMP en la regulación de la proliferación en las células de mamíferos no está completamente claro en el momento presente. En la década de los 70 prevalecía la teoría del cAMP como inhibidor de la proliferación celular. Actualmente se ha ampliado el estudio con numerosos sistemas celulares, en algunos de los cuales los agentes que elevan los niveles de cAMP son potentes mitógenos. Por ejemplo, agentes que promueven la acumulación de cAMP en células Swiss 3T3 tales como la toxina del cólera o la prostaglandina E<sub>1</sub> estimulan la síntesis de DNA actuando sinérgicamente con otros mitógenos. Resulta importante evaluar si los factores de crecimiento fisiológicos añadidos a un medio libre en suero pueden afectar al metabolismo del cAMP en estas células. La adición de PDGF induce la acumulación de cAMP en cultivos confluentes y quiescentes incubados en presencia de inhibidores de la degradación de nucleótidos cíclicos.

Esta acumulación de cAMP producida por este factor puede estar mediada por un aumento en la síntesis de prostaglandina E<sub>1</sub>, que estimula la producción de cAMP ya que la indometazina impide el aumento de los niveles de cAMP inducidos en presencia de PDGF. En contraste, otros factores de crecimiento como la vasopresina, EGF, ésteres de forbol o insulina, no aumentan los niveles de cAMP en estas células (Rozengurt, 1986). Recientemente se ha descrito un aumento en la fosforilación de una proteína de peso molecular 58.000 D denominada vimentina, presente en los filamentos intermedios de las células mesenquimáticas, en respuesta al aumento de los niveles de cAMP (Escribano y Rozengurt, 1988). A continuación se produciría una redistribución de dichos filamentos, y finalmente la síntesis de DNA.

Se ha descrito la existencia de una relación directa entre la estimulación de la proteína quinasa C y la acumulación de cAMP en células expuestas a forskolina o toxina del cólera. Este efecto ha sido descrito para la bombesina en el apartado (2.1.2.6).

El papel del cAMP en la síntesis de DNA se ha estudiado también en adipocitos marrones de ratón y rata. Géloen y col. (1988) realizando estudios "in vivo" han descrito un aumento en la incorporación de metil-<sup>3</sup>H-Timidina tras la exposición de ratas al frío en las células precursoras de los adipocitos marrones (preadipocitos y células intersticiales). Estos autores han sugerido una estimulación del crecimiento del tejido adiposo marrón tras la exposición de los animales al frío, de manera que se incrementa la liberación de noradrenalina de los terminales simpáticos activándose la mitosis de las células precursoras de los adipocitos marrones por un mecanismo  $\beta$ -adrenérgico que implica el aumento de los niveles de cAMP intracelulares. Asimismo, la inyección de noradrenalina mimetiza los efectos de la exposición al frío sobre el tejido adiposo marrón al igual que el agonista  $\beta$ -adrenérgico isoproterenol. Por el contrario, el  $\alpha$ -agonista fenilefrina no induce mitosis en este tejido. Sin embargo, con los agonistas  $\beta$ -adrenérgicos ensayados no se obtiene el efecto proliferativo máximo producido por la exposición al frío. Esto parece indicar que las catecolaminas requieren la presencia de otros factores de crecimiento para estimular máximamente el crecimiento celular del tejido.

Rehnmark y Nedergaard (1989) han realizado estudios de síntesis de DNA "in

vivo" en ratones adultos expuestos al frío encontrando un máximo aumento en la síntesis de DNA tras 8 días de exposición de los animales a la temperatura de 4°C. Asimismo, han conseguido aumentar la incorporación de <sup>3</sup>H-Timidina inyectando a los animales dosis sucesivas de noradrenalina no observando ningún efecto al inyectar la noradrenalina con el β-antagonista propanolol.

La interpretación de los resultados obtenidos "in vivo" es difícil, debido a la posibilidad de aparición de efectos secundarios en los tratamientos hormonales. Por ello, resulta necesario realizar experimentos "in vitro" en sistemas de cultivos celulares para poder observar los efectos hormonales aislados sin las interferencias que pueden producirse en los experimentos "in vivo".

## 2.2 CARACTERISTICAS GENERALES DEL TEJIDO ADIPOSO MARRON

El tejido adiposo marrón es un tejido altamente diferenciado y especializado en todos los mamíferos en la producción de calor mediante un mecanismo denominado "termogénesis sin tiriteo" que permite al recién nacido compensar la pérdida de calor que sufre al abandonar el seno materno (Nedergaard y col., 1986). En la mayoría de las especies, el tejido adiposo marrón se diferencia durante la etapa fetal y es identificable en el momento del nacimiento. Sin embargo, el desarrollo perinatal de este tejido varía dependiendo del grado de madurez que presenten al nacer (Nèchad, 1983).

La morfología del tejido adiposo marrón es común en todos los mamíferos examinados. Resulta característico su color marrón debido al alto contenido en pigmentos respiratorios, y sobre todo, a la gran irrigación sanguínea (Girardier, 1983). Con el microscopio óptico se aprecia que la mayor parte del volumen del tejido se encuentra ocupada por adipocitos marrones. Estas células son generalmente poligonales con depósitos lipídicos multiloculares ocupando en el tejido adiposo marrón de rata recién nacida un volumen aproximado del 70%. El resto del tejido está constituido por diferentes tipos de células: células endoteliales, mesenquimatosas, perivasculares, preadipocitos, mastocitos, fibroblastos, células de Schwann y otros tipos. El análisis de la estructura del adipocito marrón mediante microscopía electrónica muestra la presencia de depósitos multiloculares de grasa en el citoplasma, así como una elevada cantidad de mitocondrias con un alto contenido en membrana interna, que aparece formando crestas paralelas y empaquetadas, características de este tejido (Nèchad, 1986). Otra característica observada es el sistema de uniones entre las células que permite el intercambio de nutrientes y/o señales moleculares como pueden ser azúcares, aminoácidos, nucleótidos, cAMP, hormonas esteroídicas, etc... (Girardier, 1983).

La localización anatómica del tejido adiposo marrón indica que se desarrolla al mismo tiempo en lugares específicos. Se encuentra presente en las regiones interescapular, cervical y axilar, alrededor del timo y de la glándula tiroides, asociado a la caja torácica y dentro de esta (sobre el corazón, rodeando a la aorta, a lo largo de la traquea y el esófago y en ambos lados de la espina dorsal) . También aparece en la cavidad abdominal ( a lo largo de la aorta y de los vasos sanguíneos renales), rodeando a las cápsulas suprarrenales y en la región inguinal. Esta distribución anatómica aparentemente dispersa es estratégica, encontrándose el tejido en contacto con los vasos sanguíneos mas importantes. De esta forma, el calor producido se transfiere a las estructuras vitales por contacto directo y a través de la sangre (Nèchad, 1986).

### **2.2.1 Desarrollo y diferenciación del tejido adiposo marrón en la rata**

En el caso de la rata, la maduración del tejido adiposo marrón es perinatal, produciéndose un rápido proceso de maduración morfológica y funcional de los adipocitos marrones. Se alcanza un pico en su diferenciación y capacidad para producir calor entre la primera y segunda semana de vida, involucionando hacia la cuarta semana si el animal permanece a temperatura termoneutra, adquiriendo un aspecto semejante el del tejido adiposo blanco (Skala, 1984). Esta involución postnatal puede evitarse o revertirse cuando se mantiene una estimulación simpática, o bien por exposición de los animales al frío o por efecto de la sobrealimentación (Nicholls y Locke, 1984). La posibilidad de esta rediferenciación del tejido en el adulto hace pensar que se mantiene alguna diferencia genética con respecto al tejido adiposo blanco (Skala, 1984).

El desarrollo morfológico y bioquímico del tejido adiposo marrón se conoce bien en la región interescapular de la rata aunque todavía no se conocen con exactitud las señales que determinan su diferenciación. Los adipocitos marrones fetales se

originan a partir de las células mesenquimatosas que se encuentran asociadas a los vasos sanguíneos, y 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 estas células que se conocen como preadipocitos. Sus mitocondrias simultáneamente aumentan en número y tamaño y su membrana interna se desarrolla muy activamente formando numerosas crestas. Paralelamente se produce un aumento en la actividad respiratoria del tejido. A medida que se produce la diferenciación, los preadipocitos progresivamente pierden su capacidad de división, pero el tejido sigue creciendo gracias a la presencia de células mesenquimatosas perivasculares con actividad proliferativa. Al final del proceso, el tejido presenta una inervación simpática plenamente funcional (Nèchad, 1986).

Después de esta fase formativa, el tejido adiposo marrón se desarrolla aumentando su peso húmedo y contenido proteico. La masa mitocondrial del tejido continua creciendo así como la concentración de los componentes de la cadena respiratoria. Todos estos cambios mitocondriales dan lugar a un aumento en la capacidad termogénica del tejido. Así, el nivel de desarrollo mitocondrial y funcional del tejido adiposo marrón alcanza su máximo al final de esta fase. De hecho, la reestimulación del tejido por el frío o la dieta, tras la fase de involución que se produce en la etapa adulta, produce un nuevo aumento de los parámetros mitocondriales que habían declinado, alcanzándose el mismo nivel máximo observado en el periodo postnatal (Nicholls y Locke, 1984).

Además de los cambios mitocondriales, la exposición crónica al frío o la sobrealimentación inducen en el tejido adiposo marrón un aumento en la capacidad proliferativa de sus células (Skala, 1984).

### **2.2.2 Función termogénica del tejido adiposo marrón**

El adipocito marrón constituye la unidad funcional del tejido adiposo marrón y en sus mitocondrias radica el mecanismo molecular de la " termogénesis sin

tiriteo". Dichas mitocondrias presentan unas características bioenergéticas particulares que las diferencian de las mitocondrias del resto de los tejidos. Estas características viene dadas por la presencia de una proteína de peso molecular 32 KD localizada en la membrana interna mitocondrial merced a la cual se produce un desacoplamiento de la fosforilación oxidativa y la cadena de transporte electrónico, liberándose la energía procedente del gradiente electroquímico de protones en forma de calor, en lugar de sintetizarse ATP (Nicholls y Locke, 1984).

El efector fisiológico de la termogénesis del tejido adiposo marrón es la noradrenalina que se libera en las terminales nerviosas simpáticas que inervan el tejido. De esta manera se activa el enzima triglicérido lipasa sensible a hormonas liberándose los ácidos grasos que actúan como sustratos activadores de la proteína desacoplante, dando lugar a la disipación de energía en forma de calor (Nicholls y Locke, 1984).

La termogénesis del tejido adiposo marrón es especialmente importante durante el periodo perinatal debido a la necesidad del recién nacido de hacer frente a una temperatura ambiente inferior a la del útero materno. De esta manera, en los últimos años se han realizado estudios interesantes de la regulación de la expresión genética de la proteína desacoplante en el periodo perinatal de la rata tanto "in vivo" como "in vitro".

Se han realizado estudios "in vivo" detectándose niveles significativos del mRNA de la proteína desacoplante en fetos de rata de 19 días de gestación (Giralt y col., 1990). Asimismo, estos autores han descrito un aumento en la expresión de la proteína desacoplante con respecto a los niveles fetales durante las primeras horas de vida postnatal cuando los neonatos eran mantenidos a la temperatura de 21°C, mientras que en neonatos mantenidos a 37°C los niveles del mensajero de la proteína desacoplante experimentaban un descenso gradual en las primeras 12 horas de vida postnatal.

La cantidad de proteína desacoplante en el tejido adiposo marrón experimenta un aumento progresivo a partir del día 21 de gestación alcanzando niveles máximos en ratas lactantes de 10 días de vida postnatal (Porrás y col., 1990a). Estos resultados se correlacionan con el aumento de los niveles del mRNA de esta proteína en el desarrollo postnatal de la rata (Riquier y col., 1986). Sin embargo,

mientras que estos autores detectan un descenso en los niveles de mensajero en neonatos de 20 días, Porras y col. (1990a) continúan detectando altos niveles de proteína en este momento del desarrollo.

El cultivo primario de adipocitos marrones fetales de rata es un sistema que permite el estudio de la regulación de la expresión genética de proteínas por factores que actúan de manera individual o sinérgica (Porras y col., 1990b). En cultivos quiescentes de adipocitos marrones de fetos de rata de 22 días de gestación la proteína desacoplante se induce en presencia de isoproterenol ( $\beta$ -agonista) y las combinaciones de noradrenalina ( $\alpha$ - $\beta$ -agonista) y yohimbina ( $\alpha_2$ -antagonista) así como isoproterenol y  $T_3$ . Por tanto, se puede decir que en estas condiciones experimentales la expresión genética de la proteína desacoplante se encuentra modulada por agentes adrenérgicos y  $T_3$  (Porras y col., 1989).

### 2.2.3 Función lipogénica del tejido adiposo marrón

El tejido adiposo marrón es cuantitativamente junto con el hígado el principal tejido lipogénico durante el periodo perinatal (Pillay y Bailey, 1981). La capacidad lipogénica fetal de este tejido aumenta desde el día 20 al 22 de gestación alcanzando en el momento del nacimiento niveles cuatro veces superiores a los encontrados en hígado (Pillay y Bailey, 1982a), cayendo hasta un 15% de su valor en el primer día de vida extrauterina (Benito y col., 1984). La lipogénesis fetal es posible gracias al aporte de sustratos de la madre al feto a través de la barrera placentaria. Serán los ácidos grasos sintetizados por este tejido los combustibles metabólicos utilizados por la mitocondria como sustratos oxidativos en el mecanismo termogénico (Nicholls y Locke, 1984).

Tras el nacimiento se inhibe drásticamente la capacidad lipogénica del tejido adiposo marrón (Pillay y Bailey, 1982a; Benito y col., 1984). Dicha inhibición se corresponde con un aumento previsible de la capacidad termogénica del tejido. Este hecho se explica teniendo en cuenta que el elevado contenido en grasa de la leche y la elevada actividad lipoproteín lipasa del tejido en el periodo de lactancia, son los responsables del aporte de ácidos grasos como sustratos oxidables en la mitocondria para la producción de calor por parte de este tejido (Pillay y Bailey,

1982b). Dicha inhibición se revierte en el momento del destete, cuando los animales comienzan a alimentarse con una dieta sólida fundamentalmente hidrocarbonada y la lipogénesis vuelve a alcanzar los niveles existentes en el momento del nacimiento (Pillay y Bailey, 1982a, 1982b). De esta manera, las actividades enzimáticas lipogénicas ácido graso sintasa y enzima málica revelan este perfil de desarrollo perinatal (Martínez Valverde, 1988).

La lipogénesis del tejido adiposo marrón durante el periodo perinatal se muestra muy sensible a insulina. Esta hormona activa rápidamente las enzimas lipogénicas estimulando la síntesis lipídica del tejido adiposo marrón (Pillay y Bailey, 1983). El feto presenta unos altos niveles de insulina circulantes frente a niveles crecientes, pero aun bajos de glucagón (Lorenzo y col., 1982; Pillay y Bailey, 1983). Tras el nacimiento la razón insulina/glucagón cae drásticamente al igual que la lipogénesis del tejido adiposo marrón (Benito y col., 1984). La administración de glucagón inhibe la síntesis lipídica postnatal del tejido siendo esta inhibición concurrente con el aumento de la razón glucagón/insulina plasmática en el momento del nacimiento (Benito y col., 1984).

La sensibilidad de este tejido a catecolaminas es muy alta inhibiendo estas hormonas fuertemente la lipogénesis (Benito y col., 1984). Al incubar adipocitos marrones aislados de fetos de 22 días con noradrenalina se produce un descenso en la lipogénesis mediado por un mecanismo  $\beta$ -adrenérgico (Roncero y col., 1987). Estos resultados concuerdan con la estimulación adrenérgica de la termogénesis en el momento del nacimiento.

El papel de las hormonas tiroideas en la regulación de la síntesis lipídica del tejido adiposo marrón no es del todo conocido. Sin embargo, Hahn y Hasanali (1982) han apuntado que la administración precoz de hormonas tiroideas induce las enzimas lipogénicas de este tejido antes del destete. Estos autores sugieren que las hormonas tiroideas no actuarían directamente sobre el tejido sino que podrían aumentar el número de receptores de insulina o bien actuar directamente sobre el transporte de glucosa al tejido.

La regulación hormonal de la síntesis lipídica fetal del tejido adiposo marrón se ha estudiado "in vitro" en un sistema de cultivo primario de adipocitos marrones de fetos de rata de 22 días de gestación (Lorenzo y col., 1988). En estas

condiciones, la insulina a concentraciones comprendidas entre 0.4 y 40 nM incrementa el flujo lipogénico tanto a corto (5 horas ) como a largo plazo (24 horas). Estos efectos son mucho mayores que los observados en células aisladas tratadas con la hormona durante una hora (Roncero y col., 1987), lo que parece indicar que a lo largo del cultivo se reparan los receptores de insulina que han sido dañados en el proceso de aislamiento de la células. Asimismo, esta hormona activa las enzimas lipogénicas acetil-CoA-carboxilasa a corto plazo y ácido graso sintasa y enzima málica a largo plazo (Lorenzo y col., 1988).

La presencia de  $T_3$ , conjuntamente con insulina en el medio de cultivo potencia el efecto estimulador de esta última sobre el flujo lipogénico . Además, en ausencia de insulina la  $T_3$  también produce un aumento discreto del flujo lipogénico del 38% observándose un aumento significativo de la actividad ácido graso sintasa (Lorenzo y col., 1988).

El tratamiento del cultivo con glucagón no modifica el flujo lipogénico del tejido adiposo marrón con lo cual esta hormona no parece estar implicada en la regulación de la síntesis lipídica de este tejido. Estos resultados concuerdan con los descritos por Roncero y col. (1987) en adipocitos marrones aislados.

El papel de las catecolaminas como agentes lipolíticos ha sido también estudiado en cultivos primarios de adipocitos marrones fetales de rata. Estas hormonas mediante un mecanismo  $\beta$ -adrenérgico son potentes inhibidores de la lipogénesis en cultivo (Lorenzo y col., 1988).

La dexametasona inhibe un 50% el flujo lipogénico en cultivos primarios de adipocitos marrones fetales de rata. Sin embargo, en presencia de insulina no se ha observado este efecto inhibitorio. Estos resultados concuerdan con los descritos "in vivo" por Roncero y col. (1987). Asimismo, se ha sugerido que la dexametasona podría inhibir la utilización de glucosa por tejidos extra-hepáticos (Benito y col., 1982). De esta manera, la insulina podría incrementar el transporte de glucosa en cultivos primarios de adipocitos marrones fetales de rata, revirtiendo el efecto inhibitorio de la dexametasona en su ausencia (Lorenzo y col., 1988).

Por último, la presencia de progesterona incrementa la lipogénesis del cultivo un 10%, así como un 18% cuando actúa conjuntamente con la insulina. Estos efectos son menores que los observados "in vivo" (Roncero y col., 1987) lo que parece

indicar que esta hormona no participa directamente en la regulación de la lipogénesis del tejido adiposo marrón pudiendo actuar incrementando la ingesta y la disponibilidad de sustratos a los tejidos (Lorenzo y col., 1988).

Una vez estudiada la síntesis lipídica del tejido adiposo marrón diferenciado, sería interesante conocer como se regula la expresión genética de las enzimas que participan en este proceso. En este sentido las nuevas técnicas de Biología Molecular así como los cultivos de células animales, han contribuido a dilucidar los mecanismos reguladores no conocidos "in vivo" para muchos tejidos. En nuestro estudio nos centramos en dos enzimas que participan en la ruta lipogénica del tejido adiposo marrón mediante el aporte de poder reductor en forma de NADPH. Se trata de la enzima málica y la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa. Esta última es también el enzima limitante de la vía de las pentosas fosfato, con lo cual participa en la síntesis de ribosas 5' fosfato para la formación de ácidos nucleicos.

#### **2.2.3.1 Regulación de la expresión genética de la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa**

La glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) es el enzima limitante de la vía de las pentosas fosfato. Esta ruta aporta poder reductor en forma de NADPH que posteriormente es utilizado en reacciones metabólicas biosintéticas, entre las que se encuentran la síntesis de ácidos grasos y esteroides. El destino final de esta ruta es el aporte de pentosas fosfato, sustratos necesarios para la síntesis de ácidos nucleicos. Por tanto, el enzima tiene un doble papel en el metabolismo celular, por un lado en la síntesis lipídica y por otro, en la síntesis de ácidos nucleicos.

En mamíferos, la G6PD es un homodímero o un homotetrámero constituido por subunidades inactivas de peso molecular 58.000 D. Al efectuar la purificación el 90% de la actividad deriva de la forma dimérica. La actividad remanente se debe a los agregados tetraméricos e incluso hexaméricos que coexisten en pequeña proporción (Shreve y Levy, 1977). La proteína activa se sintetiza mediante la traducción de su correspondiente mRNA de 2.300 pares de bases (Fritz y col., 1986).

La G6PD se encuentra activa en el tejido adiposo marrón durante el periodo

perinatal aunque no se conoce su regulación en este tejido a nivel molecular. Sin embargo, en hígado de rata adulta se han realizado numerosos estudios sobre la regulación nutricional y hormonal del enzima gracias a la aplicación de las técnicas de ingeniería genética. Asimismo, los cultivos celulares han permitido el estudio por separado, o bien en conjunto, de las señales de expresión genética sin tener en cuenta otros factores que podrían interferir en los estudios realizados "in vivo".

Estudios "in vivo" demuestran que la actividad G6PD hepática disminuye en animales ayunados, aumentando en animales ayunados y posteriormente realimentados con una dieta rica en hidratos de carbono (Kletzien y col., 1985). Sin embargo, ahora nos ocuparemos de la regulación hormonal "in vitro" de la expresión genética de esta proteína.

En cultivos primarios de hepatocitos de rata adulta la actividad G6PD se induce en presencia de insulina. Este aumento en actividad es paralelo a un aumento en la velocidad de síntesis de la proteína, así como en la cantidad de mRNA detectada mediante hibridación su cDNA correspondiente en presencia de la hormona. Sin embargo, la presencia de dexametasona en el cultivo aunque aumenta significativamente los niveles de mRNA, no modifica los valores de actividad enzimática específica y velocidad de síntesis. Estos resultados se han explicado como consecuencia de una menor eficiencia traduccional del mRNA inducido en presencia de dexametasona (Fritz y col., 1986). La presencia conjunta de ambas hormonas en el medio de cultivo produce aumentos en la actividad, cantidad de proteína y niveles de mRNA mayores que los observados en presencia de insulina sola. De esta manera parece que la insulina no solo actúa incrementando los niveles del mRNA del enzima, sino que también actúa a nivel de traducción, ya que el mRNA inducido en presencia de dexametasona solo se traduce a proteína activa estando presentes ambas hormonas (Fritz y col., 1986).

El papel de las hormonas tiroideas en la regulación de la expresión genética de la G6PD se ha estudiado "in vivo" y en cultivos primarios de hepatocitos de rata adulta. Se ha descrito un aumento de dos veces en los niveles del mRNA de la G6PD determinados mediante un sistema de traducción "in vitro" tras la administración de  $T_3$  a ratas eutiroideas, así como en animales hipertiroideos, que se correlacionan perfectamente con cambios paralelos en la velocidad de síntesis

del enzima (Miksicek y Towle, 1982). Estos resultados indicarían una regulación pre-traducciona de la G6PD por  $T_3$  como consecuencia de los aumentos descritos en los niveles del mRNA en respuesta a la hormona. Otros autores indican que la administración de  $T_3$  a ratas hipotiroideas no produce aumentos significativos en los niveles del mRNA detectados mediante hibridación con el cDNA correspondiente. Sin embargo, en este caso se observa un incremento significativo en la actividad enzimática (Fritz y Kletzien, 1987). Estos datos indican que la  $T_3$  podría regular la actividad G6PD aumentando la eficiencia traduccional del mRNA sin aumentar los niveles ya existentes.

Las discrepancias entre estos resultados podrían ser consecuencia de los diferentes modelos experimentales empleados, así como en la metodología descrita en cada caso. Por tanto, resulta necesario la utilización de un sistema "in vitro" de cultivo celular para dilucidar los mecanismos responsables de los efectos de  $T_3$  sobre la actividad, velocidad de síntesis y niveles del mRNA de la G6PD. En este sentido existen estudios preliminares en cultivos primarios de hepatocitos de rata adulta. En este sistema celular no se han encontrado cambios en los niveles del mRNA de este enzima cuando la  $T_3$  o el glucagón estaban presentes en el medio de cultivo (Yoshimoto y col., 1983a). Sin embargo, estos estudios se han realizado midiendo los niveles del mRNA en un sistema de traducción "in vitro" y no mediante hibridación con sondas específicas.

#### 2.2.3.2 Regulación de la expresión genética de la enzima málica

La enzima málica es otra enzima generadora de NADPH que contribuye a mantener activo el flujo lipogénico. Se trata de un homotetrámero cuyas subunidades tienen un peso molecular de 62.000 D que individualmente carecen de actividad biológica. Esta proteína se sintetiza como resultado de la traducción de dos mRNAs de 4.5 y 2.7 Kb respectivamente que son transcritos de un único gen con más de un lugar de poliadenilación (Dozin y col., 1985).

La actividad enzima málica es alta en hígado de ratas alimentadas con una dieta rica en hidratos de carbono y disminuye drásticamente en el ayuno. De esta manera, el estado nutricional regula los niveles enzimáticos mediante el control de

la velocidad de síntesis. Asimismo, la síntesis de enzima málica en respuesta a la dieta hidrocarbonada es paralela a un aumento en los niveles de mRNA citoplasmático como consecuencia de una disminución en su velocidad de degradación (Dozin y col., 1986a).

La expresión genética de la enzima málica se encuentra también regulada por factores hormonales. La insulina aumenta la velocidad de transcripción del gen de la enzima málica hepática y por tanto los niveles del mRNA citoplasmático y la actividad enzimática específica cuando se administra a ratas diabéticas (Katsurada y col., 1988). Sin embargo, en cultivos primarios de hepatocitos de embrión de pollo no se han observado cambios en los niveles de mRNA cuando la insulina se encuentra presente en el medio de cultivo. Sin embargo, el glucagón acelera su velocidad de degradación (Back y col., 1986). En cultivos primarios de hepatocitos fetales de rata la insulina induce la actividad enzima málica como resultado de un aumento en la síntesis "de novo" de la proteína (Fabregat y col., 1989). En este sistema el efecto de la insulina se potencia en presencia de  $T_3$  siendo parcialmente revertido cuando se añade glucagón al medio de cultivo.

El papel de las hormonas tiroideas en la regulación de la expresión genética de la enzima málica ha sido y es actualmente objeto de numerosos estudios. La inyección de  $T_3$  a ratas hipotiroideas aumenta los niveles de mRNA citoplasmático así como la actividad específica de la enzima málica hepática (Dozin y col., 1985). Este efecto de  $T_3$  es dependiente del tejido ya que solo se han encontrado respuestas a esta hormona en hígado y corazón de rata no observándose en riñón, cerebro, pulmón, bazo y testículos. Tanto en hígado como en corazón la transcripción del gen de enzima málica aumentan en presencia de  $T_3$ , lo cual explica el aumento de los niveles de mRNA tras la inyección de la hormona. Sin embargo, este mecanismo resulta insuficiente para justificar los elevados niveles hepáticos de mRNA (Dozin y col., 1986b). Por este motivo, estos autores han encontrado que además de aumentar la velocidad de transcripción, la inyección de  $T_3$  estabiliza los transcritos primarios, ya que el acúmulo de mRNA citosólico durante el tratamiento con la hormona se corresponde perfectamente con los niveles de mRNA nucleares (Song y col., 1988).

Se han encontrado tres regiones dentro del promotor del gen de la enzima málica

implicadas en la unión a moléculas reguladoras de la transcripción de dicho gen. Así, la  $T_3$  unida a su receptor nuclear interaccionaría directamente con estas regiones (efecto primario) o bien podría inducir la unión de ciertas proteínas nucleares a estas regiones del promotor (efecto secundario) activándose de esta manera la transcripción (Petty y col., 1989, 1990).

La administración a ratas eutiroideas de dehidroepiandrosterona, andrógeno hipolipidémico secretado por el tejido adrenal, induce la actividad enzima málica hepática. Asimismo, se ha descrito un aumento paralelo en los niveles de mRNA citosólicos y nucleares como resultado de un aumento en la transcripción génica. La administración conjunta de  $T_3$  y dehidroepiandrosterona produce un aumento aditivo sobre la velocidad de transcripción. Experimentos realizados con ratas hipotiroideas sugieren que la  $T_3$  es necesaria para la inducción de la enzima málica por dehidroepiandrosterona, ya que en estas condiciones el andrógeno solo es capaz de inducir la expresión genética del enzima cuando se administra conjuntamente con  $T_3$  (Song y col., 1989). La dehidroepiandrosterona está implicada en procesos hipolipidémicos en la rata mediante la inhibición de la actividad ácido graso sintasa hepática y disminución de la concentración de triglicéridos en suero. Por tanto, el significado metabólico de la inducción de la enzima málica por esta molécula es desconocido. Se ha sugerido que el NADPH originado por la activación del enzima en presencia de dehidroepiandrosterona estaría implicado en otros procesos metabólicos que requieren poder reductor y no en la ruta lipogénica (Song y col., 1989).

En cultivos primarios de adipocitos marrones fetales de rata se ha estudiado la regulación hormonal de la expresión de la enzima málica a nivel de proteína. En células cultivadas durante 42 horas en presencia de la hormona la insulina incrementa tanto la actividad enzimática específica como la cantidad de proteína citosólica. Estos parámetros no se modifican al añadir conjuntamente  $T_3$  al medio de cultivo. Además, la noradrenalina produce una reversión total del efecto inductivo de la insulina sobre la expresión de la enzima málica. Mientras que el efecto inductivo de la insulina se explica como resultado de un aumento en la velocidad de síntesis de la proteína, la noradrenalina acelera la velocidad de

degradación de la enzima málica inducida en presencia de insulina (Lorenzo y col., 1989).

### **III-MATERIAL Y METODOS**

### **3.1 Animales de experimentación**

Para los cultivos celulares se han utilizado fetos de 22 días de gestación de ratas de la raza Wistar administradas por el animalario del Instituto de Bioquímica de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense.

En la purificación enzimática se emplearon ratas machos de la raza Wistar de pesos comprendidos entre 200 y 300 g que habían sido previamente ayunadas durante 48 horas y posteriormente realimentadas otras 48 horas con una dieta sólida de laboratorio fundamentalmente hidrocarbonada.

### **3.2 Medios instrumentales**

Las pesadas se realizaron en balanzas modelo Sartorius 1405 (Sartorius Werke GMBH, Alemania) y modelo ER-120A (A y B Co, Tokyo).

Para las determinaciones de pH se utilizó un pHímetro tipo Crison D-501 (Crison, España).

Las centrifugaciones han sido realizadas en una microcentrífuga Eppendorf modelo 5414 (Eppendorf, Alemania), en una centrífuga de mesa modelo GLC-1 (Sorvall, Dupont Inst. U.S.A.) y en una centrífuga Kontron modelo Centrikon H-401 (Kontron, Suiza).

Las ultracentrifugaciones se han realizado en una ultracentrífuga Kontron modelo Centrikon T-2080 (Kontron, Suiza).

Las centrifugaciones a vacío se realizaron en una centrífuga Speed-Vac Concentrator modelo RH40-11 de la firma Savant Inst. (U.S.A).

Las medidas espectrofotométricas se realizaron en un espectrofotómetro Shimadzu modelo UV-60 (Shimadzu, Japon). Se han utilizado cubetas de plástico de 1 ml de capacidad y 1 cm de paso de luz procedentes de la firma Sarstedt

(Alemania) y cubetas de cuarzo de 3 ml de capacidad y 1 cm de paso de luz.

Las medidas fluorimétricas se realizaron en un espectrofluorímetro Perkin-Elmer, modelo MPF-44A (U.S.A) utilizándose cubetas de cuarzo de 3 ml de capacidad y 1 cm de paso de luz.

Las determinaciones radiométricas fueron realizadas en un contador de centelleo líquido Kontron modelo Betamatic I (Kontron, Suiza).

Para la homogenización de los tejidos se utilizaron homogenizadores de vidrio con pistilo de teflón de la marca Pobel, adaptadas a un aparato Tri-R-Stir-R, modelo K43.

Las muestras de células fueron sonicadas en un sonicador Microson de la firma Heat Systems-Ultrasonics Inc, (U.S.A).

Para la agitación de los tubos se empleó un agitador Heidolph, modelo REAX 200 (Selecta, España) y para las distintas soluciones un agitador magnético (Selecta, España).

Las incubaciones se realizaron en un baño Grant (Grant Inst., Inglaterra) dotado con sistema de agitación lineal.

El manejo de las muestras para el cultivo de células se realizó en una campana de flujo laminar vertical Assab, modelo V<sub>4</sub> (Assab, Suecia).

El mantenimiento de los cultivos se realizó en un incubador termostatzado con gaseo de CO<sub>2</sub> de la firma Assab , modelo T-304 GF (Assab, Suecia).

Las células se incubaron en placas de 6 cm de diámetro procedentes de la firma Costar (U.K.).

La esterilización del material se realizo en un autoclave Selecta, modelo Clino-Matic (Selecta, España).

El contaje de células se realizó en un hemocitómetro Neubauer (Schreck, Alemania).

El microscopio de luz directa era de la firma Will (Heerburg, Suiza) y el microscopio de luz invertida era de la firma Nikon, (Japon).

El manejo de las muestras y productos líquidos se realizó con pipetas automáticas Gilson (Francia) modelos P-20, P-100, P-200 y P-1000 y con pipetas P-10 de la firma Eppendorf (Alemania).

Las electroforesis de proteínas se han realizado con un equipo Mini Protean II de

los laboratorios Bio-Rad, (Richmond, U.S.A). Todos los reactivos utilizados en los experimentos de inmunoelectroforesis así como la cubeta de transferencia, modelo Trans-Blot Cell y la membrana de nitrocelulosa (0.45  $\mu\text{m}$ ) fueron suministrados por Bio-Rad.

Las electroforesis de ácidos nucleicos se han realizado en cubetas de la firma Bio-Rad y E-C Aparatus Corporation (Florida, U.S.A). Asimismo, la fuente de alimentación utilizada en el desarrollo de las electroforesis fue el modelo 200/2.0 de la firma Bio-Rad.

Las medidas densitométricas se realizaron en un densitómetro de la firma E-C Aparatus Corporation (Florida, U.S.A).

Para la purificación enzimática se utilizó un equipo completo de purificación compuesto por columnas de vidrio, colector de fracciones modelo F-100 y la bomba peristáltica modelo P-1 de la firma Pharmacia (Suecia).

La concentración de las enzimas purificadas se realizó con un sistema de ultrafiltración de la firma Sartorius (Sartorius Werke GMBH, Alemania).

Los estudios de citometría de flujo se realizaron en un citómetro de la firma Beckton-Dickinson (U.S.A)

Las fotografías se realizaron en un equipo Polaroid modelo MP 4-LAND dotado de transiluminador con películas fotográficas modelo 667 de la misma firma.

Las películas utilizadas en autorradiografía eran de la casa Kodak modelo Omat X-AR.

### **3.3 Productos**

Los tampones, soluciones salinas y reactivos en general se han preparado con productos de las casas Sigma Chemical CO (U.S.A) y Merk (Alemania).

Los sustratos, enzimas y coenzimas empleados han sido suministrados por la firma Boëhringer Mannheim (Alemania).

El Medio Esencial Mínimo (MEM), las soluciones salinas de lavado y recogida de células, el bicarbonato sódico estéril, la glutamina y el suero fetal de ternera fueron suministrados por Flow (U.S.A).

La albúmina bovina libre en ácidos grasos fue suministrada por Sigma Chemical

CO (U.S.A).

La penicilina G y la estreptomina eran de Sigma Chemical CO (U.S.A). La gentamicina fue cedida por Antibióticos S.A (España) y la nistatina por Squibb S.A (España).

La insulina, noradrenalina y T<sub>3</sub> eran de la casa Sigma Chemical CO (U.S.A).

El factor de crecimiento epidérmico, la bombesina, la vasopresina, la forskolina el IBMX y el dibutirato de forbol procedían de Sigma Chemical CO (U.S.A).

El PDGF procedía de Collaborative Res., Inc. (Bedford, U.S.A).

El IGF-I fue suministrado por Amgen Biologicals (Thousand Oaks, U.S.A).

El Sephacryl G-200, la Q-Sepharosa y la NADP<sup>+</sup> agarosa eran de la casa Pharmacia (Suecia).

Todos los productos utilizados en la preparación de geles de agarosa y poliacrilamida proceden de los laboratorios Bio-Rad (Richmond, U.S.A). Los patrones de proteínas utilizados en las electroforesis de poliacrilamida eran también de Bio-Rad. Los marcadores de peso molecular de DNA fueron suministrados por Boehringer Mannheim (Alemania).

Los productos utilizados en los estudios de citometría de flujo eran de la firma Beckton-Dickinson (U.S.A).

La solución de extracción de RNA era de la firma Cinna/Biotex Lab. Int. (Texas, U.S.A).

El formaldehído empleado en los geles de agarosa era de la firma Fluka (Suiza) y la formamida de la firma Clontech Lab. Inc. (California, U.S.A).

El reactivo de determinación de proteínas fué suministrado por Bio-Rad así como el patrón de  $\gamma$ -globulina.

Los isótopos empleados <sup>3</sup>H-Timidina y <sup>32</sup> $\alpha$ -P dCTP proceden de Amersham Internacional.

Como líquido de centelleo se empleó el Cocktail-22-Normascint de la firma Shalau Ferosa (España).

### **3.4 Condiciones del animalario y control de la edad gestacional**

Los animales, ubicados en una habitación cerrada, sin ventanas y dotada de aire

acondicionado y de estufas, se mantenían a un ritmo de luz-oscuridad de 12 h-12 h, con la fase de oscuridad entre las 20 h y las 8 h, humedad de 45-55%, temperatura de  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$  y alimentación y bebida "ad libitum".

La edad gestacional se controló limitándose a una noche el tiempo de cohabitación de ratas vírgenes con machos de conocida fertilidad, apartándose las que presentaban espermatozoides en el frotis vaginal realizado a la mañana siguiente al posible coito, considerándose como día primero de la gestación. El 80% de las ratas gestantes así obtenidas, cuando se les permitía llegar al parto, lo hacían entre las 14-16 h del día 22 de gestación.

### **3.5 Obtención del tejido adiposo marrón**

Las ratas gestantes de 22 días fueron sacrificadas por dislocación cervical a primera hora del día 22 de gestación extrayéndose los fetos por cesárea. A continuación, se cortaba el cordón umbilical y posteriormente se sacrificaban por decapitación para extraer el tejido adiposo marrón interescapular con unas pinzas curvas estériles en cabina de flujo laminar.

### **3.6 Cultivo primario de adipocitos marrones fetales de rata**

El desarrollo de los métodos de cultivo de adipocitos marrones ha sido tardío, las primeras referencias en la literatura han aparecido en 1983 tanto para adipocitos marrones procedentes de ratas adultas (Nèchad, 1983, Nèchad y col., 1983) como de fetos de rata (Sugihara y col., 1983).

#### **3.6.1 Soluciones y medios de cultivo**

Las soluciones y medios de cultivo han sido preparados en la campana de flujo laminar en condiciones de esterilidad. Asimismo, todas las soluciones y tampones preparados para el cultivo han sido filtrados mediante filtros de nitrocelulosa estériles de 0.2 y  $0.45 \mu\text{m}$  de tamaño de poro.

El medio de aislamiento de adipocitos marrones tenía la siguiente composición:

NaCl-----	123mM
KCl-----	5mM
Glucosa-----	5mM
Hepes-----	100mM
CaCl <sub>2</sub> -----	1.3mM
BSA-----	4%(p/V)
Penicilina G-----	100μg/ml
Estreptomina-----	50μg/ml
Nistatina-----	25U/ml

El pH se ajustaba a 7.4 con NaOH 0.1N y posteriormente se esterilizaba por filtración.

Para el cultivo de adipocitos marrones se ha utilizado Medio Esencial Mínimo suplementado con glutamina 2 mM, Hepes 20 mM, bicarbonato sódico 2.2 g/l y antibióticos y fungicidas en las mismas concentraciones del medio de aislamiento. Asimismo, el medio de cultivo se suplementó con suero fetal bovino o albúmina bovina sérica según las condiciones experimentales.

Para el lavado de las células se utilizó una solución salina de Dulbecco's estéril suplementada con antibióticos, gentamicina y nistatina a pH 7.4.

Para la recogida de las células se utilizó una solución salina de Dulbecco's libre en calcio y magnesio suplementada con EDTA 20 mM.

### **3.6.2 Aislamiento de adipocitos marrones**

En el proceso de aislamiento de adipocitos marrones se ha seguido el método descrito por Lorenzo y col., (1988). Los fetos de rata se obtuvieron por cesárea como se ha descrito anteriormente. La extracción se realizaba en una cabina de flujo laminar donde se procedía a la decapitación y extracción del tejido adiposo marrón interescapular (aproximadamente 30 mg/feto), el cual era troceado finamente con tijeras curvas estériles y colocado en viales de plástico a los cuales se añadían 3 ml de medio de aislamiento y colagenasa en la proporción 2 mg/ml. Los viales eran incubados a 37°C en un baño con agitación de 100 oscilaciones por

minuto. Cada 5 minutos los viales eran agitados vigorosamente con un agitador mecánico durante 5 segundos para facilitar la dispersión celular.

Después de 40 minutos de incubación, cuando parecía estar completada la digestión, se añadía a los viales 1 ml de medio de aislamiento sin calcio y suplementado con EGTA 2 mM incubándose 5 minutos más. Terminada la digestión, la mezcla era filtrada por una malla de nylon de  $100 \mu\text{m}^2$  de poro para eliminar el material no digerido y el filtrado era colocado en tubos de plástico centrifugándose 5 minutos a  $600 \times g$ . A continuación, se aspiraba el sobrenadante y los adipocitos marrones se resuspendían en el medio de aislamiento centrifugándose de nuevo en las mismas condiciones. Por último, las células se resuspendían en un volumen conocido de medio de cultivo suplementado con el 10% de suero fetal de ternera.

Para determinar el número de células y la viabilidad de las mismas, una alícuota de la suspensión final de células se diluía 5 veces en una solución de azul de tripano al 0.2% en NaCl al 0.9%. Las muestras se introducían por duplicado en el hemocitómetro y se realizaba el conteo celular. Las células teñidas por el colorante se consideraban no viables. El porcentaje de células que excluían el colorante era del 96%. De esta manera se obtuvieron entre 25-30 millones de células por gramo de tejido.

### **3.6.3 Cultivo de adipocitos marrones**

Los adipocitos marrones fetales de rata han sido cultivados en diferentes condiciones según la finalidad de dichas células. Así, se han realizado cultivos con objeto de estudiar la expresión genética de las enzimas lipogénicas G6PD y enzima málica en condiciones de quiescencia y cultivos donde se ha estudiado la proliferación de los adipocitos marrones fetales en respuesta a distintos factores de crecimiento.

En los experimentos de expresión genética, una vez realizado el conteo de las células se sembraban entre  $1-1.5 \times 10^6$  células por placa de cultivo en un volumen final de 2.5 ml de medio de cultivo suplementado con un 10% de suero fetal de ternera. A continuación, las placas se incubaban a  $37^\circ\text{C}$  en un incubador dotado

con atmósfera del 5% de CO<sub>2</sub>/95% aire/80% humedad. A las 6 horas de la siembra, tiempo necesario para que las células se adhirieran a la placa de cultivo, el medio era renovado aspirándose con una pipeta pasteur estéril conectada a una trompa de vacío. A continuación, las células se sometían a dos lavados consecutivos con 2.5 ml de medio de lavado con el fin de eliminar las células hematopoyéticas, así como los adipocitos no adheridos. Posteriormente, las células se cultivaban en medio de cultivo suplementado con 2% de suero fetal y hormonas a las concentraciones: insulina 40 nM, noradrenalina 10 μM y T<sub>3</sub> 10 nM, 1 μM y 10 μM. De esta manera, las células se mantenían en cultivo por periodos de 6 y 10 días renovándose el medio y las hormonas cada 48 horas.

Para realizar los estudios de proliferación se sembraban 1.5 x 10<sup>6</sup> de células por placa de cultivo en un volumen final de 2.5 ml de medio de cultivo con suero fetal al 10% y así eran mantenidas durante 6 horas en las condiciones anteriormente descritas. A continuación se aspiraba el medio y las células se sometían a dos lavados consecutivos con solución de lavado para su posterior cultivo en medio sin suero suplementado con el 2% de albúmina bovina durante 24 horas. De esta manera se impedía la proliferación celular manteniéndose las células en la fase G<sub>0</sub> del ciclo celular. Transcurrido este tiempo las células se sometían nuevamente a lavado y a continuación se cultivaban en medio con muy bajo contenido en suero (1%) al que se añadían los distintos factores mitogénicos. En todos los experimentos se llevaron controles cultivados en ausencia de señales de proliferación. Las concentraciones de los distintos factores de crecimiento ensayados fueron: IGF-I 1.4 nM, EGF 3.3 nM, Bombesina 6 nM, Vasopresina 18 nM, PDGF ( 5 U<sub>max</sub>/2 /ml), Forscolina 10 y 25 μM, IBMX 50 μM y dibutirato de forbol 200 nM.

### **3.7 Determinación de actividades enzimáticas**

Una vez finalizado el cultivo, se retiraba el medio y se lavaban las células dos veces consecutivas con solución salina de lavado. A continuación se añadían 1.5 ml de solución de recogida de células por placa de cultivo y se mantenían las placas en el incubador durante 15 minutos con el fin de despegar las células de la

superficie de cultivo. Pasado este tiempo, se procedía al raspado de las placas quedando las células en suspensión en el medio. Con una pipeta se pasaba la suspensión a tubos eppendorf centrifugándose durante 5 minutos a 12.000 x g. Después de aspirar el sobrenadante, se volvían a añadir 1.5 ml de solución de recogida con el fin de recuperar el mayor número posible de células. Con una pipeta se pasaba a los tubos eppendorf correspondientes y se repetía la centrifugación en las mismas condiciones. Se volvía a aspirar el sobrenadante quedando en el fondo del tubo un precipitado de células que se mantenía a -20°C .

### **3.7.1 Determinación de la actividad enzima málica**

los precipitados de células se resuspendían en 500  $\mu$ l de tampón de homogenización que contenía: sacarosa 0.25 M, EDTA 1 mM, DTT 1 mM y Tris/ClH 15 mM pH 7.4. El homogenado se centrifugaba durante 5 minutos a 12.000 x g a 4°C obteniéndose el sobrenadante o fracción citosólica donde se determinaban las actividades enzimáticas. Las muestras se mantenían en hielo durante todo el proceso.

La actividad enzima málica se ha determinado espectrofotométricamente según el método descrito por Ochoa y col., (1948). Las medidas se realizaban a 37°C de temperatura y 340 nm de longitud de onda, en cubetas de plástico de 1 ml de capacidad y 1 cm de paso de luz. La mezcla de reacción contenía  $MnCl_2$  1 mM,  $NADP^+$  0.25 M, Tris/ClH 0.1 M pH 7.4 y la muestra en un volumen final de 1 ml. La reacción se iniciaba añadiendo malato 1.5 mM a la cubeta y se leía frente a un blanco donde el malato era omitido

### **3.7.2 Determinación de la actividad G6PD**

Las muestras de células se preparaban tal como se ha descrito para la enzima málica. La actividad G6PD se ha determinado espectrofotométricamente según el método descrito por Sapag-Hagar y col. (1973). Las medidas se realizaban a 37°C y 340 nm de longitud de onda en cubetas de plástico de 1 ml de capacidad y 1 cm de paso de luz. La mezcla de reacción contenía  $Cl_2Mg$  5 mM,  $NADP^+$  0.25 mM,

6-fosfogluconato deshidrogenasa 0.3 U y Tris/ClH 50 mM pH 7.5 y la muestra en un volumen final de 1 ml. La reacción se iniciaba añadiendo glucosa 6-fosfato a la cubeta y se leía frente a un blanco donde esta última era omitida. De esta manera se determinaban conjuntamente las actividades G6PD y 6-fosfogluconato deshidrogenasa que había sido añadida en exceso a las cubetas, siendo la actividad G6PD la mitad del valor obtenido por este procedimiento, puesto que un 50% del NADPH originado por reducción del NADP<sup>+</sup> corresponde a la primera reacción de la ruta de las pentosas fosfato y el otro 50% a la segunda.

### **3.7.3 Determinación de proteínas**

Las proteínas se determinaron según el método de Bradford (1976). Los reactivos utilizados fueron:

- $\gamma$ globulina 1.4 mg/ml
- reactivo Bradford (Bio-Rad)

Se construía una curva patrón de proteínas con cantidades crecientes de  $\gamma$ -globulina comprendidas entre 1.52 y 15.2  $\mu$ g de proteína, completándose con agua hasta 800  $\mu$ l añadiendo posteriormente 200  $\mu$ l de reactivo. Las muestras se preparaban con reactivo y agua de manera análoga. A continuación se dejaban transcurrir 5 minutos y se leían en el espectrofotómetro a 595 nm y temperatura ambiente obteniéndose los valores correspondientes a las absorbancias. Finalmente se construía una gráfica patrón donde se representaban en ordenadas las absorbancias y en abcisas los  $\mu$ g de proteína. Las absorbancias correspondientes a las muestras eran interpoladas y así se obtenían los mg de proteína de las mismas.

### **3.7.4 Expresión de resultados y tratamiento estadístico de los mismos**

Las actividades enzimáticas específicas se expresaron en todos los casos como nanomoles de sustrato consumido, o producto aparecido, por minuto y por mg de proteína, a la temperatura de la reacción y han sido calculadas por la siguiente fórmula:

$$A_s = \frac{V \times \Delta DO}{10^{-3} \times \epsilon \times d \times v \times c} = \frac{\text{nmoles}}{\text{min} \times \text{mg prot}} = \frac{\text{mU}}{\text{mg prot}}$$

donde

V = volumen final de la cubeta en ml

$\Delta DO$  = variaciones de la densidad óptica por minuto

$\epsilon$  = coeficiente de extinción molar

d = espesor de la cubeta (en todos los casos 1 cm)

v = volumen de muestra en cubeta (en ml)

c = concentración de proteínas en la muestra (en mg/ml)

El coeficiente de extinción molar para el NADPH a 340 nm es  $6.22 \times 10^6 \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$ .

Para la G6PD y la enzima málica se define una miliunidad de actividad enzimática como la cantidad de enzima que forma un nanomol de NADPH por minuto a 37°C.

Las tablas de actividades enzimáticas específicas se han elaborado utilizando los valores medios  $\pm$  los errores estándar de las medias  $\pm$  (S.E.M). Asimismo, se ha realizado el análisis de significatividad de la "t de Student".

### 3.8 Purificación de la enzima málica y G6PD

La enzima málica y la G6PD se purificaron a partir de hígado de ratas adultas que tras un periodo de ayuno de 48 horas, se realimentaron otras 48 horas con una dieta de laboratorio rica en hidratos de carbono. En cada purificación se partía de 60-100 g de tejido hepático que se homogenizaron en 2 volúmenes de tampón que contenía EDTA 1 mM, DTT 1 mM, sacarosa 0.25M y Tris /HCl 25 mM pH 7.5. A continuación, el homogenado se sometía a ultracentrifugación a  $105.000 \times g$  durante 1 hora a 4°C con objeto de aislar la fracción citosólica del tejido.

Precipitación fraccionada con sulfato de amonio

El primer paso de la purificación consistía en una precipitación fraccionada con sulfato de amonio. La sal se añadía lentamente al sobrenadante previamente obtenido hasta alcanzar una saturación del 30%. Seguidamente se agitaba durante 30 minutos en hielo y se centrifugaba a 27.000 x g durante 30 minutos a 4°C. El sobrenadante obtenido se volvía a precipitar hasta alcanzar el 50% de saturación y se agitaba y centrifugaba como antes. El precipitado resultante ( precipitado 30-50% de saturación) contenía la G6PD activa y se guardó a -20°C. Por último, el sobrenadante resultante se llevó al 80% de saturación. Después de agitar y centrifugar se obtuvo un precipitado (precipitado 50-80% de saturación). Este precipitado se resuspendía en la mínima cantidad posible de tampón 2 mM 2-mercaptoetanol, Tris/ClH 50 mM pH 7.4 (tampón 1) y se dializaba durante 18 horas a 4°C en 2 x 1 litros de este mismo tampón.

### **3.8.1 Purificación de la enzima málica**

#### **Cromatografía de filtración**

La muestra anteriormente dializada se centrifugaba a 27.000x g durante 30 minutos a 4°C. El sobrenadante obtenido se aplicaba a una columna de Sephacryl G-200 (120 x 2.5 cm) previamente empaquetada y equilibrada con tampón 1 . La velocidad de flujo fue en todo momento de 1 ml/minuto y todo el proceso se realizó a 4°C. En las fracciones eluidas se midió tanto la absorbancia a 280 nm, como la actividad enzima málica.

#### **Cromatografía de intercambio iónico**

Las fracciones del proceso anterior que poseían una relación actividad enzimática/ absorbancia a 280 nm mayor se juntaban y se volvían a precipitar con sulfato amónico hasta alcanzar el 80% de saturación siguiendo el procedimiento descrito. Después de centrifugar a 27.000 x g durante 30 minutos a 4°C, el precipitado se resuspendía en una mínima cantidad de tampón 1 suplementado con el 5% de glicerol y se dializaba 18 horas a 4°C frente a 2x 1 litros del mismo

tampón. A continuación, se centrifugaba a 27.000 x g durante 30 minutos a 4°C y el sobrenadante se sometía a cromatografía de intercambio iónico en una columna de Q-Sepharosa (17 x 1.6 cm) equilibrada con el mismo tampón. La velocidad de flujo en todo el proceso fue de 0.7 ml/minuto. En estas condiciones la enzima málica se quedaba retenida en la columna y era eluída con un gradiente lineal de KCl 0-200 mM.

#### Cromatografía de afinidad

Las fracciones que habían sido seleccionadas del paso anterior por poseer una mayor relación actividad enzima málica/absorbancia a 280 nm se pasaban una a una a través de una columna de 5 ml de NADP<sup>+</sup> agarosa previamente equilibrada con tampón 1 que contenía 10% de glicerol. La velocidad de flujo fue de 12 ml/hora. A continuación la columna se lavaba con tampón de equilibrio hasta que las unidades de densidad óptica a 280 nm de salida fueron inferiores a 0.02. La elución del enzima, unida a la columna, se realizó con un gradiente lineal de 0-0.02 mM de NADP<sup>+</sup> en tampón de equilibrio. Posteriormente, las muestras seleccionadas por su mayor actividad se juntaron y se concentraron por un sistema de ultrafiltración. Finalmente se obtenía la enzima málica purificada que se alicuoteaba y conservaba a -20°C. En la figura 1 se muestran los distintos pasos de la purificación en un gel de poliacrilamida-SDS. En el carril 6 aparece la banda de peso molecular 62 KD correspondiente a la enzima málica purificada de hígado de rata. Asimismo, en la tabla 1 se muestra el rendimiento de todo el proceso de la purificación.

#### **3.8.2 Purificación de la G6PD**

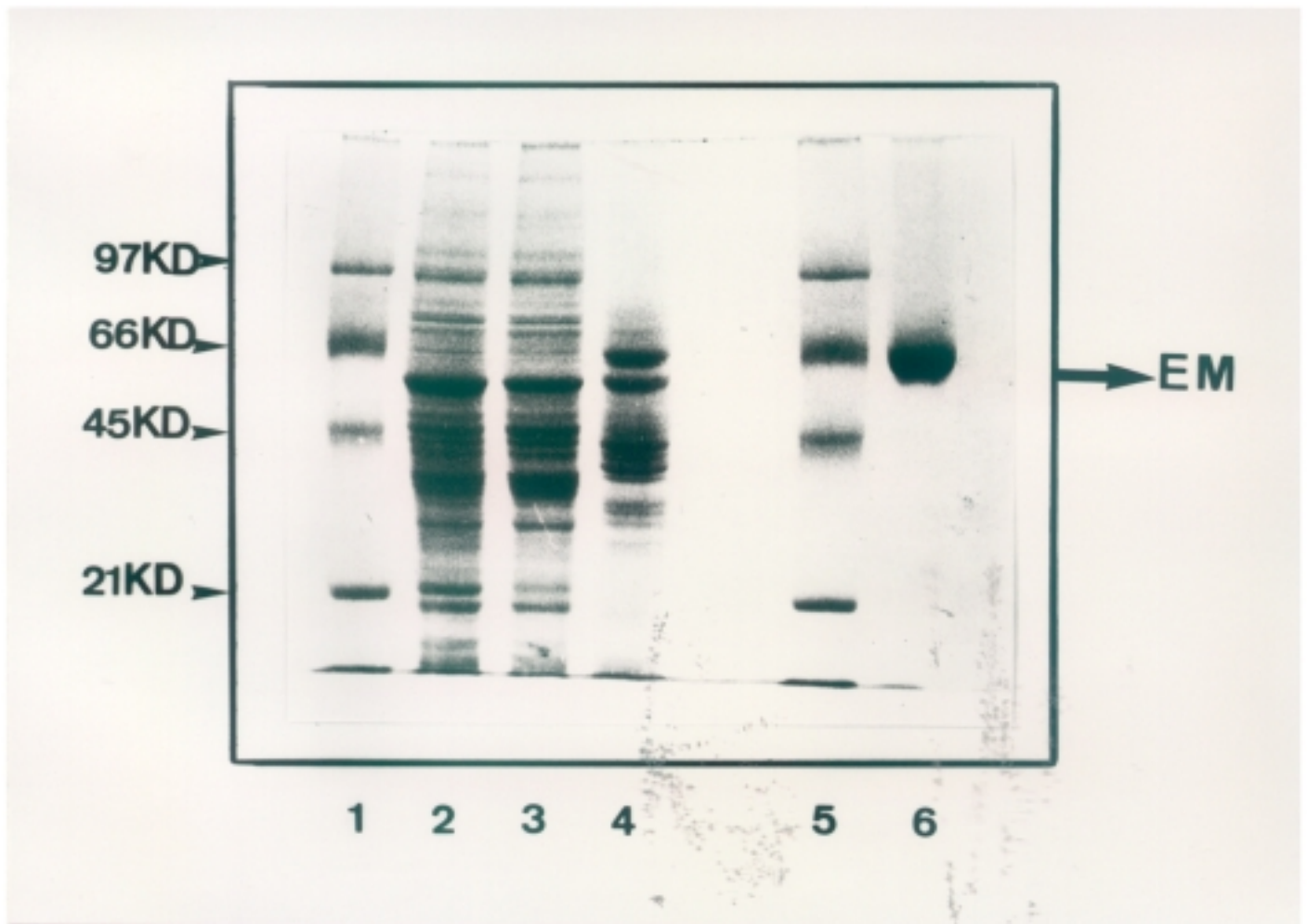
##### Cromatografía de filtración

La fracción entre el 30 y el 50% de saturación de sulfato amónico, obtenida tal como se describió en la sección anterior y que contenía la G6PD activa se

**FIGURA 1 Gel de poliacrilamida-SDS de las distinta etapas de la purificación de la enzima málica hígado de rata**

La enzima málica se ha purificado como se describe en la sección de Material y Métodos. La figura muestra un gel de poliacrilamida-SDS con las distintas etapas de la purificación.

- Carril 1- Patrón de proteínas de pesos moleculares conocidos
- Carril 2- sobrenadante de la ultracentrifugación a 105.000xg
- Carril 3- eluido de la columna de Sephacryl G-200 con actividad enzima málica
- Carril 4- eluido de la columna de Q-Sepharosa con actividad enzima málica
- Carril 5- patrón de proteínas
- Carril 6- enzima málica purificada



**TABLA 1 Purificación de la enzima málica**

La enzima málica se ha purificado como se indica en la sección de Material y Métodos. En la tabla se muestra el proceso global de purificación.

	V (ml)	Proteínas (mg/ml)	Actividad (U totales)	Recuperación (%)	As (U/mg)	Purif. (veces)
Ultrac. 105.000xg	150	16.9	668.8	100	0.26	1
Gel filtración	38	37.8	488	73	0.34	1.3
Int iónico	15	1.8	86	12.9	3.2	12.3
Afinidad+ Ultrafiltr.	10	0.3	74.3	11.1	22.5	86.5

centrifugaba a 27.000 x g durante 30 minutos a 4°C. El precipitado obtenido se resuspendía en la mínima cantidad de tampón 2 mM 2-mercaptoetanol, Tris/ClH 50 mM pH 8 (tampón 2), y se dializaba en 2 x 1 litros del mismo tampón durante 18 horas. Después de centrifugar a 27.000 x g durante 30 minutos a 4°C, la preparación dializada se aplicaba a una columna de Sephacryl G-200 que había sido previamente equilibrada con Tampón 2 a la velocidad de flujo de 1 ml/minuto. Las fracciones con actividad G6PD se reunían y concentraban mediante la adición de sulfato amónico al 55% de saturación. El precipitado obtenido mediante centrifugación se disolvió y dializó en tampón 2 como antes.

#### Cromatografía de intercambio iónico

El sobrenadante obtenido después de centrifugar el dializado a 27.000 x g durante 30 minutos a 4°C se aplicó a una columna de Q-Sepharosa, previamente equilibrada con tampón fosfato potásico 0.02M pH 7 que contenía 2 mM 2-mercaptoetanol. En estas condiciones la enzima permaneció unida a la columna y se eluyó con un gradiente lineal de tampón fosfato potásico 0.02-0.4M.

#### Cromatografía de afinidad

Las fracciones que se habían seleccionado del paso anterior por poseer mayor relación actividad G6PD/absorbancia a 280 nm se añadían a una columna de 5 ml de NADP<sup>+</sup> agarosa equilibrada con tampón 2 al que se añadía 5% de glicerol y EDTA 5 mM. La velocidad de flujo fue en todo momento de 12 ml/hora. Un pico inactivo de proteínas se eluyó con el tampón de equilibrio hasta que la absorbancia a 280 nm de las fracciones fue menor que 0.02. La enzima unida a la columna se eluyó con un gradiente lineal de 0-0.05 mM de NADP<sup>+</sup> en tampón de equilibrio. Por último, las muestras seleccionadas por su mayor actividad se juntaron y concentraron por ultrafiltración para finalmente obtener la G6PD purificada que se alicuoteaba y conservaba a -20°C. En la figura 2 se muestran las distintas etapas de la purificación de la G6PD en un gel de poliacrilamida-SDS. En el carril 6 aparece

la banda de 58 KD correspondiente a la G6PD purificada de hígado de rata. El proceso global de purificación queda resumido en la tabla 2.

### **3.9 Electroforesis en geles de poliacrilamida**

La visualización del proceso de purificación se ha realizado mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes en presencia de SDS (Maizel, 1971). Los geles se montaban entre cristales de 7-10 cm con espaciadores de 0.75 mm de sección. El gel concentrador se preparaba con acrilamida al 5% y bisacrilamida al 0.13% en tampón Tris/ClH 50 mM pH 6.7, SDS 0.1%, Urea 4M, persulfato amónico 0.01%(p/v) y TEMED 0.243% (v/v). El gel separador se preparaba con acrilamida al 10% para la enzima málica y al 7.5% para la G6PD y bisacrilamida 0.265% en tampón Tris /HCl 37.5 mM pH 8.8, SDS 0.1% (p/v), urea 4M, persulfato amónico 0.05% (p/v) y TEMED 0.243%.

Las muestras se preparaban mezclando en proporción 1:1 con el tampón de muestra cuya composición era:

Tampón Tris/HCl 0.072M pH 7.6

glicerol 10% (v/v)

SDS 1% (p/v)

azul de bromofenol 0.002% (p/v)

2 mM 2-mercaptoetanol

urea 4M

Posteriormente se hirvieron a 100°C durante 5 minutos y se cargaron en el gel. Generalmente se utilizaban 10-80 µg de proteína por muestra.

El tampón utilizado en el desarrollo de la electroforesis tenía la siguiente composición

Tris/ClH 0.025M pH 8.3

glicina 0.192M

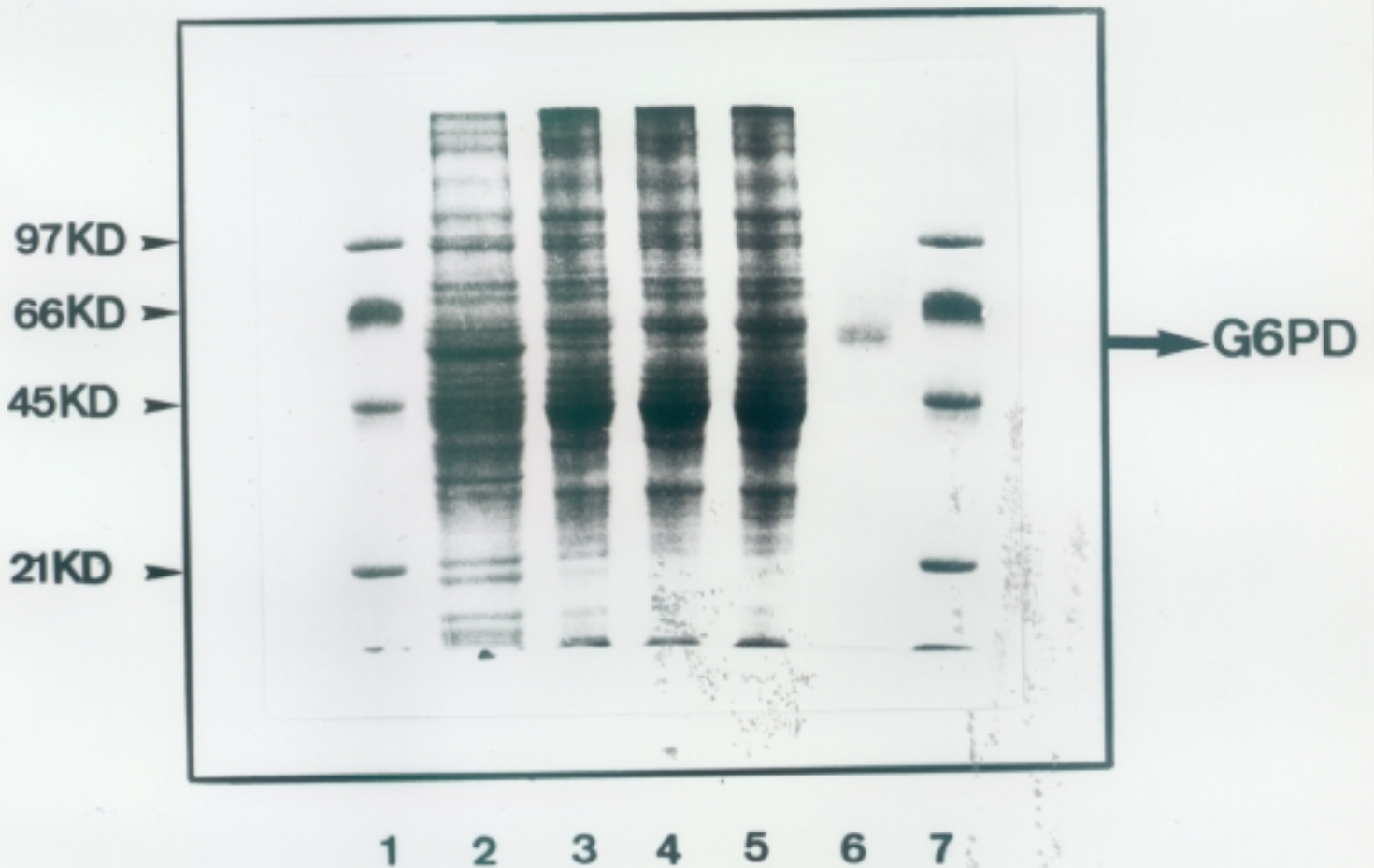
SDS 0.1% (p/v)

Las electroforesis se realizaron utilizándose una fuente de alimentación de Bio-Rad, aplicándose primero 125 voltios para permitir la entrada de las muestras y a los 20 minutos se aplicaban 100 voltios durante 45-60 minutos. La electroforesis

**FIGURA 2 Gel de poliacrilamida-SDS de las distintas etapas de la purificación de la G6PD de hígado de rata**

La G6PD se ha purificado como se indica en la sección de Material y Métodos. La figura muestra un gel de poliacrilamida-SDS con las distintas etapas de la purificación.

- Carril 1- Patrón de proteínas de peso molecular conocido
- Carril 2- sobrenadante de la ultracentrifugación a 105.000x g
- Carril 3- fracción del sobrenadante 105.000x g que precipita entre el 30 y el 50% con sulfato amónico.
- Carril 4- eluido de la columna de Sephacryl G-200 con actividad G6PD
- Carril 5- eluido de la columna de Q-Sepharosa con actividad G6PD
- Carril 6- G6PD pura
- Carril 7- Patrón de proteínas



**TABLA 2 Purificación de la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa**

La G6PD se ha purificado como se describe en la sección de Material y Métodos. En la tabla queda resumido el proceso global de purificación.

	V (ml)	Proteínas (mg/ml)	Actividad (U totales)	Recuperación (%)	A <sub>s</sub> (U/mg)	Purif. (veces)
Ultrac. 105.000xg	150	16.9	668.8	100	0.26	1
Gel filt+ precip.con SO <sub>4</sub> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	7.5	19.5	57.4	8.6	0.4	1.5
Int. iónico	15	1.12	22.7	3.4	1.3	5
Afinidad+ Ultrafiltr.	10	0.05	19.3	2.9	38.6	148.3

terminaba cuando el azul de bromofenol había salido del gel.

Como patrón de pesos moleculares se empleó una mezcla de proteínas de la firma Bio-Rad formada por proteínas de pesos moleculares entre 21.000 y 97.400 D.

Los geles, una vez finalizadas las electroforesis, se teñían 30 minutos con azul de Coomassie G al 0.2% (p/v) en metanol/agua (50:50). Antes de usar la solución se añadían a la misma 7 ml de ácido acético glacial por cada 100 ml. Finalmente, los geles se desteñían con ácido acético glacial al 7%.

### **3.10 Preparación de los antisueros**

Los anticuerpos correspondientes a las dos enzimas purificadas se prepararon mediante la inoculación de éstas a conejos hembras Neozelandeses, siguiendo básicamente la técnica descrita por Chauser (1972).

En la primera dosis se inyectaron 100  $\mu$ g de enzima purificada en un volumen final de 1 ml con NaCl al 0.9%. Esta primera dosis fue acompañada con igual volumen de adyuvante completo de Freund. Cada dos semanas durante 4 meses se inyectaron dosis semejantes acompañadas de igual volumen de adyuvante incompleto.

Las fracciones de  $\gamma$ -globulina se obtuvieron tras precipitar los antisueros con sulfato amónico al 40% dos veces consecutivas y posterior diálisis frente a tampón NaCl 125 mM, fosfato sódico 20 mM pH 7.3.

#### **3.10.1 Ensayo de doble inmunodifusión**

Para demostrar la producción de anticuerpos se utilizó la técnica de doble inmunodifusión de Ouchterlony (1953). Estos ensayos se realizaron en placas preparadas con agarosa al 1% y azida sódica 0.02% donde el antígeno y el anticuerpo fueron depositados en pocillos perforados en el gel de agarosa en el cual al difundir el uno hacia el otro precipitaban formando una línea opaca en la región en donde se encontraban en las proporciones óptimas. Las bandas de precipitina

fueron visualizadas tiñendo las placas con azul de Coomassie. Para ello, las placas se lavaron durante 12 horas, agitándolas en NaCl al 0.85%. A continuación los geles fueron cubiertos con papel de filtro, secados sobre un cristal, y teñidos y desteñidos de igual forma que la descrita para la tinción de geles de proteínas, con la salvedad de que en este caso el tiempo de tinción fue de 5 minutos.

En las figuras 3 y 4 se muestra el ensayo de doble inmunodifusión con los anticuerpos anti-enzima málica y anti-G6PD. En el caso de la G6PD se aprecian dos bandas de inmunoprecipitación correspondientes a los distintos estados de agregación que presenta esta enzima.

### **3.10.2 Titulaciones de los anticuerpos obtenidos**

Para la titulación de los anticuerpos se añadieron volúmenes crecientes de antisuero a una cantidad fija de sobrenadante obtenido tras centrifugar el tejido a 105.000 x g. La mezcla de reacción se ajustaba a un volumen constante con ClNa 150 mM y Tritón X-100, este último añadido a una concentración final del 1.7% (p/v). Las mezclas se incubaban una hora a 37°C y posteriormente toda la noche a 4°C. Entonces se centrifugaban a 12.000 x g durante 10 minutos a 4°C. Las actividades remanentes de las enzimas se ensayaron en las alícuotas del sobrenadante obtenido.

Los resultados obtenidos se muestran en las figuras 5 y 6. Como puede apreciarse, a cantidades crecientes de anticuerpo corresponden un menor número de unidades de actividad enzimática en el sobrenadante. La titulación de los sueros indicó:

10  $\mu$ l del anticuerpo frente a la G6PD precipitaban 95 mU de enzima.

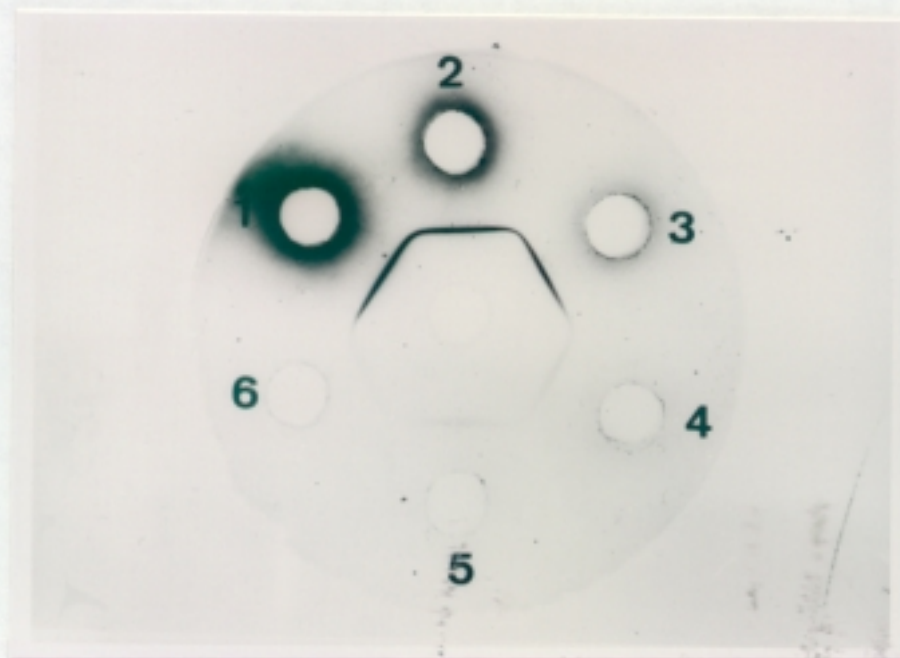
3  $\mu$ l del anticuerpo frente a la enzima málica precipitaban 75 mU de enzima.

### **3.11 Transferencia de proteínas a filtros de nitrocelulosa**

Cuando acababa el desarrollo de la electroforesis, se separaba cuidadosamente el gel de los cristales y se colocaba en el sistema utilizado para la transferencia. Este sistema debía estar previamente preparado y para ello, en una bandeja de

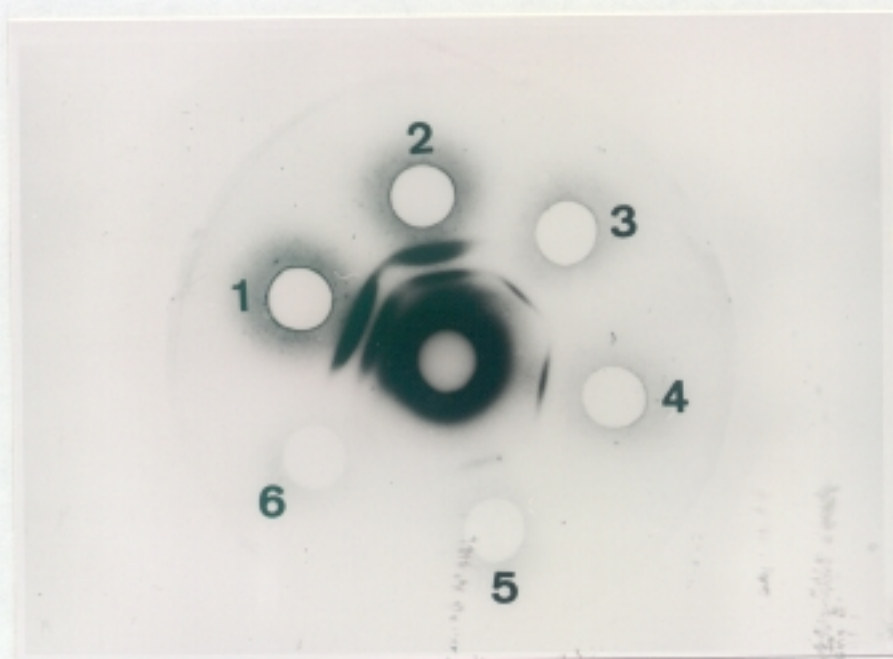
**FIGURA 3 Ouchterlony para la enzima málica**

Pocillo central- enzima málica purificada  
Pocillo 1-  $\gamma$ -globulinas anti-enzima málica de hígado de rata  
obtenidas al inyectar el enzima purificada en conejo  
Pocillo 2-  $\gamma$ -globulinas diluídas 1/2  
Pocillo 3- " " 1/4  
Pocillo 4- " " 1/8  
Pocillo 5- " " 1/16  
Pocillo 6- " " 1/32



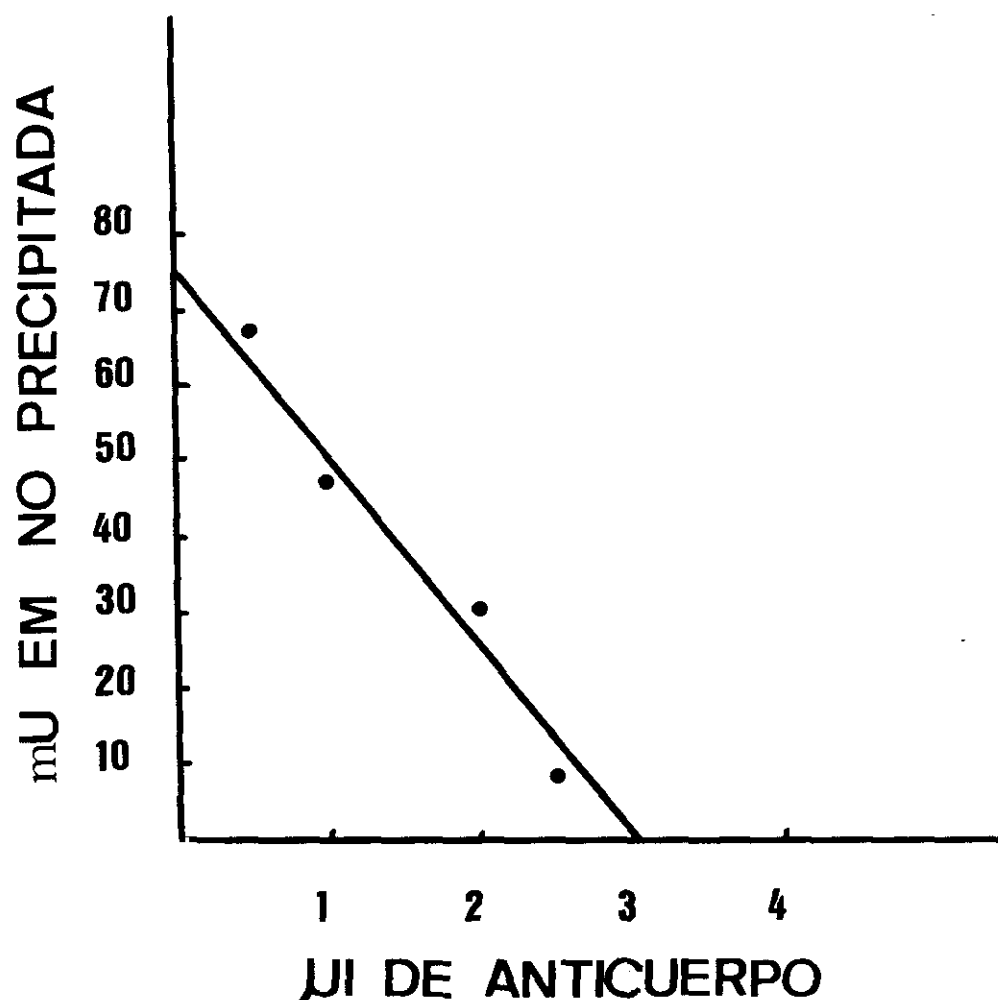
**FIGURA 4 Ouchterlony para la G6PD**

Pocillo central- extracto hepático de rata  
Pocillo 1-  $\gamma$ -globulinas anti-G6PD de hígado de rata obtenidas al  
inyectar el enzima purificada en conejo  
Pocillo 2-  $\gamma$ -globulinas diluídas 1/2  
Pocillo 3- " " 1/4  
Pocillo 4- " " 1/8  
Pocillo 5- " " 1/16  
Pocillo 6- " " 1/32



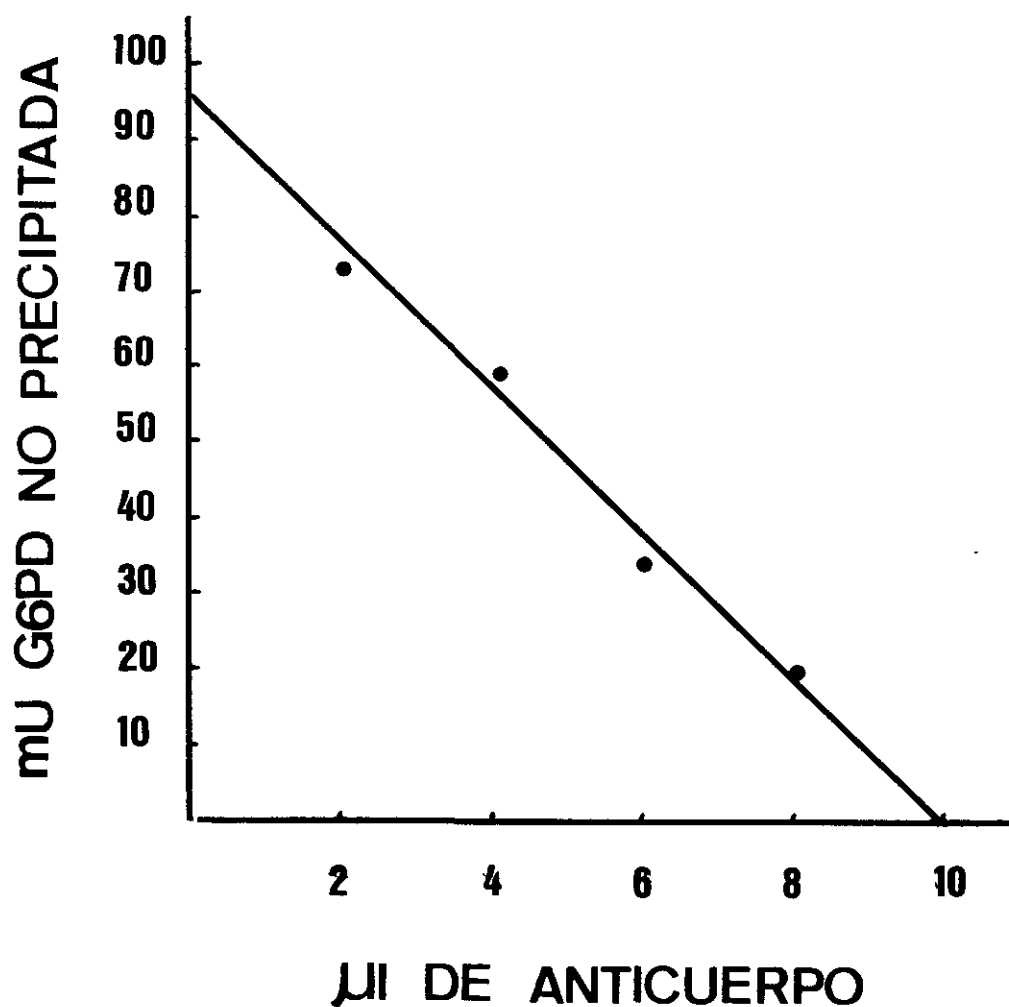
**FIGURA 5 Titulación del anticuerpo anti-enzima málica**

La titulación del anticuerpo anti-enzima málica se ha realizado añadiendo volúmenes crecientes de antisuero a una cantidad fija del sobrenadante obtenido tras la ultracentrifugación a 105.000xg y midiendo la actividad enzimática remanente tal como se indica en la sección de Material y Métodos



**FIGURA 6 Titulación del anticuerpo anti-G6PD**

La titulación del anticuerpo anti-G6PD se ha realizado añadiendo volúmenes crecientes de antisuero a una cantidad fija del sobrenadante obtenido tras la ultracentrifugación a 105.000xg y midiendo la actividad enzimática remanente tal como se indica en la sección de Material y Métodos



fotografía con el fondo cubierto de tampón de transferencia, se colocaba el soporte de plástico por el lado por donde iba el cátodo hacia abajo. A continuación se ponía una lámina de esponja tipo "Scotch-Brite", dejándolo caer suavemente desde un lateral hacia el otro para que el tampón lo fuera impregnando por capilaridad y no se formaran burbujas que entorpecieran la transferencia. A continuación, se colocaban con los mismos cuidados dos láminas de papel de filtro Whatman nº1, y sobre ellas, el gel previamente humedecido con el tampón de transferencia. Al colocar el gel había que tener en cuenta el sentido de la transferencia para saber el orden en que quedaban las bandas en la nitrocelulosa. Sobre el gel se colocaba la membrana de nitrocelulosa de un tamaño ligeramente superior al del gel. Esta membrana se había dejado equilibrar durante unos minutos en tampón de transferencia, colocándola lentamente para evitar que quedaran burbujas entre el gel y la membrana. Para terminar se colocaban otras dos láminas de papel Whatman nº1, otra lámina de esponja y la rejilla que luego se iba a situar en el lado del ánodo. Se cerraba este ensamblaje y se colocaba en la cubeta llena de tampón de transferencia. Dicho tampón se componía de glicina 198 mM, metanol al 20% (v/v) y Tris/HCl 25 mM pH 8.3.

La transferencia se realizaba conectando la cubeta a la fuente eléctrica Bio-Rad, fijando la intensidad de la corriente a 250 mA, que se mantenía durante toda la noche. Para evitar el calentamiento del medio, se utilizaba un sistema de refrigeración alrededor de la cubeta.

Una vez terminada la transferencia se estimaba la eficiencia del proceso mediante la tinción reversible de las proteínas con Ponceau S diluído 1/10 durante 2 minutos y lavando posteriormente con agua destilada para eliminar el colorante no fijado. Así se teñían las bandas de las proteínas transferidas y se podía proceder a la detección inmunológica de la enzima málica y G6PD.

### **3.12 Inmunodetección de las proteínas**

En primer lugar se realizaba el bloqueo o saturación de todos los sitios de unión específica a proteínas de la nitrocelulosa. Para ello, se incubaban las membranas durante 30 minutos con agitación suave en un tampón que contenía: NaCl 150

mM, seroalbúmina bovina al 3% y Tris /HCl 10 mM pH 7.3. Una vez concluida esta fase, para eliminar los restos de tampón utilizado, se procedía al lavado de la nitrocelulosa durante 15 minutos con una solución que contenía: NaCl 150 mM, Tween-20 0.05% (v/v) y Tris/HCl 10 mM pH 10.5.

A continuación se procedía a la incubación de la membrana con el primer anticuerpo. En nuestro caso, como primeros anticuerpos se utilizaron las  $\gamma$ -globulinas previamente obtenidas frente a la enzima málica y G6PD que eran diluídas en el mismo tampón utilizado en la fase de bloqueo en la proporción 1/100. De esta manera se incubaban las membranas con agitación suave durante 2 horas. Tras la incubación con el primer anticuerpo se realizaban 4 lavados sucesivos de 15 minutos cada uno con el tampón de lavado.

La incubación con el segundo anticuerpo se realizaba con un anticuerpo de cabra dirigido contra las inmunoglobulinas G de conejo, conjugado con la peroxidasa. Este anticuerpo era diluído en el tampón de bloqueo en una proporción 1/3000 y con el se incubaba la nitrocelulosa durante dos horas en las mismas condiciones que en el caso del primer anticuerpo. Finalizada la incubación, se realizaban también 4 lavados sucesivos, de 15 minutos cada uno en el tampón de lavado.

La fase de revelado consistía en la detección de la peroxidasa fijada con el colorante 4-cloro-naftol que actuaba como sustrato y se preparaba de forma extemporánea disolviendo 3 mg del producto en 0.25 ml de etanol absoluto. A continuación se añadía gota a gota sobre 25 ml de tampón NaCl 150 mM, Tris/HCl 10 mM pH 7.6. Este reactivo se ponía en contacto con la nitrocelulosa y en este momento se añadían 10  $\mu$ l de agua oxigenada al 33% (p/v) dejando incubar hasta visualizar las bandas de color violáceo característico. La reacción se paraba entonces, lavando con agua destilada en abundancia y la nitrocelulosa se secaba entre dos papeles de filtro para posteriormente conservarla a -20°C hasta su posterior cuantificación en el videodensitómetro.

### **3.13 Ensayo de inmunotitulación con células en cultivo**

Los ensayos de inmunotitulación se han realizado según la técnica descrita por Fabregat y col. (1989). En primer lugar se establecía una cantidad fija de actividad

G6PD (5 mU) procedente de las distintas placas de cultivo a la que se añadían cantidades crecientes del anticuerpo obtenido. A continuación se ajustaban todos los tubos a un volumen constante con NaCl 150 mM y Tritón X-100 de manera que este último se encontraba a la concentración final del 1.7%. Posteriormente se incubaban las muestras a 37°C durante una hora y se mantenían toda la noche a 4°C. A la mañana siguiente se centrifugaban a 12.000 x g durante 10 minutos a 4°C y se ensayaba la actividad G6PD en el sobrenadante obtenido.

### **3.14 Medida de la síntesis de DNA en adipocitos marrones en cultivo**

La medida de la síntesis de DNA se ha realizado según el método descrito por Mosley y col.(1981). Una vez cultivados los adipocitos marrones en las distintas condiciones experimentales, se retiraba el medio de cultivo y tras dos lavados consecutivos se añadía medio fresco suplementado con los mitógenos y 0.5  $\mu$ Ci/ml de <sup>3</sup>H-Timidina. En estas condiciones, se mantenían las células durante las 4 últimas horas de cultivo. Finalizado este tiempo, se retiraba el medio y las placas se volvían a lavar dos veces. A continuación, se añadía 1 ml de ácido tricloroacético al 10% (v/v) por placa de cultivo y las placas se mantenían durante 20 minutos a 4°C. Seguidamente se retiraba el ácido tricloroacético y se lavaban las placas dos veces con etanol al 70% dejándose secar posteriormente. Por último, se añadía a cada placa 1 ml de una solución que contenía NaOH 0.1%, carbonato sódico 2% y SDS 1% , se incubaban a 37°C durante 20 minutos y se contaban alícuotas de 100  $\mu$ l en el contador de centelleo.

### **3.15 Contaje de células de las placas de cultivo y estudio del ciclo celular**

Para determinar el número de células contenidas en cada placa de cultivo se empleó la técnica de citometría de flujo. Para la realización del ensayo una vez finalizado el periodo de cultivo las placas se sometían a dos lavados consecutivos. Posteriormente se añadían 0.5 ml de una solución que contenía Tripsina 0.05%-EDTA 0.02% (Laboratorios Flow) para despegar las células de la superficie de cultivo. Las placas se mantenían en el incubador a 37°C durante 3-4 minutos y

posteriormente se añadían 2.5 ml de medio de cultivo suplementado con suero fetal al 10% con objeto de parar la acción de la tripsina. De esta manera se obtenía una suspensión de células que se pasaba con una pipeta de plástico a unos tubos de centrifuga donde se centrifugaba a 800 x g durante 5 minutos. El precipitado de células se resuspendía en solución salina de lavado y se volvía a centrifugar en las mismas condiciones. Finalmente, las células se resuspendían en 1 ml de solución salina de lavado y se realizaba el contaje en el citómetro de flujo (Beckton-Dickinson). Paralelamente con una alícuota de 100  $\mu$ l de la suspensión celular se realizaba el estudio del ciclo celular. En primer lugar 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 ioduro de propidio y las muestras se analizaban en el citómetro de flujo con objeto de determinar el porcentaje de células que se encontraban en fase G<sub>0/G</sub>1 del ciclo celular.

### **3.16 Determinación del contenido en DNA de las placas de cultivo**

La determinación del contenido en DNA se realizaba por el método fluorimétrico de Labarca y Paigen (1980) basado en la interacción específica del colorante Hoersch con el DNA.

El precipitado de células se resuspendía en 0.5 ml de tampón que contenía: NaCl 2M, EDTA 2mM y Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50 mM pH 7.4. A continuación se sonicaban durante 45 segundos a 1.5 mA de intensidad. Durante todo el proceso las muestras se mantenían en hielo.

Para el ensayo fluorimétrico se tomaban alícuotas de 25 y 50  $\mu$ l por duplicado y se añadían a tubos de reacción que contenían el mismo tampón pero sin EDTA, y 2.5  $\mu$ g del colorante Hoersch en un volumen final de 1 ml. Las longitudes de onda a las que se realizaba el ensayo eran 354 nm como longitud de onda de excitación y 402 nm como longitud de onda de emisión. La curva patrón de DNA se preparaba con DNA purificado de timo de ternera a concentraciones de 0.1, 0.5, 1, 2.5, 5 y 10  $\mu$ g/ml de DNA. Este DNA patrón se preparaba a una concentración

de 0.5 mg/ml en agua estéril, ajustándose posteriormente la concentración a 75  $\mu$ g/ml mediante la medida de la densidad óptica a 260 nm, teniendo en cuenta que una unidad de densidad óptica equivale a 50  $\mu$ g de DNA.

### 3.17 Aislamiento de los cDNAs

Las bacterias en cuyos plásmidos estaban insertados los distintos cDNAs se conservaban a -70°C en un tampón que contenía: Tris 0.01M, MgCl<sub>2</sub> y glicerol al 50% (v/v).

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. La cepa bacteriana que contenía dicho plásmido fue generosamente cedida por la Dra. V. Nikodem (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, U.S.A).

El cDNA de la G6PD de tamaño 2.4 Kb se encontraba insertado en un lugar de corte para Eco RI del plásmido Pks (*blue script*) de 3 Kb. La cepa bacteriana que contenía dicho plásmido fue generosamente cedida por el Dr Ye-Shih Ho (Duke University Medical Centre, Durham, North Caroline, U.S.A).

El cDNA de la  $\beta_2$ -microglobulina de tamaño 0.9 Kb se encontraba insertado en un lugar de corte para Eco RI y Hind III del plásmido pGEM. La cepa bacteriana que contenía dicho plásmido fue generosamente cedida por el Dr Soprano (Philadelphia, U.S.A).

El cDNA de la  $\beta$ -actina de tamaño 1.9 Kb se encontraba insertado en un lugar de corte para Hind III en el plásmido PBR322 y fué generosamente cedido por el Dr Eugenio Santos (National Institutes of Health, Bethesda, U.S.A).

Para el crecimiento de las bacterias se utilizó el medio LB que contenía por litro:

10 g Bacto-Tripton  
10 g NaCl  
10 g Bacto-Yeast pH 7

El medio una vez preparado se esterilizaba en autoclave.

En primer lugar con el asa de platino se hacía un preinóculo en un tubo de vidrio estéril que contenía 5 ml de medio LB suplementado con ampicilina 100  $\mu\text{g/ml}$ . Una vez realizada la siembra, los tubos se mantenían en agitación suave constante toda la noche en un baño a 37°C. A la mañana siguiente, cuando habían crecido las bacterias, se inoculaban 2 ml del preinóculo en 400 ml de medio LB suplementado con ampicilina a la concentración indicada y se incubaba a 37°C con agitación rápida (300 ciclos/s) durante todo el día hasta que la lectura de la DO a 600 nm fuera de 0.6. En este momento se añadía cloranfenicol (10-20  $\mu\text{g/ml}$ ) con el fin de amplificar el crecimiento plasmídico. A continuación se incubaba toda la noche a 37°C con agitación rápida. A la mañana siguiente, cuando la lectura de la densidad óptica se había duplicado se vertía el contenido de los matraces en dos tubos de centrifuga y se centrifugaba a 7000 rpm durante 15 minutos a 4°C en una centrifuga Sorvall (rotor GSA). Se eliminaba el sobrenadante por aspiración y las bacterias que habían quedado en el fondo del tubo se lavaban con tampón TES estéril que contenía : EDTA 5 mM, NaCl 50 mM y Tris 50 mM pH 7. A continuación se volvía a centrifugar en las mismas condiciones eliminándose de nuevo el sobrenadante.

### **3.18 Obtención de los DNAs plasmídicos**

Para la extracción de DNA plasmídico se han utilizado columnas Pack-500 (Quiagen , Alemania). El proceso de extracción comenzaba con una lisis bacteriana alcalina. Para ello, se añadía la RNAsa al tampón P<sub>1</sub> que contenía EDTA 10 mM y Tris 50 mM pH 8 de manera que la concentración final de RNAsa en el tampón era 400  $\mu\text{g/ml}$ . A continuación se resuspendía el precipitado de bacterias en 10 ml de tampón P<sub>1</sub>-RNAsa y se añadían 10 ml de tampón P<sub>2</sub> que contenía NaOH 0.2M y SDS al 1% mezclando bien por inmersión del tubo varias veces. Después se dejaba en reposo 5 minutos a temperatura ambiente y se añadían 10 ml de tampón P<sub>3</sub> que contenía acetato potásico 2.55M y se mezclaba rápidamente para evitar la precipitación del SDS hasta que la solución era viscosa y turbia. Entonces se centrifugaba a 10.000 x g durante 30 minutos a 4°C obteniéndose un sobrenadante que era recogido para a continuación aplicarlo a la columna Pack-

500.

El equilibrado de la columna se realizaba cargando una jeringa estéril de 5 ml con tampón QB que contenía NaCl 750 mM, MOPS 50 mM y etanol al 15% pH 7 y acoplándola a la columna con un flujo de 1-2 gotas/segundo.

La muestra se cargaba en la jeringa acoplada a la columna con una pipeta estéril de plástico y se hacía pasar por la columna con un flujo de una gota cada 1-2 segundos. A continuación la columna se lavaba 2 veces con 10 ml de tampón QC que contenía NaCl 1M, MOPS 50 mM y etanol al 15% (v/v) pH 7 con un flujo de 1-2 gotas/segundo.

La elución del DNA se realizaba con 5 ml de tampón QF que contenía NaCl 1.2 M, MOPS 50 mM y etanol al 15% (v/v) pH 8.

El DNA eluido se precipitaba con 0.8 volúmenes de isopropanol y se centrifugaba a 12.000 x g durante 30 minutos a 4°C eliminándose el sobrenadante por aspiración a vacío. Entonces, el DNA precipitado se lavaba con etanol al 70% (v/v) y se volvía a centrifugar a 12.000 x g durante 15 minutos a 4°C. El precipitado de DNA se dejaba secar y se resuspendía en tampón TE que contenía EDTA 1 mM y Tris 10 mM pH 8 conservándose a -20°C.

### **3.19 Digestión del DNA plasmídico**

La digestión de los DNAs plasmídicos que contenían insertados los cDNAs de la enzima málica y G6PD se realizaba con la enzima de restricción Eco RI. La digestión del DNA plasmídico que contenía el cDNA de la  $\beta$ 2-microglobulina se realizaba con Eco RI y Hind III. Asimismo, la digestión del DNA plasmídico que contenía insertado el cDNA de la  $\beta$ -actina se realizaba con Hind III.

La reacción se realizaba en tubos eppendorf a los que se añadía el DNA plasmídico, tampón de digestión 10x y enzima teniendo en cuenta que una unidad de actividad de enzima de restricción se define como la cantidad de enzima capaz de digerir 1  $\mu$ g de DNA durante una hora a 37°C. La reacción se realizaba en un baño a 37°C y una vez finalizada la digestión se paraba calentando la muestra durante 1-2 minutos a 95-100°C. A continuación las muestras se ponían inmediatamente en hielo.

### 3.20 Electroforesis de los DNAs en geles de agarosa

Para poder comprobar si la digestión de los DNAs plasmídicos había sido completa se tomaban alícuotas de las muestras digeridas y se sometían a electroforesis en geles de agarosa al 0.7%.

Los geles se preparaban fundiendo la agarosa en tampón TAE que se preparaba a partir de una solución 50 veces concentrada que contenía por litro: 242 g de Tris, 57.1 ml de ácido acético glacial y 100 ml de EDTA 0.5M pH 8. Una vez fundida la agarosa en el tampón se dejaba enfriar hasta alcanzar una temperatura de 55°C y se añadía lentamente a la cubeta evitando la formación de burbujas.

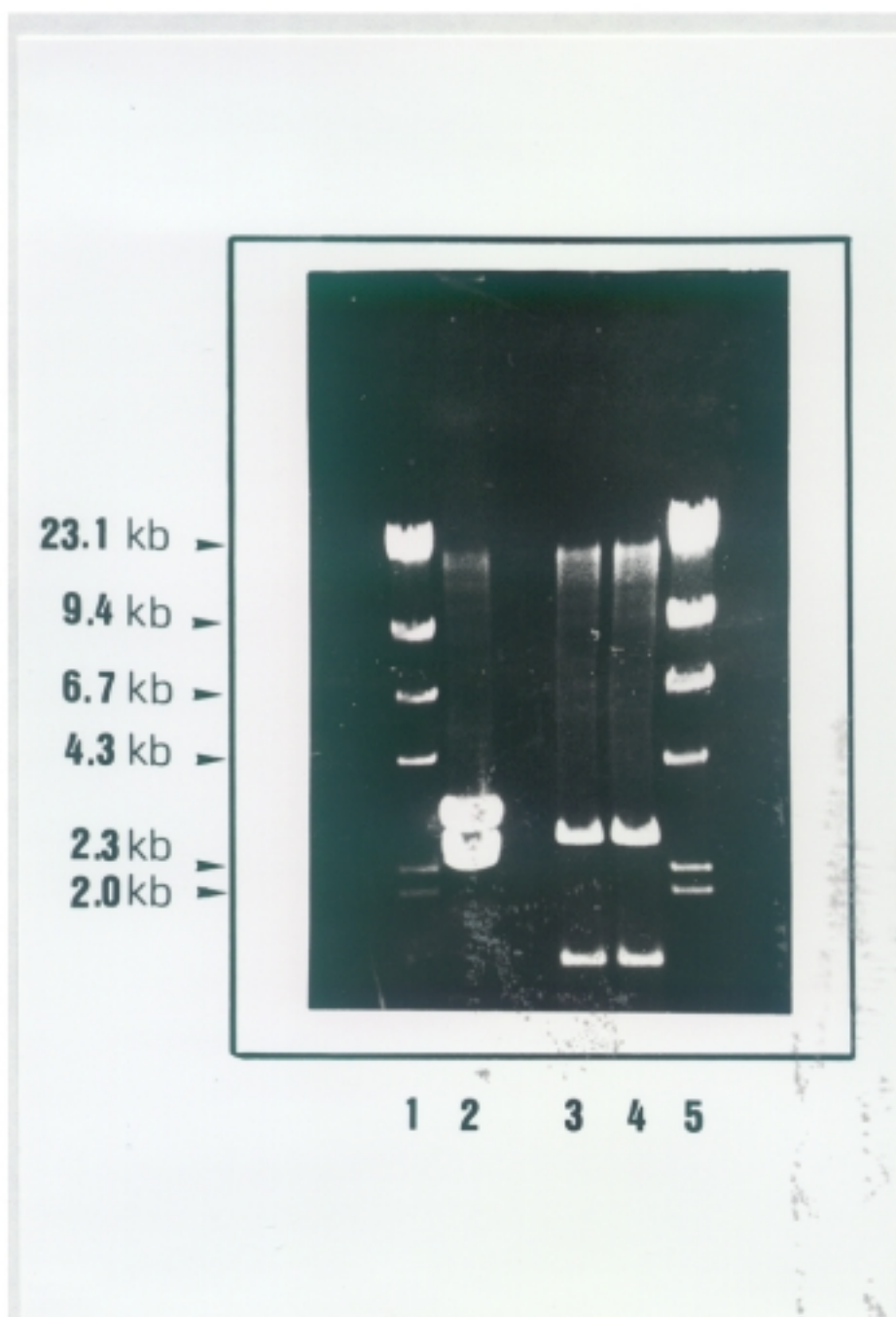
Las muestras se preparaban en tubos eppendorf a los cuales se añadía el DNA digerido en tampón que contenía : azul de bromofenol 0.25% (p/v), xileno cianol 0.25% (p/v) y glicerol 30% (v/v).

Para poder conocer el tamaño de los cDNAs se utilizaba un marcador que consistía en DNA del fago lambda digerido con el enzima de restricción Hind III y se ponían carriles de 0.5 y 1  $\mu$ g. A continuación se cargaban las muestras en el gel y se cubría con tampón de electroforesis (TAE) hasta que el gel quedaba totalmente sumergido en el tampón. La electroforesis se realizaba a un voltaje de 50-60 voltios durante 2-3 horas.

Una vez finalizada la electroforesis se procedía a la tinción del gel con bromuro de etidio 0.5  $\mu$ g/ml en tampón de electroforesis durante 30-45 minutos seguido de lavado con el mismo tampón pero sin bromuro de etidio. De esta manera, las muestras podían ser visualizadas a la luz ultravioleta y posteriormente fotografiadas. Como se aprecia en la figura 7, en el carril 2 aparecen 2 bandas. La banda superior tiene un tamaño aproximado de 3 Kb y corresponde al DNA plasmídico mientras que la banda inferior corresponde al cDNA de la G6PD cuyo tamaño es de 2.4 Kb. En los carriles 3 y 4 también aparecen 2 bandas. La banda superior de tamaño 2.7 Kb corresponde al DNA plasmídico mientras que la inferior de 1 Kb corresponde al cDNA de la enzima málica. Asimismo en la figura 8 en el carril 3 la banda superior de 3.1 Kb corresponde el DNA plasmídico mientras que la banda inferior de 0.9 Kb corresponde al cDNA de la  $\beta_2$ -microglobulina. En el carril 2 la banda superior de 4.3 Kb corresponde el DNA plasmídico mientras que la banda

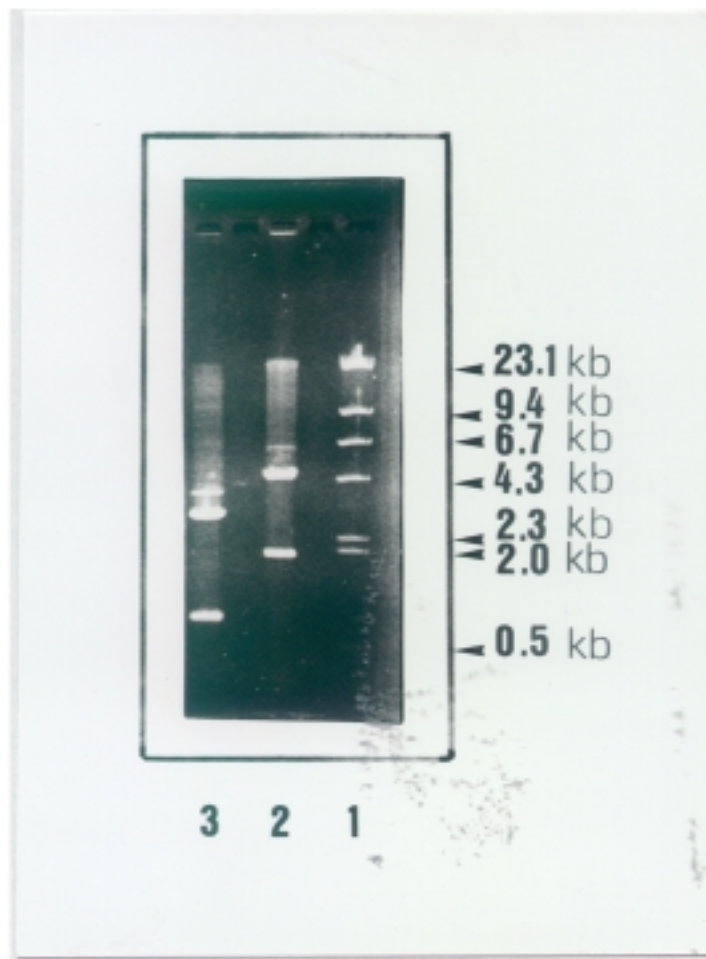
**FIGURA 7 Digestión de los DNAs plasmídicos que contenían los cDNAs de la enzima málica y la G6PD**

Carriles 1 y 5- fragmentos correspondientes al DNA del fago lambda digerido con Hind III  
Carril 2- digestión del plásmido pks (blue script) que contenía el cDNA de la G6PD  
Carriles 3 y 4- digestión del plásmido pUC 13-JM103 que contenía el cDNA de la enzima málica



**FIGURA 8 Digestión de los DNAs plasmídicos que contenían los cDNAs de la  $\beta$ -actina y  $\beta_2$ -microglobulina**

Carril 1- fragmentos correspondientes al DNA del fago lambda digerido con Hind III  
Carril 2- digestión del plásmido PBR322 que contenía el cDNA de la  $\beta$ - actina  
Carril 3- digestión del plásmido pGEM que contenía el cDNA de la  $\beta_2$ -microglobulina



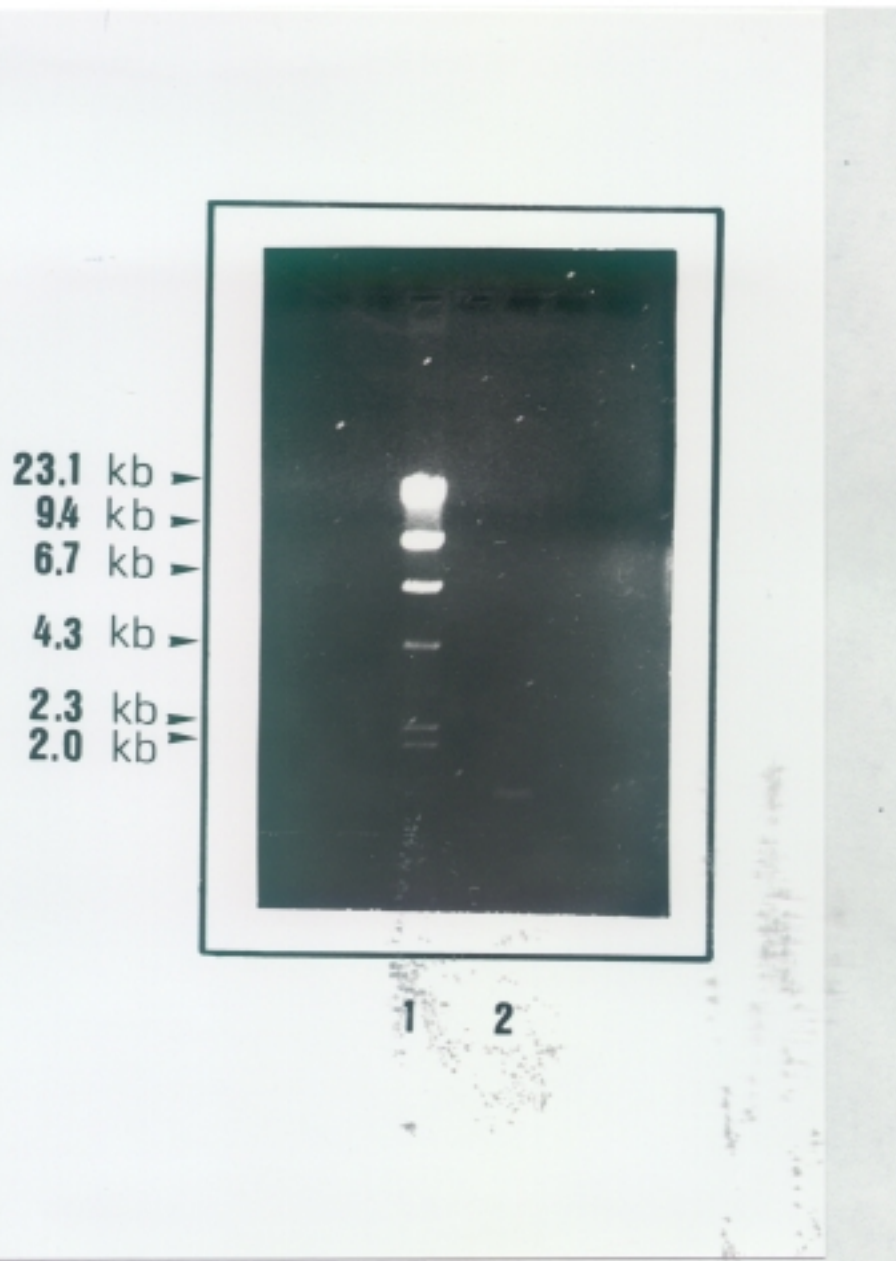
inferior de 1.9 Kb corresponde al cDNA de la  $\beta$ -actina.

### 3.21 Electroelución de los cDNAs

El proceso de electroelución comenzaba con la electroforesis de 15 g de DNA plasmídico previamente digerido tal como se ha descrito previamente. Terminada la digestión se corrían las muestras en geles de agarosa al 0.7% según el procedimiento descrito. A continuación, los geles se observaban a la luz ultravioleta en el transiluminador y se procedía a realizar una incisión por la parte superior y otra por la parte inferior de las bandas correspondientes a los distintos cDNAs para posteriormente introducir una tira de papel Whattman DE-81 en cada incisión con el fin de retener dichas bandas en el papel. A continuación se llevaba el gel a la cubeta y se continuaba la electroforesis hasta que las bandas de los cDNAs quedaban totalmente retenidas en las tiras de papel. Seguidamente se retiraban las tiras y se colocaban en tubos eppendorf que tenían una incisión en la parte inferior y que se habían colocado sobre otros tubos eppendorf. Las tiras se cubrían totalmente con tampón de lavado que contenía Tris/HCl 50 mM, EDTA 1mM y NaCl 100 mM pH 7.5 y se centrifugaban a 12.000x g durante 30 segundos de manera que el tampón de lavado pasaba por la incisión del eppendorf superior hasta el inferior repitiéndose este lavado 2 veces más. Finalmente se cubrían las tiras con tampón de elución que contenía Tris/HCl 50 mM, EDTA 1 mM y NaCl 1 M pH 7.5 y se dejaban en reposo durante 20 minutos para después centrifugar 30 segundos a 12.000 x g. De esta manera el cDNA pasaba de la tira de papel al tampón de elución. El proceso de elución se repetía una vez mas para así recuperar todo el cDNA de la tira de papel y los líquidos recogidos se precipitaban con etanol a -20°C y el cDNA electroeluido se resuspendía en tampón TE. Para poder calcular la cantidad de cDNA recuperado se corría un gel de agarosa al 0.7% con una alícuota de 1  $\mu$ l de cDNA electroeluido. En la figura 9 se aprecia en el carril 2 la banda de 1 Kb correspondiente a 1  $\mu$ l del cDNA electroeluido de la enzima málica. En la figura 10 en el carril 2 se aprecia la banda correspondiente a 1  $\mu$ l del cDNA electroeluido de la G6PD. Asimismo, en la figura 11 en el carril 3 se aprecia la banda correspondiente a 1  $\mu$ l del cDNA electroeluido de la  $\beta_2$ -microglobulina y en

**FIGURA 9 Electroelución del cDNA de la enzima málica**

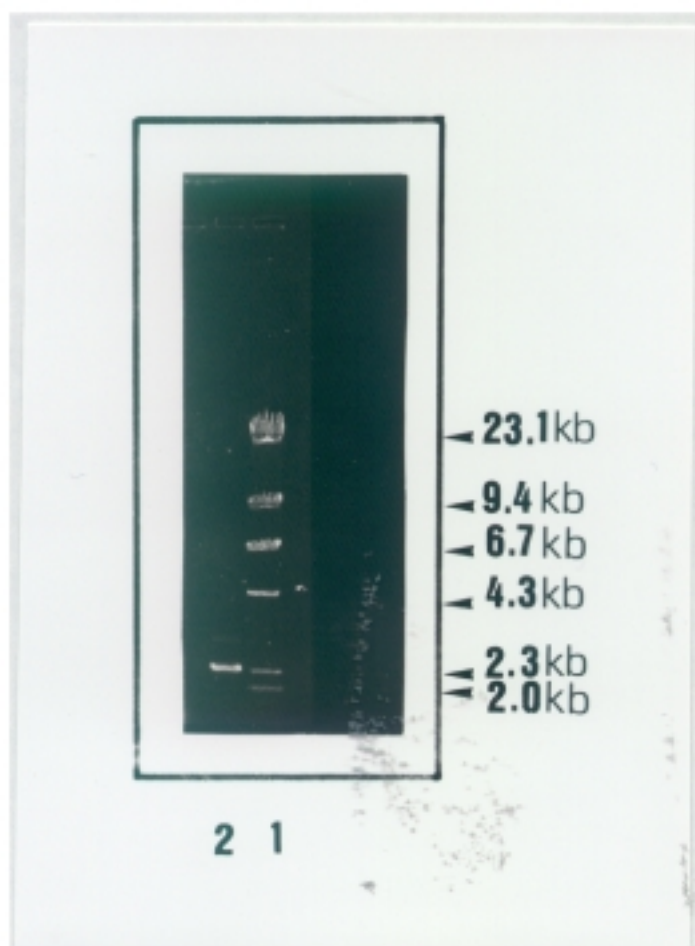
Carril 1- fragmentos correspondientes al DNA del fago digerido con Hind III  
Carril 2- cDNA electroeluido de la enzima málica



**FIGURA 10 Electroelución del cDNA de la G6PD**

**Carril 1- fragmentos correspondientes al DNA del fago lambda digerido con Hind III**

**Carril 2- cDNA electroeluido de la G6PD**

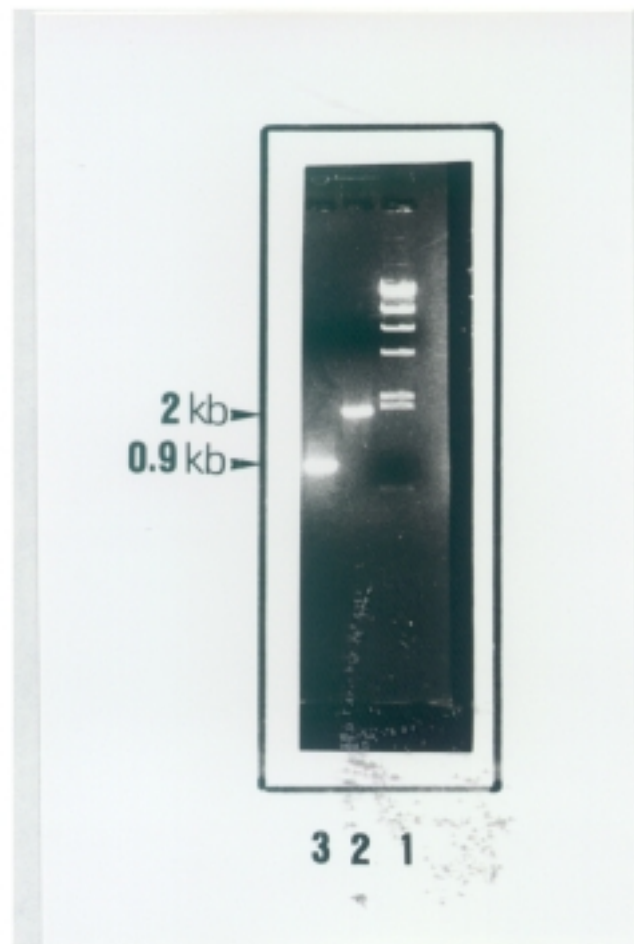


**FIGURA 11 Electroelución de los cDNAs de la  $\beta$ -actina y  $\beta_2$ -microglobulina**

Carril 1- fragmentos correspondientes al DNA del fago lambda digerido con Hind III

Carril 2- cDNA electroeluido de la  $\beta$ -actina

Carril 3- cDNA electroeluido de la  $\beta_2$ -microglobulina



el carril 2 se aprecia la banda correspondiente a 1  $\mu$ l del cDNA de la  $\beta$ -actina.

### **3.22 Aislamiento del RNA de las placas de cultivo**

Para la extracción del RNA de las placas de cultivo se ha seguido el método descrito por Chomzynski y Sacchi (1987). Una vez finalizado el periodo de cultivo en estudio, se procedía al lavado de las placas de cultivo 2 veces consecutivas con solución salina de lavado. Esta solución se encontraba en botellas de vidrio tratadas a 180°C durante 8 horas y posteriormente autoclavadas durante 15 minutos. Además, al agua utilizada en la preparación del medio se había tratado previamente con DEPC (0.1% v/v) y mantenido a 37°C durante toda la noche autoclavándose durante 15 minutos a la mañana siguiente. Asimismo, se siguió este mismo tratamiento con todo el material de vidrio y el agua empleados en los experimentos de RNA con objeto de eliminar las RNAsas responsables de la degradación del RNA.

Una vez lavadas las placas de cultivo, se añadía 1 ml de reactivo RNAzol (Cinna/Biotex, Texas, U.S.A) por placa. Este reactivo era una mezcla de tiocianato de guanidina, fenol y 2-mercaptoetanol. El RNA se solubilizaba en el medio con una pipeta con punta de plástico estéril y se pasaba a tubos eppendorf estériles (1ml/tubo) que se mantenían constantemente en hielo. A continuación se añadía 0.1 ml de cloroformo ( cloroformo: alcohol isoamílico, 24:1) por cada tubo eppendorf, se agitaban las muestras durante 30 segundos y se mantenían en hielo durante otros 15 minutos. Entonces, se centrifugaban los tubos a 12.000 x g durante 15 minutos a 4°C visualizándose dos fases en cada tubo. La fase inferior fenol-cloroformo contenía el DNA mientras que el RNA se encontraba en la fase superior acuosa. Asimismo, se apreciaba una interfase opaca que contenía la fracción proteica. La fase superior, donde se encontraba el RNA, se separaba y se pasaba a otro tubo donde se precipitaba con un volumen igual de alcohol isopropílico durante 30 minutos a -20°C. Transcurrido este tiempo, se centrifugaban las muestras a 12.000 x g durante 15 minutos a 4°C observándose un precipitado blanco de RNA en el fondo del tubo. El precipitado de RNA se lavaba retirando el sobrenadante de los tubos y añadiendo 1 ml de alcohol etílico

al 75% (v/v) por tubo volviéndose a centrifugar a 12.000 x g durante 8 minutos. Finalmente el precipitado de RNA se secaba centrifugándolo durante 5 minutos en la centrífuga de vacío y se resuspendía en EDTA 1mM pH 7 tratado previamente con DEPC. Las muestras de RNA se mantenían a -80°C hasta su posterior procesamiento.

### **3.23 Electroforesis del RNA en geles de agarosa-formaldehido**

Una vez extraído el RNA de las placas de cultivo en las distintas condiciones experimentales se procedía a realizar la electroforesis según el método descrito por Sambrook y col., (1989).

El gel se preparaba pesando 1.2 g de agarosa que era posteriormente fundida en un horno microondas en 74.4 ml de agua estéril tratada con DEPC. A continuación se enfriaba a 70°C y se añadía a la mezcla 24 ml de tampón de electroforesis 5 veces concentrado que contenía: MOPS 0.1M, acetato sódico 40 mM y EDTA 5 mM pH 7. También se añadía formaldehido a concentración final 2.2M. El volumen final era de 120 ml. El gel así preparado se añadía lentamente a la cubeta de electroforesis dejándose solidificar en una campana extractora de gases debido a los vapores de formaldehido.

Las muestras de RNA se preparaban precipitando 30  $\mu$ g de RNA en tubos eppendorf con 1/10 de acetato sódico 3M pH 5.35 y 2.5 volúmenes de etanol durante una hora a -70°C. A continuación los tubos se centrifugaban a 12.000 x g durante 15 minutos a 4°C y tras aspirar el sobrenadante, el precipitado se lavaba con etanol al 70% (v/v) volviéndose a centrifugar a 12.000 x g durante 8 minutos. Después de secar el precipitado se resuspendía en un tampón que contenía: 0.75 ml de formamida desionizada, 0.15 ml de tampón de electroforesis 10 x , 0.24 ml de formaldehido 12.3M, 0.12 ml de glicerol 87% (v/v), 0.10 ml de agua y 0.08 ml de azul de bromofenol al 10% (p/v). Las muestras se incubaban a 65°C durante 15 minutos y a continuación se ponían inmediatamente en hielo. Finalmente se cargaba el gel que se encontraba en la cubeta sumergido en tampón de electroforesis que contenía MOPS 0.02M, acetato sódico 8 mM y EDTA 1 mM pH 7. La electroforesis se realizaba a 30 voltios durante 6-7 horas. En estas

condiciones el azul de bromofenol se había desplazado 8-9 cm de los pocillos en los cuales se habían depositado las muestras.

### **3.24 Transferencia de los RNAs a filtros de nitrocelulosa**

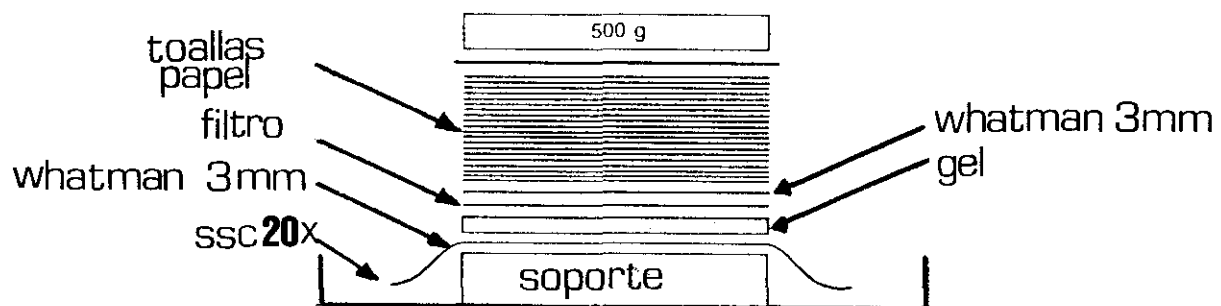
La transferencia de los RNAs a filtros de nitrocelulosa se ha realizado según el método descrito por Thomas (1980).

Terminada la electroforesis se lavaba el gel con agua estéril 2 o 3 veces con objeto de eliminar el exceso de formaldehído y a continuación se sumergía durante 45 minutos en tampón SSC 20x. Esta solución se preparaba disolviendo 175.3 g de NaCl y 88.2 g de citrato sódico en un litro de agua estéril tratada con DEPC y ajustando el pH a 7. El tampón se autoclavaba durante 15 minutos. Para montar la transferencia se cortaba un filtro de nitrocelulosa del mismo tamaño que el gel y se sumergía durante 5 minutos en agua estéril y a continuación otros 5 minutos en tampón SSC 20X. Asimismo se cortaban dos papeles Whatman 3MM del tamaño de la nitrocelulosa que se sumergían durante unos segundos en tampón SSC 2X. Entonces, se montaba la transferencia según el esquema 3. Se dejaba transferir durante 20 horas hasta que el gel quedaba completamente plano. En este momento se desmontaba la transferencia y el filtro se dejaba secar durante una hora a temperatura ambiente. A continuación la nitrocelulosa se introducía en una carpeta de papel Whatman 3MM y se trataba a 80°C durante dos horas en una estufa. De esta manera el filtro quedaba preparado para realizar la hibridación.

### **3.25 Marcaje radiactivo de los cDNAs**

En todos los experimentos los cDNAs se marcaron radiactivamente por el método de " Multiprimer DNA labelling" comercializado por Amersham. En primer lugar se procedía al tratamiento de los cDNAs ( 50 ng) a 95-100°C en tubos eppendorf durante 2 minutos con objeto de producir la desnaturalización del DNA. A continuación las muestras se ponían inmediatamente en hielo evitando así la renaturalización. La reacción se iniciaba añadiendo a los tubos los siguientes reactivos:

ESQUEMA 3 Esquema del montaje de la transferencia de los RNAs a filtros de nitrocelulosa



solución 1 (mezcla de nucleótidos no marcados)----	10 $\mu$ l
solución 2 (primer BSA)-----	5 $\mu$ l
<sup>32</sup> $\alpha$ -P dCTP-----	50 $\mu$ Ci
DNA polimerasa (fragmento klenow)-----	2 $\mu$ l

La reacción se realizaba a temperatura ambiente durante 2-3 horas. Transcurrido este tiempo, la muestra se pasaba por una columna de 10 cm de longitud de Sephadex G-50 que había sido empaquetada y equilibrada con tampón NaCl 150 mM, EDTA 10 mM, SDS 0.1% (p/v) y Tris/HCl 50 mM pH 7.5 estéril. Una vez cargada la muestra en la columna, esta se centrifugaba a 3.200 rpm durante 4 minutos. La muestra eluída contenía los cDNAs marcados, quedando retenida en la columna la radiactividad no incorporada. Finalmente, una alícuota del eluído se contaba en el contador de centelleo.

### 3.26 Prehibridación e hibridación de los filtros de nitrocelulosa

Los filtros de nitrocelulosa que contenían los RNAs transferidos se introducían cada uno en una bolsa de plástico a la que se añadían 0.1 ml/cm<sup>2</sup> de solución de prehibridación que contenía: solución Denhardt's 2x, tampón SSC 5x, SDS 0.1% (p/v), formamida desionizada 50% (v/v), DNA de esperma de salmón 100  $\mu$ g/ml y Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM pH 6.5. La solución Denhardt's se preparaba a partir de una solución 50 veces concentrada que contenía 0.5 g de Ficoll, 0.5 g de polivinilpirrolidona, 0.5 g de albúmina bovina sérica completándose con agua estéril hasta 50 ml. A continuación se filtraba y se conservaba a -20°C.

Una vez introducida la solución en la bolsa de plástico, esta se sellaba con una selladora eléctrica y a su vez se introducía en una segunda bolsa de plástico que también quedaba completamente sellada. A continuación se introducía en un baño de agua a 42°C durante 4-6 horas.

Una vez concluido el periodo de prehibridación se abrían las bolsas retirándose la solución de prehibridación y se volvía añadir un volumen igual de la misma solución fresca adicionada de 2x10<sup>6</sup> DPM/ml de cDNA marcado por el procedimiento previamente descrito. Este cDNA marcado se había tratado

previamente durante 10 minutos a 95-100°C con objeto de producir la desnaturalización. Las bolsas se volvían a sellar y se llevaban al baño a 42°C durante 40 horas. Transcurrido este tiempo se abrían las bolsas y se eliminaba el líquido radiactivo. Entonces, el filtro se sometía a 3 lavados consecutivos de 5 minutos cada uno a temperatura ambiente con una solución que contenía SSC 2x y SDS al 0.1% (p/v). A continuación se realizaban 2 lavados consecutivos de 30 minutos cada uno a 42°C con una solución que contenía SSC 0.1x y SDS al 0.1% (p/v). Después el filtro se colocaba entre dos láminas de plástico fino para ser expuesto sobre un film de rayos X de la marca Kodak X-AR Omat a -70°C.

### **3.27 Revelado de las autorradiografías**

El primer revelado de las autorradiografías se realizaba transcurridas 12 horas de exposición. El film se trataba durante 3 minutos con solución reveladora. A continuación se sumergía 15 segundos en agua y finalmente se trataba durante 5 minutos con solución fijadora. En el caso de observar una señal muy tenue los filtros se volvían a exponer por periodos de 2, 4 y 6 días para ser posteriormente revelados.

### **3.28 Rehibridación de los filtros de nitrocelulosa**

Una vez realizada la hibridación y el revelado de un filtro de nitrocelulosa, dicho filtro podía volver a hibridarse con otro cDNA diferente eliminando previamente la marca radiactiva existente en el filtro. Para ello, se preparaba una solución que contenía EDTA 2 mM, pirofosfato 0.5% (p/v), Denhardt's 1X y Tris 50 mM pH 8. Esta solución se diluía 20 veces y con la solución resultante se trataba el filtro de nitrocelulosa durante 2 horas en un baño a 70°C. Transcurrido este tiempo se retiraba la solución y se añadía solución fresca. En estas condiciones se mantenía el filtro durante una hora a temperatura ambiente. Finalmente la nitrocelulosa se dejaba secar durante 5 minutos y tras exponerla a un film de rayos X para comprobar que la marca radiactiva anterior había desaparecido, el filtro podía ser hibridado de nuevo.

### **3.29 Ensayo de dot-blot**

En algunos casos se empleó la técnica del dot-blot con el fin englobar las señales de las dos bandas del mensajero de la enzima málica en una sola marca. Las muestras de RNA se extraían tal como se ha descrito previamente. En tubos eppendorf se colocaban 6-8  $\mu\text{g}$  de RNA total a los cuales se añadía SSC 20x hasta un volumen final de 300  $\mu\text{l}$ . En nuestro caso utilizamos un aparato de Bio-Rad en el que se introducía un filtro de nitrocelulosa que había sido previamente tratado con agua estéril durante 5 minutos y con tampón SSC 20x durante 2 horas a 4°C. Las muestras se calentaban durante 15 minutos a 65°C y a continuación se aplicaban a los pocillos del aparato y con la ayuda del vacío se filtraban las muestras por la nitrocelulosa. En estas condiciones los RNAs quedaban fijos en el filtro. A continuación se lavaban los pocillos con 300  $\mu\text{l}$  de tampón SSC 20x con la ayuda del vacío. Finalmente se abría el aparato y se sacaba la nitrocelulosa. Después de dejarla secar a temperatura ambiente durante una hora se trataba en la estufa a 80°C durante 2 horas. A continuación se realizaban los tratamientos de prehibridación, hibridación, lavados y revelado descritos en los apartados anteriores.

### **3.30 Tinción de los filtros de nitrocelulosa con azul de metileno**

Una vez realizadas las hibridaciones deseadas se procedía a la tinción de los filtros con azul de metileno con objeto de comprobar si existía la misma cantidad de RNA total todos los carriles de los geles o en todos los pocillos de los dot-blots. Para ello, los filtros de nitrocelulosa se trataban durante 10 minutos con ácido acético al 5%. A continuación los filtros se trataban durante otros 10 minutos con una solución que contenía 0.04% de azul de metileno (p/v) en acetato sódico 0.5M pH 5.2. Tras un lavado con agua estéril durante 5 minutos se visualizaban los rRNAs de 28S y 18S en los filtros.

## **IV-RESULTADOS Y DISCUSION**

## **4.1 Estudio de la proliferación de los adipocitos marrones fetales de rata en cultivo primario**

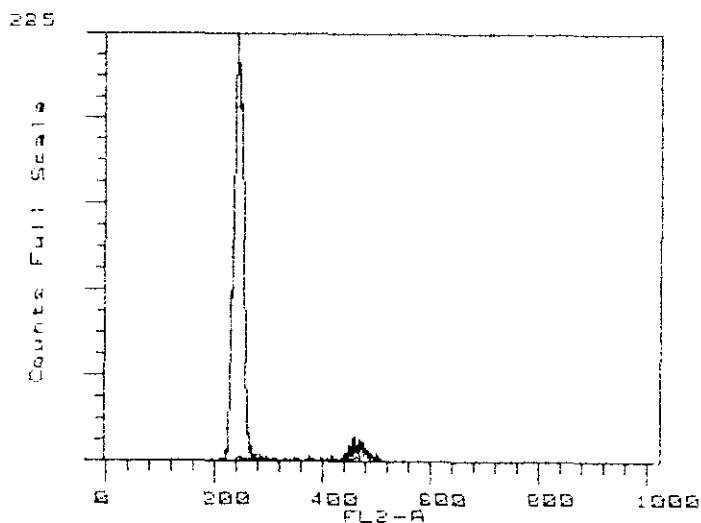
### **4.1.1 Efecto de los factores de crecimiento sobre la síntesis de DNA y parámetros asociados**

Los adipocitos marrones fetales de rata en cultivo constituyen el sistema celular en el cual hemos realizado los estudios de proliferación celular. Se trata de células fetales que "in vivo" comienzan a proliferar en etapas tempranas del desarrollo, concretamente al mismo tiempo que se van formando los vasos sanguíneos en el interior del tejido adiposo marrón (Nèchad, 1986).

Los estudios de proliferación celular "in vitro" requieren la puesta a punto de un sistema de cultivo que permita medir aquellos parámetros celulares que indican la respuesta proliferativa de las células ante los distintos estímulos de crecimiento. En este sentido y tras muchos intentos fallidos, establecimos unas condiciones de cultivo que podían ser adecuadas para realizar nuestros objetivos. En primer lugar se procedía al aislamiento y siembra de los adipocitos marrones ( $1.5 \times 10^6$  células/placa) en un medio de cultivo suplementado con el 10% de suero fetal bovino, con objeto de favorecer la adherencia de las células a las placas de cultivo. Transcurridas 6-8 horas de la siembra en este medio, las células se sometían a dos lavados consecutivos con solución salina de lavado para así eliminar tanto los glóbulos rojos existentes en el medio, como las células no adheridas. A continuación, los adipocitos marrones se cultivaban durante 24 horas en un medio libre en suero. En este momento el estudio del ciclo celular mediante citometría de flujo revelaba que más de un 90% de las células se encontraban en la fase  $G_0/G_1$  del ciclo celular tal como se muestra en la figura 12. Como puede observarse, un 91.12% de las células se encontraban en fase  $G_0/G_1$  mientras que solamente el 3.1% y el 5.88% se encontraban en las fases S y  $G_2/M$  respectivamente en estas condiciones experimentales. Entonces, estas células quiescentes eran estimuladas

**FIGURA 12 Análisis por citometría de flujo del ciclo celular de los adipocitos marrones quiescentes**

Los adipocitos marrones fueron cultivados durante 24 horas en medio de cultivo libre en suero. En este momento se realizó el análisis del ciclo celular por tinción del DNA con ioduro de propidio como se indica en la sección de Material y Métodos. Se muestra un experimento representativo.



fase	n°celulas	%
G1	: 4545	91.0
S	: 155	3.1
G2+M	: 293	5.9
Total:	4993	100.0

realizábamos los estudios de síntesis de DNA y otros parámetros celulares asociados.

Como señales de proliferación ensayamos factores de crecimiento individuales, así como diversas combinaciones mitogénicas. En primer lugar, como combinación mitogénica compleja y además control positivo de proliferación celular, estimulamos las células durante 64 horas con el 10% de suero fetal bovino. Como controles negativos de proliferación utilizamos adipocitos marrones quiescentes mantenidos durante estas 64 horas en medio de cultivo libre en suero. Los factores individuales ensayados fueron el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) por ser un conocido mitógeno de células mesenquimáticas, el factor de crecimiento epidérmico (EGF) ya que ciertas células fetales como los hepatocitos proliferan en presencia de este factor, y el factor de crecimiento insulínico tipo I (IGF-I) dado que el tejido adiposo marrón se muestra muy sensible a insulina, particularmente en la etapa fetal. Asimismo, combinamos estos factores individuales con otros mitógenos conocidos en muchos sistemas o líneas celulares tales como bombesina, vasopresina o ésteres de forbol y agentes que elevan los niveles de cAMP intracelulares como forskolina e IBMX con objeto de potenciar la estimulación de la proliferación que podrían producir los factores de crecimiento individuales. La incorporación de  $^3\text{H}$ -Timidina en adipocitos marrones cultivados durante 64 horas en presencia de diversos mitógenos se muestra en la Tabla 3. Dicha incorporación se ha determinado en las 4 últimas horas de cultivo.

Como se observa en la tabla 3 la presencia en el medio de cultivo del 10% de suero fetal bovino durante 64 horas incrementó 3 veces la incorporación de  $^3\text{H}$ -Timidina con respecto a las células controles quiescentes cultivadas durante este mismo tiempo en medio de cultivo libre en suero. A continuación, se estimularon las células con factores de crecimiento individuales de los cuales solo el IGF-I (1.4 nM) superó los valores de incorporación obtenidos en presencia del 10% de suero fetal. Asimismo, se alcanzaron, aunque no se superaron, los valores de incorporación obtenidos en presencia del 10% de suero fetal al cultivar las células durante 64 horas con EGF (3.3 nM). Otros factores individuales ensayados fueron bombesina (6 nM), vasopresina (18 nM) y PDGF (5 unid max/2/ml). Sin embargo, en presencia de estos factores individuales la incorporación de  $^3\text{H}$ -Timidina fue significativamente menor que la obtenida

**TABLA 3 Incorporación de <sup>3</sup>H-Timidina en adipocitos marrones fetales en cultivo en respuesta a factores de proliferación**

Los adipocitos marrones quiescentes se cultivaron durante 64 horas en presencia de diversos factores de crecimiento. La incorporación de <sup>3</sup>H-Timidina se midió en las 4 últimas horas de cultivo. Los resultados son las medias  $\pm$  SEM (n=10-15) y se expresaron en porcentaje con respecto a las células controles quiescentes

Factores de crecimiento	---	PDGF (5 U/ml/2)	EGF (3.3nM)	IGF-I (1.4nM)
-----	100	199 $\pm$ 24	286 $\pm$ 25	360 $\pm$ 42
EGF (3.3 nM)	---	240 $\pm$ 24	---	339 $\pm$ 24
Bombesina (6nM)	228 $\pm$ 18	150 $\pm$ 35	270 $\pm$ 24	376 $\pm$ 21
Vasopresina (18nM)	246 $\pm$ 19	226 $\pm$ 12	320 $\pm$ 27	311 $\pm$ 20
Bombesina+Vasopresina	278 $\pm$ 12	211 $\pm$ 13	400 $\pm$ 28	324 $\pm$ 12
Forscolina (10 $\mu$ M)+ IBMX (50 $\mu$ M)	<100	---	---	<100
Bombesina+Vasopresina +Forscolina (25 $\mu$ M)	---	---	<100	---
Bombesina+Vasopresina+ Forscolina (10 $\mu$ M)+ IBMX (50 $\mu$ M)	---	---	<100	---
10% Suero fetal	319 $\pm$ 16	---	---	---

en presencia del 10% de suero fetal.

A continuación pasamos a estudiar el efecto producido por diferentes combinaciones mitogénicas sobre la síntesis de DNA en adipocitos marrones fetales quiescentes en cultivo. Cuando se cultivaron las células en presencia de la combinación de EGF, vasopresina y bombesina, se obtuvieron los máximos efectos en la incorporación de  $^3\text{H}$ -Timidina (4 veces) en comparación con las células controles quiescentes. Sin embargo, el efecto del IGF-I no se modificó significativamente cuando este factor se añadió al medio de cultivo conjuntamente con EGF, bombesina, vasopresina, o con la combinación de estas dos últimas. Tampoco observamos efectos sinérgicos al tratar las células con PDGF en presencia de EGF, bombesina, vasopresina, o con la combinación de estas dos últimas. Asimismo la presencia de PDGF combinado con dibutirato de forbol (200 nM) no modificó los valores de incorporación obtenidos en presencia de PDGF solo.

Al añadir al medio de cultivo agentes que elevan los niveles de cAMP intracelulares observamos un descenso significativo en la incorporación de  $^3\text{H}$ -Timidina en adipocitos marrones fetales en cultivo. Así, cuando se cultivaban las células con la combinación EGF, vasopresina y bombesina en presencia de forskolina, molécula activadora del enzima adenilato ciclasa, o en presencia de forskolina e IBMX, un inhibidor de la nucleótido fosfodiesterasa, la incorporación de  $^3\text{H}$ -Timidina como se muestra en la tabla 3, no experimentó un incremento significativo manteniéndose los niveles observados para células controles quiescentes. Asimismo, la presencia de forskolina e IBMX con IGF-I en el medio de cultivo, impidió la inducción de la síntesis de DNA producida por este factor.

Como resultado de los experimentos de síntesis de DNA en adipocitos marrones fetales en cultivo, seleccionamos como factores individuales y combinaciones mitogénicas el 10% de suero fetal bovino, el IGF-I y la combinación de EGF, bombesina y vasopresina puesto que producían los aumentos mas significativos en la incorporación de  $^3\text{H}$ -Timidina, para los siguientes estudios de proliferación. Como condición no mitogénica estudiamos la combinación de EGF, bombesina, vasopresina y forskolina ya que su presencia en el medio de cultivo producía niveles en la síntesis de DNA semejantes a los obtenidos con células controles quiescentes.

Además de estudiar la incorporación de  $^3\text{H}$ -Timidina de los adipocitos marrones

fetales en respuesta a los distintos factores de proliferación, hemos medido otros parámetros relacionados con el estado proliferativo de las células tales como el número de células y el contenido en DNA, RNA y proteínas de cada placa de cultivo en las mismas condiciones experimentales. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 4.

Como puede observarse, tanto el número de células como el contenido total de DNA, RNA y proteínas expresado por placa de cultivo experimentaron el máximo aumento cuando los adipocitos marrones se cultivaron durante 64 horas en presencia del 10% de suero fetal bovino (tabla 4). En estas condiciones, tanto el número de células como el contenido en RNA por placa de cultivo aumentaron 3 veces con respecto a las placas controles quiescentes. Asimismo, los aumentos en el contenido de DNA y proteínas totales por placa de cultivo fueron de 2 veces con respecto a los controles. En presencia de IGF-I y de la combinación de EGF, bombesina y vasopresina se observaron aumentos de dos veces tanto en el número de células como en el contenido en DNA, RNA y proteínas por placa de cultivo. Sin embargo, la presencia de forskolina conjuntamente con EGF, bombesina y vasopresina en el medio de cultivo revirtió los efectos producidos por esta combinación mitogénica en todos los parámetros en estudio, de manera que los valores obtenidos fueron del mismo orden que los observados en placas controles quiescentes. En todas las combinaciones estudiadas existía una buena correlación entre el número de células y el contenido en DNA ( $28.6 \mu\text{g DNA}/10^6$  células). Asimismo las relaciones RNA/DNA y RNA/proteínas fueron semejantes en todas las combinaciones ensayadas.

Los resultados obtenidos muestran la respuesta de los adipocitos marrones fetales quiescentes a diversos péptidos mitogénicos tras 64 horas de cultivo. La presencia en el medio de cultivo del 10% de suero fetal bovino, IGF-I y la combinación de EGF, bombesina y vasopresina, que aumentaban significativamente la incorporación de  $^3\text{H}$ -Timidina (tabla 3), aumentaron también el número de células así como el contenido en DNA, RNA y proteínas expresadas por placa de cultivo en comparación con las placas controles quiescentes (tabla 4). Hay que señalar que los efectos producidos en el número de células son mayores al cultivar éstas durante 64 horas en presencia del 10% de suero fetal bovino en comparación con los cultivos en presencia de IGF-I o la combinación de EGF, bombesina y vasopresina (tabla 4). Estos resultados podrían

**TABLA 4 Efecto de los factores de proliferación sobre el número de células y contenido en DNA, RNA y proteínas en cultivos primarios de adipocitos marrones fetales de rata**

Las células se han cultivado tal como se indica en la tabla 3. El contenido en DNA, RNA y proteínas se ha determinado al final del cultivo. El número de células ha sido determinado mediante citometría de flujo. Los resultados son medias  $\pm$  SEM (n=3-6)

	nº células (x10 <sup>6</sup> /placa)	DNA ( $\mu$ g/placa)	RNA ( $\mu$ g/placa)	Proteínas ( $\mu$ g/placa)
Control	0.59 $\pm$ 0.4	17.3 $\pm$ 1.4	7.1 $\pm$ 0.6	256 $\pm$ 13
IGF-I (1.4nM)	1.08 $\pm$ 0.12	30.6 $\pm$ 0.6	13.3 $\pm$ 1.0	482 $\pm$ 10
EGF (3.3nM)+ Vasopresina (18nM) +Bombesina (6nM)	1.10 $\pm$ 0.12	29.5 $\pm$ 2.0	14.6 $\pm$ 1.0	524 $\pm$ 25
EGF+Vasopresina+ Bombesina+ Forscolina (25 $\mu$ M)	0.61 $\pm$ 0.05	19.2 $\pm$ 1.2	8.6 $\pm$ 0.8	198 $\pm$ 09
10% suero fetal	1.42 $\pm$ 0.20	38.6 $\pm$ 1.7	23.5 $\pm$ 0.2	559 $\pm$ 22

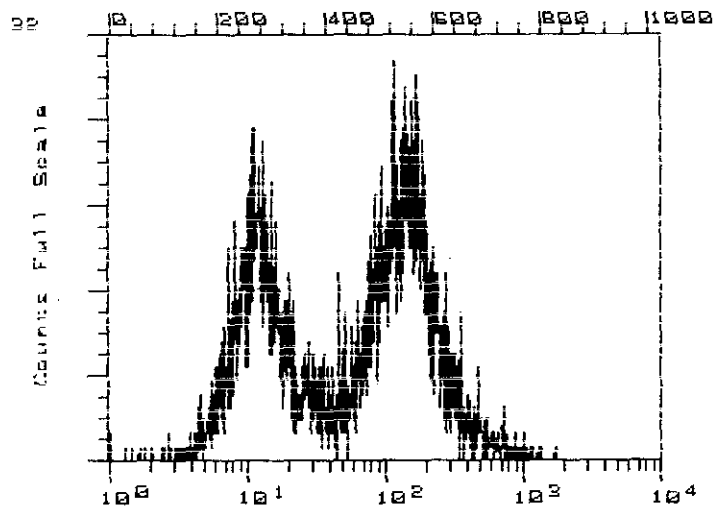
explicarse teniendo en cuenta que la composición del suero fetal bovino además de estar implicada en la estimulación de la síntesis de DNA de los adipocitos marrones fetales en cultivo (tabla 3) contribuye al mantenimiento de la supervivencia celular en las placas de cultivo.

Paralelamente, se han caracterizado las células mediante la técnica de citometría de flujo en dos condiciones experimentales: células quiescentes y células estimuladas con el 10% de suero fetal bovino (figura 13). Las células controles presentaban un perfil de fluorescencia intrínseca en el que observamos dos picos bien diferenciados de área aproximada que corresponden a dos poblaciones de distinta fluorescencia intrínseca. En presencia del 10% de suero fetal durante 64 horas ambos picos muestran cambios muy significativos. El de baja fluorescencia presenta un área 5 veces mayor que el de alta fluorescencia, que ha disminuído sensiblemente con respecto a los controles. La emisión de fluorescencia es un indicativo del contenido celular de flavinas en estado oxidado (Thorell, 1983). Por tanto, en presencia de suero fetal observamos que solo una pequeña parte de la población celular posee alta fluorescencia. Dichas células constituirían la población quiescente metabólicamente activa, mientras que la población mayoritaria de baja fluorescencia correspondería a células proliferantes con un alto flujo glucolítico anaerobio y por tanto, con menor metabolismo oxidativo mitocondrial.

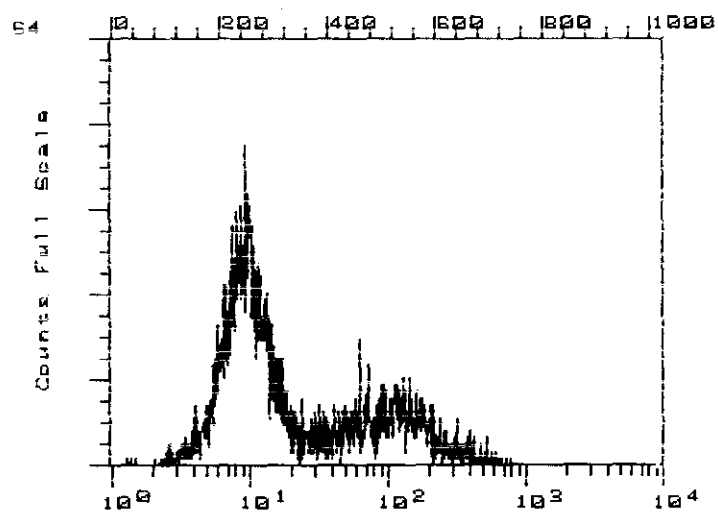
El IGF-I ha resultado ser el principal factor de crecimiento individual responsable de la proliferación de los adipocitos marrones fetales en cultivo primario. Como puede observarse en la tabla 1, la síntesis de DNA es mayor en presencia de IGF-I que en presencia del 10% de suero fetal bovino en el medio de cultivo. De esta manera, nuestros resultados concuerdan con recientes trabajos que atribuyen a este factor un papel importante en el crecimiento y desarrollo en la transición fetal-neonatal de la rata (Humbel, 1990., Straus y col., 1991). Sin embargo, al combinar el IGF-I con otros factores de crecimiento tales como EGF, bombesina o vasopresina no han aparecido efectos sinérgicos significativos. Estos resultados podrían explicarse por la independencia del IGF-I de otros factores de crecimiento en sus mecanismos de acción intracelular. También el EGF, potente mitógeno en células hepáticas, combinado con bombesina y vasopresina supera los niveles de síntesis de DNA observados en presencia del 10% de suero fetal bovino (tabla 3). Sin embargo, la

**FIGURA 13 Análisis por citometría de flujo de adipocitos marrones fetales quiescentes y estimulados con el 10% de suero fetal bovino**

Los adipocitos marrones se han cultivado tal como se describe en la tabla 3. Transcurridas 64 horas de cultivo se procedía a la tripsinización de las células y al análisis de las mismas por citometría de flujo



**CONTROL**



**10% SUERO FETAL**

falta de efecto sinérgico observada al tratar las células con EGF e IGF-I podría deberse a que ambos factores poseen mecanismos semejantes de acción intracelular mediante la activación de la proteína intracelular tirosina kinasa.

En otros sistemas de cultivo primario de células fetales los efectos mitogénicos observados han sido diferentes. Por ejemplo, en cultivos primarios de hepatocitos fetales de rata, el EGF ha resultado ser el principal factor de crecimiento individual incrementando hasta 5 veces los niveles de síntesis de DNA con respecto a células controles quiescentes (Hoffman y col., 1989). Sin embargo, en cultivos primarios de adipocitos marrones fetales el EGF produce aumentos significativos en la síntesis de DNA solamente cuando se encuentra presente en el medio de cultivo conjuntamente con los neuropéptidos bombesina y vasopresina (tabla 1).

En nuestro sistema celular, otros factores de crecimiento como el PDGF, bombesina o vasopresina, que han sido descritos como buenos mitógenos en la línea celular Swiss 3T3 (Rozengurt y Sinnet-Smith, 1983; Blakeley y col., 1989), no producen aumentos significativos en la síntesis de DNA (tabla 3). Asimismo, en adipocitos marrones fetales, el PDGF no actúa sinérgicamente con otros factores tales como EGF, bombesina o vasopresina. Además, en presencia de PDGF, la activación de la proteína kinasa C por ésteres de forbol tampoco produce efectos positivos sobre la síntesis de DNA. Esto sugiere que esta vía de transmisión de señales no parece ser responsable de la inducción de la proliferación en cultivos primarios de adipocitos marrones fetales de rata.

Otro sistema celular que responde de manera diferente a los distintos factores de crecimiento es la línea celular NIH-3T3, donde la respuesta mitogénica es positiva si existen niveles de insulina altos en el medio (Randazzo y Jarett, 1990).

El efecto inhibitor del cAMP sobre la proliferación de los adipocitos marrones fetales en cultivo ha sido también descrito en células fibroblásticas de pulmón de hamster (Magnaldo y col., 1989). Por el contrario, se ha descrito un aumento en la síntesis de DNA en adipocitos marrones de ratones adaptados al frío, situación que conduce a una elevación de los niveles de cAMP intracelulares (Rehnmark y Nedergaard, 1989). Asimismo, en la línea celular Swiss 3T3 también se ha descrito la estimulación de la síntesis de DNA en presencia de agentes que elevan los niveles de cAMP en combinación con otros factores (Escribano y Rozengurt, 1988). Sin embargo, en

nuestro sistema celular los agentes que elevan los niveles de cAMP intracelulares podrían estar inhibiendo, mediante la activación de la proteína kinasa A, la vía de transmisión de señales intracelulares mediada por la proteína tirosina kinasa, presumiblemente activada por los factores de crecimiento IGF-I y EGF. De esta manera la forskolina, potente activador de la proteína kinasa A, en nuestras células es capaz de revertir el efecto estimulador sobre la síntesis de DNA producido por el IGF-I y la combinación mitogénica de EGF, bombesina y vasopresina.

#### **4.1.2 Efecto de los factores de crecimiento sobre la expresión genética de la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa**

La G6PD es el enzima limitante de la vía de las pentosas fosfato. Esta ruta aporta poder reductor en forma de NADPH que posteriormente se utiliza en reacciones metabólicas biosintéticas entre las que se encuentran la síntesis de ácidos grasos y esteroides. El destino final de la ruta es el aporte de pentosas fosfato, sustratos necesarios para la síntesis de ácidos nucleicos. Por tanto, este enzima podría tener un doble papel en el metabolismo celular: por un lado en la síntesis lipídica en células diferenciadas, y por otro en la síntesis de ácidos nucleicos en células proliferantes.

En cultivos primarios de hepatocitos de rata adulta se ha descrito una inducción de la G6PD en condiciones proliferativas (Yoshimoto y col., 1983b). Sin embargo, en nuestro sistema celular no existían referencias sobre una posible relación entre la estimulación de la proliferación celular y la inducción de este enzima. En experimentos previos realizados en nuestro laboratorio observábamos un descenso gradual en la actividad G6PD al cultivar los adipocitos marrones fetales en condiciones de quiescencia experimental (Martínez Valverde, 1988). Por tanto, ante la posibilidad de la existencia de un paralelismo entre proliferación e inducción de la G6PD, estudiamos el efecto de los factores de crecimiento que estimulaban significativamente la incorporación de <sup>3</sup>H-Timidina sobre la actividad G6PD. Asimismo, ensayamos esta actividad enzimática en presencia de aquellas combinaciones que resultaron no mitogénicas para los adipocitos marrones fetales en cultivo. Para ello utilizamos las mismas condiciones experimentales de cultivo que describíamos en el apartado 4.1.1 para la determinación de la incorporación de <sup>3</sup>H-Timidina y otros parámetros celulares relacionados.

Paralelamente determinamos la actividad enzima málica, otro enzima generador de NADPH que participa en la ruta lipogénica, en las mismas condiciones experimentales con objeto de probar si la relación proliferación-inducción enzimática era específica de la G6PD. Este estudio lo realizamos a 3 niveles:

- medida de la actividad enzimática específica de la G6PD en respuesta a los diversos factores de crecimiento.
- determinación de los cambios en la cantidad de proteína inmunorreactiva en respuesta a estos factores mediante inmunoprecipitación con el anticuerpo específico anti-G6PD.
- medida de los cambios en los niveles del mRNA de la G6PD al estimular las células con las combinaciones de factores previamente seleccionadas.

El efecto de los distintos factores de crecimiento sobre las actividades G6PD y enzima málica se muestra en la tabla 5. La actividad G6PD en adipocitos marrones recién aislados era  $61.9 \pm 1.5$  nmoles/min/mg de proteína. Sin embargo, al cultivar las células en un medio libre en suero se produjo una caída gradual de la actividad enzimática específica hasta alcanzar valores de  $30.3 \pm 1.3$  tras 64 horas de cultivo.

A continuación estudiamos el efecto de las combinaciones mitogénicas seleccionadas en los estudios anteriores sobre la actividad G6PD. Las condiciones de cultivo en estos experimentos se detallan en la sección de Material y Métodos. Así, al cultivar los adipocitos marrones fetales quiescentes durante 64 horas en presencia del 10% de suero fetal bovino se duplicó la actividad G6PD con respecto a la obtenida en las células controles quiescentes. Asimismo, tanto el IGF-I como la combinación de EGF, bombesina y vasopresina produjeron un efecto semejante sobre la actividad G6PD. Al ensayar en el medio de cultivo la combinación no mitogénica de EGF, bombesina, vasopresina y forskolina, no se observó la inducción de la actividad G6PD, manteniéndose esta en los niveles correspondientes a las células controles quiescentes. También la presencia de forskolina e IBMX revirtió el efecto estimulador del IGF-I sobre la actividad G6PD (tabla 5). De esta manera, podemos decir que las combinaciones no mitogénicas no modifican la actividad G6PD en cultivos primarios de adipocitos marrones fetales de rata.

La actividad enzima málica no experimentó cambios significativos a lo largo del tiempo de cultivo, así como en presencia de los mitógenos ensayados (tabla 5). Sin embargo, cuando se añadían al medio de cultivo agentes que elevan los niveles de

**TABLA 5 Efecto de los factores de proliferación sobre las actividades glucosa 6-fosfato deshidrogenasa y enzima málica en cultivos primarios de adipocitos marrones fetales de rata**

Los adipocitos marrones se han cultivado tal como se indica en la tabla 3. Las actividades enzimáticas específicas se han determinado al final del cultivo y se han expresado en nmol/minx mg proteína. Los resultados son medias  $\pm$  SEM (n=10-15). Las actividades G6PD y enzima málica en células recién aisladas eran  $61.9 \pm 1.5$  y  $19.5 \pm 2.0$ , respectivamente.

	G6PD (nmol/minxmg prot.)	Enzima málica (nmol/minxmg prot.)
Control	$30.0 \pm 1.3$	$17.4 \pm 1.1$
IGF-I (1.4nM)	$77.4 \pm 5.6$	$16.7 \pm 1.2$
EGF (3.3nM) + Vasopresina (18nM) + Bombesina (6nM)	$67.0 \pm 5.1$	$18.3 \pm 1.5$
IGF-I + Forscolina (10 $\mu$ M) + IBMX (50 $\mu$ M)	$37.1 \pm 3.0$	$6.4 \pm 0.5$
EGF + Vasopresina + Bombesina + forscolina (25 $\mu$ M)	$43.0 \pm 3.5$	$6.8 \pm 0.6$
10% suero fetal	$68.2 \pm 2.1$	$17.5 \pm 1.5$

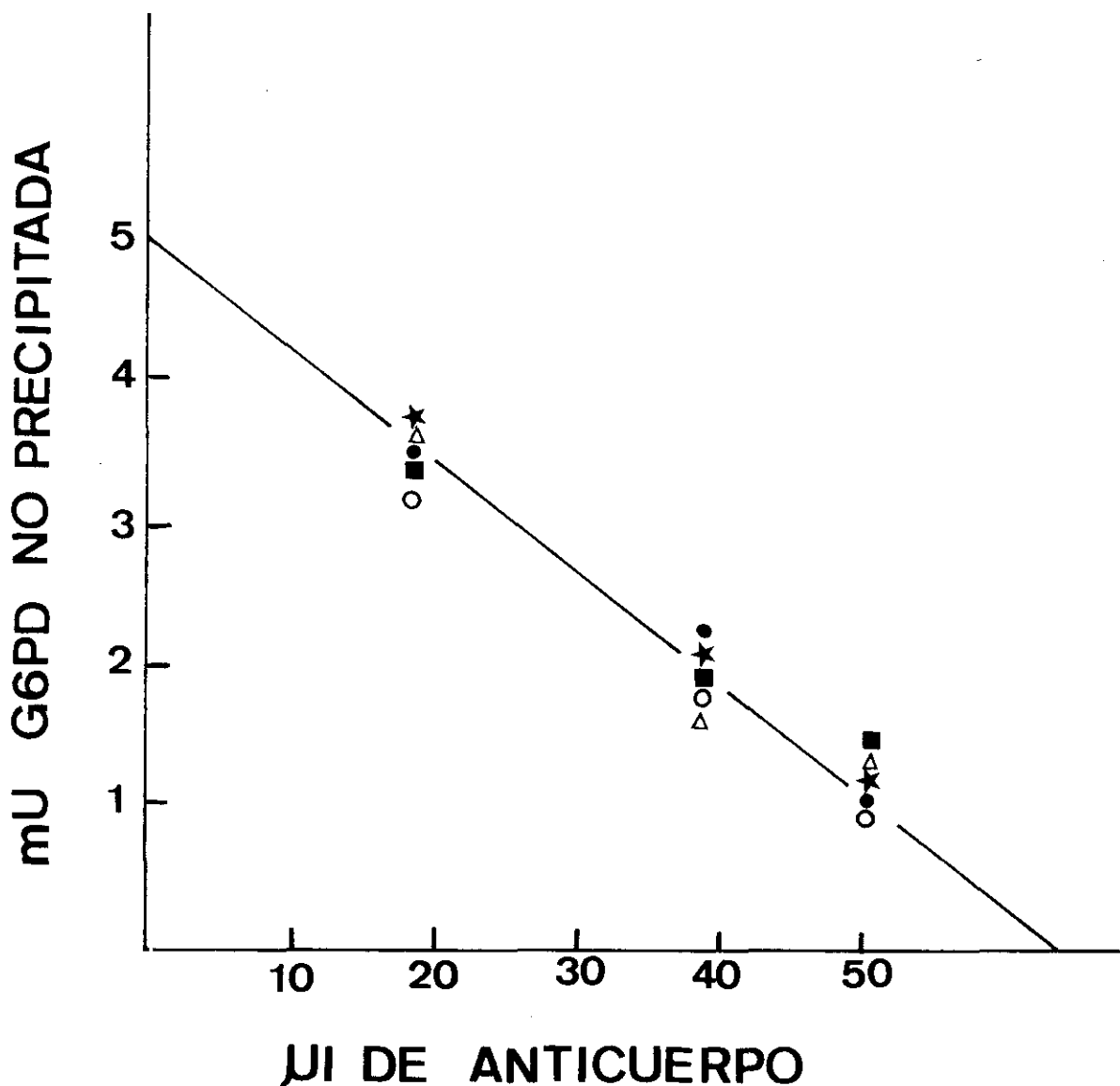
cAMP intracelulares, la actividad enzimática experimentó un descenso significativo. Así, las combinaciones de IGF-I, forskolina e IBMX y de EGF, bombesina, vasopresina y forskolina en el medio de cultivo presentaban una actividad enzimática inferior incluso que la obtenida para células controles quiescentes. Estos resultados podrían explicarse como consecuencia del efecto descrito por Lorenzo y col. (1989) del cAMP sobre la expresión de la enzima málica, donde en presencia de noradrenalina se produce un aumento significativo de la velocidad de degradación de esta proteína en cultivos primarios de adipocitos marrones fetales de rata.

Nuestro siguiente objetivo fue comprobar si estos cambios en la actividad G6PD producidos por los diversos factores de crecimiento se correspondían con cambios paralelos en la cantidad de proteína. Para ello realizamos el experimento de inmunotitulación con el anticuerpo específico anti-G6PD que se muestra en la figura 14. En este ensayo se utilizaron células cultivadas en presencia de las combinaciones mitogénicas y no mitogénicas seleccionadas. Como se aprecia en la figura 14 en todas las condiciones los cambios producidos en la actividad G6PD eran proporcionales a los cambios en la cantidad de proteína inmunorreactiva. Por tanto, podemos decir que existe una buena correlación entre los efectos producidos por los factores de crecimiento sobre la actividad G6PD y la cantidad de proteína.

Finalmente, estudiamos el efecto de estos factores sobre la expresión genética de la G6PD. Para ello, fue necesario cuantificar los niveles del mRNA de la G6PD en las distintas condiciones experimentales. Así, realizamos el ensayo de Northern-blot a partir de 30  $\mu$ g de RNA total obtenido a partir de los adipocitos marrones fetales cultivados durante 64 horas en presencia de las combinaciones de factores previamente seleccionadas. A continuación realizamos las electroforesis de estos RNAs en geles de agarosa-formaldehído y posteriormente la transferencia a filtros de nitrocelulosa. Estos filtros fueron hibridados con el cDNA de la G6PD marcado con  $^{32}$ P por el procedimiento descrito en la sección de Material y Métodos. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 15. El análisis densitométrico de la figura 15 indicaba que las células cultivadas durante 64 horas en presencia del 10% de suero fetal duplicaron los niveles del mRNA de la G6PD en comparación con las células controles quiescentes. Este mismo efecto también se observaba al cultivar las células en presencia de IGF-I y la combinación de EGF, bombesina y vasopresina. Por tanto, estos resultados parecen

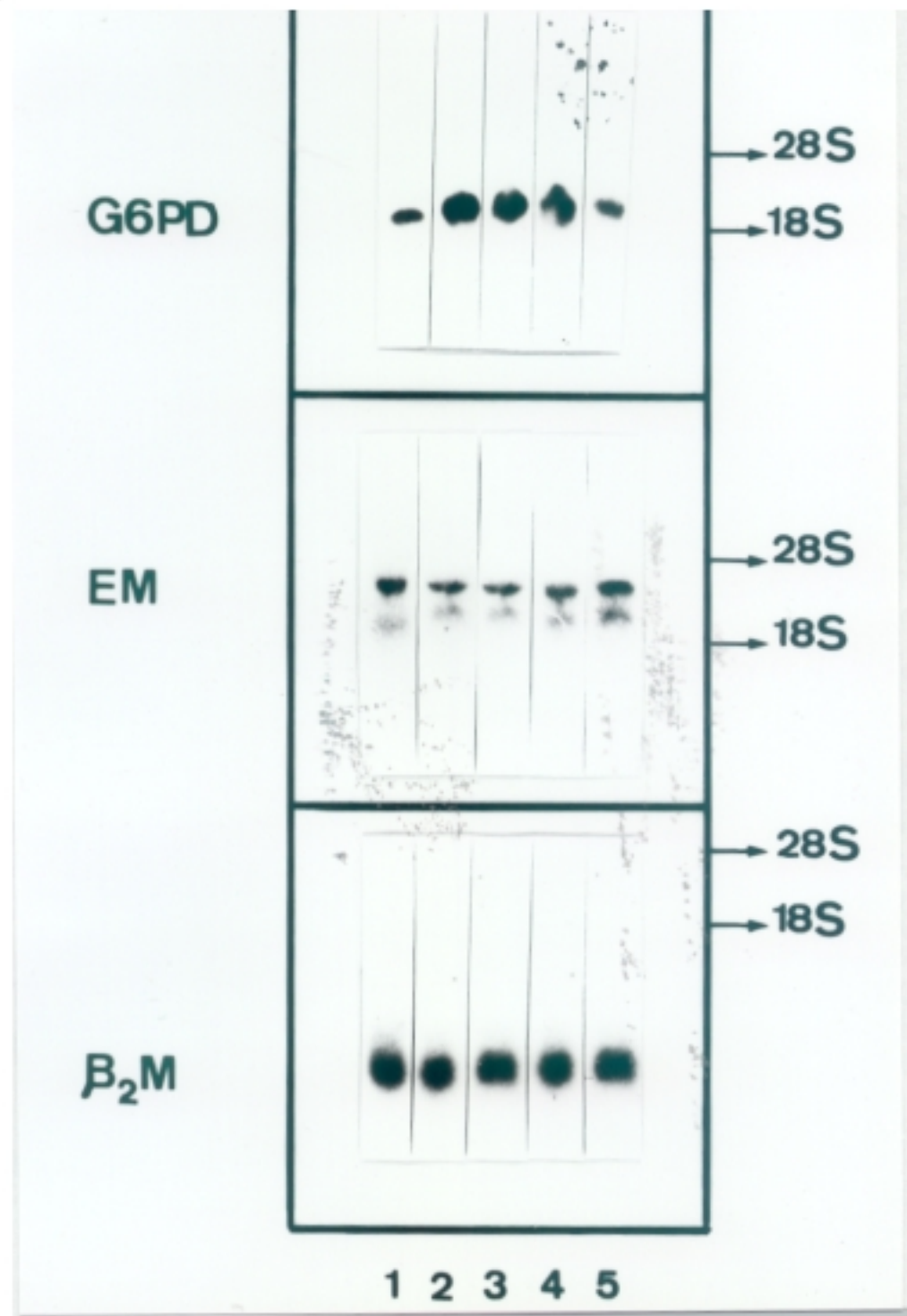
**FIGURA 14 Inmunoprecipitación de la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa en cultivos primarios de adipocitos marrones fetales de rata en presencia de factores de proliferación**

Los adipocitos marrones se han cultivado como se indica en la tabla 3. La G6PD se ha inmunoprecipitado con volúmenes crecientes del anticuerpo anti-G6PD (diluído 1/100) de células controles quiescentes (★), células cultivadas con 10% de suero fetal (Δ), IGF-I (1.4 nM) (○), EGF (3.3 nM) + Vasopresina (18 nM) + Bombesina (6 nM) (●) y EGF + Vasopresina + Bombesina + Forskolina (25 μM) (■). Se muestra un experimento representativo.



**FIGURA 15** Análisis de Northern-Blot del mRNA de la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa de cultivos primarios de adipocitos marrones en presencia de factores de proliferación

El RNA total (30  $\mu$ g) se ha sometido a electroforesis en geles de agarosa 1% / formaldehído 2.2M, transferido a filtros de nitrocelulosa e hibridado con el cDNA de la G6PD marcado por el procedimiento descrito en la sección de Material y Métodos. Los filtros se lavaron y rehibridaron con los cDNAs de la enzima málica y  $\beta_2$  microglobulina previamente marcados. Los RNAs procedían de células controles quiescentes (1), células cultivadas 64 h en presencia del 10% de suero fetal (2), IGF-I (1.4 nM) (3), EGF (3.3 nM) + Vasopresina (18 nM) + Bombesina (6 nM) (4) y EGF + Vasopresina + Bombesina + Forskolina (25  $\mu$ M) (5). Las posiciones de los rRNAs ribosomales 28S y 18S se indican en la derecha de la figura. Se muestra un experimento representativo.



indicar que estos factores mitogénicos aumentan la expresión genética de la G6PD a nivel transcripcional. Sin embargo, no observamos diferencias entre los niveles de mRNA de células controles quiescentes y células cultivadas en presencia de la combinación no mitogénica de EGF, bombesina, vasopresina y forskolina. A continuación tratamos los filtros convenientemente como se describe en la sección de Material y Métodos y los hibridamos con el cDNA de la enzima málica observando la aparición de los dos mRNAs de 4.5 y 2.7 Kb respectivamente descritos para esta proteína, siendo la forma mayoritaria en nuestro sistema celular la de 4.5 Kb. Como se aprecia en la figura 15 no existen diferencias significativas entre los niveles de los mRNAs de la enzima málica de células controles y células estimuladas con los mitógenos. En particular, la presencia de forskolina conjuntamente con EGF, bombesina y vasopresina no modifica los niveles de mRNA de la enzima málica detectados en su ausencia. Estos resultados parecen indicar que los agentes que elevan los niveles de cAMP intracelulares disminuyen la actividad enzima málica a nivel postranscripcional (Lorenzo y col., 1989).

Finalmente hibridamos los filtros con el cDNA de la  $\beta_2$ -microglobulina con objeto de normalizar nuestros resultados observando la aparición de los dos mRNAs de 0.9 y 1.1 Kb respectivamente correspondientes a esta proteína. El mRNA de 0.9 Kb parece ser la forma mayoritaria en nuestro sistema. Como se observa en la figura 15, la expresión genética de la  $\beta_2$ -microglobulina no se modifica en ninguna de las condiciones experimentales ensayadas.

En consecuencia, se puede decir que la expresión genética de la G6PD se induce en condiciones mitogénicas en cultivos primarios de adipocitos marrones fetales de rata. Estos resultados concuerdan con el papel de este enzima en la síntesis de DNA en adipocitos marrones fetales como ha sido sugerido en cultivos primarios de hepatocitos de rata adulta, donde el EGF induce la G6PD en respuesta a la proliferación celular (Yoshimoto y col. 1983b., Tsao y col. 1986). Por otra parte, la inducción de la síntesis de DNA y la expresión genética de la G6PD observada en presencia de EGF, bombesina y vasopresina en el medio de cultivo resultan inhibidas por forskolina. De esta manera, estos resultados refuerzan el papel de la G6PD como donador de ribosas 5'-fosfato para la síntesis de ácidos nucleicos, mientras que la enzima málica no se encuentra implicada en el crecimiento celular.

En resumen, los adipocitos marrones fetales en cultivo constituyen un sistema adecuado para la realización de estudios de proliferación celular. Tanto la síntesis de DNA como el número de células y contenido en DNA, RNA y proteínas se inducen en presencia del 10% de suero fetal bovino, IGF-I y la combinación de EGF, bombesina y vasopresina en comparación con las células controles quiescentes. En nuestro sistema celular, el IGF-I ha resultado ser el principal factor de crecimiento individual ya que el EGF requiere la presencia de los péptidos vasopresina y bombesina para ejercer el máximo efecto mitogénico. Estos factores de crecimiento inducen la expresión genética de la G6PD, enzima generadora de NADPH, que también participa en el aporte de ribosomas fosfato para la síntesis de ácidos nucleicos en nuestras células proliferantes. Tanto la cantidad de proteína inmunorreactiva como los niveles del mRNA de la G6PD aumentan en respuesta al suero fetal, IGF-I y la combinación de EGF, bombesina y vasopresina. De esta manera, la G6PD puede ser un marcador de proliferación celular en adipocitos marrones fetales en cultivo. Sin embargo, la enzima málica, también implicada en la generación de NADPH, no parece regular la proliferación de los adipocitos marrones fetales en cultivo. Finalmente, los agentes que elevan los niveles de cAMP intracelulares han resultado ser en nuestro sistema inhibidores de la proliferación celular. En este sentido, la presencia de forskolina revierte el efecto estimulador de la combinación de EGF, bombesina y vasopresina sobre la síntesis de DNA, número de células, contenido global de DNA, RNA y proteínas, así como sobre la inducción de la G6PD.

#### **4.2 Regulación hormonal de la expresión genética de la enzima málica y la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa en cultivos primarios de adipocitos marrones fetales de rata en condiciones no proliferativas**

La enzima málica y la G6PD son dos enzimas que participan en la síntesis lipídica mediante el aporte de poder reductor en forma de NADPH. Debido a que en la etapa fetal el tejido adiposo marrón es el principal tejido lipogénico en la rata, realizando una síntesis "de novo" muy intensa a partir de sustratos no lipídicos que recibe del compartimento materno, nos proponemos estudiar la regulación hormonal de la expresión genética de estas dos enzimas lipogénicas en nuestro sistema "in vitro" de cultivo primario de adipocitos marrones fetales en condiciones no proliferativas.

La regulación hormonal de la expresión genética de la enzima málica y la G6PD se ha estudiado cultivando los adipocitos marrones por periodos de 6 y 10 días en MEM suplementado con el 2% de suero fetal bovino como se indica en la sección de Material y Métodos. En estas condiciones las células se mantenían viables y quiescentes a lo largo del tiempo de cultivo. De esta manera hemos estudiado los efectos de la insulina, como hormona típicamente lipogénica, puesto que el tejido adiposo marrón se muestra muy sensible a esta hormona, particularmente durante la etapa fetal (Benito y col., 1984). Asimismo hemos estudiado el efecto de la T<sub>3</sub> sobre el cultivo por estar implicada tanto en el metabolismo lipídico como en la termogénesis del tejido adiposo marrón (Nicholls y Locke, 1984). Como agente lipolítico, dado que el glucagón no ejerce efecto ni en adipocitos marrones aislados (Roncero y col., 1987), ni en adipocitos marrones en cultivo (Lorenzo y col., 1988), se ha estudiado el efecto de la noradrenalina. Esta hormona, además de su papel inhibitor de la lipogénesis en adipocitos marrones (Roncero y col., 1987, Lorenzo y col., 1988), está directamente implicada en la termogénesis del tejido adiposo marrón tras el nacimiento (Nicholls y Locke, 1984).

La regulación hormonal de la expresión genética de la enzima málica y la G6PD en cultivos primarios de adipocitos marrones fetales en condiciones no proliferativas se ha realizado a 3 niveles:

- determinación de los niveles de los mRNAs de estas dos enzimas en respuesta a insulina ,  $T_3$  y noradrenalina tras 6 y 10 días de cultivo mediante la técnica de Northern-Blot e hibridación con los cDNAs específicos.

- medida de los cambios en las cantidades de ambas proteínas mediante inmunodetección con los anticuerpos frente a estas enzimas.

- medida de las actividades enzimáticas específicas de la enzima málica y la G6PD en las mismas condiciones experimentales.

#### **4.2.1 Regulación hormonal de la expresión genética de la enzima málica en cultivos primarios de adipocitos marrones fetales de rata en condiciones no proliferativas**

En primer lugar estudiamos el efecto de estas hormonas sobre los niveles del mRNA de la enzima málica en nuestras condiciones experimentales. Para ello, realizamos ensayos de Northern-blot a partir de 30  $\mu$ g de RNA total obtenido a partir de los adipocitos marrones cultivados durante 6 y 10 días en presencia de insulina (40 nM),  $T_3$  (10  $\mu$ M), y las combinaciones de insulina y  $T_3$  e insulina ,  $T_3$  y noradrenalina (10  $\mu$ M), así como de células controles cultivadas en ausencia de hormonas. La hibridación de los Northern-blots con el cDNA de la enzima málica se muestra en las figuras 16 y 17 donde aparecen dos formas maduras de mRNA para esta enzima de 4.5 y 2.7 kb respectivamente. Mediante el análisis densitométrico de las autorradiografías se determinó que los niveles relativos de estos mensajeros eran del 60-70% para la forma de 4.5 Kb frente a un 30-40% para la de 2.7 Kb. Estos resultados difieren con los descritos por Dozin y col. (1985) para la enzima málica hepática, donde la forma predominante es la de 2.7 Kb.

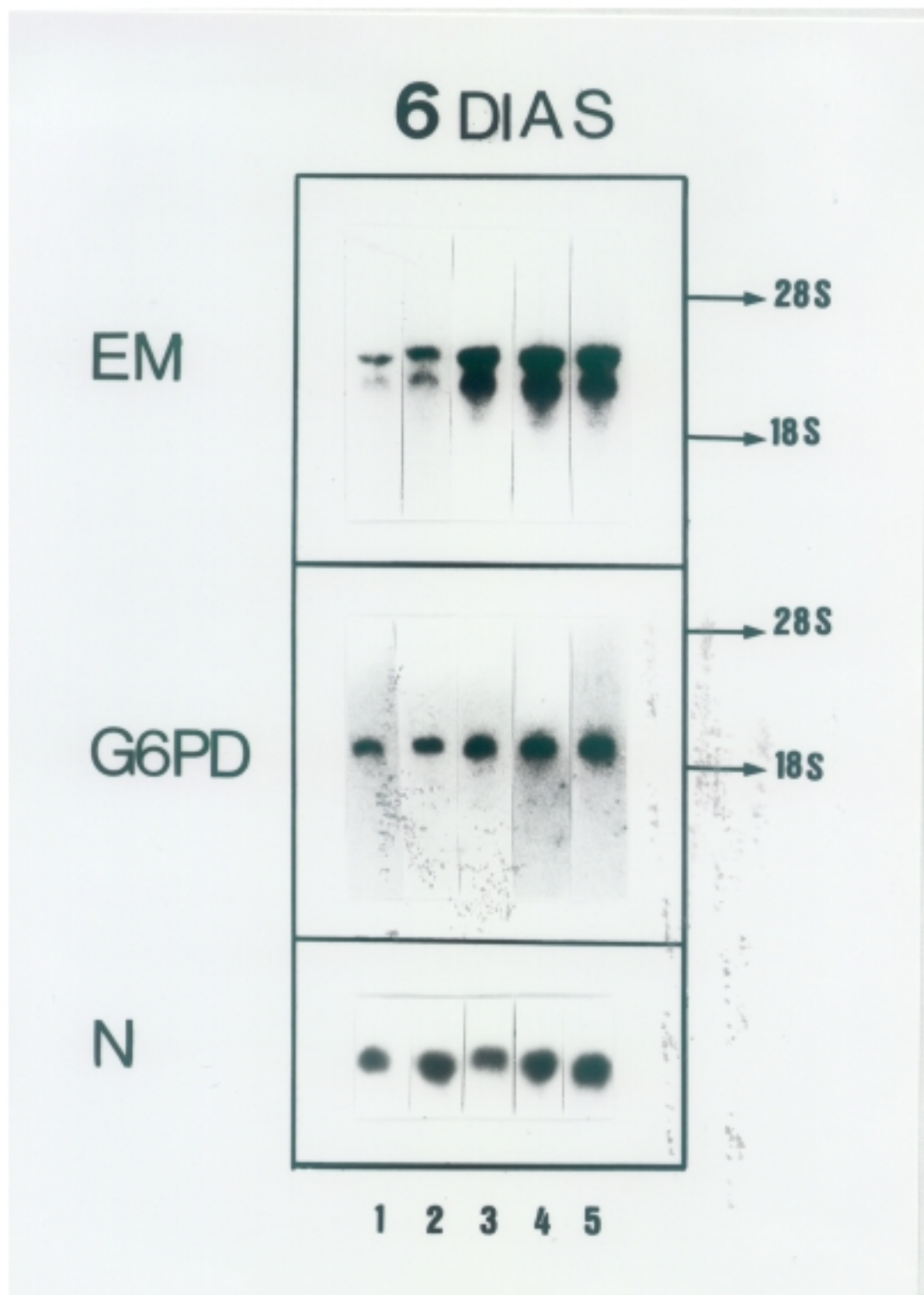
En presencia de  $T_3$  en el medio de cultivo durante 6 y 10 días observamos aumentos de 1.8 y 3.7 veces respectivamente en los niveles de los mRNAs de la enzima málica en comparación con las células controles cultivadas en ausencia de

hormonas (figuras 16 y 17, tabla 7). En estos experimentos la concentración de  $T_3$  utilizada era  $10 \mu\text{M}$  ya que al realizar estudios previos de dosis-respuesta con esta hormona como muestra la figura 18 observamos que concentraciones de  $T_3$  de  $10 \text{ nM}$  no modificaban los niveles de los mRNAs de la enzima málica tras 10 días de cultivo. Asimismo, cuando las concentraciones de la hormona eran de  $1 \mu\text{M}$  se duplicaban los niveles de los mRNAs del enzima. Sin embargo, al emplear concentraciones de  $10 \mu\text{M}$  los aumentos del mRNA obtenidos fueron de 3 veces con respecto a las células controles cultivadas en ausencia de la hormona.

Nuestro siguiente objetivo fué estudiar los efectos producidos por la  $T_3$  sobre la cantidad de proteína inmunorreactiva tal como se muestra en la figura 19. Los aumentos observados en los niveles de los mRNAs de la enzima málica en presencia de  $T_3$  ( $10 \mu\text{M}$ ) tras 6 y 10 días de cultivo eran paralelos con aumentos en la cantidad de proteína detectados mediante inmunodetección de los Western-blots correspondientes con el anticuerpo específico anti-enzima málica. Así, el análisis densitométrico de la figura 19 muestra aumentos de 1.5 y 2.5 veces en la cantidad de proteína tras 6 y 10 días de cultivo respectivamente en comparación con los controles tal como se muestra en la tabla 7. Asimismo, también hemos estudiado el efecto de la  $T_3$  sobre la actividad enzimática específica tal como se muestra en la tabla 6 encontrando que estos cambios en la cantidad de proteína eran paralelos a cambios en la actividad enzimática específica (tabla 7). Estos resultados parecen indicar que la regulación de la expresión genética de la enzima málica por  $T_3$  ocurre a nivel transcripcional. En experimentos previos realizados en nuestro laboratorio por Lorenzo y col.(1989) la  $T_3$  no modificaba la actividad enzima málica tras 2 días de cultivo en presencia de la hormona. De esta manera se podría decir que en nuestro sistema de cultivo, la enzima málica madura a lo largo del tiempo en su respuesta a  $T_3$  probablemente por un aumento progresivo en el número de receptores inducido por la presencia prolongada de la hormona en el medio de cultivo, tal como se ha descrito para la glándula pituitaria (Lemarchand-Beraud y col., 1987). Nuestros resultados prueban una regulación por  $T_3$  de la expresión genética de la enzima málica tal como se ha descrito en hígado, corazón, riñón en contraste con otros sistemas como cerebro, pulmón, bazo y testículo donde el enzima málica no está regulada por esta hormona (Dozin y col., 1985).

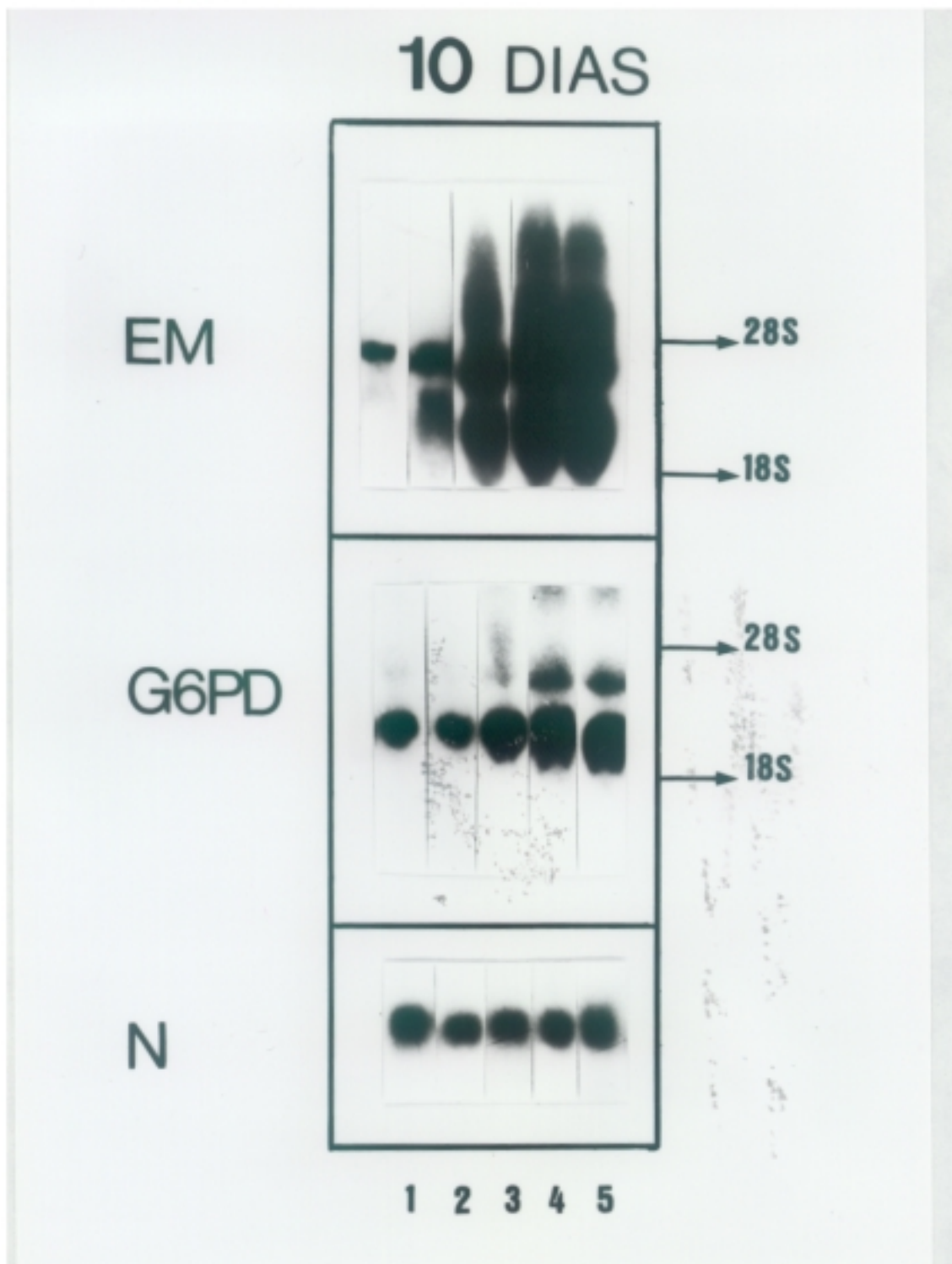
**FIGURA 16 Análisis de Northern-Blot de los mRNAs de la enzima málica y G6PD de adipocitos marrones fetales cultivados durante 6 días en condiciones no proliferativas**

El RNA total (30  $\mu$ g) se ha sometido a electroforesis en geles de agarosa 1%/formaldehído 2.2 M, transferido a filtros de nitrocelulosa e hibridado con los cDNAs marcados de la enzima málica (panel 1), G6PD (panel 2) y  $\beta$ -actina como normalizador (panel 3). Los RNAs procedían de adipocitos marrones cultivados durante 6 días como se indica en la sección de Material y Métodos en ausencia de hormonas (1), con  $T_3$  (10  $\mu$ M) (2), insulina (40 nM) (3), insulina+ $T_3$  (4), insulina+ $T_3$ +noradrenalina (10  $\mu$ M) (5). A la derecha de la figura se muestran las posiciones de los rRNAs 28S y 18S. Se muestra un experimento representativo.



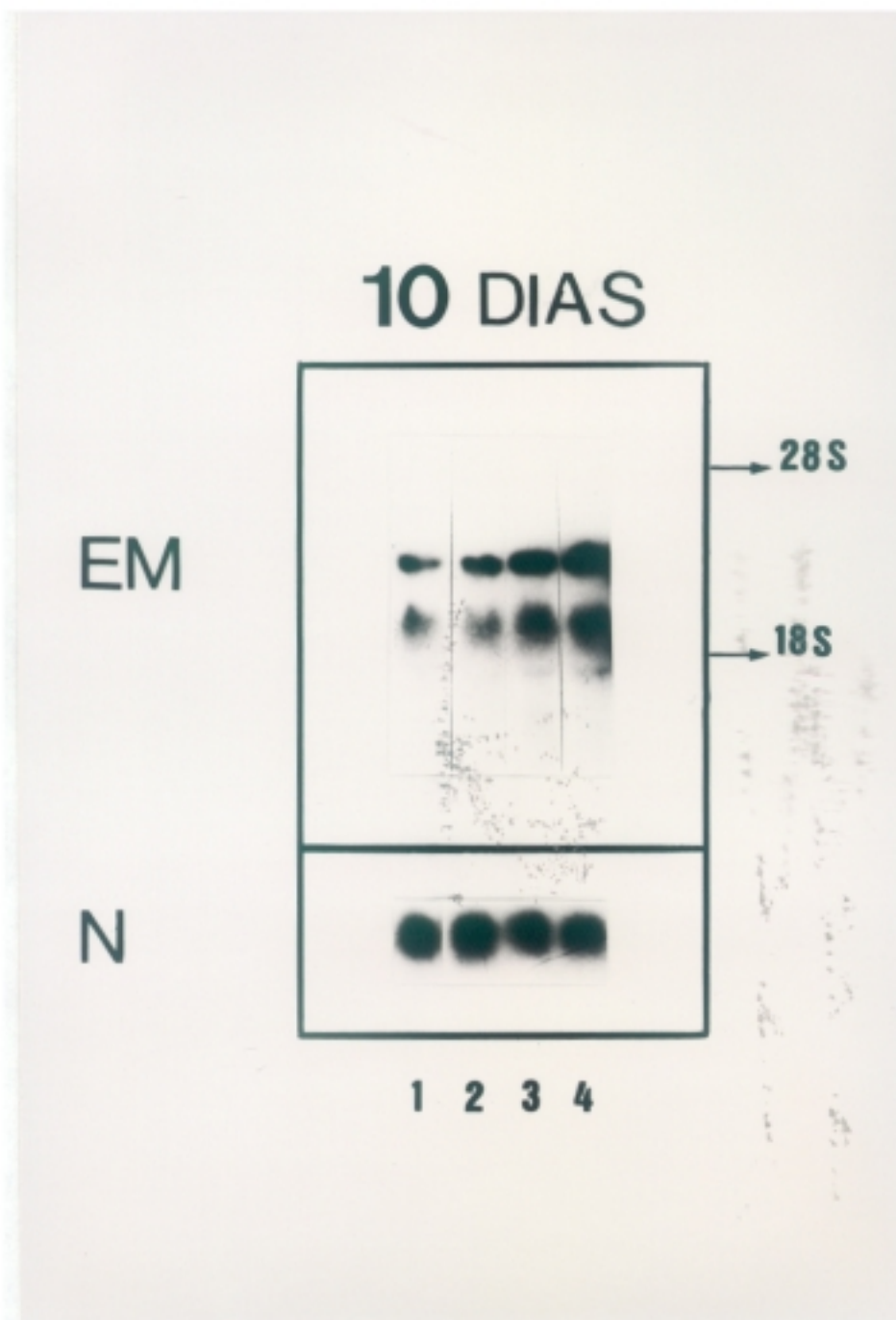
**FIGURA 17 Análisis de Northern-Blot de la enzima málica y la G6PD de adipocitos marrones fetales cultivados durante 10 días en condiciones no proliferativas**

El RNA total (30  $\mu$ g) se ha sometido a electroforesis en geles de agarosa 1%/formaldehído 2.2 M, transferido a filtros de nitrocelulosa e hibridado con los cDNAs previamente marcados de la enzima málica (panel 1), G6PD (panel 2) y  $\beta$ -actina como normalizador (panel 3). Los RNAs procedían de adipocitos marrones cultivados durante 10 días como se indica en la sección de Material y Métodos en ausencia de hormonas (1), con  $T_3$  (10  $\mu$ M) (2), insulina (40 nM) (3), insulina+ $T_3$  (4), insulina +  $T_3$ +noradrenalina (10  $\mu$ M). A la derecha de la figura se muestran las posiciones de los rRNAs 28S y 18S. Se muestra un experimento representativo.



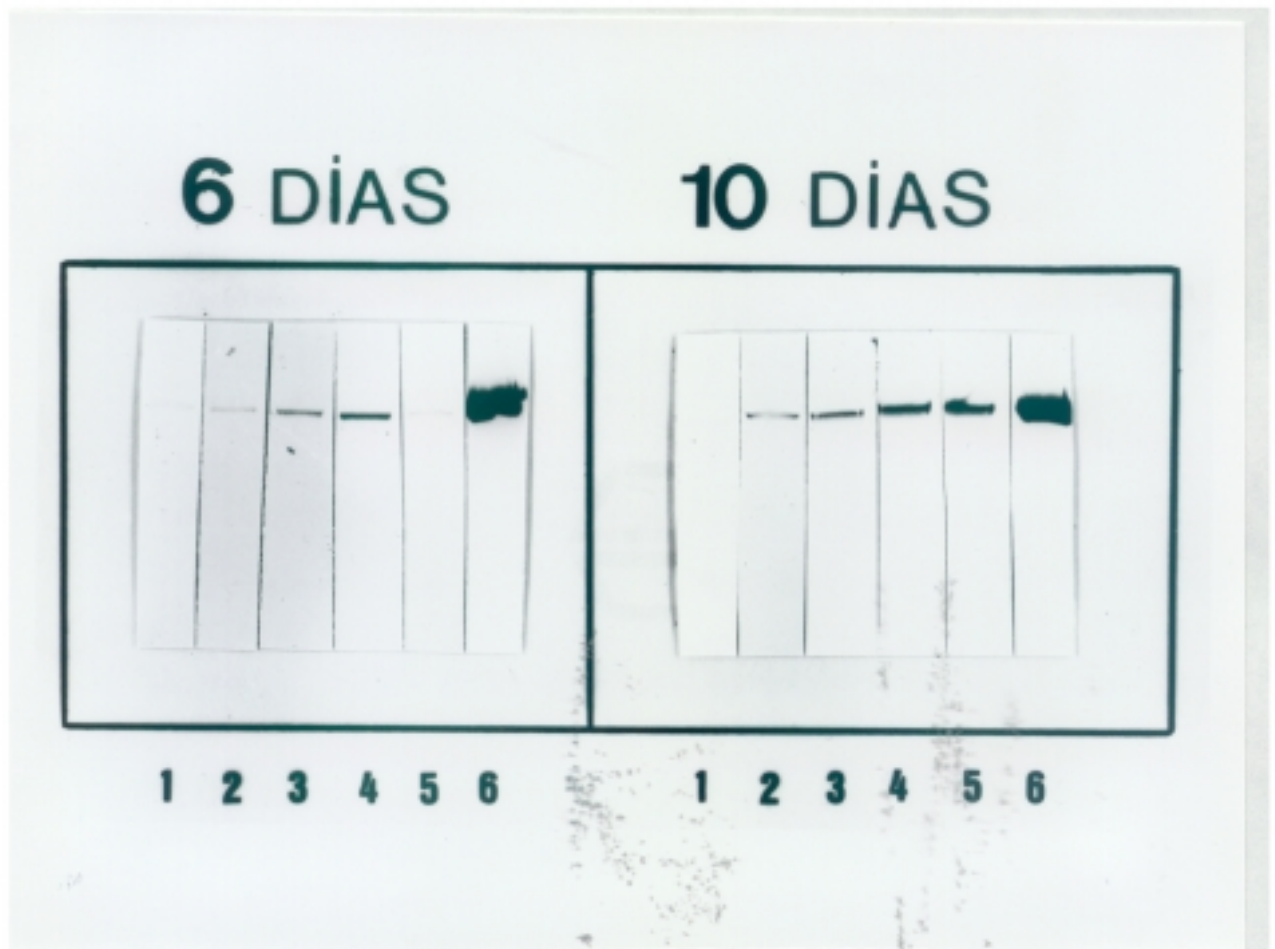
**FIGURA 18 Dosis-respuesta de la inducción de los mRNAs de la enzima málica por T<sub>3</sub>**

El RNA total (30  $\mu$ g) se ha sometido a electroforesis en geles de agarosa 1% / formaldehído 2.2 M, transferido a filtros de nitrocelulosa e hibridado con los cDNAs previamente marcados de la enzima málica (panel 1) y  $\beta$ -actina (panel 2) como normalizador. Los RNAs procedían de adipocitos marrones fetales cultivados durante 6 días en ausencia de hormonas (1), con T<sub>3</sub> (10 nM) (2), T<sub>3</sub> (1  $\mu$ M) (3) y T<sub>3</sub> (10  $\mu$ M) (4). Se muestra un experimento representativo.



**FIGURA 19 Análisis por Western-Blot de la enzima málica de adipocitos marrones cultivados durante 6 y 10 días en condiciones no proliferativas**

Las proteínas citosólicas (23  $\mu\text{g}$ ) se han sometido a electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS, transferido a filtros de nitrocelulosa y sometido a inmunodetección con el anticuerpo anti-enzima málica. Las proteínas procedían de adipocitos marrones fetales cultivados durante 6 y 10 días en ausencia de hormonas (1), con  $\text{T}_3$  (10  $\mu\text{M}$ ) (2), insulina (40 nM) (3), insulina+ $\text{T}_3$  (4), insulina+ $\text{T}_3$ +noradrenalina (10  $\mu\text{M}$ ) (5) y enzima málica purificada (250 ng) (6). Se muestra un experimento representativo.



**TABLA 6 Efectos hormonales sobre la actividad específica de la enzima málica en cultivos primarios de adipocitos marrones fetales de rata en condiciones no proliferativas**

Los adipocitos marrones se han cultivado en MEM suplementado con el 2% de suero fetal bovino en presencia de insulina (40 nM), T<sub>3</sub> (10 μM) y noradrenalina (10 μM) como se indica en la tabla. La actividad enzimática específica ha determinado tras 6 y 10 días de cultivo y se expresa en nmoles/min/ mg de proteína. Los resultados obtenidos son las Medias ± S.E.M (n= 8-10). La actividad enzima málica en células recién aisladas era 18.3±1.4.

	6 DIAS	10 DIAS
Control	15.3 ± 2.4	20.5 ± 2.8
T <sub>3</sub>	23.3 ± 2.9	43.5 ± 5.3
Insulina	63.6 ± 7.4	122.9 ± 12.0
Insulina+T <sub>3</sub>	85.2 ± 4.9	177.2 ± 5.1
Insulina+T <sub>3</sub> + noradrenalina	27.2 ± 1.2	172.0 ± 4.2

**TABLA 7 Efectos hormonales sobre la actividad específica, cantidad de proteína y concentración de los mRNAs de la enzima málica en cultivos primarios de adipocitos marrones fetales de rata en condiciones no proliferativas**

Los adipocitos marrones se han cultivado en las condiciones descritas en la tabla 6. Los resultados de actividad enzimática específica (tabla 6) se expresan en número de veces con respecto de los controles. La cantidad de proteína y concentración de los mRNAs se han cuantificado mediante el análisis densitométrico de las figuras 16, 17 y 19 expresándose los resultados en número de veces con respecto de los controles.

Días de cultivo	$A_s$		(proteína)		(mRNA)	
	6	10	6	10	6	10
Control	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
$T_3$	1.5	2.1	1.5	2.5	1.8	3.7
Insulina	4.2	6.0	3.0	6.3	3.5	6.9
Insulina+ $T_3$	5.6	8.6	6.2	10.6	4.6	7.9
Insulina+ $T_3$ + noradrenalina	1.8	8.8	1.1	11.0	4.0	7.6

Asímismo, otras enzimas lipogénicas como la ácido graso sintasa y también el propio flujo lipogénico se inducen por  $T_3$  en cultivos primarios de adipocitos marrones fetales de rata (Lorenzo y col., 1988).

La presencia de insulina (40 nM) durante 6 y 10 días de cultivo aumentó los niveles de los mRNAs de la enzima málica 3.5 y 7 veces respectivamente en comparación con los controles cultivados en ausencia de la hormona (figuras 16 y 17, tabla 7). Estos efectos fueron paralelos a los aumentos en la cantidad de proteína determinados mediante el análisis densitométrico de la figura 19 (tabla 7). Asímismo, la actividad enzimática específica aumentó 4.2 y 6 veces tras 6 y 10 días de cultivo respectivamente en comparación con los controles (tablas 6 y 7). Nuestros resultados revelan que la enzima málica de los adipocitos marrones fetales en cultivo responde altamente a insulina estando regulada su expresión a nivel transcripcional tal como se ha descrito en hígado de rata (Katsurada y col., 1988). *La presencia prolongada de insulina en el medio de cultivo durante 10 días produce la máxima inducción de la enzima málica en comparación con los cultivos a 6 días, lo que parece indicar que a lo largo del tiempo de cultivo de los adipocitos marrones fetales aumenta el requerimiento de NADPH necesario para la síntesis lipídica de estas células.*

La presencia conjunta de insulina (40 nM) y  $T_3$  (10 $\mu$ M) en el medio de cultivo durante 6 días producía aumentos de 4.6 veces en los niveles de los mRNAs del enzima (figura 16, tabla 7), 6.2 veces en la cantidad de proteína (figura 19, tabla 7) y 5.6 veces en la actividad enzimática específica (tablas 6 y 7) en comparación con los controles cultivados en ausencia de hormonas. Estos efectos fueron significativamente mayores que los observados individualmente con insulina y  $T_3$  y muestran un efecto aditivo de ambas hormonas a 6 días de cultivo, momento en el cual se está produciendo la maduración del sistema a  $T_3$ . Este efecto aditivo entre insulina y  $T_3$  se observa también tras 10 días de cultivo en presencia de ambas hormonas donde se producen los máximos aumentos de 8-10 veces en los niveles de los mRNAs de la enzima málica ( figura 17, tabla 7), 10.6 veces en la cantidad de proteína (figura 19, tabla 7) y 8.6 veces en la actividad enzimática específica (tablas 6 y 7). Estos resultados indican que ambas hormonas regulan la expresión genética de la enzima málica por distintos mecanismos y sugieren la

existencia de diferentes elementos reguladores en el gen de la enzima málica tal como se ha descrito recientemente en el hígado (Petty y col., 1990).

La presencia de noradrenalina ( $10\mu\text{M}$ ) en el medio de cultivo conjuntamente con insulina y  $T_3$  durante 6 días no modificó significativamente los niveles de los mRNAs de la enzima málica con respecto de los niveles observados en presencia de insulina y  $T_3$  (figura 16, tabla 7). Sin embargo, la noradrenalina impidió el efecto estimulador de insulina y  $T_3$  sobre la cantidad de proteína y actividad enzimática específica a 6 días de cultivo (figura 19, tablas 6 y 7). De esta manera, se podría decir que el efecto inhibitorio de la noradrenalina sobre la inducción de la enzima málica en presencia de insulina y  $T_3$  parece regularse a nivel post-transcripcional y podría explicarse como consecuencia del aumento de la velocidad de degradación de la enzima málica descrito por Lorenzo y col. (1989) en adipocitos marrones fetales en cultivo. Sin embargo, la noradrenalina conjuntamente con insulina y  $T_3$  durante 10 días en el medio de cultivo no modifica los niveles de los mRNAs de la enzima málica, cantidad de proteína y actividad enzimática específica (figuras 17 y 19, tablas 6 y 7). Estos resultados podrían indicar una pérdida de la respuesta  $\beta$ -adrenérgica de los adipocitos marrones como consecuencia de la presencia prolongada de noradrenalina en el medio de cultivo y concuerdan con la pérdida del efecto del isoproterenol sobre la estimulación de la proteína desacoplante descrita en cultivos primarios de adipocitos marrones fetales de rata (Porras y col., 1990)

#### **4.2.2 Regulación hormonal de la expresión genética de la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa en cultivos primarios de adipocitos marrones fetales de rata en condiciones no proliferativas**

El estudio de la regulación hormonal de la expresión genética de la G6PD se ha realizado en las mismas condiciones experimentales que en el caso de la enzima málica. Asimismo, se han estudiado los efectos de la insulina,  $T_3$  y noradrenalina sobre los niveles del mRNA de la G6PD mediante la técnica de Northern-Blot e hibridación con el cDNA tal como se muestra en las figuras 16 y 17, cantidad de proteína mediante inmunodetección con el anticuerpo específico anti-G6PD tal

como se muestra en la figura 20 y actividad enzimática específica como se muestra en la tabla 8.

La presencia de  $T_3$  ( $10 \mu\text{M}$ ) en el medio de cultivo durante 6 y 10 días no modificó los niveles del mRNA de la G6PD, cantidad de proteína y actividad enzimática específica en comparación con los controles cultivados en ausencia de la hormona ( figuras 16, 17 y 20, tablas 8 y 9) Estos resultados muestran una diferencia importante entre la regulación por  $T_3$  de la enzima málica y la G6PD de manera que esta última no es un enzima inducible por  $T_3$  tal como se ha descrito en cultivos primarios de hepatocitos de rata adulta (Nakamura y col., 1982, Yoshimoto y col., 1983a).

Cuando los adipocitos marrones eran cultivados en presencia de insulina ( $40 \text{ nM}$ ) en el medio de cultivo durante 6 y 10 días se observaron aumentos en los niveles del mRNA de la G6PD de 1.8 y 2.5 veces respectivamente con respecto a los controles cultivados en ausencia de la hormona (figuras 16 y 17, tabla 9). Estos resultados indican una regulación de la expresión genética de la G6PD a nivel transcripcional. Tanto la cantidad de proteína como la actividad enzimática específica aumentaron 2.2 y 1.6 veces respectivamente tras 6 días de cultivo con respecto a los controles (fig 20, tablas 8 y 9) no encontrándose cambios en la actividad enzimática específica tras 10 días de cultivo (tabla 9). Sin embargo, la inducción de la G6PD por insulina es menor que la observada en la enzima málica tanto a 6 como a 10 días de cultivo (figuras 16, 17 y 20, tablas 8 y 9). De esta manera se podría decir que la G6PD no parece ser el donador principal de NADPH en adipocitos marrones, cuyo requerimiento aumenta progresivamente debido a la lipogénesis inducida por la insulina a lo largo del tiempo de cultivo.

La presencia conjunta de insulina y  $T_3$  durante 6 días en el medio de cultivo aumenta ligeramente tanto los niveles del mRNA de la G6PD como la cantidad de proteína en comparación con los niveles observados en presencia de insulina sola (figuras 16, y 20, tabla 9). Sin embargo, no se observan diferencias en la actividad enzimática específica (tablas 8 y 9). Tras 10 días de cultivo en presencia de ambas hormonas la inducción del mRNA de la G6PD es significativamente mayor que la observada en presencia de insulina sola (figura 17, tabla 9). Como hemos descrito anteriormente, la  $T_3$  no parece tener un efecto directo sobre la expresión genética

**FIGURA 20 Análisis por Western-Blot de la G6PD de adipocitos marrones fetales cultivados durante 6 días en condiciones no proliferativas**

Las proteínas citosólicas (80  $\mu\text{g}$ ) se han precipitado con ácido tricloroacético y sometido a electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS, transferido a filtros de nitrocelulosa y sometido a inmunodetección con el anticuerpo anti-G6PD. Las proteínas procedían de adipocitos marrones fetales cultivados durante 6 días en ausencia de hormonas (1), con  $\text{T}_3$  (10  $\mu\text{M}$ ) (2), insulina (40 nM) (3), insulina+ $\text{T}_3$  (4), insulina +  $\text{T}_3$  + noradrenalina (10  $\mu\text{M}$ ) (5) y G6PD purificada (250 ng) (6). Se muestra un experimento representativo.



**TABLA 8 Efectos hormonales sobre la actividad específica de la G6PD en cultivos primarios de adipocitos marrones fetales de rata en condiciones no proliferativas**

Los adipocitos marrones se han cultivado en MEM suplementado con el 2% de suero fetal bovino en presencia de insulina (40 nM), T<sub>3</sub> (10 μM) y noradrenalina (10 μM) como se indica en la tabla. La actividad enzimática específica se ha determinado tras 6 y 10 días de cultivo y se expresa en nmoles/min/mg de proteína. Los resultados obtenidos son las Medias ± S.E.M. (n= 8-10). La actividad G6PD en células recién aisladas era 60.5 ± 1.9.

	6 DIAS	10 DIAS
Control	52.5 ± 2.7	61.8 ± 3.7
T <sub>3</sub>	48.0 ± 4.3	71.1 ± 1.7
Insulina	82.0 ± 5.6	94.8 ± 3.2
Insulina+T <sub>3</sub>	83.8 ± 7.1	118.0 ± 7.5
Insulina+T <sub>3</sub> + noradrenalina	84.1 ± 9.7	120.0 ± 9.4

**TABLA 9 Efectos hormonales sobre la actividad enzimática, cantidad de proteína y concentración del mRNA de la G6PD en cultivos primarios de adipocitos marrones fetales de rata en condiciones no proliferativas**

Los adipocitos marrones se han cultivado en las condiciones descritas en la tabla 6. Los resultados de actividad enzimática específica (tabla 8) se expresan en número de veces con respecto de los controles. La cantidad de proteína y concentración de mRNA se ha cuantificado mediante análisis densitométrico de las figuras 16, 17 y 20 expresándose los resultados en número de veces con respecto de los controles.

Días de cultivo	A <sub>s</sub>		(proteína)		(mRNA)	
	6	10	6	10	6	10
Control	1.0	1.0	1.0	---	1.0	1.0
T <sub>3</sub>	0.9	1.1	0.7	---	0.8	0.8
Insulina	1.6	1.5	2.2	---	1.8	2.5
Insulina+T <sub>3</sub>	1.6	1.9	2.9	---	2.2	3.5
Insulina+T <sub>3</sub> + noradrenalina	1.6	1.9	3.0	---	2.3	3.4

de la G6PD , con lo cual, estos resultados podrían explicarse como resultado de la estabilización por  $T_3$  de los niveles del mensajero inducidos por la insulina. Además hemos observado la aparición de un segundo mensajero de 3 Kb para la G6PD tras 10 días de cultivo (figura 17, panel 2), probablemente una forma precursora del mensajero, con lo que se refuerza el papel estabilizador de la  $T_3$  sobre la expresión de la G6PD inducida en presencia de insulina.

La noradrenalina ( $10 \mu\text{M}$ ) presente en el medio de cultivo conjuntamente con insulina y  $T_3$  no modificó los niveles del mRNA de la G6PD, cantidad de proteína y actividad enzimática específica en comparación con las células cultivadas con insulina y  $T_3$  tanto a 6 como a 10 días de cultivo (figuras 16, 17 y 20, tablas 8 y 9). Estos resultados contrastan con los descritos anteriormente para la enzima málica pero concuerdan con los descritos para la G6PD en cultivos primarios de hepatocitos de rata adulta donde la noradrenalina y el isoproterenol no modifican la inducción de la G6PD por insulina (Nakamura y col., 1982).

En resumen, nuestros resultados muestran una diferente regulación hormonal de la expresión genética de la enzima málica y la G6PD a 6 y 10 días de cultivo de adipocitos marrones fetales de rata en condiciones no proliferativas. La presencia prolongada de  $T_3$  en el medio de cultivo induce la expresión genética de la enzima málica a nivel transcripcional lo que parece indicar la presencia de elementos reguladores de respuesta a  $T_3$  en el gen de la enzima málica tal como se ha descrito recientemente en el hígado (Petty y col., 1990) . Sin embargo, la G6PD del tejido adiposo marrón no es un enzima inducible por  $T_3$  al igual que se ha descrito en el hígado (Nakamura y col., 1982, Yoshimoto y col., 1983a). La insulina aumenta la expresión genética de ambas enzimas a 6 y 10 días de cultivo a nivel transcripcional. La inducción es máxima sobre la enzima málica tras 10 días de cultivo. Sin embargo, el efecto inductivo de esta hormona sobre la G6PD es menor que sobre la enzima málica, no observándose diferencias entre la inducción a 6 y 10 días de cultivo. Esto parece indicar que es la enzima málica la principal enzima generadora de NADPH para la síntesis lipídica inducida por la continua presencia de insulina en el medio de cultivo, estando la G6PD implicada en otras funciones como el aporte de ribosas 5'fosfato para la síntesis de ácidos nucleicos y supervivencia celular. Asimismo, el efecto aditivo de insulina y  $T_3$  sobre la

inducción de la expresión genética de la enzima málica indica la existencia de distintos elementos reguladores de respuesta hormonal en el gen de esta enzima. En las máximas condiciones de inducción, tras 10 días de cultivo, aparece una segunda isoforma del mensajero de la G6PD de mayor tamaño lo que refuerza el papel estabilizador de la  $T_3$  sobre la expresión genética del enzima. La noradrenalina revierte el efecto estimulador de la insulina y  $T_3$  tanto sobre la actividad enzima málica como sobre la cantidad de proteína, no modificando los niveles del mensajero de esta enzima tras 6 días de cultivo. Estos resultados indican un efecto de la noradrenalina a nivel postraducciona, acelerando la degradación de la proteína enzima málica (Lorenzo y col., 1989) Sin embargo, tras 10 días de cultivo la enzima málica pierde su respuesta adrenérgica en cultivo primario de adipocitos marrones fetales de rata. Finalmente, la expresión de la enzima G6PD no está regulada por la presencia de noradrenalina en el medio de cultivo.

## **V-CONCLUSIONES**

1- Los adipocitos marrones fetales en cultivo constituyen un sistema adecuado para la realización de estudios de proliferación celular. Tanto la síntesis de DNA, como el número de células y contenido en DNA, RNA y proteínas se inducen en presencia del 10% de suero fetal bovino, IGF-I y de la combinación de EGF, bombesina y vasopresina en comparación con las células controles quiescentes.

2- El IGF-I ha resultado ser el principal factor de crecimiento individual en nuestro sistema celular, ya que el EGF requiere la presencia de los péptidos vasopresina y bombesina para ejercer el máximo efecto mitogénico.

3- Tanto el IGF-I, como el 10% de suero fetal y la combinación de EGF, bombesina y vasopresina inducen la actividad específica, cantidad de proteína y concentración de mRNA de la G6PD, por lo que esta enzima tiene un papel como marcador de la proliferación en nuestro sistema celular.

4- Los agentes que elevan los niveles de cAMP intracelulares han resultado ser en nuestro sistema inhibidores de la proliferación celular, ya que la presencia de forskolina revierte el efecto estimulador de la combinación de EGF, bombesina y vasopresina sobre la síntesis de DNA, RNA y proteínas, así como sobre la inducción de la G6PD.

5- Nuestros resultados demuestran una diferente regulación hormonal de la expresión genética de la enzima málica y de la G6PD a los 6 y 10 días de cultivo de los adipocitos marrones fetales de rata en condiciones no proliferativas. La

presencia prolongada de  $T_3$  en el medio de cultivo induce la expresión genética de la enzima málica a nivel transcripcional, lo que parece indicar la presencia de elementos reguladores de respuesta a  $T_3$  en el gen de la enzima málica. Sin embargo, la G6PD del tejido adiposo marrón no es un enzima inducible por  $T_3$ .

6- La insulina aumenta la expresión genética de la enzima málica y de la G6PD a los 6 y 10 días de cultivo, a nivel transcripcional. La inducción de la enzima málica es máxima tras 10 días de cultivo, lo que sugiere que este enzima contribuye fundamentalmente a la síntesis lipídica creciente en los cultivos primarios de adipocitos marrones fetales de rata.

7- La insulina y  $T_3$  ejercen un efecto aditivo sobre la expresión genética de la enzima málica a 6 y 10 días de cultivo, lo que sugiere la existencia de distintos elementos reguladores de respuesta hormonal en el gen de esta enzima. La presencia de  $T_3$  produce una estabilización de los niveles del mRNA de la G6PD inducidos en presencia de insulina, observándose la aparición de una isoforma precursora del mensajero de este enzima tras 10 días de cultivo.

8- La noradrenalina revierte el efecto estimulador de la insulina y  $T_3$  sobre la actividad enzima málica y cantidad de proteína, no modificando los niveles de los mRNAs tras 6 días de cultivo. A los 10 días de cultivo la enzima málica pierde su respuesta adrenérgica. Sin embargo, la expresión genética de la G6PD no está regulada por la presencia de noradrenalina en el medio de cultivo.

## **CONCLUSION FINAL**

Las células primarias fetales de mamíferos han demostrado ser un buen modelo experimental tanto para estudios de proliferación, como de diferenciación celular. Nuestros resultados han dejado bien establecido que los adipocitos marrones fetales de rata presentan esta dualidad de funciones, habiendo sido inducidos a un programa de proliferación e igualmente, previa su quiescencia, reinducidos a un programa de diferenciación que conduce a la amplificación de su perfil de expresión génica en relación con la síntesis lipídica.

## **VI- BIBLIOGRAFIA**

- Back, D.W.; Wilson, S.B., Morris, S.M.Jr. and Goodridge A.G. (1986). "Hormonal regulation of lipogenic enzymes in chick embryo hepatocytes in culture." *J. Cell Biol.* 261, 12555-12561

- Ballesteros, M.; Scott, C.D. and Baxter, R.C. (1990). "Developmental regulation of IGF-II/manose 6-phosphate receptor m-RNA in the rat." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 172, 775-779

- Barnard, J.A.; Lyons, R.M. and Moses H.L. (1990). "The cell biology of TGF-B." *Biochim. Biophys. Acta* 1032, 79-87

- Beguinot, F.; Smith, R.S.; Kahn, C.R.; Maron, R.; Moses, A.C. and While, M.F. (1988). "Phosphorilation of insulin-like growth factor I receptor by insulin receptor tyrosine kinase in intact cultured skeletal muscle cells." *Biochemistry* 27, 3222-3228

- Benito, M.; Lorenzo, M. and Medina, J.M. (1982). "Relationship between lipogenesis and glycogen synthesis in maternal and foetal tissues during late gestation in the rat." *Biochem. J.* 204,865-868

- Benito, M; Lorenzo, M and Caldés, T. (1984) . "Regulation of lipogenesis and non-saponificable lipid synthesis in vivo at birth after prolonged starvation in the newborn rat." *Biochem. J.* 224, 823-828

- Berridge, M.J.; Heslop, J.P.; Irvine, R.F. and Brown, K.D. (1984). "Inositol trisphosphate formation and calcium mobilization in Swiss 3T3 cells in response to platelet-derived growth factor." *Biochem. J.* 222, 195-201

- Blakeley, D.M.; Corps, A.N. and Brown K.D. (1989). "Bombesin and platelet-derived growth factor stimulate formation of inositol phosphates and Ca<sup>2+</sup> mobilization in Swiss 3T3 by different mechanisms." *Biochem. J.* 258, 177-185

- 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
  
- Braulke, T.; Tippmer, S.; Neher, E. and Von Figura K. (1989). "Regulation of the mannose 6-phosphate/IGFII receptor expression at the cell surface by mannose 6-phosphate, insulin like growth factors and epidermal growth factor". *EMBO J.* 8, 681-686
  
- Brown, K.D. and Littlewood, C.S. (1989). "Endothelin stimulates DNA synthesis in Swiss 3T3 cells." *Biochem. J.* 263, 977-980
  
- Buchkovich, K.; Duffy, L.A. and Harlow, E. (1989). "The retinoblastoma protein is phosphorylated during specific phases of the cell cycle". *Cell* 58, 1097-1105
  
- Carpenter, G. and Cohen, S. (1979). "Epidermal growth factor." *Ann. Rev. Biochem.* 48, 193-216
  
- Carpenter, G and Cohen, S. (1990). "Epidermal growth factor." *J. Biol. Chem.* 265, 7709-7712
  
- Cattaneo, M.G. and Vicentini, L.M. (1989). "Differential mechanisms of inositol phosphate generation at the receptors for bombesin and platelet-derived growth factor." *Biochem. J.* 262, 665-668
  
- Chauser, J. (1972) en "Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology." (Work, T. and Work, E. eds) pp 423-465. Elsevier, Amsterdam, New York.
  
- Cheifetz, S.; Hernandez, H.; Laiho, M.; Dijke, P.; Iwata, K.K. and Massagué J. (1990). "Distinct Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$  ) receptor subsets as determinants of cellular responsiveness to three TGF- $\beta$  isoforms." *J. Biol. Chem.* 265, 20533-20538

- Chomczynski, K. and Sacchi, N. (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." *Anal. Biochem.* 162, 156-159
  
- Cirillo, D.M.; Gaudino, G.; Naldini, L. and Comoglio, P.M. (1986). "Receptor for bombesin with associated tyrosine kinase activity." *Mol. Cell Biol.* 6, 4641-4649
  
- Clemons, D.R.; Van Wyk, J.J. and Pledger, W.J. (1980). "Sequential addition of platelet factor and plasma to BALB/c3T3 fibroblasts cultures stimulates somatomedin-c binding early in the cell cycle." *Proc. Natl. Academ. Sci.* 77, 6644-6648
  
- Coffey, A.; Fabregat, I.; Sinnett-Smith, J. and Rozengurt, E. (1990). "Solubilization of the bombesin receptor from Swiss 3T3 cells membranes." *FEBS lett.* 263, 80-84
  
- De Larco, J.E. and Todaro, G.J. (1978). "Growth factors from murine sarcoma virus-transformed cells". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 75, 4001-4005
  
- Derynck, R. (1988). "Transforming growth factor  $\alpha$ " *Cell* 54, 593-595
  
- Dozin, B., Magnuson, M.A and Nikodem, V.M. (1985). "Tissue specific regulation of two functional malic enzyme m-RNAs by Triiodothyronine." *Biochemistry* 24, 5581-5586
  
- Dozin, B.; Rall, J.E. and Nikodem, V.M. (1986a). "Tissue specific control of rat malic enzyme activity and messenger m-RNA levels by a high carbohydrate diet." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 83, 4705-4709
  
- Dozin, B.; Magnuson, M.A. and Nikodem, V.M. (1986b). "Thyroid hormone regulation of malic enzyme synthesis." *J. Biol. Chem.* 261, 10290-10292
  
- Draetta, G. (1990). "Cell cycle control in eukaryotes: molecular mechanisms of cdc2 activation". *TIBS* 15 , 378-383

- Escribano, J. and Rozengurt, E. (1988). "Cyclic AMP increasing agents rapidly stimulate vimentin phosphorylation in quiescent cultures of Swiss 3T3." *J. Cell Physiol.* 137, 223-234
  
- Fabregat, I.; Lorenzo, M. and Benito, M. (1989). "Precocious induction of malic enzyme by nutritional and hormonal factors in rat foetal hepatocyte primary cultures." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 161, 1028-1034
  
- Fabregat, I. and Rozengurt, E. (1990). " ( D-Arg<sup>1</sup>, D-Phe<sup>5</sup>, D-Trp<sup>7,9</sup>, Leu<sup>11</sup>) substance P, a neuropeptide antagonist, blocks binding, Ca<sup>2+</sup>-mobilizing and mitogenic effects of endothelin and vasoactive intestinal contractor in mouse 3T3 cells." *J. Cell Physiol.* 145, 88-94
  
- Folkman, J. and Klagsbrun, M. (1987). " Angiogenic factors". *Science* 235, 442-447
  
- Freeman, R.S. and Donoghue, D.J. (1991). " Protein kinases and protooncogenes: Biochemical regulators of the eukaryotic cell cycle". *Biochemistry* 30, 2293-2302
  
- Fritz, R.S.; Stumpo, D.J. and Kletzien, R.F. (1986). "Glucose 6-phosphate dehydrogenase mRNA sequence abundance in primary cultures of rat hepatocytes". *Biochem. J.* 237, 617-619
  
- Fritz, R.S. and Kletzien, R.F. (1987) "Regulation of glucose 6-phosphate dehydrogenase by diet and thyroid hormone." *Mol. Cell. Endoc.* 51, 13-17
  
- Gèloën, A.; Collet, A.J.; Guay, G. and Bukowiecki, L.J. (1988). "β-Adrenergic stimulation of brown adipocyte proliferation." *Am. J. Physiol.* 254 (Cell Physiol.) c:175-c:182
  
- Giralt, M.; Martín, I.; Iglesias, R.; Viñas, O.; Villarroya, F. and Mampel, T. (1990). "Development of the uncoupling protein in the rat brown adipose tissue during the perinatal period." *Eur. J. Biochem.* 193, 297-302

- Girardier, L. (1983). "Brown fat: and energy dissipating tissue." en "Mammalian thermogenesis" (Ed. Girardier L. and Stock M.) pp 50-98. Chapman y Hall. London
  
- Glotzer, M.; Murray, A.W. and Kirschner, M.W. (1991). "Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway". *Nature* 349, 132-138
  
- Gospodarowicz, D.; Neufeld, G. and Schweigerer, L. (1986). "Fibroblast growth factor". *Mol. Cell. Endocrinol.* 46, 187-204
  
- Hahn, P and Hassalani, S. (1982). "The effect of 3,5,3-Triiodothyronine on Phosphoenolpyruvate carboxykinase, fatty acid synthetase and malic enzyme activity of liver and brown fat of fetal and neonatal rats." *Biol. Neonate* 41, 1-7
  
- Hannink, M. and Donoghue, D. (1989). "Structure and function of platelet-derived growth factor and related peptides." *Biochim. Biophys. Acta* 989, 1-10
  
- Hart, C.E.; Forstrom, J.W.; Kelly, J.D.; Seifert, R.A.; Smith, R.A.; Ross, R.; Murray, M.J. and Bowen-Pope, D.F. (1988). "Two classes of PDGF receptor recognize different isoforms of PDGF". *Science* 240, 1529-1531
  
- Heldin, C-H.; Bäckström, G.; Östman, A.; Hammacher, A.; Rönstrand, L.; Rubin, K.; Nistèr, M. and Westermark, B. (1988). " Binding of different dimeric forms of PDGF to human fibroblasts: evidence for two separate receptor types". *EMBO J.* 7, 1387-1392
  
- Heldin, C-H and Westermark, B. (1989). "Growth factors as transforming proteins." *Eur. J. Biochem.* 184, 487-496
  
- Henderson, G.I.; Baskin, G.S.; Horbach, J.; Porter, P. and Schenker, S. (1989). "Arrest of EGF-dependent growth in fetal hepatocytes after ethanol exposure." *J. Clin. Invest.* 84, 1287-1294

- Hoffmann, B.; Piasecki, A. and Paul, D. (1989). "Proliferation of fetal rat hepatocytes in response to growth factors and hormones in primary culture." *J. Cell Physiol.* 139, 654-662
  
- Howe, P.H. and Leof, E.B. (1989). "Transforming growth factor  $\beta$ 1 treatment of AKR-2B cells is coupled through a pertussis toxin-sensitive G proteins." *Biochem. J.* 261, 879-886
  
- Humbel, R.E. (1990). "Insulin-like growth factors I and II." *Eur. J. Biochem.* 190, 445-462
  
- Hunter, T.; Ling, N. and Cooper, J.A. (1984). "Protein kinase C phosphorylation of the EGF receptor at a threonine residue close to the cytoplasmic surface of the plasma membrane." *Nature* 311, 480-483
  
- Isacke, C.M.; Meisenhelder, J.; Brown, K.D.; Gould, S.J. and Hunter, T. (1986). "Early phosphorylation events following the treatment of Swiss 3T3 cells with bombesin and the mammalian bombesin-related peptide, gastrin-releasing peptide." *EMBO J.* 5, 2889-2898
  
- Jaye, M.; Lyall, R.M.; Mudd, R.; Schlessinger, J. and Sarver, N. (1988). "Expression of acidic fibroblast growth factor cDNA confers growth advantage and tumorigenesis to Swiss 3T3 cells". *EMBO J.* 7, 963-969
  
- Kadowaki, T.; Koyasu, S.; Nishida, E.; Sakai, H.; Takaku, F.; Yahara, I. and Kasuga, M. (1986). "Insulin-like growth factors, insulin, and epidermal growth factor cause rapid cytoskeletal reorganization in KB cells." *J. Biol. Chem.* 34, 16141-16147
  
- Kasuga, M.; Van Obberghen, E.; Nissley, S.P. and Rechler, M.M. (1981). "Demonstration of two subtypes of insulin-like growth factor receptors by affinity cross-linking." *J. Biol. Chem.* 256, 5305-5308

- Katsurada, A.; Iritani, N.; Fukuda, H.; Noguchi, T. and Tanaka, T. (1988). "Transcriptional and posttranscriptional regulation of malic enzyme synthesis by insulin and triiodothyronine". *Biochim. Biophys. Acta* 950, 113-117
  
- Kletzien, R.F.; Prostko, R.; Stumpo, D.J.; Mc Clung, J.K. and Dreher, K.L. (1985). "Molecular cloning of DNA sequences complementary to rat liver glucose 6-phosphate dehydrogenase m-RNA." *J. Biol. Chem.* 260, 5621-5624
  
- Koistien, R.; Itkonen, O.; Selenius, P. and Seppälä, M. (1990). "Insulin-like growth factor-binding protein-I inhibits binding of IGF-I on fetal skin fibroblasts but stimulates their DNA synthesis." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 173, 408-415
  
- Kramer, I.M.; Koornneef, I.; Vries, C.; de Groot, R.P.; de Laat, S.W.; Eijnden-van Raaij, A.J.M. and Kruijer, W. (1991). " Phosphorylation of nuclear protein is an early event in TGF- $\beta$ 1 action". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 175, 816-822
  
- Labarca, C. y Paigen, K. (1980). "A simple, rapid and sensitive DNA assay procedure." *Anal. Biochem.* 102, 1028-1034
  
- Lemarchand-Berau, T.; Von Overbeck, K. and Rognoni, J.B. (1987). "The modulation by 3,5,3'-Triiodothyronine of pituitary T<sub>3</sub> nuclear receptor in hypothyroid rats is inhibited by cicloheximide". *Endocrinology* 121, 677-683
  
- Leof, E.B.; Proper, J.A.; Goustin, A.S.; Shipley, G.D.; Dicarletto, P.E. and Moses, H.L. (1986). "Induction of c-sis and activity similar to platelet-derived growth factor by transforming growth factor B. A proposed model for indirect mitogenesis involving autocrine activity." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 83, 2453-2457
  
- Liu, L.; Brinkman, A.; Blat, C. and Harel, L. (1991). "IGFBP-1, an insulin like growth factor binding protein, is a cell growth inhibitor". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 174, 673-679

- Lopez-Rivas, A. and Rozengurt, E. (1984). "Vasopressin rapidly stimulate  $Ca^{2+}$  from an intracellular pool in quiescent Swiss 3T3 cells." *Am. J. Physiol.* 247, c:156-c:162
  
- Lorenzo, M.; Roncero, C.; Fabregat, I. and Benito, M. (1988). "Hormonal regulation of foetal brown adipocytes 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
  
- Lyons, R.M. and Moses, H.L. (1990). "Transforming growth factors and the regulation of cell proliferation." *Eur. J. Biochem.* 187, 467-473
  
- Magnaldo, I.; Pouyssègur, J. and Paris, S. (1989). "Cyclic AMP inhibits mitogen-induced DNA synthesis in hamster fibroblasts, regardless of the signalling pathway involved." *FEBS lett.* 245, 65-69
  
- Maizel, J.V.Jr. (1971). " Polyacrylamide gel electrophoresis of viral proteins". *Methods. Virol.* 5, 180-244
  
- Martinez Valverde (1988) Memoria de Licenciatura. Departamento de Bioquímica. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense
  
- Massagué, J. (1983). "Epidermal Growth Factor-like Transforming Growth Factor." *J. Biol. Chem.* 258, 13614-13620
  
- Meisenhelder, J.; Suh, P-G.; Rhee, S.G. and Hunter, T. (1989). "Phospholipase C- is a substrate for the PDGF and EGF receptor protein-tyrosine kinases in vivo and in vitro." *Cell*, 57, 1109-1122
  
- Mendoza, S.A.; Wigglesworth, N.M.; Pohjanpelto, P. and Rozengurt, E. (1980).

"Na<sup>+</sup> entry and Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> pump activity in murine, hamster and human cells. Effect of monensin, serum platelet extract, and viral transformation." J. Cell. Physiol. 103, 17-27

- Mendoza, S.A.; Lopez-Rivas, A.; Sinnet-Smith, J. and Rozengurt, E. (1986). "Phorbol esters and diacylglycerol inhibit vasopressin-induced increases in cytoplasmic free Ca<sup>2+</sup> and <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup> efflux in Swiss 3T3 cells." Exp. Cell. Res 164, 536-545

- Miksicek, R.J. and Towle, H.C. (1982). "Changes in the rates of synthesis and messenger RNA levels of hepatic glucose-6-phosphate and 6 phosphogluconate dehydrogenases following induction by diet or thyroid hormone." J. Biol. Chem. 19, 11829-11835

- Millar, J.B.A. and Rozengurt, E. (1988). "Bombesin enhancement the c-AMP accumulation in Swiss 3T3 cells: evidence of a dual mechanism of action." J. Cell. Physiol. 137, 214-222

- Millar, J.B. and Rozengurt, E. (1989). "Heterologous desensitization of bombesin-induced mitogenesis by prolonged exposure to vasopressin: a post receptor signal transduction block." Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 86, 3204-3208

- Millar, J.B. and Rozengurt, E. (1990). "Chronic desensitization to bombesin by progressive down-regulation of bombesin receptors in Swiss 3T3 cells". J. Biol. Chem. 265, 12052-12058

- Molloy, C.J.; Bottaro, D.P.; Fleming, T.P.; Marshall, M.S.; Gibbs, J.B. and Aaronson, S.A. (1990). "PDGF induction of tyrosine phosphorylation of GTPase activating protein." Nature, 342, 711-714

- 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. U.S.A 78, 5717-5721

- Nakamura T.; Yoshimoto, K.; Aoyama, K. and Ichiara, A. (1982) "Hormonal regulation of glucose 6-phosphate dehydrogenase and lipogenesis in primary cultures of rat hepatocytes" J. Biochem. 91, 681-693

- Nèchad, M.; Kuusela, P.; Carneheim, C.; Björntorp, P.; Nedergaard, J. and Cannon, B. (1983). "Developmen of brown fat cells in monolayer culture I." Exp. Cell Res. 149, 105-117

- Nèchad, M. (1983). "Development of brown fat cells in monolayer culture II." Exp. Cell Res. 149, 119-127

- 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.G., eds) pp 152-213. Ed. Edward Arnold, London.

- Nicholls, D.G. and Locke, R.M. (1984). "Thermogenic mechanisms in brown fat." Physiol. Rev. 64, 1-64

- Nielsen, C.H. (1989). "EGF influences the developmental clock regulating maturation of the fetal lung fibroblasts." Biochim. Biophys. Acta 1021, 201-206

- Nistèr, M.; Hammacher, A.; Mellström, K.; Siegbahn, A.; Rönstrand, L.; Westermark, B. and Heldin, C-H. (1988). "A glioma-derived PDGF A chain homodimer has different functional activities from a PDGF AB heterodimer purified from human platelets." Cell 52, 791-799

- Ochoa, S.; Mehler, A.H. and Kornberg, A. (1948). "Biosynthesis of dicarboxylic acids by dioxide fixation." J. Biol. Chem. 174, 979-1000

- Ouchterlony, O. (1953). "Antigen-antibody reactions in gels". Acta Pathol. Microbiol. Scand. 32, 231-235

- Petty, K.J.; Morioka, H.; Mitsuhashi, T. and Nikodem, V.M. (1989). "Thyroid hormone regulation of transcription factors involved in malic enzyme gene expression." J. Biol. Chem. 264, 11483-11490

- Petty, K.J.; Desvergne, B.; Mitsuhashi, T. and Nikodem, V.M. (1990). "Identification of a thyroid hormone response element in the malic enzyme gene." J. Biol. Chem. 265, 7395-7400

- Pike, L.J. and Eakes, A.T. (1987). "Epidermal growth factor stimulates the production of phosphatidylinositol monophosphate and the breakdown of polyphosphoinositides in A431 cells." J. Biol. Chem. 262, 1644-1651

- Pillay, D. and Bailey, E. (1981). "Perinatal lipogenesis in the liver and brown adipose tissue of the rat." Biochem. Soc. Trans. 9, 393

- Pillay, D. and Bailey, E. (1982a). "Lipogenesis at the suckling-weaning transition in liver and brown adipose tissue of the rat." Biochim. Biophys. Acta 713, 663-669

- Pillay, D. and Bailey, E. (1982b). "Perinatal lipogenesis in the liver and brown adipose tissue of the rat." Int. J. Biochem. 14, 511-517

- Pillay, D. and Bailey, E. (1983). "Effects of insulin and maternal diabetes on fetal lipogenesis in the rat." Enzyme 29, 126-130

- Porras, A.; Fernandez, M. and Benito, M. (1989). "Adrenergic regulation of the uncoupling protein expression in foetal brown adipocytes in primary culture." Biochem. Biophys. Res. Commun. 163, 541-547

- Porras, A.; Peñas, M.; Fernandez, M. and Benito, M. (1990a). "Development of the uncoupling protein in the rat brown-adipose tissue during the perinatal period." *Eur. J. Biochem.* 187, 671-675

- Porras, A.; Peñas, M.; Fernandez, M. and Benito, M. (1990b). "Characterization of a system to study the uncoupling protein expression in brown adipocytes primary cultures". en "Endocrine and Biochemical Development of the Fetus and Neonate" (Cuezva, J.M. ed.) Plenum Press, New York.

- Prostko, C.R.; Fritz, R.S. and Kletzien, R.F. (1989). "Nutritional regulation of hepatic glucose 6-phosphate dehydrogenase." *Biochem. J.* 258, 295-299

- Randazzo, P.A. and Jarett, L. (1990). "Characterization of the growth of murine fibroblasts that express human insulin receptors." *Exp. Cell Res.* 190, 31-39

- Rehnmark S. and Nedergaard, J. (1989). "DNA synthesis in mouse brown adipose tissue is under  $\beta$ -adrenergic control." *Exp. Cell Res.* 180, 574-579

- Rhee, S.G.; Pann-Ghill, S.; Ryu, S-H. and Lee, S.Y. (1989). "Studies of inositol phospholipid-specific phospholipase C." *Science* 244, 546-550

- Ricquier, D.; Bouillaud, F.; Toumelin, P.; Morg, G.; Bazin, R.; Arch, J. and Penicaud, L. (1986). "Expression of the uncoupling protein m-RNA in thermogenic or weakly thermogenic brown adipose tissue." *J. Biol. Chem.* 261, 13905-13910

- Rinderknecht, E. and Humbel, R.E. (1978). "The amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin". *J. Biol. Chem.* 253, 2769-2776

- Rodriguez-Peña, A.; Zachary, I. and Rozengurt, E. (1986). "Rapid dephosphorylation of a M<sub>r</sub> 80000 protein, a specific substrate of protein kinase C upon removal of phorbol esters, bombesin and vasopressin." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 140, 379-385

- Rodriguez-Peña, A. and Rozengurt, E. (1986). "Vasopressin rapidly stimulates protein kinase C in quiescent Swiss 3T3 cells." *J. Cell Physiol.* 129, 124-130
  
- Rogelj, S.; Weinberg, R.A.; Fanning, P. and Klagsbrun, M. (1988). "Basic fibroblast growth factor fused to a signal peptide transforms cells." *Nature*, 331, 173-175
  
- 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, R.; Raines, E.W. and Bowen-Pope, D.F. (1986). "The biology of the platelet-derived growth factor." *Cell* 46, 155-169
  
- Rotwein, P. "Two insulin-like growth factor I messenger RNAs are expressed in human liver." (1986). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 83, 77-81
  
- Rozengurt, E. and Sinnet-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. (1986). "Early signals in the mitogenic response." *Science*, 234, 161-166
  
- Rozengurt, E. (1988). "Bombesin-induction of cell proliferation in Swiss 3T3 cells." *Annals of the New York Academy of Sciences* 547, 277-292
  
- Rowlatt, V.; Mrosovsky, N. and English, A. (1971). "A comparative survey of brown fat in the neck and axilla of mammals at birth." *Biol. Neonate* 17, 53-58
  
- Russell, W.E.; Coffey, R.J.; Ouellette, A.J. and Moses, H-L. (1988). "Type transforming growth factor reversibly inhibits the early proliferative response to partial hepatectomy in the rat." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 85, 5126-5130

- 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.

- Sapag-Hagar, M.; Lagunas, R. and Sols, A. (1973). "Apparent unbalance between the activities of 6-phosphogluconate and glucose 6-phosphate dehydrogenases in rat liver." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 50, 179-185

- Schmidt, W.; Pöll-Jordan, G. and Löffler, G. (1990). "Adipose conversion of 3T3-L1 cells in a serum-free culture system depends on epidermal growth factor, insulin-like growth factor I, corticosterone and cyclic AMP". *J. Biol. Chem.* 265, 15489-15495

- Serrano, J.; Shuldiner, A.R.; Roberts, C.T.; Le Roith D. and De Pablo, F. (1990). "The insulin-like growth factor I (IGF-I) gene is expressed in chick embryos during early organogenesis". *Endocrinology* 127, 1547-1549

- Shreve, D.S. and Levy, H.R. (1977). "On the molecular weight of human glucose 6-phosphate dehydrogenase." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 78, 1369-1375

- Sinnet-Smith, J.; Lehmann, W. and Rozengurt, E. (1990). "Bombesin receptors in membranes from Swiss 3T3 cells." *Biochem. J.* 265, 485-493

- Skala, J.P. (1984). "Mechanism of hormonal regulations in brown adipose tissue of developing rats." *Can. J. Biochem. Cell Biol.* 62, 637-647

- Smith, P.J.; Wise, L.S.; Berkowitz, R.; Wan, C. and Rubin, C.S. (1988). "IGF-I is an essential regulator of the differentiation of 3T3 L1 adipocytes." *J. Biol. Chem.* 263, 9402-9408

- Song, M-K H.; Dozin, B.; Grieco, D.; Rall, J.E. and Nikodem, V.M. (1988). "Transcriptional activation and stabilization of malic enzyme mRNA precursor by thyroid hormone." *J. Biol. Chem.* 263, 17970-17974

- Song, M-K H.; Grieco, D.; Rall, J. and Nikodem, V.M. (1989). "Thyroid hormone mediated transcriptional activation of the rat liver malic enzyme gene by dehydroepiandrosterone." J. Biol. Chem. 264, 18981-18985

- Straus, D.S.; Ooi, G.T.; Orłowski, G.C. and Rechler, D.S. (1991). "Expression of the genes for insulin-like growth factor I (IGF-I), and IGF-binding proteins 1 and 2 in fetal rat under conditions of intrauterine growth retardation caused by maternal fasting". Endocrinology 128, 518-525

- Sugihara, H.; Miyabara, S.; Yonemitsu, N. and Ohta, K. (1983). "Hormonal sensitivity of brown fat cells of fetal rats in monolayer culture." Exp. Clin. Endocrinol. 82, 309-319

- 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

- Takasu, N.; Takasu, M.; Komiya, I.; Nagasawa, Y.; Asawa, T.; Shimizu, Y. and Yamada, T. (1989). "IGF-I stimulates inositol phosphate accumulation, a rise in cytoplasmic free calcium, and proliferation in cultured porcine thyroid cells." J. Biol. Chem. 264, 18485-18488

- Takuwa, N.; Takuwa, Y.; Yanagisawa, M.; Yamashita, K. and Masaki T. (1989). "A novel vasoactive peptide endothelin stimulates mitogenesis through inositol lipid turnover in Swiss 3T3 fibroblasts". J. Biol. Chem. 264, 7856-7861

- Thomas, P. (1980). "Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose" Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 77, 5201-5205

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

- Tsao, M-S; Earp, H.S. and Grisham, J.W. (1986). "The effects of epidermal growth factor and the state of confluence on enzymatic activities of cultured rat liver epithelial cells". *J. Cell Physiology* 126, 167-173

- Ullrich, A.; Coussens, L.; Hayflick, J.S.; Dull, T.J.; Gray, A.; Tam, A.W.; Lee, J.; Yarden, Y.; Libermann, T.A.; Schlessinger, J.; Downward, J.; Mayes, E.L.V.; Whittle, N.; Waterfield, M.D. and Seeburg, P.H. (1984). "Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermal carcinoma cells". *Nature*, 309, 418-424

- Von Figura, K.V. and Hasilik, A. (1986). "Lysosomal enzymes and their receptors". *Ann. Rev. Biochem.* 55, 167-193

- Waheed, A.; Braulke, T.; Junghans, U. and Von Figura, K. (1988). "Manose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor: the two types of ligands bind simultaneously to one receptor at different sites." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 152, 1248-1254

- Woll, P.J. and Rozengurt, E. (1989). "Neuropeptides as growth regulators." *British Medical Bulletin* 45, 492-505

- Yoshimoto, K.; Nakamura, T.; Niimi, S. and Ichiara, A. (1983a) "Hormonal regulation of translatable mRNA of glucose 6-phosphate dehydrogenase in primary cultures of adult rat hepatocytes". *Biochim. Biophys. Acta* 741, 143-149

- Yoshimoto, K.; Nakamura, T. and Ichiara, A. (1983b). "Reciprocal effects of epidermal growth factor and key lipogenic enzymes in primary cultures of adult rat hepatocytes." *J. Biol. Chem.* 258, 12355-12360

- Zachary, I. and Rozengurt, E. (1985). "Modulation of the epidermal growth factor receptor by mitogenic ligands: Effects of bombesin and role of protein kinase C". *Cancer Surv.* 4, 729-765

- Zachary, I. and Rozengurt, E. (1987). "Identification of a receptor for peptides of the bombesin family in Swiss 3T3 cells by affinity cross-linking." J. Biol. Chem. 262, 3947-3950.

## FE DE ERRATAS

En la página de los objetivos de la Tesis Doctoral, línea 9, donde dice "el efecto de las hormonas", debe decir "el efecto que las hormonas".

Página 15, líneas 22-23, donde dice "molécula en este proceso", debe decir "molécula mediadora de este proceso".

Página 18, línea 32, donde dice "expuesta" debe decir "expuestas".

Página 30, línea 11, donde dice "Lorenzo y col. (1982)", debe decir "Benito y col.(1982)".

Página 41, línea 24, donde dice " -globulina", debe decir "  $\gamma$ -globulina".

Página 44, línea 28, donde dice "1-1.5 x10<sup>6</sup> células por placa de cultivo", debe decir "2 x10<sup>5</sup> células por placa de cultivo".

Página 63, línea 3, donde dice "15 g de DNA", debe decir "15 $\mu$ g de DNA".

Figura 12, donde dice "quiescrentes", debe decir "quiescentes".

Figuras 14 y 15, donde dice "forskolina", debe decir "forskolina".

Tabla 3, donde dice "PDGF (5 U/ml/2)", debe decir "PDGF (5 U<sub>125</sub>/2/ml)".

Página 99, líneas 4-5, el título correcto es " Hormonal regulation of rat foetal lipogenesis in brown adipocyte primary cultures".

Páginas 95, 102 y 103 donde dice " uncoupling", debe decir "uncoupling", en la página 95, donde dice "precocius", debe decir "precocious" y en la página 94, donde dice "enzime", debe decir "enzyme".