

CULTIVO Y DIFERENCIACION DE PREADIPOCITOS DE CORDEROS DE LAS RAZAS LACHA Y RAZA NAVARRA

Eguinoa P., Arana A., Soret B., Mendizábal J.A., Purroy A.

ETSIA. Universidad Pública de Navarra. Campus de Arrosadía.31006 Pamplona

INTRODUCCIÓN

El tejido graso en los animales se desarrolla en diferentes depósitos tanto internos (omental, mesentérico, pélvicorrenal, etc) como de la canal (subcutáneo, intermuscular, intramuscular), proceso que se debe a dos fenómenos: la hiperplasia (aumento del número de adipocitos) y la hipertrofia (aumento del tamaño celular) (Ailhaud *et al.*, 1992; Flint y Vernon, 1993). Los adipocitos no tienen capacidad de división sino que proceden de células precursoras (preadipocitos) que proliferan y se diferencian en adipocitos que almacenan lípidos en su citoplasma (Flint y Vernon, 1993).

En trabajos anteriores, Mendizábal *et al.* (1997) y Soret *et al.* (1998) han encontrado la existencia de diferencias en la adiposidad entre razas y entre depósitos en corderos en crecimiento de las razas Lacha y Rasa Aragonesa (actualmente Raza Navarra), constatando que la mayor cantidad de grasa de los corderos de raza Rasa Aragonesa a los 30 días de edad (12 kg de peso vivo) fue debida a un mayor número de adipocitos, mientras que a los 90 y 120 días (24 y 36 kg, respectivamente) al mayor tamaño de los mismos.

Con objeto de analizar el efecto de alguno de los factores que regulan la diferenciación de los preadipocitos ovinos, se ha utilizado en este trabajo un método basado en el cultivo celular de preadipocitos, que posibilita la identificación de dichos factores, ya que esta identificación *in vivo* es muy compleja. Para ello, se han estudiado los depósitos omental y subcutáneo de corderos de tipo lechal de las razas Lacha y Raza Navarra, con el objeto de ayudar a esclarecer la causa de las diferencias en la diferenciación de los preadipocitos de distinto depósito graso.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se han utilizado corderos lechales de un mes de edad de las razas Lacha y Raza Navarra (4 animales por raza). Una vez sacrificados los animales se recogieron muestras de grasa de forma aséptica de los depósitos omental (epiplón mayor) y subcutáneo (flanco de la espalda) en suero salino estéril (0,15M NaCl, 37°C). El tejido se digirió con collagenasa para disgregar los distintos tipos celulares que componen la fracción estromovascular y se separaron los mismos por centrifugación. Las células de la fracción estromovascular se distribuyeron en placas de cultivo (4×10^4 células/ml) en un medio llamado M199 que les permitía proliferar y que contiene Earle's salts, Hepes (pH 7,3) y L-glutamina, y que fue suplementado con acetato (2mM), antibióticos y suero fetal bovino (20% v/v). Las células se mantuvieron en cámara de cultivo a 37°C con O₂ : CO₂ (95:5 v/v). Los preadipocitos se adhieren a la superficie de las placas durante las primeras 24 h de cultivo, tras las cuales el medio de cultivo se cambió por medio fresco (de igual composición). Esta operación se repitió cada 3 días hasta que las células alcanzaron el estado de confluencia, es decir, cuando toda la superficie de la placa de cultivo estuvo cubierta por células. Cuando las células se encontraban en dicho estado, el medio de proliferación se reemplazó por un medio que permitía la diferenciación celular y que tenía como base medio DMEM-F12. Se utilizaron dos tratamientos: uno, con insulina

(1,6 µg/ml) y triiodotironina (2 nM) (IT_3) y el otro, conteniendo además un suplemento lipídico (1%) (IT_3L). La diferenciación celular se controló a través del microscopio por la aparición de gotas de lípidos dentro de las células y mediante la cuantificación de la actividad de las enzimas marcadoras glicerol 3-fosfato deshidrogenasa (G3-PDH), que estima la formación de triglicéridos (Wisse y Green, 1979), y Sintetasa de ácidos Grasos (FAS), que estima la síntesis de ácidos grasos *de novo* (Halestrap y Denton, 1973).

El análisis estadístico de los datos se realizó sometiendo los resultados a un análisis de varianza de tres factores de variación (tratamiento, raza y depósito).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Respecto a la identificación de los factores que promueven la diferenciación de los preadipocitos, los resultados obtenidos han mostrado que los dos tratamientos utilizados, el primero con las hormonas insulina y triiodotironina (IT_3) y el segundo administrando además un suplemento lipídico (IT_3L), promueven la diferenciación de las células precursoras de la fracción estromovascular en células adiposas, ya que ambos tratamientos favorecían la aparición de vacuolas lipídicas observables por análisis microscópico. Esto ocurrió en los cultivos de los preadipocitos de las dos razas y de los dos depósitos analizados. Por otra parte, con ambos tratamientos la actividad de las enzimas G3-PDH y FAS en las células diferenciadas (Tabla 1) fue superior a la actividad de estas mismas enzimas encontrada en las células no diferenciadas (9,6 nmol/placa y 4 nmol/placa para la actividad de la G3-PDH y la FAS, respectivamente) ($p < 0,001$). Así mismo, en dicha tabla se observa que existieron diferencias entre ambos tratamientos ($p < 0,001$). Los preadipocitos que se diferenciaron en el medio de cultivo que incluía lípidos (IT_3L) presentaron una mayor diferenciación, cuantificada por una mayor actividad tanto de la G3PDH como de la FAS, en ambas razas y en los dos depósitos estudiados, lo que estaría relacionado con el hecho de que el consumo de leche, con un alto contenido en lípidos, durante la lactancia promueve el desarrollo del tejido adiposo (Vernon, 1986).

No se han encontrado diferencias significativas entre depósitos en la actividad de las dos enzimas estudiadas (Tabla 1), a diferencia de lo observado en razas inglesas en las que se observó una menor diferenciación en preadipocitos procedentes del depósito omental que en los del depósito subcutáneo cultivados bajo las mismas condiciones experimentales (Soret *et al.*, 1999).

Finalmente, se observó un efecto significativo de la raza ($p < 0,05$ para la G3PDH y $p < 0,01$ para la FAS; Tabla 1) y una interacción significativa entre los efectos tratamiento y raza ($p = 0,07$ y $p < 0,01$; respectivamente) debido a que cuando las condiciones del medio favorecían una mayor diferenciación celular, es decir, cuando el medio de cultivo se suplementaba con lípidos, la actividad enzimática y, por tanto, la diferenciación de los preadipocitos de la raza Raza Navarra fue superior a la de la raza Lacha. Teniendo en cuenta que la raza Raza Navarra presentó una mayor cantidad de grasa y un mayor número de adipocitos que la raza Lacha en los corderos de tipo lechal cuyo único alimento consumido fue la leche de la madre, rica en lípidos, (Soret *et al.*, 1998), estos resultados podrían ser indicativos de que la mayor tendencia a acumular grasa de los animales de raza Raza Navarra podría deberse a una mayor facilidad de sus preadipocitos para diferenciarse en adipocitos los que posteriormente sufrirían una hipertrofia.

En definitiva, en este trabajo se han conseguido establecer las condiciones para el estudio de la diferenciación de los preadipocitos e identificar algunos de los factores que regulan su desarrollo, aportando un nuevo acercamiento al conocimiento de las diferencias en el desarrollo del tejido graso en las diferentes razas y depósitos de los corderos.

Tabla 1.- Actividad de las enzimas Glicerol 3-P deshidrogenasa (G3PDH) y Sintetasa de Ácidos grasos (FAS) (nm/placa $\pm$ error estándar) en preadipocitos de los depósitos omental y subcutáneo de las razas Raza Navarra (RN) y Lacha (L) diferenciados con las distintas combinaciones de insulina y triiodotironina (IT₃), y con suplemento lipídico (IT₃L). Efecto del tipo de tratamiento (Tr) de la raza (R) y del depósito (D).

	OMENTAL		SUBCUTANEO		Tr	R	D	TrxR ¹
	RN	L	RN	L				
G3PDH					***	*	NS	p=0,07
IT ₃	29,7 $\pm$ 5,1	20,2 $\pm$ 4,2	18,4 $\pm$ 2,5	22,6 $\pm$ 6,7				
IT ₃ L	123,4 $\pm$ 38,8	48,1 $\pm$ 9,2	77,1 $\pm$ 16,9	61,4 $\pm$ 25,2				
FAS					***	**	NS	**
IT ₃	8,7 $\pm$ 0,8	9,0 $\pm$ 1,1	11,1 $\pm$ 1,0	7,8 $\pm$ 0,7				
IT ₃ L	26,7 $\pm$ 6,5	13,5 $\pm$ 1,2	20,4 $\pm$ 2,5	11,8 $\pm$ 1,9				

¹ Las interacciones TrxD, RxD y TrxRxD fueron no significativas.

NS: no significativo; * p<0,05; *** p<0,001.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AILHAUD G., AMRI E., NEGREL R. 1992. Cellular and molecular aspects of adipose tissue development. *Annual Review of Nutrition* **12** 201-233.
- FLINT D.I., VERNON R.G. 1993. Hormones and adipose tissue growth. In *Vertebrate Endocrinology: Fundamentals and Biomedical Implications*, pp 469-494. Eds MP Schreibman, CG Scanes and PKT Pang. Orlando: Academic Press.
- HALESTRAP A.P., DENTON R.M. 1973. Insulin and the regulation of adipose tissue Acetyl CoA carboxylase. *Biochemical Journal* **105** 529-536.
- MENDIZABAL J.A., SORET B., PURROY A., ARANA A., HORCADA A. 1997. Influence of sex on cellularity and on lipogenic enzymes of Spanish lamb breeds (Lacha and Rasa Aragonesa). *Animal Science* **64** 283-289.
- SORET B., MENDIZABAL J.A., ARANA A., PURROY A., EGUINO P. 1998. Breed effects on cellularity and lipogenic enzymes in growing Spanish lambs. *Small Ruminant Research* **29** 103-112.
- SORET B., LEE H.-J., FINLEY E., LEE S.C., VERNON R.G. 1999. Regulation of sheep subcutaneous and omental preadipocytes in culture. (*Journal of Endocrinology*, en prensa).
- VERNON R.G. 1986. The growth and metabolism of adipocytes. In *Control and Manipulation of animal growth*, pp 67-83. Eds PJ Buttery, NB Hayne and DB Lindsay. Butterworths. London.
- WISSE L.S., GREEN H. 1979. Participation of one isozyme of cytosolic glycerophosphate dehydrogenase in the adipose conversion of 3T3 cell. *Journal of Biological Chemistry* **254** 273-275.