

Lej. 33



**Universidad Nacional Autónoma de México**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**“RELACION DEL CITOESQUELETO CON LA INHIBICION  
DE LA CONVERSION ADIPOCITICA DE LAS CELULAS  
3T3 - F442A POR EFECTO DEL ACIDO RETINOICO”**

**T E S I S**

**Que para obtener el Título de  
B I O L O G O**

**p r e s e n t a**

**JOSE FEDERICO BERNARDO CASTRO MUÑOZ LEDO**

**Director de Tesis:  
DR. WALID KURI - HARCUCH**

**México, D. F.**

**1983**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

INDICE.

	Pág.
AGRADECIMIENTOS -----	
LISTA DE ABREVIATURAS -----	1
RESUMEN -----	3
INTRODUCCION -----	6
Sublíneas preadiposas de las células 3T3 -----	9
Conversión adipocítica -----	10
Cambios morfológicos -----	11
Acumulación de triglicéridos -----	12
Cambios en actividades enzimáticas -----	13
Efecto de hormonas y agentes químicos sobre la conversión adipocítica de las células 3T3 -----	19
a) Inductores de la lipogénesis -----	19
b) Prostaglandinas, esteroides y modificadores de los niveles intracelulares de nucleótidos cíclicos ----	21
c) Agentes lipolíticos -----	22
Efecto de factores séricos sobre la conversión adipocítica de las células 3T3 -----	24
La biotina como agente modulador de la conversión adipocí- tica de las células 3T3 -----	26
Efecto del ácido retinoico sobre la conversión adipocíti- ca de las células 3T3 -----	27
Conversión adipocítica: su relación con la síntesis de DNA y el ciclo celular -----	31
Conversión adipocítica de las células 3T3 <u>in vivo</u> -----	33

	pág.
Antecedentes -----	34
MATERIAL Y METODOS -----	36
Materiales -----	36
Métodos -----	37
Cultivos de células -----	37
Recubrimiento de las cajas de cultivo con poli-D-lisina	37
Tratamiento con ácido retinoico -----	38
Tratamiento con citocalasina B -----	38
Obtención de extractos celulares -----	38
Determinación de las actividades enzimáticas -----	39
Cálculos de la actividad enzimática -----	41
Tinción de lípidos intracelulares por el método del ro- jo oleoso O -----	42
Determinación de proteínas -----	42
RESULTADOS -----	43
Determinación de las actividades enzimáticas -----	43
Inactivación de las reacciones enzimáticas -----	43
Efecto del ácido retinoico sobre la morfología de las células 3T3-F442A -----	46
Cambios en la actividad de las enzimas lipogénicas -----	48
Efecto de la citocalasina B -----	53
Efecto de la citocalasina B sobre la conversión adipocí- tica de células tratadas con ácido retinoico -----	56
DISCUSION -----	58
BIBLIOGRAFIA -----	68

## LISTA DE ABREVIATURAS.

ACTH	hormona adrenocorticotrópica
ADP	difosfato de adenosina
AMP <sub>c</sub>	adenosina 3': 5' monofosfato cíclico
AR	ácido trans-retinoico
A <sub>340</sub>	absorbencia a 340 nm
ATP	trifosfato de adenosina
CB	citocalasina B.
CoA	coenzima A
DEX	dexametasona
DHAP	fosfato de dihidroxiacetona
DMEM	medio de Eagle modificado por Dulbecco-Vogt.
DMSO	dimetil sulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucleico
EDTA	ácido etilen dinitrilo tetracético
EGF	factor de crecimiento epidérmico
FGF	factor de crecimiento fibroblástico
GMP <sub>c</sub>	guanosina 3': 5' monofosfato cíclico
glicerolfosfato deshidrogenasa.	L-glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (EC 1.1.1.9).
GPDH	L-glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (EC 1.1.1.8).
MIX	1-metil 3-isobutil xantina
NAD	nicotinamida adenina dinucleótido, forma oxidada.

NADH	nicotinamida adenina dinucleótido, forma reducida.
NADP	fosfato de nicotinamida adenina dinucleótido, forma oxidada.
NADPH	fosfato de nicotinamida adenina dinucleótido, forma reducida.
PBS	solución salina de fosfatos
PDGF	factor de crecimiento derivado de plaquetas.
PGE <sub>1</sub>	prostaglandina E <sub>1</sub>
PGF <sub>2α</sub>	prostaglandina F <sub>2α</sub>
SDS	dodecil sulfato de sodio
TRIS	tris (hidroximetil) aminometano

## RESUMEN.

Cuando las células 3T3 llegan a confluencia se diferencian a células con características morfológicas y bioquímicas de adipocitos. Durante este proceso aumenta la síntesis de triglicéridos a partir de sus precursores y también aumenta la actividad de las enzimas relacionadas con la síntesis de lípidos. La conversión adipocítica depende de un factor sérico necesario para la formación de los adipocitos; en ausencia de este factor las células no se diferencian a adipocitos (Kuri-Harcuch y Green, 1978). La diferenciación de las células 3T3 también se inhibe totalmente por  $10^{-6}M$  ó  $10^{-5}M$  de ácido retinoico; la inhibición es reversible al cambiar las células a medio adipogénico libre del retinoide (Kuri-Harcuch, 1982). Con el propósito de analizar algunas de las características de la inhibición de la conversión adipocítica por el ácido retinoico y la relación que guarda el citoesqueleto con la acción del retinoide, se examinó el comportamiento de las enzimas lipogénicas, glicerolfosfato deshidrogenasa y enzima málica, durante la reversión del bloqueo de la diferenciación con ácido retinoico. Cultivos paralelos de células 3T3-F442A cuya conversión se inhibió durante 11 días de cultivo con ácido retinoico  $10^{-6}M$  ó  $10^{-5}M$ , o por cultivo en medio no-adipogénico con o sin ácido retinoico, se estimularon a diferenciarse en medio adipogénico libre del retinoide; las actividades de la glicerolfosfato deshidrogenasa y de la enzima málica presentaron en todos los casos los cambios característicos de la diferenciación, aumentando respectivamente 100-300 veces y 8-14 veces los valores de actividad encontrados en cultivos no susceptibles a la conversión adipocítica.

o en células en fase de proliferación. Cuando los cultivos alcanzaron el estado de reposo en presencia del ácido retinoico, se observó un retraso en la expresión de ambas enzimas respecto a los cultivos que revirtieron de un medio no-adipogénico; este retraso dependió de la concentración de retinoide utilizada durante la inhibición de la conversión. El retraso fue mayor en los cultivos donde se inhibió previamente la diferenciación con medio no-adipogénico conteniendo ácido retinoico. En los cultivos cuya diferenciación se bloqueó a lo largo de los experimentos, las actividades permanecieron en sus niveles basales. Estos resultados sugieren que el estado de reposo alcanzado por las células 3T3-F442A en presencia del ácido retinoico es diferente al estado de reposo alcanzado por las células cultivadas en medio no-adipogénico. Por otra parte, durante la inhibición de la conversión adipocítica por el ácido retinoico, las células presentaron una morfología más aplanada y alargada que las células cultivadas en ausencia del retinoide; estos cambios morfológicos sugieren que el ácido retinoico puede ejercer su efecto a través de una estabilización del citoesqueleto. El tratamiento con citocalasina B (2.0 µg/ml) aplicado durante la reversión de la inhibición por el retinoide adelantó 2-3 días el inicio de la conversión adipocítica, mientras que en cultivos mantenidos en presencia del ácido retinoico a lo largo del desarrollo experimental la citocalasina B no tuvo efecto. Los resultados muestran que la estabilización del citoesqueleto mediada por el ácido retinoico solamente modula la expresión del

fenotipo diferenciado y que la inhibición de la conversión adipocítica se lleva al cabo mediante otro mecanismo. Los resultados sugieren que la glicerolfosfato deshidrogenasa y la enzima málica se regulan de manera no coordinada.

## INTRODUCCION.

La multicelularidad de un organismo depende de la formación de células especializadas en funciones específicas como locomoción, soporte, captación de estímulos del medio, etc. La expresión de estas funciones específicas depende de los procesos de diferenciación celular. Las células diferenciadas tienen el mismo genoma, pero expresan diferentes funciones (Maclean, 1977).

El estado diferenciado es característico de las células de organismos eucariontes; pero se observa una expresión genética diferencial en los procariontes, la cual corresponde al encendido y apagado de operones de diferentes rutas metabólicas. En bacterias y cianobacterias se encuentran algunos grupos que constituyen agregados multicelulares, como los cuerpos fructíferos en Myxobacterias (Dworkin, 1973) o los heterocistos y acinetos en cianobacterias (Carr y Bradley, 1973).

Se consideran tres probables indicios en la aparición de la diferenciación entre los eucariontes (Maclean, 1977): un alto grado de diferenciación de partes de una misma célula; una tendencia al desarrollo de una estructura sincicial como en Stentor, Opalina o Physarum (Sauer, 1973) y el hongo Dictyostelium discoideum (Garrod y Ashworth, 1973), y una tendencia a desarrollar una estructura multicelular como en Pandorina, Volvox o Dictyostelium.

Por otra parte, del estudio comparativo de la diferenciación a lo largo de la escala filogenética, se pueden postular 4 principios (Maclean, 1977):

- 1) La diferenciación determina la forma orgánica del individuo.

2) El estado diferenciado tiene como consecuencia una restricción o pérdida de la potencialidad de la célula para dar origen a otros tipos celulares.

3) La determinación de una célula es estable y heredable.

4) El estado diferenciado tiende a ser predominante en la vida de los organismos a medida que se asciende en la escala evolutiva.

Uno de los problemas centrales que se presentan en el estudio de la diferenciación, es el explicar cómo se establece el compromiso de la célula para el cambio de expresión genética característico de este fenómeno y en el que la progenie celular muestra un nuevo programa diferente al de las células progenitoras. Existen dos modelos que tratan de responder esta pregunta. El primero, propone que el compromiso para expresar funciones diferenciadas por parte de una célula ocurre en forma estocástica (Till y col, 1964; Gusella y col, 1976); es decir, con una probabilidad discreta en cada generación celular. Este compromiso requiere la presencia de un inductor y la expresión de la diferenciación se determina por parámetros cinéticos precisos (Gusella y col, 1976). El segundo, propone que la diferenciación comprende una serie de eventos programados en los que la transición de un compartimento celular al siguiente en un linaje celular está dada por eventos dependientes del ciclo celular (Holtzer, 1970). Holtzer (1970) postula dos tipos de ciclo celular: un ciclo celular proliferativo, en el que se producen células hijas iguales a la célula progenitora, y un ciclo celular cuántico que produce células con funciones características que no se encuentran en la célula

progenitora.

Para el estudio de la diferenciación se han utilizado varios sistemas experimentales, tanto in vivo como in vitro. In vivo, los estudios de regeneración en anfibios han apoyado las siguientes conclusiones (Konigsberg, 1963): las células diferenciadas no necesariamente son irreversibles como elementos postmitóticos; cuando las células diferenciadas se estimulan en forma adecuada mediante la amputación del órgano, pueden perder algunas de sus estructuras características y adquirir algunas de las funciones típicas de un estado más temprano de diferenciación, y pueden proliferar y volver a expresar el estado normal de diferenciación. Para el estudio in vitro de la diferenciación de células de mamífero, se ha utilizado el cultivo de células o de tejidos. Las células de mamífero mantenidas en cultivo, en algunos casos proliferan indefinidamente y después de algún tiempo mueren, como las células de humano que logran sobrevivir aproximadamente 50 generaciones en cultivo. En algunos otros casos, la población celular puede constituirse en una línea celular establecida y adquiere la capacidad de multiplicación indefinida, y en ocasiones, la capacidad de producir tumores.

En 1963, Todaro y Green obtuvieron líneas celulares establecidas de fibroblastos de embrión de ratón suizo. Inocularon cultivos con diferentes densidades celulares y los mantuvieron en un régimen de transferencia de 3 días. Se derivaron las líneas 3T3, 3T6 y 3T12, cuyas densidades de inoculación fueron de  $3 \times 10^5$ ,  $6 \times 10^5$  y  $12 \times 10^5$  células por cultivo, respectivamente. Se observó, que al iniciar los

cultivos, las células presentaron una tasa alta de crecimiento que disminuyó paulatinamente; después de 15 ó 30 generaciones (45-75 días de cultivo) la velocidad de crecimiento aumentó y alcanzó un valor semejante al inicial (Todaro y Green, 1963). Este aumento fue el primer indicio del establecimiento y estuvo acompañado de la adquisición de heteroploidía. Estas células, al igual que otras líneas celulares establecidas, poseen una mayor capacidad de proliferación a bajas densidades de inóculo y una morfología fibroblastoide.

La línea celular 3T3 tiene un comportamiento diferente al de las otras líneas obtenidas por Todaro y Green; presenta una densidad de saturación menor, es sensible a la inhibición del crecimiento por densidad de saturación, lo cual no es característico de la mayor parte de las líneas celulares establecidas, y forma monocapas capaces de permanecer en estado de reposo por largos períodos (Todaro y Green, 1963).

#### Sublíneas preadiposas de las células 3T3.

En los cultivos de células 3T3 que llegaban a confluencia, se podían observar algunas células con gotas de lípidos en el citoplasma que formaban grupos probablemente relacionados clonalmente (Green y Kehinde, 1974). La clonación selectiva permitió obtener clones con diferente capacidad de acumular lípidos en el citoplasma; la acumulación lipídica podría deberse a un proceso de diferenciación a adipocitos y se denominó conversión adipocítica (Green y Kehinde, 1974).

Las dos clones que inicialmente se aislaron fueron la clona

3T3-L1 y la clona 3T3-L2 (Green y Kehinde, 1974). La diferenciación de la clona 3T3-L1 se presenta tanto en cultivos en superficie que han alcanzado el estado de confluencia, como en cultivos en suspensión estabilizados con metil-celulosa que impiden la multiplicación celular generalizada (Green y Meuth, 1974). Posteriormente, se obtuvieron subclonas que variaron en su capacidad o susceptibilidad para la conversión adipocítica, entre ellas: células con alta susceptibilidad de conversión (3T3-F442A), células con una mediana susceptibilidad de conversión (3T3-L1 y 3T3-L2), y clonas que poseen un porcentaje de conversión muy bajo o que no tienen la capacidad de convertirse a adipocitos (3T3-M2 y 3T3-C2) (Green y Kehinde, 1976).

Las clonas 3T3-L1, 3T3-L2 y 3T3-F442A son un modelo adecuado para el estudio in vitro del metabolismo de lípidos, del proceso de diferenciación de los adipocitos y de su capacidad para responder a hormonas y agentes lipogénicos y lipolíticos. Estos aspectos se han estudiado tanto en el animal intacto como en rebanadas de tejido mantenidas en cultivo o en cultivos primarios de adipocitos (Rudman y Di Girolamo, 1967; Rothblat, 1969). Sin embargo, las clonas de 3T3, a diferencia de las rebanadas de tejido o de los cultivos primarios, son una población celular homogénea que puede proliferar indefinidamente y tienen la capacidad de iniciar la diferenciación adipocítica en condiciones específicas.

#### Conversión adipocítica.

La conversión adipocítica se caracteriza por varios cambios:

cambios morfológicos, acumulación intracitoplásmica de triglicéridos, cambios en actividades enzimáticas, incremento en la sensibilidad a hormonas y síntesis de DNA.

#### Cambios morfológicos.

Las células 3T3 son células de aspecto fibroblástico, aplanadas e irregulares con grandes procesos citoplásmicos. Cuando llegan a confluencia los procesos se retraen, engrosan y adquieren una forma oval o esférica. Simultáneamente, se acumulan lípidos en el citoplasma formando numerosas gotas que se fusionan y desplazan el núcleo hacia la periferia. En las primeras fases de la diferenciación, las células son similares a los adipocitos multiloculares del tejido adiposo pardo, pero al final de la conversión son más parecidas a los adipocitos uniloculares del tejido adiposo blanco (Green y Meuth, 1974). Los cambios morfológicos muy tempranos no están claramente descritos. Sin embargo, Green y Kehinde (1976) describieron, por tinción de los lípidos con rojo oleoso O, que al inicio de la transición morfológica el citoplasma aparece teñido en forma difusa sin aparentes gotas de lípidos; los límites celulares están bien definidos y paulatinamente desaparecen al irse sobrelapando los procesos celulares y adquirir la forma redonda. Los adipocitos se encuentran formando pares o grupos de células que probablemente están en la misma etapa de diferenciación, sugiriendo que las células están en relación clonal y más o menos sincrónica (Green y Kehinde, 1976).

Los cambios morfológicos de la conversión adipocítica se encuentran determinados por el programa de diferenciación y no dependen

de la acumulación intracitoplásmica de lípidos. Kuri-Harcuch y col (1978) comunicaron que la adquisición de la forma redonda se puede llevar al cabo en ausencia de síntesis y acumulación de triglicéridos debido a probables alteraciones del citoesqueleto. Durante la conversión adipocítica disminuye la síntesis de actina hasta en un 75-80% (Sidhu, 1979; Spiegelman y Green, 1980) lo que correlaciona con la desaparición de las fibras de tensión (Novikoff y col, 1980). Spiegelman y Farmer (1982) encontraron que la disminución en la síntesis y contenido de actina, tubulina y vimentina precede a los aumentos en la actividad de las enzimas lipogénicas. Durante la reorganización del citoesqueleto, se ha sugerido la existencia probable de filamentos, todavía no identificados, alrededor de las gotas intracitoplásmicas de lípidos cuya disposición es similar en los adipocitos diploides en desarrollo (Novikoff y col, 1980).

Por otra parte, en los preadipocitos 3T3 las gotas de lípidos se encuentran rodeadas por retículo endoplásmico, mitocondrias y peroxisomas, sugiriendo la existencia de una relación metabólica y estructural. Debido a la reorganización del citoplasma durante la diferenciación, aumentan las vacuolas autofágicas y las vacuolas con actividad de fosfatasa ácida (Novikoff y col, 1980).

#### Acumulación de triglicéridos.

La acumulación de lípidos intracitoplásmicos durante la conversión adipocítica de las células 3T3 puede deberse a un aumento en la síntesis de ácidos grasos y triglicéridos. La síntesis de triglicéridos durante la fase de proliferación exponencial es similar tanto en los cultivos

de las sublíneas 3T3-L1 y 3T3-F442A (líneas con alta susceptibilidad de conversión) como en los cultivos de las células 3T3-M2 y 3T3-C2 (líneas con baja susceptibilidad). Sin embargo, cuando las células 3T3-L1 y 3T3-F442A llegan a confluencia, la síntesis de triglicéridos aumenta varias veces en magnitud (Green y Kehinde, 1975). La incorporación de  $^{14}\text{C}$ -glucosa, de  $^{14}\text{C}$ -acetato y de  $^{14}\text{C}$ -palmitato a triglicéridos en las células 3T3-L1 aumenta aproximadamente 200 veces, 50 veces y de 6 a 20 veces, respectivamente en comparación a la incorporación en la sublínea 3T3-M2 de nula susceptibilidad de conversión adipocítica (Green y Kehinde, 1975; Mackall y col, 1976). La incorporación de estos precursores a fosfolípidos no aumenta y se mantiene a niveles basales (Green y Kehinde, 1975). Recientemente se ha comunicado que el palmitoleato y el oleato constituyen el 32 y 26% respectivamente de los ácidos grasos totales en 3T3-L1, y son sintetizados de novo o por desaturación de palmitato y estearato; su concentración aumenta unas 8 veces durante la conversión adipocítica (Kasturi y Joshi, 1982).

#### Cambios en actividades enzimáticas.

Tanto en los adipocitos diploides como durante la conversión adipocítica de las células 3T3, la biosíntesis de triglicéridos se puede llevar al cabo por la síntesis de novo de ácidos grasos a partir de sus precursores, o por la esterificación de los ácidos grasos exógenos. La acumulación intracitoplásmica de lípidos durante la conversión adipocítica se debe al aumento en la actividad de las enzimas lipogénicas, ocasionado por una mayor síntesis de novo de las enzimas como la acetil CoA carboxilasa, la sintetasa de los ácidos

grasos, la glicerolfosfato deshidrogenasa y la enzima málica (Mackall y col, 1976; Ahmad y col, 1979; Student y col, 1980; Weiss y col, 1980; Spiegelman y Green, 1980). Se ha observado un aumento en la cantidad de mRNA's específicos que codifican algunas de estas enzimas (Spiegelman y Green, 1981). Resultados similares se podrían esperar para las otras enzimas lipogénicas cuya síntesis no se ha estudiado. Las enzimas esterificantes glicerolfosfato aciltransferasa, la diacil glicérido aciltransferasa y la lisofosfatídico aciltransferasa aumentan en actividad 50-100 veces, 60 y 50 veces, respectivamente en relación con las células 3T3-C2 que no son susceptibles de conversión adipocítica (Kuri-Harcuch y Green, 1977; Kuri-Harcuch y col, 1978; Coleman y col, 1978). Las enzimas que sintetizan ácidos grasos, acetil CoA carboxilasa, ATP-citrato liasa y sintetasa de los ácidos grasos aumentan su actividad 40 y 50 veces durante la conversión (Mackall y col, 1976); la enzima málica que produce un 40-50% del NADPH necesario para la síntesis de ácidos grasos (Wise y Ball, 1964), también aumenta aproximadamente 15 veces respecto a las células no adiposas (Kuri-Harcuch y Green, 1977). Por otra parte, las enzimas glicolíticas glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, deshidrogenasa láctica, aldolasa y gliceraldehído fosfato deshidrogenasa muestran pocos aumentos en su actividad, de 2-4 veces respecto a las células no diferenciadas (Grimaldi y col, 1978; Spiegelman y Green, 1980). Sin embargo, otra enzima glicolítica, la glicerolfosfato deshidrogenasa, que a partir del fosfato de dihidroxiacetona sintetiza el 3-glicerolfosfato necesario para la síntesis de los triglicéridos, llega a aumentar entre 500 a 50,000 veces durante la conversión adipocítica (Kuri-Harcuch y col, 1978; Pairault y Green, 1979). Este

aumento tan significativo de la enzima se explica, porque durante la diferenciación a adipocitos, se expresa una isoenzima que no se encuentra en células no adiposas (Wise y Green, 1979). La enzima lipoproteína lipasa, que es característica del tejido adiposo y que se localiza en la superficie de las células endoteliales de los vasos o en la superficie de los adipocitos, también se expresa durante la conversión adipocítica de las células 3T3; la actividad de esta enzima llega a aumentar hasta 80 veces (Wise y Green, 1978; Grimaldi y col, 1978; Spooner y col, 1979) (ver tabla 1).

Los aumentos en las actividades enzimáticas durante la conversión adipocítica parecen estar regulados en forma coordinada tanto para las enzimas que sintetizan ácidos grasos (Mackall y col, 1976), como para las enzimas esterificantes (Coleman y col, 1978). Sin embargo, también se ha descrito que las enzimas lipogénicas están reguladas en forma no coordinada con las enzimas glicolíticas (Spiegelman y Green, 1980). Las enzimas lipogénicas responden de manera diferente a la deficiencia de biotina, y se ha postulado la existencia de enzimas primarias como la glicerolfosfato deshidrogenasa y la lipoproteína lipasa cuyas actividades no se modifican por la síntesis de ácidos grasos; otras, como la enzima málica y la glicerolfosfato aciltransferasa, se han considerado como enzimas secundarias ya que sus actividades se pueden regular por la síntesis de ácidos grasos (Kuri-Harcuch y col, 1978). Por otra parte, la síntesis de la glicerolfosfato deshidrogenasa, de la sintetasa de los ácidos grasos y de la enzima málica no parecen regularse como unidad coordinada del tipo operón (Spiegelman y Green,

Tab.a I. Proteínas cuyo nivel se modifica durante la conversión adipocítica de las células 3T3.

Nombre	Cambio en la enzima	Referencias
<b>a) Biosíntesis de los ácidos grasos.</b>		
ATP citrato liasa	(+) 20-50 veces	10,29,67,68
Acetil CoA carboxilasa	(+) 40-50 veces	68
Sintetasa de los ácidos grasos	(+) 1.75; 10-50 veces	29,68,110,115,123
Piruvato carboxilasa	(+) 18 veces	3,67
Estearoil CoA desaturasa	(+) 100 veces	43
1) NADH ferricianuro reductasa <sup>a</sup>	(+) 3.4 veces	43
2) NADH citocromo c <sup>a</sup> reductasa	(+) 2.3 veces	43
3) Citocromo b <sub>5</sub> <sup>a</sup>	(+) 6.6 veces	43
4) $\Delta^9$ desaturasa terminal <sup>a</sup>	(+) 32 veces	43
Enzima mállica	(+) 7-15 veces	49,50,51,53
<b>b) Biosíntesis de lípidos.</b>		
Glicerolfosfato deshidrogenasa	(+) 200-5000 veces	53,82
Glicerolfosfato acil transferasa	(+) 50-80 veces 100 veces 30.4 veces	10,49,50,51,53
Acido graso CoA ligasa	(+) 30-100 veces	10,29
Lisofosfatídico acil transferasa	(+) 59 veces	10
Diacilglicerol acil transferasa	(+) 63 veces 13 veces	10,29
Lipoproteína lipasa	(+) 80-180 veces 1.5-3 veces	53,112,127 29
Diacilglicerol colina fosfotransferasa	(+) 2.5 veces	10
Diacilglicerol etanolamina fosfotransferasa	(+) 2.7 veces	10

Tabla 1. (Continuación).

Nombre	Cambio en la enzima	Referencias
Fosfatídico fosfatasa	(+) 3.3. veces	10,29
Trioleín hidrolasa	(+) 2 veces	29
c) Enzimas del metabolismo energético.		
Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa	(+) 2 veces	29
Lactato deshidrogenasa	(+) 1.2-3 veces	29,67,110
Fosfofructocinasa	(+) 5.2 veces	67
Aldolasa	(+) 4 veces; 4.4%	67,110
Citrato sintasa	(+) 2.7 veces	67
Isocitrato deshidrogenasa mitocondrial (ligada a NAD)	(+) 1.3 veces	67
Glutamato deshidrogenasa	(+) 2 veces	67
Gliceraldehído fosfato deshidrogenasa	(+) 10.4%	110
d) Movilización de triglicéridos intracitoplásmicos.		
Hidrolasa de triglicéridos	(+) 19 veces	44
Hidrolasa de diglicéridos	(+) 12 veces	44
Hidrolasa de monoglicéridos	(+) 10 veces	44
Colesterol ester hidrolasa	(+) 280 veces	44
e) Otras actividades enzimáticas.		
K <sup>+</sup> -p-nitrofenil fosfatasa	(+) 1.5 veces	29
Fosfatasa ácida	(+) n.d.	78
α-naftil acetato estearasa	(+) n.d.	78
Poli(ADP-ribosa) sintetasa	(+) posterior a los primeros indicios de conversión.	84
γ-glutanil transpeptidasa <sup>b</sup>	(+) 4 veces	117
Glutacionasa <sup>b</sup>	(+) 5 veces	117
Glutaminasa independiente de fosfato	(+) 5 veces	117
Glutamina sintetasa	(+) más de 100 veces	73

Tabla 1 (Continuación).

Nombre	Cambio en la enzima	Referencias
f) Proteínas citoesqueléticas.		
Tubulina	(-) más de 95%	108
Actina	(-) 80-90%	105,108,110
Vimentina	(-) n.d.	108
g) Otras.		
Colágena	(-) n.d.	28
Péptido de 250 000 daltones	(-) 2%	110
Péptido 16 500-18 500 daltones	(+) n.d.	105

Los signos (+) o (-) indican incremento o decremento, respectivamente.

n.d. significa no determinado.

Los cambios en porcentaje están referidos respecto a la cantidad de proteína total.

\*Notas: a) Las actividades NADH ferricjanuro reductasa, NADH-citocromo c reductasa, citocromo  $b_c$  y  $\Delta$  desaturasa terminal forman parte del complejo de la esteroil CoA desaturasa.

b) Las actividades  $\gamma$ -glutamil transpeptidasa, glutatiónasa y glutaminasa independiente de fosfato pertenecen a la misma proteína.

1981).

Efecto de hormonas y agentes químicos sobre la conversión adipocítica de las células 3T3.

La acumulación de lípidos en el tejido adiposo se regula por: el transporte y metabolismo de la glucosa, la síntesis de ácidos grasos y de triglicéridos, y la movilización de los triglicéridos acumulados en el citoplasma, i.e. lipólisis (Rudman y Di Girolamo, 1967). Estos procesos se pueden modificar por hormonas como la insulina, epinefrina y la ACTH, o por agentes químicos como indometacina.

a). Inductores de la lipogénesis.

La insulina estimula el transporte y el metabolismo de la glucosa en el tejido adiposo de la rata y del ratón (Rudman y Di Girolamo, 1967) y también estimula la lipogénesis y la acumulación intracelular de triglicéridos.

En la conversión adipocítica de las células 3T3, la insulina también aumenta el transporte y la incorporación de glucosa (Green y Kehinde, 1975) y estimula su conversión a  $\text{CO}_2$  (Rubin y col, 1977). El transporte de glucosa aumenta de 1 a 2 veces en las células diferenciadas a adipocitos (Rosen y col, 1978; Karlsson y col, 1979; Bishayee y Das, 1982); este efecto es similar al que se observa en adipocitos diploides de rata (Karnieli y col, 1981). Por otra parte, cuando se agregan concentraciones de 1 a 5  $\mu\text{g}$  de insulina por mililitro de medio de cultivo, la incorporación de glucosa a triglicéridos aumenta de 4 a 5 veces durante la conversión adipocítica (Green y Kehinde,

1975). La insulina también aumenta el transporte de aminoácidos (Rosen y col, 1978), la síntesis de proteínas y del DNA (Green y Kehinde, 1975) y la utilización de triglicéridos exógenos (Spooner y col, 1979) durante la conversión adipocítica.

La insulina produce aumentos en la actividad de las enzimas lipogénicas como la esteroil CoA desaturasa (Kasturi y Joshi, 1982), la lipoproteína lipasa (Spooner y col, 1979), la ácido graso CoA ligasa y la diacilglicérido aciltransferasa (Grimaldi y col, 1978). Otras enzimas y proteínas consideradas como primarias en la conversión adipocítica, como la glicerolfosfato deshidrogenasa, la sintetasa de los ácidos grasos, la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y la actina no aumentan su actividad o contenido por el efecto de la insulina (Grimaldi y col, 1978; Spiegelman y Green, 1980).

El aumento en la sensibilidad a la insulina durante la conversión adipocítica de las células 3T3 se debe a un incremento en la cantidad de receptores para insulina en la superficie celular, la cual es de 7000-9000 receptores por célula en los preadipocitos y aumenta a 170 000-250 000 receptores por célula diferenciada a adipocito; hay un aumento de 10 a 35 veces en la cantidad de receptores para la insulina (Rubin y col, 1978; Reed y col, 1977; 1981; Karlsson y col, 1979). Estos cambios se deben a un incremento de 20 a 40 veces en la síntesis de los receptores (Reed y col, 1981).

La respuesta de las células 3T3 a la insulina se observa a concentraciones fisiológicas de la hormona (Russell y Ho, 1976); el mecanismo de acción, en su mayor parte, es desconocido aunque su

capacidad de inducir un estado facilitado del transporte de hexosas y de afectar el metabolismo celular en general no depende solamente de la interacción de la hormona con sus receptores, sino de su efecto sobre la síntesis de proteínas (Rosen y col, 1978; Karlsson y col, 1979). Se ha comunicado que la insulina induce la fosforilación de la proteína ribosomal S6 (Rosen y col, 1981) y de la enzima ATP citrato liasa (Swergold y col, 1982) en los adipocitos 3T3-L1.

b). Prostaglandinas, esteroides y modificadores de los niveles intracelulares de nucleótidos cíclicos.

Existen otros compuestos como las prostaglandinas  $F_{2\alpha}$  y  $E_1$ , la 1-metil 3-isobutilxantina (MIX), la dexametasona (DEX) y la indometacina, que en forma independiente o combinada, estimulan la diferenciación de las células 3T3 a adipocitos (Russell y Ho, 1976; Chang y Polakis, 1978; Rubin y col, 1978; Spooner y col, 1979; Student y col, 1980).

La prostaglandina  $F_{2\alpha}$  y la 1-metil 3-isobutilxantina promueven la conversión adipocítica, aumentan las actividades enzimáticas y la proliferación celular (Russell y Ho, 1976). La prostaglandina  $E_1$  ( $PGE_1$ ) tiene una capacidad de estimulación de la conversión 100 veces menor que la prostaglandina  $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ ) ya que parece interaccionar con menor afinidad con el receptor de la  $PGF_{2\alpha}$  (Russell y Ho, 1976).

El mecanismo de acción de estos compuestos no se conoce; la MIX inhibe la fosfodiesterasa del  $ANP_c$  y aumenta la concentración intracelular del nucleótido (Russell y Pastan, 1974; D'Armiento y col, 1972) y la  $PGF_{2\alpha}$  aumenta los niveles intracelulares del  $GMP_c$  (DeAsua y col, 1975). Sin embargo, la diferenciación de los preadipocitos

no se estimula con otros compuestos que modifican los niveles intracelulares de nucleótidos cíclicos, por ejemplo, el dibutilil AMP<sub>c</sub>, la cafeína o la teofilina (Russell y Ho, 1976) que incluso reducen la síntesis de enzimas lipogénicas durante la diferenciación (Spiegelman y Green, 1981).

Los esteroides como la dexametasona (DEX), la desoxicorticosterona, la dihidrotestosterona y la progesterona ejercen en el tejido adiposo un efecto negativo sobre el transporte y el metabolismo de la glucosa (Rudman y Di Girolamo, 1967), pero estimulan la conversión adipocítica de las células 3T3 (Rubin y col, 1978). Su efecto parece deberse a una disminución en la disponibilidad de ácidos grasos insaturados para la síntesis de prostaglandina E<sub>1</sub> (Rubin y col, 1978); la dexametasona (DEX) produce la mayor estimulación de la conversión adipocítica (Rubin y col, 1978). Rubin y col, (1978) obtuvieron hasta un 80-90% de conversión adipocítica en las células 3T3-L1 empleando una mezcla de MIX (0.5 mM) y DEX (0.25 µM) en ausencia de insulina. La indometacina, que es un compuesto sintético y un potente inhibidor de la actividad de la prostaglandina endoperóxido sintetasa, también estimula la conversión adipocítica de las células 3T3-L1 (Chang y Polakis, 1978).

c). Agentes lipolíticos.

Diversos agentes lipolíticos que elevan los niveles intracelulares de AMP<sub>c</sub> modulan negativamente la conversión adipocítica y el metabolismo de los adipocitos terminalmente diferenciados, como la cafeína (Russell y Ho, 1976), el isoproterenol (Green y Kehinde,

1975; Weiss y col, 1980; Spiegelman y Green, 1981; Kawamura y col, 1981; Lai y col, 1981; Watkins y col, 1982; Swergold y col, 1982), la teofilina (Spiegelman y Green, 1981; Miller y col, 1978, 1980) o el dibutiril AMP<sub>c</sub> y otros análogos del AMP<sub>c</sub> (Russell y Ho, 1976; Miller y col, 1978, 1980; Spiegelman y Green, 1981).

El dibutiril AMP<sub>c</sub> y sus análogos; el isoproterenol y la teofilina al agregarse al medio de cultivo disminuyen la acumulación de triglicéridos en las células 3T3-L1 ó 3T3-F442A (Green y Kehinde, 1975; Spiegelman y Green, 1981). Estos compuestos aumentan la actividad de algunas enzimas glicolíticas como la aldolasa, la deshidrogenasa láctica y la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (Spiegelman y Green, 1981), y de las enzimas que intervienen en la movilización citoplásmica de los triglicéridos y del colesterol, como la triglicérido lipasa, la monoglicérido lipasa y la colesterol ester hidrolasa (Kawamura y col, 1981). Sin embargo, disminuyen la síntesis y la actividad de las enzimas lipogénicas como la sintetasa de los ácidos grasos, la glicerolfosfato deshidrogenasa, la enzima málica y la piruvato carboxilasa (Spiegelman y Green, 1981); también disminuyen la actividad de la glutamina sintetasa (Miller y col, 1980). Durante la incubación de los preadipocitos 3T3 con dibutiril-AMP<sub>c</sub> se observa la aparición de un péptido de 39,000 daltones cuya función todavía no se conoce (Spiegelman y Green, 1981).

Las aminas β-adrenérgicas y la hormona adrenocorticotrópica (ACTH), cuyos efectos están mediados por el AMP<sub>c</sub>, ejercen una acción lipolítica sobre el tejido adiposo de los mamíferos (Rudman y Di Girolamo,

1967) y disminuyen la acumulación de triglicéridos (Green y Kehinde, 1975) y la síntesis de algunas de las enzimas lipogénicas en los adipocitos 3T3 (Weiss y col, 1980), pero estimulan la movilización de triglicéridos y la liberación de glicerol-3-fosfato (Kawamura y col, 1981). Este efecto se relaciona con un aumento en la sensibilidad de las células a la ACTH y a los agonistas  $\beta$ -adrenérgicos durante la conversión adipocítica (Rubin y col, 1977; Kawamura y col, 1981); depende del número de receptores celulares, que para los receptores  $\beta$ -adrenérgicos aumenta en un 60-70% (Lai y col, 1981). En el caso de la ACTH se desconoce si la aparición de la sensibilidad a la hormona se debe a la síntesis de novo de receptores, a la activación de los existentes o a ambos mecanismos (Rubin y col, 1977).

Efecto de factores séricos sobre la conversión adipocítica de las células 3T3.

La conversión adipocítica de las células 3T3 depende de un factor del suero suplementado al medio de cultivo que se encuentra en varias especies animales como en el humano, el cerdo, el bovino y el caballo. El suero fetal de bovino contiene la mayor actividad de este factor, mientras que el suero de gato carece de ella (Kuri-Harcuch y Green, 1978). La ausencia en el medio de cultivo de este factor no lipídico tiene como consecuencia que los cambios característicos de la conversión no se lleven al cabo, por lo que se ha denominado factor adipogénico (Kuri-Harcuch y Green, 1978). La respuesta celular al factor adipogénico depende de la susceptibilidad de las células a la conversión y de la concentración del factor en el medio de cultivo

(Kuri-Harcuch y Green, 1978).

El lóbulo anterior de la hipófisis tiene actividad adipogénica que es estable a 4°C y no es dializable; estimula la conversión adipocítica de las células 3T3-F442A, pero no de las células 3T3-C2 (Hayashi y col, 1981). Los extractos hipofisarios presentan una actividad específica aproximadamente 500 veces mayor que la del suero (Hayashi y col, 1981), y podría deberse a la hormona de crecimiento que también estimula la conversión, aunque con características diferentes al suero fetal de bovino (Morikawa y col, 1982). La diferenciación de las células Balb/c 3T3 a adipocitos también requiere factores séricos; el plasma humano contiene factores polipeptídicos termolábiles, que a diferencia del factor adipogénico para la diferenciación de las células 3T3 de ratón suizo pierden su actividad cuando el plasma se coagula (Krawisz y Scott, 1982).

Por otra parte, extractos del lóbulo posterior de la hipófisis, cerebro y útero, inhiben la conversión adipocítica de las células 3T3-F442A (Hayashi y col, 1981). Esta inhibición se ha atribuido a la presencia del factor de crecimiento fibroblástico (FGF) en estos extractos; el FGF y el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), que también inhibe la conversión adipocítica, producen una respuesta mitogénica (Hayashi y col, 1981). Esta respuesta mitogénica no parece ser la causante de la inhibición, ya que la concentración necesaria para la inhibición de la conversión adipocítica es varias veces menor que la necesaria para inducir la respuesta mitogénica celular (Hayashi y col, 1981). No todos los mitógenos inhiben la

conversión adipocítica; el factor de crecimiento epidérmico (EGF) no tiene capacidad para inhibir este proceso de diferenciación (Hayashi y col, 1981).

La acidificación del suero genera un polipéptido cuyo peso molecular aproximado es de 24,000 daltones que inhibe reversiblemente la conversión adipocítica, probablemente bloqueando algunos eventos tempranos del proceso de diferenciación (Kuri-Harcuch y Green, 1981).

La biotina como agente modulador de la conversión adipocítica de las células 3T3.

La biotina es necesaria para la acumulación lipídica en las células 3T3-F442A; la deficiencia de biotina no bloquea la iniciación de la conversión adipocítica, pero inhibe la acumulación intracitoplásmica de triglicéridos (Kuri-Harcuch y col, 1978). Las células cultivadas en condiciones en que la biotina se ha retirado del medio de cultivo presentan los cambios morfológicos característicos de la conversión adipocítica; las células pierden su forma fibroblástica alargada y adquieren la forma oval y redonda, sin la gota intracitoplásmica de lípidos (Kuri-Harcuch y col, 1978). Por otra parte, algunas de las enzimas lipogénicas como la enzima málica, la glicerolfosfato aciltransferasa y la piruvato carboxilasa alcanzan niveles de actividad varias veces menores que los que se observan en células no deficientes de biotina (Kuri-Harcuch y col, 1978; Freytag y Utter, 1980). Otras enzimas lipogénicas, la glicerolfosfato deshidrogenasa, la lipoproteína lipasa (Kuri-Harcuch y col, 1978), la sintetasa de ácidos grasos (Spiegelman y Green, 1980; Kasturi y Joshi,

1982) y la esteroil CoA desaturasa (Kasturi y Joshi, 1982) no se alteran en su actividad durante la conversión adipocítica en condiciones deficientes de biotina. La ausencia de biotina también produce una disminución total en la actividad de algunas enzimas glicolíticas como la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa y la deshidrogenasa láctica, mientras que no altera la actividad de otra enzima glicolítica, la aldolasa (Spiegelman y Green, 1980). Todos los cambios producidos por la deficiencia de biotina son reversibles después de 24-48 horas de adicionar concentraciones de biotina mayores de  $10^{-8}$ M (Kuri-Harcuch y col, 1978). Estos resultados han sugerido que la actividad de las enzimas lipogénicas y glicolíticas durante la conversión adipocítica se regula en forma independiente, no coordinada (Kuri-Harcuch y col, 1978; Spiegelman y Green, 1980).

Efecto del ácido retinoico sobre la conversión adipocítica de las células 3T3.

La vitamina A es un compuesto que tiene una actividad biológica diversa; en forma natural se encuentra como el alcohol trans-retinol o sus productos de oxidación trans-retinal y el ácido trans-retinoico. La vitamina A interviene en el ciclo visual (Wald, 1968) y el mantenimiento de la capacidad reproductora de los mamíferos. Al igual que sus análogos (retinoides), modifica la diferenciación de diversos tipos celulares de origen epitelial (De Luca, 1977; Lotan, 1980; Fuchs y Green, 1981) o mesenquimatoso (De Luca, 1977; Hassell y col, 1978; Lewis y col, 1978; Lotan, 1980) tanto in vivo como in vitro; en algunos casos, induce la diferenciación de las células de carcinoma embrionario

a diversos tipos celulares (Strickland y Mahdavi, 1978; Linder y col, 1981).

Los retinoides inducen una respuesta pleiotípica en las células o tejidos sensibles a su acción, la cual depende de la dosis y el tiempo de tratamiento (Wilson y Reich, 1978; Haddox y Russell, 1979; Haddox y col, 1979; Lotan y col, 1980a, 1982, 1983; Rapaport y col, 1982a, b; Mordan y Bertram, 1983). Los retinoides inhiben la proliferación de células cultivadas in vitro (Haddox y col, 1979; Shapiro y Poon, 1979; Lotan y col, 1982; Olsson y Breitman, 1982), y aumentan su sensibilidad a la inhibición de la proliferación por densidad de saturación (Adamo y col, 1979; Jetten y col, 1979; Lotan y col, 1980a, b; Mukherjee y col, 1982; Kuri-Harcuch, 1982; Mordan y Bertram, 1983). Se ha sugerido que el efecto de los retinoides sobre la proliferación se debe a un bloqueo de la progresión en el ciclo celular, en algún punto específico localizado en la parte media de  $G_1$  (Haddox y Russell, 1979; Haddox y col, 1979; Lotan y col, 1982) que podría corresponder al punto de restricción propuesto por Pardee (1974). Por otro lado, Schroder y col (1982) proponen que los retinoides afectan la proliferación reduciendo la velocidad de paso de las células a través de las fases S y  $G_2$  del ciclo celular pero no las bloquean en la fase  $G_1$ .

Los cambios en la proliferación, por lo general, van acompañados de cambios en la morfología celular (Jetten y col, 1979; Adamo y col, 1979; Shapiro y Poon, 1979; Lotan y col, 1980a; Linder y col, 1981; Olsson y Breitman, 1982) probablemente relacionados con modificaciones en la adhesión (Adamo y col, 1979; Jetten y col, 1979; Mukherjee y

col, 1982). Los retinoides alteran la biosíntesis de glicoproteínas y de glicolípidos (De Luca, 1977; Wolf y col, 1979; Sasak y col, 1980; Lotan, 1980; Lotan y col, 1980a, 1983), de glicosaminoglicanos y de proteoglicanos (Shapiro y Poon, 1979; Jetten y col, 1979; Lotan, 1980), y aumentan la síntesis de fibronectina y su acumulación en la superficie celular (Jetten y col, 1979; Hassell y col, 1978, 1979; Lotan y col, 1980a; Bolmer y Wolf, 1982). La modificación de la superficie celular por acción de los retinoides puede deberse a que estos compuestos forman intermediarios manosil-retinil-fosfato en reacciones de glicosilación (De Luca, 1977; Lotan, 1980) y estimulan la actividad de una galactosil-transferasa (Dorsey y Roth, 1974). Es probable que la modulación de glicoproteínas de superficie por los retinoides requiera una proteína cinasa cuya actividad aumenta en la membrana celular cuando las células son tratadas con estos compuestos (Plet y col, 1982; Mukherjee y col, 1982); esto se podría correlacionar con la potenciación del efecto de los retinoides sobre la diferenciación celular por agentes que elevan los niveles de AMP<sub>c</sub> (Strickland y Mahdavi, 1978; Olsson y Breitman, 1982).

Por otra parte, los retinoides regulan la expresión genética a través de su interacción con una proteína receptora intracelular de manera análoga al mecanismo de acción de las hormonas esteroides. La existencia de proteínas receptoras con especificidad hacia retinol o hacia ácido retinoico se ha descrito en el citoplasma de varios tipos celulares (Ong y Chytil, 1975; Jetten y col, 1979; Lotan y col, 1980b; Lacroix y col, 1980). El complejo receptor-retinoide es translocado al núcleo (Takase y col, 1979) y el retinoide es

transferido a sitios de unión específicos en la cromatina, disociándose de la proteína receptora (Liau y col, 1981). Se ha demostrado una correlación entre la sensibilidad de las células a diferentes retinoides con la presencia de las proteínas receptoras en el citoplasma (Lotan y Nicolson, 1977; Lotan, 1980; Lotan y col, 1980b). Sin embargo, la heterogeneidad en la sensibilidad de diferentes líneas celulares a los retinoides, la capacidad de respuesta a los retinoides por células donde no se han detectado estos receptores y la existencia de efectos que no dependen de receptores (Lotan y col, 1980b; Lotan y Nicolson, 1977, 1979; Lacroix y col, 1980); permiten sugerir que otros mecanismos de acción pueden estar involucrados en el efecto de la vitamina A y sus análogos.

El ácido retinoico inhibe la conversión adipocítica de las células 3T3-L2 (Murray y Russell, 1980) y de las células 3T3-F442A en cultivos en superficie y en suspensión (Kuri-Harcuch, 1982). Concentraciones de  $10^{-5}M$  y  $10^{-6}M$  del ácido retinoico producen una inhibición total de la conversión adipocítica; concentraciones menores solamente producen una inhibición parcial (Kuri-Harcuch, 1982). La inhibición de la conversión adipocítica solamente se manifiesta cuando los cultivos son tratados con este compuesto antes de la expresión de la conversión, por lo que se ha sugerido que este análogo de la vitamina A bloquea algunos eventos previos al establecimiento del compromiso a diferenciación de los preadipocitos (Kuri-Harcuch, 1982). Esta inhibición es reversible cuando las células se vuelven a cultivar en ausencia del retinoide (Kuri-Harcuch, 1982).

La inhibición de la conversión adipocítica se acompaña por

cambios en la forma celular; la morfología adipocítica no se observa en las células tratadas con ácido retinoico, sino que éstas muestran una mayor tendencia al alargamiento y al aplanamiento, y presentan una mayor sensibilidad a la inhibición de la proliferación por densidad de saturación (Kuri-Harcuch, 1982).

**Conversión adipocítica:** su relación con la síntesis de DNA y el ciclo celular.

Antes de iniciar la conversión adipocítica, las células 3T3 muestran el fenotipo fibroblástico característico (Green y Meuth, 1974). La diferenciación a adipocitos se puede posponer indefinidamente al mantener las células en proliferación, o se puede inhibir por el tratamiento con la bromo-desoxiuridina o con el arabinósido de citosina, que bloquean la replicación del DNA (Green y Meuth, 1974; Green y Kehinde, 1975; Pairault y Green, 1979; Kuri-Harcuch y Marsch-Moreno, 1983). Sin embargo, se ha descrito que al entrar las células al estado de reposo y ser estimuladas a diferenciación con suero adipogénico, atraviesan un ciclo celular que precede a la expresión del nuevo fenotipo (Kuri-Harcuch y Marsch-Moreno, 1983). Este ciclo celular está seguido por una respuesta mitogénica limitada que tiene un efecto amplificador al aumentar en forma selectiva el número de adipocitos (Pairault y Green, 1979; Kuri-Harcuch y Marsch-Moreno, 1983).

El establecimiento del compromiso a diferenciación de las células 3T3, se puede llevar al cabo a través de un ciclo celular cuántico (Holtzer, 1970) o en forma estocástica (Gusella y col,

1976), siendo la síntesis de DNA previa a la expresión del fenotipo adipocítico un requisito indispensable en ambos casos (Kuri-Harcuch y Marsch-Moreno, 1983). Steinberg y Brownstein (1982) describieron evidencias favorables al segundo modelo y sugieren que el compromiso a la diferenciación se adquiere en una parte de la población celular cuya progenie es capaz de acumular lípidos en respuesta a moduladores como la insulina y constituyen grupos clonalmente relacionados durante la conversión.

El acoplamiento entre el estado de reposo y la expresión del fenotipo diferenciado, se ha explicado proponiendo que los preadipocitos, antes de expresar el fenotipo adipocítico, están en un estado de reposo diferente al que se encuentran las células cuyo crecimiento ha sido bloqueado por falta de suero o de nutrientes; este estado de reposo localizado en algún punto específico de la fase  $G_1$  del ciclo celular se ha denominado  $G_D$  (Scott y col, 1982a, 1982b). Se sugiere que los preadipocitos en  $G_D$  se caracterizan por su capacidad de diferenciación sin la síntesis de DNA y por su sensibilidad al efecto mitogénico de la metil-isobutil xantina, a diferencia de las células en otros estados de reposo (Scott y col, 1982a, 1982b). Al iniciarse la diferenciación de las células situadas en  $G_D$ , éstas entran a un estado de diferenciación no terminal denominado  $G_D$ , que se caracteriza por la expresión del fenotipo adipocítico; finalmente se alcanza la diferenciación terminal; tanto  $G_D$  como  $G_D$ , son estados reversibles a partir de los cuales las células pueden proliferar con un estímulo adecuado, o pueden continuar hacia la diferenciación terminal (Scott y col, 1982b). Se ha demostrado

que  $G_D$  y el proceso de diferenciación son eventos separables que dependen de factores plasmáticos distintos (Krawisz y Scott, 1982). La diferenciación posiblemente está acompañada por cambios en la disponibilidad de la cromatina a la transcripción durante el estado de reposo alcanzado antes de la expresión del fenotipo adipocítico. Esta posibilidad se sugiere por los cambios abruptos en la actividad de la enzima poli-ADP (ribosa) sintetasa, que se presentan después que ha cesado la síntesis de DNA y antes de la aparición del fenotipo adipocítico (Pekala y col, 1981).

#### Conversión adipocítica de las células 3T3 in vivo.

A pesar de que las células 3T3 se diferencian en cultivo adquiriendo características morfológicas y bioquímicas similares a las células de tejido adiposo, las condiciones en cultivo no necesariamente pueden corresponder a las que predominan durante el desarrollo del tejido adiposo; además las células 3T3 son una línea celular establecida con características que las hacen diferentes de las células de cultivos primarios (Todaro y Green, 1963). Green y Kehinde (1979) inocularon por vía subcutánea en ratones atímicos, células 3T3-F442A que todavía no habían iniciado la conversión adipocítica. Las células inoculadas se diferenciaron formando cojinetes de tejido graso histológicamente similares al tejido adiposo del animal. Estos cojinetes mostraron abundante vascularización, que se correlaciona con la secreción de factores angiogénicos por estas células (Castellot y col, 1980, 1982). Estos resultados muestran que

las células 3T3-F442A pueden ser un modelo adecuado para el estudio del desarrollo y fisiología del tejido adiposo.

### Antecedentes.

Como ya se mencionó, la conversión adipocítica de las células 3T3 puede bloquearse con ácido retinoico en concentraciones que varían entre  $10^{-6}M$  y  $10^{-5}M$  (Murray y Russell, 1980; Kuri-Harcuch, 1982); este efecto va acompañado por cambios en la morfología celular (Kuri-Harcuch, 1982) al igual que en otros tipos celulares tratados con el retinoide (Jetten y col, 1979; Shapiro y Poon, 1979), así como por una disminución en la densidad de saturación (Kuri-Harcuch, 1982). Los cambios en la morfología celular inducidos por los retinoides en diversos sistemas, parecen estar relacionados con modificaciones en la adhesión (Adamo y col, 1979; Jetten y col, 1979) y son ocasionados, en parte, por un aumento en la cantidad de fibronectina sintetizada y adsorbida a la superficie celular (Jetten y col, 1979; Hassell y col, 1978; 1979). Una de las primeras manifestaciones de la conversión adipocítica son los cambios en la morfología celular (Green y Meuth, 1974; Green y Kehinde, 1976) y en el citoesqueleto (Spiegelman y Green, 1980; Spiegelman y Farmer, 1982), y se sugiere que estos últimos regulan la expresión del fenotipo adipocítico (Spiegelman y Ginty, 1982); la adición de fibronectina al medio de cultivo inhibe la diferenciación, mientras que el uso de drogas que desorganizan el citoesqueleto la promueven (Spiegelman y Ginty, 1982).

Estas evidencias plantean la posibilidad de que el ácido retinoico inhiba la conversión adipocítica a través de un efecto estabilizador sobre el citoesqueleto.

Por otra parte, la conversión adipocítica depende de un factor sérico cuya carencia en el medio de cultivo, no permite la iniciación de la diferenciación (Kuri-Harcuch y Green, 1978). Resultados preliminares mostraron que cultivos paralelos de células 3T3-F442A cuya conversión se inhibió por efecto del ácido retinoico y/o por ausencia del factor adipogénico en el medio de cultivo, cuando se estimularon a diferenciarse en medio adipogénico no presentaron el mismo grado de conversión adipocítica. Este comportamiento, aparentemente dependió de las condiciones de inhibición de la diferenciación, y sugirió que el efecto del ácido retinoico sobre la diferenciación de los preadipocitos 3T3 pudiera involucrar un mecanismo diferente al que se observa cuando el factor adipogénico no se encuentra en el medio de cultivo.

El objetivo de este trabajo consistió en examinar el comportamiento de marcadores de diferenciación que permitieran establecer algunas de las características de la inhibición de la conversión adipocítica por el ácido retinoico; también se analizó la relación que guarda el citoesqueleto con la acción del retinoide. Como marcadores de diferenciación se seleccionó la enzima glicerolfosfato deshidrogenasa (EC 1.1.1.8) y la enzima málica (EC 1.1.1.40), que parecen corresponder a una enzima "primaria" y a una enzima "secundaria" respectivamente, en el proceso de

conversión adipocítica (Kuri-Harcuch y col, 1978).

## MATERIAL Y METODOS.

### Materiales.

La d-biotina, el fosfato de dihidroxiacetona sal de litio, la nicotinamida adenina dinucleótido forma reducida (NADH), el fosfato de nicotinamida adenina dinucleótido sal monosódica (NADP), la insulina de páncreas bovino forma cristalina, la poli-d-lisina bromhidrato, el clorhidrato de trietanolamina, el ácido trans-retinoico, la citocalasina B, el reactivo de Polfn-Ciocalteu 2.0 N, el dimetil sulfóxido y el rojo oleoso O se obtuvieron de Sigma Chemical Co.; la albúmina bovina forma cristalina y el ácido L(-)málico se obtuvieron de Calbiochem. El TRIS (Tris(hidroximetil)aminometano) y el 2-mercaptoetanol se obtuvieron de Bio-Rad Laboratories. La fibronectina humana se obtuvo de Collaborative Research. El SDS (lauril sulfato de sodio) se obtuvo de BDH Chemical Ltd y el Sephadex G-50 de Pharmacia Fine Chemicals. El suero fetal de bovino se obtuvo de Microbiological Associates; el suero de ternera y el suero de gato se obtuvieron de Colorado Serum Co.

Se emplearon las siguientes soluciones amortiguadoras:

- I. Tris 50 mM pH 7.4, EDTA 1.0 mM, 2-mercaptoetanol 1.0 mM.
- II. Tris 25 mM pH 7.5, EDTA 1.0 mM.
- III. Tris-HCl 45 mM pH 7.4,  $MgCl_2$  4.5 mM.

## Métodos.

### Cultivos de células.

Las células 3T3-F442A (Green y Kehinde, 1976), se inocularon en medio de Eagle modificado por Dulbecco-Vogt (DMEM) suplementado con 7% de suero de ternera a una densidad de  $6 \times 10^3$  células por caja de cultivo de 35 mm. Tres días después del inóculo los cultivos se cambiaron al medio definitivo, adipogénico o no adipogénico y éste se cambió cada tercer día. Los cultivos se mantuvieron a 36°C en una atmósfera humidificada de 90% de aire y 10% de CO<sub>2</sub>.

El medio adipogénico consistió en medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal de bovino, insulina 5 µg/ml y biotina 10<sup>-7</sup>M. El medio no adipogénico consistió en medio DMEM suplementado con 5% de suero de gato, insulina 5 µg/ml, biotina 10<sup>-7</sup>M y fibronectina humana 0.3 µg/ml; las cajas de cultivo se recubrieron previamente con poli-D-lisina para evitar el despegamiento de la monocapa celular.

### Recubrimiento de las cajas de cultivo con poli-D-lisina.

El recubrimiento con poli-D-lisina se realizó por el método de MacKeehan y Ham (1976). Una solución de poli-D-lisina-HBr en agua a una concentración de 0.1 mg/ml se esterilizó por filtración y se agregaron 0.5 ml de la solución por cada caja de 35 mm cubriendo toda la superficie de ésta; se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos al término de los cuales se retiró la solución de poli-D-lisina y se lavó la superficie de la caja con 3 ml de agua bidestilada estéril. El lavado se repitió ya que la presencia del polímero básico libre puede inhibir la proliferación celular.

#### Tratamiento con ácido retinoico.

El ácido retinoico se preparó a una concentración de  $10^{-2}$ M en alcohol etílico absoluto, y se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$  en la oscuridad por no más de 2 semanas. Una muestra alícuota de la solución concentrada de ácido retinoico se agregó a 100 ml de medio para obtener una concentración final de  $10^{-5}$ M ó  $10^{-6}$ M; la concentración final de etanol en el medio de cultivo no excedió el 0.1%. Todos los procedimientos donde se utilizó el ácido retinoico se llevaron al cabo en condiciones de baja iluminación.

#### Tratamiento con citocalasina B.

Se preparó una solución concentrada de citocalasina B disolviendo 5 mg del reactivo en 1.0 ml de dimetil sulfóxido (DMSO). Esta solución se adicionó al medio de cultivo a una concentración final de 2  $\mu\text{g/ml}$  durante tres días a partir del día 11 de cultivo.

#### Obtención de los extractos celulares.

Los extractos celulares totales se obtuvieron por el procedimiento de Kuri-Harcuch y Green (1977). El medio de cultivo se descartó y las células se lavaron 3 veces con solución salina de fosfatos (PBS), cuidando de no despegar la monocapa. Se adicionaron 0.1 ml de solución amortiguadora I y las células se despegaron con un gendarme de hule, repitiéndose 2 veces esta operación. La suspensión celular se sonicó a  $4^{\circ}\text{C}$  y a 40 W durante 3 segundos en un sonicador Lab-Line ultratip labsonic system 9100 (Lab-Line Instruments Inc.). El sonicado se centrifugó a 12,000 rpm durante

3 minutos a 4°C en una centrifuga Eppendorf 5412 (Brinkmann). Se obtuvo el sobrenadante libre de lípidos y se filtró en una columna de Sephadex G-50 de 3 ml de volumen total previamente equilibrada con la solución amortiguadora I. La columna se eluyó con la misma solución y se colectó el volumen de exclusión, el cual contenía las actividades enzimáticas a determinar. Los extractos celulares se dividieron en muestras alícuotas de 0.1 a 0.15 ml y se almacenaron a -70°C hasta su utilización. La cromatografía de filtración en gel se realizó para eliminar los compuestos de bajo peso molecular, principalmente aquellos que podrían interferir con las determinaciones de la actividad enzimática.

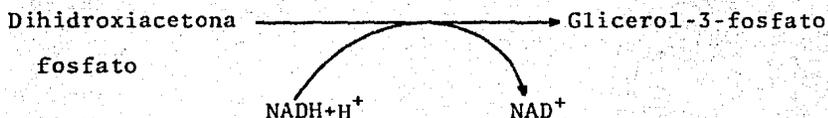
#### Determinación de las actividades enzimáticas.

La actividad de la glicerolfosfato deshidrogenasa se determinó por el método de Kozak y Jensen (1974) modificado por Kuri-Harcuch y col (1978). La mezcla de incubación de 0.3 ml de volumen total consistió de 0.06 ml de NADH 1.2 mM disuelto en trietanolamina 500 mM EDTA 12.5 mM, de 0 a 0.21 ml de extracto celular conteniendo de 1 a 20 µg de proteína, y solución amortiguadora II hasta completar 0.3 ml de volumen total; la reacción se inició agregando 0.03 ml de solución de DHAP 2.0 mM. Las concentraciones finales en la mezcla de incubación fueron: trietanolamina 100 mM pH 7.5; EDTA 3.3 mM; NADH 0.24 mM y DHAP 0.2 mM.

Las determinaciones se realizaron por duplicado y la reacción se detuvo con 0.03 ml de SDS al 20% siendo el consumo de sustrato menor al 20% del total y la reacción enzimática lineal. Se determinó la desaparición de NADH (formación de NAD) por disminución de la

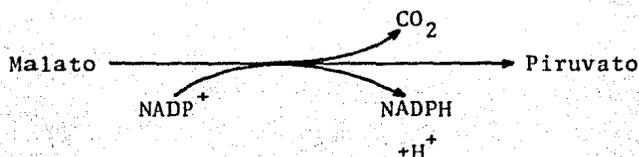
absorbencia a 340 nm.

La reacción catalizada por esta enzima es:



La actividad de la enzima mállica (L-malato: NADP oxidorreductasa (descarboxilante) EC 1.1.1.40) se determinó por el método de Wise y Ball (1964). La mezcla de incubación de 0.3 ml de volumen total consistió de 0.02 ml de una solución de NADP 6 mM, hasta 0.10 ml de extracto celular conteniendo 6  $\mu\text{g}$  de proteína total y solución amortiguadora III hasta completar 0.3 ml de volumen total. La mezcla se preincubó durante 5 minutos a 30°C, y la reacción se inició agregando 5  $\mu\text{l}$  de una solución de L-malato 34 mM; la incubación se continuó a 30°C hasta que la reacción se detuvo con 0.03 ml de SDS al 20% alcanzando un consumo máximo de sustrato de 20% del total; se determinó la reducción del NADP por incremento de la absorbencia a 340 nm. Las concentraciones finales en la mezcla de incubación fueron: 27 mM de Tris-HCl pH 7.4, 2.7 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 0.4 mM de NADP y 0.56 mM de L-malato.

La reacción catalizada por esta enzima es:



### Cálculos de la actividad enzimática.

El cálculo de la actividad específica de las enzimas se realizó por la ecuación de Lambert-Beer:

$$A = \epsilon \cdot c \cdot l$$

donde:

A = absorbencia a la longitud de onda empleada.

$\epsilon$  = coeficiente de extinción molar del sustrato.

c = concentración del sustrato.

l = longitud del paso de luz en la celda.

De esta ecuación, al despejar c, se obtiene:

$$c = \frac{A}{\epsilon \cdot l}$$

Como la actividad se midió por el cambio en la concentración de sustrato -desaparición de NADH para la glicerolfosfato deshidrogenasa y formación de NADPH para la enzima málica- a través del cambio en la absorbencia a 340 nm, la ecuación se puede expresar como:

$$\Delta c = \frac{\Delta A}{\epsilon \cdot l}$$

Puesto que la actividad específica de una enzima se define como la cantidad de sustrato utilizada por mg de proteína por minuto, es necesario considerar el tiempo de incubación, la cantidad de proteína en el ensayo y el volumen total de la mezcla de incubación; por lo tanto, el cálculo de la actividad específica puede realizarse por la siguiente ecuación:

$$\Delta c = \frac{\Delta A}{\epsilon \cdot l} \times \frac{Vol (ml)}{t (min)} \times \frac{10^{-3} (l)}{mg \text{ prot.}}$$

Se empleó un coeficiente de extinción milimolar de  $6.22 \times 10^{-6}$

litros  $\text{nmoles}^{-1}/\text{cm}$  a 340 nm para el NADH o el NADPH; el paso de luz fue de 1 cm. Por lo tanto la actividad específica se calculó por:

$$\text{a.e.} = \frac{\Delta A}{(6.22 \times 10^{-6} \text{ nmoles}^{-1} \frac{\text{litros}}{\text{cm}})} \times \frac{0.3 \text{ ml}}{1 \text{ cm}} \times \frac{10^{-3} \text{ lts}}{\text{mg prot.}} \times \frac{1}{\text{min.}}$$

es decir:

$$\text{a.e.} = \frac{\Delta A}{(6.22 \times 10^{-3} \text{ nmoles}^{-1}) (\text{min})} \times \frac{0.3 \text{ ml}}{\text{mg prot.}}$$

donde  $\Delta A = A_0 - A_f$ , siendo  $A_0$  el valor de absorbencia inicial (correspondiente al promedio de absorbencia de las incubaciones en  $t = 0'$ ) y  $A_f$  el valor de absorbencia al detener la reacción.

#### Tinción de lípidos intracelulares por el método del rojo oleoso O.

Para la tinción de lípidos intracelulares en los cultivos de células 3T3-F442A, se empleó el método del rojo oleoso (Humason, 1972). Se descartó el medio de cultivo y las células se fijaron con formaldehído al 10% (v/v) en PBS a 5°C, por un período mínimo de 30 minutos. Los cultivos fijados se lavaron con agua de 1 a 2 minutos y se tiñeron con una solución de rojo oleoso O" en alcohol isopropílico al 50% durante 2 horas a temperatura ambiente; se lavaron con agua de 1 a 2 minutos y se dejaron secar a temperatura ambiente.

#### Determinación de proteínas.

Las proteínas se determinaron por el método de Lowry y col., (1951) utilizando albúmina bovina como referencia.

## RESULTADOS.

### Determinación de las actividades enzimáticas.

La actividad de las enzimas se determinó en extractos de células 3T3-F442A para definir las condiciones del tiempo de incubación y de la concentración de proteínas en el ensayo. Las condiciones de incubación se determinaron tanto en extractos de alta actividad enzimática, como en los de baja actividad específica. En el caso de la glicerolfosfato deshidrogenasa, los resultados mostraron que para los extractos de alta actividad enzimática las condiciones de ensayo son de 1 a 5  $\mu\text{g}$  de proteína y de 1 a 5 minutos de incubación, mientras que para los extractos de baja actividad son de 20  $\mu\text{g}$  de proteína y de 30 a 60 minutos de incubación (Fig. 1). En el caso de la enzima málica, la cantidad de proteína en el ensayo fue de 6  $\mu\text{g}$  y el tiempo de incubación fue de 20 minutos para los extractos de alta actividad específica y de 60 minutos para los extractos de baja actividad (Fig. 2). En estas condiciones la reacción para ambas enzimas se encontraba en su fase lineal y con un consumo de sustrato no mayor del 20%.

### Inactivación de las reacciones enzimáticas.

Los ensayos de la actividad de GPDH y de la enzima málica inicialmente se realizaron registrando el cambio continuo de absorbencia durante el desarrollo de la reacción. Se intentó modificar este procedimiento para determinar en forma simultánea la actividad enzimática en varios extractos celulares. La modificación para ambas enzimas consistió en detener la reacción

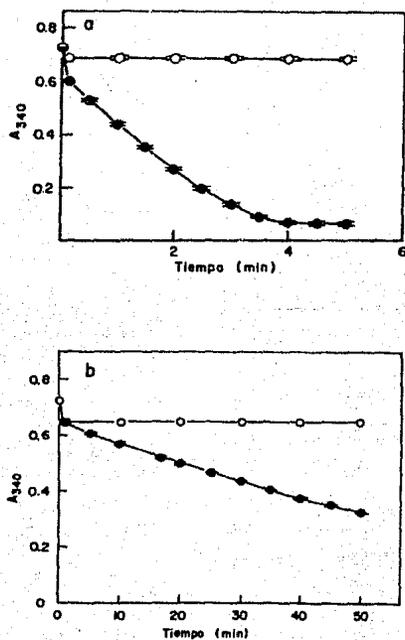


Figura 1. Cinética de actividad de la enzima glicerolfosfato deshidrogenasa en extractos de células 3T3-F442A.

a). Extractos de alta actividad enzimática obtenidos de células cultivadas durante 12 días; b) extractos de baja actividad enzimática obtenidos de células cultivadas durante 7 días. (O) Incubación sin DHAP; (●) incubación en presencia de DHAP. En ambos casos se utilizaron 5  $\mu$ g de proteína por ensayo para un volumen final de 300  $\mu$ l en la mezcla de incubación; los cambios de absorbencia se registraron a 340 nm. Se muestran promedios de 2 determinaciones.

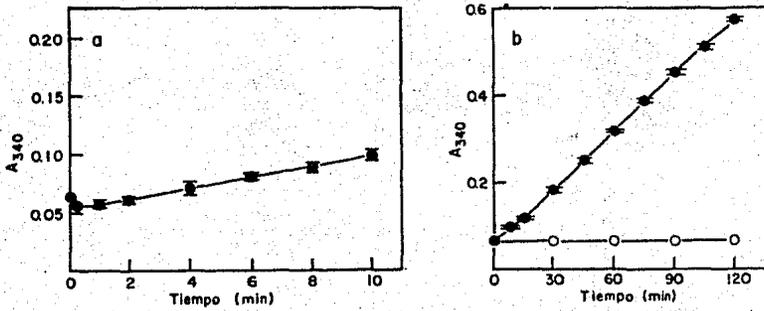


Figura 2. Cinética de actividad de la enzima málica en extractos de células 3T3-F442A.

a). Tiempos cortos de incubación; b). Tiempos largos de incubación. (O) Incubación sin L-malato; (●) incubación en presencia de L-malato. Las determinaciones se realizaron en extractos obtenidos de células cultivadas durante 13 días incubando 25  $\mu\text{g}$  de proteína por ensayo. Se muestran promedios de 2 determinaciones.

enzimática con 2.0% de SDS al finalizar el tiempo de incubación. Se hicieron incubaciones con extractos de alta y baja actividad de ambas enzimas. Se midió el cambio de absorbencia a 340 nm durante la reacción enzimática y después de detenerla con 0.03 ml de SDS al 20%. Una vez agregada la solución de SDS, se determinó la absorbencia a 340 nm y se registró a intervalos de 15 min durante una hora. En la figura 3 se observa que el SDS detuvo ambas reacciones enzimáticas ya que la absorbencia se mantuvo estable durante un tiempo mínimo de una hora. Tampoco se presentaron cambios en la absorbencia debido a una degradación no enzimática del NADH o NADPH. La disminución en la absorbencia que se observó al agregar la solución de SDS al 20% se debió a la dilución de la mezcla de incubación. Este decremento, que siempre fue de un 10% aproximadamente, se consideró para efectuar los cálculos de actividad específica y para hacer las correcciones respecto al volumen de 0.3 ml de la mezcla de incubación. El tiempo cero de reacción se determinó en todos los ensayos agregando SDS antes de iniciar la reacción enzimática.

Efecto del ácido retinoico sobre la morfología de las células 3T3-F442A.

Células 3T3-F442A se cultivaron en condiciones que inhiben la conversión adipocítica manteniéndolas en medio suplementado con 10% de suero fetal de bovino (medio adipogénico) conteniendo  $10^{-6}$  ó  $10^{-5}M$  de ácido retinoico, o en medio suplementado con 5% de suero de gato (medio no-adipogénico) con o sin ácido retinoico: a partir del día 11 de inóculo, cultivos paralelos se cambiaron a medio suplementado

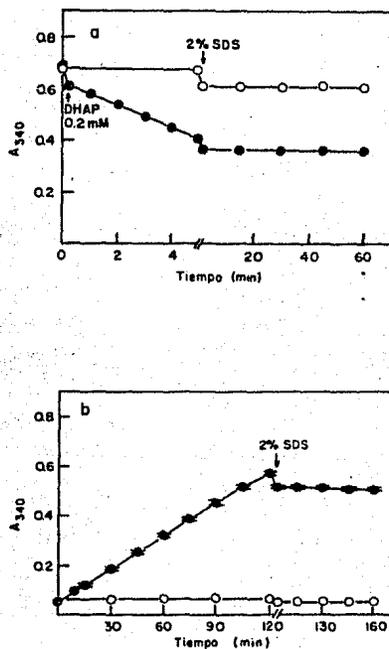


Figura 3. Inactivación de las reacciones enzimáticas con SDS al 20%.

a). Actividad de glicerolfosfato deshidrogenasa; b). Actividad de la enzima málica. (○) Incubación sin sustrato; (●) incubación en presencia del sustrato (los sustratos fueron DHAP en el caso de la glicerolfosfato deshidrogenasa y L-malato en el caso de la enzima málica). Se efectuaron incubaciones de extractos de células 3T3-F442A siguiendo el cambio de absorbencia durante la reacción enzimática y también después de agregar 30  $\mu$ l de SDS al 20% a la mezcla de incubación.

con suero fetal de bovino. Simultáneamente, otros cultivos se mantuvieron en medio adipogénico durante todo el tiempo del experimento. Los cultivos en medio adipogénico mostraron los cambios característicos de la conversión adipocítica descritos por Green y Meuth (1974) y Green y Kehinde (1976), pero las células tratadas con ácido retinoico mostraron una morfología aplanada y alargada con algunas células de aspecto redondeado y refringente, algunas formando grupos bien definidos. Efectos similares se observaron cuando las células se cultivaron en medio no-adipogénico conteniendo  $10^{-5}M$  de ácido retinoico; las células mostraron una forma más alargada y aplanada, orientándose en haces paralelos. Estas observaciones coinciden con los cambios morfológicos causados por el ácido retinoico en las células 3T3-F442A (Kuri-Harcuch, 1982). Las células mantenidas en medio no-adipogénico y en ausencia de ácido retinoico presentaron una tendencia a sobrelaparse dando la impresión de ser más numerosas; esto es congruente con resultados descritos anteriormente, en los cuales el retinoide disminuye la densidad de saturación de las células 3T3-F442A (Kuri-Harcuch, 1982).

#### Cambios en la actividad de las enzimas lipogénicas.

Los niveles de actividad de la glicerolfosfato deshidrogenasa y de la enzima málica se determinaron en extractos de cultivos paralelos. Las células que se mantuvieron en medio adipogénico mostraron los cambios de actividad característicos de la conversión adipocítica (Kuri-Harcuch y Green, 1977; Kuri-Harcuch y col, 1978).

La actividad de la glicerolfosfato deshidrogenasa aumentó más de 100 veces en los cultivos que habían alcanzado una conversión adipocítica casi completa y se mantuvo constante hasta el final del experimento (Fig. 4a); la actividad de la enzima málica aumentó durante la diferenciación hasta un nivel 14 veces mayor respecto a las células antes de iniciar la conversión adipocítica (Fig. 4b). Las células que se mantuvieron con medio no-adipogénico o con medio adipogénico conteniendo  $10^{-6}M$  ó  $10^{-5}M$  de ácido retinoico presentaron niveles bajos de ambas actividades enzimáticas, similares a los que se observan cuando las células se encuentran en la fase de crecimiento exponencial (Figs. 4a y 4b) o en células que no se diferencian a adipocitos como las células de la línea 3T3-C2 (Kuri-Harcuch y Green, 1977).

La inhibición de la conversión adipocítica por el ácido retinoico es reversible si las células se mantienen en medio adipogénico después de retirar el retinoide del medio de cultivo (Kuri-Harcuch, 1982). Con el propósito de determinar la velocidad de reversión de la inhibición de la conversión adipocítica y si ésta es modulada por la concentración del retinoide, se determinó la actividad de la glicerolfosfato deshidrogenasa y de la enzima málica en extractos de células 3T3-F442A cuya conversión se bloqueó manteniéndolas en medio adipogénico con  $10^{-6}M$  ó  $10^{-5}M$  de ácido retinoico o en medio no-adipogénico con o sin el retinoide, hasta el día 11 de cultivo, a partir del cual los cultivos se cambiaron a medio adipogénico sin ácido retinoico. La figura 5a muestra

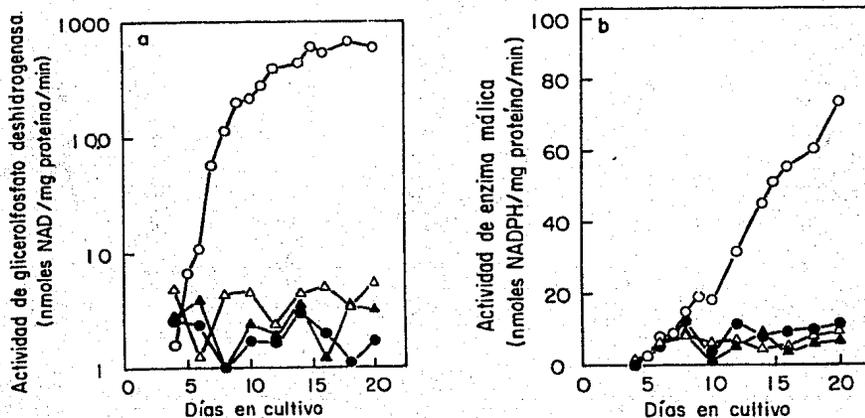


Figura 4. Cambios en la actividad de las enzimas lipogénicas durante la conversión adipocítica de las células 3T3.

Células 3T3-F442A se cultivaron en cajas de cultivo de 35 mm de diámetro. Las actividades de: a) glicerolfosfato deshidrogenasa y de b) enzima málica se determinaron en extractos celulares de los mismos cultivos. Cultivos en medio no-adipogénico (▲); cultivos en medio adipogénico sin ácido retinoico (O) o en medio adipogénico conteniendo  $10^{-6}M$  (●) ó  $10^{-5}M$  (Δ) de ácido retinoico. Los valores son el promedio de cultivos duplicados; la variación entre los valores de los duplicados no fue mayor del 5%.

que los cultivos que alcanzaron el estado de reposo en medio no-adipogénico y después fueron estimulados a diferenciarse en medio adipogénico, presentaron la actividad de la glicerolfosfato deshidrogenasa 24 horas después del cambio a medio adipogénico, aumentando cerca de 140 veces el valor de actividad durante la inhibición (Fig. 5a). Las células cultivadas en medio adipogénico conteniendo  $10^{-6}M$  ó  $10^{-5}M$  de ácido retinoico también se diferenciaron cuando se eliminó el retinoide del medio de cultivo; la actividad de la glicerolfosfato deshidrogenasa aumentó hasta en 100 veces respecto a su actividad inicial. La tasa de cambio de la actividad enzimática fue muy semejante a la de los cultivos no tratados con el retinoide. Sin embargo, los cultivos tratados con ácido retinoico  $10^{-6}M$  y  $10^{-5}M$  expresaron el aumento en la actividad de la glicerolfosfato deshidrogenasa 2 y 4 días después de cambiar las células a condiciones adipogénicas en ausencia del retinoide respectivamente (Fig. 5a). Las células mantenidas en medio no-adipogénico conteniendo ácido retinoico  $10^{-5}M$  iniciaron la conversión adipocítica después que los cultivos mantenidos con medio adipogénico y tratados con la misma concentración del retinoide. En este caso, la glicerolfosfato deshidrogenasa se expresó 6 días después que se inició la reversión; la actividad de esta enzima se modificó bruscamente aumentando 140 veces en un intervalo de 2 días (Fig. 5a).

La enzima málica, en todos los casos, presentó un comportamiento semejante aumentando de 8 a 14 veces su nivel respecto a su actividad antes del cambio a medio adipogénico. La actividad de esta enzima,

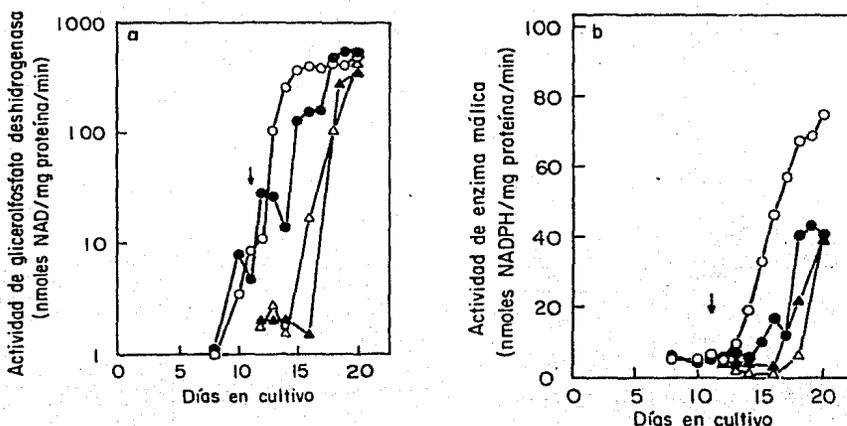


Figura 5. Actividades enzimáticas en cultivos confluentes después de revertir la inhibición de la conversión adipocítica por ácido retinoico.

Células 3T3-F442A se cultivaron en cajas de cultivo de 35 mm de diámetro. Las actividades de: a) glicerolfosfato deshidrogenasa y de b) enzima málica se determinaron en extractos celulares de los mismos cultivos. Cultivos en medio no-adipogénico sin ácido retinoico (O) o conteniendo  $10^{-5}$ M de ácido retinoico (▲); cultivos en medio adipogénico conteniendo  $10^{-6}$ M (●) ó  $10^{-5}$ M (Δ) de ácido retinoico. Después que las células llegaron a confluencia y se mantuvieron en el estado de reposo durante 5 días (día 11 de cultivo), todos los cultivos se cambiaron a medio adipogénico en ausencia del retinoide. Los valores son el promedio de cultivos duplicados; la variación entre los valores de los duplicados no fue mayor del 5%.

en los cultivos que revirtieron del efecto del ácido retinoico  $10^{-6}M$  ó  $10^{-5}M$ , se expresó con un retraso de 3 días respecto al aumento en la actividad de la glicerolfosfato deshidrogenasa; en los cultivos mantenidos previamente en medio no-adipogénico con o sin el retinoide, la actividad de ambas enzimas se manifestó en forma casi simultánea (Fig. 5b).

#### Efecto de la citocalasina B.

Recientemente se demostró que la adición de fibronectina al medio de cultivo bloquea la conversión adipocítica, mientras que drogas como la citocalasina D facilitan la expresión de este fenotipo diferenciado (Spiegelman y Ginty, 1982). Esto sugiere que la organización del citoesqueleto podría regular la activación de genes específicos durante la conversión adipocítica (Spiegelman y Ginty, 1982). Debido a que el ácido retinoico y otros retinoides inhiben la conversión adipocítica y promueven la adquisición de una forma más alargada y probablemente más fuertemente adherida al sustrato (Kuri-Harcuch, 1982), es probable que el ácido retinoico inhiba la conversión adipocítica a través de una acción estabilizadora del citoesqueleto. Con el propósito de estudiar esta posibilidad, los filamentos de actina de las células tratadas con el retinoide se despolimerizaron por el tratamiento con citocalasina B (Brenner y Korn, 1980; Flanagan y Lin, 1980; Maness y Walsh, 1982; Yahara y col, 1982) y se analizó su efecto sobre la conversión adipocítica.

Inicialmente se determinó si la citocalasina B previene el bloqueo de la conversión adipocítica inducido por el ácido retinoico.

Células mantenidas en reposo con medio adipogénico conteniendo ácido retinoico  $10^{-5}M$  o con medio no-adipogénico con o sin ácido retinoico  $10^{-5}M$  se estimularon a diferenciarse, a partir del día 11 de cultivo, con medio adipogénico conteniendo diferentes concentraciones de citocalasina B. El tratamiento con citocalasina B se llevó al cabo durante 3 días, después de los cuales las células se mantuvieron durante otros 3 días en ausencia de la citocalasina B. Los cultivos se fijaron con formaldehído al 10% en PBS, y las células se tiñeron con rojo oleoso O. Para obtener datos cuantitativos, se midió la cantidad de luz absorbida por los cultivos teñidos mediante un método fotocolorimétrico (Kuri-Harcuch, datos no publicados). En la figura 6a se observa que la citocalasina B aumentó la conversión adipocítica de las células cuya diferenciación se bloqueó con el ácido retinoico, siendo más notable el efecto de esta droga a una concentración de 2.0  $\mu g/ml$ . No se observó un aumento significativo de la conversión adipocítica en los cultivos mantenidos con medio no-adipogénico (Fig. 6a).

En un experimento similar, las células se incubaron con 2.0  $\mu g/ml$  de citocalasina B durante 1 a 4 días después de haber retirado el ácido retinoico del medio de cultivo. En la figura 6b se observa que el mayor grado de conversión adipocítica se obtuvo con 1, 2 y 3 días de tratamiento, no existiendo una diferencia significativa entre éstos. El tratamiento con citocalasina B durante 4 días disminuyó la conversión adipocítica (Fig. 6b).

En resumen, los resultados muestran que la citocalasina B a

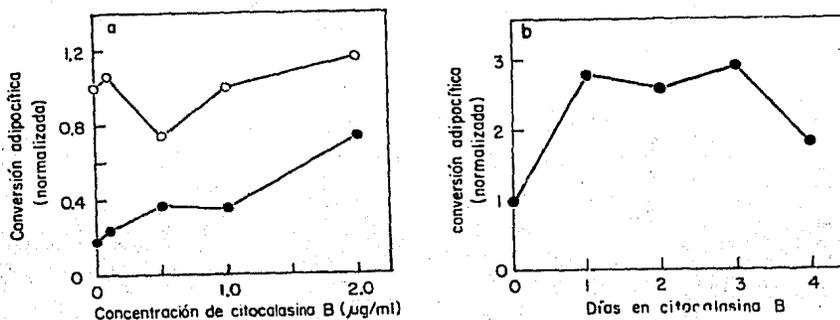


Figura 6. Efecto de la citocalasina B sobre la conversión adipocítica.

Células 3T3-F442A se cultivaron en medio adipogénico conteniendo  $10^{-5}$  M de ácido retinoico; el día 11 de cultivo las células se cambiaron a medio adipogénico en ausencia del retinoide (●), pero conteniendo citocalasina B. a). Diferentes concentraciones de citocalasina B durante 3 días; b). 2.0 µg/ml de citocalasina B durante 1 a 4 días de cultivo. La citocalasina B se retiró del medio de cultivo y las células se mantuvieron hasta los 18 días de cultivo. Las células se fijaron y se tiñeron con rojo oleoso O; la conversión adipocítica se cuantificó fotocolorimétricamente. Los resultados están referidos respecto al porcentaje de conversión alcanzado por cultivos mantenidos en medio no-adipogénico y que se cambiaron a medio adipogénico sin la citocalasina B, normalizados a un valor de 1.0 (O).

una concentración de 2.0 µg/ml durante 1 a 3 días, aumenta de 2 a 3 veces el grado de conversión adipocítica.

Efecto de la citocalasina B sobre la conversión adipocítica de células tratadas con ácido retinoico.

Células 3T3-F442A que se cultivaron en presencia de  $10^{-5}$ M de ácido retinoico se incubaron con 2.0 µg/ml de citocalasina B durante 3 días a partir del día 11 después de la inoculación; los cultivos se fijaron y tñieron con rojo oleoso O el día 18 de cultivo y se determinó el grado de conversión adipocítica. En la tabla 2 se observa que los cultivos suplementados con medio adipogénico conteniendo  $10^{-5}$ M de ácido retinoico o suplementados con medio no-adipogénico, ya sea tratados o no tratados con citocalasina B, no mostraron conversión adipocítica. Cuando el ácido retinoico se quitó del medio de cultivo y las células se cambiaron a medio adipogénico, se observó un nivel bajo de conversión adipocítica (tabla 2); sin embargo, después de quitar el ácido retinoico y cultivar las células con medio adipogénico conteniendo citocalasina B, el grado de conversión adipocítica fue similar al observado en las células no tratadas con el retinoide y suplementadas con medio adipogénico (tabla 2).

Por otra parte, las actividades de la glicerolfosfato deshidrogenasa y de la enzima málica se determinaron para analizar si el aumento de la conversión adipocítica en las células tratadas con citocalasina B se debe a una iniciación más temprana de la diferenciación. Células 3T3-F442A se cultivaron en medio adipogénico

Tabla 2. Efecto de la citocalasina B sobre la conversión adipocítica de células 3T3-F442A.

Condiciones de cultivo	Adición	Conversión adipocítica (normalizada)
S. de gato ↓ S. fetal de bovino	—————	1.0
S. de gato	—————	0.0
S. de gato	CB 2.0 µg/ml	0.0
S. fetal de bovino + AR 10 <sup>-5</sup> M	—————	0.07
S. fetal de bovino + AR 10 <sup>-5</sup> M	CB 2.0 µg/ml	0.14
S. fetal de bovino + AR 10 <sup>-5</sup> M ↓ S. fetal de bovino	—————	0.18
S. fetal de bovino + AR 10 <sup>-5</sup> M ↓ S. fetal de bovino	CB 2.0 µg/ml	0.73

Células 3T3-F442A se cultivaron con medio no-adipogénico o con medio adipogénico conteniendo 10<sup>-5</sup>M de ácido retinoico (AR); a los 11 días después de la inoculación algunos de los cultivos se cambiaron a medio adipogénico sin ácido retinoico. Los cultivos que se indican se trataron con 2.0 µg/ml de citocalasina B (CB) durante 3 días; se retiró la CB y se mantuvieron con el mismo medio durante 3 días más. A los 18 días de cultivo, las células se fijaron y tiñeron con rojo oleoso O y se determinó el grado de conversión adipocítica como se describe en la figura 6.

o medio no-adipogénico, ambos conteniendo  $10^{-5}$ M de ácido retinoico; a los 11 días después de la inoculación se cambiaron a medio adipogénico sin el retinoide y se trataron con citocalasina B durante 3 días, cultivos paralelos no recibieron la CB. La actividad de la glicerolfosfato deshidrogenasa en los cultivos tratados con CB aumentó 2-3 días antes que la actividad de los cultivos no tratados con esta droga (Fig. 7a, b). La enzima málica presentó una respuesta similar a la de la glicerolfosfato deshidrogenasa; la actividad aumentó antes en los cultivos tratados con citocalasina B que en los no tratados (Fig. 8a, b). Sin embargo, las células que se trataron con citocalasina B pero que constantemente se cultivaron con medio no-adipogénico o con medio adipogénico conteniendo  $10^{-5}$ M de ácido retinoico, no mostraron ningún aumento en la actividad de la glicerolfosfato deshidrogenasa (Fig. 7c).

#### DISCUSION.

Los resultados obtenidos muestran que la inhibición de la diferenciación de las células 3T3-F442A por efecto del ácido retinoico, se acompaña por cambios en la morfología celular y por niveles de actividad de la glicerolfosfato deshidrogenasa y de la enzima málica similares a los observados en células en proliferación o que no sufren la conversión adipocítica como las células de la línea 3T3-C2 (Kuri-Harcuch y Green, 1977); algunos

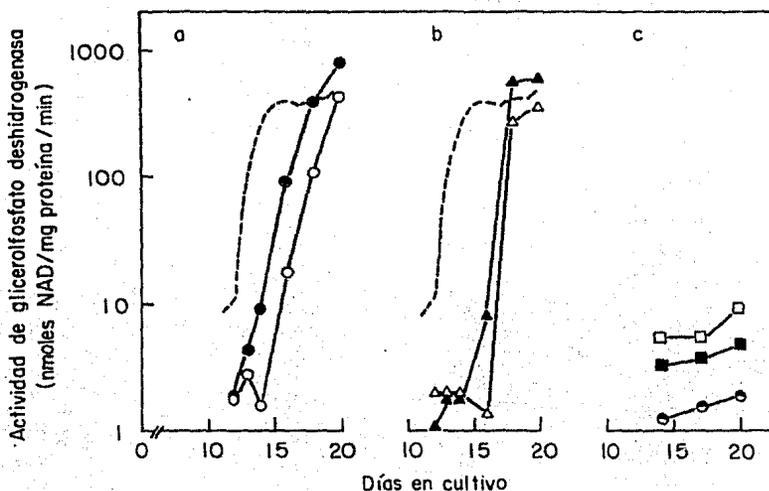


Figura 7. Efecto de la citocalasina B sobre la actividad de la glicerolfosfato deshidrogenasa.

Las células 3T3-F442A se cultivaron como se describe en la figura 2. a). Medio adipogénico; b). Medio no-adipogénico, ambos conteniendo  $10^{-5}M$  de ácido retinoico. A los 11 días después de la inoculación todos los cultivos se cambiaron a medio adipogénico sin el retinoide; algunos cultivos se incubaron con  $2.0 \mu g/ml$  de citocalasina B durante 3 días al tiempo de retirar el ácido retinoico ( $\bullet$ ,  $\blacktriangle$ ), otros cultivos paralelos no se incubaron con citocalasina B ( $\circ$ ,  $\Delta$ ). En c) las células se cultivaron constantemente con medio no-adipogénico ( $\square$ ); con medio adipogénico ( $\blacksquare$ ) o medio no-adipogénico ( $\odot$ ) ambos conteniendo  $10^{-5}M$  de ácido retinoico; todos los cultivos se incubaron con citocalasina B, como se describe para a) y b). La actividad de la glicerolfosfato deshidrogenasa se determinó en extractos celulares totales. Los valores son el promedio de cultivos duplicados; la variación entre los valores de los duplicados no fue mayor del 5%. La línea discontinua muestra la actividad enzimática de los cultivos suplementados con medio no-adipogénico y que se cambiaron a medio adipogénico (datos obtenidos de la figura 2a).

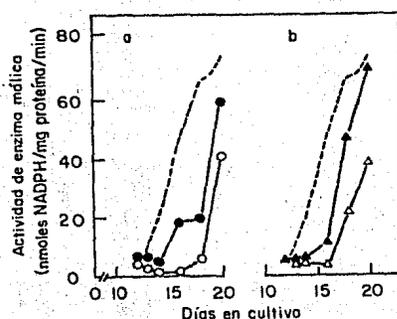


Figura 8. Efecto de la citocalasina B sobre la actividad de la enzima mállica.

El experimento se realizó como se describe en la figura 7a, b. a). Medio adipogénico; b); medio no-adipogénico, ambos conteniendo  $10^{-5}$ M de ácido retinoico. Cultivos incubados con citocalasina B (●, ▲); cultivos incubados sin citocalasina B (○, △). La línea discontinua muestra la actividad enzimática de los cultivos suplementados con medio no-adipogénico que se cambiaron a medio adipogénico (datos obtenidos de la figura 2b).

de los resultados también son similares a los obtenidos con la sintetasa de los ácidos grasos en la sublínea 3T3-L2 (Murray y Russell, 1980). La inhibición de la conversión adipocítica es reversible (Kuri-Harcuch, 1982); el inicio de la reversión trae como consecuencia la aparición de las características morfológicas y enzimáticas del fenotipo adipocítico después de un período cuya duración depende fundamentalmente de la concentración del ácido retinoico en el medio de cultivo durante el bloqueo de la conversión. Efectos dependientes de la concentración y del tiempo de tratamiento con retinoides se han descrito en diversos sistemas (Jetten y col, 1979; Haddox y Russell, 1979; Haddox y col, 1979; Lotan y col, 1980, 1982; Rapaport y col, 1982; Douer y Koeffler, 1982a, 1982b); en el caso de los cultivos tratados con ácido retinoico  $10^{-6}$  ó  $10^{-5}$ M, el período necesario para que se iniciara la conversión adipocítica varió entre 2 y 4 días, respectivamente.

El tratamiento con ácido retinoico  $10^{-5}$  ó  $10^{-6}$ M modifica la expresión de las enzimas lipogénicas durante la reversión del bloqueo de la conversión adipocítica; mientras los cultivos que se mantuvieron en medio adipogénico mostraron cambios simultáneos en la actividad de la glicerolfosfato deshidrogenasa y de la enzima málica, los cultivos mantenidos en presencia del retinoide expresaron la actividad de la enzima málica con un retraso de 3 días aproximadamente respecto al cambio en la actividad de la enzima glicerolfosfato deshidrogenasa.

Durante la diferenciación, los preadipocitos 3T3 sufren una

serie de cambios morfológicos (Green y Meuth, 1974; Green y Kehinde, 1976) que se encuentran estrechamente relacionados con una reorganización del citoesqueleto (Novikoff y col, 1980; Spiegelman y Green, 1980), y cambios en la síntesis de proteínas que lo constituyen (Sidhu, 1979; Spiegelman y Green, 1980; Spiegelman y Farmer, 1982). Spiegelman y Ginty (1982) demostraron que la adición de fibronectina al medio de cultivo bloqueó el fenómeno de conversión adipocítica y drogas como la citocalasina D facilitaron la expresión del fenotipo diferenciado; esto sugirió que la organización del citoesqueleto pudiera regular la activación de genes específicos durante la conversión adipocítica (Spiegelman y Ginty, 1982). La fibronectina, glicoproteína relacionada con el citoesqueleto (Hynes y Destree, 1978; Singer, 1979; Singer y Chen, 1980) y con fenómenos de adhesión celular (Yamada y Olden, 1978; Hynes y col, 1979), bloquea los cambios morfológicos característicos que se presentan durante la diferenciación de condrocitos (Pennypacker y col, 1979; Nest y col, 1979). También se ha demostrado que el ácido retinoico puede bloquear la condrogénesis (Hassell y col, 1978; Lewis y col, 1978) produciendo un aumento en la adsorción de fibronectina a la superficie celular, así como un ligero aumento en la síntesis de ésta (Hassell y col, 1979); este aumento en la síntesis de fibronectina inducido por los retinoides se describió en otros sistemas (Jetten y col, 1979; Bolmer y Wolf, 1982) incluyendo las células 3T3 (Jetten y col, 1979). El incremento en la cantidad de fibronectina en la superficie celular se ha correlacionado con el

aumento en la adhesión que inducen los retinoides (Adamo y col, 1979). Estos datos sugieren que el ácido retinoico induce la estabilización del citoesqueleto y un aumento en la adhesión de las células 3T3-F442A, efecto que se refleja en los cambios morfológicos observados durante el tratamiento con el retinoide y que ya han sido descritos con anterioridad (Kuri-Harcuch, 1982).

El tratamiento con citocalasina B no previno la inhibición producida por el ácido retinoico, pero en los cultivos cuya conversión se bloqueó con el ácido retinoico  $10^{-5}M$  hasta el día 11 de cultivo, adelantó 2 días el inicio de la diferenciación respecto a los cultivos que durante la reversión no fueron tratados con esta droga (Figs. 7 y 8). Se observó el mismo retraso en la expresión de la enzima málica respecto al inicio del aumento en la actividad de la glicerolfosfato deshidrogenasa. El inicio de la conversión en los cultivos tratados con citocalasina B aún mostró diferencias respecto a los cultivos controles donde se inició la conversión a partir de condiciones no-adipogénicas, existiendo una diferencia de 1.5 días aproximadamente. Estos resultados permiten concluir que a pesar de que el ácido retinoico ejerce una acción estabilizadora sobre el citoesqueleto, este efecto no interviene directamente sobre la inhibición de la conversión adipocítica; en caso contrario, podría esperarse que el tratamiento con citocalasina B per se permitiera la diferenciación en aquellos cultivos donde el retinoide se mantuvo en el medio de cultivo durante todo el desarrollo experimental. Esto

concuerta con los resultados obtenidos por Kuri-Harcuch (1982) en cultivos en suspensión estabilizados con metilcelulosa, donde las condiciones de cultivo no favorecen la estabilización del citoesqueleto, pero permiten la inhibición de la diferenciación por el ácido retinoico. Por lo tanto, aunque los cambios en la organización del citoesqueleto son una de la primeras manifestaciones del proceso de conversión, estos sólo forman una parte del programa de diferenciación siendo indispensable que ocurran otros cambios, muchos de ellos hasta ahora desconocidos, para que se inicie la conversión adipocítica. El efecto del retinoide sobre el citoesqueleto retardó la expresión del fenotipo adipocítico una vez que se inicio la reversión, sugiriendo que el ácido retinoico puede modular la expresión de la conversión adipocítica a través de una estabilización de elementos del citoesqueleto.

Cuando la conversión adipocítica se bloqueó con medio no-adipogénico conteniendo ácido retinoico  $10^{-5}M$ , el intervalo que transcurrió entre el inicio de la reversión y la aparición de los primeros indicios de diferenciación fue aún mayor que el observado en los cultivos mantenidos con medio adipogénico conteniendo el retinoide; parece ser que la presencia del factor adipogénico es necesaria durante el bloqueo de la conversión con el ácido retinoico para que este intervalo sea menor.

Las diferencias encontradas en el comportamiento de las enzimas, principalmente el retardo en la expresión de la enzima málica respecto a la glicerolfosfato deshidrogenasa sugiere que

ambas enzimas se regulan de manera independiente y no coordinada, resultado que concuerda con el concepto de que la glicerolfosfato deshidrogenasa es una enzima primaria en el programa de diferenciación; su respuesta es independiente de la síntesis de lípidos celulares, mientras que la expresión de la enzima málica depende de la síntesis de ácidos grasos (Kuri-Harcuch y col, 1978; Spiegelman y Green, 1980).

Las diferencias en la duración del intervalo necesario para que se manifieste el proceso de conversión en los preadipocitos 3T3 durante la reversión de la inhibición por el ácido retinoico, sugieren la posibilidad de que el estado de reposo en que están las células durante la inhibición de la diferenciación es diferente del que se encuentran los cultivos cuya conversión se evitó al mantener las células en medio no-adipogénico. Se ha sugerido que el ácido retinoico bloquea la progresión de las células a través del ciclo celular en un punto localizado en la parte media de la fase  $G_1$  (Haddox y Russell, 1979; Haddox y col, 1979; Lotan y col, 1982) por lo que el retinoide podría bloquear la etapa de proliferación selectiva de adipocitos que antecede a la expresión del fenotipo adipocítico (Pairault y Green, 1979; Kuri-Harcuch y Marsh-Moreno, 1983). Otra posibilidad de explicar el efecto del retinoide es con base en el modelo propuesto por Scott y colaboradores (1982a; 1982b). En este caso, el retinoide induciría un estado de reposo  $G_D$  a partir del cual los preadipocitos podrían expresar el fenotipo adipocítico sin atravesar por un período crítico de síntesis de DNA; este estado sería diferente del que están las células cultivadas en medio no-adipogénico, donde el estado de reposo inducido es

previo a un período de síntesis de DNA necesario para la conversión adipocítica (Kuri-Harcuch y Marsch-Moreno, 1983). Sin embargo, el tratamiento con citocalasina B en los cultivos que revierten de la inhibición por el ácido retinoico parece indicar que el bloqueo inducido por el retinoide es anterior a la síntesis de DNA. Esto se basa en las observaciones de que la citocalasina B inhibe la síntesis de DNA en diversos sistemas incluyendo las células 3T3 (O'Neill, 1979; Maness y Walsh, 1982), y de que la aplicación de esta droga en los cultivos que revierten de la inhibición por  $10^{-6}M$  del retinoide manifiestan el fenotipo adipocítico en forma más tardía respecto a los cultivos que no recibieron el tratamiento con la CB (resultados no presentados).

Schroder y colaboradores (1982), han sugerido que el ácido retinoico no induce un bloqueo de la progresión del ciclo celular, sino que al inhibir en forma parcial la síntesis del DNA hace más lento el paso de las células a través de las fases S y  $G_2$  del ciclo (Schroder y col, 1982; Rapaport y col, 1982a). Las condiciones de cultivo manejadas por estos autores difieren de las empleadas en este trabajo; el tratamiento con el retinoide es de corta duración a diferencia del tratamiento empleado por nosotros para inhibir la conversión adipocítica. Esto es importante ya que se ha demostrado que la respuesta al retinoide depende del tiempo de tratamiento (Rapaport y col, 1982a, b).

El mecanismo de acción del ácido retinoico aún es desconocido. Se ha descrito la existencia de una proteína receptora

intracitoplásmica específica para este compuesto la cual podría mediar su efecto sobre genes específicos que intervienen en el programa de diferenciación; por otra parte, el retinoide también podría inducir cambios en la superficie celular a través de reacciones de glicosilación (ver Lotan, 1980) y modificar la interacción del factor adipogénico con su receptor. Este efecto podría relacionarse en parte con los cambios morfológicos inducidos por el retinoide, ya que la forma celular modula la capacidad de respuesta a hormonas y factores de crecimiento (Gospodarowicz y col, 1978).

## REFERENCIAS.

- 1). Adamo, S; De Luca, L.M.; Akalovsky, I. & Bhat, P.V. (1979) Retinoid-induced adhesion in cultured transformed mouse fibroblasts. *J. Natl. Cancer Inst.*, 62: 1473-1477.
- 2). Ahmad, P.M.; Russell, T.R. & Ahmad, F. (1979) Increase in fatty acid synthetase content of 3T3-L cells undergoing spontaneous and chemically induced differentiation to adipocytes. *Biochem. J.* 182: 509-514.
- 3). Angus, C.W. & Lane, M.D. (1981) Increase in translatable mRNA for mitochondrial pyruvate carboxylase during differentiation of 3T3 preadipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 103: 1216-1222.
- 4). Bishayee, S. & Das, M. (1982) Insulin degradation in 3T3-L1 adipocytes: Role of the endocytic lysosomal pathway. *Arch. Biochem. Biophys.* 214: 425-430.
- 5). Bolmer, S.D. & Wolf, G. (1982) Stimulation of fibronectin production by retinoic acid in mouse skin tumors. *Cancer Res.* 42: 4465-4472.
- 6). Brenner, S.L. & Korn, E.D. (1980) The effects of cytochalasins on actin polymerization and actin ATPase provide insights into the mechanism of polymerization. *J. Biol. Chem.* 255: 841-844.
- 7). Carr, N.G. & Bradley, S. (1973) Aspects of development in blue-green algae. en: *Microbial Differentiation* (Ashworth, J.M. & Smith, J.E. eds.) 23<sup>rd</sup>. Symp. Soc. Gen. Microbiol. Cambridge University Press. G.B. p.p. 161-188.

- 8). Castellot, J.J.; Karnovsky, M.J. & Spiegelman, B.M. (1980) Potent stimulation of vascular endothelial cell growth by differentiated 3T3 adipocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 6007-6011.
- 9). Castellot, J.J.; Karnovsky, M.J. & Spiegelman, B.M. (1982) Differentiation-dependent stimulation of neovascularization and endothelial cell chemotaxis by 3T3 adipocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 5597-5601.
- 10). Coleman, R.A.; Reed, B.C.; Mackall, J.C.; Student, A.K.; Lane, M.D. & Bell, R.M. (1978) Selective changes in microsomal enzymes of triacylglycerol, phosphatidycholine, and phosphatidylethanolamine biosynthesis during differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. J. Biol. Chem. 253: 7256-7261.
- 11). Chang, T.H. & Polakis, E. (1978) Differentiation of 3T3-L1 fibroblasts to adipocytes. Effect of insulin and indomethacin on the levels of insulin receptors. J. Biol. Chem. 253: 4693-4696.
- 12). D'Armiento, M.; Johnson, G.S. & Pastan, I. (1972) Regulation of adenosine 3': 5'-cyclic monophosphate phosphodiesterase activity in fibroblasts by intracellular concentration of cyclic adenosine monophosphate. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69: 459-462.
- 13). De Asua, L.J.; Clingan, D. & Rudland, P.S. (1975) Initiation of cell proliferation in cultured mouse fibroblasts by prostaglandin F<sub>2α</sub>. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72: 2724-2728.

- 8). Castellot, J.J.; Karnovsky, M.J. & Spiegelman, B.M. (1980) Potent stimulation of vascular endothelial cell growth by differentiated 3T3 adipocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 6007-6011.
- 9). Castellot, J.J.; Karnovsky, M.J. & Spiegelman, B.M. (1982) Differentiation-dependent stimulation of neovascularization and endothelial cell chemotaxis by 3T3 adipocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 5597-5601.
- 10). Coleman, R.A.; Reed, B.C.; Mackall, J.C.; Student, A.K.; Lane, M.D. & Bell, R.M. (1978) Selective changes in microsomal enzymes of triacylglycerol, phosphatidycholine, and phosphatidylethanolamine biosynthesis during differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. J. Biol. Chem. 253: 7256-7261.
- 11). Chang, T.H. & Polakis, E. (1978) Differentiation of 3T3-L1 fibroblasts to adipocytes. Effect of insulin and indomethacin on the levels of insulin receptors. J. Biol. Chem. 253: 4693-4696.
- 12). D'Armiento, M.; Johnson, G.S. & Pastan, I. (1972) Regulation of adenosine 3': 5'-cyclic monophosphate phosphodiesterase activity in fibroblasts by intracellular concentration of cyclic adenosine monophosphate. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69: 459-462.
- 13). De Asua, L.J.; Clingan, D. & Rudland, P.S. (1975) Initiation of cell proliferation in cultured mouse fibroblasts by prostaglandin F<sub>2α</sub>. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72: 2724-2728.

- 14). De Luca, L.M. (1977) The direct involvement of vitamin A in glycosyl transfer reactions of mammalian membranes. *Vitam. Horm.* 35: 1-57,
- 15). Dorsey, J.K. & Roth, S. (1974) The effect of polyprenols on cell surface galactosyltransferase activity. en: *Control of Proliferation in Animal Cells* (Clarkson, B. & Baserga, R. eds) Cold Spring Harbor Conferences on Cell Proliferation vol 1 Cold Spring Harbor Laboratory. p.p. 533-539.
- 16). Douer, D. & Koeffler, H.P. (1982a) Retinoic acid enhances colony-stimulating factor-induced clonal growth of normal human myeloid progenitor cells in vitro. *Exp. Cell Res.* 138: 193-198.
- 17). Douer, D. & Koeffler, H.P. (1982b) Retinoic acid enhances growth of human early erythroid progenitor cells in vitro. *J. Clin. Invest.* 69: 1039-1041.
- 18). Dworkin, M. (1973) Cell-cell interactions in the Myxobacteria. en: *Microbial Differentiation* (Ashworth, J.M. & Smith, J.E. eds) 23<sup>rd</sup>. Symp. Soc. Gen. Microbiol. Cambridge University Press. G.B. p.p. 125-142.
- 19). Flanagan, M.D. & Lin, S. (1980) Cytochalasins block actin filament elongation by binding to high affinity sites associated with F-actin. *J. Biol. Chem.* 255: 835-838.
- 20). Freytag, S.O. & Utter, M.F. (1980) Induction of pyruvate carboxylase apoenzyme and holoenzyme in 3T3-L1 cells during differentiation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 77: 1321-1325.

- 21). Fuchs, E. & Green, H. (1981) Regulation of terminal differentiation of cultured human keratinocytes by vitamin A. *Cell* 25: 617-625.
- 22). Garrod, D. & Ashworth, J.M. (1973) Development of the cellular slime mould Dictyostelium discoideum. en: *Microbiol Differentiation*. (Asworth, J.M. & Smith, J.E. eds) 23<sup>rd</sup>. Sym. Soc. Gen. Microbiol. Cambridge University Press. G.B. p.p. 407-435.
- 23). Gospodarowicz, D.; Greenburg, G. & Birdwell, C.R. (1978) Determination of cellular shape by the extracellular matrix and its correlation with the control of cellular growth. *Cancer Res.* 38: 4155-4171.
- 24). Green, H. & Kehinde, O. (1974) Sublines of mouse 3T3 cells that accumulate lipid. *Cell* 1: 113-116.
- 25). Green, H. & Kehinde, O. (1975) An established preadipose cell line and its differentiation in culture II. Factors affecting the adipose conversion. *Cell* 5: 19-27.
- 26). Green, H. & Kehinde, O. (1976) Spontaneous heritable changes leading to increased adipose conversion in 3T3 cells. *Cell* 7: 105-113.
- 27). Green, H. & Kehinde, O. (1979) Formation of normally differentiated subcutaneous fat pads by an established preadipose cell line. *J. Cell Physiol.* 101: 169-172.
- 28). Green, H. & Meuth, M. (1974) An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture. *Cell* 3: 127-133.
- 29). Grimaldi, P.; Négrel, R. & Ailhaud, G. (1978) Induction of the triglyceride pathway enzymes and of lipolytic enzymes

during differentiation in a "preadipocyte" cell line.

Eur. J. Biochem. 84: 369-376.

- 30). Gusella, J.; Geller, R.; Clarke, B.; Weeks, V. & Housman, D. (1976) Commitment to erythroid differentiation by Friend erythroleukemia cells: a stochastic analysis. *Cell* 9: 221-229.
- 31). Haddox, M.K.; Frasier Scott, K.F. & Russell, D.H. (1979) Retinol inhibition of ornithine decarboxylase induction and G<sub>1</sub> progression in chinese hamster ovary cells. *Cancer Res.* 39: 4930-4938.
- 32). Haddox, M.K. & Russell, D.H. (1979) Cell cycle-specific locus of vitamin A inhibition of growth. *Cancer Res.* 39: 2476-2480.
- 33). Hassell, J.R.; Pennypacker, J.P.; Kleinman, H.K.; Pratt, R.M. & Yamada, K.M. (1979) Enhanced cellular fibronectin accumulation in chondrocytes treated with vitamin A. *Cell* 17: 821-826.
- 34). Hassell, J.R.; Pennypacker, J.P.; Yamada, K.M. & Pratt, R.M. (1978) Changes in cell surface proteins during normal and vitamin A-inhibited chondrogenesis in vitro. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 312: 406-409.
- 35). Hayashi, I.; Nixon, T.; Morikawa, M. & Green, H. (1981) Adipogenic and anti-adipogenic factors in the pituitary and other organs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 3969-3972.
- 36). Holtzer, H. (1970) Proliferative and quantal cell cycles in the differentiation of muscle, cartilage, and red blood cells. *en: Control Mechanisms in the Expression of Cellular Phenotypes.*

- (H.A. Padykula ed.) Symp. Int. Soc. Cell. Biol.  
Academic Press N.Y. vol 9. p.p. 69-88.
- 37). Humason, G.L. (1972) Animal Tissue Techniques. 3<sup>rd</sup> ed.  
W.H. Freeman and Co. San Francisco. p.p. 307-308.
- 38). Hynes, R.O. & Destree, A.T. (1978) Relationships between  
fibronectin (LETS protein) and actin. Cell 15: 875-886.
- 39). Hynes, R.O.; Destree, A.T.; Perkins, M.E. & Wagner, D.D. (1979)  
Cell surface fibronectin and oncogenic transformation.  
J. Supramol. Struct. 11: 95-104.
- 40). Jetten, A.M.; Jetten, M.E.R.; Shapiro, S.S. & Poon, J.P. (1979)  
Characterization of the action of retinoids on mouse fibroblast  
cell lines. Exp. Cell Res. 119: 289-299.
- 41). Karlsson, F.A.; Grunfeld, C.; Kahn, C.R. & Roth, J. (1979)  
Regulation of insulin receptors and insulin responsiveness in  
3T3-L1 fatty fibroblasts. Endocrinology 104: 1383-1392.
- 42). Karnieli, E.; Zarnowski, M.J.; Hissin, P.J.; Simpson, I.A.;  
Salans, L.B. & Cushman, S.W. (1981) Insulin-stimulated  
translocation of glucose transport systems in the isolated  
rat adipose cell. Time course, reversal, insulin concentration  
dependency and relationship to glucose transport activity. J.  
Biol. Chem. 256: 4772-4777.
- 43). Kasturi, R. & Joshi, V.C. (1982) Hormonal regulation of  
stearoyl coenzyme A desaturase activity and lipogenesis  
during adipose conversion of 3T3-L1 cells. J. Biol. Chem.  
257: 12224-12230.

- 44). Kawamura, M.; Jensen, D.F.; Wancewicz, E.V.; Joy, L.L.; Khoo, J.C. & Steinberg, D. (1981) Hormone-sensitive lipase in differentiated 3T3-L1 cells and its activation by cyclic AMP-dependent protein kinase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 732-736.
- 45). Konigsberg, I.R. (1963) Clonal analysis of myogenesis. Science 140: 1273-1284.
- 46). Kozak, L.P. & Jensen, J.T. (1974) Genetic and developmental control of multiple forms of L-glycerol 3-phosphate dehydrogenase. J. Biol. Chem. 249: 7775-7781.
- 47). Krawisz, B.R. & Scott, R.E. (1982) Coupling of preadipocyte growth arrest and differentiation I. Induction by heparinized medium containing human plasma. J. Cell Biol. 94: 394-399.
- 48). Kuri-Harcuch, W. (1982) Differentiation of 3T3-F442A cells into adipocytes is inhibited by retinoic acid. Differentiation 23: 164-169.
- 49). Kuri-Harcuch, W. & Green, H. (1977) Increasing activity of enzymes on pathway of triacylglycerol synthesis during adipose conversion of 3T3 cells. J. Biol. Chem. 252: 2158-2160.
- 50). Kuri-Harcuch, W & Green, H. (1978) Adipose conversion of 3T3 cells depends on a serum factor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 6107-6109.
- 51). Kuri-Harcuch, W. & Green, H. (1981) Suppression of the adipose conversion of 3T3 cells by acidified serum. J. Cell Physiol. 108: 455-460.

- 52). Kuri-Harcuch, W. & Marsch-Moreno, M. (1983) DNA Synthesis and cell division related to adipose differentiation of 3T3 cells. *J. Cell Physiol.* 114: 39-44.
- 53). Kuri-Harcuch, W.; Wise, L.S. & Green, H. (1978) Interruption of the adipose conversion of 3T3 cells by biotin deficiency: differentiation without triglyceride accumulation. *Cell* 14: 53-59.
- 54). Lacroix, A.; Anderson, G.D.L. & Lippman, M.E. (1980) Retinoids and cultured human fibroblasts. Effects on cell growth and presence of cellular retinoic acid-binding protein. *Exp. Cell Res.* 130: 339-344.
- 55). Lai, E.; Rosen, O.M. & Rubin, C.S. (1981) Differentiation-dependent expression of catecholamine-stimulated adenylate cyclase. Roles of the  $\beta$ -receptor and the G/F protein in differentiating 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.* 256: 12866-12874.
- 56). Lewis, C.A.; Prart, R.M.; Pennypacker, J.P. & Hassell, J.R. (1978) Inhibition of limb chondrogenesis *in vitro* by vitamin A: Alterations in cell surface characteristics. *Develop. Biol.* 64: 31-47.
- 57). Liao, G.; Ong, D.E. & Chytil, F. (1981) Interactions of the retinol/cellular retinol-binding protein complex with isolated nuclei and nuclear components. *J. Cell Biol.* 91: 63-68.
- 58). Linder, S.; Krondahl, U.; Sennerstram, R. & Ringertz, N.R. (1981) Retinoic acid-induced differentiation of F9 embryonal carcinoma cells. *Exp. Cell Res.* 132: 453-460.

- 59). Lotan, R. (1980) Effects of vitamin A and its analogs (retinoids) on normal and neoplastic cells. *Biochim. Biophys. Acta* 605: 33-91.
- 60). Lotan, R.; Fischer, I.; Meromsky, L. & Moldave, K. (1982) Effects of retinoic acid on protein synthesis in cultured melanoma cells. *J. Cell Physiol.* 113: 47-55.
- 61). Lotan, R.; Kramer, R.H.; Neumann, G.; Lotan, D. & Nicolson, G.L. (1980a) Retinoic acid-induced modifications in the growth and cell surface components of a human carcinoma (HeLa) cell line. *Exp. Cell Res.* 130: 401-414.
- 62). Lotan, R.; Neumann, G. & Lotan, D. (1980b) Relationships among retinoid structure, inhibition of growth, and cellular retinoic acid-binding protein in cultured S91 melanoma cells. *Cancer Res.* 40: 1097-1102.
- 63). Lotan, R.; Neumann, G. & Deutsch, V. (1983) Identification and characterization of specific changes induced by retinoic acid in cell surface glycoconjugates of S91 murine melanoma cells. *Cancer Res.* 43: 303-312.
- 64). Lotan, R. & Nicolson, G.L. (1977) Inhibitory effects of retinoic acid or retinyl acetate on the growth of untransformed, transformed and tumor cells *in vitro*. *J. Natl. Cancer Inst.* 59: 1717-1722.
- 65). Lotan, R. & Nicolson, G.L. (1979) Heterogeneity in growth inhibition by  $\beta$ -trans-retinoic acid of metastatic B16 melanoma clones and *in vivo*-selected cell variant lines. *Cancer Res.* 39: 4767-4771.

- 66). Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L. & Randall, R.J.  
(1951) Protein measurement with the folin phenol reagent.  
J. Biol. Chem. 193: 265-275.
- 67). Mackall, J.C. & Lane, M.D. (1977) Role of pyruvate carboxylase  
in fatty acid synthesis: alterations during preadipocyte  
differentiation. Biochem. Biophys. Res. Commun. 79: 720-725.
- 68). Mackall, J.C.; Student, A.K.; Polakis, S.E. & Lane, M.D.  
(1976) Induction of lipogenesis during differentiation in a  
"preadipocyte" cell line. J. Biol. Chem. 251: 6462-6464.
- 69). Maclean, N. (1977) The differentiation of cells. University  
Park Press. G.B. p.p. 4-33.
- 70). Maness, P.F. & Walsh, R.C. (1982) Dihydrocytochalasin B  
disorganizes actin cytoarchitecture and inhibits initiation  
of DNA synthesis in 3T3 cells. Cell 30: 253-262.
- 71). McKeehan, W.L. & Ham, R.G. (1976) Stimulation of clonal growth  
of normal fibroblasts with substrata coated with basic polymers.  
J. Cell Biol. 71: 727-734.
- 72). Miller, R.E. & Carrino, D.A. (1980) Dibutyryl cyclic AMP  
decrease glutamine synthetase in cultured 3T3-L1 adipocytes.  
J. Biol. Chem. 255: 5490-5500.
- 73). Miller, R.E.; Hackenberg, R. & Gershman, H. (1978) Regulation  
of glutamine synthetase in cultured 3T3-L1 cells by insulin,  
hydrocortisone, and dibutyryl cyclic AMP. Proc. Natl. Acad.  
Sci. USA 75: 1418-1422.
- 74). Mordan, L.J. & Bertram, J.S. (1983) Retinoid effects on cell-  
cell interactions and growth characteristics of normal and

- carcinogen-treated C3H/10T 1/2 cells. *Cancer Res.* 43: 567-571.
- 75). Morikawa, M.; Nixon, T. & Green, H. (1982) Growth hormone and the adipose conversion of 3T3 cells. *Cell* 29: 783-789.
- 76). Mukherjee, B.B.; Mobry, P.M. & Pena, S.D.J. (1982) Retinoic acid induces anchorage -and density- dependent growth without restoring normal cytoskeleton, EGF binding, fibronectin content and ODC activity in a retrovirus-transformed mouse cell line. *Exp. Cell Res.* 138: 95-107.
- 77). Murray, T. & Russell, T.R. (1980) Inhibition of adipose conversion in 3T3-L2 cells by retinoic acid. *J. Supramol. Struct.* 14: 255-266.
- 78). Novikoff, A.B.; Novikoff, P.M.; Rosen, O.M. & Rubin, C.S. (1980) Organelle relationships in cultured 3T3-L1 preadipocytes. *J. Cell Biol.* 87: 180-196.
- 79). Olsson, I.L. & Breitman, T.R. (1982) Induction of differentiation of the human histiocytic lymphoma cell line U-937 by retinoic acid and cyclic adenosine 3': 5'- monophosphate-inducing agents. *Cancer Res.* 42: 3924-3927.
- 80). O'Neill, F.J. (1979) Differential effects of cytochalasin B and caffeine on control of DNA synthesis in normal and transformed cells. *J. Cell Physiol.* 101: 201-218.
- 81). Ong, D.E. & Chytil, F. (1975) Retinoic acid-binding protein in rat tissue. *J. Biol. Chem.* 250: 6113-6117.
- 82). Pairault, J. & Green, H. (1979) A study of the adipose conversion of suspended 3T3 cells by using glycerophosphate dehydrogenase

- as differentiation marker. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 5138-5142.
- 83). Pardee, A.B. (1974) A restriction point for control of normal animal cell proliferation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71: 1286-1290.
- 84). Pekala, P.H.; Lane, M.D.; Watkins, P.A. & Moss, J. (1981) On the mechanism of preadipocyte differentiation. Masking of poly(ADP-ribose) synthetase activity during differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. J. Biol. Chem. 256: 4871-4876.
- 85). Pennypacker, J.P.; Hassell, J.R.; Yamada, K.M. & Pratt, R.M. (1979) The influence of an adhesive cell surface protein on chondrogenic expression in vitro. Exp. Cell Res. 121: 411-415.
- 86). Plet, A.; Evain, D. & Anderson, W.B. (1982) Effect of retinoic acid treatment of F9 embryonal carcinoma cells on the activity and distribution of cyclic AMP-dependent protein kinase. J. Biol. Chem. 257: 889-893.
- 87). Rapaport, E.; Schroder, E.W. & Black, P.H. (1982a) Retinoic acid-promoted expansion of total cellular ATP pools in 3T3 cells can mediate its stimulatory and growth inhibitory effects. J. Cell Physiol. 110: 318-322.
- 88). Rapaport, E.; Schroder, E.W.; Kabcenell, A.K. & Black, P.H. (1982b) Correlation between activation of quiescent 3T3 cells by retinoic acid and increases in uridine phosphorylation and cellular RNA synthesis. Cancer Res. 42: 4918-4920.
- 89). Reed, B.C.; Kaufmann, S.H.; Mackall, J.C.; Student, A.K. & Lane, M.D. (1977) Alterations in insulin binding accompanying

differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 4876-4880.

- 90). Reed, B.C.; Ronnett, G.V.; Clements, P.R. & Lane, M.D. (1981) Regulation of insulin receptor metabolism. Differentiation-induced alteration of receptor synthesis and degradation. J. Biol. Chem. 256: 3917-3925.
- 91). Rosen, O.M.; Rubin, C.S.; Cobb, M.H. & Smith, C.J. (1981) Insulin stimulates the phosphorylation of ribosomal protein S6 in a cell-free system derived from 3T3-L1 adipocytes. J. Biol. Chem. 256: 3630-3633.
- 92). Rosen, O.M.; Smith, C.J.; Fung, C. & Rubin, C.S. (1978) Development of hormone receptors and hormone responsiveness in vitro. Effect of prolonged insulin treatment on hexose uptake in 3T3-L1 adipocytes. J. Biol. Chem. 253: 7579-7583.
- 93). Rothblat, G.H. (1969) Lipid metabolism in tissue culture cells. Adv. Lipid Res. 7: 135-163.
- 94). Rubin, C.S.; Hirsch, A.; Fung, C. & Rošen, O.M. (1978) Development of hormone receptors and hormonal responsiveness in vitro. Insulin receptors and insulin sensitivity in the preadipocyte and adipocyte forms of 3T3-L1 cells. J. Biol. Chem. 253: 7570-7578.
- 95). Rubin, C.S.; Lai, E. & Rosen, O.M. (1977) Acquisition of increased hormone sensitivity during in vitro adipocyte development. J. Biol. Chem. 252: 3554-3557.
- 96). Rudman, D. & Di Girolamo, M. (1967) Comparative studies on the physiology of adipose tissue. Adv. Lipid Res. 5: 35-117.

- 97). Russell, T.R. & Ho, R.J. (1976) Conversion of 3T3 fibroblasts into adipose cells. Triggering of differentiation by prostaglandin  $F_{2\alpha}$  and 1-methyl-3-isobutyl xanthine. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73: 4516-4520.
- 98). Russell, T.R. & Pastan, I.H. (1974) Cyclic adenosine 3':5'-monophosphate and cyclic guanosine 3':5'-monophosphate phosphodiesterase activities are under separate genetic control. J. Biol. Chem. 249: 7764-7769.
- 99). Sasak, W.; De Luca, L.M.; Dion, L.D. & Silverman-Jones, C.S. (1980) Effect of retinoic acid on cell surface glycopeptides of cultured spontaneously transformed mouse fibroblasts (Balb/c 3T12-3 cells). Cancer Res. 40: 1944-1949.
- 100). Sauer, H.W. (1975) Differentiation in Physarum polycephalum. In: Microbial Differentiation (Ashworth, J.M. & Smith, J.E. eds) 25<sup>th</sup> Symp. Soc. Gen. Microbiol. Cambridge University Press. G.B. p.p. 375-405.
- 101). Schroder, E.W.; Rapaport, E.; Kabcenell, A.K. & Black, P.H. (1982) Growth inhibitory and stimulatory effects of retinoic acid on murine 3T3 cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 1549-1552.
- 102). Scott, R.E.; Florine, D.L.; Wille, J.J. & Yun, K. (1982a) Coupling of growth arrest and differentiation at a distinct state in the  $G_1$  phase of the cell cycle:  $G_D$ . Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 845-849.
- 103). Scott, R.E.; Hoerl, B.J.; Wille, J.J.; Florine, D.L.; Krawisz, B.R. & Yun, K. (1982b) Coupling of preadipocyte growth arrest

- and differentiation II. A cell cycle model for the physiological control of cell proliferation. *J. Cell Biol.* 94: 400-405.
- 104). Shapiro, S.S. & Poon, J.P. (1979) Retinoic acid-induced alterations of growth and morphology in an established epithelial line. *Exp. Cell Res.* 119: 349-357.
- 105). Sidhu, R.S. (1979) Two-dimensional electrophoretic analyses of proteins synthesized during differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *J. Biol. Chem.* 254: 11111-11118.
- 106). Singer, I.I. (1979) The fibronexus: a transmembrane association of fibronectin-containing fibers and bundles of 5 nm microfilaments in hamster and human fibroblasts. *Cell* 16: 675-685.
- 107). Singer, S.J. & Chen, W.T. (1980) Fibronectin is not present in the focal adhesions formed between normal cultured fibroblasts and their substrata. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 7318-7322.
- 108). Spiegelman, B.M. & Farmer, S.R. (1982) Decreases in tubulin and actin gene expression prior to morphological differentiation of 3T3 adipocytes. *Cell* 29: 53-60.
- 109). Spiegelman, B.M. & Ginty, C.A. (1982) Cytoskeleton reorganization is required for changes in gene expression during preadipocyte differentiation. *J. Cell Biol.* 95: 59a (Abstr #2125).
- 110). Spiegelman, B.M. & Green, H. (1980) Control of specific protein biosynthesis during the adipose conversion of 3T3 cells. *J. Biol. Chem.* 255: 8811-8818.
- 111). Spiegelman, B.M. & Green, H. (1981) Cyclic AMP-mediated control of lipogenic enzyme synthesis during adipose differentiation

- of 3T3 cells. *Cell* 24: 503-510.
- 112). Spooner, P.M.; Chernick, S.S.; Garrison, M.M. & Scow, R.O. ('979) Development of lipoprotein lipase activity and accumulation of triacylglycerol in differentiating 3T3-L1 adipocytes. Effects of prostaglandin  $F_{2\alpha}$ , 1-methyl-3-isobutyl xanthine, prolactin and insulin. *J. Biol. Chem.* 254: 1305-1311.
- 113). Steinberg, M.M. & Brownstein, B.L. (1982) A clonal analysis of the differentiation of 3T3-L1 preadipose cells: Role of insulin. *J. Cell Physiol.* 113: 359-364.
- 114). Strickland, S. & Mahdavi, V. (1978) The induction of differentiation in teratocarcinoma stem cells by retinoic acid. *Cell* 15: 393-403.
- 115). Student, A.K.; Hsu, R.Y. & Lane, M.D. (1980) Induction of fatty acid synthetase synthesis in differentiating 3T3-L1 preadipocytes. *J. Biol. Chem.* 255: 4745-4750.
- 116). Swergold, G.D.; Rosen, O.M. & Rubin, C.S. (1982) Hormonal regulation of the phosphorylation of ATP citrate lyase in 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.* 257: 4207-4215.
- 117). Takahashi, S. & Zeydel, M. (1982)  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase and glutathione in aging IMR-90 fibroblasts and in differentiating 3T3-L1 preadipocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* 214: 260-267.
- 118). Takase, S.; Ong, D.E. & Chytil, F. (1979) Cellular retinol-binding protein allows specific interaction of retinol with the nucleus in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 2204-2208.

- 119). Till, J.E.; McCulloch, E.A. & Siminovitch, L. (1964)  
A stochastic model of stem cell proliferation, based on the  
growth of spleen colony-forming cells. Proc. Natl. Acad. Sci.  
USA 51: 29-36.
- 120). Todaro, G.J. & Green, H. (1963) Quantitative studies of the  
growth of mouse embryo cells in culture and their development  
into established lines. J. Cell Biol. 17: 299-313.
- 121). Wald, G. (1968) Molecular basis of visual excitation.  
Science 162: 230-239.
- 122). Watkins, P.A.; Moss, J.; Pekala, P.H. & Lane, M.D. (1982)  
Effect of differentiation on the adenylate cyclase system of  
3T3-C2 and 3T3-L1 cells: Determination of cholera toxin substrates  
in differentiating 3T3-L1 and non differentiating 3T3-C2 cells.  
J. Biol. Chem. 257: 14719-14722.
- 123). Weiss, G.H.; Rosen, O.M. & Rubin, C.S. (1980) Regulation of  
fatty acid synthetase concentration and activity during  
adipocyte differentiation. Studies on 3T3-L1 cells. J. Biol.  
Chem. 255: 4751-4757.
- 124). West, C.M.; Lanza, R.; Rosenbloom, J.; Lowe, M.; Holtzer, H.  
& Avdalovic, N. (1979) Fibronectin alters the phenotypic  
properties of cultured chick embryo chondroblasts. Cell 17:  
491-501.
- 125). Wilson, E.L. & Reich, E. (1978) Plasminogen activator in  
chick fibroblasts: Induction of synthesis by retinoic acid;  
synergism with viral transformation and phorbol ester. Cell  
15: 385-392.

- 126). Wise, E.M. & Ball, E.G. (1964) Malic enzyme and lipogenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 52: 1255-1263.
- 127). Wise, L.S. & Green, H. (1978) Studies of lipoprotein lipase during the adipose conversion of 3T3 cells. Cell 13: 233-242.
- 128). Wise, L.S. & Green, H. (1979) Participation of one isozyme of cytosolic glycerolphosphate dehydrogenase in the adipose conversion of 3T3 cells. J. Biol. Chem. 257: 14719-14722.
- 129). Wolf, G.; Kiorpes, T.C.; Masushige, S.; Schreiber, J.B.; Smith, M.J. & Anderson, R.S. (1979) Recent evidence for the participation of vitamin A in glycoprotein synthesis. Fed. Proc. 38: 2540-2543.
- 130). Yahara, I.; Harada, F.; Sekita, S.; Yoshihira, K. & Natori, S. (1982) Correlation between effects of 24 different cytochalasins on cellular structures and cellular events and those on actin in vitro. J. Cell Biol. 92: 69-78.
- 131). Yamada, K.M. & Olden, K. (1978) Fibronectins-adhesive glycoproteins of cell surface and blood. Nature 275: 179-184.