

Diferenciación *in vitro* de preadipocitos de tejido adiposo bovino

In vitro differentiation of preadipocytes from bovine adipose tissue

Adriana González Gallardo^a, Alfredo Varela-Echavarría^b, Armando Shimada Miyasaka^a,
Ofelia Mora Izaguirre^a

RESUMEN

Con objeto de obtener subcultivos seriales de preadipocitos del tejido adiposo bovino y luego tratar de diferenciarlos a adipocitos, se compararon dos medios de cultivo. Se obtuvieron muestras de tejido adiposo subcutáneo y de omento de animales adultos de 3 a 4 años de edad, y de grasa perirrenal y de omento de fetos en el último tercio de la gestación. En el caso de células adultas, se establecieron subcultivos; sin embargo no pudieron ser diferenciadas. Para el tejido adiposo fetal, se establecieron subcultivos y los fibroblastos perirrenales fueron capaces de diferenciarse con el medio apropiado (DMEM/F-12 1:1; 10 µg/ml insulina; 0.25 µM dexametasona; 10 µg/ml lipoproteínas de muy baja densidad; 100 µg/ml estreptomycina; 100 UI/ml penicilina). Estos resultados podrían servir de base para obtener un modelo que permita estudiar los mecanismos moleculares de diferenciación de preadipocitos en tejido adiposo bovino.

PALABRAS CLAVE: Bovinos, Diferenciación, Adipocitos.

ABSTRACT

To study differentiation of bovine adipose tissue preadipocytes into adipocytes in bovines, two culture media were tested. Samples were obtained of subcutaneous and omentum fat from 3-4 yr old Holstein adults, and perirenal and omentum fat from fetuses in their last third of gestation. Although no differentiation was observed in cells obtained from adult animals' adipose tissue, fetal perirenal fibroblasts differentiated into adipocytes in the following medium: DMEM/F-12 1:1; 10 µg/ml insulin; 0.25 µM dexamethasone; 10 µg/ml very low-density lipoproteins; 100 µg/ml streptomycin; and 100 IU/ml penicillin. These results could be used to develop a model to study the molecular mechanisms of preadipocyte differentiation in bovine adipose tissue.

KEYWORDS: Bovine, Differentiation, Adipocytes.

El tejido adiposo (TA) blanco es la mayor reserva energética en los animales; se utiliza como reservorio de triglicéridos en periodos durante los cuales existe un exceso de energía y se moviliza durante periodos de privación de ésta^(1,2). Los adipocitos representan entre una y dos terceras partes del tejido adiposo; el resto son preadipocitos (precursores de las células grasas), fibroblastos y otros tipos celulares como pericitos, células endoteliales y sanguíneas^(3,4,5,6). El TA aparece

White adipose tissue constitutes animals' main energy reserve and is used as a triglyceride reservoir in those months with energy surplus and is mobilized in scarcity periods^(1,2). Adipocytes constitute between one and two thirds of adipose tissue, the remainder being preadipocytes (fat cell precursors), fibroblasts and other cell types as pericytes, endothelial and blood cells^(3,4,5,6). Adipose tissue materializes late in embryo development, in humans during the second and

Recibido el 13 de abril de 2007. Aceptado para su publicación el 9 de noviembre de 2007

^a Laboratorio de Rumiología y Metabolismo Nutricional (RuMeN). Facultad de Estudios Superiores-Cuautitán. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Blvd. B. Quintana 514-D. Arboledas, 76140. Querétaro, México. mora@inb.unam.mx. Correspondencia al cuarto autor.

^b Instituto de Neurobiología-UNAM. Campus Juriquilla,

tarde durante el desarrollo embrionario; en humanos empieza a desarrollarse durante el segundo y el tercer tercio de gestación y la mayor proliferación de la población de adipocitos ocurre después del nacimiento y durante la pubertad⁽⁴⁾. El TA no puede ser detectado macroscópicamente durante la embriogénesis, sólo puede ser identificado cuando ya contiene adipocitos (células completamente diferenciadas o terminales). Debido a que no se han encontrado marcadores específicos que puedan ser utilizados para identificar adipoblastos o preadipocitos *in vivo*, no existe mucha información sobre la ontogenia de este tejido⁽⁴⁾.

La adipogénesis ocurre como consecuencia del recambio celular normal y debido a la necesidad de almacenar más grasa como consecuencia de un aumento en el consumo de calorías, y por lo tanto de ganancia de peso⁽⁷⁾. El crecimiento del TA se produce por la combinación de hiperplasia e hipertrofia; la hiperplasia ocurre por la proliferación de los preadipocitos y su posterior diferenciación, y se ve incrementada en animales jóvenes. La hiperplasia es controlada por hormonas y factores de crecimiento, como los de crecimiento similares a insulina de tipo I y II (IGF-I e IGF-II), las formas ácida y básica del factor de crecimiento fibroblástico (aFGF y bFGF) y el factor de necrosis tumoral (TNF- α), entre otros⁽⁸⁾. Las líneas celulares adipocíticas se desarrollan a partir de una rama celular pluripotencial de origen mesodermal, que también dará lugar a las células musculares, óseas y del cartílago; sin embargo los mecanismos mediante los cuales se regula la diferenciación de esta rama celular mesenquimatosa a líneas adipocíticas no se conocen en detalle^(7,9). El primer paso para la diferenciación de las células adiposas es el cese de la proliferación celular, la cual se observa en cultivo después de la inhibición por contacto; sin embargo en experimentos en los que se usó una densidad muy baja con medios libres de suero o en suspensión en metil-celulosa, demostraron que el contacto célula-célula no es el único requerimiento para que ocurra la diferenciación celular. En cultivo, este proceso es inducido por la adición de hormonas pro-diferenciantes y por una o dos divisiones celulares extras, lo que se conoce como expansión clonal⁽⁷⁾.

third gestation period and their greater proliferation happens after birth and in puberty⁽⁴⁾. Adipose tissue cannot be detected macroscopically during embryogenesis, and can be identified when adipocytes are already present (completely differentiated cells). Owing to the fact that no specific markers have been identified that could be used to identify adipoblasts or preadipocytes *in vivo*, practically no information on this tissue's ontogenesis is available⁽⁴⁾.

Adipogenesis is a consequence of normal cell replacement and also of the need to store more fat in answer to an increase in calorie intake and therefore of live weight⁽⁷⁾. Adipose tissue increases through a mixture of hyperplasia and hypertrophy, the first owing to preadipocyte proliferation and later differentiation, and increases in young animals. Hyperplasia is controlled by hormones and growth factors, as those similar to type I and II insulin (IGF-I and IGF-II), acidic and basic fibroblast growth factors (aFGF and bFGF) and tumor necrosis factor (TNF- α), among others⁽⁸⁾. Adipocyte cell lines develop from a pluripotent cell branch of mesoderm origin which also originate cartilage, muscle and bone cells; however, mechanism which regulate differentiation from this mesenchymal cell branch to adipocytes are not known in detail^(7,9). The first step for adipose cell differentiation is an end of cell proliferation, which is seen in cultures after inhibition by contact; however, in experiments carried out at a very low density in serum free or methyl-cellulose in suspension media, showed that cell-cell contact is not the only requirement for cell differentiation. In cultures, this process is induced through the addition of pre-difference hormones and by one or two extra cell division, a process known as clonal expansion⁽⁷⁾. This process ends with transcription factor expression of peroxisome-proliferator activated receptor γ (PPAR γ) and CCAAT/ α enhancer binding protein α (C/EBP α). Induction of both these proteins is characterized by the expression of the differentiated phenotype⁽⁷⁾. Most of the knowledge related to transcription events which regulate adipogenesis has been developed in cell lines as 3T3-L1.

PPAR γ activity is regulated by both natural ligands (prostaglandins, fatty acids, etc.) and pharmacologic

Este proceso cesa con la expresión de los factores de transcripción de los receptores de la activación de la proliferación de peroxisomas γ (PPAR γ) y CCAAT/intensificador de la proteína de unión α (C/EBP α). La inducción de estas dos proteínas se caracteriza por la expresión del fenotipo diferenciado⁽⁷⁾. La mayor parte del conocimiento generado en cuanto a los eventos transcripcionales que regulan la adipogénesis se han desarrollado en líneas celulares como la 3T3-L1.

La actividad del PPAR γ es regulada por ligandos naturales (prostaglandinas, ácidos grasos, etc.) y farmacológicos (como las tiazolidinedionas, TZD). La naturaleza de sus ligandos, junto con su capacidad para modificar la actividad transcripcional de múltiples genes relevantes en la homeostasis celular de lípidos, permite plantear que los receptores nucleares heterodiméricos son los reguladores fisiológicos del metabolismo lipídico. Los receptores nucleares heterodiméricos (clase II) son aquéllos que se unen al DNA con el receptor del ácido 9-cis retinóico (RXR), y dentro de ellos se encuentran los PPARs, el receptor tiroideo (TR), receptor de ácido retinóico (RAR) y algunos receptores huérfanos⁽⁷⁾.

En el caso de bovinos, Ohyama *et al*⁽¹⁰⁾ estimularon con TZD a preadipocitos primarios encontrando que este agente favorece la proliferación y conversión adipocítica de estas células. Pero para que este efecto adipogénico sea observado, se requiere de más de tres días de exposición a las TZD en preadipocitos primarios de bovino, que contrasta con los preadipocitos 3T3-L1 que requieren un menor tiempo (24 a 48 h) para que se active la expresión de PPAR γ ⁽¹¹⁾.

Los reportes acerca de la proliferación de los preadipocitos de bovino son escasos y controversiales ya que se debe tener en cuenta que las condiciones particulares en que estas células son cultivadas pueden determinar su tasa de proliferación y la subsiguiente conversión adiposa. Los factores que afectan la capacidad de proliferación de este tipo de células de acuerdo al sitio y edad del animal aún no han sido establecidos, pero algunos reportes indican que puede ser atribuida a la sensibilidad a

ligands (thiazolidinedione, TZD). The nature of its ligands jointly with their capacity to modify transcriptional capacity of multiple relevant genes in lipid cell homeostasis, allows presuming that heterodimeric nucleic receptors are the physiological regulators of lipid metabolism. Heterodimeric nucleic receptors (class II) are those that join DNA to 9-cis retinoic acid's (RXR) receptor and inside them PPAR γ , thyroid receptor (TR) and retinoic acid receptor (RAR) can be found as well as some orphan receptors⁽⁷⁾.

In the case of bovines, Ohyana *et al*⁽¹⁰⁾ stimulated through TZD primary preadipocytes, finding that this agent favors their proliferation and adipocyte conversion. But, to observe this effect, bovine primary preadipocytes should be exposed to TZD for more than 3 d, in contrast to 3T3-L1 preadipocytes which require less exposure time (24 to 48 h) for activation of PPAR γ expression⁽¹¹⁾.

Reports on bovine preadipocyte proliferation are very few and controversial because the particular conditions in which these cells are grown could determine the proliferation rate and its subsequent adipose conversion. Factors which affect proliferation capacity of these cells in accordance with location and age of animals have not been determined, but some reports indicate that it could be attributed to sensibility to hormones, paracrine factors and to the capacity to assimilate diverse substrates.

The present study was carried out with the objective of obtaining serial subcultures of bovine adipose tissue fibroblasts and afterwards differentiating them into adipocytes.

Two types of samples were taken: 1) subcutaneous and omentum adipose tissue from 3 to 4 yr old Holstein adults; 2) perirenal and omentum of six Holstein fetuses in the last third of their gestation. All samples were obtained immediately after sacrifice in Querétaro's municipal slaughterhouse.

Samples were kept in a basal medium (Dubelcco modified by Eagle, DMEM) (InvitrogenTM, Carlsbad, CA, USA) added with penicillin, 100 IU/ml (InvitrogenTM, Carlsbad, CA, USA) and

hormonas, factores paracrinós y a la capacidad de asimilar los diferentes sustratos del medio.

El presente trabajo se realizó con el objetivo de obtener subcultivos seriales de fibroblastos del tejido adiposo bovino y luego tratar de diferenciarlos a adipocitos.

Se tomaron dos tipos de muestras: 1) tejido adiposo subcutáneo y del omento de cinco animales adultos Holstein de 3 a 4 años de edad; 2) tejido adiposo peri renal y del omento de seis fetos Holstein en el último tercio de gestación. Todas las muestras fueron obtenidas inmediatamente después del sacrificio en el rastro municipal de la ciudad de Querétaro.

Las muestras fueron mantenidas en un medio basal (Medio de Dubelcco modificado por Eagle, DMEM) (Invitrogen™, Calsbad, CA) adicionado con 100 UI/ml de penicilina (Invitrogen™ Calsbad, CA) y 100 mg/ml de estreptomycin (Invitrogen™ Calsbad, CA) a temperatura de refrigeración (4 °C). Una vez en el laboratorio y en condiciones de esterilidad, el tejido adiposo se seccionó en piezas pequeñas (2 a 5 mm aproximadamente) y se lavó cuatro veces con PBS y antibióticos (estreptomycin 100 µg/ml y penicilina 100 UI/ml).

El tejido adiposo (3 ± 0.1 g) se disgregó utilizando 1 ml de una solución de digestión por cada 0.5 g de muestra (DMEM conteniendo 20 mM HEPES pH 7.4 (Mallincrodt Baker, Inc. Philliburg, NJ), 2 mg/ml de colagenasa tipo (Sigma® St. Louis, MO) y 4 mg/ml de albúmina sérica bovina (Sigma® St. Louis, MO)⁽¹²⁾. La digestión se realizó durante 60 min a 37 °C en agitación. Al término de la digestión, ésta se filtró a través de gasas estériles para eliminar el tejido no digerido. La suspensión obtenida se centrifugó 5 min a 11,000 rpm, a temperatura ambiente.

La pastilla celular se resuspendió en medio basal [DMEM conteniendo 4 µM de biotina (Sigma® St. Louis, MO), 200 µM de ácido ascórbico (Sigma® St. Louis, MO.), 100 UI/ml penicilina, 100 µg/ml estreptomycin y 10% de suero fetal bovino (Invitrogen™ Calsbad, CA.)]; se sembraron en cajas

streptomycin, 100 µg/ml (Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA) at 4 °C. Once in the laboratory and in sterile conditions, the adipose tissue was cut in small pieces (2 to 5 mm approximately) and washed four times with PBS and antibiotics (penicillin, 100 IU/ml and streptomycin, 100 µg/ml).

Adipose tissue (3 ± 0.1 g) was disintegrated using 1 ml digestion solution for each 0.5 g of sample (DMEM containing 20 mM HEPES pH 7.4 (Mallincrodt Baker Inc., Philliburg, NJ, USA); 2 mg/ml collagenase (Sigma®, St. Louis, MO, USA) and 4 mg/ml bovine serum albumin (BSA) (Sigma®, St. Louis, MO, USA)⁽¹²⁾. Digestion was carried out for 60 min at 37 °C stirring. At digestion's end, the resulting solution was filtered through sterile gauze to eliminate non digested tissue. The resulting suspension was centrifuged at 11,000 RPM at room temperature.

The cell tablet was re-suspended in a basal medium (DMEM containing biotin 4 µM (Sigma®, St. Louis, MO, USA), 200 µM ascorbic acid, 100 IU/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin and 10% bovine fetal serum (Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA), inoculated in 100 mm diameter culture dishes and incubated at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere. Cells were maintained in this condition up to pre-confluence and later sub-cultured. Cells were unstuck with trypsin 0.1% (Sigma®, St. Louis, MO, USA) and later counted in a Neubauer chamber to rate cell yield. Cells were sub-cultured always at the same density (1×10^5 cells in each culture dish).

In an experiment carried out simultaneously, differentiation capacity of the obtained populations was assessed. To this end 24 well cell culture plates were inoculated 2×10^4 cells/well. When cultures reached pre-confluence (48 h), cells were treated with two culture media with different differentiation promoters: 1) Differentiation Medium 1: DMEM 20% bovine fetal serum, 100 nM dexamethasone (Sigma®, St. Louis, MO, USA), 50 µM indomethacin (Sigma®, St. Louis, MO, USA), 2 mM glutamine (Sigma®, St. Louis, MO, USA), 100 IU/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin sulphate⁽¹³⁾; 2) Differentiation Medium 2: DMEM/F-12 1:1 (Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA), 10

de cultivo de 100 mm de diámetro y se incubaron a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO₂. Las células se mantuvieron en las mismas condiciones hasta que alcanzaron la preconfluencia, y posteriormente fueron sub-cultivados. Las células se despegaron con tripsina 0.1% (Sigma® St. Louis, MO) y se contaron en una cámara de Neubauer para conocer el rendimiento celular. Las células se sub-cultivaron siempre a la misma densidad (1x10⁵ células en caja de cultivo de 100 mm de diámetro).

En un experimento paralelo se evaluó la capacidad de diferenciación de las poblaciones obtenidas, y para ello se sembraron placas de 24 pozos con 2x10⁴ célula/pozo. Cuando los cultivos alcanzaban preconfluencia (48 h) las células fueron tratadas con dos medios de cultivo con diferentes promotores de diferenciación: 1) medio de diferenciación 1: DMEM, 20% de suero fetal bovino, 100 nM dexametasona (Sigma® St. Louis, MO), 50 µM indometacina (Sigma® St. Louis, MO), 2 mM glutamina (Sigma® St. Louis, MO), 100 UI/ml penicilina y 100 µg/ml sulfato de estreptomycin⁽¹³⁾; 2) medio de diferenciación 2: DMEM/F-12 1:1 (Invitrogen™ Calsbad, CA), 10 µg/ml de insulina (Sigma® St. Louis, MO), 0.25 µM de dexametasona y 10 µg/ml de lipoproteínas de muy baja densidad (Sigma® St. Louis, MO), estreptomycin 100 µg/ml y 100 u/ml de penicilina⁽¹²⁾.

Los cultivos fueron mantenidos en estas condiciones al menos ocho días, haciéndoles cambio de medio cada tercer día, y con un microscopio de contraste de fases, se observó la presencia de gotas de grasa en el citoplasma celular.

Para determinar la expresión de PPAR γ al término de la diferenciación, se extrajo el RNA total de las células usando el kit Rneasy (Qiagen® Austin, TX). Se realizó una transcripción reversa (RT) usando un oligo específico, siguiendo el protocolo de Super Script II (Invitrogen™ Calsbad, CA). Para el PCR se utilizaron: 3 µl cDNA, 1 mM MgCl, 0.2 mM dNTP's, 0.2 mM de cada oligonucleótido, y 5 U Taq DNA polimerasa (Invitrogen™ Calsbad, CA). El programa del termociclador fue el siguiente: desnaturalización 94 °C por 45 seg, alineación 55 °C por 30 seg y extensión 72 °C por 1 min 30 ciclos. Los oligonucleótidos utilizados fueron los

µg/ml insulina (Sigma®, St. Louis, MO, USA), 0.25 µM dexamethasone, 10 µg/ml very low density lipoprotein (Sigma®, St. Louis, MO, USA), 100 µg/ml streptomycin and 100 IU/ml penicillin⁽¹²⁾.

Cultures were kept in these conditions for 8 d at least, changing media every other day and fat droplets in cell cytoplasm were looked for with a phase contrast microscope.

To determine PPAR γ expression at the end of differentiation, RNA was extracted from cells by means of Rneasy kit (Qiagen®, Austin, TX, USA). A reverse transcription (RT) was performed using a specific oligo, in accordance with SuperScript II Protocol (Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA). For PCR the following were used: 3 µl cDNA, 1 mM MgCl, 0.2 mM dNTP's 0.2 mM of each oligonucleotide and 5 U Taq DNA polymerase (Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA). The thermocycler program was as follows: denaturalization at 94 °C for 45 sec, alignment at 55 °C for 30 sec and extension at 72 °C for 1 min, 30 cycles. The oligonucleotides used were those reported by Wu *et al*⁽¹²⁾ which give rise to an 511 bp amplification. The oligonucleotide sequence was as follows: 5'-GAC TTG AAC GAC CAA GTA ACT C-3' (nucleotide 1,200-1,221) and 5'-CTC TGC TAA TAC AAG TCC TTG TAG-3' (nucleotide 1,711-1,688) of the PPAR γ gene (Genbank access No. Y12419).

At the end of the differentiation process after 13 d, cultures were fixed and dyed in a in an Oil Red O saturated solution (Sigma®, St. Louis, MO, USA), which specifically bonds to triglycerides. To quantify adipocyte conversion 1 ml of isopropyl alcohol (Mallincrodt Caker Inc., Phillipburg, NJ, USA) was added to each well. Solubilized dye absorptivity was determined though spectrophotometry at 510 nm. Lipid accumulation is proportional to absorptivity levels obtained in Oil Red O extraction⁽¹⁴⁾.

As one more differentiation indicator G3PDH activity was determined through spectrophotometry, which quantifies NADH disappearance during DHAP reduction catalyzed by G3PDH in accordance

reportados por Wu *et al.*⁽¹²⁾ que dan origen a un amplificado de 511 pares de bases. La secuencia de los oligonucleótidos fue la siguiente: 5'-GAC TTG AAC GAC CAA GTA ACT C-3' (nucleótido 1,200-1,221) y 5'-CTC TGC TAA TAC AAG TCC TTG TAG-3' (nucleótido 1,711-1,688) del gen de PPAR γ (No. de acceso Genbank Y12419).

Al término de la diferenciación celular a los 13 días, los cultivos fueron fijados y teñidos en una solución saturada de rojo oleoso O (Sigma[®] St. Louis, MO), el cual se une específicamente a triglicéridos. Para cuantificar la conversión adipocítica se agregó 1 ml de alcohol isopropílico (Mallincrodt Baker, Inc. Phillipburg, NJ) a cada pozo; al colorante solubilizado se le determinó su absorbancia espectrofotométricamente a 510 nm. La acumulación lipídica es proporcional a los niveles de absorbancia obtenidos de la extracción del rojo oleoso O⁽¹⁴⁾.

Como un indicador más de diferenciación se determinó la actividad G3PDH por un método espectrofotométrico, el cual cuantifica la desaparición de NADH durante la reducción de DHAP catalizada por G3PDH de acuerdo a Wise y Green⁽¹⁵⁾ modificada por Castro-Muñozledo *et al.*⁽¹⁶⁾ Para medir la actividad enzimática, un mililitro de la mezcla de reacción conteniendo 100 mM de trietanolamina/HCl pH 7.5 (Sigma[®] St. Louis, MO), 2.5 mM de EDTA (Mallincrodt Baker, Inc. Phillipburg, NJ.), 0.12 mM de NADH (Sigma[®] St. Louis, MO), 0.2 mM de DHAP (Sigma[®] St. Louis, MO), 0.1 mM de b-mercaptoetanol (BioRad, Hercules, CA) y 5 mg de proteína del extracto citosólico de células con 13 días de tratamiento con medio de diferenciación. La mezcla de reacción fue atemperada a 37 °C por 2 min antes de adicionar el sustrato (DHAP). El cambio en la absorbancia fue registrado a 340 nm (espectrofotómetro Hewlett Packard 8453) a los 5 min a partir de que se adicionó el sustrato. La actividad enzimática se expresó en nM de NADH oxidado/mg de proteína/min (nM NADH/mg de proteína/min).

Se realizó un análisis de regresión para establecer el modelo al que mejor se ajustara la proliferación celular en los diferentes tipos de tejidos y determinar su comportamiento.

with the Wise and Green⁽¹⁵⁾ modified by Castro-Muñozledo *et al.*⁽¹⁶⁾ method. To rate enzyme activity, one milliliter of reaction mixture containing 100mM triethanolamine hydrochloride pH 7.5 (Sigma[®], St. Louis, MO, USA), 2.5 mM EDTA (Mallincrodt Baker Inc., Phillipburg, NJ, USA), 0.12 mM NADH (Sigma[®], St. Louis, MO, USA), 0.2 mM DHAP (Sigma[®], St. Louis, MO, USA), 0.1 mM β -mercaptoethanol (BioRad, Hercules, CA, USA) and 5 ml of cytosolic extract of cells after a 13 d treatment with differentiation medium. The reaction mixture was tempered at 37 °C for 2 min before the substrate (DHAP) was added. Absorptivity change was recorded at 340 nm in a Hewlett-Packard 8453 spectrophotometer 5 min after substrate addition. Enzyme activity was expressed in oxidized NADH nM/mg of protein/min (nM NADH/mg protein/min).

A regression analysis was carried out to establish which model adjusted better to cell proliferation in different types of tissue and to determine their performance. Oil Red O results were analyzed through SAS general model linear procedure⁽¹⁷⁾. Means were compared through minimum quadratic differences.

A preadipocyte serial subculture of all tissue samples was carried out. Cell proliferation previous to differentiation induction for each tissue can be seen in Figure 1A. No differences were observed in proliferation rates in different cultures. Equations obtained were as follows: $y = -0.12 + 18.35x - 0.73x^2$ ($r^2 = 0.99$, $P < 0.01$); $y = -26.03 + 24.69x - 1.40x^2$ ($r^2 = 0.98$, $P < 0.01$); $y = -17.66 + 22.49x - 0.95x^2$ ($r^2 = 0.93$, $P < 0.01$); $y = -59.84 + 39.27x - 2.63x^2$ ($r^2 = 0.97$, $P < 0.01$), for adult subcutaneous AT, adult omentum, fetus perirenal and fetus omentum, respectively. At this cultures' stage, cell show fibroblast look (Figures 1B, 1C). Neither obvious morphologic differences between cultures were observed or were lipid droplets detected. Before confluence was reached, the corresponding differentiation medium was added to each culture.

Adipocyte differentiation was observed only in fetus perirenal tissue at approximately d 13 and only in differentiation medium 2 (Figure 1D), presenting profuse lipid droplets in differentiated cells.

Los resultados del rojo oleoso O fueron analizados mediante el procedimiento de modelos lineales generales del SAS⁽¹⁷⁾. Las medias fueron comparadas mediante diferencias mínimas cuadráticas.

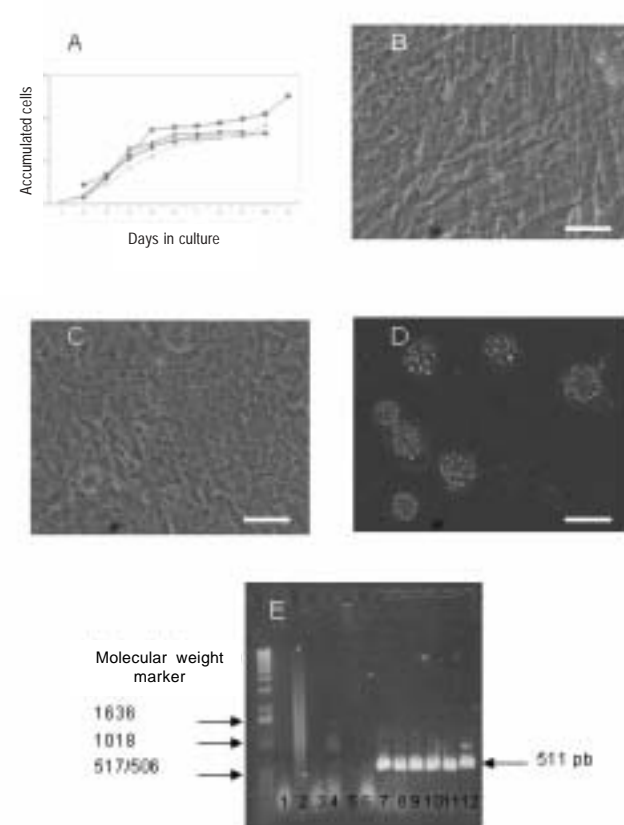
Se estableció el subcultivo serial de preadipocitos de todas las muestras de tejido adiposo obtenidas. En la Figura 1A se observan las curvas de la proliferación celular para cada uno de los tejidos, previo a la inducción de la diferenciación. No hubo diferencias en las tasas de proliferación de los diferentes cultivos. Las ecuaciones obtenidas fueron: $y = -0.12 + 18.35x - 0.73x^2$ ($r^2 = 0.99$, $P < 0.01$); $y = -26.03 + 24.69x - 1.40x^2$ ($r^2 = 0.98$, $P < 0.01$); $y = -17.66 + 22.49x - 0.95x^2$ ($r^2 = 0.93$, $P < 0.01$); y $y = -59.84 + 39.27x - 2.63x^2$ ($r^2 = 0.97$, $P < 0.01$); para los TA subcutáneo de adulto, de omento de adulto, peri renal de feto, y de omento de feto, respectivamente. En este estado de los cultivos, las células muestran apariencia de fibroblasto (Figuras 1B, 1C). No se observaron diferencias morfológicas obvias entre ninguno de los cultivos y no se detectaron gotas lipídicas. Antes de alcanzar la confluencia, se les agregó a cada uno de los cultivos el medio de diferenciación correspondiente.

Únicamente en el cultivo de tejido perirrenal fetal, la diferenciación adipocítica fue observada a los 13 días aproximadamente, y sólo cuando se usó el medio de diferenciación 2 (Figura 1D), presentando abundantes gotas lipídicas en las células diferenciadas.

En estos cultivos, el grado de incorporación de rojo oleoso por pozo en unidades de absorbancia (510 nm) fue 0.115, 0.169 y 0.206 para los cultivos con medio basal, medio de diferenciación 1 y 2, respectivamente. El mayor valor de absorbancia corresponde a ambos medios de diferenciación ($P < 0.01$, $n = 6$). Es decir, aunque morfológicamente sólo se vio diferenciación con el medio de diferenciación 2, aparentemente con los resultados de rojo oleoso el medio de diferenciación 1 también promovió el acúmulo de grasa. Aunque, tal vez en menor tamaño y las gotas de grasa no pudieron ser observadas por microscopía. Estos resultados muestran que aun cuando en el medio de diferenciación no

Figura 1. Establecimiento de subcultivos seriales de fibroblastos de tejido adiposo fetal bovino y su diferenciación *in vitro*

Figure 1. Establishment of serial fibroblast subcultures of fetus bovine adipose tissue and their *in vitro* differentiation



- A. Cell proliferation curves. ▲ Adult Omentum, ● Subcutaneous, adult ■ Fetus omentum ■ Fetus perirenal.
- B. Phase contrast microphotograph showing confluent preadipocytes in DMEM medium.
- C. Phase contrast microphotograph showing confluent preadipocytes in Differentiation Medium 1. Bar = 100 μ m.
- D. Phase contrast microphotograph showing adipocytes in Differentiation Medium 1. Bar = 100 μ m.
- E. Agarose 1 % gel in which cDNA de PPAR γ obtained from fibroblasts of fetus adipose tissue is seen. From lanes 1 to 6 PCR of omentum fibroblasts are shown and from lanes 7 to 12 PCR of differentiated fibroblasts from perirenal adipose tissue are shown.

exista la presencia de lípidos, los preadipocitos de tejido adiposo bovino son capaces de diferenciarse. No obstante esta diferenciación es menor que cuando en el medio de cultivo se adicionan lipoproteínas. Los procesos para la diferenciación de adipocitos se han estudiado principalmente en la línea celular inmortalizada 3T3, obtenida de embrión de ratón suizo; sin embargo éstas no reflejan necesariamente dicho proceso en todas las especies, por ello la inducción de la conversión adiposa depende del modelo de cultivo celular a utilizarse, y dentro de esto, la sensibilidad a los agentes inductores de la diferenciación pueden variar entre preadipocitos de línea celular y preadipocitos primarios y entre especies utilizadas.

En conjunto, el estándar de medio de cultivo adipogénico a usar estará enriquecido con suero, insulina, dexametasona e isobutylmetixantina, sin embargo el uso de cada uno de ellos depende de la especie. La hormona del crecimiento también ha mostrado efectos *in vitro* sobre la proliferación y diferenciación de preadipocitos que al parecer no concuerdan con establecido en sistemas *in vivo*. Como ya se mencionó las TZD se han usado para estimular la diferenciación de preadipocitos de diferentes modelos celulares, incluidos los bovinos. Es decir, no existe un “medio de cultivo” universal para diferenciar adipocitos, por lo que el establecimiento de un modelo adecuado permitirá realizar más estudios sobre la fisiología de este proceso en cada especie. Asimismo, estos resultados indican que diferentes sitios de tejido adiposo de diferentes edades tienen diferentes capacidades adipogénicas, al menos en las condiciones *in vitro* de nuestro estudio.

La diferenciación de los preadipocitos de bovino ha sido exitosa para diferentes tipos de depósitos; sin embargo los resultados no son concluyentes. Wu *et al*⁽¹²⁾ reportaron diferentes respuestas dependiendo del depósito de grasa. Por ejemplo, los preadipocitos del tejido adiposo subcutáneo de bovinos responden mejor a la estimulación con triglicéridos que los del omento. Sin embargo cuando se estimuló con indometacina (un ligando de PPAR γ), la diferenciación fue mayor para los preadipocitos del omento. En ratas los preadipocitos peri renales poseen mayor capacidad de diferenciación

In these cultures, the incorporation rate of Oil Red O by well in absorptivity units (510 nm) was 0.115, 0.169 and 0.206 for cultures in basal, differentiation 1 and differentiation 2 media, respectively. The higher absorptivity value belongs to both differentiation media ($P < 0.01$, $n = 6$). That is to say, that while morphological differentiation was seen in medium 2, apparently through Oil Red O results, medium 1 promoted fat accumulation, perhaps in smaller size and fat droplets could not be seen through the microscope. These results show that even though lipids are not present in differentiation media, preadipocytes of bovine adipose tissue can differentiate. Nevertheless, this differentiation is smaller than when lipoproteins are added to culture media. Adipocyte differentiation processes have been studied primarily in 3T3 immortalized cell line, obtained from Swiss rat embryos; however, these do not necessarily reflect what happens in other species, therefore adipose conversion induction depends on the cell culture model used, and inside this, sensitivity to differentiation induction agents can vary between cell line adipocytes and primary adipocytes and between species.

Overall, the adipogenic culture medium standard to be used shall be enriched with serum, insulin, dexamethasone and isobutylmetaxanthine. However, use of each of these components depends on the specie being studied. Growth hormone has also shown effects *in vitro* on preadipocyte proliferation and differentiation which seem not to concur with *in vivo* systems. As already mentioned, TZDs have been used to stimulate preadipocyte differentiation in different cell models, bovines included. That is to say that no universal “culture medium” exists to differentiate adipocytes, and due to this, establishing an adequate model will allow to perform more studies on the physiology of this process in different species. Besides, these results indicate that different adipose tissue sites and ages show different adipogenic capacity, at least in the *in vitro* conditions of the present study.

Bovine preadipocyte differentiation has been successful in different deposit types, however, results are not conclusive. Wu *et al*⁽¹²⁾ report different responses depending on fat deposits. For example,

que otros depósitos⁽¹⁸⁾, lo que sugiere que estas células tienen un potencial intrínseco de diferenciación, tal como se observó en nuestro estudio.

En humanos y borregos los preadipocitos subcutáneos que se diferencian tienen mayor actividad de la GPDH que los del omento⁽¹⁸⁾. En este estudio no se obtuvieron diferencias para la actividad de la GPDH entre los medios de cultivo, siendo la media de actividad obtenida de 270 nM de NADH/mg de proteína/min (EEM=28.53); esta situación fue similar a la reportada por Moncada⁽⁵⁾ para cultivos primarios de adipocitos de pollo, en donde lo que se midió fue el efecto de suero fetal bovino o suero de pollo sobre la diferenciación adipocítica, y no observó diferencias entre tratamientos, lo que se puede atribuir a los diferentes tipos de poblaciones celulares que existen en un cultivo primario (fibroblastos y adipocitos con diferentes niveles de diferenciación), lo que no ocurre en líneas celulares en donde se alcanza prácticamente diferenciar al 100 % de las células.

Respecto a la expresión de PPAR γ , esta fue positiva sólo para los cultivos de tejido adiposo peri renal de feto para el medio de diferenciación 2, tal como se muestra en la Figura 1E, donde se observa una banda de 511 pares de bases, lo que es similar a lo ya reportado⁽¹⁰⁾, siendo PPAR γ el mejor indicador de diferenciación adiposa. Se observan las bandas correspondientes a los seis animales de estudio.

En conclusión, las células del tejido adiposo peri renal fetal bovino son capaces de diferenciarse en adipocitos maduros *in vitro* (en cultivo) mediante la adición de insulina, dexametasona y lipoproteínas de muy baja densidad. Este sistema de cultivo podrá ser usado como herramienta para estudiar los mecanismos moleculares de la diferenciación adipocítica en esta especie.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por la FES-C UNAM, Cátedra IN2.02 y el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Proyecto 41337-Z. Los autores

subcutaneous adipose tissue preadipocytes show a better response to triglycerides than those of the omentum. However, when stimulated with indomethacin (a PPAR γ ligand), differentiation was greater in omentum preadipocytes. In rats, perirenal adipocytes show greater differentiation capacity than other deposits⁽¹⁸⁾, which suggests that these cells have intrinsic differentiation potential, as shown in the present study.

In humans and sheep, subcutaneous adipocytes which differentiate show more GPDH activity than those of omentum⁽¹⁸⁾. In the present study no differences in GPDH activity between media was observed, being the observed activity average 270 nM NADH/mg of protein/min (SE=28.53); this is similar to what is reported by Moncada⁽⁵⁾ for chicken adipocyte primary cultures, where effects of bovine fetus serum and chicken serum on adipocyte differentiation were studied. No differentiation between treatments was observed, which can be attributed to different types of cell populations present in primary cultures (fibroblasts and adipocytes in diverse differentiation stages), something that does not happen in cell lines in which differentiation reaches almost 100 % of cells.

With reference to PPAR γ expression, it was positive only for fetus perirenal adipose tissue in Differentiation Medium 2, as shown in Figure 1E, in which a 511 bp band is observed, similar to what is reported in another paper⁽¹⁰⁾, being PPAR γ the best indicator for adipose differentiation. The bands corresponding to the six animals studied are shown.

In conclusion, bovine fetus perirenal adipose tissue cells are capable of differentiating in mature adipocytes *in vitro* through addition of insulin, dexamethasone and very low density lipoproteins. This culture system could be used to study molecular mechanisms of adipocyte differentiation in bovines.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was funded by FES-C UNAM, Professorship IN2.02 and CONACYT Project 41337-

externan su agradecimiento al Rastro Municipal de Querétaro por las facilidades otorgadas para la recolección de las muestras.

Z. The authors wish to thank Querétaro's Municipal Slaughterhouse for their help in sample collection.

End of english version

LITERATURA CITADA

1. Emery RS. Mobilization, turnover and disposition of adipose tissue lipids. In: Digestive physiology and metabolism in ruminants. Proceed of the 5th Internat Symp Rum Physiol. Clermont-Ferrand, France. 1979.
2. Gregoire FM, Smas CM, Sook Sul H. Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev* 1998;78:783-809.
3. Ailhaud G, Grimaldi P, Negrel R. Cellular and molecular aspects of adipose tissue development. *Annu Rev Nutr* 1992;12:207-233.
4. Dani C. Embryonic stem cell-derived adipogenesis. *Cell Tissues Organs* 1999;165:173-180.
5. Moncada C. Factores que afectan el subcultivo serial y la acumulación lipídica de adipofibroblastos fetales de pollo [tesis Maestría]. México: Universidad Autónoma de Querétaro; 2000.
6. Ailhaud G. Development of white adipose tissue and adipocyte differentiation. In: Adipose tissue. Klaus S editor. Austin, TX, USA: Ed Landes Bioscience; 2001:27-54.
7. Rosen ED, Spiegelman B. Molecular regulation of adipogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2000;16:145-171.
8. Butterwith S, Peddie C, Goddard C. Regulation of adipocyte precursor DNA synthesis by acidic and basic fibroblast growth factors: interaction with heparin and other growth factors. *J Endocrinol* 1993;137:369-374.
9. MacDougald O, Lane D. Transcriptional regulation of gene expression during adipocyte differentiation. *Annu Rev Biochem* 1995;64:345-373.
10. Ohyama M, Matsuda K, Torii S, Matsui T, Yano H, Kawada, Ishihara T. The interaction between vitamin A and Thiazolidinedione on bovine adipocyte differentiation in primary culture. *J Anim Sci* 1998;76:61-65.
11. Torii S, Kawada T, Matsuda K, Matsui T, Ishihara T, Yano H. Thiazolidinedione induces the adipose differentiation of fibroblast-like cells resident within bovine skeletal muscle. *Cell Biol Int* 1998;22:421-427.
12. Wu P, Sato K, Suzuta F, Hikasa Y, Kagota K. Effects of lipid-related factors on adipocyte differentiation of bovine stromal-vascular cells in primary culture. *J Vet Med Sci* 2000;62:933-939.
13. Prokesh A. Large scale gene expression profiling during adipogenesis of murine bone marrow stromal cells [Masters thesis]. Graz, Austria and the National Institutes of Health, Bethesda, Md, USA: University of Technology; 2002.
14. Ramírez-Zacarias JL, Castro-Munozledo F, Kuri-Harcuch W. Quantitation of adipose conversion and triglycerides by staining intracytoplasmic lipids with Oil red O. *Histochemistry*. 1992;97:493-497.
15. Wise L, Green H. Participation of one isozyme of cytosolic glycerophosphate dehydrogenase of 3T3 cells. *J Biol Chem* 1979;254:273-275.
16. Castro-Munozledo F, Marsh-Moreno M, Beltrán-Langarica A, Kuri-Harcuch W. Commitment of adipocyte differentiation in 3T3 cells is inhibited by retinoic acid and expression of lipogenic enzymes is modulated through cytoskeleton stabilization. *Differentiation* 1987;36:211-219.
17. SAS Institute, Inc. SAS/STAT® User's Guide. Version 6.02. SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA. 1992.
18. Daniel P, Roncari D, Hollenberg C. Influence of anatomic site and age on the replication and differentiation of rat adipocyte precursors in culture. *J Clin Invest* 1983;72:1200-1208.