

ADIPOGÉNESIS *IN VITRO* DE CÉLULAS 3T3-L1

MARÍA ALEJANDRA CLAVIJO, QUÍMICA FARMACÉUTICA¹, DORIS GÓMEZ CAMARGO, BACTERIÓLOGA, Ph. D.^{2†}
y Claudio Gómez Alegría, Bioquímico, Ph. D.^{1,2,*}

¹ Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia.

² Grupo UNIMOL, Universidad Nacional de Colombia, Universidad de Cartagena.

Resumen

Adipogénesis es el proceso mediante el cual células multipotenciales se diferencian a adipocitos maduros para cumplir un importante papel metabólico y endocrino. El objetivo de este trabajo fue implementar en nuestro laboratorio un modelo de adipogénesis *in vitro* que nos permitiera posteriormente, estudiar mecanismos de acción farmacológica a nivel molecular. En el trabajo se describe la utilización del modelo de preadipocitos 3T3-L1 y se muestran algunas de las características de crecimiento del cultivo, así como los cambios morfológicos y celulares que acompañan el proceso de diferenciación.

Palabras clave: adipogénesis, diferenciación celular, células 3T3-L1, adipocitos.

IN VITRO ADIPOGENESIS OF 3T3-L1 CELLS

Abstract

Adipogenesis is the process by which multipotent cells are differentiated into mature fat cells to fulfill a key metabolic and endocrine role. The aim of this work was to implement in our lab an *in vitro* model of adipogenesis, to be used later on in pharmacological studies on drug action mechanisms at a molecular level. Here we describe the implementation of the pre-adipocytes 3T3-L1 model, showing some culture growth features together with a set of morphological and cellular changes accompanying the differentiation process.

Key words: adipogenesis, cell differentiation, 3T3-L1 cells, adipocytes

Introducción

La obesidad es un problema global asociado a una serie de alteraciones metabólicas y al desarrollo de enfermedades crónicas como diabetes tipo-2, enfermedades cardiovasculares, hipertensión y otras (1-16). El balance metabólico normal se mantiene a través de un sistema homeostático complejo que involucra múltiples tejidos y órganos. El tejido adiposo, antes visto como un simple depósito de lípidos, actualmente se reconoce como un importante órgano endocrino que regula el balance metabólico a través de la secreción de una variedad de hormonas (17-21.;

el tejido adiposo blanco está directamente implicado en obesidad y en cuadros patológicos asociados (22-25). Por lo tanto, el conocimiento de la biología del adipocito es crucial para la comprensión de las bases moleculares de la obesidad y las patologías asociadas (26-28).

El proceso de diferenciación mediante el cual las células mesenquimales precursoras multipotenciales dan origen a células adiposas maduras se conoce con el nombre de adipogénesis y ocurre por la activación de un programa coordinado de expresión génica mediado por factores de transcripción, el cual conduce a

† Durante la elaboración del trabajo estuvo vinculada como profesor titular de la UNMG.

* Correspondencia: cjgomeza@unal.edu.co Dirección postal: Universidad Nacional de Colombia, Ciudad Universitaria. Departamento de Farmacia. Carrera 30 No. 45-03, Bogotá DC. Colombia.

Recibido: Mayo 24 de 2007. Aceptado: Julio 18 de 2007.

cambios en la actividad, en la cantidad, o ambos, de proteínas claves en la fisiología del adipocito como por ejemplo, las implicadas en la homeostasis de los lípidos y la glucosa (29,30).

Como parte de un proyecto que tiende a estudiar el mecanismo molecular mediante el cual los agonistas del receptor activado por el proliferador del peroxisoma- γ (PPAR- γ), regulan la expresión de caveolina, una proteína importante para la fisiología del adipocito (31-35), se hizo necesario implementar en nuestro laboratorio un modelo de adipogénesis *in vitro*. Para ello escogimos el modelo 3T3-L1, ampliamente utilizado (36), dentro de los diversos modelos con que se dispone en la actualidad para estudiar el proceso de adipogénesis.

Materiales y métodos

Cultivo y propagación de las células 3T3-L1

La línea de fibroblastos 3T3-L1, una línea celular de preadipocitos comprometida a diferenciarse a adipocitos y derivada de células embrionarias de ratón (37,38), se adquirió de la ATCC (*American Type Culture Collection*) y se mantuvo de acuerdo a las especificaciones del proveedor. Las células se sembraron a una densidad inicial de 1000 células/cm² sobre frascos de cultivo T25 (25 cm² de área superficial) que contenían 7 ml de medio completo DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) con suero fetal bovino (FBS) 10% y antibióticos (penicilina 100 U/ml y estreptomycin 100 μ g/ml). El cultivo se mantuvo a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5% y cada dos días se cambiaba el medio. Entre cuatro y cinco días después de la siembra inicial, cuando el cultivo llegó a una confluencia del 60%-80% las células se desprendieron con una solución de Tripsina-EDTA al 0,25%. Dependiendo del destino de las células, se pasaron a frascos nuevos T25, o a placas de 24 pozos. La criopreservación de las células se realizó en nitrógeno líquido, en medio completo suplementado con dimetilsulfóxido (DMSO) al 5% (v/v) (0,5-1 \times 10⁶ células/ml; 1 ml/vial).

Curvas de crecimiento

Las células se sembraron sobre placas de 24 pozos a una densidad inicial de 1000 ó 3000 células/cm² (4000 ó 12000 células por ml, respectivamente) en el medio de crecimiento (0,5 ml por pozo). A distintos tiempos de crecimiento (ver resultados), las células se despegaron con solución de Tripsina-EDTA

y se realizó el recuento de células viables, para lo cual se mezcló la suspensión celular con solución de azul tripán al 0,4% (en PBS) en proporción 1:1, haciendo el conteo celular en cámara de Neubauer. El número de células viables se graficó en función del tiempo de crecimiento del cultivo. Cada punto experimental corresponde al recuento promedio de dos pozos (duplicados). Las curvas de crecimiento se construyeron graficando los puntos experimentales y la ecuación que describe el crecimiento poblacional del cultivo es:

$$N(t) = \frac{K}{1 + ((K/N_0) - 1)e^{-rt}}$$

en donde N_0 y $N(t)$ corresponden a la densidad de la población a tiempo cero y t , respectivamente, K es un parámetro conocido como capacidad de carga (máxima población sostenible) y r es el *parámetro maltusiano* (tasa de crecimiento poblacional máxima) (39-41). El ajuste de los datos a la ecuación se hizo por el método de los mínimos cuadrados con ayuda de la herramienta solver de Excel (Microsoft Office 2003).

Diferenciación in vitro de las células 3T3-L1

Se sembraron 6000 células por pozo 3T3-L1 en placas de 24 pocillos y se dejaron crecer en medio completo hasta alcanzar confluencia. A los dos días posconfluencia los pozos se clasificaron en dos grupos: control y diferenciado. El grupo diferenciado se trató con medio de diferenciación (medio de crecimiento suplementado con 3-isobutil-1-metilxantina 0,5 mM, dexametasona 1 μ M e insulina 1,7 μ M). El grupo control se trató con medio de crecimiento conteniendo una concentración equivalente de DMSO y metanol al del grupo diferenciado; esto porque los aditivos proadipogénicos provienen de soluciones stock preparadas en tales solventes. El medio control o diferenciado se mantuvo por 48 horas, tiempo después del cual las células se cambiaron a medio completo hasta la finalización del experimento, con cambios de medio cada dos días (42;43). Todos los experimentos se hicieron con células de los pases dos a ocho.

Tinción con Oil Red O

A distintos tiempos del proceso de diferenciación (0, 3, 6 y 9 días) las células se fijaron con solución de formaldehído al 10% durante una hora a temperatura ambiente, se lavaron con isopropanol al 60% y se dejaron secar. A continuación se les adicionó

solución de Oil Red O (3,5 g por l en isopropanol) por 20 minutos. Se removió la solución y se lavó inmediatamente con isopropanol al 100% seguido de cuatro lavados con agua destilada (44,45). Las células teñidas se observaron al microscopio y se tomaron las respectivas fotografías.

Resultados

Las células 3T3-L1, derivadas de células embrionicas de ratón y empleadas como un modelo clásico de adipogénesis *in vitro*, son células comprometidas a diferenciarse (46,47). En cultivo, cuando no están diferenciadas, presentan una morfología típica de fibroblastos (figura 1. por lo que también se les conoce como fibroblastos 3T3-L1.

Las curvas de crecimiento obtenidas con cultivos, partiendo de diferente densidad inicial de células (No): 4000 ó 12000 células por ml (equivalente a sembrar 2000 ó 6000 células por pozo) se observan en la figura 2. A partir del ajuste de los datos a la ecuación logística descrita en materiales y métodos, se estimaron los parámetros que describen el crecimiento celular: tasa máxima de crecimiento (r) y tamaño poblacional máximo (K) (tabla 1.. El cultivo con 12000 células por ml iniciales presentó una tasa de crecimiento aparentemente mayor (12%) y un tamaño poblacional máximo también mayor (42%) respecto del cultivo de inferior No (tabla 1., pero se requiere repetir los experimentos para determinar si los cambios son o no estadísticamente significativos.

Adicionalmente, se estudió de manera preliminar, el efecto de tres sueros FBS diferentes: dos de ellos importados de Europa y Estados Unidos y el tercero



FIGURA 1. Fibroblastos 3T3-L1 en fase exponencial de crecimiento. Fotografía tomada durante la fase exponencial de crecimiento en medio completo (Magnificación de 200x).

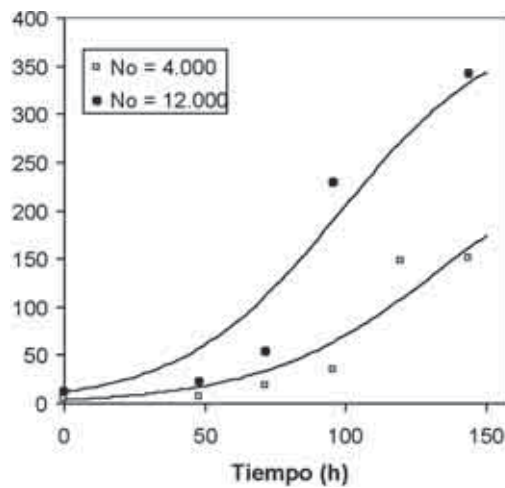


FIGURA 2. Curvas de crecimiento de células 3T3-L1. Células sembradas a una densidad inicial (No) de 4000 (□) ó 12000 (●) células por ml fueron crecidas a 37°C. A los tiempos indicados en la figura se realizó recuento celular según lo descrito en materiales y métodos. Cada curva representa el recuento promedio de dos pozos. La línea sólida de cada curva representa el mejor ajuste de los datos experimentales a la ecuación logística.

TABLA 1. Parámetros de crecimiento poblacional. r y K (ambos en células por ml) se obtuvieron a partir del ajuste de los datos a la ecuación logística, de acuerdo a lo descrito en materiales y métodos.

No	r	K
4000	0,0315	281502
12000	0,0353	400000

de origen nacional. De ellos, los sueros FBS certificado de Estados Unidos y el nacional se comportaron de manera similar, en el sentido de que se observó un crecimiento celular normal Sin embargo, los resultados con el suero FBS europeo no fueron los esperados, observándose dos efectos claros: i) las células tuvieron un crecimiento más lento; ii) el cultivo no llegó al 100% de confluencia, fluctuando entre 70% y 80% (los datos acerca de los tres sueros no se muestran).

En la figura 3 se muestran las imágenes de microscopía óptica de las células 3T3-L1 a distintos tiempos de diferenciación (adipogénesis). Se puede apreciar que durante el proceso de adipogénesis ocurrió un notable cambio en la morfología celular, manifestado ya a los tres días de diferenciación: las células diferenciadas son de mayor tamaño y se muestran más

redondeadas que las del grupo control, especialmente a tiempos largos (nueve días) de diferenciación. Adicional al cambio de forma se observó que las células diferenciadas, en contraste a las del grupo control, acumularon gotas de lípidos en su citoplasma, lo cual se visualizó por tinción con el colorante Oil Red-O, que tiñe de rojo los lípidos acumulados en el citoplasma (figura 4). La tinción fue muy tenue a los tres días de diferenciación, pero el número de gotas teñidas y su tamaño aumentaron a tiempos posteriores de diferenciación (seis y nueve días de adipogénesis), resultado que revela que a largos tiempos de diferenciación se acumula una mayor cantidad de lípidos en el citoplasma. Un efecto adicional que se observó de manera consistente fue que aproximadamente el 50% de las células en diferenciación tendieron a levantarse de la superficie de la placa de cultivo (se despegan) luego de dos días de diferenciación y en

estos momentos se trabaja en identificar la causa de este hallazgo.

Las células 3T3-L1 fueron crecidas a confluencia y dos días después tratadas con medio completo (grupo control) o medio de diferenciación (grupo diferenciado) según descrito en materiales y métodos. A los tiempos indicados, las células fueron fotografiadas al microscopio óptico.

Discusión

La diferenciación de células precursoras en células adiposas maduras conduce a la formación de una

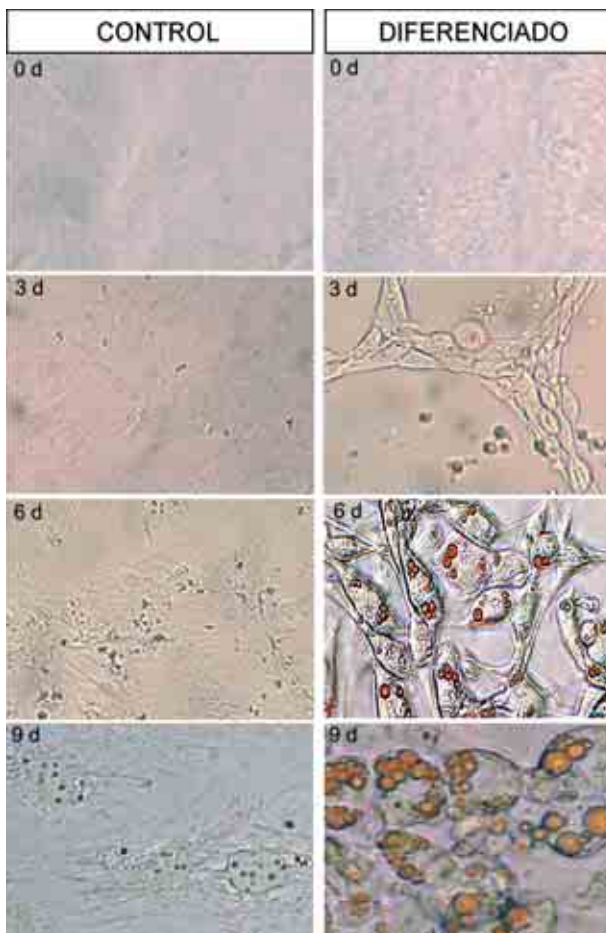


FIGURA 3. Cambios morfológicos de las células 3T3-L1 durante su diferenciación a adipocitos.

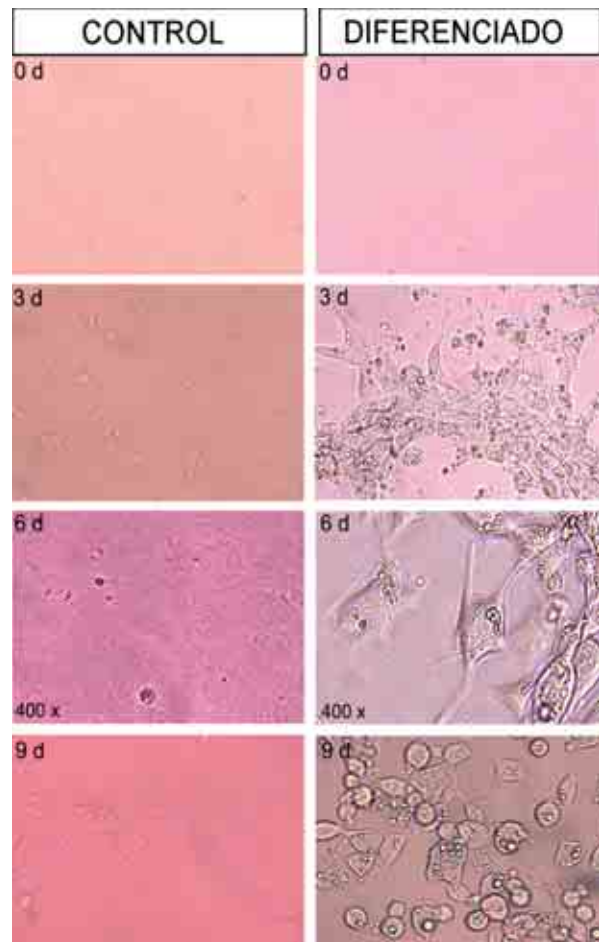


FIGURA 4. Acumulación de lípidos en células 3T3-L1 durante la adipogénesis. Las células 3T3-L1 fueron crecidas a confluencia y dos días después tratadas con medio completo (grupo control) o medio de diferenciación (grupo diferenciado). A los tiempos indicados, las células fueron teñidas con Oil Red-O y luego fotografiadas al microscopio óptico. (aumento 400X).

célula especializada, no sólo en almacenar y movilizar el exceso de grasa acumulada en forma de triacilglicérolos, sino también en cumplir un papel endocrino importante para la homeostasis del organismo. A nivel molecular, el proceso de adipogénesis implica la activación de una cascada altamente coordinada y regulada de factores de transcripción que, en conjunto, conducen al establecimiento del estado diferenciado. Un factor clave para el desarrollo normal de este proceso es PPAR- γ , un miembro de la superfamilia de receptores nucleares (48-50).

El presente trabajo constituye la etapa preliminar de un proyecto actualmente en ejecución por nuestro grupo, donde se busca estudiar el mecanismo molecular por el cual la expresión de caveolina, una proteína importante para el mantenimiento de la homeostasis de lípidos y glucosa (51-53), es regulada durante el proceso de adipogénesis. Como primer paso era necesario disponer de un modelo de adipogénesis para poder continuar con las siguientes etapas del proyecto. Un modelo clásico ampliamente utilizado es el de las células 3T3-L1, cuya diferenciación puede ser inducida *in vitro*. Aquí hemos descrito la implementación de dicho modelo experimental en nuestro laboratorio, estudiando algunas características de crecimiento y diferenciación de nuestro cultivo celular.

Referente al crecimiento celular, el cultivo se ajustó al modelo de crecimiento poblacional de Verhulst descrito por la ecuación logística (41). Al partir de diferente densidad poblacional inicial (*No*), el cultivo con *No* menor tuvo un retraso mayor en alcanzar la fase de crecimiento exponencial, lo cual era de esperar. La tasa de crecimiento máxima *r* estimada para dicho cultivo fue 12% menor, pero se requiere de un mayor número de experimentos para saber si dicho valor es significativamente diferente; esperamos que no lo sea, ya que se trata del mismo cultivo creciendo en condiciones análogas.

Con respecto al máximo poblacional *K*, el máximo rendimiento celular que se espera en una placa de 24 pozos es aproximadamente 190000 células/pozo (54). El *K* obtenido en nuestros experimentos, después de corregir por el volumen del pozo, fue de aproximadamente 141000 y 200000 células/pozo para *No* de 4000 y 12000 células por ml, respectivamente (tabla 1). Estos valores se aproximan al máximo esperado para estas placas y, por lo tanto, validan nuestro trabajo. La diferencia del 42% observada podría deberse a: (i) variabilidad inherente del método, o (ii) que el cultivo con *No* menor aún se

encuentre en fase exponencial de crecimiento, no llegando todavía a confluencia, con lo cual el valor de *K* pudo haber sido subestimado por falta de recuento a tiempos mayores. Esta última posibilidad parece más plausible dado que el cultivo con *No* menor presenta un retraso mayor para iniciar el crecimiento.

Un resultado interesante es lo observado con los diferentes sueros FBS ensayados. El suero nacional se comportó similar al suero certificado estadounidense, y mejor que el suero europeo. Estos datos preliminares se deben estudiar con mayor profundidad, pues podría traducirse en disminución de costos del proyecto y en una potencial ampliación de la industria nacional a mercados internacionales.

En cuanto a la diferenciación celular, el proceso de adipogénesis inducido *in vitro* significó profundos cambios morfológicos y funcionales: las células diferenciadas tienden a adquirir morfología redondeada y comienzan a acumular lípidos, observados como gotas citoplasmáticas que se tiñen de rojo con el colorante utilizado. Estos resultados nos permiten confirmar que nuestro cultivo claramente respondió al estímulo de diferenciación y que, efectivamente, las células se transformaron en adipocitos maduros.

Aunque aún existen inconvenientes por resolver, como por ejemplo, el hecho de que nuestras células tiendan a despegarse de la placa a tiempos prolongados de diferenciación, los resultados mostrados en el presente trabajo nos permite concluir que hemos implementado de manera satisfactoria un modelo de adipogénesis *in vitro* que se basa en el empleo de células 3T3-L1. Actualmente nuestro grupo ya se encuentra trabajando con el modelo implementado, estudiando a nivel molecular el efecto de ciertos fármacos sobre la respuesta celular.

Agradecimientos

Este trabajo se realizó en el Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional, Laboratorio de Ensayos Farmacológicos (L.E.F), permitió la graduación de María Alejandra Clavijo como Químico Farmacéutico de la Universidad Nacional y fue financiado por la Universidad Nacional de Colombia (Proyecto DIB No. 8003056). Los autores agradecen al Dr. Luis Ospina (coordinador del L.E.F.), al Dr. Fabio Aristizábal y a todos los miembros del laboratorio, en especial a Alba Lucía Valenzuela, Claudia Cordero y Johana Morantes, por su colaboración. A Marcela Torres (Laboratorio de Microscopía UNAL) y a Claudia Bernal (Laboratorio de Investigaciones, Facultad de Medicina, UMNG) por sus sugerencias técnicas en el cultivo.

Referencias

1. Douketis JD, Sharma AM. Obesity and cardiovascular disease: pathogenic mechanisms and potential benefits of weight reduction. *Semin Vasc Med* 2005 Feb;5(1):25-33.
2. Poirier P, Giles TD, Bray GA, Hong Y, Stern JS, Pi-Sunyer FX, et al. Obesity and cardiovascular disease: pathophysiology, evaluation, and effect of weight loss: an update of the 1997 American Heart Association Scientific Statement on Obesity and Heart Disease from the Obesity Committee of the Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism. *Circulation* 2006 Feb 14;113(6):898-918.
3. Vague J, Vague P, Tramon M, Vialettes B, Mercier P. Obesity and diabetes. *Acta Diabetol Lat* 1980 Apr;17(2):87-99.
4. Howard BV, Ruotolo G, Robbins DC. Obesity and dyslipidemia. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2003 Dec;32(4):855-67.
5. Dustan HP. Obesity and hypertension. *Diabetes Care* 1991 Jun;14(6):488-504.
6. Kolanowski J. Obesity and hypertension: from pathophysiology to treatment. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1999 Feb;23 Suppl 1:42-6.:42-6.
7. Miller WM, Nori-Janosz KE, Lillystone M, Yanez J, McCullough PA. Obesity and lipids. *Curr Cardiol Rep* 2005 Nov;7(6):465-70.
8. Barber TM, McCarthy MI, Wass JA, Franks S. Obesity and polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2006 Aug;65(2):137-45.
9. Keller KB, Lemberg L. Obesity and the metabolic syndrome. *Am J Crit Care* 2003 Mar;12(2):167-70.
10. Rappaport EB, Usher DC. Obesity, insulin resistance, and type 2 diabetes in children and adolescents. *Pediatr Ann* 2006 Nov;35(11):822-6.
11. Grundy SM. Obesity, metabolic syndrome, and coronary atherosclerosis. *Circulation* 2002 Jun 11;105(23):2696-8.
12. Aschner P, King H, Triana de TM, Rodriguez BM. Glucose intolerance in Colombia. A population-based survey in an urban community. *Diabetes Care* 1993 Jan;16(1):90-3.
13. Bautista LE, Orostegui M, Vera LM, Prada GE, Orozco LC, Herran OF. Prevalence and impact of cardiovascular risk factors in Bucaramanga, Colombia: results from the Countrywide Integrated Noncommunicable Disease Intervention Programme (CINDI/CARMEN) baseline survey. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2006 Oct;13(5):769-75.
14. López-Jaramillo P, Rueda-Clausen CF, Silva FA. The utility of different definitions of metabolic syndrome in Andean population. *Int J Cardiol* 2007 Apr 4;116(3):421-2.
15. Pérez LH, Gutiérrez LA, Vioque J, Torres Y. Relation between overweight, diabetes, stress and hypertension: a case-control study in Yarumal-Antioquia, Colombia. *Eur J Epidemiol* 2001;17(3):275-80.
16. Uscategui Penuela RM, Perez Giraldo JA, ristizabal Rivera JC, Camacho Perez JA. Excess of weight and their relationship with high blood pressure in schoolchildren and adolescents of Medellín, Colombia. *Arch Latinoam Nutr* 2003 Dec;53(4):376-82.
17. Trujillo ME, Scherer PE. Adipose tissue-derived factors: impact on health and disease. *Endocr Rev* 2006 Dec;27(7):762-78.
18. Trayhurn P, Bing C, Wood IS. Adipose tissue and adipokines—energy regulation from the human perspective. *J Nutr* 2006 Jul;136(7 Suppl):1935S-9S.
19. Frayn KN. Adipose tissue as a buffer for daily lipid flux. *Diabetologia* 2002 Sep;45(9):1201-10.
20. Gimeno RE, Klamann LD. Adipose tissue as an active endocrine organ: recent advances. *Curr Opin Pharmacol* 2005 Apr;5(2):122-8.
21. Ahima RS. Adipose tissue as an endocrine organ. *Obesity (Silver Spring)* 2006 Aug;14 Suppl 5:242S-249S.:242S-9S.
22. Alessi MC, Lijnen HR, Bastelica D, Juhan-Vague I. Adipose tissue and atherothrombosis. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2003 Sep 20;33(5-6):290-7.
23. Fantuzzi G, Mazzone T. Adipose Tissue and Atherosclerosis. Exploring the Connection. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007 Feb 15;.
24. Frayn KN. Adipose tissue and the insulin resistance syndrome. *Proc Nutr Soc* 2001 Aug;60(3):375-80.
25. Karpe F, Tan GD. Adipose tissue function in the insulin-resistance syndrome. *Biochem Soc Trans* 2005 Nov;33(Pt 5):1045-8.
26. Haque WA, Garg A. Adipocyte biology and adipocytokines. *Clin Lab Med* 2004 Mar;24(1):217-34.
27. Wu ZH, Zhao SP. Adipocyte: a potential target for the treatment of atherosclerosis. *Med Hypotheses* 2006;67(1):82-6.
28. Rosen ED, Spiegelman BM. Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. *Nature* 2006 Dec 14;444(7121):847-53.
29. Gregoire FM. Adipocyte differentiation: from fibroblast to endocrine cell. *Exp Biol Med (Maywood)* 2001 Dec;226(11):997-1002.
30. Rosen ED, MacDougald OA. Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006 Dec;7(12):885-96.
31. Nystrom FH, Chen H, Cong LN, Li Y, Quon MJ. Caveolin-1 interacts with the insulin receptor and can differentially modulate insulin signaling in transfected Cos-7 cells and rat adipose cells. *Mol Endocrinol* 1999 Dec;13(12):2013-24.
32. Karlsson M, Thorn H, Parpal S, Stralfors P, Gustavsson J. Insulin induces translocation of glucose transporter GLUT4 to plasma membrane caveolae in adipocytes. *FASEB J* 2002 Feb;16(2):249-51.
33. Razani B, Combs TP, Wang XB, Frank PG, Park DS, Russell RG, et al. Caveolin-1-deficient mice are lean, resistant to diet-induced obesity, and show hypertriglyceridemia with adipocyte abnormalities. *J Biol Chem* 2002 Mar 8;277(10):8635-47.
34. Cohen AW, Razani B, Wang XB, Combs TP, Williams TM, Scherer PE, et al. Caveolin-1-deficient mice show insulin resistance and defective insulin receptor protein expression in adipose tissue. *Am J Physiol Cell Physiol* 2003 Jul;285(1):C222-C235.
35. Cohen AW, Razani B, Schubert W, Williams TM, Wang XB, Iyengar P, et al. Role of caveolin-1 in the modulation of lipolysis and lipid droplet formation. *Diabetes* 2004 May;53(5):1261-70.
36. Feve B. Adipogenesis: cellular and molecular aspects. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2005 Dec;19(4):483-99.

37. Green H, Meuth M. An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture. *Cell* 1974 Oct;3(2):127-33.
38. Green H, Kehinde O. An established preadipose cell line and its differentiation in culture. II. Factors affecting the adipose conversion. *Cell* 1975 May;5(1):19-27.
39. Verhulst P-F. Recherches mathématiques sur la loi d'accroissement de la population. *Nouv mém de l'Academie Royale des Sci et Belles-Lettres de Bruxelles* 1845;18:1-41.
40. Verhulst P-F. Deuxième mémoire sur la loi d'accroissement de la population. *Mém de l'Academie Royale des Sci, des Lettres et des Beaux-Arts de Belgique* 1847;20:1-32.
41. Weisstein EW. Logistic Equation. MathWorld—A Wolfram Web Resource 2007. Disponible en: <http://mathworld.wolfram.com/LogisticEquation.html>
42. Chawla A, Lazar MA. Induction of Rev-ErbA alpha, an orphan receptor encoded on the opposite strand of the alpha-thyroid hormone receptor gene, during adipocyte differentiation. *J Biol Chem* 1993 Aug 5;268(22):16265-9.
43. Chawla A, Schwarz EJ, Dimaculangan DD, Lazar MA. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma: adipose-predominant expression and induction early in adipocyte differentiation. *Endocrinology* 1994 Aug;135(2):798-800.
44. Ramirez-Zacarias JL, Castro-Munozledo F, Kuri-Harcuch W. Quantitation of adipose conversion and triglycerides by staining intracytoplasmic lipids with Oil red O. *Histochemistry* 1992 Jul;97(6):493-7.
45. Strutt B, Khalil W, Killinger D. *Methods in molecular medicine: Human cell culture protocols*. Totowa, NJ: G.E. Jones, Humana Press Inc; 1996.
46. Green H, Meuth M. An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture. *Cell* 1974 Oct;3(2):127-33.
47. Green H, Kehinde O. An established preadipose cell line and its differentiation in culture. II. Factors affecting the adipose conversion. *Cell* 1975 May;5(1):19-27.
48. Rosen ED, Sarraf P, Troy AE, Bradwin G, Moore K, Milstone DS, et al. PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. *Mol Cell* 1999 Oct;4(4):611-7.
49. Rosen ED, Spiegelman BM. Molecular regulation of adipogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2000;16:145-71.:145-71.
50. Rosen ED. The transcriptional basis of adipocyte development. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2005 Jul;73(1):31-4.
51. Cohen AW, Combs TP, Scherer PE, Lisanti MP. Role of caveolin and caveolae in insulin signaling and diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003 Dec;285(6):E1151-E1160.
52. Cohen AW, Hnasko R, Schubert W, Lisanti MP. Role of caveolae and caveolins in health and disease. *Physiol Rev* 2004 Oct;84(4):1341-79.
53. Razani B, Combs TP, Wang XB, Frank PG, Park DS, Russell RG, et al. Caveolin-1-deficient mice are lean, resistant to diet-induced obesity, and show hypertriglyceridemia with adipocyte abnormalities. *J Biol Chem* 2002 Mar 8;277(10):8635-47.
54. Corning cell culture selection guide. Corning Life Sciences 2006:1-53. Disponible en: http://www.corning.com/lifesciences/products_services/product_literature/us_canada_index.asp#lab_plasticware