



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE
MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCION Y DE LA SALUD ANIMAL

“EFECTO DE ALGUNOS COMPONENTES LIPÍDICOS DE LOS
FORRAJES SOBRE LA DIFERENCIACIÓN DEL TEJIDO ADIPOSO
BOVINO *in vitro*”

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:
PATRICIA GARCIA ROJAS MONTIEL

TUTOR: DRA. MARIA OFELIA MORA IZAGUIRRE

COMITE TUTORAL: DR. ARMANDO SHIMADA MIYASAKA
DRA. ANAID ANTARAMIAN SALAS

CUAUTITLAN IZCALLI

2009



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.

El presente trabajo se realizó en el grupo de investigación del Laboratorio de Rumiología y Metabolismo Nutricional de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, ubicado en el A 03 del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México, Campus Juriquilla, Querétaro.

DEDICATORIAS:

Al principal motor en mi vida, mi hijo Mario Armando, con todo mi amor.

A mi Madre por brindarme siempre su comprensión y apoyo incondicional.

A mis hermanos Tonatiuh y Ernesto, con todo mi cariño.

A mi querido Padre y a mi hermano Mauricio, como los extraño...

Agradecimientos:

A la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán por brindarme la oportunidad de continuar mi superación académica y personal.

A Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca que me otorgo para la realización de mis estudios

A la Dra. María Ofelia Mora Izaguirre por brindarme siempre su apoyo, consejos, orientación y sobre todo sus conocimientos para llevar a buen fin, este proyecto, esperando contar siempre con algo que para mi es invaluable, su amistad.

A la Dra. Anaid Antaramian y al Dr. Armando Shimada Miyasaka, miembros de mi Comité Tutoral por todos los consejos, observaciones y apoyo que me brindaron durante la realización de mis estudios.

Al Dr. Alfredo Varela Echavarría por compartir conmigo opiniones sobre mi trabajo en el laboratorio.

A la MC Adriana González Gallardo de la Unidad de Proteogenómica, por ser en muchos aspectos la persona que me permitió avanzar con mayor seguridad en los primeras etapas de mi proyecto.

A la MC Laura González Dávalos, gracias por todo, el trabajar contigo a sido una feliz experiencia.

Para no olvidar a ninguno, a TODOS los queridos compañeros y compañeras del A 03 a los cuales tuve el placer de conocer durante este tiempo, siempre estarán en mis mejores recuerdos.

¡GRACIAS!

Al Dr. Francesc Villarroya Gombau por permitirme realizar una estancia de investigación relacionada con mis estudios de doctorado, en el Laboratorio que el dirige, dentro del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Biología de la Universidad de Barcelona.

A los miembros del jurado por sus valiosas observaciones y comentarios.

RESUMEN

El consumo creciente de carne de bovino requiere del constante desarrollo de tecnologías que mejoren la producción animal para obtener canales de calidad y en las que el contenido de grasa determina en gran medida dicha calidad. En el presente trabajo se estudió el efecto de compuestos que sean posibles promotores de adipogénesis. La importancia de la grasa alimenticia en la expresión de múltiples genes es clara, en el caso de bovinos para carne, la grasa en la forma de ácidos grasos (saturados o insaturados), vitamina A (principalmente ácido retinoico) o carotenoides (β -caroteno y luteína), son obtenidos constantemente a partir del alimento o de la pastura. El objeto de este trabajo fue estudiar el efecto de ácidos grasos insaturados (ácido fitánico y pristánico), vitamina A (ácido retinoico 9 cis y all trans) y carotenoides (β -caroteno y luteína) durante la diferenciación del tejido adiposo blanco bovino sobre la expresión de PPAR γ y su coactivador PGC1- α . Las muestras fueron tomadas de la región subcutánea de animales al sacrificio y fueron procesadas en una solución conteniendo colagenasa tipo II por 2 h a 37°C. Las células fueron resuspendidas con medio basal (medio DMEM con 5% de suero fetal bovino) y sembradas en cajas de cultivo con 24 pozos, a una densidad de 1×10^4 células/cm² e incubadas a 37°C. con una atmósfera de 5% de CO₂. Antes de la confluencia, la diferenciación fue inducida por diferentes tratamiento; ácidos grasos insaturados: ácido fitánico (25, 50, 100 μ M) y ácido pristánico (25, 50, 100 μ M); retinoides: ácido retinoico 9 cis (0.5, 0.75, 1 μ M) y todo trans (0.5, 0.75, 1 μ M) y carotenoides: β -caroteno (10, 20, 30 μ M) o luteína (10, 20, 30 μ M). La expresión de PPAR γ y PGC-1 α fue medida de células diferenciadas. Los resultados mostraron que el fitánico, ácido retinoico 9 cis y all trans fueron los mejores activadores de la expresión de PPAR γ . Por consiguiente estos compuestos son agentes potentes para promover la adipogénesis bovina y sería interesante considerarlos para la engorda de bovinos.

Palabras clave: PPAR γ , PGC-1 α , grasa alimenticia, bovino para carne.

ABSTRACT

The increasing beef consumption in Mexico require the constant development of technologies to improve animal production to obtain quality beef carcass where the fat content determines in great measure its quality, therefore in this research we study the adipose tissue physiology and the effect of compounds that are potential promoters of adipogenesis. The importance of dietary fat in the expression of multiple genes is clear, in the case of beef cattle, fat in the form of fatty acids (saturated or unsaturated), vitamin A (mainly retinoic acid), or carotenoids (β -carotene and lutein), is obtained constantly from the dietary feed or from pasture. The aim of this work was to study the effect of fatty acids (phytanic acid and pristanic), vitamin A (all trans and 9 cis retinoic acid), and carotenoids (β -carotene and luteine) during differentiation of the bovine white adipose tissue, over the expression of PPAR γ and its coactivator PGC-1 α . Samples were collected at slaughter from subcutaneous adipose tissue and were processed in a solution containing Type II collagenase for 2 h at 37°C. Cells were re-suspended with basal medium, DMEM medium containing 5% fetal bovine serum, plated in 24-well culture plate at a density of 1×10^4 cells/cm² and incubated at 37°C and 5% CO₂ atmosphere. Before confluence, preadipocyte differentiation was induced by different treatments; unsaturated fatty acids: phytanic acid (25, 50, 100 μ M) and pristanic acid (25, 50, 100 μ M); retinoids: 9 cis-retinoic acid (0.5, 0.75, 1 μ M) and all trans retinoic acid (0.5, 0.75, 1 μ M) and carotenoids: β -carotene (10, 20, 30 μ M) or lutein (10, 20, 30 μ M). PPAR γ and PGC-1 α expression was measured from differentiated cells. The results show that phytanic, all-trans retinoic acid and 9-cis retinoic acid, were the best activators of PPAR γ expression. Therefore these are powerful agents for bovine adipogenesis promotion, and promissory compounds in bovine fattening.

Key words: PPAR γ , PGC-1 α , dietary fat, beef cattle

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIAS	4
AGRADECIMIENTOS	5
RESUMEN	6
ABSTRACT	7
ÍNDICE GENERAL	8
ÍNDICE DE CUADROS	9
ÍNDICE DE FIGURAS	10
ABREVIATURAS	11
1. ANTECEDENTES	13
1.1 Carne de bovino	13
1.1.1 Situación actual de la carne de bovino en México	13
1.1.2 Definición y clasificación	17
2. INTRODUCCION	20
3. JUSTIFICACIÓN	36
4. HIPÓTESIS	36
5. OBJETIVOS	36
5.1 Objetivo general	36
5.2 Objetivos particulares	36
6. Artículo: Levels of PPAR γ and PGC-1 α induction by unsaturated fatty acids, retinoic acid and carotenoids in white bovine adipose tissue	37
7. DISCUSIÓN	38
8. CONCLUSIONES	46
9. LITERATURA CITADA	47

Anexos

Artículo: "Papel del coactivador PGC-1 α en el balance energético. Importancia en la producción de bovinos de engorda"

Artículo: Levels of PPAR γ and PGC-1 α induction by unsaturated fatty acids, retinoic acid and carotenoids in white bovine adipose tissue

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Resumen de la balanza nacional disponibilidad-consumo de carne en canal de bovino, periodo 1990-2008.	15
Cuadro 2. Resumen nacional de producción, precio, valor, animales sacrificados y peso de carne en canal de bovino 1990-2007.	16
Cuadro 3. Criterios mínimos y/o límites máximos de aplicación general en todo el país para establecer los diferentes grados básicos de calidad.	18
Cuadro 4. Principales moléculas sintetizadas por el tejido adiposo.	23
Cuadro 5. Promedios (\pm DE) de concentraciones plasmáticas de retinol ($\mu\text{g/ml}$) en vaquillas a pastoreo en los meses de invierno y primavera.	42

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Carne de bovino selecta.	19
Figura 2. Tejido adiposo blanco (TAB)	21
Figura 3. Representación esquemática de los receptores nucleares.	29
Figura 4. Esquema de los principales elementos involucrados en el funcionamiento de PPAR γ	30
Figura 5. Ácidos grasos, ligandos naturales de PPAR γ	32
Figura 6. Carotenoides, ligandos naturales de PPAR γ	32
Figura 7. Estructura química de algunos retinoides biológicamente activos.	34
Figura 8. Regulación transcripcional regulada medio de los heterodímeros PPAR-RXR.	35
Figura 9. Estructura química del PPAR γ y su LBD	39
Figura 10. Nueva vía de regulación del gen de PGC-1 α .	40
Figura 11. Base estructural de la regulación de la función de la activación (AF2) por los ligandos de receptor nuclear RXR.	43

ABREVIATURAS

ADD1/SREBP1	Adipocyte differentiation and determination factor 1/sterol regulatory element binding protein 1
AMPc	Adenosina 5'-monofosfato cíclico
ATP	Adenosine trifosfato
C/EBP	Proteína de unión a CCAAT/enhancer
CNA	Consumo nacional aparente
E2F	Factor transcripcional regulador de la progresión del ciclo celular
FABP	Proteína de unión a ácidos grasos
FAS	Ácido graso sintasa
FIAF	Fasting-induced adipose factor
GLUT-4	Transportador de glucosa de tipo 4
HDL	Lipoproteína de alta densidad
HSL	Lipasa sensible a hormonas
IBMX	Isobutilmetilxantina
IGF-1	Insulin-like growth factor 1
IL-6	Interleuquina 6
LBD	Dominio de unión al ligando (siglas en inglés)
LPL	Lipoproteína lipasa
MIF	Factor inhibitorio de la migración de macrófagos
NADP	Dinucleótido de nicotinamida adenina fosfato
NAD+	Dinucleótido de nicotinamida adenina reducido
NEFAs	Ácidos grasos no esterificados
PAI-1	Plasminogen activator inhibitor 1
PBS	Phosphate buffered saline
PGC-1α	Coactivador del receptor activado por proliferadores peroxisomales γ -1 α
PEPCK	Fosfoenol piruvato carboxicinasasa
PPAR	Receptor activado por proliferadores peroxisomales

PPREs	Elementos de respuesta reguladores de la proliferación de peroxisomas
PREF-1	Factor preadipocitario 1
RAR	Receptor del ácido retinoico
RXR	Receptor X de retinoides
SREBP	Elemento regulador de esteroides unido a proteínas
STATs	Transductores de señal y activadores de la transcripción
TA	Tejido adiposo
TAB	Tejido adiposo blanco
TAC	Tejido adiposo café
TMCA	Tasa media de crecimiento anual
TNF-α	Factor de necrosis tumoral α
TZDs	Tiazolidinedionas
UCP-1	Proteína desacopladora
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad

1. ANTECEDENTES.

1.1 Ganadería productora de carne

1.1.1 Situación actual de la carne de bovino en México.

La carne de bovino es uno de los productos pecuarios de mayor consumo nacional gracias a su gran valor nutrimental con alto contenido proteínico, agradable sabor y versatilidad gastronómica. La producción en el año 2006 alcanzó 1,612,992 toneladas, lo que significa un crecimiento del 3% con relación a la del año previo, y una participación del 30% en la producción total de carnes en México. De acuerdo al resumen nacional de producción 2007 y 2008, la carne de bovino continúa creciendo en un 1.4 y 1.3% con respecto a los años previos, respectivamente (Cuadro 1), manteniendo el mismo porcentaje de participación y colocándose a la cabeza, junto con la carne de ave, en la producción total de cárnicos en el país (SIAP, SAGARPA, 2008).

Aunque la ganadería bovina se realiza en todo el país, se identifican entidades que aportan fuertes volúmenes al censo nacional.

En la actualidad el principal estado productor de bovino en el país es Veracruz , con 44 millones de toneladas que representa el 14.2% de la producción nacional, seguido por Jalisco con el 11.3% (35 millones de toneladas) y Chiapas que representa el 6.3% con (19 millones de toneladas) según el Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (Financiera rural, 2009). Estos tres estados junto con Sonora (4.5%), Sinaloa (4.5%) y Baja California (4.6%) representan el 45.4% de la producción nacional (SIAP, 2009).

A pesar de los pronósticos de crecimiento en las importaciones debido a las tendencias observadas entre 1998 y 2002 por la falta de oferta para cubrir la demanda, el fortalecimiento de la economía y el crecimiento de la población (FIRA 2002), los cambios suscitados en el mercado externo en 2003 llevaron a la orientación de las exportaciones de carne de bovino de algunas naciones

proveedoras de México, hacia otros mercados de mayor poder adquisitivo. Como efecto de esta situación y del crecimiento de los precios en el mercado internacional, las importaciones mexicanas de este cárnico se redujeron a 266,000 toneladas, 31.2% menos que el año previo. En años postreros a la fecha, las importaciones de carne de bovino se han mantenido sin cambios drásticos; la producción ha crecido con el consumo y las exportaciones se redujeron marcadamente a partir de 2004, patrones que impactan en gran medida a que no existan requerimientos y/o crecimiento sustentable en las importaciones.

La carne de bovino ocupa un papel preponderante dentro del consumo total de carnes en México, manteniéndose como el eje en torno al cual se determinan condiciones del mercado general de cárnicos y en cierta medida de los precios. Las tendencias, en los últimos años, en materia de producción, importaciones, exportaciones y consumo nacional aparente (CNA) de carne de bovino en México se resumen en el Cuadro 1. CNA es la medida de la cantidad de producto que está a disposición de un país para su adquisición. Dentro de esta estimación se consideran la producción nacional, las importaciones de ganado para abasto (convertidos a carne en canal) y las de carnes en canal y cortes, así como las exportaciones de ganado para abasto y/o engorda (convertidos a carne en canal) y carne en canal y cortes.

Cuadro 1. Resumen de la balanza nacional disponibilidad-consumo de carne en canal de bovino, periodo 1990-2008.

Año	Composición en volumen (toneladas)			Composición porcentual		
	Producción	Importaciones	Exportaciones	CNA	Producción*	Importaciones
1990	1,113,919	50,819	134,424	1,030,314	95.1	4.9
1991	1,188,687	163,073	123,727	1,228,034	86.7	13.3
1992	1,247,195	196,754	104,341	1,339,609	85.3	14.7
1993	1,256,478	103,385	129,624	1,230,239	91.6	8.4
1994	1,364,711	140,203	104,701	1,400,213	90.0	10.0
1995	1,412,336	41,784	166,988	1,287,133	96.8	3.2
1996	1,329,947	110,402	47,366	1,392,983	92.1	7.9
1997	1,340,071	197,558	66,835	1,470,793	86.6	13.4
1998	1,379,768	262,996	72,089	1,570,676	83.3	16.7
1999	1,399,629	287,769	104,505	1,582,893	81.8	18.2
2000	1,408,618	337,986	123,611	1,622,993	79.2	20.8
2001	1,445,211	335,697	116,132	1,664,776	79.8	20.2
2002	1,467,574	386,825	96,762	1,757,637	78.0	22.0
2003	1,503,760	265,956	127,121	1,642,595	83.8	16.2
2004	1,543,730	256,700	8,300	1,791,500	85.7	14.3
2005	1,557,707	310,300	17,900	1,851,600	83.2	16.8
2006*	1,612,992	284,800	19,200	1,843,600	86.4	13.6
2007	1,635,040	286,500	27,800	1,878,100	85.6	14.4
2008*	1,656,391	—	—	—	—	—

*Producción** es la composición porcentual del CNA y se estima restando las exportaciones a la producción nacional. /2006* Estimado por el SIAP. /2008* Pronosticado. /Fuente: Coordinación General de Ganadería, SAGARPA.

El valor de la producción tanto del ganado para abasto como de la carne bovina en canal, continuó registrando incrementos en los últimos años, como consecuencia de la combinación del crecimiento en sus volúmenes y en sus precios (Cuadro 2).

Cuadro 2. Resumen nacional de producción, precio, valor, animales sacrificados y peso de carne en canal de bovino 1990-2008.

Año	Producción (toneladas)	Precio (pesos por kilogramo)	Valor de la producción (miles de pesos)	Animales sacrificados (cabezas)	Peso (kilogramos)
1990	1,113,919	7.68	8,550,543		
1991	1,188,687	8.49	10,096,360		
1992	1,247,195	8.18	10,197,849		
1993	1,256,478	8.35	10,488,082		
1994	1,364,711	8.13	11,099,642		
1995	1,412,336	10.58	14,945,373		
1996	1,329,947	13.29	17,677,977		
1997	1,340,071	17.59	23,565,505	6,327,000	212
1998	1,379,768	18.99	26,198,298	6,578,000	209
1999	1,399,629	21.11	29,545,733	6,892,639	203
2000	1,408,618	21.83	30,754,342	6,975,749	202
2001	1,444,621	22.58	32,612,447	7,099,784	203
2002	1,467,574	22.20	32,579,708	7,111,997	206
2003	1,503,760	23.67	35,586,877	7,190,363	209
2004	1,543,730	26.49	40,889,886	7,650,065	202
2005	1,557,707	30.14	46,945,454	7,666,414	203
2006	1,612,992	30.49	49,176,123	7,860,027	205
2007	1,635,040	30.90	50,516,520	7,968,710	205
2008	1,667,136	31.79	52,999,749	8,074,451	206

Fuente: Elaborado por el servicio de información agroalimentaria y pesquera (SIAP), con información de las delegaciones de la SAGARPA.

1.1.2 Definición y clasificación.

Por definición, la carne de bovino, según la Norma Oficial Mexicana NMX-FF-078-SCFI-2002, es el cuerpo del animal sacrificado, desangrado y sin piel, abierto a lo largo de la línea media del pecho y abdomen a la cola; separado de la cabeza al nivel de la articulación occipitoatloidea; de las extremidades anteriores al nivel de la articulación carpometacarpiana y de las posteriores al nivel de la tarsometatarsiana; con o sin la presencia de cola, amputada ésta a la altura de la segunda vértebra caudal; sin vísceras cavitarias (excepto los riñones), quedando el diafragma adherido, sin genitales ni ubre.

La *clasificación de canales de bovino* es la determinación del grado de calidad de la canal después de haber sido sometida a un estudio técnico en base a parámetros especificados en dicha norma (Cuadro 3); y la *calidad de la carne en canal*, se refiere a los atributos o características deseables para el consumo humano, y cuya relación da lugar a los distintos grados de clasificación. Para efecto de esta norma las canales de ganado bovino se han clasificado de acuerdo a los siguientes grados básicos de calidad:

- ❖ Suprema
- ❖ Selecta
- ❖ Estándar
- ❖ Comercial
- ❖ Fuera de clasificación

Los parámetros especificados a que se hace mención anteriormente, se refieren a los criterios empleados para definir cada una de las categorías básicas o grados básicos de calidad. Dichos criterios se muestran a continuación, en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Criterios mínimos y/o límites máximos de aplicación general en todo el país para establecer los diferentes grados básicos de calidad (adaptado de NOM NMX-FF-078-SCFI-2002).

	Grados de calidad de las canales			
	Suprema	Selecta	Estándar	Comercial
Madurez	Con base a grado de osificación			
Conformación de la canal/Muscularidad	<p>Perfil de la pierna convexo y redondo en vista lateral y transversal. Lomos amplios y redondos cubriendo y aún rebasando el espacio comprendido entre las apófisis transversas y espinosas de las vértebras lumbares y torácicas. Musculatura de espaldilla y base del cuello redondeados y en balance armónico con el resto de la canal.</p>	<p>Perfil de la pierna convexo en vista lateral y en plano en vista transversal. Lomos planos cubriendo el espacio comprendido entre las apófisis transversas y espinosas de las vértebras lumbares y torácicas. Musculatura de espaldilla y base del cuello marcados sin llegar a conferir aspecto de redondez.</p>	<p>Perfil de la pierna recto y plano en vista lateral y transversal. Lomos planos cubriendo escasamente el espacio comprendido entre las apófisis transversas y espinosas de las vértebras lumbares y torácicas. Musculatura de la espaldilla y base del cuello planos.</p>	<p>Perfil de la pierna cóncavo o plano. Desarrollo deficiente de lomos y de la musculatura en general.</p>
Color de la grasa	Blanca (Equivalente a clave Power Point 255-255-255)	Blanca a cremosa (Equivalente a clave Power Point 255-255 de 255 a 210)	Cremosa a ligeramente amarilla (Equivalente a clave Power Point 255-255 de 210 a 200)	Puede ser amarilla (Equivalente a clave Power Point 255-255 menor de 200)
Color de la carne	<p>Rojo cerezo (Clave 186C)</p> <p>Sistema Pantone</p>	<p>Rojo cerezo (Clave 186C) a rojo intenso (Clave 1805)</p> <p>Sistema Pantone</p>	<p>Rojo intenso (Clave 1805) a rojo oscuro (Clave 188C)</p> <p>Sistema Pantone</p>	<p>Se acepta rojo oscuro (Clave 188C)</p> <p>Sistema Pantone</p>
Distribución de la grasa subcutánea	Capa uniforme en pierna, lomo y costillar.	Capa uniforme en pierna, lomo y costillar.	Capa NO uniforme.	Sin requisito mínimo.
Grasa perirrenal	Cobertura del 50% en adelante.	Cobertura del 25% en adelante.	Cobertura del 25% en adelante.	Sin requisito mínimo.

De acuerdo al cuadro anterior, la calidad de la canal está en función, entre otras cosas, de la distribución de la grasa subcutánea (Figura 1) y del porcentaje de la que recubre riñones, entre otros criterios, lo cual se sugiere en la norma oficial mexicana NMX-FF-078-SCFI-2002.



Figura 1. Carne de bovino selecta. El color de la grasa de la carne es de blanca a cremosa, con una distribución de la grasa subcutánea uniforme en pierna, lomo y costillar.

Dada la importancia de la calidad de las canales y sabiendo el impacto que tienen sobre su precio, resulta de gran importancia estudiar el efecto de algunos componentes lipídicos de la dieta, sobre la diferenciación del tejido adiposo bovino *in vitro.*, lo que nos permitirá conocer más a fondo su fisiología, lo cual resulta fundamental en el proceso productivo de la canal, ya que el tejido adiposo representa parte importante del sabor y textura de la carne.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Tejido Adiposo

La homeostasis energética en mamíferos es el resultado del balance entre el aporte y el gasto energético. En gran medida, el equilibrio se mantiene a través de una respuesta coordinada entre el sistema nervioso y el tejido adiposo, siendo este último la principal reserva energética del organismo, así como la vía por la cual se disipa ésta (Rodríguez de la Concepción, 2004).

La digestión, la gestación, el requerimiento de la producción de calor y el ejercicio físico son los procesos que determinan el balance energético y en último caso estarán afectando el peso corporal. El organismo procesará e integrará respuestas a través de señales nerviosas y hormonales, y es importante resaltar que también algunos nutrientes de la dieta se convertirán en señales y sensores el *status* energético (Rodríguez de la Concepción, 2004).

El Tejido adiposo (TA) está formado por diversos tipos celulares, entre ellos los adipocitos, preadipocitos con diversos grados de diferenciación, fibroblastos, células endoteliales y sanguíneas, se encuentra distribuido principalmente a escala dérmica, subcutánea, mediastínica, mesentérica, perigonadal, perirrenal y retroperitoneal (Moreno y Martínez, 2002).

En mamíferos existen dos tipos de TA, los cuales difieren en distribución, color, vascularización y actividad metabólica; éstos son el Tejido adiposo blanco (TAB), el cual está ampliamente distribuido y constituye la grasa corporal, y el Tejido adiposo café (TAC) el cual es menos abundante y se limita a ciertas áreas específicas. El TAC es el principal sitio donde se lleva a cabo la termogénesis compensatoria para el mantenimiento de la temperatura corporal en animales jóvenes (Ailhaud *et al.*, 1992; Dani, 1999; Emery, 1979).

2.1.1 Tejido Adiposo Blanco

El TAB es la mayor reserva energética en los animales, se utiliza como reservorio de triglicéridos en períodos durante los cuales existe un exceso de energía alimenticia y se moviliza durante períodos de privación de ésta (Emery, 1979; Gregoire *et al.*, 1998).

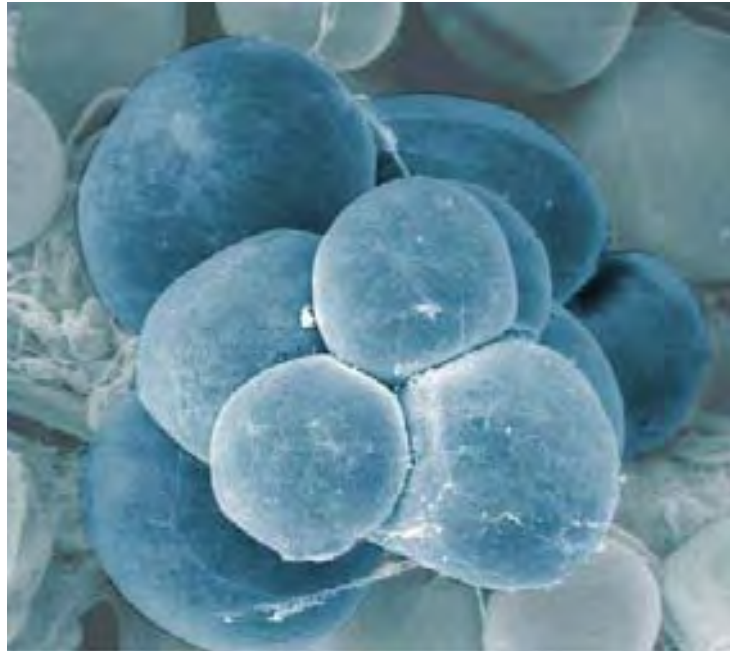


Figura 2. Adipocitos humanos (aumento x 400)

La masa de TAB está determinada por el balance entre el consumo y el gasto de energía (Dani, 1999). Es el sitio principal para la síntesis de ácidos grasos en los rumiantes y constituye una reserva dinámica de energía, a través de la cual fluye del 10 al 80% de la energía diaria, dependiendo del estado productivo, el tipo de alimento y los requerimientos de energía en relación al consumo (Emery, 1979).

Basados en incubaciones *in vitro* y en el uso de compuestos marcados *in vivo*, quedó establecido que el acetato es el precursor primario para la síntesis *de novo* de ácidos grasos en los rumiantes, y que éste proceso es el más activo en el TA de estos animales. La utilización de glucosa para la lipogénesis es limitada en los rumiantes y esto es debido a los bajos niveles de la ATP-citrato-liasa

(enzima que provoca la ruptura del citrato) y/o de la NADP-malato-deshidrogenasa (enzima mística) (Smith, 1995).

La principal fuente de triglicéridos para los adipocitos procede de los quilomicrones y de las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL, por sus siglas en inglés) circulantes. Los triglicéridos de estas lipoproteínas son hidrolizados hasta ácidos grasos libres y monoglicerol por la lipoproteína lipasa (LPL) que se encuentra en la pared de los capilares del tejido adiposo. Estos ácidos grasos libres son captados por los adipocitos a través de procesos de transporte activo mediado por proteínas transportadoras específicas de ácidos grasos. Una vez en el interior de la célula, los ácidos grasos son reesterificados para formar triglicéridos. (Moreno y Martínez, 2002).

La lipólisis es regulada por la lipasa sensible a hormona, la cual es una enzima intracelular activada por AMPc-dependiente de la proteína-cinasa (Sprinkle *et al.*, 1998). Durante la lipólisis, los triglicéridos almacenados en el tejido adiposo son hidrolizados hasta ácidos grasos y glicerol. Los tejidos periféricos consiguen acceder a los depósitos de energía de los lípidos del tejido adiposo a través de tres etapas de procesamiento. En primer lugar, los lípidos deben mobilizarse. En este proceso los triacilglicéridos se degradan a ácidos grasos y glicerol, que se liberan desde el tejido adiposo y se transportan a los tejidos que requieren energía. En segundo lugar, en estos tejidos, los ácidos grasos deben activarse y transportarse al interior de la mitocondria para su degradación. En tercer lugar, los ácidos grasos se descomponen de manera secuencial en acetil-CoA, que posteriormente se procesa en el ciclo del ácido cítrico (Stryer *et al.*, 2003).

Los ácidos grasos liberados no son solubles en el plasma sanguíneo, así que, tras la liberación, la albúmina sérica se une a los ácidos grasos y les sirve de portador. De este modo, los ácidos grasos libres se vuelven accesibles como combustible para otros tejidos (Stryer *et al.*, 2003).

Además de su papel como reserva energética, el TA actúa como una glándula que secreta factores autocrinos, paracrinos y endocrinos. En años recientes, se ha demostrado que el tejido adiposo produce una serie de citocinas, tales como el factor de necrosis tumoral, la leptina y el inhibidor del activador del

plasminógeno-1 (PAI-1). También puede formar hormonas tales como estradiol y cortisol, a partir de sus precursores. Además, en el TA se encuentra presente la mono-amino-oxidasa, enzima que puede metabolizar catecolaminas (Chilliard *et al.*, 2000).

La leptina es elaborada y secretada por los adipocitos maduros y se une a sus receptores en el hipotálamo o en tejidos periféricos. La leptina regula la masa de grasa corporal. La pérdida de reservas grasas disminuye los niveles de leptina e incrementa los del neuropéptido Y, lo que produce un incremento en el consumo de alimento. Contrario a esto, la ganancia de peso incrementa los niveles de leptina y disminuye el consumo alimenticio. La hormona estimulante de los melanocitos es necesaria para que se observe esta respuesta (Gregoire *et al.*, 1998).

El TA también participa en la regulación de la respuesta inmune secretando adiposina (que es un componente de la vía alterna del complemento), el factor de necrosis tumoral tipo α (TNF- α) y el factor inhibitorio de la migración de macrófagos (MIF). El TA secreta proteínas relacionadas con la función vascular como el angiotensinógeno y el PAI-1. El primero participa en la regulación del aporte sanguíneo y en el flujo de ácidos grasos desde el TA y el segundo parece estar involucrado en el desarrollo de enfermedades vasculares asociadas con la obesidad abdominal (Gregoire *et al.*, 1998) (Cuadro 4).

Cuadro 4. Principales moléculas sintetizadas por el tejido adiposo	
Leptina	Disminuye la ingesta y regula el balance energético.
TNF- α	Incrementa lipólisis, activa a LPL.
Resistina	Disminuye sus niveles con la diferenciación del tejido adiposo y mejora resistencia a la insulina.
FIAF (Fasting induced adipose factor)	Regulación del metabolismo en condiciones de ayuno.
PAI-1 (Plasminogen activator inhibitor-1)	Contribuye al desarrollo de la obesidad y la resistencia a insulina.
Adipsina	Actúa a nivel del adipocito, regula metabolismo lipídico.
IL-6	Regulador del balance energético, contribuye a la resistencia a la insulina.
Ácidos grasos	Reguladores de la expresión génica.
Adiponectina	Hormona con efectos antidiabéticos, antiinflamatorios y antiaterogénicos.

(adaptado de Rodríguez de la Concepción, 2004).

2.1.2. Tejido Adiposo Café

En prácticamente todos los mamíferos, incluida la especie humana, la actividad del Tejido adiposo café (TAC) como productor de calor es fundamental para el mantenimiento de la temperatura corporal tras el nacimiento, cuando los neonatos necesitan una elevada producción de calor en la transición de la vida intrauterina a la extrauterina (Cannon y Nedergaard, 1986).

Asimismo, la termogénesis del TAC también juega una función primordial en la adaptación a ambientes fríos en el animal adulto de muchas especies, además de un papel importante en el despertar de animales en hibernación.

Rothwell y Stock (1986) propusieron que la actividad termogénica generada por el TAC podría ser un mecanismo de regulación del peso corporal, que se opondría al desarrollo de la obesidad, gracias a la actuación del tejido (al menos para roedores adultos) como centro de disipación de la energía de la dieta ingerida en exceso.

Mientras la principal función del TAB es la de servir de reserva energética, el TAC está dotado de mecanismos que disipan la energía para generar calor (termogénesis) y esta función la asume a través de la proteína desacoplante mitocondrial (UCP-1), cuya expresión solo se presenta en este tejido y por lo tanto sirve para su identificación (Moreno y Martínez, 2002).

Además de las diferencias funcionales, también existen diferencias morfológicas, los adipocitos cafés se distinguen de los blancos por las inclusiones lipídicas multiloculares y un mayor número de mitocondrias que garantiza su gran capacidad respiratoria; mientras que los adipocitos blancos se caracterizan por una inclusión lipídica grande y pocas mitocondrias (Ailhaud *et al.*, 1992).

La dualidad funcional entre el TAB y el TAC queda reflejada por el papel de ambos en la obesidad; mientras el exceso de ingesta aumenta los depósitos

lipídicos en el TAB, el TAC protege de la obesidad inducida por la dieta gracias a la termogénesis del tejido (Hamann *et al.*, 1996).

2.2 Desarrollo del tejido adiposo

2.2.1 Desarrollo tisular.

Los preadipocitos tienen un origen mesodermal, que da origen además del TA a los tejidos muscular, óseo y cartilaginoso. En bovinos, como en humanos, la diferenciación del TAB comienza durante la etapa final del desarrollo embrionario y no finaliza después del nacimiento, continua hipertrofiándose dependiendo de la ingesta (Burdí *et al.*, 1985), en ratones y ratas el proceso de conversión de preadipocitos a adipocitos del TAB tiene lugar después del nacimiento, a diferencia del TAC, cuya diferenciación es completamente prenatal.

La línea adipocitaria deriva de un precursor embrionario multipotente y que posee capacidad para diferenciarse en células unipotentes y comprometidas hacia el desarrollo de varios tipos celulares determinados, tales como adipocitos, condrocitos, osteoblastos y miocitos. A pesar de todo, los preadipocitos del tejido adiposo café y blanco son aparentemente indistinguibles y se desconoce el mecanismo a través del cual un fibroblasto precursor dará lugar a un adipocito blanco o café, ya que existe una gran similitud entre el proceso de diferenciación de ambos tejidos adiposos. (Moreno y Martínez, 2002).

El proceso de diferenciación supone cambios cronológicos en la expresión de numerosos genes. Así, se van presentando aquellos genes característicos de los adipocitos, al mismo tiempo que se van reprimiendo aquellos que son inhibitorios para la adipogénesis o que no son necesarios para la función del adipocito. Todos estos cambios en la expresión y función de estos genes conducen finalmente a la adquisición del fenotipo característico del adipocito maduro (Prawitt *et al.*, 2008).

De acuerdo a lo anterior, y ya que los fenómenos moleculares implicados en la diferenciación de los adipocitos no son totalmente conocidos, dichos procesos

se han estudiado principalmente en líneas celulares de preadipocitos como por ejemplo las 3T3-L1, las cuales presentan cuatro etapas de crecimiento celular *in vitro*: 1) Inhibición del crecimiento, 2) Expansión clonal, 3) Cambios tempranos en la expresión de genes y 4) Eventos tardíos y diferenciación terminal. Dichas etapas también las podemos observar, con pequeñas variaciones, en los cultivos primarios (Gregoire *et al.*, 1998).

1) Inhibición del crecimiento

Las células sufren múltiples divisiones mitóticas, y comienzan a saturar la superficie de cultivo *in vitro*. Así, comienza a haber mayor proximidad entre ellas, una vez alcanzada la confluencia, los preadipocitos sufren inhibición por contacto y cesan su crecimiento.

2) Expansión clonal

Para que se lleve a cabo el proceso de diferenciación adipocítica se requiere del cese de la proliferación celular lo cual ocurre, *in vitro*, cuando las células se encuentran confluentes. El tratamiento de estas células en las que ha cesado el crecimiento, con medio de diferenciación, las induce a reentrar en el ciclo celular, y se producen varios ciclos de replicación de DNA y duplicación celular (Moreno y Martínez, 2002). Esta expansión mitótica clonal de células comprometidas es esencial para completar la diferenciación terminal en adipocitos maduros. Las proteínas del retinoblastoma (Rb) modulan la actividad de E2F, un factor de transcripción que juega un papel fundamental en la regulación de la progresión del ciclo celular.

Varios estudios recientes han sugerido que las proteínas Rb juegan un papel fundamental en la regulación de la expansión mitótica clonal necesaria para la diferenciación de los adipocitos 3T3-L1 (Moreno y Martínez, 2002).

La expresión de la Lipoproteína lipasa (LPL) ha sido considerada a menudo como un signo temprano de la diferenciación adipocitaria. La expresión de LPL ocurre, sin embargo, de manera espontánea al alcanzar la confluencia y es independiente de los inductores de la diferenciación. Esta circunstancia sugiere

que LPL puede reflejar la etapa de cese del crecimiento más que ser un marcador temprano del proceso de diferenciación (Gregoire *et al.*, 1998).

3) Cambios tempranos en la expresión de genes.

Conforme la expansión clonal cesa, se inicia la activación transcripcional coordinada de genes específicos del adipocito. La expresión de estos genes se acompaña de cambios bioquímicos y morfológicos que conducen a la adquisición del fenotipo del adipocito.

El proceso de adipogénesis habitualmente se describe como una cascada de eventos genéticos. Hasta ahora, se han descrito dos familias de factores de transcripción, las proteínas de unión a CCAAT/enhancer (C/EBPs, por sus siglas en inglés) y el receptor activado por proliferadores peroxisomales γ (PPAR γ , por sus siglas en inglés), que han sido identificadas como claves de la transcripción de genes adipogénicos (MacDougald y Lane, 1995).

Otro factor que también parece estar implicado en el proceso de diferenciación es el factor de determinación y diferenciación del adipocito 1/elemento regulatorio de esteroides unidos a proteínas 1 (ADD1/SREBP1, por sus siglas en inglés). La coexpresión de este factor de transcripción incrementa la actividad transcripcional de PPAR γ (Gregoire *et al.*, 1998).

Entre los genes que disminuyen su expresión a lo largo de la diferenciación es de destacar el factor de preadipocito 1 (Pref-1, por sus siglas en inglés). Pref-1 presenta altos niveles de expresión en preadipocitos y su expresión disminuye durante la diferenciación, siendo completamente indetectable en adipocitos maduros.

4) Eventos tardíos y diferenciación terminal

Durante la fase final de la diferenciación, los adipocitos en cultivo incrementan marcadamente la lipogénesis *de novo*, observándose, por tanto, un incremento en la expresión y actividad de enzimas implicadas en esta ruta tales como la sintasa de ácidos grasos (FAS, por sus siglas en inglés), enzima málica, glicerol

3-fosfato deshidrogenasa, entre otras. Durante esta etapa aumenta también considerablemente la sensibilidad a la insulina, debido a un gran aumento en el número de receptores de insulina y transportadores de glucosa dependientes de insulina (GLUT4) (Moreno y Martínez, 2002). En esta etapa, se expresan y sintetizan a su vez otros genes y productos específicos de los adipocitos como aP2, una proteína fijadora de ácidos grasos específica de adipocitos, y perilipina, una proteína asociada a las gotas de lípidos.

Además, los adipocitos en esta etapa comienzan a secretar algunos mensajeros endócrinos y parácrinos tales como leptina, adiposina, inhibidor activador plasminogénico 1 (PAI-1, por sus siglas en inglés) y la angiotensina (Gregoire *et al.*, 1998).

2.2.2 Control transcripcional de la diferenciación.

Los receptores nucleares (NRs por sus siglas en inglés) forman una superfamilia de factores de transcripción activados por ligando compuestos por seis dominios. El dominio N-terminal A/B alberga la función de activación de transcripción autónoma AF-1. El dominio C es el dominio de unión al DNA que reconoce también el llamado elemento de respuesta a ligando en la región promotora del gen blanco vía dos módulos de dedos de zinc. El dominio E, alberga el sitio de unión al ligando y una función de activación de transcripción dependiente de ligando (AF-2), es localizado en el extremo C terminal. Los receptores nucleares se unen al ligando en una cavidad dentro del dominio de unión al ligando (LBD por sus siglas en inglés), los cuales tienen una estructura conservada consistente en tres capas antiparalelas de alfa-hélices (11-13), la alfa-hélice C terminal llamada hélice 12 sirve como un switch molecular, la capa central esta incompleta dejando una cavidad donde se puede unir el ligando, el tamaño de la misma varia de acuerdo a la disposición de las hélices en las capas exteriores y donde encontramos, por ejemplo, residuos de glutamato y lisina altamente conservados (Molnár *et al.*, 2005).

Los receptores nucleares activan la transcripción en respuesta a la unión con el ligando por medio del desplazamiento de proteínas co-represoras y el reclutamiento de proteínas coactivadoras. El dominio D es un enlace entre el

dominio C y E siendo estructuralmente flexible y el dominio F existe solamente en algunos NRs. (Steinmetz *et al.*, 2001; Itoh *et al.*, 2008).

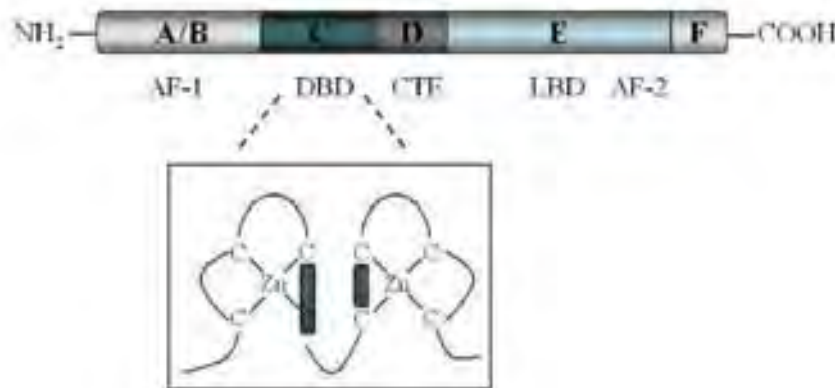


Figura 3. Representación esquemática de la estructura de los receptores nucleares. Las regiones a/b y E contienen los dominios de transactivación independiente (AF-1) y dependiente de ligando (AF-2), respectivamente. En el cuadro se muestra la estructura de dedos de Zinc característica del dominio de unión a DNA (DBD).

Varias hormonas y factores de crecimiento que afectan la diferenciación de una manera positiva o negativa pueden ser identificadas. El estudio de la regulación de los factores de transcripción y el modo de acción de varios agentes que influyen en la diferenciación puede revelar los mecanismos fisiológicos y patofisiológicos que podrían disminuir o aumentar el desarrollo del tejido adiposo.

La expresión de muchas de las proteínas que participan en la diferenciación de los adipocitos está finamente regulada por la expresión de factores de transcripción que actúan como reguladores de la expresión génica (Hackl *et al.*, 2005). La caracterización de las regiones reguladoras de genes específicos adiposos ha llevado a la identificación de los factores de transcripción, cuya función es clave en el complejo de la cascada transcripcional durante la diferenciación adipocítica, el crecimiento y diferenciación de preadipocitos es controlada por la comunicación entre células individuales o entre células y el ambiente extracelular.

Factores de transcripción implicados en la adipogénesis.

1) PPARs

Los receptores nucleares de hormonas son factores de transcripción dependientes de la activación por ligando. Los miembros de esta familia identificados hasta ahora son α , γ y δ , los cuales tienen diferentes funciones de transactivación que varían de acuerdo al tejido, especificidad de ligando y coactivadores. El receptor activado por proliferadores peroxisomales γ (PPAR γ), de todos los PPARs, es el más adipogénico y ya se expresa en la etapa del preadipocito, participando en la expresión de la mayoría, sino de todos, los genes específicos de la célula adiposa (Moreno y Martínez, 2002, Ahmed W *et al.* 2007). PPAR γ , al igual que el resto de los miembros de esta superfamilia, son factores de transcripción que necesitan heterodimerizar con otro receptor nuclear de hormona, el receptor X de retinoides o RXR, para unirse al DNA y ser transcripcionalmente activo (Rodríguez de la Concepción, 2004).

En los heterodímeros que forman los diferentes PPARs con RXR, cualquier miembro de la pareja puede regular la actividad transcripcional por interacción con su propio ligando, resultando en un efecto aditivo al considerar un ligando para ambos, se ha demostrado que ligandos selectivos de RXR puede activar genes PPRE (Schulman *et al.*; 1998, Hondares, E. 2006)

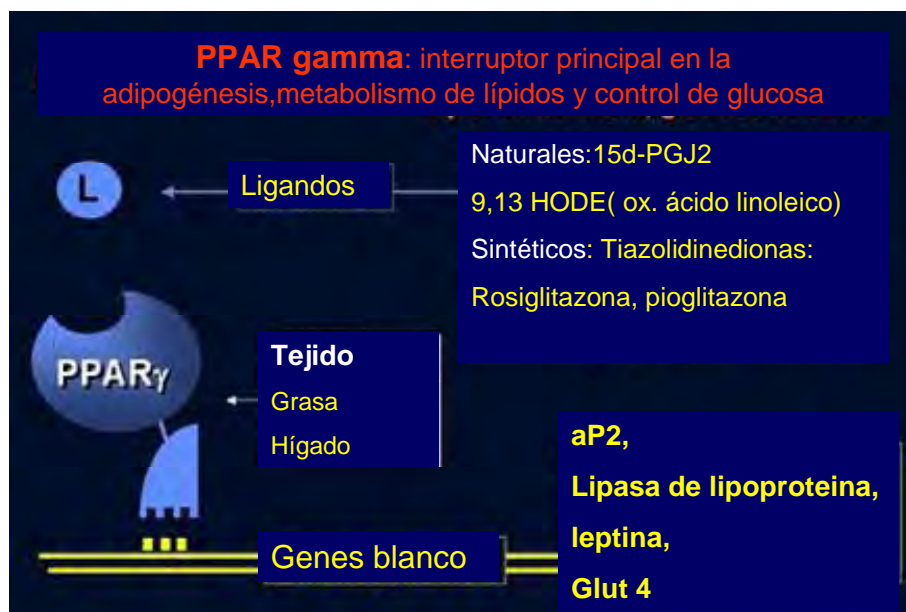


Figura 4. Principales elementos involucrados en el funcionamiento de PPAR γ

La actividad transcripcional de PPAR γ es modulada mediante la interacción ligando-receptor. Así, PPAR γ puede ser activado por ligandos sintéticos llamados tiazolidinedionas (TZDs), estimulando potencialmente la adipogénesis (Spiegelman, 1998). La búsqueda de dichos compuestos ha llevado a la identificación de algunos ligandos naturales, incluyendo la 15 deoxi- Δ 12,14 prostaglandina J2 o 15dPGJ2 (Forman *et al.*, 1995; Kliewer *et al.*, 1995). Este eicosanoide es capaz de unirse y activar PPAR γ y puede promover adipogénesis cuando se añade a fibroblastos en cultivo. Otros ácidos grasos naturales, como el ácido oleico, linoleico, fitánico y prístánico pueden unirse igualmente a PPAR γ (Forman *et al.*, 1997; Kliewer *et al.*, 1997).

La distribución específica de ligandos a nivel de los diferentes tejidos también puede determinar la función de PPAR γ . De esta manera, la disponibilidad de ligandos naturales procedentes de la dieta o liberados por una situación hormonal determinada y, por tanto, indicadores del marco celular específico, provocará una respuesta mediada por PPAR γ mucho más sensible y específica de tejido (Rodríguez de la Concepción, 2004). Como se comentó anteriormente existe en los NRs un espacio en su estructura que permite la vinculación al ligando y en el caso de este factor de transcripción, es particularmente larga y esta rodeada por aminoácidos no polares, sin embargo, en los dos extremos de ella hay grupos de residuos polares, lo cual permite a PPAR γ interactuar con una variedad de compuestos estructuralmente diferentes con una relativa baja afinidad (Kd en el orden de 1 μ M) (Uppenberg *et al.*, 1998; Molnár *et al.*, 2005). Existen cuatro diferentes grupos de aminoácidos que contribuyen a la estabilización de la hélice 12 del dominio de unión al ligando de PPAR; estos son Lys y Glu mediante una carga tipo clamp estabilizando la hélice 12 vía un puente con su coactivador; Glu, Arg y Tyr directamente estabilizan la hélice vía puentes de sal y de hidrógeno; Lys y Asp interactúan con cada uno así como con el coactivador e His, Tyr formando enlaces de hidrógeno (Molnár *et al.*, 2005).



Figura 5. Ácidos grasos, ligandos naturales de PPAR γ .
(Estructura química)

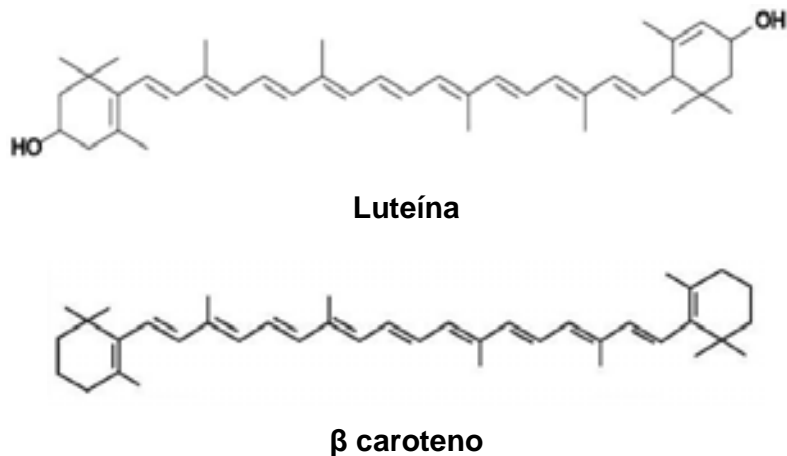


Figura 6. Carotenoides, ligandos naturales de PPAR γ
(Estructura química)

2) Familia C/EBP

Miembros de la familia C/EBP fueron los primeros factores de transcripción que se demostró que juegan un papel importante en la diferenciación adiposa. Isoformas de C/EBP son expresadas en otros tejidos, como el hígado y C/EBP α se expresa justo antes de la transcripción de varios de los genes adiposos, incluyendo α 2, GLUT-4, PEPCK, leptina y receptores de insulina. Tres miembros de esta familia C/EBP: α , β y δ se expresan tanto el TA blanco como café. La expresión ectópica de C/EBP α ó β induce adipogénesis en fibroblastos no progenitores (Spiegelman *et al.*, 1998).

También se ha visto (Machado *et al.*, 1994) que la expresión de C/EBP α y β en TAC se da de forma tardía en la etapa fetal, coincidiendo con el inicio de la transcripción del gen UCP1. Los factores de transcripción de la Familia C/EBP se pueden unir a dos secuencias diferentes de DNA, la caja CCAAT de muchos promotores y a la secuencia TGTGG(A/T)(A/T)(A/T)G de algunos aumentadores virales. Se conocen varios factores de esta familia (α , β , γ , δ , crp1, d/CEBP y CHOP-10). Se cree que las proteínas C/EBP son esenciales para el establecimiento del fenotipo diferenciado de ciertos tipos celulares (Rosen *et al.* 2002).

3) Proteínas ADD1/SREBP-1c

ADD1/SREBP1 puede regular varios genes relacionados con el metabolismo de los ácidos grasos y triacilglicéridos, como son la FAS, la ACO y la glicerofosfato aciltransferasa 1 y 2, lo cual sugiere que este factor es un enlace entre los cambios nutricionales y el programa genético lipogénico de la célula (Rodríguez de la Concepción, 2004).

ADD1/SREBP1 puede regular el proceso de adipogénesis, aunque no de manera tan importante como PPAR γ o C/EBP α . La expresión ectópica de ADD1/SREBP1 induce la diferenciación de la célula adiposa, induciendo directamente la expresión del gen PPAR γ a través de la unión de este factor a elementos de respuesta caja E en el promotor de PPAR γ (Fajas *et al.*, 1999). Cabe mencionar que este factor también está implicado en la producción del ligando endógeno de PPAR γ , al observarse que un medio condicionado de células que lo expresan es capaz de activar la transcripción regulada por PPAR γ (Rodríguez de la Concepción, 2004).

4) Reguladores STATs

Los transductores de señal y activadores de la transcripción (STATs) comprenden una familia de proteínas citoplasmáticas que son activadas por y mediante la expresión génica en respuesta a efectores extracelulares (Morrison y Farmer, 2000; Rosen y Spiegelman, 2000).

5) RXR y RAR

La actividad del AR es mediada a través de dos familias de receptores nucleares, el receptor de ácido retinóico (RAR, por sus siglas en inglés), el cual reconoce al ácido retinóico all-trans, el mayor producto de la oxidación intracelular de vitamina A y al ácido retinóico 9-cis, el cual es un producto menos abundante del metabolismo del retinol y los receptores X de retinoides (RXR, por sus siglas en inglés), los cuales reconocen solamente al ácido retinóico 9-cis (Chambon, 1996).y cada familia tiene tres subtipos: α , β y γ .

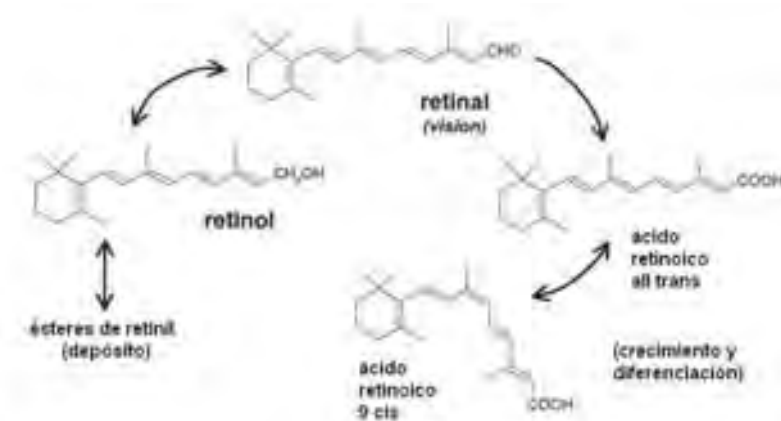


Figura 7. Estructura química de algunos retinoides biológicamente activos. (Modificado de Bonet *et al.* 2002)

Los RXR pueden homodimerizar o heterodimerizar con RAR y otros receptores nucleares que incluyen el receptor para hormona tiroidea, receptor de vitamina D y PPAR γ (Mangelsdorf y Evans, 1995). Mientras que RAR solamente heterodimeriza con RXR. Esos homodímeros o heterodímeros pueden unirse a elementos que responden al AR o a retinoides para regular la expresión de genes, y por lo tanto regular procesos celulares (Villarroya, 2004).

La regulación transcripcional realizada por PPARs se logra por medio de los heterodímeros PPAR-RXR, el cual se une a elementos de respuesta PPAR (PPREs) en el promotor de genes blanco. RXRs son activados por ácido 9-cis retinoico. Detrás de la heterodimerización con varios miembros de FRHN, RXRs

pueden también homodimerizar y regula trans-activación de genes blancos (Schulman *et al*; 1998).

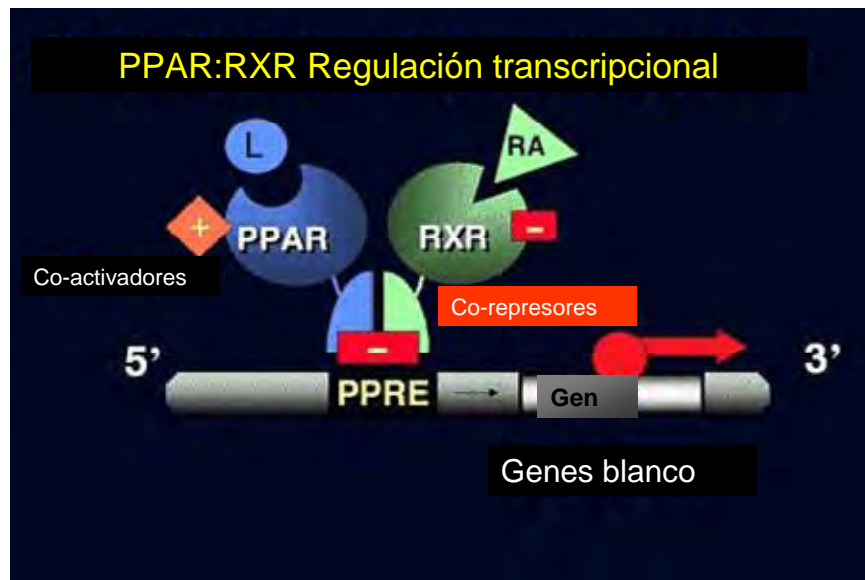


Figura 8. Regulación transcripcional regulada por medio de los heterodímeros PPAR-RXR.

Conocer los avances en el estudio de los factores de transcripción y sus co-reguladores, nos dará la pauta para investigar nutrientes u otro tipo de compuestos, que actúen como ligandos de los factores de transcripción de genes específicos, que controlan procesos metabólicos tales como la lipogénesis y la gluconeogénesis en especies rumiantes (particularmente bovinos). Lo anterior permitirá ahondar no solo en el conocimiento de la fisiología del desarrollo del tejido adiposo de los bovinos, sino también porque resulta de importancia en el proceso productivo de la canal, ya que el tejido adiposo es parte determinante en el sabor y textura de la carne.

En el artículo: "Papel del coactivador PGC-1 α en el balance energético. Importancia en la producción de bovinos de engorda" 2008, ALPA, 16, 2:64-77; se pretende resumir los avances en el estudio de algunos de los factores de transcripción y sus co-reguladores, específicamente el coactivador PGC-1 α , que se ha visto afectan la transcripción de genes involucrados en la homeostasis energética (ANEXO).

3. JUSTIFICACIÓN

Debido a la importancia en la producción de carne de bovino en México, es necesario optimizar dicho proceso de manera que se obtengan canales de calidad. Según la Norma Oficial Mexicana, la calidad esta directamente relacionada con la cantidad, las características intrínsecas y la distribución de la *grasa* presente en las canales, siendo ésta la que en gran parte aporta las características organolépticas deseables como textura, firmeza y sabor a la canal. Por ello, es necesario conocer los mecanismos que desencadenan y promueven adipogénesis y lipogénesis en el tejido adiposo blanco de bovino, lo que involucra el estudio de factores genéticos, nutricionales, hormonales y bioquímicos que regulan la deposición de lípidos en estos animales.

4. HIPÓTESIS

Compuestos lipídicos favorecen la diferenciación del tejido adiposo blanco bovino *in vitro*.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Conocer el efecto de diversos componentes lipídicos, a saber ácidos grasos (tales como ácido fitánico y ácido pristánico), retinoides (como el ácido retinóico 9 cis y all trans) y carotenoides (como β caroteno y luteína) sobre algunos de los factores de transcripción involucrados en la diferenciación del tejido adiposo blanco bovino.

5.2 Objetivos específicos

Medir los cambios en la expresión endógena de PPAR γ y su coactivador PGC-1 α , por efecto de la adición de diferentes niveles de ácidos grasos insaturados (fitánico y pristánico), ácido retinoico (9 cis y all trans) y carotenoides (β caroteno y luteína).

6. ARTÍCULO

“Induction of PPAR γ and PGC-1 α by unsaturated fatty acids, retinoic acid and carotenoids in white bovine adipose tissue”

El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de ácidos grasos (ácido fitánico y pristánico), vitamina A (ácido retinoico 9 cis y all trans), y carotenoides (β caroteno y luteína) durante la diferenciación de tejido adiposo blanco, sobre la expresión de PPAR γ y su coactivador PGC-1 α . (ANEXO)

7. DISCUSIÓN

Los receptores activados por proliferadores peroxisomales (PPARs) pertenecen a la familia de los receptores nucleares, que se sabe están involucrados en la homeostasis de la glucosa y de los lípidos. Basados en un gran número de estudios cristalográficos, se sabe que estos se unen a compuestos agonistas en el dominio de unión a ligando (LBD). Actualmente existe un gran mercado para el descubrimiento y creación de compuestos que se unan a los PPARs, dado su efecto benéfico en el Síndrome Metabólico, así como en la solución de problemas reproductivos, tumorales, etc. en humanos (Farce *et al.* 2009), en animales aún no se ha difundido el uso de agonistas de PPARs como promotores para mejorar la calidad de la canal, por lo que considero que los resultados obtenidos en éste estudio contribuirán en éste sentido.

7.1 Ácidos grasos

Según reportes encontrados en la literatura, los ácidos grasos poliinsaturados naturales y oxidados, así como los derivados del ácido araquidónico (las prostaglandinas y las prostaciclina), se unen selectivamente a los subtipos de PPAR y estimula su actividad de transcripción (Desvergne *et al.*, 2004).

Un estudio realizado por Waku *et al.*, 2009, mostró que la conformación de un ácido graso y su relación con el espacio de unión al ligando (LBD) de PPAR γ es fundamental para llevar a cabo la activación de este factor de transcripción.

Dicha conformación depende de manera importante de la ruta metabólica que produce al ligando y de la posición de la fracción cetona en la estructura del mismo, aunque no se excluye que otras moléculas endógenas sin esta característica puedan actuar, en algunos casos, como agonistas de PPAR γ . Los resultados en dicho estudio sugieren que el LBD se une por enlace covalente al ácido graso endógeno vía una única cisteína (Cys), la cual es reportada como fundamental para la activación del receptor.



Figura 9. Estructura química de PPAR γ (A) y su LBD (B).

En nuestro trabajo experimental demostramos que el ácido fitánico y el ácido pristánico incrementan la expresión del RNAm de PPAR γ cuando se emplearon niveles de 100 μ M ($p < 0.05$), siendo mayor la observada en el caso del ácido fitánico.

Lough en 1977, alimentó a vacas lecheras con ensilado de pasto por seis meses, encontrando que el ácido fitánico constituye una proporción importante (13%) del total de ácidos grasos de cadena larga de los triglicéridos y fosfolípidos en plasma, lo cual lo hace altamente disponible. Esta proporción puede variar dependiendo de la concentración del ácido o sus precursores en el alimento que se ingiere, siendo mayor en el caso de los forrajes verdes.

El ácido fitánico es ligando natural de PPAR γ el cual regula el metabolismo de la glucosa y también de RXR, (Heim *et al.* 2002) por lo que en este caso, la expresión puede ser inducida por cualquiera de los dos factores de

transcripción, los cuales forman un heterodímero, mientras que el ácido pristánico, solamente es ligando de PPAR γ (Schlüter *et al.* 2002). Cabe señalar que la afinidad del ácido fitánico por los receptores RXR es menor que la que se observa con el ácido retinóico 9 cis (Villarroya *et al.* 2004).

Los ácidos grasos insaturados utilizados mostraron prácticamente la misma inducción de RNAm de PGC-1 α y esto se debe a que el PGC-1 α como gen diana de ligandos de PPARs, actúa a través de un PPRE que se encuentra en la zona distal del promotor y la existencia de un mecanismo de autorregulación positiva de PGC-1 α a través de la coactivación de la acción de los PPARs sobre su propio promotor (Hondares, 2007).

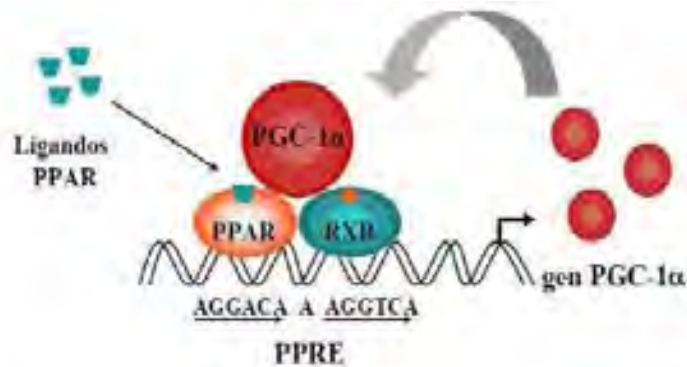


Figura 10. Nueva vía de regulación del gen PGC-1 α por los ligandos de PPARs. Mecanismo de autorregulación positiva mediado por la coactivación de PPARs por PGC-1 α sobre su propio gen en presencia de ligandos.

Este mecanismo garantiza que ante determinados estímulos activadores de PPARs los niveles de expresión de este coactivador se mantengan elevados, lo cual es necesario para llevar a cabo una respuesta génica específica (Yubero *et al.* 2004; Hondares *et al.* 2006). Otros estudios muestran que ácidos grasos saturados como el palmítico inducen la expresión de PGC-1 α y el ácido oleico suprimen su expresión en células de tejido muscular liso en ratas (Zhang *et al.* 2007).

7.2 Retinoides

En este trabajo se pudo determinar que el ácido retinóico en sus dos isoformas 9 cis y all trans incrementa la expresión de RNAm de PPAR γ , siendo el 9 cis un mejor activador (31 veces más en relación al medio basal). Un trabajo realizado por Krskova-Tybitanclova *et al.* (2008) mostró que el RNAm de PPAR γ aumenta de manera significativa en el tejido adiposo del epidídimo de rata al utilizar la isoforma 13 cis (tres veces más en relación al control utilizado), esta no activa algún gen en específico, sino que es por un proceso de isomerización un precursor de AR 9 cis y AR all trans.

El ácido retinóico impacta en la diferenciación de preadipocitos, sin embargo su efecto final depende de la concentración y viabilidad del isomero tan bien como en la viabilidad relativa de RAR y RXR en las células (Villarroya *et al.*, 1999).

Nosotros probamos diferentes dosis de ambas isoformas para determinar la máxima concentración a utilizar sin causar muerte celular, que en este caso fue de 1 μ M. Un estudio realizado por González (2005) determinó que el promedio de las concentraciones plasmáticas de retinol en bovinos mantenidos en pastoreo, fue de 0.46 \pm 0.09 μ g/ml, con un rango de 0.23 a 0.64 μ g/ml. (Cuadro 5).

Bonet *et al.* (2003) demostraron que altas dosis de ácido retinóico bloquea PPAR γ y C/EBP α vía la acción de RARs inhibiendo con esto la adipogenesis, dosis bajas son necesarias para activar la adipogénesis, porque provee suficiente ácido retinóico 9 cis para asegurar la activación del RXR. De hecho, la expresión de las isoformas de RXR son reguladas durante la diferenciación adipocitaria y los ligandos sintéticos específicos de RXR han demostrado que promueven adipogenesis (Canan *et al.*, 1999). Los ácidos retinóicos tienen la capacidad de autorregular, de manera constante, el nivel de actividad de sus receptores RAR y RXR, lo cual parece ser una característica

importante de la respuesta del tejido adiposo a los ácidos retinóicos (Villarroya et al., 1999).

Cuadro 5. Promedios (\pm DE) de concentraciones plasmáticas de retinol ($\mu\text{g/ml}$) en vaquillas a pastoreo en los meses de invierno y primavera.

Concentración plasmática de retinol($\mu\text{g/ml}$)

Periodo	Mes	<i>promedio</i> \pm DE	Rango	
Invierno austral	Julio	0.41 \pm 0.08	0.23	0.57
	Agosto	0.44 \pm 0.09	0.26	0.62
	Septiembre	0.44 \pm 0.09	0.26	0.62
Total invierno		0.42 \pm 0.09a	0.24	0.60
Primavera austral	Octubre	0.53 \pm 0.10	0.33	0.73
	Noviembre	0.46 \pm 0.08	0.30	0.62
	Diciembre	0.50 \pm 0.08	0.34	0.66
Total primavera		0.50 \pm 0.09b	0.32	0.68
Promedio total		0.46 \pm 0.09	0.28	0.64

Letras diferentes en la columna indican $P < 0.05$

González (2005)

Es conocido que los ácidos retinóico 9 cis y all trans tienen un papel clave en los estados tempranos y terminales de la adipogénesis, debido principalmente a la activación de RXR (Delerive *et al.*, 2002). Su efecto final depende de su concentración y presencia de isómeros así como de la disponibilidad relativa de RAR y RXR en las células (Villarroya et al. 1999).

El ligando endógeno para RXR es el ácido retinóico 9 cis, retinoides nutricionales como el ácido retinóico all trans son convertidos a la forma 9 cis por una isomerasa intracelular ubiua (Schulman *et al.* 1998). El dominio E de RXR α al unirse con AR 9-cis asume su forma transcripcional activa. Sin embargo, el ligando adopta una forma curva, con un ligero cambio y rotado alrededor de su cadena poliinsaturada alifática con respecto a la rígida estructura del dominio E de RXR α , en comparación a lo que ocurre cuando el AR 9 cis establece un enlace con el dominio E de RAR γ , además se observa que el anillo β -ionona esta orientado de manera diferente con respecto a la

cadena alifática de AR 9-cis sobre el enlace a RXR α y RAR γ . En conclusión la rígida estructura del sitio de unión al ligando de RXR discrimina entre AR all trans y 9 cis siendo más afín a este último (Steinmetz *et al.*, 2001).



Figura 11. Base estructural de la regulación de la función de la activación (AF2) por los ligandos de receptor nuclear RXR.

Nuestros resultados mostraron que tanto el ácido retinóico 9 cis y todo trans incrementaron la expresión del RNAm de PPAR γ ($p < 0.05$), siendo el primero el que mayor efecto tuvo (31 vs 14 veces) debido a su afinidad como se comentó anteriormente. Las concentraciones que probamos de ambos isómeros fueron 0.5, 0.75 y 1 μ M, en la dosis más alta no se presentó muerte celular.

El RNAm de PGC-1 α fue inducido de la misma manera por ambas isoformas del ácido retinóico: 9 cis y all trans, otros autores mostraron que en ratas los retinoides así como la tiazolidinediona no tuvieron ningún efecto en el nivel de RNAm de UCP-2 y PGC-1 α (Emilsson *et al.* 2000).

En estudios previos realizados en células de mamíferos, se ha demostrado que existe una relación física entre PGC1 y RXR, la cual requiere la presencia de la región AF-2 de RXR para que interactúe con el motif LXXLL de PGC-1. Estos resultados indican que PGC-1 es un auténtico coactivador para RXR (Delerive *et al.* 2002).

7.3 Carotenoides

Se sabe que los carotenoides están involucrados en la modulación de la transcripción de ciertos factores de transcripción, incluyendo los receptores nucleares activados por ligando (Sharoni *et al.* 2004). En relación a PPAR γ la presencia de sus receptores en varias células cancerosas y su activación por ácidos grasos, prostaglandinas y agentes hidrofóbicos relacionados, hacen a estos factores de transcripción dependientes de ligando un blanco de los carotenoides o sus derivados (Sharoni *et al.* 2004, Cui Y *et al.* 2007).

Esta también reportado que ellos pueden activar el sistema de transcripción de elementos de respuesta de antioxidantes, especialmente el licopeno y menos marcado con otros carotenoides, ellos inducen la fase II a través de la activación del sistema de transcripción ARE, lo cual puede explicar algunas de las actividades de prevención contra el cáncer de los carotenoides (Ben-Dor *et al.*, 2005).

Takahashi *et al.*, (2002) observaron que isoprenoles (farnesol y geranilgeraniol) transactivaron al gen de PPAR γ cuando fueron adicionados en altas concentraciones (100 μ M). Además, estos agentes también regulan positivamente la expresión de genes blanco de PPAR γ del metabolismo lipídico. Sin embargo los autores reportan que una concentración de 100 μ M de varios carotenoides, una concentración difícil de mezclar en soluciones acuosas, no afectaron de manera significativa la transactivación de PPAR γ .

Okada *et al.*, (2008) probaron luteína, violaxantina, α -caroteno, carotenoides con grupo epóxido (β -caroteno 5, 6-epóxido) grupo cetona (cantaxantina, citranaxantina, rodoxantina), un hidroxil carotenoide (β -criotoxantina), epoxi-hidroxi carotenoides (anteraxantina, luteína epóxido) y ceto-hidroxi carotenoide (capsorubino) y no encontraron efectos que disminuyeran la actividad de GPDH o en la expresión de aP2 en 3T3-L1. En relación a PPAR γ la presencia de sus receptores en varias células cancerosas y su activación por ácidos grasos, prostaglandinas y agentes hidrofóbicos relacionados, hacen a estos

factores de transcripción dependientes de ligando un blanco de los carotenoides o sus derivados (Sharoni *et al.* 2004). En el caso de la luteína, estudios en células de pollo demostraron que en niveles superiores a 10 μM y menores de 100 μM pueden estimular la expresión de RNAm de PPAR γ básicamente por su heterodimerización con RXR, coincidiendo esto con nuestros resultados (Ziouzenkova *et al.* 2006).

Nuestros resultados mostraron que solamente β caroteno a dosis de 30 μM incremento la expresión de RNAm de PPAR γ y luteína mostró la misma tendencia que el β caroteno ($p < 0.05$), ningún efecto de los carotenoides se mostró en la expresión de RNAm PGC-1 α cuando es comparado con rosiglitazona. Aún no podemos concluir que el β caroteno contribuya de manera importante a promover la diferenciación del tejido adiposo por la activación del sistema PPAR, ya que su afinidad con el LBD de este factor de transcripción es baja.

Los resultados obtenidos nos muestran que la inducción de los genes de PPAR γ y PGC-1 α fueron incrementados por todos los ligandos probados, pero el AR 9 cis mostró la mayor inducción de PPAR γ y se demostró la acción inductora de la rosiglitazona en el tejido adiposo blanco de los bovinos, confirmando con esto lo que otros autores han encontrado en adipocitos de ratón, rata y humano (Hondares, 2007).

Para comprender los resultados obtenidos en este trabajo es necesario recordar que en el heterodímero que forma PPAR γ con RXR, cualquier miembro de la pareja puede regular la actividad transcripcional por interacción con su propio ligando, resultando en un efecto aditivo al considerar un ligando para ambos, se ha demostrado que ligandos selectivos de RXR puede activar genes PPRE (Schulman *et al.*; 1998, Hondares, E. 2006), como fue en nuestro caso el AR 9 cis, que siendo ligando específico de RXR, fue el que mayor expresión de PPAR γ mostró.

8. CONCLUSIONES.

En base a los resultados obtenidos de la presente investigación se concluye que:

- El proceso de diferenciación adipocitaria de cultivos primarios de tejido adiposo subcutáneo de bovinos se lleva a cabo en un lapso aproximado de 10 días, tiempo en el cual se observa el mayor número de células diferenciadas, con las cuales se realizan ensayos cuantitativos para medir la expresión de PPAR γ y PGC1- α .
- Compuestos lipídicos en la dieta influyen en las rutas de regulación de PPAR γ y PGC-1 α , controlando la diferenciación y el metabolismo energético en el tejido adiposo blanco, lo cual se explica por el hecho que ellos son ligandos naturales de PPAR γ (ácidos grasos insaturados) o RXR (isómeros del ácido retinoico) los cuales podrían tener un uso en animales de engorda, para promover diferenciación de tejido adiposo.
- En los resultados se pudo observar que el ácido fitánico (100 μ M), los ácidos retinoico 9 cis (1 μ M) y all trans (1 μ M) fueron los mejores activadores para la expresión de PPAR γ , mientras que para PGC-1 α el comportamiento fue similar entre los diferentes ligandos sin presentar ninguno de ellos un aumento significativo de la expresión del coactivador.
- En el caso de efectos aditivos se observó que la combinación de ácido fitánico y pristánico podría emplearse en animales *in vivo*, ya que no generan problemas de intoxicación.
- Los resultados indican la posibilidad de que controlando la expresión de PPAR γ por medio de sus ligandos, se podría contribuir a la producción de carne marmoleada con una proporción grasa/músculo más adecuada al gusto del mercado.

9. Literatura citada

- Ahmed W., Ziouzenkova O., Brown J., Devchand P., Francis S., Kadakia M. 2007. PPARs and their metabolic modulation: new mechanisms for transcriptional regulation?. *Journal of Internal Medicine* 262: 184-198. Symposium.
- Ailhaud G, Grimaldi P., and Negrel R. 1992. Cellular and molecular aspects of adipose tissue development. *Annual Review of Nutrition* 12:207-233.
- Ben-Dor, A., Steiner, M., Gheber, L., Danilenko, M., Dubi, N., Linnewiel, K., Zick, A., Sharoni, Y., Levy, J. (2005) Carotenoids activate the antioxidant response element transcription system. *Molecular Cancer Therapeutics*. 4(1):177-186.
- Bonet, M.L., Ribot, J., Felipe, F., Palou, A. 2003. Vitamin A and the regulation of fat reserves. *Cellular and Molecular Life Sciences* 60:1311-1321.
- Burdi, A., Poissonnet C., Garn S., Lavelle M., Sabet M., Bridges P. 1985. Adipose tissue growth patterns during human gestation: a histometric comparison of buccal and gluteal fat depots. *International Journal of Obesity* 9: 247-256.
- Canan, K., Dardashti, L.J., Cesario, R.M., et al. 1999 Synthesis of retinoid X receptor-specific ligands that are potent inducers of adipogenesis in 3T3-L1 cells. *Journal of Medicinal Chemistry* 42:742-750.
- Cannon, B. and Nedergaard J. 1986. Brown adipose tissue thermogenesis in neonatal and cold-adapted animals. *Biochem. Soc. Trans.* 14: 233-236.
- Casteilla, L., Nougues, J., Reyne, Y. and Riquer, D. 1991. Differentiation of ovine brown adipocyte precursor cells in a chemically defined serum-free medium-importance of glucocorticoids and age of animals. *European Journal of Physiology* 252: 195-199.
- Chambon P. A decade of molecular biology of retinoic acid receptors.1996.*FASEB Journal* 10: 940-954.
- Chilliard, Y., Ferlay, A., Faulconnier, Y., Bonnet, M., Rouel, J and Bocquier, F. 2000 Adipose tissue metabolism and its role in adaptations to undernutrition in ruminants. *Proceedings of the Nutrition Society* 59:127-134.
- Cui Y, Lub Z, Bai L., Shi Z., Zhao W, Zhao B. 2007. β -Carotene induces apoptosis and up-regulates peroxisome. *European Journal of Cancer* 43, Issue 17,2590-2601
- Dani, C. 1999. Embryonic stem cell-derived adipogenesis. *Cell Tissues Organs* 165:173-180.
- Deliverie P., Wu Y., Burris T., Chin W., and Suen C. 2002. PGC-1 Functions as a Transcriptional Coactivator for the Retinoid X Receptors. *The Journal of Biological Chemistry* Vol. 277, No. 6, Issue of February 8, p. 3913–3917.
- Desvergne, B., Michalik, L., and Wahli, W. 2004. Be fit or be sick: peroxisome proliferator-activated receptors are down the road. *Molecular Endocrinology*. 18:1321–1332

- Emery, R. S. 1979. Mobilization, turnover and disposition of adipose tissue lipids. In *Digestive Physiology and Metabolism in Ruminants. Proceedings of the 5 th International Symposium on Ruminant Physiology*. Clermont-Ferrand, France.
- Emilsson V, O'Dowd J, Wang S, Liu YL, Sennitt M, Heyman R, Cawthorne MA. 2000. The effects of rexinoids and rosiglitazone on body weight and uncoupling protein isoform expression in the Zucker fa/fa rat. *Metabolism*. 49(12):1610-5.
- Fajas L., Schoonjans K., Gelman L., Kim J.B., Najib J., Martin G., Fruchart J.C., Briggs M., Spiegelman B.M. y Auwerx J. 1999. Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression by adipocyte differentiation and determination factor 1/sterol regulatory element binding protein 1: implications for adipocyte differentiation and metabolism. *Molecular and Cellular Biology* 19(8):5495-503.
- Farce A, Renault N y Chavatte P. 2009. Structural insight into PPARgamma ligands binding. *Current Medicinal Chemistry* 16(14):1768-89
- Forman BM, Tontonoz P, Chen J, Brun RP, Spiegelman BM & Evans RM. 1995. 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma. *Cell* 83 803–812.
- González C. 2005. Concentraciones plasmáticas de retinol en vaquillas a pastoreo, en período de Invierno y Primavera, en un predio del sur de Chile. Memoria de título para optar al Título de Médico Veterinario. Universidad Austral de Chile.
- Gregoire F., Smas C. and Sul H. 1998. Understanding adipocyte differentiation. *Physiological Reviews* 76:783-809.
- Hackl H., Burkard T., Sturn A., Rubio R., Schleiffer A., Tian S., Quackenbush J., Eisenhaber F. and Trajanoski Z. 2005. Molecular processes during fat cell development revealed by gene expression profiling and functional annotation *Genome Biology*, Volume 6, Issue 13.
- Hamann, A., Flier, J., Lowell, B. 1996. Decreased brown fat markedly enhances susceptibility to diet-induced obesity, diabetes and hyperlipidemia. *Endocrinology*. 137: 21-29.
- Heim M., Johnson J., Boess F., Bendik I., Weber P., Hunziker W., and Flühmann B. 2002. Phytanic acid, a natural peroxisome proliferator-activated receptor agonist, regulates glucose metabolism in rat primary hepatocytes. *FASEB Journal*.
- Hondares E. 2007. Nuevos aspectos de la interrelación entre PPARs y PGC-1 α en el control de la expresión génica y el metabolismo. Tesis de Doctorado. Universidad de Barcelona.
- Hondares E., Mora O., Yubero P., Rodriguez de la Concepción M., Iglesia R., Giralt M., and Villarroya F. 2006. Thiazolidinediones and Rexinoids Induce Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Coactivator (PGC)-1 α Gene Transcription: An Autoregulatory Loop Controls PGC-1 α Expression in Adipocytes via Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ Coactivation. *Endocrinology* 147(6):2829–2838.
- Itoh T., Fairall L., Amin K., Inaba Y., Szanto A., Balint B., Nagy L., Yamamoto K. and Schwabe J. 2008. Structural basis for the activation of PPAR γ by oxidized fatty acids. *Nature Structural and Molecular Biology* 15(9):924-31.

- Kliwer SA, Lenhard JM, Willson TM, Patel I, Morris DC & Lehmann JM. 1995. A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation. *Cell* 83:813-819.
- Krskova-Tybitanclova K, Macejova D, Brtko J, Baculikova M, Krizanova O, Zorad S. 2008. Short term 13-cis-retinoic acid treatment at therapeutic doses elevates expression of leptin, GLUT4, PPARgamma and aP2 in rat adipose tissue. *Journal of Physiology and Pharmacology* 59(4):731-43.
- Lough, A.K. 1977. The phytanic acid content of the lipids of bovine tissues and rumen. *Lipids* 12:115-119.
- MacDougald O.A., and Lane M.D. 1995. Transcriptional regulation of gene expression during adipocyte differentiation. *Annual Review of Biochemistry* 64:345-358.
- Machado, C., Yubero, P., Viñas, O., Iglesias, R., Villarroya, F and Mampel, T. 1994. CCAAT/enhancer-binding proteins alpha and beta in brown adipose tissue: evidence for a tissue-specific pattern of expresión during development. *Biochemical Journal* 302: 695-700.
- Mangelsdorf D. J., and Evans R.M. 1995. The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* ;83:841-850
- Molnár, F., Matilainen, M., y Carlberg, C. 2005. Structural Determinants of the Agonist-independent Association of Human Peroxisome Proliferator-activated Receptors with Coactivators. *The Journal of Biological Chemistry*. 280:26543-26556.
- Moreno M.J. y Martínez J.A. 2002. El tejido adiposo: órgano de almacenamiento y órgano secretor. Departamento de Fisiología y Nutrición. Universidad de Navarra. ANALES Sis. San Navarra. 25:29-39.
- Morrison, R and Farmer, S. 2000. Hormonal signaling and transcriptional control of adipocyte differentiation. *J. Nutr.* 130:3116s-3121s. Parker, R. S. 1996. Absorption, metabolism, and transport of carotenoids. *FASEB Journal*. 10, 542-551.
- Norma Oficial Mexicana NMX-FF-078-SCFI-2002.
- Okada, T., Nakai, M., Maeda, H., Hosokawa, M., Sashima, T., Miyashita, K. 2008. Suppressive effect of neoxanthin on the differentiation of 3T3-L1 adipose cells. *Journal of Oleo Science* 57(6):345-351.
- Prawitt J., Niemeier A., Kassem M., Beisiegel U. y Heeren J. 2008. Characterization of lipid metabolism in insulin-sensitive adipocytes differentiated from immortalized human mesenchymal stem cells. *Experimental. Cell Research* 314(4):814-24.
- Puigserver, P Wu, Z., Park, C., Graves, R., Wright, M and Spiegelman, B. 1998. A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptative thermogenesis. *Cell*, 92: 829-839.
- Rodríguez de la Concepción, M. L. 2004. Diferenciación adipocitaria y factores reguladores de la biogenesis mitochondrial. Efectos de los fármacos antiretrovirales. Tesis de Doctorado. Universidad de Barcelona.

- Rosen ED, Hsu CH, Wang X, Sakai S, Freeman MW, Gonzalez FJ and Spiegelman BM. 2002. C/EBP α induces adipogenesis through PPAR γ : a unified pathway. *Genes & Development*. 16:22-6
- Rosen ED y Spiegelman BM. 2006. Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. *Nature* 444(7121):847-53
- Rothwell, A and Stock, M. 1986. Brown adipose tissue and diet induced thermogenesis.. In *Brown Adipose Tissue*. Ed. P. Trayhurn, G. Nicholls. Edward Arnold Publishers, London. P. 269-298.
- Schulman I., Shao G., and Heyman R. 1998. Transactivation by Retinoid X Receptor–Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ (PPAR γ) Heterodimers: Intermolecular Synergy Requires Only the PPAR γ Hormone-Dependent Activation Function. *Molecular and Cellular Biology*, 18:3483-494
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) 2008. www.sagarpa.gob.mx
- Selvaraj R. and Klasing K. 2006. Lutein and Eicosapentaenoic Acid Interact to Modify iNOS mRNA Levels through the PPAR γ /RXR Pathway in Chickens and HD11 Cell Lines. *Journal of Nutrition* 136: 1610–1616.
- Sharoni Y, Danilenko M, Dubi N, Ben-Dor A, Levy J. 2004. Carotenoids and transcription. *Archives and Biochemistry and Biophysics* Oct 1;430(1):89-96.
- Schlüter, A., Yubero, P., Iglesias, R., Giralt, M., Villarroya, F. 2002 The chlorophyll-derived metabolite phytanic acid induces white adipocyte differentiation. *International Journal of Obesity* 26:1277-1280.
- Smith, S. 1995. Substrate utilization in ruminant adipose tissue. In “The Biology of Fat in Meat Animals”. Edited by Smith, S. and Smith, D. American Society for Animal Science. USA.
- Spiegelman B.M. 1998. PPAR- γ : adipogenic regulator and thiazolidinedione receptor. *Diabetes*; 47:507-514.
- Sprinkle, J., Hansard, H., Warrington, B., Holloway, J., Wu, G. y Smith, S. 1998. Physiological adaptations in adipose tissue of brahman vs angus heifers. *Journal of Animal Science*. 76 : 743-749.
- Steinmetz A C., Renaud J.P y Moras D. 2001. Binding of ligands and activation of transcription by nuclear receptors. *Annual Review of Biophysics & Biomolecular Structure* 30:329-59.
- Stryer L., Berg J.M. y Tymoczko J.L. 2003. *Bioquímica*. 5^a edición , Editorial Reverté, S.A. España. p. 605. Ilus.
- Takahashi, N., Kawada, T., Goto, T., Yamamoto, T., Taimatsu, A., Matsui, N., Kimura, K., Saito, M., Hosokawa, M., Miyashita, K., Fushiki, T. (2002) *FEBS Letters*. 514: 315–322.
- Uppenberg J., Svensson C., Jaki M., Bertilsson G., Jendeberg L. and Berkenstam A. 1998. Crystal Structure of the Ligand Binding Domain of the Human Nuclear Receptor PPAR γ . *The Journal of Biological Chemistry*. 273(47):31108-31112.
- Villarroya, F., Giralt, M., Iglesias, R. 1999. Retinoids and adipose tissues: metabolism, cell differentiation and gene expression. *International Journal of Obesity* 23:1-6.

- Villarroya F., Iglesias R. and Giralt M. 2004. Retinoids and Retinoid Receptors in the Control of Energy Balance: Novel Pharmacological Strategies in Obesity and Diabetes. *Current Medicinal Chemistry* 11, 795-805.
- Waku T, Shiraki T, Oyama T, Fujimoto Y, Maebara K, Kamiya N, Jingami H y Morikawa K. (2009) Structural Insight into PPAR γ Activation Through Covalent Modification with Endogenous Fatty Acids. *Journal of Molecular Biology* 385(1):188-199.
- Yubero P., Hondares E., Carmona M.C., Rossell M., González F., Iglesias R., Giralt M., and Villarroya F. 2004. The Developmental Regulation of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ Coactivator-1 α . Expression in the Liver Is Partially Dissociated from the Control of Gluconeogenesis and Lipid Catabolism. *Endocrinology* 145(9):4268–4277.
- Ziouzenkova O., Orashanu G., Sukhova G., Lau E., Berger J., Tang G., Krinsky N., Dolnikowski G., Plutzky J. 2006. Asymmetric cleavage of β -carotene yields a transcriptional repressor of RXR and PPAR responses. *Molecular Endocrinology*. p. 3483–3494.
- Zhang, Y., Liu, C., Zhu, L., Jiang, X., Chen, X., Qi, X., Liang, X., Jin, S., Zhang, P., Li, Q., Wang, D., Liu, X., Zeng, K., Zhang, J., Xiang, Y., Zhang, C.Y. (2007) PGC-1 α inhibits oleic acid induced proliferation and migration of rat vascular smooth muscle cells. *PLoS ONE*. Nov 7;2(11):e1137.

ANEXOS

PRESENTACIÓN DE TRABAJOS EN CONGRESOS.

EFFECTO DEL NIVEL DE ROSIGLITAZONA EN LA DIFERENCIACIÓN DEL TEJIDO ADIPOSO BOVINO *IN VITRO*. XIII CONGRESO BIENAL DE LA AMENA 23 AL 27 DE OCTUBRE DEL 2007, VERACRUZ, VER.

EFFECT OF LEVEL OF THIAZOLIDINEDIONE ON BOVINE WHITE ADIPOSE TISSUE DIFFERENTIATION *IN VITRO*, EN EL 13TH EUROPEAN CONGRESS ON BIOTECHNOLOGY, DEL 16 AL 19 DE SEPTIEMBRE DE 2007. BARCELONA, ESPAÑA

EFFECT OF β CAROTENE AND RETINOIC ACID ON PPAR γ EXPRESSION DURING BOVINE WHITE ADIPOSE TISSUE DIFFERENTIATION *IN VITRO*. FASEB, 7-9 DE ABRIL DE 2008, SAN DIEGO, CA.

EFFECTO DE ALGUNOS COMPONENTES LIPÍDICOS DE LA DIETA SOBRE LA DIFERENCIACIÓN DEL TEJIDO ADIPOSO BOVINO *IN VITRO*. XV JORNADAS CONMEMORATIVAS SEPTIEMBRE 22-26 DE 2008. INSTITUTO DE NEUROBIOLOGIA, UNAM

Papel del coactivador PGC-1 α en el balance energético. Importancia en la producción de bovinos de engorda.

P. García-Rojas Montiel¹, A. Antaramian², A. Shimada Miyasaka³,
F. Villarroya Gombau⁴, O. Mora Izaguirre^{3*}

Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). México
Recibido Noviembre 1, 2007. Aceptado: Falta

Role of coactivator PGC-1 α in energy balance. Importance in the production of beef cattle.

ABSTRACT. The importance of dietary fat in the expression of multiple genes is clear, in the case of beef cattle, fat in the form of fatty acids (saturated or unsaturated), vitamin A (mainly retinoic acid), or carotenoids (β -carotene, lutein, lycopene and their metabolites), is obtained constantly from the dietary feed or from pasture. This review tries to summarize the advances in the study of some of the transcription factors and their co-regulators, specifically coactivator PGC-1, which has been observed to affect the transcription of genes involved in energy homeostasis. The capacity of dietary lipids or their metabolic products, to influence on PGC-1 α , due in part to the presence of an element of answer to PPAR in its genic promoter, which appears to be conserved in different species of mammals including bovines. It might be important to find nutrients or other types of compounds, that could act as ligands of the factors of transcription of specific genes, that control metabolic processes such as gluconeogenesis and lipolysis in ruminants so in a near future they would contribute to improve the production in the specie.

Key words: Energy metabolism, PGC-1 α , dietary fat, beef cattle

RESUMEN. La importancia de la grasa dietaria en la expresión de múltiples genes es clara, en el caso de los bovinos de engorda, esta grasa en forma de ácidos grasos (saturados o insaturados), vitamina A (principalmente en forma de ácido retinóico) o carotenoides (β -caroteno, luteína, licopeno y sus metabolitos), se incorporan constantemente a través de la dieta, tanto en corral como en pastoreo. Esta revisión pretende resumir los avances en el estudio de algunos de los factores de transcripción y sus co-reguladores, específicamente el coactivador PGC-1 α , que se ha visto afectan la transcripción de genes involucrados en la homeostasis energética. La capacidad de los lípidos de la dieta o de sus productos metabólicos para influir en PGC-1 α (se debe en) buena parte a la presencia de un elemento de respuesta a PPAR en su promotor genico, elemento conservado en las distintas especies de mamíferos incluidos los bovinos. Esto nos dará la pauta para investigar nutrientes u otro tipo de compuestos, que actúen como ligandos de los factores de transcripción de genes específicos, que controlan procesos metabólicos tales como la gluconeogénesis y la lipólisis en especies rumiantes (particularmente bovinos) lo que en un futuro contribuirá a mejorar la producción en esta especie.

Palabras clave: Metabolismo energético, PGC-1 α , grasa dietaria, bovinos de engorda.

* Autor para la correspondencia, e-mail: ofemora2001@yahoo.com.mx

¹Programa de Posgrado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), México

²Unidad de Proteogenómica, Instituto de Neurobiología, UNAM, Blvd. Juriquilla 3001, Querétaro, Qro. México

³Laboratorio de Rumiología y Metabolismo Nutricional (RuMeN), Secretarías de Investigación y de Posgrado, Facultad de Estudios Superiores-Cuautitlán, UNAM, Blvd. B. Quintana 514-D, Arboledas, Querétaro, Qro. 76140, México.

⁴Departamento de Bioquímica y Biología Molecular e Instituto de Biomedicina (IBUB),

Universitat de Barcelona y CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición. Av. Diagonal 645, Barcelona, 08028, España.

Introducción

La ganadería bovina en México representa una de las principales actividades del sector agropecuario del país, por la contribución que realiza a la oferta de productos cárnicos y lácticos, así como su participación en la balanza comercial, donde las exportaciones de ganado en pie son su principal rubro. Por otro lado, los patrones culturales de consumo de los diferentes productos cárnicos han hecho que la carne de ganado bovino sea el eje ordenador de la demanda y de los precios de las demás carnes (SAGARPA, 2005).

La ganadería bovina productora de carne en México ocupa el lugar número ocho a nivel mundial, y mantuvo una tasa de crecimiento media anual de 1.75 % en el período 1991-2002 (FAO, 2003). En el año 2003 con un inventario nacional de 29 306,931 cabezas de ganado, se logró una producción de carne en canal de 1'503,760 ton (SAGARPA, 2005).

La producción de ganado bovino para carne se desarrolla bajo diferentes contextos agroclimáticos, tecnológicos, de sistemas de manejo y por finalidad de explotación, comprendiendo principalmente la producción de novillos para abasto, la cría de becerros para la exportación y la producción de pie de cría. Sin embargo, los sistemas básicos de explotación de bovinos para carne son el intensivo o engorda en corral y el extensivo o engorda en praderas y agostaderos en las diferentes regiones del país. La región árida y semiárida representan el 33.0% de la producción de carne a nivel nacional, la región templada aporta el 31.6% y la región trópico húmedo y seco es la que mayor aporte tiene con el 35.4% (Ruíz *et al.*, 2004).

En general, la producción de carne de bovino del país ha evolucionado tecnológicamente a un menor ritmo que la avicultura y la porcicultura; pero, la multiplicación del sistema intensivo de engorda en corrales en el centro-norte del país con ganadería especializada, muestra niveles tecnológicos similares a los actualmente utilizados en los estados del medio oeste de EUA, donde la alimentación se basa principalmente en granos. Por su parte, las zonas tropicales, con sistemas extensivos y con una ganadería de doble propósito, adoptan estrategias para una mejor producción y conservación de forrajes con un uso limitado de granos, y suplementos alimenticios que raramente rebasan el 20% de la ración total de animales en finalización.

Independientemente del tipo de sistema de explotación utilizado, al final de su ciclo productivo todos los animales se sacrifican e impactan la producción nacional de carne (Ruíz *et al.*, 2004).

La producción de carne bovina en el país necesita

optimizarse, entendiéndose con esto, que el mercado reciba canales de buena calidad, que sean del agrado del consumidor final, y provenientes de animales sanos.

En este sentido, el conocer el metabolismo energético de los tejidos involucrados en la calidad de la carne, básicamente el adiposo y el muscular, resulta fundamental para lograr el objetivo final de obtener bovinos de calidad.

Por lo que es importante señalar que la homeostasis energética, es decir la regulación del balance entre el consumo, el almacenamiento y gasto de energía están bajo el control de diversos factores de transcripción, entre los que se encuentran varios de los receptores nucleares, destacan entre ellos los PPARs, que promueven la oxidación de los ácidos grasos en hígado y músculo, contribuyen a controlar la termogénesis en el tejido adiposo café y regulan el almacenamiento de energía mediante el control de la diferenciación de los adipocitos. Existen un tipo de proteínas que contribuyen a regular a los factores de transcripción y puede haber algunas que activan o bien que repriman la actividad de los factores de transcripción.

Esta revisión pretende resumir los avances en el estudio de algunos de los factores de transcripción y sus co-reguladores, específicamente el coactivador PGC-1 α , que se ha visto afectan la transcripción de genes involucrados en la homeostasis energética.

Esto nos dará la pauta para investigar nutrientes u otro tipo de compuestos, que actúen como ligandos de los factores de transcripción de genes específicos, que controlan procesos metabólicos tales como la gluconeogénesis y la lipólisis en especies rumiantes (particularmente bovinos) lo que en un futuro contribuirá a mejorar la producción en esta especie.

La presente revisión se ha estructurado de la siguiente forma:

a) Factores de transcripción, ¿qué son y como actúan?. Dentro de este punto se hará mención de los receptores nucleares y se pasará en particular a explicar la importancia de los PPARs dentro del metabolismo energético, indicando las funciones principales de los tres tipos conocidos: PPAR α , γ y δ .

b) Coactivadores de factores de transcripción, se hace una descripción de qué son los co-reguladores y en especial los coactivadores.

c) Coactivador PGC-1 α , se hace una descripción detallada de su estructura y de su importancia en el metabolismo; se explican sus funciones en la termogénesis adaptativa, en el metabolismo de la glucosa, en el músculo esquelético (tanto para la

remodelación de fibras musculares como para el metabolismo de este tejido) y en el tejido adiposo. Se hace referencia a estos dos tejidos en particular por ser los componentes principales de la canal.

d) Por último se explican las principales vías de regulación de PGC-1 α por los diferentes componentes de la dieta, se centra la discusión en la grasa dietaria y se explica como es que los ácidos grasos (saturados e insaturados), la vitamina A y los carotenoides, pueden ser reguladores de éste coactivador de manera directa o indirecta, y como esto afectará la producción de los bovinos de engorda. Se termina la sección enfatizando los mecanismos moleculares de acción de los compuestos lipídicos sobre PGC-1 α .

Factores de transcripción

La activación de la transcripción de los genes es un proceso con múltiples pasos, que implica a un gran número de proteínas que funcionan en complejos. Los factores de transcripción se unen al DNA (ácido desoxirribonucleico, por sus siglas en inglés) en una secuencia específica y esencialmente marcan a un gen para su activación o represión, a través del reclutamiento de proteínas coactivadoras o corepresoras (Spiegelman *et al.*, 2004).

El blanco final de los factores de transcripción es el genoma y el principio de su acción es inducir cambios conformacionales en los complejos proteicos que interactúan con la maquinaria transcripcional (Feige *et al.*, 2007).

La regulación transcripcional es vital para la homeostasis y permite la adaptación de los procesos fisiológicos a las señales externas. El control transcripcional del metabolismo se conserva desde los organismos procariotes, hasta los eucariotes, tales como bovinos. A continuación se mencionara a un tipo de factores de transcripción que se visto son muy importantes para el metabolismo energético.

Receptores nucleares

La superfamilia de los receptores nucleares (NR, por sus siglas en inglés) son factores de transcripción regulados por ligandos, tales como esteroides, hormonas tiroideas, retinoides y ligandos lipofílicos; además existe una serie de miembros de los cuales no se conoce el ligado (Lonard *et al.*, 2005).

Sus miembros se caracterizan por tener una estructura modular común, se conocen 50 proteínas pertenecientes a esta «superfamilia» génica (Fajas *et al.*, 1998). Tienen papeles esenciales en la reproducción (e.g. receptores de andrógenos o de estrógenos), en el balance de minerales (e.g. receptor de mineralocorticoides), en la función tiroidea (e.g. receptor de hormona tiroidea) y el metabolismo energético (e.g. receptor X del hígado, LXR α por sus siglas

en inglés y el receptor proliferador de peroxisomas activado, PPARs por sus siglas en inglés) (Lonard *et al.*, 2005).

Es decir, juegan un papel dominante en la integración de señales dietéticas, metabólicas y endocrinas para el control de la expresión de un gen blanco. Esto les permite coordinar procesos metabólicos mediante la adaptación de respuestas tisulares a diversos desafíos y mediante la comunicación entre órganos que integran señales endógenas y exógenas (Feige *et al.*, 2007).

Después de interactuar con sus ligandos específicos, los receptores nucleares se unen a regiones específicas del genoma y modifican la transcripción de numerosos genes. Históricamente, los receptores nucleares más estudiados han sido los de hormonas esteroideas (estrógenos, andrógenos, progesterona, glucocorticoides y mineralocorticoides). Estos receptores se unen con alta afinidad y especificidad a sus ligandos y forman homodímeros para interactuar con el DNA (Fajas *et al.*, 1998).

Sin embargo, recientemente, la atención se ha volcado hacia otros receptores nucleares, para la mayoría de los cuales no existe claridad en cuanto a sus ligandos endógenos, genes blancos ni funciones fisiológicas. De ahí que, tradicionalmente, se les haya denominado «receptores nucleares huérfanos» (ONR, por sus siglas en inglés). En contraste con los receptores esteroideos clásicos, los receptores huérfanos presentan un repertorio de ligandos más amplio y unen sus ligandos con menor afinidad. Estos receptores funcionan predominantemente como heterodímeros del receptor de retinoides X (RXR, por sus siglas en inglés), por lo que también se les conoce como receptores nucleares heterodiméricos.

Este complejo proteico heterodimérico se une a secuencias nucleotídicas específicas (elementos de respuesta) presentes en las regiones que controlan la expresión génica (promotores) de los genes blanco de los receptores nucleares, participando en el reclutamiento de otros factores proteicos, necesarios para la regulación de la actividad transcripcional de dichos genes. Esta última característica es muy relevante para entender su funcionamiento y para plantear posibles estrategias terapéuticas basadas en su manipulación farmacológica.

Dentro de éstos últimos se encuentran los PPAR, en los que fijaremos nuestra atención puesto que juegan un papel importante en el metabolismo energético.

PPARs

Los PPARs constituyen una familia de factores de transcripción que regulan los procesos metabólicos implicados en la homeostasis de lípidos y de la glucosa (Mettu *et al.*, 2007).

Sus actividades transcripcionales son moduladas mediante la interacción ligando-receptor. Los conocidos hasta ahora son α , γ y δ (también conocido como ξ) los cuales tienen diferentes funciones de transactivación. Estas varían de acuerdo al tejido, especificidad de ligando y coactivadores (Jarrar *et al.*, 2007).

PPAR α

PPAR- α induce la proliferación de los peroxisomas e incrementa la oxidación de los ácidos grasos dentro de éstos, así como también activa la expresión de genes codificantes para enzimas de la maquinaria mitocondrial de ácidos grasos. En las especies estudiadas hasta ahora, se expresa en hígado, músculo, corazón y riñones. PPAR- α regula el metabolismo de las lipoproteínas a través de la activación directa de la lipoproteína lipasa y del receptor "scavenger" (molécula que neutraliza a otra molécula) B1 y de manera indirecta a través de la activación de genes regulados por el receptor X del hígado- α (LXR α por sus siglas en inglés), que es un receptor nuclear que actúa sobre numerosos genes involucrados en el metabolismo de los ácidos grasos y el colesterol (Rosenson *et al.*, 2007).

PPAR γ

Existen dos isoformas PPAR γ 1 y PPAR γ 2, la isoforma 2 es más grande que la uno. PPAR γ 2 se expresa más en adipocitos y PPAR γ 1 es más ubicuo (Jarrar *et al.*, 2007).

En humanos y roedores, PPAR γ se expresa principalmente en tejido adiposo, macrófagos, músculo e hígado y se requiere para la diferenciación del tejido adiposo (Rosenson, 2007).

La actividad del PPAR α es regulada por ligandos naturales (prostaglandinas, ácidos grasos, etc.) y farmacológicos (como las tiazolidinedionas). Los agonistas del PPAR γ tienen efectos de aumento en la sensibilidad a insulina porque disminuyen la lipólisis adipocitaria y por ende los ácidos grasos circulantes y porque además redirigen los triglicéridos desde la grasa visceral hacia la subcutánea (Yoon *et al.*, 2001).

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. Se ha reportado que algunos ONR tienen además, participación fisiológica en el metabolismo de los carbohidratos, la respuesta inflamatoria local, la regeneración tisular, la diferenciación celular, la apoptosis y el envejecimiento, ampliando su potencial impacto en la patogenia y el tratamiento de diversas enfermedades (Morrison y Farmer, 2000; Rosen *et al.*, 2002).

Una vez unido a su ligando específico, heterodimerizan con RXR y se unen a secuencias de DNA específicas, bi-hexaméricas, llamadas elementos PPRE, estos procesos de unión, activación y heterodimerización son modulados por las proteínas co-reguladoras (Jarrar *et al.*, 2007).

El hecho de que PPAR γ juegue un papel importante en la regulación de la adipogénesis está sustentado por el hecho de que las tiazolidinedionas (TZD), que son potentes inductores de la diferenciación adipocítica, son ligandos de alta afinidad para PPAR γ (Morrison y Farmer, 2000; Rosen *et al.*, 2002). Además, la expresión ectópica de PPAR γ en varias líneas celulares no progenitoras producen una inducción consistente y potente de la diferenciación adiposa (Morrison y Farmer, 2000; Rosen *et al.*, 2002).

Los principales coactivadores de PPAR γ son acetil transferasas de histonas p300 (CBP), SCR-1 y TEF2 (Jarrar *et al.*, 2007).

Al unirse a la proteína coactivadora-1 (PGC-1), PPAR γ participa de manera fundamental en la diferenciación de los adipocitos (Puigserver y Spiegelman, 2003).

PPAR δ

PPAR- δ se expresa en las especies estudiadas hasta ahora en cerebro, tejido adiposo, músculo, hígado, células δ pancreáticas, células de la musculatura lisa vascular y endotelio. Su activación incrementa el colesterol unido a HDL, a través de la expresión del transportador A1. Tiene múltiples efectos sobre la homeostasis de glucosa, tales como la inhibición de la salida de la glucosa hepática y el aumento en el transporte y la oxidación de los ácidos grasos en el músculo esquelético y el tejido adiposo (Rosenson, 2007).

Coactivadores de factores de transcripción

Los factores de la transcripción, sin embargo, no funcionan solos y requieren de "co-reguladores" para modificar y epigenéticamente remodelar la estructura de la cromatina y con ello afectar a los complejos en los cuales reside la maquinaria básica de la transcripción. Estos co-reguladores, que pueden tener acciones positivas (coactivador) y negativas (corepresor) en la transcripción del gene blanco, confieren un segundo nivel de la especificidad a la respuesta transcripcional (Spiegelman y Heinrich, 2004; Beige y Auwerx, 2007; Rosenfeld, 2006).

Luego entonces, un coactivador es una proteína o conjunto de proteínas que mediante la interacción con factores de transcripción, incrementa la tasa de transcripción de determinados genes, ejerciendo este efecto sin que se una a ninguna secuencia específica de DNA (Liang y Ward, 2006; Rodríguez de la Concepción, 2004).

Los coactivadores pueden dividirse en dos clases: adaptadores que reclutan aparatos transcripcionales, y componentes involucrados en la modificación o remodelación de cromatina. Un coactivador debe cumplir con ciertos criterios: interacción directa dependiente del agonista con holoreceptores y capacidad de interactuar con los componentes de la maquinaria de transcripción y por lo tanto, aumentar la actividad transcripcional basal (Tirabi y Langin, 2005).

En este artículo, abordaremos inicialmente los mecanismos moleculares de activación de PGC-1 α para proponer a continuación una síntesis de sus principales funciones y su repercusión sobre la producción de bovinos de engorda.

Coactivador PGC-1 α

PGC-1 o coactivador del receptor activado por proliferadores peroxisomales γ (PPAR γ)-1, es una familia de genes que se ha visto son reguladores maestros de la biogénesis mitocondrial y del metabolismo oxidativo. Se conocen tres miembros de esta familia, siendo PGC-1 α el más estudiado. PGC-1 β y PRC (coactivador relativo de PGC-1) son los menos caracterizados. PGC-1 α y δ se expresan en las especies estudiadas hasta ahora en tejido adiposo café, corazón cerebro y riñón y PRC es ubicuo (Handschin y Spiegelman, 2006; Srivastava *et al.*, 2007).

PGC-1 α se ha demostrado está implicado en múltiples respuestas biológicas relacionadas con la homeostasis energética, regulación térmica y el metabolismo de la glucosa. Es una proteína de 90 kDa que se expresa en músculo esquelético, corazón, riñón, cerebro y tejido adiposo en roedores (Puigserver *et al.*, 1998;).

El gen de PGC-1 α se localiza en el cromosoma 6 en bovinos (en el 5 de ratón y en el 4 de humanos) y codifica para una proteína de 797 ó 798 aminoácidos (en bovinos y ratón ó humano, respectivamente). Se localiza en el núcleo de las células, principalmente de aquellas que tienen un metabolismo oxidativo alto, como el tejido adiposo café, el corazón y el músculo esquelético (Liang y Ward, 2006; Puigserver *et al.*, 1998; Chikuni *et al.*, 2005; Spiegelman, 1998).

No posee actividad de acetiltransferasa de histonas (HAT) por sí misma pero los cambios conformacionales que produce después de unirse al factor de transcripción incrementan la afinidad del complejo a la actividad HAT de otros factores, por lo que el resultado es la acetilación de las proteínas de las histonas, lo que produce alteraciones en la conformación que incrementan el acceso al DNA por parte del complejo de transcripción (Puigserver *et al.*, 1998).

Posee una zona N-terminal que contienen un po-

tente activador transcripcional que es muy rico en aminoácidos ácidos, dentro de esta región se encuentra una secuencia LXXLL motivo que es indispensable para la interacción ligando-dependiente con PPAR γ y RXR α entre otros (Puigserver y Spiegelman, 2003).

PGC-1 α interactúa con diversos factores de transcripción que están involucrados en una amplia variedad de respuestas biológicas incluyendo la termogénesis adaptativa, biogénesis mitocondrial, metabolismo de glucosa y ácidos grasos, remodelación del tipo de fibra muscular y el desarrollo del corazón (Liang y Ward, 2006).

En el caso particular de bovinos, algunos investigadores señalan que variaciones polimórficas en el gen condicionan la calidad de la producción láctea, situación por demás interesante ya proponen usarlo como gen candidato para predecir cantidad de grasa en leche (Cannon *et al.*, 1998; Khatib *et al.*, 2007).

PGC-1 α y el metabolismo energético

Termogénesis adaptativa

La termogénesis adaptativa es un proceso fisiológico a través del cual la energía es disipada en forma de calor, en respuesta a las condiciones ambientales tales como el estrés por frío y la sobrealimentación (Weikard *et al.*, 2005); la exposición al frío eleva drásticamente su expresión debido a que hay una necesidad fisiológica de un aumento en el metabolismo oxidativo.

Se identificó al PGC-1 α como un coactivador de PPAR γ en primer lugar en el tejido adiposo café. Las ratas y los ratones tienen grandes depósitos de tejido adiposo café, no así los demás mamíferos, entre ellos los rumiantes, en donde las células adiposas café desaparecen (o se dispersan) en el tejido adiposo blanco. En los adultos de mamíferos no roedores, es el músculo esquelético el principal órgano termogénico (Wu *et al.*, 1999).

Durante la termogénesis, PGC-1 α coactiva a PPAR γ y a, al receptor de ácido retinóico (RAR, por sus siglas en inglés) y al receptor tiroideo, lo que estimula la expresión de la proteína UCP-1, un desacoplador biológico del sistema mitocondrial de la fosforilación oxidativa (Barbera *et al.*, 2001).

La termogénesis adaptativa tanto en el tejido adiposo café como en el músculo esquelético, involucra la estimulación de la biogénesis mitocondrial, incrementa la oxidación de los ácidos grasos y el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa. En respuesta al frío, se incrementa la expresión de PGC-1 α , la cual se induce a través del sistema nervioso simpático, vía receptores δ 3 adrenérgicos y AMPc (Puigserver *et al.*, 1998).

PGC-1 α y el metabolismo de la glucosa

El mantenimiento de la homeostasis de la glucosa plasmática es vital para la sobrevivencia de los mamíferos y por lo tanto, los niveles de ésta son finamente regulados en respuesta a la ingesta de nutrientes y a señales hormonales. La insulina disminuye los niveles de glucosa plasmática circulantes mediante la inhibición de la producción de glucosa hepática y mediante el aumento en la disponibilidad de ésta al músculo esquelético y al tejido adiposo blanco. En contraposición a esto, el glucagon y los glucocorticoides incrementan los niveles de glucosa a través de la activación de la gluconeogénesis, además de la activación de la glucógenolisis en el hígado y la reducción de la utilización de la glucosa por el músculo esquelético. Bajo condiciones normales de alimentación, los niveles de PGC-1 α en el hígado son muy bajos (21), sin embargo, durante el ayuno se produce un incremento en su expresión, lo cual estimula la gluconeogénesis y la oxidación de ácidos grasos (Yoon *et al.*, 2001).

Durante el ayuno, se activa la expresión de PGC-1 α por el glucagon y las catecolaminas, vía AMPc. PGC-1 α coactiva entonces a factores de transcripción tales como el factor nuclear hepático-4 α , el receptor de glucocorticoides y FOXO1, los cuales se unen a las regiones promotoras de genes de enzimas gluconeogénicas como la fosfoenol piruvato carboxilasa (PEPCK, por sus siglas en inglés) y la glucosa 6 fosfatasa (G6P, por sus siglas en inglés) (Liang y Ward, 2006).

Una cepa de ratones deficientes en PGC-1 α mostró hipoglicemia, en respuesta a alteraciones en la gluconeogénesis y en la producción hepática de glucosa (Yoon *et al.*, 2001). Otra cepa de ratones deficientes en PGC-1 α , después de un período corto de ayuno, desarrolló esteatosis hepática debida a la combinación de una reducción en la oxidación mitocondrial de ácidos grasos y en incremento en la expresión de genes lipogénicos (Leone *et al.*, 2005).

El ayuno también induce la expresión de PPAR α , que cuando es coactivado por PGC-1 α , provoca la expresión de genes involucrados en la oxidación de ácidos grasos a nivel hepático. Estos cambios en la expresión génica durante períodos de falta de nutrientes, contribuyen a preservar la glucosa para el sistema nervioso central (Yoon *et al.*, 2001).

El músculo utiliza la glucosa usando a los transportadores de glucosa (GLUT, por sus siglas en inglés) GLUT1, GLUT3 y GLUT4, siendo el último sensible a la insulina. PGC-1 α incrementa la expresión de GLUT4, sin embargo no se ha visto que PGC-1 α incremente la entrada de glucosa al músculo *in vivo* (Michael *et al.*, 2001).

De la interacción insulina-PGC-1 α se sabe muy

poco hasta ahora, existe evidencia que sugiere que la insulina reprime la expresión de PGC-1 α (Herzig *et al.*, 2001), y consistente con esta evidencia a ello, se han visto incrementos en la expresión de PGC-1 α en situaciones deficientes en insulina, cuyo caso pudiera presentarse en rumiantes (Yoon *et al.*, 2001).

PGC-1 α y el músculo esquelético

a) Efecto en la remodelación de las fibras musculares

Las fibras del músculo esquelético se clasifican en tres tipos: tipo I, tipo IIa y tipo IIb. Las fibras de contracción lenta tipo I y las rápidas, tipo IIa; contienen más mitocondrias y muestran tasas de metabolismo oxidativo más altas. En contraste, las tipo IIb tienen menos mitocondrias y son glucolíticas. Es bien sabido que PGC-1 α induce una remodelación de la composición del tipo de fibras musculares. Se ha visto en roedores y humanos que la expresión de PGC-1 α en el músculo esquelético aumenta por ejercicio de corta duración y durante entrenamientos de resistencia (Russell *et al.*, 2003).

En modelos que sobre-expresan PGC-1 α existe una conversión de fibras de contracción rápida tipo IIb al tipo IIa (20%) y a fibras de contracción lenta tipo I (10%), observándose un incremento de la activación de los genes involucrados en el metabolismo oxidativo mitocondrial. Las señales "ríu arriba" involucradas en la activación de PGC-1 α no son muy claras aún, pero se cree que están involucradas varias vías: calcineurina, CaMK, p38, MAPK y la proteína cinasa activada por AMP (adenosina monofosfato, por sus siglas en inglés) (Liang y Ward, 2006).

b) Efecto en el metabolismo muscular

Se sabe que las concentraciones celulares de AMP cambian más drásticamente que las de ATP o ADP, siendo AMP un monitor del estado energético celular. El mejor sensor molecular de los niveles de AMP celulares es la AMPK (proteína cinasa de AMP activada, por sus siglas en inglés), esta enzima es activada por el estrés celular provocado por el agotamiento del ATP. La AMPK es también activada por la leptina y adiponectina, que son también importantes reguladoras del metabolismo energético. En el músculo esquelético, los cambios metabólicos inducidos por la AMPK son agudos, a través de la fosforilación de enzimas metabólicas, o crónicos a través del control de la expresión génica.

La activación de la AMPK incrementa la entrada de glucosa debido a un incremento en la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática, aunado a ello se observa un incremento en el transporte de ácidos grasos a la mitocondria, debido a la acetil CoA carboxilasa 2 (Hardie *et al.*, 2006).

Recientemente algunos investigadores observaron que en músculo esquelético la expresión de algunos genes requiere de la proteína PGC-1 α , entre ellos GLUT4, algunos genes mitocondriales y el mismo PGC-1 α . También observaron que la AMPK fosforila directamente a PGC-1 α , y que esta fosforilación incrementa la actividad de la proteína PGC-1 α (Jäger *et al.*, 2007).

Lo anterior demostró que las modificaciones post-translacionales de PGC-1 α por la AMPK juegan un importante papel en la integración de los ajustes metabólicos debidos a los cambios en el medio ambiente (dieta) en el músculo esquelético y estos posiblemente ocurre también a nivel hepático.

PGC-1 y el tejido adiposo

El desarrollo de un organismo multicelular a partir de una sola célula (el huevo fertilizado), implica su multiplicación hasta la obtención de millones de células especializadas. Durante este proceso la diferenciación celular resulta en el surgimiento de identidades celulares bien definidas tales como las células musculares, nerviosas, epidérmicas y adiposas (Wolpert *et al.*, 1998).

Diversos estudios han demostrado que las células mesenquimales (pluripotenciales) dan origen a cuatro tipos celulares bien diferenciados: condrocitos, osteocitos, miocitos y adipocitos (Dani *et al.*, 1997). Esto resulta muy interesante para el estudio del problema que nos atañe, puesto que los dos últimos tipos celulares son responsables de la calidad de las canales de los animales. Así, se ha observado que aunque no existen diferencias estructurales específicas entre los precursores de las células cartilaginosa y las musculares, cuando estas se cultivan bajo condiciones adecuadas dan lugar a un tipo celular específico.

El tejido adiposo (TA) juega un papel fundamental en el mantenimiento del balance energético en mamíferos. La homeostasis energética es el resultado del balance entre el aporte y el gasto energético.

En gran medida, el equilibrio se mantiene a través de una respuesta coordinada entre el sistema nervioso y el TA, siendo este último la principal reserva energética del organismo, así como la vía por la cual se disipa ésta.

La digestión, la gestación, el requerimiento de la producción de calor y el ejercicio físico son procesos que determinan el balance energético y en último caso estarán afectando el peso corporal (Moreno y Martínez, 2002).

La glucosa también es selectivamente captada por el TA a través del transportador de glucosa GLUT4, dependiente de insulina, que permite la entrada de glucosa. La liberación de ácidos grasos y glicerol por parte del TA influyen en el metabolismo hepático y periférico de la glucosa.

El adipocito se origina de un precursor mesenquimático multipotencial que se diferencia primero a adipoblasto, luego a preadipocito y finalmente a adipocito. El adipoblasto es de aspecto fibroblástico y va adquiriendo paulatinamente las características propias del adipocito. Entre los factores de transcripción más importantes para la diferenciación adiposa destacan C/EBP α y el receptor nuclear PPAR γ . Otros factores de transcripción que destacan son C/EBP β , C/EBP δ , SREBPs y el receptor nuclear RXR α (Rosen *et al.*, 2002). En la figura 1 se observa una representación gráfica de la adipogénesis, resaltando el papel de PGC-1 α .

Se ha visto que PGC-1 α participa también en la determinación de la divergencia entre el tejido adiposo blanco y café, ya que PPAR γ es incapaz por sí mismo de inducir la diferenciación hacia tejido adiposo café, pero unido a PGC-1 α estimula la transcripción de los genes involucrados en este proceso (Puigserver y Spiegelman, 2003; Puigserver *et al.*, 1998; Hondares *et al.*, 2006).

Regulación de PGC-1 α por componentes de la dieta

Importancia de la grasa

La grasa dietaria es un macronutriente importante para el crecimiento y desarrollo de todos los organismos. Los efectos de la porción lipídica de la dieta sobre la expresión génica reflejan una respuesta adaptativa a los cambios en la calidad y tipo de grasa ingerida (Jump y Clarke, 1999).

Se ha visto que algunos componentes lipídicos de la dieta pueden actuar como potenciales activadores o inhibidores de la diferenciación muscular (Staiger *et al.*, 2005) y adipocítica, tanto blanca como café (Jump y Clarke, 1999; Schlüter *et al.*, 2002).

Esta revisión se enfoca básicamente en la importancia de la grasa dietaria sobre la actividad de PGC-1 α , específicamente el efecto de los ácidos grasos, los retinoides y los carotenoides, por ser estos tres componentes importantes en las dietas de bovinos, tanto en pradera como en corral.

1) Ácidos grasos en dietas de bovinos de engorda

En los rumiantes, el tejido adiposo es considerado como el principal sitio de síntesis de ácidos grasos y constituye una reserva dinámica de energía a través de la cual fluye del 10 al 80% de la energía diaria, dependiendo del estado productivo, del tipo de alimento y de los requerimientos de energía en relación al consumo (Schlüter *et al.*, 2002). En bovinos tanto en pastoreo como aquellos alimentados en corral, la proporción de ácidos grasos de la dieta es alta y se sabe que algunos ácidos grasos pueden actuar como factores de transcripción tanto en esta especie como en otros mamíferos, anfibios, e incluso bacterias (Jump y Clarke, 1999).

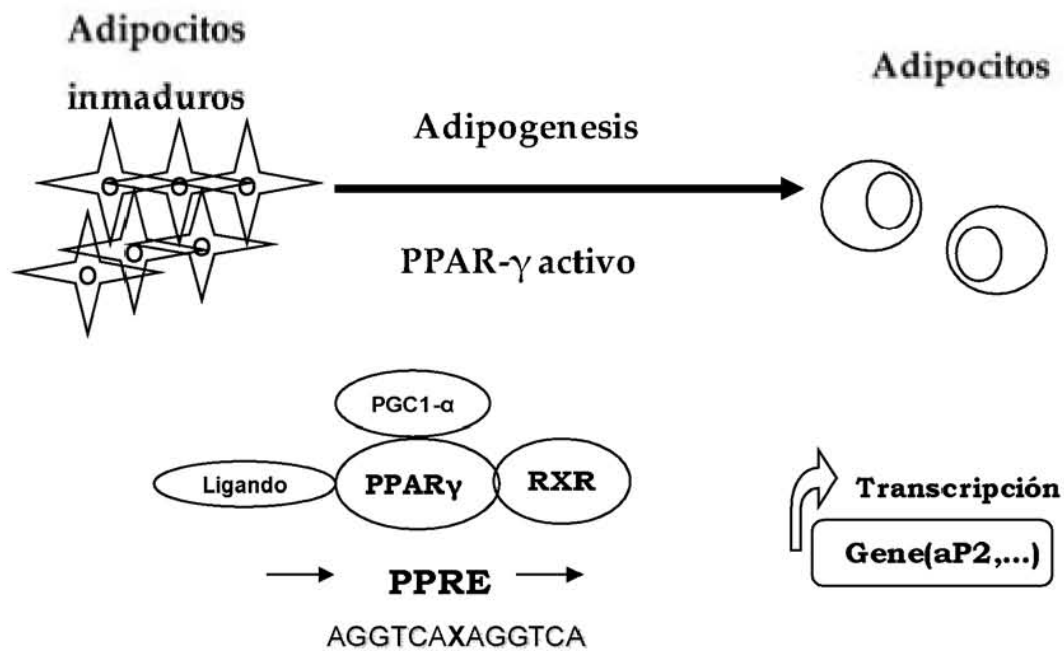


Figura 1. Representación de los procesos involucrados en la adipogénesis. El sitio PPRE es donde se une PPAR γ .

Estos factores son regulados por su unión directa sobre ácidos grasos, acil-coA grasa, o por oxidación de ácidos grasos (como la regulación de la proteína G), también se ha visto que la oxidación de los ácidos grasos controla los niveles intracelulares de calcio, los cuales afectan cascadas de señalización a nivel nuclear (Staiger *et al.*, 2005).

La mayoría de ácidos grasos atraviesan la placenta por difusión pasiva, los procesos de difusión facilitada y transporte activo están enfocados en el intercambio de sustancias endógenas, las sustancias apolares o liposolubles llegan más fácilmente al feto que las polares. En la placentación de tipo epitelio-corial que encontramos en rumiantes, el paso de los compuestos es menor, que por ejemplo en una del tipo endotelial, por no existir un contacto íntimo entre la madre y el feto (Guido, 2005).

Se ha demostrado que existe una concentración muy baja de lípidos y bajas proporciones de C18 PUFAs, en el suero de rumiantes recién nacidos. En estos animales la proporción de C18:2 es una quinta parte de la correspondiente a sus madres, mientras que los valores de C18:3 n-3 fueron muy bajos en becerros recién nacidos. Las bajas proporciones de C18-PUFAs encontrada en rumiantes recién nacidos están de acuerdo con una transferencia limitada de ácidos grasos a través de la placenta en rumiantes. Otros ácidos grasos de cadena larga como los 20:4 n-6 y otros PUFAs están presentes en moderadas proporciones

en el suero de los rumiantes recién nacidos. Es posible que estos ácidos grasos hayan sido transportados a través de la placenta de manera preferencial a partir de la circulación materna, por la proteína FABP que ha sido identificada en ovejas (Soopela, 2000). Con estos antecedentes entonces, el mayor efecto de los ácidos grasos dietarios sobre PGC-1 se verán posparto, es decir, en cuanto los neonatos empiecen a recibir grasa proveniente de la dieta.

Ácidos grasos saturados

Se ha visto que la expresión de PGC-1 α y β , se disminuye significativamente en músculo y tejido adiposo de roedores, cuando se usan dietas altas en grasa saturada (Crunkhorn *et al.*, 2007; Dong *et al.*, 2007). En roedores obesos (Lep(ob)/Lep(ob)) se ha observado también una disminución en la expresión de PGC-1 α (Crunkhorn *et al.*, 2007) y en células musculares *in vitro*, también se ha visto una disminución cuando las células son tratadas con ácido palmítico (Dong *et al.*, 2007). Aunado a esto se ha informado que el palmitato disminuye la expresión de los genes del ciclo de Krebs y de la fosforilación oxidativa y reduce el consumo de oxígeno celular muscular (Crunkhorn *et al.*, 2007).

Ácidos grasos insaturados

En roedores se ha notado que cuando se tratan miocitos *in vitro* con ácidos grasos insaturados (palmitoléico, oléico o linoéico) se incrementa de un 100 a 200% la expresión de PGC-1 α , comparados con el control (Staiger *et al.*, 2005).

Un ácido graso, rico en la dieta de rumiantes, y que resulta interesante debido a su papel en la diferenciación del tejido adiposo tanto blanco como café, es el ácido fitánico (ácido 3,7,11,15 tetra-metil-hexadecanoico), que es un isoprenoide de origen vegetal que deriva del fitol de la clorofila. Su estructura ramificada presenta homología con la estructura de derivados de vitamina A, vitamina E, geranyl-geranyl pirofosfato y farnesil-pirofosfato (42). El ácido fitánico y el ácido pristánico son ácidos grasos de cadena ramificada, presentes en concentraciones micromolares en el plasma de animales sanos. Ambos activan a los PPARs dependiendo de la concentración, la activación es observada vía dominio de unión al ligando, así también como una vía del elemento de respuesta (PPRE) del PPAR (Schlüter *et al.*, 2002). Además de los PPARs, el ácido fitánico también transactiva los tres subtipos de los RXR, dependiendo de la concentración de estos (Schlüter *et al.*, 2002). Está claramente demostrado que el ácido fitánico por sí mismo y no solamente su metabolito, el ácido pristánico, es un ligando fisiológico para PPAR (Zomer *et al.*, 2000), por lo que resultará interesante realizar investigaciones en cuanto a su papel sobre PPAR α y PGC-1 α en especies en las que estos ácidos grasos presentan concentraciones sanguíneas altas de manera natural.

Es importante señalar que el ácido fitánico además de inducir la diferenciación adiposa, también se ha visto que promueve la entrada de glucosa en los hepatocitos cuando se dieron dosis de 100 μ M (en cultivos primarios de hepatocito de rata), dosis menor a la que se puede encontrar en bovinos adultos (Heim *et al.*, 2002).

La concentración de ácido fitánico fue determinada en las muestras de suero de bovino tomadas a diferentes edades (Cuadro 1), lo que se puede observar es que en los primeros 10 días después del nacimiento, hay un aumento (de hasta 158 veces) en la concentración de ácido fitánico, del recién nacido al estado adulto, se observa un aumento en los valores de 12 veces; lo cual está relacionado con la cantidad del compuesto ingerido y aprovechado por el animal (Zomer *et al.*, 2000).

En animales en pastoreo o consumiendo forraje, éstos compuestos representan en el rumen hasta el

13.2% del total de los ácidos grasos, principalmente en forma de alcohol (dihidrofitol), lo que representa el 0.6% del total de la fracción lipídica del líquido ruminal.

De forma individual los compuestos derivados del ácido fitánico presentes son dihidrofitil palmitato (0.05%), dihidrofitil fitano (0.1%) y dihidrofitil n-C18 ácidos grasos (0.45%) (Body, 1975).

En cuanto a su absorción, el ácido fitánico puede aumentar hasta en un 8% del total de los ácidos grasos circulantes y se han encontrado cantidades fuera de éste en el TA (Lough, 1977).

Es decir, es importante ahondar en el conocimiento de los ácidos grasos insaturados que naturalmente se encuentran en la sangre de los bovinos, ya que tendrán un impacto como ligandos de los factores de transcripción y por ende podrán regular la expresión de PGC-1 α y de manera indirecta la calidad de la canal de los bovinos.

2) Vitamina A: regulación de PGC-1 α por retinoides

La vitamina A generalmente es suplementada a la dieta de los rumiantes para asegurar una máxima productividad y para mantener una buena salud. Sin embargo, una buena parte del retinol suplementado es destruido por las bacterias ruminales (hasta un 80%). Se ha visto que, independientemente de la fuente de suplementación, en bovinos la concentración de retinol oscila entre 0.3-0.4 μ g/mL de retinol en sangre y en hígado entre 70 y 190 μ g/g de tejido (Alosilla *et al.*, 2007).

Los retinoides (retinol, retinal y el ácido retinóico) son esenciales para todas las formas de vida. En los vertebrados son importantes para el desarrollo del sistema nervioso y la notocorda, así como muchas otras estructuras embrionarias; además intervienen en el mantenimiento de epitelios, de la competencia inmune y la reproducción (Blomhoff y Blomhoff, 2006).

Los retinoides son moléculas importantes en la visión, en el desarrollo embrionario, en el control del ciclo celular, la diferenciación, así como en la muerte celular (Blomhoff y Blomhoff, 2006).

El ácido retinoico todo-trans (RA, por sus siglas en inglés) se obtiene de la dieta como derivado de la vitamina A, por oxidación enzimática del retinol. La

Cuadro 1. Concentración de ácido fitánico en suero de bovino (Zomer *et al.*, 2000).

Muestra	Ácido fitánico (μ M)
Fetal (< 0 días)	0.12 \pm 0.02
Recién nacido (0-10 días)	18.9
Adulto (> 2 años)	231 \pm 53

capacidad del RA para regular la expresión de cientos de genes a través de su unión a NR es bien conocida. El RA es el ligando natural primario para el sistema de transcripción basado en retinoides, el cual es por sí mismo un miembro del grupo de receptores nucleares hormonales, el grupo de genes blanco para el sistema de RA es amplio y diverso, así como sus efectos, tanto transcripcionales como no transcripcionales (Maden, 1994). La privación o la exposición a un exceso de RA puede resultar en anomalías en el desarrollo embrionario y en la fisiología del adulto (Sulik *et al.*, 1988).

La actividad del RA es mediada a través de dos familias de receptores nucleares, el receptor de ácido retinóico (RAR) con sus tres isoformas α , β y γ , el cual reconoce al ácido retinóico all-trans y al ácido retinóico 9-cis, y los receptores X de retinoides (RXR) con sus tres isoformas α , β y γ , los cuales reconocen solamente ácido retinóico 9-cis (Maden, 1994; Briko, 2007; Germain *et al.*, 2006).

Retinoides y tejido adiposo

El RA afecta las fases terminales de la diferenciación del adipocito. Cuando se usa en concentraciones supra fisiológicas, inhibe la diferenciación de líneas celulares y preadipocitos primarios de cerdo (Suryawana y Hu, 1977).

El RA actúa en las fases tempranas del proceso de diferenciación ya que solo es capaz de bloquear la diferenciación cuando es añadido en estadios tempranos del proceso, mientras que si las células ya se encuentran en los estadios finales el tratamiento con RA ya no es efectivo (Rodríguez de la Concepción, 2004; Klein *et al.*, 2000).

El papel del RA en los estadios tempranos del proceso de diferenciación es distinguible del papel del mismo sobre la diferenciación terminal del adipocito, ya que ni las hormonas adipogénicas ni los potentes activadores de PPAR α podrían sustituir al RA (Dari *et al.*, 1997).

Se ha visto que los ligandos de RXR inducen la expresión de PGC-1 α , esto es debido a la presencia de un elemento de respuesta para PPAR γ en la región distal del promotor del gen de PGC-1 α que se une al heterodímero PPAR γ /RXR (Hondares *et al.*, 2006).

3) Regulación de PGC-1 α por carotenoides y sus metabolitos

Los carotenoides son una clase de hidrocarburos tetraterpénicos naturales, ampliamente distribuidos en plantas y animales, que dan a estos una pigmentación desde amarillo-naranja a rojo. Los forrajes verdes contienen altas concentraciones de carotenoides, que prácticamente no sufren cambios a su paso por el rumen (Van Soest, 1994; Mora *et al.*, 1999; Nozière

et al., 2006), así que son absorbidos y depositados en tejido adiposo, ocasionando la coloración amarillenta del mismo (Nozière *et al.*, 2006). En bovinos, el principal pigmento responsable de la coloración amarillenta del tejido adiposo es el β -caroteno y en segundo grado la luteína (Yang *et al.*, 1992; Mora *et al.*, 2000).

Se sabe que en la mayoría de las especies existe una alta eficiencia de conversión de β -caroteno a vitamina A, siendo la enzima responsable de ello la enzima 15, 15' monooxigenasa (EC 1.13.11.21), sin embargo en especies tales como humanos, bovinos, hurones y gerbos la eficiencia es baja, lo que provoca niveles altos de β -caroteno circulantes en sangre y consecuentemente su depósito en el tejido adiposo (Mora y Shimada, 2001; Ribaya *et al.*, 1993; White *et al.*, 1993).

El producto de la ruptura de β -caroteno son dos moléculas de retinaldehído que posteriormente son reducidas a retinol (Parker, 1996). El β C y los otros carotenoides que pasan sin cambios al sistema circulatorio, son transportados a varias partes del cuerpo en asociación con lipoproteínas de alta densidad (Yang *et al.*, 1992). Debido a su característica lipofílica, los carotenoides pueden migrar a tejidos grasos como: la grasa subcutánea, las adrenales, la glándula mamaria y el ovario particularmente el cuerpo lúteo (Morales *et al.*, 2006).

En relación a la cantidad que se encuentra a nivel fetal, mediciones de la concentración plasmática de retinol, β -caroteno y α -tocoferol en becerros al nacimiento mostraron valores muy bajos que se incrementan sustancialmente del nacimiento a los 7 días de edad a consecuencia de la ingestión del calostro (Nonnecke, 1999).

Diversos trabajos muestran una gran variabilidad en la concentración de carotenoides en la sangre y tejido adiposo del bovino, se reportan valores de carotenos en plasma que fluctúan entre 2.4 μ L/mL y 3.4 μ L/mL respectivamente. Otras determinaciones de la concentración de β -caroteno en plasma y tejido adiposo subcutáneo han arrojado valores de 2.19 μ L/mL y 0.81 μ g/g, mientras que en el caso de animales suplementados con β -caroteno se han reportado valores en tejido adiposo de hasta 6.97 μ g/g (Nozière *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 1992; Mora *et al.*, 2000).

Respecto a los carotenoides, podemos pensar en tres posibilidades de cómo estos compuestos pudieran estar actuando sobre la expresión génica, específicamente sobre PPAR, sus heterodímeros con RXR o RAR o el coactivador PGC-1 α :

a) Carotenoides como tal, ya que debido a la baja actividad de la enzima 15'15' monooxigenasa podemos encontrar en la sangre de los bovinos altas concentraciones de β -caroteno, o bien luteína u otro

carotenoide que pudiera encontrarse en el alimento.

b) Los productos de la ruptura de β -caroteno por acción de la 15, 15' monooxigenasa:

b.1. Por ruptura central: RA, esencialmente en su forma todo trans o 9- cis.

b.2. Por ruptura excéntrica: apocarotenales

En este sentido, se ha visto que β -caroteno y sus metabolitos podrían tener efectos sobre la regulación génica a través de la activación de NR. La ruptura simétrica de éste compuesto puede formar RA 9-cis, que es el ligando natural de RXR, que forma heterodímeros con diversos miembros de la familia de los NR. Respecto a la ruptura excéntrica o asimétrica, se da la formación de apocarotenales, que son moléculas de las que se sabe poco respecto a su papel biológico, incluidos sus efectos transcripcionales (Ziouzenkova *et al.*, 2007).

Existen reportes donde se observó que el β -apo-14'-carotenal, reprime la activación de PPAR α , PPAR β y RXR, así como las respuestas biológicas que inducen sus ligandos agonistas, tanto *in vitro* como *in vivo* (Ziouzenkova *et al.*, 2007).

En el caso de la luteína se ha visto que en pollos, en función de la dosis, se induce la expresión de PPAR β y que además actúa como ligando de RXR (Selvaraj y Klasing, 2006).

En ratas se ha visto que la ingestión de licopeno altera la expresión de la 15,15' monooxigenasa, de PPAR γ y de la proteína ligadora de ácidos grasos 3 (FABP3) en algunos tejidos como intestino delgado, próstata y riñón, lo cual sugiere que este carotenoide puede tener un papel importante en la modulación del metabolismo de lípidos, retinoides y de otros carotenoides (como β -caroteno) (Zaripheh *et al.*, 2006).

En estudios recientes se demostró que en células intestinales humanas (y cuya actividad es parecida a la de bovinos) la expresión de la 15,15' monooxigenasa es dependiente de la cooperación entre PPAR γ y el factor potenciador de miocitos 2 (MEF2). Estos autores sugieren que PPAR podrá ayudar a explicar las diferencias de la regulación transcripcional del gen de la 15,15' monooxigenasa entre especies (Gong *et al.*, 2006).

Es decir, se ha visto que los carotenoides modulan mecanismos de proliferación celular, también pueden actuar sobre factores de crecimiento, servir en la comunicación intercelular y producir cambios en la expresión de muchas proteínas que participan en estos procesos, tales proteínas pueden ser conexinas, ciclinas, cinasas dependientes de ciclinas y sus respectivos inhibidores (Sharoni *et al.*, 2004).

Los cambios que producen en la expresión de múltiples proteínas sugieren que el efecto inicial de los carotenoides involucra la modulación de la transcripción, lo que resulta en una interacción directa de

los carotenoides o sus derivados con un ligandos de los NR o directamente con ellos.

Es importante mencionar que PPAR también puede regular la expresión de la enzima 15,15' monooxigenasa, investigadores observaron que en el promotor del gen de esta enzima existe un elemento de respuesta PPRE, el cual responde a PPAR γ (Boulanger *et al.*, 2003).

En el caso de los bovinos entonces, resulta muy interesante estudiar como los carotenoides y sus metabolitos regulan a diferentes factores de transcripción y a sus coactivadores, y como estos a su vez regulan las concentraciones de estos compuestos.

Mecanismos moleculares de acción de los lípidos sobre PGC-1 α

La capacidad de los lípidos de la dieta o de sus productos metabólicos para influir en PGC-1 α se debe en buena parte a la presencia de un elemento de respuesta a PPAR (PPRE) en su promotor génico, elemento conservado en las distintas especies de mamíferos incluidos los bovinos (Hondares *et al.*, 2006).

Este elemento, al unir PPARs, sensibiliza la transcripción del gen PGC-1 α a ácidos grasos lo que explicaría la capacidad de los ácidos grasos monoinsaturados, conocidos activadores de PPAR α o PPAR β , para aumentar los niveles de PGC-1 α .

Distintos tipos de PPAR podrían estar implicados en este control según el tejido, y mientras PPAR γ ejerce esta función de regulación de PGC-1 α en el tejido adiposo, se ha descrito recientemente que PPAR γ sería el responsable de la activación de PGC-1 α en el tejido muscular (Hondares *et al.*, 2007; Schuler *et al.*, 2006).

No todos los ácidos grasos tienen, no obstante, efectos activadores sobre PGC-1 α y, como se ha mencionado antes, los ácidos grasos saturados como el palmitato pueden tener efectos opuestos, es decir, represores. En este caso, la vía de acción del palmitato parece no implicar PPARs sino al factor de transcripción Nf κ -B, sensible al estrés metabólico, y que mediaría la acción represiva del palmitato sobre la transcripción del gen PGC-1 α (Coll *et al.*, 2006).

En el caso de la acción de los derivados de vitamina A, lo más probable parece ser que, en ausencia de elementos de unión al receptor RAR en el gen PGC-1 α , sea RXR el que confiere esta sensibilidad. Como se ha mencionado, RXR es un acompañante obligatorio de los PPAR y mantiene su sensibilidad a ser estimulado por sus ligandos, sean éstos retinoides como el ácido 9-cis retinoico, u otros como el propio ácido fitánico. La presencia de RXR heterodimerizando con PPARs en el propio promotor de PGC-1 α explica la sensibilidad de este gen a las vías dependientes de vitamina A.

Implicaciones

La importancia de la grasa dietaria en la expresión de múltiples genes es suficientemente clara, en el caso de los bovinos de engorda, esta grasa en forma de ácidos grasos (saturados o insaturados), vitamina A (principalmente en forma de ácido retinóico) o carotenoides (β -caroteno, luteína, licopeno y sus metabolitos), se incorporan constantemente a través de la dieta, tanto en corral como en pastoreo. Estos compuestos se han descrito como potenciales ligandos para el receptor RXR y/o como potenciales activadores de PPARs y como se sabe que existen ligandos sintéticos para RXR (rexinoides) y activadores de PPARs los cuales influyen de manera muy importante en el metabolismo energético, estos compuestos a su vez serán importantes sobre la ex-

presión del coactivador PGC-1 α , el cual regula a su vez su propia expresión.

Si bien es cierto que la literatura indica que estos compuestos atraviesan la placenta, lo hacen en concentraciones muy bajas (aunque la literatura no marca el tipo de dieta de madre), lo cual significa que su efecto será principalmente sobre diferenciación postnatal.

Es decir, hacer investigaciones respecto a cómo la grasa de la dieta afecta la transcripción de factores de transcripción y coactivadores implicados en el metabolismo energético en bovinos de engorda, es de trascendencia para comprender los mecanismos fisiológicos implicados en la producción de esta especie y su futura aplicación para mejorar la calidad de la canal.

Agradecimientos

Este trabajo forma parte del Proyecto PAPIIT IN220906-3 y de la Cátedra de Investigación de la

FESC-UNAM IN2-02.

Literatura Citada

- Alosilla, C., L. McDowell, N. Wilkinson, C. Staples, W. Thatcher, F. Martin and M. Blair. 2007. Bioavailability of vitamin A sources for cattle. *J. Anim. Sci.* 85: 1235-1238.
- Barbera, M., A. Schlüter, N. Pedraza, R. Iglesias, F. Villarroya, and M. Giralt. 2001. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha activates transcription of the brown fat uncoupling protein 1 gene. A link between regulation of the thermogenic and lipid oxidation pathways in the brown fat cell. *J Biol Chem* 276(2):1486-93
- Blomhoff, R. and H. Blomhoff. 2006. Overview of retinoid metabolism and function. *J. Neurobiol.* 66: 606-630.
- Body, D. R. 1975. The occurrence of dihydrophytyl wax esters in bovine rumen. *Biochim Biophys Acta.* 380: 45-51.
- Boulanger A, P, McEmore, N, Copeland, D, Gilbert N, Jenkins, S, Yu, S, Gentleman and T. Redmond. 2003. Identification of beta-carotene 15, 15'-monooxygenase as a peroxisome proliferator-activated receptor target gene. *FASEB J.* 17:1304-1306.
- Brtko, J. 2007. Role of retinoids and their cognate nuclear receptors in breast cancer chemoprevention. *Cent Eur J Public Health* 15: 3-6.
- Cannon, B., J. Housatek and J. Nedergaard. 1998. Brown adipose tissue. More than effector of thermogenesis? *Am J NY Acad Sci.* 856:171-187
- Chikuni, K., I. Nakajima, M. and S. Muroya. 2005. Peroxisome-proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1alpha (PGC-1 alpha) expression and the formation of slow-twitch muscle fibers in porcine and bovine skeletal muscles. *Anim. Sci. J.* 76: 375-380.
- Coll T., M. Jove, R. Rodriguez-Calvo, E. Eyre, X. Palomer and R.M. Sanchez. 2006. Palmitate-mediated downregulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1alpha in skeletal muscle cells involves MEK1/2 and nuclear factor-kappaB activation. *Diabetes.* 55: 2779-2787.
- Crunkhorn, D., F. Dearie, C. Mantzoros, H. Gami, W. daSilva, D. Espinoza, R. Faucette, K. Barry, A. Bianco and M. Patti. 2007. Peroxisome proliferator activator receptor gamma coactivator-1 expression is reduced in obesity: potential pathogenic role of saturated fatty acids and p38 mitogen-activated protein kinase activation. *J. Biol. Chem.* 282: 15439-15450.
- Dani, C., A. Smith, S. Dessolin, P. Leroy, L. Staccini, P. Villageois, C. Darimont and G. Ailhaud. 1997. Differentiation of embryonic stem cells into adipocytes in vitro. *J. Cell. Sci.* 110: 1279-1285.
- Dong F, Q, Li, N, Sreejayan, J.M. Nunn and J. Ren. 2007. Metallothionein Prevents High Fat Diet-Induced Cardiac Contractile Dysfunction: Role of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor [gamma] Coactivator-1[alpha] and Mitochondrial Biogenesis. *Diabetes; 0 db06-1596v1-0.*
- Emery R.S. Mobilization, turnover and disposition of adipose tissue lipids. In *Digestive Physiology and Metabolism in Ruminants. Proceedings of the 5 th International Symposium on Ruminant Physiology.* Clermont-Ferrand, France. 1979.
- Fajas L, J.C. Fruchart and J. Auwers. Transcriptional control of adipogenesis. *Curr Opin Cell Biol* 1998;10:165-173.
- FAO. 2003. Información estadística. http://apps.fao.org/feij/gj_j_and_j_Auwers. 2007. Transcriptional coregulators in the control of energy homeostasis. *Trends Cell Biol* 4. 7(6):292-301
- Germain, P., P. Chambon, G. Echols, R.M. Evans, M.A. Lazar, M. Leid, A. De Lera, E. Lolán, D. Mangelsdorf and H. Gronemeyer. 2006. International Union of Pharmacology. LXIII. Retinoid X receptors. *Pharmacol Rev.* 58:760-772.
- Gong X, S.W. Tsai, B. Yan and L.P. Rubin. 2006. Cooperation between MEF2 and PPARgamma in human intestinal beta,beta-carotene 15,15'-monooxygenase gene expression. *BMC Mol Biol.* 7: 7-19.
- Guido, M. 2005. INTERAÇÃO MATERNO FETAL. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Revisión.
- Handschin, C., and B.M. Spiegelman. 2006. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 coactivators, energy homeostasis, and metabolism. *Endocr Rev.* 27: 728-35.
- Hardie, D., S. Hawley and J. Scott. 2006. AMP-activated protein kinase, development of the energy sensor concept. *J. Physiol (London)* 574: 7-15.

- Heim, M., J. Johnson, F. Booss, I. Bendik, P. Weber, W. Hunziker and B. Flühmann. 2002. Phytanic acid, a natural peroxisome proliferators-activated receptor (PPAR) agonist, regulates glucose metabolism in rat primary hepatocytes. *FASEB J.* 16: 718-720.
- Herzig, S., F. Long, U. Jhala, S. Hedrick, R. Quinn, A. Bauer, D. Rudolph, G. Schutz, C. Yoon, P. Puigserver, B. Spiegelman and M. Montminy. 2001. CREB regulates hepatic gluconeogenesis through the coactivator PGC-1. *Nature* 413: 179-183.
- Honduras E, O. Mora, P. Yubero, M. Rodríguez de la Concepción, R. Iglesias, M. Giralt and F. Villarroya. 2006. Thiazolidinediones and rexinoids induce PGC-1 α gene transcription. An auto-regulatory loop controls PGC-1 α expression in adipocytes via PPAR co-activation. *Endocrinology*, 147: 2829–2838
- Honduras E, L. Pinoda-Torra, R. Iglesias, B. Stojsic, F. Villarroya and M. Giralt. PPAR δ , but not PPAR α , activates PGC-1 α gene transcription in muscle. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007; 354:1021-1027.
- Jäger, S., C. Handschin, J. St-Pierre and B.M. Spiegelman. 2007. AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1 α . *Proc Nat Acad Science* 104: 12017-12022.
- Jarrar, M. and A. Baranova. 2007. PPAR α activation by thiazolidinediones (TZDs) may modulate breast carcinoma outcome: the importance of interplay with TGF β signaling. *J. Cell. Mol. Med.* 11: 71-87.
- Jump, D and S. Clarke. 1999. Regulation of gene expression by dietary fat. *Annu Rev Nutr.* 19: 63-90.
- Khatib H, I. Zaitoun, J. Wiebelhaus, Y. Chang and G. Rosa. 2007. The association of bovine PPAR α and OPN genes with milk composition in two independent Holstein cattle populations. *J. Dairy Sci.* 90:2966-2970.
- Klein, S., J. Horowitz, M. Landt, S. Goodrick and V. Mohamed-Ali, S. Coppel. 2000. Leptin production during early starvation in lean and obese women. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 278: E280-E284.
- Leone, T., J. Lehman, B. Finck, P. Schaeffer, A. Wende, S. Boundina, M. Courtis, D. Wozniak, N. Sambandam, C. Bernal-Mizrachi, Z. Chen, J. Holloszy, D. Medeiros, R. Schmidt, J. Saffitz, E. Abel, C. Senekovich and D. Kelly. 2005. PGC-1 α deficiency causes multisystem energy metabolic derangements: muscle dysfunction, abnormal weight control and hepatic steatosis. *PLoS Biol* 3: e101.
- Liang, H. and W. Ward. 2006. PGC-1 α : a key regulator of energy metabolism. *Advances in Physiology Education*, 30: 145-151.
- Lionard, D. and B. O'Malley. 2005. Expanding functional diversity of the coactivators. *Trends in Biochemical Sciences*, 30: 126-132.
- Lough, A. K. 1977. The phytanic acid content of the lipids of bovine tissues and rumen. *Lipids*, 12: 115-119.
- Maden M. Vitamin A in embryonic development. *Nutr Rev* 1994; 52: S3-12.
- Mettu N.B, T.B. Stanley, M.A. Dwyer, M.S. Jansen, J.E. Allen, J.M. Hall and D.P. McDonnell. 2007. The nuclear receptor-coactivator interaction surface as a target for peptide antagonists of the peroxisome proliferator activated receptors. *Mol Endocrinol.*
- Michael, K., Z. Wu, R. Cheatham, P. Puigserver, G. Adelmant, J. Lehman, D. Kelly and B.M. Spiegelman. 2001. Restoration of insulin-sensitive glucose transporter (GLUT4) gene expression in muscle cells by the transcriptional coactivator PGC-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 3820-3825.
- Mora, O., J. Romano, E. González, F. Ruiz and A. Shimada. 1999. In vitro and in situ disappearance of β -carotene and lutein from lucerne (*Medicago sativa*) hay in bovine and caprine ruminal fluids. *J. Sci. Food Agric.* 79: 273 - 276.
- Mora, O., J. Romano, E. González, F. Ruiz and A. Shimada. 2000. Low cleavage activity of 15,15-dioxygenase to convert β -carotene to retinal in cattle compared with goats, is associated with the yellow pigmentation of adipose tissue. *Int. J. Vit. Nutr. Res.* 70: 199-205.
- Mora, O. y A. Shimada. 2001. Causas de la deposición de grasa amarilla en canales de bovinos finalizadas en pastoreo. *Vet. Mex.* 32 (1): 63-71.
- Morales A, A. Rosas, A. González, A. Antaramian, A. Varela, A. Shimada and O. Mora. 2006. Cloning and expression of β -carotene-15,15'-oxygenase in bovine gonadal tissues. *Int. J. Vit. Nutr. Res.* 76: 9-17.
- Moreno, M.J. y J.A. Martínez. 2002. El tejido adiposo: órgano de almacenamiento y órgano secretor. *Anales Sis Navarra*, Vol. 25, Suplemento 1: 29-39.
- Morrison, R and S. Farmer. 2000. Hormonal signaling and transcriptional control of adipocyte differentiation. *J. Nutr.* 130:3116s-3121s.
- Monneville B. Modulation of Fat Soluble Vitamin Concentrations and Blood Mononuclear Leukocyte Populations in Milk Replacer-Fed Calves by Dietary Vitamin A and Beta-Carotene. *J Dairy Sci* 1999;82: 2632-2641.
- Mozdury, P., H. Girault, A. Lucas, B. Marlin, P. Crozier and M. Doreau. 2006. Carotenoids for ruminants: From forages to dairy products. *Anim. Feed Sci. Technol.* 131, 418-450
- Parker, R.S. Absorption metabolism and transport of carotenoids. *FASEB J.* 1996; 10:542-51.
- Puigserver, P. and B. Spiegelman. 2003. Peroxisome proliferator-activated receptor- α coactivator 1 α (PGC-1 α) transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endocrine Reviews* 24(1) 78-90.
- Puigserver, P., G. Adelmant, Z. Wu, M. Fan, J. Xu, B. O'Malley, B.M. Spiegelman. 1999. Activation of PPAR γ coactivator-1 through transcription factor docking. *Science* 286: 1368-1371.
- Puigserver, P., Z. Wu, C.W. Park, R. Graves, M. Wright and B.M. Spiegelman. 1998. A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell*, 92: 829-839.
- Ribaya M.J.D., M.J. Lopez, J.M. Ordovas, M.C. Blanco, J.G. Fox and R.M. Russell. 1993. Distribution of beta-carotene and vitamin A in lipoproteins fraction of ferret serum. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 691:232-236.
- Rodríguez de la Concepción, M. L. 2004. Diferenciación adipocitaria y factores reguladores de la biogénesis mitocondrial. Efecto de los fármacos antiretrovirales. Tesis de Doctorado. Facultad de Biología. Universitat de Barcelona, España.
- Rosen ED, CH. Hsu, X. Wang, S. Sakai, M.W. Freeman, F.J. González and B.M. Spiegelman. 2002. C/EBP α induces adipogenesis through PPAR γ : a unified pathway. *Genes Dev.* 16:22-26.
- Rosenfeld, M., V. Lunnyak and C. Glass. 2006. Sensors and signals: a coactivator/corepressor/epigenetic code for integrating signal-dependent programs of transcriptional response. *Genes Dev.* 20: 1405-1428.
- Rosenson, R. 2007. Effects of peroxisome proliferator-activated receptors on lipoprotein metabolism and glucose control in type 2 diabetes mellitus. *Am J Cardiol* 99: 96B-104B.
- Ruiz Flores Agustín et al. 2004. Impacto del TL α CAN en la cadena de valor de bovinos para carne. Universidad Autónoma de Chapingo.
- Russell, A., J. Feilchenfeldt, S. Schreiber, M. Praz, A. Crettonand, C. Gobelet, C. Meier, D. Bell, A. Kralli, J. Giacobino and O. Deriaz. 2003. Endurance training in humans leads to fiber type-specific increases in levels of peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 and peroxisome proliferator-activated receptor- α in skeletal muscle. *Diabetes* 52: 2874-2881.
- Schuler M, F. Ali, C. Chambon, D. Duteil, J.M. Bornert, A. Tardivel and et al. 2006. PGC1 α expression is controlled in skeletal muscles by PPAR β , whose ablation results in fiber-type switching, obesity, and type 2 diabetes. *Cell Metab.* 4:407-414.

- Schlüter, A., P. Yubero, R. Iglesias, M. Giralt and F. Villarroya. 2002. The chlorophyll-derived metabolite phytanic acid induces white adipocyte differentiation. *Int J. Obesity* 26: 1277-1280.
- Schlüter, A., M. Giralt, R. Iglesias and F. Villarroya. 2002. Phytanic acid, but not pristanic acid, mediates the positive effects of phytol derivatives on brown adipocyte differentiation. *FEBS Letters* 517: 83-86.
- Selvaraj, R. and K. Klasing. 2006. Lutein and eicosapentaenoic acid interact to modify iNOS mRNA levels through the PPARgamma/RXR pathway in chickens and HD11 cell lines. *J. Nutr.* 136:1610-1616.
- Sharoni Y, M. Danilenko, N. Dubi, A. Ben-Dor and J. Levy. 2004. Carotenoids and transcription. *Arch Biochem Biophys.* 430: 89-96.
- Servicio de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera. SAGARPA. 2005.
- Soopela, P. 2000. Fats as indicators of physiological constraints in newborn and young reindeer. *Disertación académica.* Facultad de Ciencia, Universidad de Oulu, Finlandia.
- Spiegelman, B. M. and R. Heinrich. 2004. Biological control through regulated transcriptional coactivators. *Cell.* 119: 157-167.
- Spiegelman, B.M. 1998. PPAR-gamma: adipogenic regulator and thiazolidinedione receptor. *Diabetes* 47: 507-514.
- Srivastava, S., J. Barret and C. Moraes. 2007. PGC-1 α /1 upregulation in associated with improved oxidative phosphorylation in cells harboring nonsense mtDNA mutations. *Human Mol Gen* 16: 993-1005.
- Staiger, H., K. Staiger, C. Haas, M. Weisser, F. Machicao and H. Häring. 2005. Fatty acid-induced differential regulation of the genes encoding peroxisome proliferator-activated receptor- δ coactivator-1 α and 1 β in human skeletal muscle cells that have been differentiated in vitro. *Diabetologia* 48: 2115-2118.
- Sulik KK, C.S. Cook and W.S. Webster. 1988. Teratogens and craniofacial malformations: relationship to cell death. *Development* 103: Supplement 213.
- Suryawana, A. and C. Hu. 1997. Effect of retinoic acid on differentiation of cultured pig preadipocytes. *J. Anim. Sci.* 75: 112-117.
- Tirabi, C. and D. Langin. 2005. PGC-1 α , un co-activateur transcriptionnel impliqué dans le métabolisme. *Medicine Science* 21 : 49-54.
- Van Soest P.J. 1994. *Nutritional Ecology of the Ruminant*. 2o. ed. Comstock Publishing Cornell University Press NY p-40-125.
- Weikard R, C. Kühn, T. Goldammer, G. Freyer and M. Schwerin M. 2005. The bovine PPARGC1A gene: molecular characterization and association of an SNP with variation of milk fat synthesis. *Physiol Genomics.* 21:1-13.
- White WS, K.M. Peck, E.Á. Ulman and J.W. Erdman. The ferret as a model for evaluation of the bioavailabilities of all-trans- β -carotene and its isomers. *J Nutr* 1993; 123:1129-1139.
- Wolpert, L., R. Beddington, J. Brockers, T. Jessell, P. Lawrence and E. Meyerowitz. 1998. *Principles of Development.* Oxford Press University. N.Y. USA.
- Wu, Z., P. Puigserver, U. Andersson, C. Zhang, G. Adelmant, V. Mootha, A. Troy, S. Cinti, B. Lowell, R. Scarpulla, B.M. Spiegelman. 1999. Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through and thermogenic coactivator PGC-1. *Cell* 98: 115-124.
- Yang, A., T.W. Larsen and R.K. Tume. 1992. Carotenoid and retinol concentrations in serum, adipose tissue and liver and carotenoid transport in sheep, goats and cattle. *Aust. J. Agric. Res.* 43:1809-1817.
- Yoon J.C., P. Puigserver, G. Chen, J. Donovan, Z. Wu, J. Rhee, G. Adelmant, J. Stafford, C.R. Kahn, D.K. Granner, C.B. Newgard and B.M. Spiegelman. 2001. Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1. *Nature* 413:131-138.
- Zaripheh S, T. Nara, M. Nakamura and J. Erdman. 2006. Dietary lycopene downregulates carotenoid 15,15'-monooxygenase and PPAR-gamma in selected rat tissues. *J.Nutr.* 136: 932-938.
- Ziourzoukova C, G. Orsani, G. Sukhova, E. Lau, J. Berger, G. Tang, N. Krinsky, G. Dolnikowski, J. Pluzky. 2007. Asymmetric cleavage of beta-carotene yields a transcriptional repressor of retinoid X receptor and peroxisome proliferator-activated receptor responses. *Mol. Endocrinol* 21: 77-88.
- Zomer A.W., G.A. Jansen and N.M. Verhoeven. 2000. Phytanoyl CoA hydroxylase activity is induced by phytanic acid. *Eur. J. Biochem.* 267, 4063-4067.
- Zomer, A. W., B Van der Burg, G. A. Jansen, R. J. A. Wanders, B. T. Poll-The, and P. T. van der Saag. 2000. Pristanic acid and phytanic acid: naturally occurring ligands for the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor. *J. Lipid Res.* 41: 1801-1807.



Induction of PPAR γ and PGC-1 α by unsaturated fatty acids, retinoic acid, and carotenoids in white bovine adipose tissue

Journal:	<i>Journal of Animal Science</i>
Manuscript ID:	E-2009-2579
Manuscript Type:	Animal Nutrition - Ruminant
Date Submitted by the Author:	15-Oct-2009
Complete List of Authors:	García-Rojas, Patricia; UNAM, Programa de Posgrado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal Antaramian, Anaid; UNAM, INB González-Dávalos, Laura; FESC-UNAM, Secretaría de Investigación Villarroya, Francesc; UB, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular e Instituto de Biomedicina Shimada, Armando; FESC-UNAM, Secretaría de Investigación Varela-Echavarría, Alfredo; UNAM, INB Mora, Ofelia; FESC-UNAM, Secretaría de Investigación
Key Words:	PPAR γ , PGC-1 α , dietary fat, beef cattle



1 **Induction of PPAR γ and PGC-1 α by unsaturated fatty acids, retinoic acid, and**
2 **carotenoids in white bovine adipose tissue¹**

3
4 Running head: **PPAR γ and PGC-1 α in bovine adipose tissue**

5 P. García-Rojas*, A. Antaramian[#], L. González-Dávalos[§], F. Villarroya[‡], A. Shimada[§],
6 A. Varela-Echavarría[#] and O. Mora^{§2}.

7 * Programa de Posgrado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal,
8 Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). México

9 [#] Instituto de Neurobiología, UNAM. Blvd. Juriquilla 3001, Querétaro, Qro. 76230,
10 México

11 [§] Laboratorio de Rumiología y Metabolismo Nutricional (RuMeN). Secretaría de
12 Posgrado. Facultad de Estudios Superiores-Cuautitlán, UNAM. Blvd. B. Quintana 514-
13 D, Col. Arboledas. Querétaro, Qro. 76140, México

14 [‡] Departamento de Bioquímica y Biología Molecular e Instituto de Biomedicina
15 (IBUB), Universitat de Barcelona y CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición.
16 Av. Diagonal 645, Barcelona. 08028, Spain.

17 **ABSTRACT**

18 The importance of dietary fat in the expression of multiple genes is clear. In the case of
19 beef cattle, fat in the form of fatty acids (saturated or unsaturated), vitamin A (mainly
20 retinoic acid), or carotenoids (β -carotene and lutein) is obtained constantly from dietary
21 feed or pasture. The aim of this work was to study the effect of fatty acids (phytanic and
22 pristanic acids), vitamin A (all-trans and 9-cis retinoic acid), and carotenoids (β -

¹ This study was supported by a grant (IN220906-3) from Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT).

² Corresponding author: mora@inb.unam.mx, ofemora2001@yahoo.com.mx

1 carotene and luteine) on the expression of PPAR γ and its coactivator PGC-1 α during
2 differentiation of the bovine white adipose tissue. Samples were collected at slaughter
3 from subcutaneous adipose tissue and were processed in a solution containing Type II
4 collagenase for 2 h at 37°C. Cells were re-suspended in basal medium, DMEM
5 containing 5% fetal bovine serum, plated in 24-well culture plate at a density of 1×10^4
6 cells/cm², and incubated at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. Before confluence,
7 preadipocyte differentiation was induced by various treatments: rosiglitazone (20 μ M);
8 unsaturated fatty acids: phytanic acid (25, 50, 100 μ M) and pristanic acid (25, 50, 100
9 μ M); retinoids: 9 cis-retinoic acid (0.5, 0.75, 1 μ M) and all-trans retinoic acid (0.5,
10 0.75, 1 μ M); and carotenoids: β -carotene (10, 20, 30 μ M) and lutein (10, 20, 30 μ M).
11 PPAR γ and PGC-1 α expression was measured in differentiated cells. Phytanic acid, all-
12 trans retinoic acid, and 9-cis retinoic acid were the best activators of PPAR γ expression
13 while the combination of 9-cis and all-trans retinoic acid was the best activator of PGC-
14 1 α expression ($P < 0.05$). Therefore, these are powerful agents for the promotion of
15 bovine adipogenesis and constitute promising compounds to be used in bovine
16 fattening.

17 Key words: PPAR γ , PGC-1 α , dietary fat, beef cattle

1

INTRODUCTION

2 In Mexico, there are nearly 29 million head of beef cattle (SIEAP, 2005). In the arid and
3 semi-arid regions of the north and center of the country, cattle are generally fattened in
4 feedlots with high-grain diets; in contrast, finishing through grazing is more common in
5 the south, where high stocking rates make the activity more profitable.

6 The relevance of dietary fat for the expression of multiple genes is clear. In the case of
7 beef cattle, gene expression is potentially activated by fat components, for instance fatty
8 acids (saturated or unsaturated), vitamin A (mainly retinoic acid), or carotenoids (β -
9 carotene, lutein, lycopene, and their metabolites), which are obtained continuously from
10 feed or pasture.

11 Adipose differentiation in mammals is the result of sequential changes in the expression
12 of many genes. Among them, two transcription factor families have been described:
13 proteins binding to CCAAT/enhancer (C/EBPs) and peroxisomal proliferator-activated
14 receptor γ (PPAR γ), which have been identified as "master controls" of the transcription
15 of adipogenic genes (MacDougald and Lane, 1995). PPARs are nuclear hormone
16 receptors, and their activation depends on ligand binding. PPARs identified to date are
17 α , γ , and β/δ , and their function as ligand-dependent transcription factors varies
18 depending on the tissue. PPAR γ is the most adipogenic of all PPARs and is expressed
19 as early as the preadipocyte stage, activating most of the adipose cell-specific genes
20 (Moreno y Martínez, 2002). PPAR γ , as well as the other members of this nuclear
21 receptor superfamily, is a transcription factor that dimerizes with another hormone
22 nuclear receptor, the retinoid X receptor (RXR), which allows it to bind DNA and
23 activate transcription (Rodríguez de la Concepción, 2004). The peroxisome proliferator
24 activated receptor- γ coactivator 1 (PGC-1 α) is the main co-activator of this receptor.
25 Natural ligands of PPAR γ have been identified, such as 15-deoxy Δ 12, 14 prostaglandin

1 J2 or 15dPGJ2, an eicosanoid which binds and activates it. Other natural fatty acids
2 such as oleic and linoleic acids interact in the same way with PPAR γ promoting
3 adipogenesis in fibroblasts *in vitro* (Forman et al., 1995; Kliewer et al., 1995).

4 The responsive element in the promoter region of the PPAR gene is conserved in
5 various mammals including bovines, and it might influence PGC-1 α activity. Therefore,
6 it is important to find nutrients or other compounds which could act as ligands of
7 transcription factors for specific genes that control metabolic processes such as
8 gluconeogenesis and lipolysis in ruminants and to test them as candidates to improve
9 livestock production.

10 The aim of this work was to study the effect of fatty acids (phytanic and pristanic acids),
11 vitamin A derivatives (all-trans and 9-cis retinoic acid), and carotenoids (β -carotene and
12 lutein) during differentiation of bovine white adipose tissue. These compounds were
13 chosen because they are ubiquitous in cattle feed; their content in ingesta and in bovine
14 plasma is high and they may influence master regulators in the development of bovine
15 adipose tissue. For example, the adverse effects of palmitic acid on PPAR γ expression
16 in different tissues is well documented (Meidute-Abaraviciene et al., 2008); also,
17 Crunkhorn et al. (2007) demonstrated that saturated fatty acids reduce PGC-1 α
18 expression, whereas PGC-1 α expression is increased 2- to 3-fold by all unsaturated fatty
19 acids (Staiger et al., 2005). Among the natural products which can activate nuclear
20 hormone receptors, phytanic acid was found to be capable of binding and activating
21 retinoid X receptor (RXR) and PPAR α (Schlüter et al., 2002), and its derivative
22 pristanic acid has also been reported to activate PPAR α . Phytanic (3, 7, 11, 15-
23 tetramethylhexadecanoic) acid is a derivative of the phytol side chain of chlorophyll
24 (Schlüter et al., 2002). Whereas phytanic acid levels in human or rodent tissues are very

1 low, phytanic acid constitutes a substantial portion of the total fatty acids (13%) of the
2 triglycerides and phospholipids in bovine plasma (Lough, 1977).

3 It has been established that the physiological effects of retinoic acids (RAs) are
4 mediated by members of two families of nuclear receptors, the retinoic acid receptors
5 (RARs) and the retinoid X receptors (RXRs). Whereas all-trans retinoic acid activates
6 RARs, 9-cis retinoic acid is a high-affinity ligand for RXRs, and it activates not only the
7 RXR-RXR homodimers but also RXR-PPAR heterodimers (Germain et al., 2006). The
8 role of retinoic acids in adipocyte differentiation is a complex one. Retinoic acid
9 inhibits preadipocyte differentiation of pig cell lines and primary cultures (Suryawana
10 and Hu, 1977), indicating that porcine preadipocytes differentiate by a mechanism that
11 involves activation of the RAR and downregulation of PPAR γ , RXR α , and SREBP-1C
12 mRNA (Brandebourg and Hu, 2005). However, the sequential requirement of retinoic
13 acid and PPAR γ during adipogenesis in embryonic cells is well documented (Phillips et
14 al., 2003). In fact, retinoids activating RXR (retinoids) promote adipogenesis through
15 the activation of RXR in the PPAR γ /RXR heterodimer. Pasture-fed cattle ingest
16 substantial amounts of carotenoids, mainly β -carotene and lutein; these compounds are
17 only partially converted into vitamin A, and the surplus is stored in adipose tissue (Arias
18 et al., 2009). Therefore, carotenoids were also analyzed in the present work.

19 To our knowledge, the present study constitutes the first analysis of how all these lipid
20 compounds influence adipose differentiation and expression of master regulators in
21 bovines.

22 MATERIAL AND METHODS

23 All samples were obtained immediately after slaughter at the Querétaro municipal
24 abattoir. Animals were killed, without food deprivation, by captive bolt gun followed

1 by exsanguination. All procedures were carried out in accordance with the Mexican
2 Federal laws for animal care (SAGAR, 1997).

3 *Animals*

4 Samples were collected from crossbred beef cattle. Representative (around 30 g)
5 subcutaneous adipose tissue from 3- to 4-year-old male bovines was taken.

6 *Samples and Experimental Treatments*

7 Samples were transported to the laboratory in sterile Dulbecco's modified Eagle's
8 medium (DMEM) in ice (Pu et al., 2005) and processed in sterile Hanks balanced salt
9 solution (HBSS) with 1 mg/mL Type II collagenase (Sigma-Aldrich[®], St. Louis, MO)
10 for 2 h at 37 °C with shaking at 95 rpm, then filtered through 250 µm mesh. The filtrate
11 was centrifuged at 1100 rpm for 5 min, and the digestion medium was removed by
12 aspiration. The cells, showing mainly a fibroblast morphology (preadipocytes), were
13 resuspended in DMEM containing 5% fetal bovine serum, 100 mM ascorbic acid in
14 magnesium phosphate, 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, and 250 ng/mL
15 amphotericin B (basal medium); they were plated on 24-well plates (NUNC[™] Brand
16 Products, Rochester, NY) at a density of 1×10^4 cells/cm² and incubated five hours at
17 37°C under a humidified, 5%-CO₂ atmosphere. Cell cultures were washed twice with
18 phosphate-buffered saline (PBS 1X) supplemented with the above-mentioned
19 antibiotics. Before reaching confluence, preadipocyte differentiation was induced by
20 adipogenic agents consisting of 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine, 0.25 µM
21 dexamethasone (both from Sigma-Aldrich[®], St. Louis, MO) and 2.5 µg/mL insulin
22 (Wako Chemicals, USA Inc, Richmond, VA) for 2 days. Treatments started on the
23 second day and continued until day 8, 9, or 10, and they consisted of different doses of
24 rosiglitazone (20 µM, positive control); unsaturated fatty acids: phytanic acid (25, 50,

1 100 μM) and pristanic acid (25, 50, 100 μM); retinoids: 9 cis-retinoic acid (0.5, 0.75, 1
2 μM) and all-trans retinoic acid (0.5, 0.75, 1 μM); and carotenoids: β -carotene (10, 20, 30
3 μM) and lutein (10, 20, 30 μM). All treatment compounds were from Sigma-Aldrich[®]
4 (St. Louis, MO). The following combinations were tested, using the best concentrations
5 obtained in previous experiments: 1) rosiglitazone + all-trans retinoic acid, 2) all-trans
6 retinoic acid + 9-cis retinoic acid, 3) as in 2 + pristanic acid, 4) as in 3+ phytanic acid,
7 5) pristanic acid + phytanic acid, 6) all-trans retinoic acid + lutein and as 4 + lutein.
8 After the treatment, the media was replaced with DMEM containing 5% FBS and 2.5
9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ insulin and changed every other day throughout the differentiation process (Wu
10 et al., 2000). Rosiglitazone was used as a positive control because Ohyana et al., (1998)
11 found proliferation and adipocyte conversion by adding rosiglitazone to primary
12 preadipocytes. The dose used (20 μM) was determined in a preliminary dose-
13 dependence experiment, measuring the effect of 0, 5, 10, 15, 20, and 30 μM
14 rosiglitazone on PPAR γ mRNA levels in primary cultures of bovine white adipocytes
15 (n=4).

16 ***RNA isolation***

17 Total RNA from 80%-differentiated cells was extracted with RNeasy Mini Kit
18 (Qiagen[®], Austin, TX) according to the manufacturer's protocol, and it was eluted in 30
19 μL of RNase-free water and stored at -70°C to be used in the following molecular
20 biology experiments.

21 ***PPAR γ mRNA detection by Semi-quantitative RT-PCR in bovine adipocytes***

22 We analyzed PPAR γ expression (as indicator of adipose differentiation) on days 8-10
23 of the differentiation process by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-
24 PCR). Single-strand cDNA was synthesized according to the manufacture's

1 instructions. RT was carried out using oligo (dT)₁₂₋₁₈ primer (Sigma-Genosys, St. Louis,
2 MO) and Super script II reverse transcriptase (Invitrogen[®], Carlsbad, CA). PPAR γ
3 primers were: forward 5'-GACTTGAACGACCAAGTAACTC; reverse 5'-
4 CTCTGCTAATACAAGTCCTTG TAG (Table 1). PCR was performed using Platinum
5 PCR Super Mix (Invitrogen[®], Carlsbad, CA). The amplification parameters consisted of
6 initial denaturation at 94°C for 2 min; denaturation at 94°C for 45 s, annealing at 58°C
7 for 1 min, and extension at 72°C for 1 min, for 40 cycles. The products were separated
8 on a 1% agarose gel and visualized with Syber green I (Invitrogen[®], Carlsbad, CA).

9 For PGC-1 α , the same PCR conditions were used with the following primers: forward
10 5'ACTACGGTACCTTCCACTCTTTG; reverse 5'AGCAGCACACTCGAGGTCAC
11 (Table 1).

12 ***Real-time quantitative PCR for the determination of PPAR γ mRNAs***

13 PPAR γ and PGC-1 α expression were assessed by real-time quantitative PCR
14 (LightCycler[®] 1.5 Instrument, Roche Diagnostics; Basel, Switzerland), and the primers
15 used were:

16 PPAR γ : Forward 5'- CATCTTCCAGGGGTGTCAGT; Reverse 5'-
17 GGATATGAGGACCCCATCCT;

18 PGC1- α : Forward 5'-GTGAAGACCAGCCTCTTTGC; Reverse 5'-
19 TCACTGCACCACTTGAGTCC (Table 1).

20 Both fragments were amplified by using SYBR Green Jump Start Taq Ready Mix for
21 quantitative PCR, Capillary Formulation (Sigma-Aldrich[®], St. Louis, MO). An aliquot
22 of the reverse-transcription reaction was then subsequently added to the real-time PCR.
23 Cytoplasmic β -actin was amplified as housekeeping gene in order to normalize the
24 target gene to the amount of cDNA; the primers used were: forward

1 5'CCATCATGAAGTGTGACGTTG and reverse
2 5'ACAGAGTACTTGCGCTCAGGA (Table 1). The PCR conditions were as follows:
3 initial denaturation at 94°C for 2 min; denaturation at 94° C for 0 s, annealing at 58°C
4 for 8 s, and extension at 72°C for 8 s, for 55 cycles.

5 A standard curve was obtained using the following concentrations (in duplicate) of
6 PPAR γ PCR product: 1.97×10^7 , 1.97×10^6 , 1.97×10^5 and 1.97×10^4 molecules/ μ l; this
7 curve was used to determine the concentration of the experimental samples. The
8 efficiency (E) of the standard curve results was 1.944 and an error of 0.072.

9 Sequencing:

10 The identity of the PCR products was confirmed by sequencing in a 310 ABI prism
11 sequencer with version 3 Big Dye by Applied Biosystems.

12 **Statistical analyses**

13 PPAR γ and PCG1- α mRNA were analyzed statistically as completely randomized
14 design. Data were analyzed using the general linear models procedure of SAS (2004),
15 and the LSMEANS option was used to obtain and analyze treatment means.

16 **RESULTS**

17 Under the culture conditions of bovine preadipocytes in our experimental setting, early
18 differentiation was observed by day 5, and the terminal period of differentiation was on
19 day 8 to 10, as evidenced by acquisition of a round cell morphology and massive
20 accumulation of fat droplets inside the cells (Figure 1A). Figure 1B shows the RNA
21 isolated from adipocytes of two animals treated with the rexinoid, 9 cis-retinoic acid, as
22 an example. A PCR product of 511 bp was observed by electrophoresis (Figure 1C),
23 and its PPAR γ identity was confirmed by sequencing (data not shown).

1 We used rosiglitazone as a positive control; compared to basal medium, this synthetic
2 ligand increased the expression of PPAR γ mRNA 8.3 fold vs. the 2.9-fold increase
3 observed in differentiation medium ($p < 0.01$), and by 2.1 vs. 1.5-fold, respectively, in
4 the case of PGC-1 α mRNA expression (Figure 2).

5 ***Induction of PPAR γ and PGC-1 α gene expression in bovine white adipocytes by***
6 ***unsaturated fatty acids***

7 Phytanic acid increased PPAR γ mRNA expression in bovine primary white adipocytes
8 differentiated in culture; this effect was dose-dependent (the highest being 6 fold),
9 ($P < 0.05$, Fig. 3A). Pristanic acid (Fig. 3B) showed the same tendency (maximum 4.5-
10 fold induction of PPAR γ mRNA, $P < 0.05$), but the increase was smaller than that
11 observed for phytanic acid. PGC-1 α mRNA expression was increased by 25 μ M
12 phytanic acid and remained at similar levels with higher concentrations ($P < 0.05$) (Fig.
13 3A and 3B).

14 ***Induction of PPAR γ and PGC-1 α gene expression in bovine white adipocytes***

15 ***by retinoids***

16 PPAR γ mRNA expression increased more than 30-fold in the presence of 9-cis retinoic
17 acid compared with differentiation medium, and at all doses tested, induction was
18 greater than with rosiglitazone ($P < 0.05$, Fig. 4A). All-trans retinoic acid (1 μ M)
19 increased mRNA PPAR γ 14-fold compared with basal medium ($P < 0.05$, Fig. 4B).

20 PGC-1 α mRNA expression was similar with 0.5 and 0.75 μ M 9-cis retinoic acid and
21 greater with a 1 μ M dose ($P < 0.05$); for all-trans retinoic acid the highest expression was
22 induced by 0.5 μ M and 1 μ M ($P < 0.05$) (Fig. 4A and 4B).

1 *Induction of PPAR γ and PGC-1 α gene expression in bovine white adipocytes by*
2 *carotenoids*

3 PPAR γ mRNA expression was increased by 30 μ M β -carotene; however, 10 μ M β -
4 carotene decreased expression compared to differentiation medium ($P < 0.05$) (Fig. 5A).
5 At the highest concentrations tested, lutein induced slightly higher levels of PPAR γ
6 mRNA expression than β -carotene (4 vs. 3 fold, Fig. 5B). PGC-1 α mRNA expression
7 was also increased by β -carotene (at doses of 10 and 30 μ M) compared to differentiation
8 medium (Fig. 5A), but not by lutein (Fig. 5B)

9 *Induction of PPAR γ and PGC-1 α gene expression in bovine white adipocytes*
10 *by different fatty compound combinations*

11 Figure 6 ($P < 0.01$) shows that of the compounds tested, 9-cis retinoic acid is the best
12 inducer of PPAR γ mRNA expression (14 fold, as in fig. 4A). An additive effect is
13 observed with 9-cis and all-trans retinoic acid (20-fold). Furthermore, addition of
14 phytanic acid or of both phytanic and pristanic acids together with 9-cis and all-trans
15 retinoic acid induced more (22-fold) than 9-cis and all-trans retinoic acids by
16 themselves. Surprising, the highest induction (24-fold) was observed when all five
17 compounds were added simultaneously (fig. 6).

18 PGC-1 α mRNA expression also showed the highest increase (4.6 fold) in the presence
19 of 9-cis plus all-trans retinoic acid ($P < 0.01$, Fig. 6).

20 **DISCUSSION**

21 The results found in the present work indicate that the ligands tested increase PPAR γ
22 and PGC-1 α gene expression in bovine adipogenic cultures, and that 9-cis retinoic acid
23 is the most potent inducer of PPAR γ expression. Rosiglitazone showed a powerful

1 effect in the bovine adipocyte studies, as expected on the basis of previous data in other
2 species (Yoon et al., 2001; Hondares et al., 2006). Adopted orphan NRs, such as
3 PPARs, bind a variety of structurally-diverse compounds with an affinity constant (Kd)
4 as low as 1 μ M, which could explain our results (Molnár et al., 2005).

5 It has been reported that native and oxidized polyunsaturated fatty acids, as well as
6 arachidonic acid derivatives such as prostaglandins and prostacyclins, selectively bind
7 to the PPAR subtypes and stimulate their transcriptional activity (Desvergne et al.,
8 2004). Here, we have demonstrated that both phytanic and pristanic acids increased
9 PPAR γ mRNA expression, and this action was slightly higher for phytanic acid (Fig.
10 3A and 3B). It is important to note that phytanic acid constitutes a substantial proportion
11 of the total fatty acids present in bovine blood plasma (13% of the triglycerides and
12 phospholipids, Lough 1977). In this study phytanic acid was found to be the best
13 activator of PPAR γ expression, probably owing to its ability to bind and activate
14 retinoid X receptor (RXR) and PPAR α (Schlüter et al., 2002). These unsaturated fatty
15 acids caused an induction of PGC-1 α mRNA perhaps due to the presence of a PPAR γ -
16 consensus responsive site in the distal region of the bovine PGC-1 α promoter. In
17 rodents, it has been established that the induction of PGC-1 α expression in response to
18 PPAR γ activation could be amplified because of the auto-regulatory loop mediated by
19 the co-activation of PPAR γ action on PGC-1 α gene transcription by PGC-1 α itself, a
20 mechanism of feed-forward regulation in response to rosiglitazone (Hondares et al.,
21 2006). The site of the PGC-1 α mouse gene promoter mediating the responsiveness to
22 PPAR γ , and therefore to rosiglitazone, is strongly conserved in the bovine gene
23 (Hondares et al., 2006). Other researchers have shown that saturated fatty acids such as
24 palmitate induced PGC-1 α expression, whereas oleic acid had the opposite effect
25 (Zhang et al., 2007).

1 We also observed that in the case of retinoic acid, both 9-cis and all-trans retinoic acid
2 increased PPAR γ mRNA expression, with 9-cis being a better activator. Krskova-
3 Tybitanclova et al. (2008) showed in an *in vivo* trial that PPAR γ mRNA is significantly
4 increased in rat adipose tissue by 13-cis retinoic acid treatment when compared to
5 controls. It is known that retinoic acids have an impact on preadipocyte differentiation,
6 although their final effect depends on the concentration and isomer availability as well
7 as on the relative RAR and RXR availability in the cells (Villarroya et al., 1999). We
8 tested different doses of both forms of retinoic acid (results not shown), and the highest
9 dose (1 μ M) never caused cell death. Bonet et al. (2003) explained that high doses of
10 retinoic acid block PPAR γ and C/EBP α via RAR inhibition of adipogenesis, whereas
11 low doses are needed to trigger adipogenesis because they provide sufficient 9-cis
12 retinoic acid to ensure the activation of the RXR moiety of the PPAR γ /RXR
13 heterodimer. In fact, expression of RXR isoforms is up-regulated during adipocyte
14 differentiation, and synthetic, specific RXR ligands have been shown to promote
15 adipogenesis (Canan et al., 1999). Retinoic acids can auto-regulate the steady-state level
16 of their RAR and RXR receptors, which seems to be an important feature of the reponse
17 of adipose tissue to retinoic acids (Villarroya et al., 1999).

18 Our results confirm that in a bovine adipocyte differentiation system, retinoid
19 responsiveness, mediated though the balance between retinoic acid isomers as well as
20 the RAR and RXR receptor availability in preadipocytes, results in an increased rate of
21 adipogenesis.

22 Induction of PGC-1 α expression by 9-cis and all-trans retinoic acids was similar to that
23 of PPAR γ in bovine adipocytes. In other species, rexinoids have been shown either not
24 to alter PGC-1 α (Emilsson et al., 2000) or to induce it (Hondares et al., 2006).

1 It is well documented that carotenoids are involved in the modulation of transcription by
2 certain transcription factors, including ligand-activated nuclear receptors (Sharoni et al.,
3 2004). It has also been reported that they activate the antioxidant response element
4 transcription system; lycopene and, to a lesser extent, other carotenoids induce phase II
5 enzymes by activating the ARE transcription system, which may explain some of the
6 cancer-preventing activity of carotenoids (Ben-Dor et al., 2005). The presence of
7 PPAR γ in various types of cancer cells suggests that carotenoids or their derivatives can
8 also be activators of the cascade in these cells (Sharoni et al., 2004). Takahashi et al.
9 (2003) observed that isoprenols (farnesol and geranylgeraniol) transactivated the
10 PPAR γ promoter-driven expression of a reporter gene at high concentration (100 μ M).
11 Moreover, these agents up-regulated the expression of lipid metabolic target genes of
12 PPAR γ . However, the authors reported that various carotenoids at 100 μ M, a
13 concentration hardly achievable in aqueous solutions, did not significantly affect
14 PPAR γ transactivation. Okada et al. (2008) tested lutein, violaxanthine, α -carotene,
15 carotenoids with an epoxy group (β -carotene 5, 6-epoxide) or a keto group
16 (canthaxanthine, citranaxanthine, rhodoxanthine), a hydroxyl carotenoid (β -
17 crytoxanthine), epoxy-hydroxy carotenoids (antheraxanthine, lutein epoxide), and a
18 keto-hydroxy carotenoid (capsorubin) and did not find suppressive effects on either
19 GPDH activity or aP2 expression in 3T3-L1. Our results showed that only β -carotene at
20 a dose of 30 μ M increased PPAR γ mRNA expression; lutein showed the same tendency
21 as β -carotene ($P < 0.01$), whereas carotenoids had no effect on PGC-1 α mRNA
22 expression when it is compared with rosiglitazone (Fig. 5A and 5B). It is not yet
23 conclusive that activation of the PPAR system contributes to the ability of carotenoids
24 to promote adipose tissue differentiation.

1 In summary, we establish here that active molecules present in dietary fat may have a
2 profound influence on PPAR γ - and PGC-1 α -regulated pathways controlling
3 differentiation and energy metabolism in white fat. This may reflect that these lipid
4 compounds act as natural ligands of PPAR γ (unsaturated fatty acids) or RXR (retinoic
5 acid isomers); hence, they could have a potential use in fattening animals by promoting
6 adipose tissue differentiation leading to marbling and resulting in better quality
7 carcasses.

8 **Acknowledgments**

9 This work was part of the doctoral thesis that the senior author submitted to the
10 Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Patricia García-Rojas also
11 thanks CONACYT for a scholarship at Facultad de Estudios Superiores-Cuautitlán,
12 UNAM and grants SAF2008-01846 and PCI2006-A7-0570 from Ministerio de Ciencia
13 y Tecnología, Spain. We also thank Adriana González from Proteogenomic Facility,
14 INB-UNAM for technical support and Dorothy Pless for revising the English
15 manuscript.

16 **LITERATURE CITED**

- 17 Arias, E., A. González, A. Shimada, A. Varela-Echavarría, F. Ruiz-López, A. Doring,
18 and O. Mora. 2009. β - Carotene is mobilized along with triglycerides in bovine
19 adipose tissue in response to insulin or epinephrine. *J. Anim. Physiol. Anim.*
20 *Nutr.* 93: 83-93.
- 21 Ben-Dor, A., M. Steiner, L. Gheber, M. Danilenko, N. Dubi, K. Linnewiel, A. Zick, Y.
22 Sharoni, and J. Levy. 2005. Carotenoids activate the antioxidant response
23 element transcription system. *Mol. Cancer Ther.* 4: 177-186.

- 1 Bonet, M.L., J. Ribot, F. Felipe, and A. Palou. 2003. Vitamin A and the regulation of fat
2 reserves. *Cell Mol. Life Sci.* 60: 1311-1321.
- 3 Brandebourg, T.D., and C.Y. Hu. 2005. Regulation of differentiating pig preadipocytes
4 by retinoic acid. *J. Anim. Sci.* 83:98-107.
- 5 Canan Koch, S. S., L. J. Dardashti, R. M. Cesario, G. E. Croston, M. F. Boehm, R. A.
6 Heyman and A. M. Nazdam. 1999. Synthesis of retinoid X receptor-specific
7 ligands that are potent inducers of adipogenesis in 3T3-L1 cells. *J. Med. Chem.*
8 42: 742-750.
- 9 Crunkhorn, S., F. Dearie, C. Mantzoros, H. Gami, W.S. da Silva, D. Espinoza, R.
10 Faucette, K. Barry, A.C. Bianco and M. E. Patti. 2007. Peroxisome proliferator
11 activator receptor gamma coactivator-1 expression is reduced in obesity:
12 potential pathogenic role of saturated fatty acids and p38 mitogen-activated
13 protein kinase activation. *J. Biol. Chem.* 282: 15439-15450.
- 14 Desvergne, B., L. Michalik, and W. Wahli. 2004. Be fit or be sick: peroxisome
15 proliferator-activated receptors are down the road. *Mol. Endocrinol.* 18:1321–
16 1332.
- 17 Emilsson, V., J. O'Dowd, S. Wang, Y.L. Liu, M. Sennitt, R. Heyman, and M.A.
18 Cawthorne. 2000. The effects of rexinoids and rosiglitazone on body weight and
19 uncoupling protein isoform expression in the Zucker fa/fa rat. *Metabolism.* 49:
20 1610-1615.
- 21 Forman, B.M., P. Tontonoz, J. Chen, R. P. Brun, B. M. Spiegelman, and R. M. Evans.
22 1995. 15-Deoxy-D12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte
23 determination factor PPAR gamma. *Cell.* 83: 803-812.

- 1 Germain, P., P. Chambon, G. Eichele, R.M. Evans, M.A. Lazar, M. Leid, A. R. De
2 Lera, R. Lotan, D. J. Mangelsdorf, and H. Gronemeyer. 2006. International
3 Union of Pharmacology. LX. Retinoid Acids Receptors. *Pharmacol. Rev.* 58:
4 760-772.
- 5 Hondares E., O. Mora, P. Yubero, M. Rodríguez de la Concepción, R. Iglesias, M.
6 Giralt, and F. Villarroya. 2006. Thiazolidinediones and rexinoids induce PGC-
7 1α gene transcription. An auto-regulatory loop controls PGC-1a expression in
8 adipocytes via PPAR co-activation. *Endocrinology.* 147: 2829–2838.
- 9 Kliewer, S.A., J.M. Lenhard, T.M. Willson, I. Patel, D.C. Morris, and J.M. Lehmann.
10 1995. A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated
11 receptor gamma and promotes adipocyte differentiation. *Cell.* 835: 813-819.
- 12 Krskova-Tybitanclova, K., D. Macejova, J. Brtko, M. Baculikova, O. Krizanova, and S.
13 Zorad. 2008. Short term 13-cis-retinoic acid treatment at therapeutic doses
14 elevates expression of leptin, GLUT4, PPARgamma and aP2 in rat adipose
15 tissue. *J. Physiol. Pharmacol.* 59: 731-743.
- 16 Lough, A.K. 1977. The phytanic acid content of the lipids of bovine tissues and milk.
17 *Lipids.* 12: 115-119.
- 18 MacDougald, O.A. and M.D. Lane. 1995. Transcriptional Regulation of Gene
19 Expression during Adipocyte Differentiation. *Annu. Rev. Biochem.* 64: 345-373.
- 20 Meidute-Abaraviciene, S., L. Lundquist, J. Galvanovskis, E. Flodgren, B. Olde, and A.
21 Salehi. 2008. Palmitate-induced beta-cell dysfunction is associated with
22 excessive NO production and is reversed by thiazolidinedione-mediated
23 inhibition of GPR40 transduction mechanisms. *PLoS ONE.* 3: e2182. (Abstr).

- 1 Molnár, F., M. Matilainen, and C. Carlberg. 2005. Structural Determinants of the
2 Agonist-independent Association of Human Peroxisome Proliferator-activated
3 Receptors with Coactivators. *J. Biol. Chem.* 280: 26543–26556.
- 4 Moreno, M.J. y J. A. Martínez. 2002. El tejido adiposo: órgano de almacenamiento y
5 órgano secretor. *Anales Sis San Navarra*, 25: 29-39.
- 6 Ohyama, M., K. Matsuda, S. Torii, T. Matsui, H. Yano, T. Kawada and T. Ishihara.
7 1998. The interaction between vitamin A and Thiazolidinedione on bovine
8 adipocyte differentiation in primary culture. *J. Anim. Sci.* 76: 61-65.
- 9 Okada, T., M. Nakai, H. Maeda, M. Hosokawa, T. Sashima, and K. Miyashita. 2008.
10 Suppressive effect of neoxanthin on the differentiation of 3T3-L1 adipose cells.
11 *J. Oleo Sci.* 57: 345-351.
- 12 Phillips, B.W., C. Vernochet, and C. Dani. 2003. Differentiation of embryonic stem
13 cells for pharmacological studies on adipose cells. *Pharmacol. Res.* 47: 263-268.
- 14 Pu, L. L., X. Cui, B. F. Fink, M. L. Cibull, and D. Gao. 2005. The viability of fatty
15 tissues within adipose aspirates after conventional liposuction: a comprehensive
16 study. *Ann. Plast. Surg.* 54: 288–292.
- 17 Rodríguez de la Concepción, M. L. 2004. Diferenciación adipocitaria y factores
18 reguladores de la biogénesis mitocondrial. Efecto de los fármacos
19 antiretrovirales. Tesis de Doctorado. Facultat de Biologia. Universitat de
20 Barcelona, España.
- 21 SAS Institute Inc 2004. SAS OnlineDoc® 9.1.3. Cary, NC: SAS Institute Inc.
- 22 Schlüter, A., P. Yubero, R. Iglesias, M. Giralt, and F. Villarroya. 2002. The chlorophyll-
23 derived metabolite phytanic acid induces white adipocyte differentiation. *Int. J.*
24 *Obesity.* 26: 1277-1280.

- 1 Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural (SAGAR). 1997. Sacrificio
2 Humanitario de los Animales Domésticos y Silvestres. Norma Oficial Mexicana
3 NOM-033-ZOO-1995. Diario Oficial de la Federación. 16 de Julio. México.
- 4 Servicio de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera (SIEAP). 2005.
5 SAGARPA. México.
- 6 Sharoni, Y., M. Danilenko, N. Dubi, A. Ben-Dor, and J. Levy. 2004. Carotenoids and
7 transcription. *Arch. Biochem. Biophys.* 430: 89-96.
- 8 Staiger, H., K. Staiger, C. Haas, M. Weisser, F. Machicao, and H. U. Häring. 2005.
9 Fatty acid-induced differential regulation of the genes encoding peroxisome
10 proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1alpha and -1beta in human
11 skeletal muscle cells that have been differentiated *in vitro*. *Diabetologia* 48:
12 2115–2118.
- 13 Suryawan, A., and C. Y. Hu. 1997. Effect of retinoic acid on differentiation of cultured
14 pig preadipocytes. *J. Anim. Sci.* 75: 112-117.
- 15 Takahashi, N., T. Kawada, T. Goto, C. S. Kim, A. Taimatsu, K. Egawa, T. Yamamoto,
16 M. Jisaka, K. Nishimura, K. Yokota, R. Yu, and T. Fushiki. 2003. Abietic acid
17 activates peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR γ) in RAW264.7
18 macrophages and 3T3-L1 adipocytes to regulate gene expression involved in
19 inflammation and lipid metabolism *FEBS Lett.* 550: 190-194.
- 20 Villarroya, F., M. Giralt, and R. Iglesias. 1999. Retinoids and adipose tissues:
21 metabolism, cell differentiation and gene expression. *Int. J. Obesity.* 23: 1-6.
- 22 Wu, P., K. Sato, F. Suzuta, Y. Hikasa, and K. Kagota. 2000. Effects of lipid-related
23 factors on adipocyte differentiation of bovine stromal-vascular cells in primary
24 culture. *J. Vet. Med. Sci.* 62: 933-939.

- 1 Yoon, J.C., P. Puigserver, G. Chen, J. Donovan, Z. Wu, J. Rhee, G. Adelmant, J.
2 Stafford, C.R. Kahn, D.K. Granner, C.B. Newgard, and B.M. Spiegelman. 2001.
3 Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-
4 1. *Nature* 413: 131-138.
- 5 Zhang, Y., C. Liu, L. Zhu, X. Jiang, X. Chen, X. Qi, X. Liang, S. Jin, P. Zhang, Q. Li,
6 D. Wang, X. Liu, K. Zeng, J. Zhang, Y. Xiang, and C.Y. Zhang. 2007. PGC-
7 1alpha inhibits oleic acid induced proliferation and migration of rat vascular
8 smooth muscle cells. *PLoS ONE*. 2: e1137. (Abstr).

1

Table 1. Primers designed for semiquantitative and real time PCR.

2

	Primers	Fragment size (bp)	Sequence position
PPAR γ semiquantitative PCR	Forward 5'-GACTTGAACGACCA AGTAACTC; Reverse 5'- CTCTGCTAATAACAAGTCCTTGTAG	511	1087-1598
PGC-1 α semiquantitative PCR	Forward 5'- TGGATGCCTCGCATTTCAGTG; Reverse 5'- TCACCAACCAGAGCAGCACA.	2161	-2003 +158
PPAR γ Real time PCR	Forward 5'- CATCTTCCAGGGGTGTCAGT; Reverse 5'- GGATATGAGGACCCCATCCT	187	998-1185
PGC-1 α Real time PCR	Forward 5'- GTGAAGACCAGCCTCTTTC; Reverse 5'- TCACTGCACCACTTGAGTCC.	109	155-263
β actin Real time PCR	Forward 5'- CCATCATGAAGTGTGACGTTG Reverse 5'- ACAGAGTACTTGCGCTCAGGA	176	642-818

3

4

Figure 1. Bovine adipocyte differentiation, RNA extraction and PPAR γ expression.

A) Morphological cell changes during adipocyte differentiation.

A, B, and C are from subcutaneous adipose tissue on days 1, 5, and 10 after they were seeded.

B) RNA isolated from adipocytes of two animals treated, Line 1 and 7 basal; line 2 and 8 differentiation medium; line 3 and 9 20 μ M of rosiglitazone; line 4 to 6 and 10 to 12 9 cis-retinoic acid (0.5, 0.75, 1 μ M).

C) PPAR γ expression was demonstrated by RT-PCR of RNA samples of one animal treated with 9 cis-retinoic acid (0.5, 0.75, 1 μ M) showing a band of 511 bp of PPAR γ

Figure 2. Effect of 20 μ M of rosiglitazone on PPAR γ and PGC-1 α gene expression.

The level of 20 μ M of rosiglitazone was tested as a positive control of expression.

Figure 3. Effect of three different levels of unsaturated fatty acids on PPAR γ and PGC-1 α gene expression

The following combinations were tested: A) phytanic acid 25, 50, 100 μ M, and B) pristanic acid 25, 50, 100 μ M.

Figure 4. Effect of three levels of rexinoids on PPAR γ and PGC-1 α gene expression

The following concentrations were tested: A) rexinoids: 9 cis-retinoic acid 0.5, 0.75, 1 μ M and B) all-trans retinoic acid 0.5, 0.75, 1 μ M.

Figure 5. Effect of three levels of carotenoids on PPAR γ and PGC-1 α gene expression

The following concentrations were tested: A) β -carotene 10, 20, 30 μ M) and B) lutein 10, 20, 30 μ M

Figure 6. Effect of ligand levels and combinations on PPAR γ and PGC-1 α gene expression

The following combinations were tested: 1) rosiglitazone + all-trans retinoic acid, 2) all-trans retinoic acid + 9-cis retinoic acid, 3) as in 2 + pristanic acid, 4) as in 3 + phytanic acid, 5) pristanic acid + phytanic acid, 6) all-trans retinoic acid + lutein and 7) as 4 + lutein. In each case, the compounds were used at the concentration that gave the greatest effect when tested alone in the previous experiments (using the best obtained concentration in previous experiments). Rosiglitazone was used as a positive control.

Figure 1.

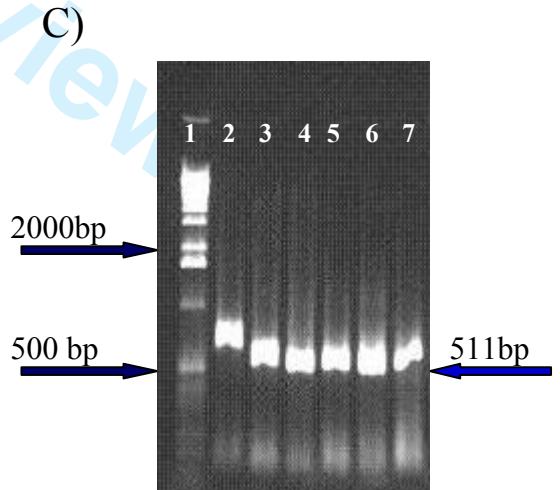
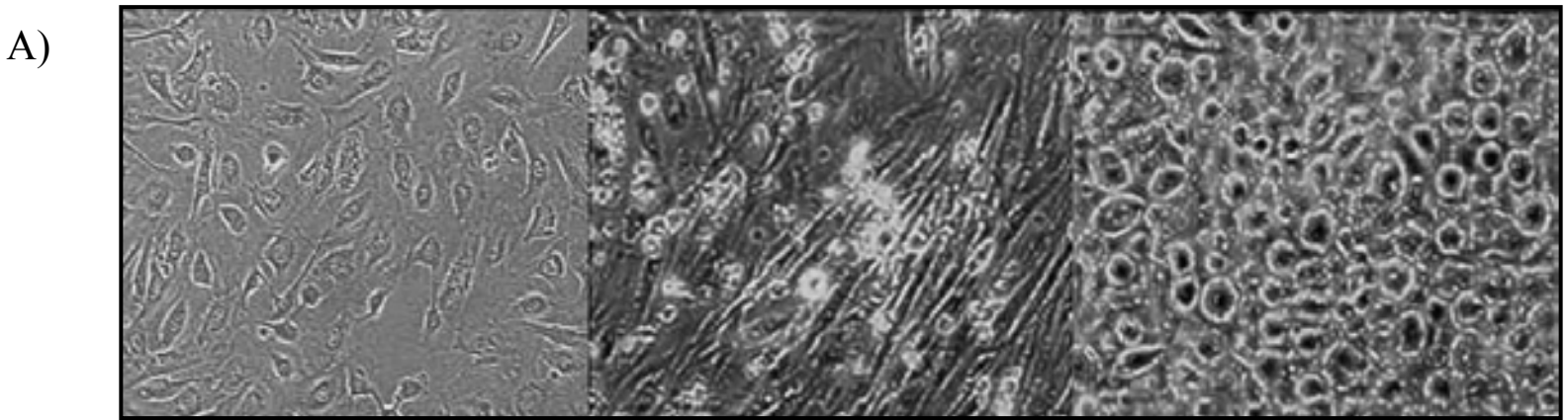


Figure 2.

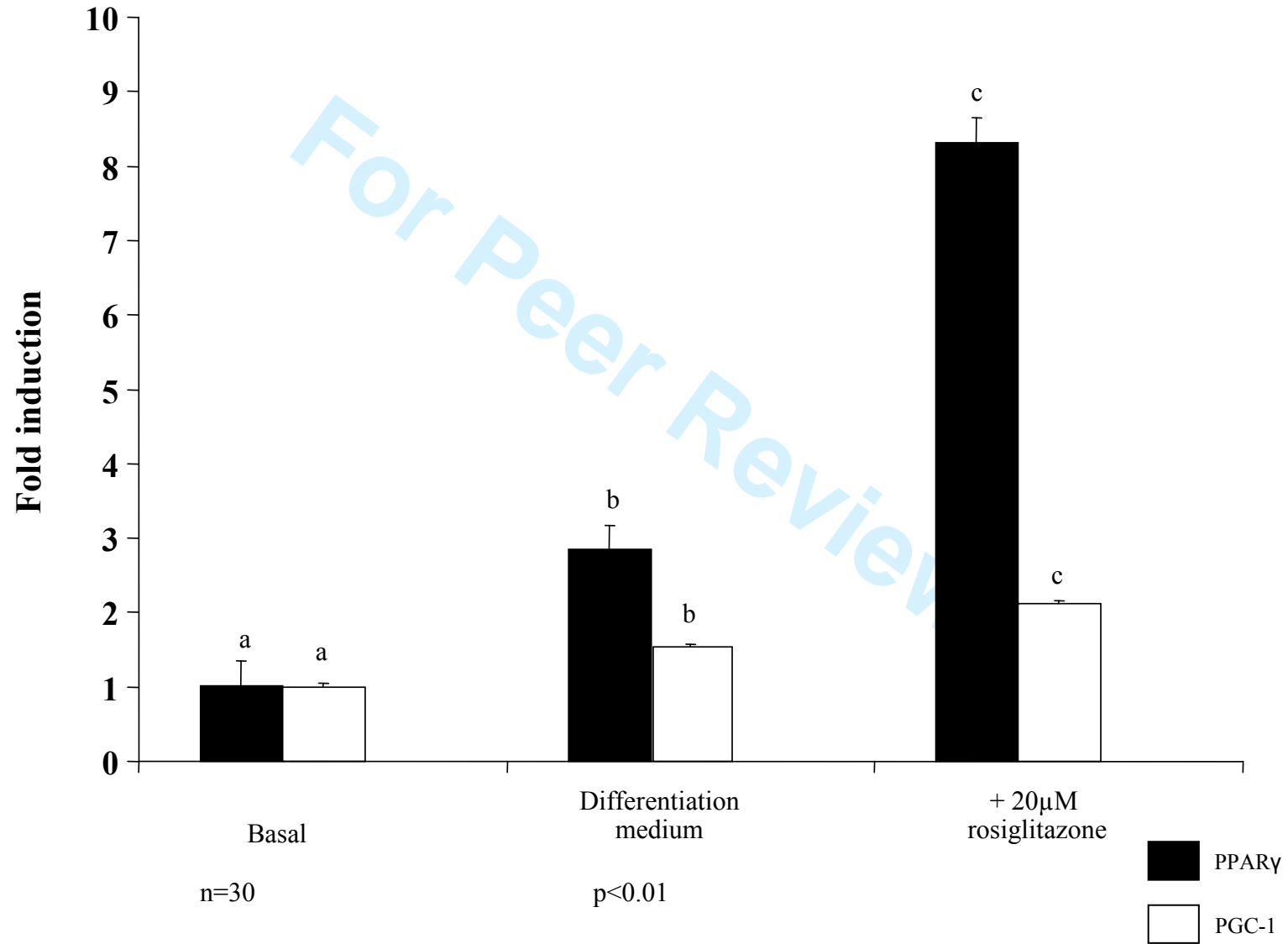


Figure 3.

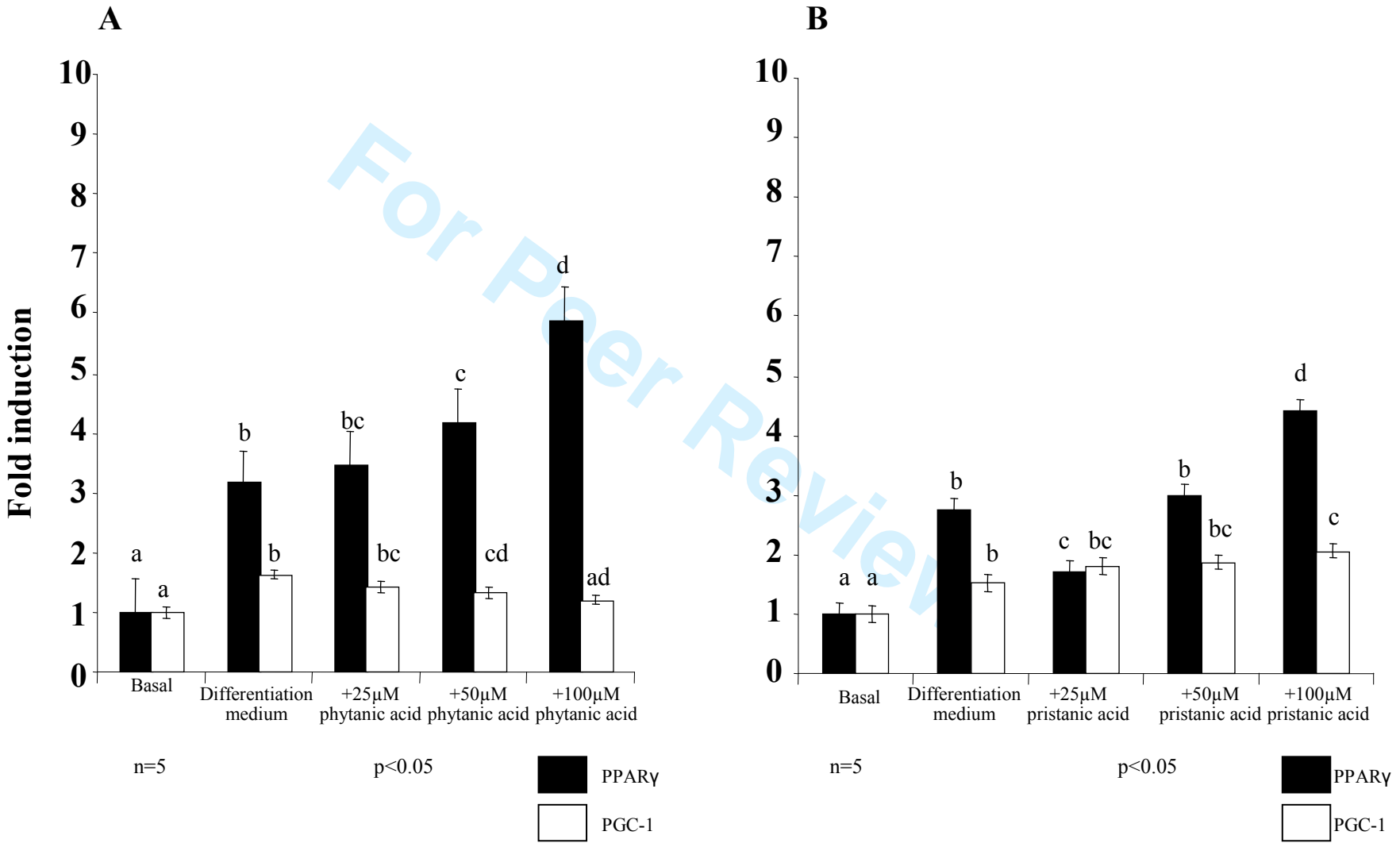


Figure 4.

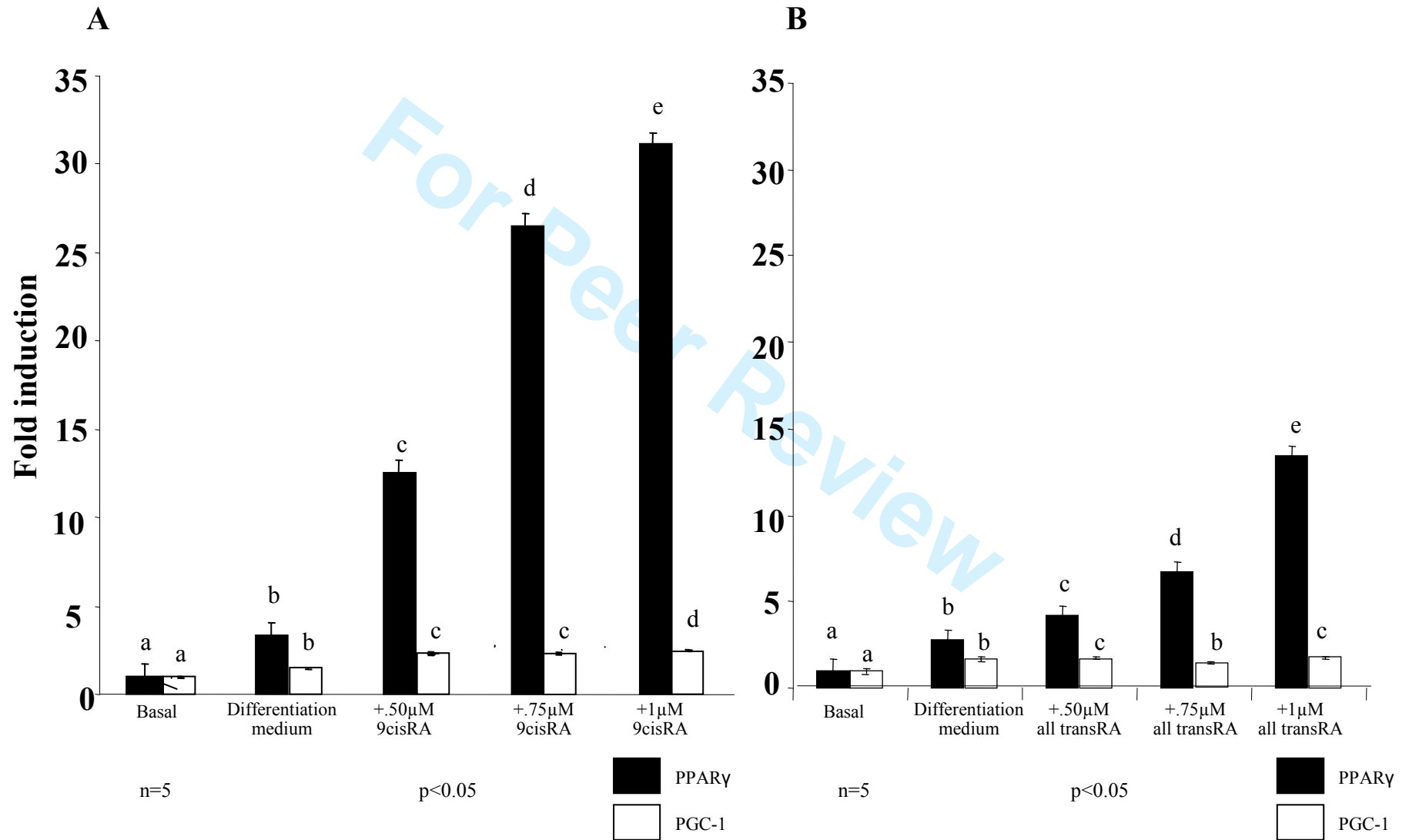


Figure 5.

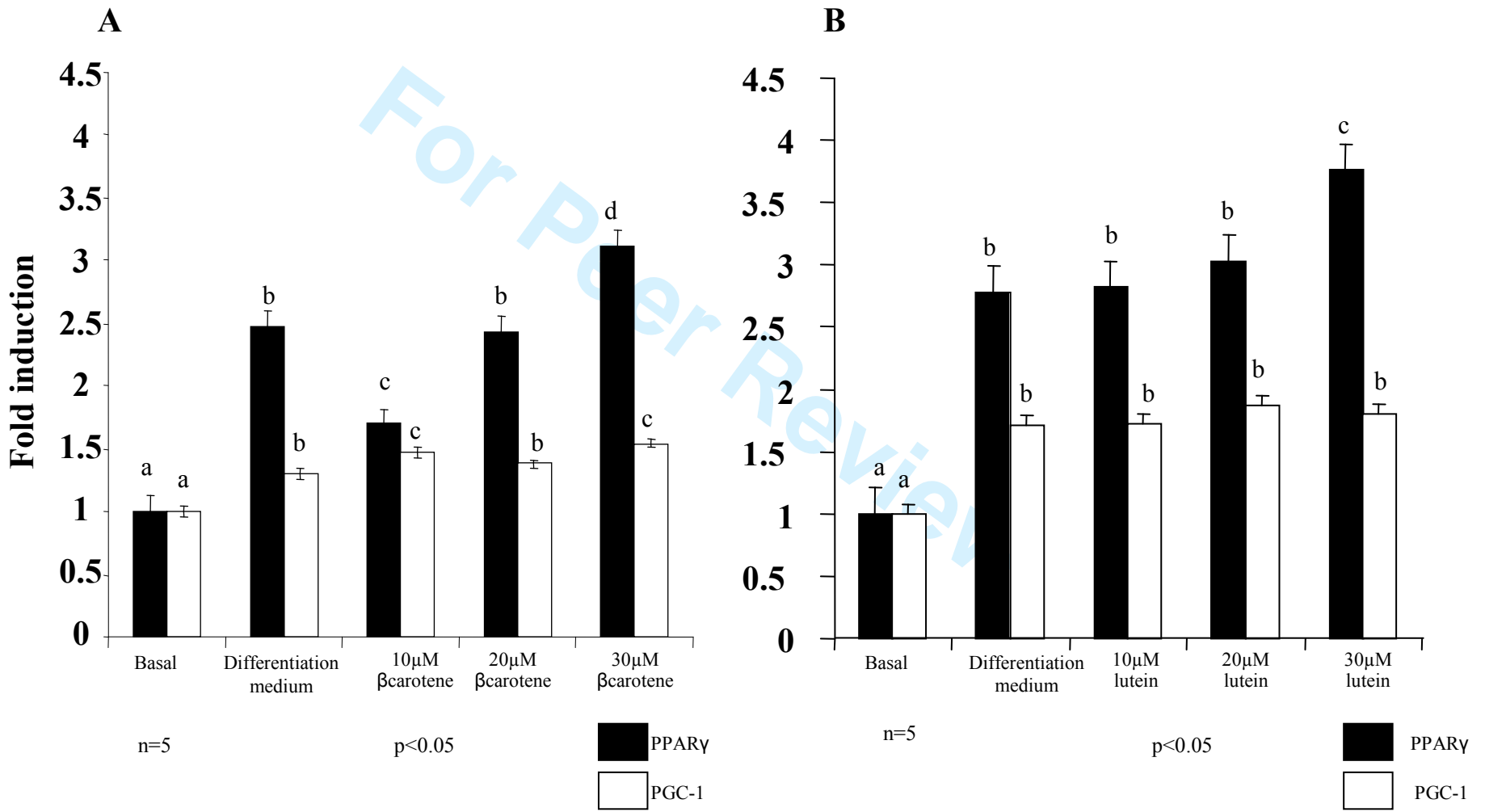


Figure 6.

