



11674
1
**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCION Y DE LA SALUD ANIMAL**

**RECAMBIO DE β -CAROTENO EN TEJIDO
ADIPOSO DE BOVINO**

T E S I S

**PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS**

P R E S E N T A

LUIS EDUARDO ARIAS CHAVEZ

**TUTOR:
MARIA OFELIA MORA IZAGUIRRE**

**COMITE TUTORAL:
MARIA OFELIA MORA IZAGUIRRE
ARMANDO SHIMADA MIYASAKA
LOURDES JUAREZ MOSQUEDA**

AJUCHITLAN, QRO

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

2003

A



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

DEDICATORIA

A mis padres, Epifanio y Francisca:

Por su decidido apoyo en todo momento y por encauzarme en el camino de la superación. Mi gratitud eterna.

A mis hermanos, Adalberto, Juan Carlos, Claudia Teresa, Ana Lilia, Luz Elena y Carmen Idalia:

Por sus constantes estímulos y sus consejos que han contribuido positivamente para mi formación.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

AGRADECIMIENTOS

- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por su apoyo económico durante los cursos de maestría y por financiar el proyecto: J31295-B.
 - A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, por brindarme la oportunidad de realizar estudios de posgrado.
 - Al laboratorio de Biología Molecular (A-03) del Instituto de Neurobiología (INB) de la UNAM Campus Juriquilla Qro., en donde realicé los trabajos de laboratorio. Gracias por las facilidades brindadas y por el apoyo, especialmente a el Dr. Alfredo Varela Echavarría y a la M.C. Carmen Mejía Viggiano.
 - A la Dra. María Ofelia Mora Izaguirre, por su confianza, amistad y gran apoyo que me ha brindado durante mis estudios de maestría.
 - A la M.C. Adriana González Gallardo por su apoyo y colaboración en la realización del presente trabajo.
 - A el Dr. Felipe de Jesús Ruiz, por su amistad y orientación en los análisis estadísticos de este trabajo.
 - A los investigadores del Centro Nacional de Investigación en Fisiología y Mejoramiento Animal, por compartir sus conocimientos y experiencias, así, como brindarme su apreciable amistad.
 - A los miembros del Jurado: Dr. Armado Shimada Miyasaka, Dra. Lourdes Juárez Mosqueda, Dra. Tercia Cesaria Reis de Souza, Dr. José Luis Romano Muñoz y Dra. María Ofelia Mora Izaguirre, por sus valiosas contribuciones y sugerencias para mejorar el presente escrito.
 - A mis amigas y amigos del INB por brindarme su amistad y regalarme buenos momentos.
 - A Lety por su trabajo y dedicación.
 - A mis compañeros del posgrado, por su amistad y por compartir todas las buenas experiencias.
- Y a todas las personas que de alguna manera contribuyeron en la realización del este trabajo, mil gracias !!!

Resumen

Arias Chávez Luis Eduardo 2003. RECAMBIO DE β -CAROTENO EN TEJIDO ADIPOSO DE BOVINO. Tesis de Maestría en Ciencias. Asesor: María Ofelia Mora Izaguirre.

Los forrajes verdes son fuentes ricas de carotenoides, principalmente β -caroteno (β C), por lo cual los bovinos en pastoreo pueden consumir grandes cantidades de este compuesto en la dieta. El depósito más importante de β C en bovinos, es el tejido adiposo. Se desconocen los factores que influyen en el recambio de éste. Con objeto de conocer algunos de esos factores, se realizaron dos experimentos. En el experimento 1, explantes de tejido adiposo de tres bovinos fueron incubados con diferentes concentraciones (0, 1, 5 y 20 μ M) de β C. La actividad de la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH) fue cuantificada como indicadora de la viabilidad de células adiposas. El β C fue determinado por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). La mejor incorporación de β C fue obtenida con la concentración 20 μ M y la actividad de G3PDH mostraron un efecto cuadrático ($P < 0.05$) sobre el tiempo de incubación. En el segundo experimento, explantes de tejido adiposo de seis bovinos fueron incubados. Se evaluó el efecto de la insulina y de la epinefrina sobre la incorporación y movilización de β C y de triglicéridos. La incorporación de triglicéridos y de β C en los explantes fue mayor en presencia de insulina, por el contrario, la epinefrina movilizó el β C y los triglicéridos. Se encontró relación en la movilización de triglicéridos: β C de $1:6 \times 10^{-4}$ y $1:28 \times 10^{-4}$ en presencia de 0 y 20 μ M de β C, respectivamente. Los resultados de este estudio sugieren que la movilización de β C del tejido adiposo de los bovinos es dependiente de la concentración intracelular y que su movilización es similar a la de los triglicéridos.

Palabras clave: Recambio de β -caroteno, insulina, epinefrina, tejido adiposo, bovinos.

Abstract

The green forages are rich sources of carotenoides, mainly β -carotene (β C). Cattle can ingest substantial quantities of β C in the diet. Because not all of the ingested and absorbed β C is transformed into vitamin A, the surplus is then deposited in adipose tissue, where it accumulates. As a result, yellow fat is frequently observed in the carcasses of pasture-fed animals. Most of the factors involved in the turnover of this compound is unknown. In order to know some of them, two experiments were conducted; in Expt 1, explants of adipose tissue of three bovines were incubated with different concentration (0, 1, 5 and 20 μ M) of β C. The activity of the Glicerol-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH) was quantified as indicator of the viability of fatty cells. The highest incorporation of β C was obtained at 20 μ M and the activity of G3PDH showed a quadratic effect ($P < 0.05$) over the incubation time. In Expt 2, explants of adipose tissue of six animals were incubated. The effect of insulin and epinephrine over the incorporation and mobilization of β C and triglycerides were determined. The incorporation of triglycerides and the β C in the explants were greater in presence of insulin, on the contrary, the epinephrine mobilized them. The ratios obtained in the mobilization of triglycerides: β C were $1:6 \times 10^{-4}$ and $1:28 \times 10^{-4}$ in presence of 0 and 20 μ M of β C, respectively. The results of this study suggest that the mobilization of β C of the adipose tissue of bovine is dependent on its intracellular concentration and is related to the mobilization of the triglycerides.

Words key: β -carotene turnover, insulin, epinephrine, adipose tissue, bovine.

CONTENIDO

	Pág.
Dedicatoria.....	i
Agradecimientos.....	ii
Resumen.....	iii
Abstract.....	iv
Índice de cuadros.....	vi
Índice de figuras.....	vii
1. Introducción.....	1
2. Revisión de literatura.....	3
2.1 Tejido adiposo.....	3
2.2 Recambio de ácidos grasos.....	7
2.3 Metabolismo de los carotenoides y concentración de β -caroteno en tejido adiposo de los bovino.....	11
3. Objetivo general.....	16
3.1 Objetivos específicos.....	16
4. Hipótesis.....	16
5. Artículo científico: "Incorporación y movilización de β -caroteno en tejido adiposo de bovino <i>in vitro</i> ".....	17
6. Discusión general.....	56
7. Conclusión.....	59
8. Literatura citada.....	60

INDICE DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1 Proteínas secretadas por los adipocitos al torrente sanguíneo....	4
Cuadro 2 Receptores en adipocitos.....	5-6
Cuadro 3 Tasas de recambio de ácidos grasos en el tejido adiposo de rumiantes.....	9
Cuadro 4 Concentración de β -caroteno en el tejido adiposo de bovino bajo diferentes condiciones.....	14
Cuadro 5 Factores genéticos asociados con el color de la grasa.....	15

ARTICULO

Cuadro 1 Tratamientos.....	25
Cuadro 2 Concentración de β -caroteno, actividad de la enzima G3PDH a las 0 horas de incubación y concentración de DNA genómico en el tejido adiposo.....	46
Cuadro 3 Incorporación y movilización de triglicéridos y de β -caroteno en explantes de tejido adiposo incubados con 0 ó 20 μ M de β -caroteno.....	47
Cuadro 4 Tasa de movilización de triglicéridos y de β -caroteno en explantes de tejido adiposo de bovinos incubados con 0 ó 20 μ M de β -caroteno.....	48

INDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1 Incubación de explantes de tejido adiposo de bovino.....	49
Figura 2 Efecto de la concentración de β C (0, 1, 5 y 20 μ M) sobre su incorporación en explantes de tejido adiposo de bovino incubados durante 25 h.....	50
Figura 3 Actividad de la enzima G3PDH en explantes de tejido adiposo de bovino incubados durante 120 h con diferente concentración de β C (0, 1, 5 y 20 μ M).....	51
Figura 4 Efecto del tipo de hormona sobre la incorporación de β C/ μ g de DNA en explantes de tejido adiposo incubados durante 20 h.....	52
Figura 5 Efecto de la concentración de β C y tipo de hormona adicionados al medio de cultivo sobre la actividad de la enzima G3PDH en explantes de tejido adiposo de bovino en cultivo durante 20 h.....	53
Figura 6 Efecto del tipo de hormona adicionada en el medio de cultivo sobre la concentración de triglicéridos por μ g de DNA en explantes de tejido adiposo de bovino incubados durante 20 h.....	54
Figura 7 Expresión de fragmentos del gen que codifica la enzima β -caroteno 15,15'-oxigenasa en tejido adiposo de bovino.....	55

1. Introducción

La ganadería bovina productora de carne de México ocupa el lugar número nueve a nivel mundial. En el periodo 1990-2001 mantuvo una tasa de crecimiento media anual de 2.29%. En el año 2001 con un inventario nacional de 28'313,158 cabezas de ganado se logró una producción de carne en canal de 1'399,629 t (CEA 2002). Debido a la importancia de la producción de carne bovina en el país y en el mundo, es necesario optimizar dicha producción. Entendiéndose con esto, enviar al mercado canales provenientes de animales sanos y de buena calidad, pero que sean del agrado del consumidor final.

En México, la gran mayoría de los bovinos son engordados y finalizados bajo condiciones de pastoreo (CEA 1999). Sin embargo, se ha observado que como consecuencia del consumo de forrajes verdes, el tejido adiposo de los bovinos presenta una coloración amarillenta debido a la deposición de carotenoides en este tejido. El principal carotenoide responsable de la pigmentación del tejido adiposo es el β -caroteno, y en segundo término la luteína (Morgan *et al.* 1969). La pigmentación de la grasa demerita la calidad de las canales, ya que las hace parecer al consumidor como provenientes de animales viejos. A pesar de que la coloración de la grasa no afecta el sabor ni el valor nutrimental de la carne (Bidner *et al.* 1986; McCaughey y Cliplet 1996; Simonne 1996), la presencia de pigmentos en la grasa de la canal puede representar un castigo en su precio, por el rechazo de la carne por parte del consumidor. En México, los ingresos del ganadero se reducen del 10 al 15% del valor de la canal cuando es clasificada como amarilla. Se estimó que para el año 1999, 54 mil toneladas de carne en canal presentaron este problema (Barrón *et al.* 2003).

El ganadero productor de carne bovina ha intentado superar el problema mediante la estabulación y la alimentación de los animales en base a granos y forrajes secos durante algunos meses previos al sacrificio. Sin embargo, ésto no sólo no ha garantizado la efectividad de la despigmentación, sino que ha resultado en un incremento innecesario en los costos de producción y, en última instancia en la economía del consumidor final.

PAGINACIÓN DISCONTINUA

Bovinos que estuvieron en pastoreo y posteriormente fueron estabulados y alimentados con dietas basadas en granos y forrajes secos durante algunos meses previos al sacrificio, mostraron una disminución en la concentración de β -caroteno en la grasa de 0.28 a 0.17 $\mu\text{g/g}$ (Forrest 1981). No obstante, se desconoce si la disminución de la coloración amarillenta de la grasa de los bovinos finalizados con dietas basadas en concentrado y forrajes secos se debe a la movilización y oxidación de los carotenoides depositados en el tejido graso, a la dilución de la pigmentación por el incremento de grasa en el tejido adiposo durante la engorda o a ambos (Strachan *et al.* 1993).

El β -caroteno es un compuesto lipídico, por lo que los depósitos de este compuesto en el tejido adiposo de los bovinos pueden estar en constante recambio, lo cual podría ser semejante a lo que ocurre con los ácidos grasos. Para dilucidar lo anterior, es necesario conocer los factores que influyen en la incorporación y la movilización de este compuesto en dicho tejido. El presente trabajo tuvo como objetivo general evaluar el recambio de β -caroteno en tejido adiposo de bovino, con el propósito de ampliar los conocimientos sobre los procesos metabólicos y fisiológicos que regulan la deposición y la remoción de los carotenoides en el tejido adiposo del bovino. En este estudio se realizaron dos experimentos, el primero con el objeto de determinar una concentración adecuada de β -caroteno en el medio de cultivo que nos permita cuantificar su incorporación en explantes de tejido adiposo; el segundo con el objeto de conocer el efecto de la insulina y de la epinefrina sobre la incorporación o la movilización de β -caroteno en el tejido adiposo de bovino, mediante el uso de sistemas de incubación *in vitro* de explantes de tejido adiposo.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2. Revisión de literatura

2.1. Tejido Adiposo

El tejido adiposo está constituido por células adiposas sumergidas en una matriz de tejido conectivo. El tejido adiposo es el reservorio de energía más grande de un organismo y se encuentra disperso en todo el cuerpo del animal, encontrándose principalmente en forma subcutánea, intramuscular, intermuscular y visceral (Emery 1979; Frühberk *et al.* 2001).

Existen dos tipos de tejido adiposo, que difieren por su distribución, color, vascularidad y actividad metabólica. Uno de ellos es el tejido adiposo blanco que está ampliamente distribuido y que constituye la mayor parte de la grasa corporal; el otro es el tejido adiposo pardo, mucho menos abundante y limitado a ciertas áreas del cuerpo, el color de este último se debe a que sus células contienen un número elevado de mitocondrias que le proporcionan una alta capacidad para generar calor a través de la oxidación de los ácidos grasos (Fawcett 1995; Cinti 2001).

Las células del tejido adiposo blanco varían enormemente en tamaño (20 - 200 μm de diámetro), y su forma es típicamente esférica. Alrededor del 90% del volumen de las células maduras está ocupado por una gota de grasa, que desplaza al núcleo y al resto del citoplasma hacia la periferia (Fawcett 1995; Frühberk *et al.* 2001). La función principal del adipocito es almacenar energía en forma de triglicéridos durante periodos de consumo de energía en exceso y movilizar estas reservas cuando el gasto energético excede al consumo; los adipocitos maduros poseen las enzimas y proteínas reguladoras necesarias para realizar lipólisis y lipogénesis *de novo* (Frühberk *et al.* 2001).

La grasa de los rumiantes está constituida en un 80% por los siguientes ácidos grasos: mirístico (C14:0), palmítico (C16:0), esteárico (C18:0) y oleico (C18:1), principalmente. En estos animales los lípidos se originan de tres fuentes: del aporte dietético con modificación microbiana, de la síntesis microbiana y de la síntesis *de novo* de ácidos grasos (síntesis endógena) en el citoplasma del adipocito. La síntesis endógena a partir del acetato (principal precursor de ácidos

grasos en rumiantes) obtenido durante la fermentación ruminal cuando se proporcionan dietas ricas en forraje, determina que el ácido palmítico sea el principal producto final que posteriormente puede ser alargado hasta esteárico y desaturado hasta oleico (Byers y Schelling 1988).

El tejido adiposo era considerado un tejido pasivo para el almacenamiento del exceso de energía en forma de triglicéridos (Serrano y Lepak 1996). Sin embargo, el tejido adiposo está activamente involucrado en la regulación de diversas funciones celulares a través de una compleja red de señales endócrinas, parácrinas y autócrinas que tienen influencia en el comportamiento de otros tejidos, incluyendo el hipotálamo, el páncreas, el hígado, el músculo esquelético, los riñones, el endotelio y el sistema inmune, entre otros (Frühberk *et al.* 2001). Investigaciones recientes señalan que los adipocitos actúan como células secretorias endócrinas (Cuadros 1 y 2), y se ha demostrado que varias hormonas, factores de crecimiento, citocinas y receptores de señal son expresadas en estas células (Frühberk *et al.* 2001; Trayhurn y Beattie 2001).

Cuadro 1. Proteínas secretadas por adipocitos al torrente sanguíneo¹

Molécula*	Función / Efecto
Leptina	Señala al cerebro de la cantidad de grasa corporal almacenada. Regula el apetito y el gasto de energía.
TNF- α	Interfiere con la señalización de los receptores de insulina y puede ser una de las posibles causas del desarrollo de resistencia a la insulina observada en la obesidad.
IL-6	Implicada en los mecanismos de defensa y en el metabolismo de la glucosa y lípidos.
PAI-1	Potente inhibidor del sistema fibrinolítico.
Angiotensinógeno	Precursor de angiotensina II. Regulador de la presión sanguínea y de la homeostasis electrolítica.
Adipsina	Posible enlace entre la activación de vías alternativas complementarias y el metabolismo del tejido adiposo.
ASP	Influye en la tasa de síntesis de triglicéridos en tejido adiposo.
Adipofilina	Es un marcador específico de la acumulación de lípidos en la célula.
PGI ₂ y PGF _{2α}	Implicadas en funciones reguladoras como inflamación, coagulación sanguínea, ovulación y menstruación.
FGF β	Regula una amplia variedad de respuestas biológicas, incluyendo proliferación, diferenciación, apoptosis y desarrollo celular.
IGF-I	Estimula la proliferación de una amplia variedad de células y es mediador de muchos de los efectos de la hormona de crecimiento.
MIF	Involucrado en procesos proinflamatorios e inmunoregulación.

¹ Adaptado de Frühberk *et al.* 2001; Trayhurn y Beattie 2001.

² TNF- α , factor de necrosis tumoral- α ; IL-6, interleucina-6; PAI-1, inhibidor activador de plasminógeno-1; ASP, proteína estimuladora de aclación; PGI₂ y PGF_{2 α} , prostaglandinas I₂ y F_{2 α} , respectivamente; TGF β , factor de crecimiento transformante- β ; IGF-I, factor de crecimiento semejante a insulina I; MIF, factor inhibidor de macrófagos.

Cuadro 2. Receptores en adipocitos¹

Receptores ²	Principales efectos de la activación de receptores sobre el metabolismo en adipocitos
<i>Receptores de citocinas/hormonas</i>	
Leptina	Estimula la lipólisis.
Insulina	Regula funciones autócrinas de la expresión de leptina. Inhibe la lipólisis y estimula la lipogénesis. Induce la captación de glucosa y su oxidación. Estimula la expresión de leptina.
Glucagon	Estimula la lipólisis.
IGF-I y II	Inhiben la lipólisis.
GH	Estimulan el transporte y oxidación de glucosa. Induce la expresión de leptina y IGF-I.
TSH	Estimula la lipólisis. Regula la diferenciación de los adipocitos.
Prostaglandinas	Regula la lipólisis. Fuerte efecto antilipolítico (PGF ₂).
TNF- α	Modula la diferenciación de los preadipocitos (PGF _{2α} y PGI ₂). Estimula la lipólisis. Regula la secreción de leptina.
IL-6	Potente inhibidor de la diferenciación de los adipocitos. Inhibe la actividad de la lipoproteína lipasa. Induce la lipólisis.
Adenosina	Inhibe la lipólisis.
Gastrina/CCK-B	Regula la expresión y la secreción de leptina.
GIP	Estimula la síntesis de triglicéridos y de ácidos grasos. Amplifica el efecto de la insulina.
GLP-1	Regula la síntesis de glucógeno. Incrementa el metabolismo de la glucosa estimulada por insulina.
NPY-Y1	Inhibe la lipólisis. Induce la expresión de leptina.
Angiotensina II	Incrementa la lipogénesis. Estimula la producción de prostaciclina por las células adiposas maduras. Interactúa con la insulina en la regulación del metabolismo en los adipocitos.
EGF	Regula la diferenciación de los adipocitos.
PDGF	Interfiere con el efecto lipolítico de las catecolaminas.
FGF	Regula la diferenciación de los adipocitos.
TGF β	Potente inhibidor de la diferenciación de los adipocitos.
<i>Receptores adrenérgicos y de catecolaminas</i>	
$\beta_1, \beta_2, \beta_3 (\beta_4?)$	Estimulan la lipólisis. Inducen la termogénesis. Reducen el nivel de RNAm de leptina.
α_1	Induce de producción de inositol fosfato y activa la proteína cinasa C.
α_2	Inhibe la lipólisis. Regula el crecimiento de los preadipocitos.

Cuadro 2. Receptores en adipocitos¹ (continuación)

Receptores ²	Principales efectos de la activación de receptores sobre el metabolismo en adipocitos
<i>Receptores nucleares</i>	
PPAR γ	Induce la diferenciación de los adipocitos y los sensibiliza a la insulina
RAR/RXR	Regula la diferenciación de los adipocitos
T ₃	Estimula la lipólisis
	Regula la secreción de leptina
	Regula los efectos de insulina
Glucocorticoides	Estimula la diferenciación de los adipocitos
Andrógenos	Controla el desarrollo de tejido adiposo (señales antiadipogénicas)
	Modula la expresión del gen <i>ob</i>
Estrógenos	Controla el desarrollo de tejido adiposo (señales proadipogénicas)
	Modula la expresión del gen <i>ob</i>
Progesterona	Regula el metabolismo de la grasa y su distribución
Vitamina D	Inhibe la diferenciación de los adipocitos
<i>Receptores de lipoproteínas</i>	
VLDL	Internaliza partículas de las VLDL
	Estimula la acumulación de lípidos
LDL	Estimula la captación de colesterol
HDL	Induce la captación y el metabolismo de HDL

^{1/} Adaptado de Frühberk *et al.* 2001.

^{2/} GH, hormona de crecimiento; TSH, hormona estimuladora de tiroides, CCK-B, colecistoinina-B; GIP, péptido inhibidor gástrico; GLP-1, péptido semejante a glucagon-1; NPY-Y1, neuropéptido Y-Y₁; EGF, PDGF, FGF, factores de crecimiento epidermal, derivado de plaquetas, y de fibroblastos, respectivamente; PPAR γ , receptor activador-proliferador de peroxisomas- γ ; RAR y RXR, receptores de ácido retinoico; T₃, triiodotironina; VLDL, LDL, y HDL, lipoproteínas de muy baja densidad, baja densidad y alta densidad, respectivamente.

2.2. Recambio de Ácidos Grasos en el Tejido Adiposo

El recambio de ácidos grasos en el tejido adiposo ha sido demostrado utilizando compuestos marcados, incluso se señala que éste también se realiza en aquellos individuos que se encuentran en equilibrio energético (Fawcett 1995).

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 (Emery 1979).

Las grasas contenidas en el alimento son hidrolizadas a nivel de duodeno a ácidos grasos y glicerol por la acción de la lipasa pancreática. Estos productos se incorporan en las células epiteliales del intestino delgado, donde se esterifican de nuevo en triglicéridos y se empaquetan junto con el colesterol de la dieta y proteínas específicas para formar agregados lipoproteicos denominados quilomicrones. La parte proteica de los quilomicrones actúa como punto de reconocimiento específico por parte de los receptores de las membranas celulares. Los quilomicrones que contienen apoproteína C-II (apoC-II) pasan del enterocito al sistema linfático, posteriormente vía sanguínea son transportados al tejido muscular y al tejido adiposo (Lehninger 1993). En el endotelio capilar de ambos tejidos se encuentra la enzima lipoproteína lipasa (LPL) que es activada por la apoC-II de los quilomicrones. La LPL hidroliza los triglicéridos en ácidos grasos y glicerol, los ácidos grasos se incorporan al miocito donde son oxidados para generar energía o bien al adipocito donde son reesterificados con glicerol para quedar almacenados en forma de triglicéridos (Lehninger 1993). El remanente de los quilomicrones, de los que se les ha retirado la mayor parte de triglicéridos, llegan a hígado vía sanguínea y son introducidos por endocitosis. Byers y Schelling (1988) señalan que cuando la dieta es rica en grasas, los triglicéridos que llegan de esta forma al hígado son empaquetados con apoproteínas específicas para formar lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL, por sus siglas en inglés). Las VLDL son transportadas por la sangre desde el

RECIBIDA CON
FALLA DE ORIGEN

hígado hasta el músculo y el tejido adiposo en donde la LPL es activada por la apoC-II, liberando los ácidos grasos contenidos en las VLDL (Lehninger 1993).

La síntesis *de novo* de ácidos grasos en los rumiantes difiere de los no rumiantes en que el acetato, no la glucosa, es el principal precursor para la biosíntesis de ácidos grasos (Smith y Crouse 1984). El principal sitio de lipogénesis en rumiantes es el tejido adiposo y, durante la lactación, la glándula mamaria (Byers y Schelling 1988). No obstante, se ha demostrado que puede ocurrir la síntesis *de novo* de ácidos grasos a partir de lactato *in vitro* e *in vivo* en tejido adiposo de novillos alimentados con dietas altas en energía (Byers y Schelling 1988).

Una de las funciones del tejido adiposo blanco es almacenar triglicéridos durante los periodos de consumo de energía en exceso. La principal fuente de almacenamiento de energía en los mamíferos son los triglicéridos, y el tejido adiposo es el principal sitio para este almacenaje. Cuando las necesidades energéticas corporales no son cubiertas por las moléculas energéticas circulantes o por los carbohidratos almacenados, los lípidos son movilizados del tejido adiposo a través de los procesos de lipólisis, liberando a la circulación glicerol y ácidos grasos para ser oxidados en otros tejidos (Emery 1979; Bartness y Bamshad 1998; Gregoire *et al.* 1998; Trayhurn y Beattie 2001).

Los adipocitos son células muy sensibles a los diferentes estímulos hormonales y nerviosos. Bartness y Bamshad (1998) mencionan que además de la epinefrina (de la médula adrenal) y del glucagon; el sistema nervioso simpático (SNS) está involucrado en la regulación de la lipólisis, el cual puede estimular vía neural la liberación de catecolaminas de las terminaciones nerviosas del SNS en el tejido adiposo, no obstante, la movilización de lípidos es controlada principalmente vía catecolaminas que se encuentran en sangre. Cuando las hormonas como la epinefrina y el glucagon son secretadas en respuestas a necesidades energéticas metabólicas, éstas desencadenan una cascada de señalización que resulta en la liberación de ácidos grasos para que sean utilizados como fuente de energía (Lehninger 1993). Estas hormonas actúan a través de receptores específicos en la membrana plasmática de los adipocitos y desencadenan la activación de la

adenilato ciclasa en la membrana plasmática vía proteínas G, produciéndose un aumento en la concentración intracelular de adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPc). Las proteínas cinasas dependiente de AMPc se activan y se fosforilan, para posteriormente activar por fosforilación a la lipasa sensible a hormona (HSL, por sus siglas en inglés), esta enzima intracelular una vez activada cataliza la hidrólisis de los enlaces éster de los triglicéridos contenidos en la gota de grasa (Holm *et al.* 2000). Los ácidos grasos así liberados difunden desde el adipocito al torrente circulatorio, donde se unen mediante enlaces no covalentes a la albúmina sérica por medio de la cual son transportados a tejidos como el músculo esquelético, el corazón, la glándula mamaria en lactación y la corteza renal, entre otros. En los capilares de estos tejidos se disocian de la albúmina y difunden al citosol de la célula en la cual son oxidados para generar energía (Lehninger 1993). En situaciones fisiológicas, como la gestación, la lactación, la hibernación y el ayuno, hay una regulación recíproca entre las enzimas HSL y LPL en los depósitos de tejido adiposo (Holm *et al.* 2000). En el Cuadro 3, se reportan algunos datos de las tasas de recambio de ácidos grasos en tres especies de rumiantes bajo diferentes situaciones fisiológicas (Emery 1979).

Cuadro 3. Tasas de recambio de ácidos grasos (AG) en el tejido adiposo de rumiantes¹

Condiciones	Estimado de la poza de AG (moles)	Flujo de AG (moles/día)	Tiempo de recambio (días)
Vaca, 550 kg produciendo 30 kg de leche con 3.7% d grasa	164.8	4.9	34
Cabra, 64.5 kg ayunada por 3 días	38.7	1.5	27
Cabra, 53.7 kg lactando	24.1	1.2	20
Cabra, 54 kg lactando y ayunada por 3 días	16.2	2.3	7
Borrega, 59 kg no gestante	35.4	0.4	88
Borrega, 59 kg no gestante, ayunada por 4 días	35.4	0.8	44
Borrega, 76 kg gestante, ayunada por 4 días	36.4	1.5	24
Borrega, 58 kg lactando 1-15 días	34.4	1.6	22
Novillo, 300 kg	-	-	< 52

^{1/} Adaptado de Emery 1979.

^{1/} Los estimados de la poza de los ácidos grasos contenidos en los depósitos en tejido adiposo y el flujo de los ácidos grasos fueron basados en una revisión de literatura.

La liberación de ácidos grasos del adipocito en estado de ayuno es el resultado neto de la lipólisis por la HSL y la reesterificación *in situ* de algunos ácidos grasos liberados, lo anterior obedece a que la actividad de la LPL en tejido adiposo disminuye durante el ayuno, mientras que la actividad de la HSL incrementa al doble durante este estado metabólico (Holm *et al.* 2000). La concentración de ácidos grasos en plasma incrementa durante el ayuno hasta alcanzar la meseta (4-8 días), este efecto probablemente debido a mecanismos de retroalimentación antilipolítica (Chilliar 1993; Chilliar *et al.* 2000).

La movilización de ácidos grasos al inicio de la lactación es variable, dependiendo del balance de energía, de la producción diaria de leche, de la concentración de grasa en leche, del nivel del consumo de materia seca, entre otros. Es muy común que en las primeras seis semanas de la lactación, exista una pérdida del 30 al 40% de los lípidos corporales (3-6 kg en borregas y cabras, y de 20-50 kg en vacas lecheras); la movilización de ácidos grasos puede aumentar al 80% cuando los animales en lactación son ayunados (Chilliar *et al.* 2000). En contraste a las borregas no lactantes, las borregas en lactación son capaces de movilizar mayor cantidad de lípidos corporales. La diferencia entre éstas es debida a la gran demanda de los ácidos grasos por la glándula mamaria de las borregas en lactación (Chilliar *et al.* 2000). Holm *et al.* (2000) mencionan que durante la lactación, la expresión de la HSL retorna a sus niveles control, desencadenando la lipólisis, mientras que la actividad de la LPL permanece reducida (Holm *et al.* 2000). Por otra parte, diversos estudios han demostrado que durante la fase anabólica de la gestación la tasa de movilización de ácidos grasos permanece disminuida, debido a que la relación mRNA de HSL-LPL y la actividad es baja, mientras que esta relación se incrementa durante la fase catabólica (Holm *et al.* 2000).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2.3 Metabolismo de los Carotenoides y Concentración de β -Caroteno en el Tejido Adiposo de Bovinos

Los carotenoides son pigmentos liposolubles que colorean de amarillo a rojo, esta característica cromófora se debe a la presencia de una serie de dobles enlaces conjugados. En general los carotenoides están formados por 40 carbonos, sin embargo, existen carotenoides de C30, C45 y C50, producidos por algunas bacterias no fotosintéticas. Esta gran familia de pigmentos se clasifican de acuerdo a su estructura química en dos grupos principales: carotenos hidrocarbonados constituidos por carbono e hidrógeno como el licopeno, α , β , γ carotenos, y por los oxicarotenoides o xantofilas, constituidos por carbono, hidrógeno y oxígeno (Groos 1991; Tee 1992). Solo algunos microorganismos fotosintéticos y las plantas superiores pueden sintetizar carotenoides; la presencia de estos compuestos en los tejidos de los animales depende de estas dos fuentes. Los animales solo pueden modificar la estructura de estos compuestos durante su metabolismo y acumulación en los tejidos (Tee 1992).

Los bovinos alimentados bajo condiciones de pastoreo consumen grandes cantidades de carotenoides ya que éstos son constituyentes normales de los forrajes verdes. No todos los carotenoides ingeridos son convertidos en vitamina A; parte de ellos se absorben intactos y se depositan principalmente en el tejido adiposo, causando la pigmentación amarillenta de las canales. El β -caroteno y la luteína son los principales carotenoides responsables de dicha pigmentación (Yang *et al.* 1992).

El proceso de degradación ruminal de los carotenoides es insignificante. Van Soest (1994), señala que, aunque pueden ser atacados por las bacterias anaeróbicas e hidrogenarse, el sistema de dobles enlaces conjugados (posición *trans*) los hace más resistentes a la hidrogenación, comparados con otros compuestos insaturados no conjugados, lo que permite que prácticamente lleguen intactos al intestino delgado. Van Soest (1994) indica también que los carotenoides tienen una digestibilidad del 0.1% a nivel ruminal (en forma de una hidrogenación destructiva), siendo muy poco utilizados en esta parte del tracto

digestivo. Estudios recientes, en bovinos y cabras, corroboran lo anterior. Mora *et al.* (1999) señalan que el proceso de la degradación de los carotenoides a nivel ruminal es bajo, tanto en bovinos como en caprinos, de tal modo que grandes cantidades de estos compuestos pasan intactos al intestino delgado. Por otro lado, se ha observado que en los bovinos la digestibilidad fecal de los carotenoides suplementados en la dieta es alta (hasta el 90%); sin embargo, cuando son consumidos de manera natural en los forrajes su digestibilidad es alrededor del 60% (Mora 1998).

Debido a su liposolubilidad, los carotenoides sufren un proceso de absorción similar al de los lípidos. A nivel de intestino delgado los carotenoides contenidos en el alimento son digeridos por acción enzimática y junto con la vitamina A son disueltos en glóbulos grasos que pasan a través del lumen del duodeno. En el intestino los lípidos se encuentran con las sales biliares y las enzimas pancreáticas, las cuales liberan diversas moléculas como producto de la digestión lipídica. Los ésteres de vitamina A son hidrolizados inmediatamente. Estos productos de la digestión interactúan con las sales biliares y el colesterol formando micelas mixtas, en las cuales se solubiliza la vitamina A y los carotenoides. Las micelas difunden por la cubierta glicoproteica de la membrana celular de la mucosa intestinal. Los componentes de las micelas, excepto las sales biliares, penetran individualmente a la fase lipídica de la membrana de las células de la mucosa intestinal (Tee 1992).

Cuando el β -caroteno es absorbido por las células de la mucosa intestinal, es degradado por acción de la enzima β -caroteno 15,15'-oxigenasa a dos moléculas de retinaldehído que posteriormente es reducido a retinol. Cerca del 75% del retinol que cruza el epitelio intestinal es esterificado con ácidos grasos de cadena larga, comúnmente en forma de ácido palmítico o ácido esteárico, éstos son incorporados juntos con otros lípidos y apoproteínas a los quilomicrones y lipoproteínas. La vitamina A (el 95% en forma de palmitato de retinilo) es almacenada en hígado y representa aproximadamente el 90% del total de las reservas corporales de esta vitamina (Tee 1992; Parker 1996).

Una porción de los carotenoides absorbidos no son metabolizados en la mucosa intestinal, sino que son incorporados en las lipoproteínas de baja densidad (LDL, por sus siglas en inglés) en el humano y el cerdo (Bendich y Olso 1989; Tee 1992; Pollack *et al.* 1994); en el caso de los bovinos y en el hurón (Pollack *et al.* 1994) los carotenoides se asocian a lipoproteínas de alta densidad (HDL, por sus siglas en inglés) pasando a la sangre como tal, vía linfática. Esta es la razón por la cual estos compuestos son constituyentes normales de la sangre del humano, de los bovinos, de los equinos, de los hurones, de los cerdos, de los peces, de las aves y de algunos crustáceos. Por otra parte, la concentración de carotenoides en sangre y en los tejidos está en función del consumo diario de estos compuestos (Bendich y Olso 1989). El β -caroteno como otras vitaminas liposolubles, es secretado en la leche. En vacas, la secreción diaria de β -caroteno es limitada en cantidad y difiere de acuerdo a la etapa de lactación (Krogh *et al.* 1999).

Se ha observado que a diferencia de los bovinos (rumiantes que pigmentan la grasa), los caprinos no pigmentan el tejido adiposo. En un estudio se observó que la actividad intestinal de la enzima β -caroteno 15,15'-oxigenasa es cinco veces menor en los bovinos, comparada con la observada en los caprinos, lo que sugiere que esta baja actividad de la enzima es responsable de que en los bovinos se absorban grandes cantidades de β -caroteno y se lleguen a depositar en el tejido adiposo, lo que le produce la coloración amarillenta (Mora *et al.* 2000). Diversos trabajos muestran una gran variabilidad en la deposición de β -caroteno en el tejido adiposo de bovinos (Cuadro 4). Datos en la literatura muestran valores que van desde 0.44 hasta 111.6 μg de β -caroteno por g de tejido adiposo (Yang *et al.* 1992; Yang *et al.* 1992; Strachan *et al.* 1993; Mora *et al.* 1998). Bendich y Olson (1989) mencionan que la concentración de carotenoides en sangre y en tejidos está en función de su consumo diario, del periodo de consumo, de la eficiencia en su absorción y de la tasa de gasto de estos compuestos. Por otra parte, Zhou *et al.* (1993) y Strachan *et al.* (1993) mencionan que existen correlaciones significativas entre la concentración de carotenoides y la coloración

del tejido adiposo subcutáneo que van desde 0.53 hasta 0.85. Por otro lado, Knight *et al.* (1993) encontraron que la intensidad del color de la grasa está altamente correlacionada ($r=0.92$) con el contenido de carotenoides y que la concentración de β -caroteno en el plasma está correlacionada con el color de la grasa ($r=0.67$).

Cuadro 4. Concentración de β -caroteno en el tejido adiposo (TA) de bovinos bajo diferentes condiciones

Animales	Condiciones	$\mu\text{g/g}$ de TA	Referencia
Novillos Hereford	Finalizados en pastoreo en pradera de zacate buffel	0.81	Yang <i>et al.</i> 1992
Toretos Brahman de 3 años de edad	Finalizados en pastoreo en pradera de zacate buffel	1.08	Yang <i>et al.</i> 1993
Novillos Brahman con peso promedio de 424 kg	Finalizados en pastoreo en pradera de zacate buffel	0.44	Strachan <i>et al.</i> 1993
Vaquillas Angus con peso vivo promedio de 334.1 kg	Suplementadas durante 30 días con 352 mg de β -caroteno por kg de MS con un producto comercial (Lucarotin®)	6.97	Mora <i>et al.</i> 2000
Toretos de las razas Suizo Pardo, Charolais, Brahman y sus cruza	Bovinos finalizados en pastoreo en trópico húmedo del sureste de México	En primavera 37 y en verano 111.6	Barrón <i>et al.</i> 2003
Toretos Holstein con peso promedio de 345.6 kg	Suplementados durante 30 días con 5.5, 44 o 352 mg de β -caroteno (Lucarotin®) por kg de MS	0.15, 0.50, 3.70 respectivamente	Mora <i>et al.</i> 2001

Por otra parte, se ha observado que pueden existir factores genéticos asociados con el color amarillento de la grasa. Barton y Pleasants (1993) evaluaron el color de la grasa subcutánea de varias razas bovinas durante cinco años consecutivos (Cuadro 5). Ellos concluyen, que dentro de las razas de carne más del 60% de las canales las clasifican como blancas; la raza Angus mostró más amarillamiento en la grasa, ya que posee un 40% con este problema. De las razas productoras de leche la Holstein Friesian y Jersey mostraron mayor porcentaje de canales amarillas.

Cuadro 5. Factores genéticos asociados con el color de la grasa¹

RAZA	COLOR DE LA GRASA (% DE CANALES)		
	1	2	3
Shorthorn carne	73	17	3
Galloway	66	24	10
Angus	60	25	15
Ayrshire	47	37	16
Holstein Friesian	17	40	43
Shorthorn lechero	7	38	55
Jersey	7	14	79

¹ Barton y Pleasants (1993). * Calificación: 1= muy blanca 5= muy amarilla

Forrest (1981) menciona que el mantener a los bovinos en periodos de 56 a 120 días con una alimentación basada en concentrados y forrajes secos disminuye el color amarillento de la grasa a un nivel aceptable para el mercado canadiense. En este trabajo se encontró que después de 56 días de estabular a los animales, éstos mostraron una disminución en la concentración de β -caroteno en la grasa de 0.28 a 0.17 $\mu\text{g/g}$.

Hasta el momento se desconoce si la disminución de la coloración amarillenta de la grasa de los bovinos finalizados con dietas basadas en concentrados y forrajes secos se debe a la movilización y oxidación de los carotenoides depositados en el tejido graso, a la dilución de la pigmentación por el incremento de grasa en el tejido adiposo durante la engorda o a ambos (Strachan *et al.* 1993).

Debido a que el β -caroteno es un compuesto de naturaleza lipídica, existe la posibilidad de que éste sea movilizado del adipocito durante la lipólisis, liberándose a circulación sanguínea los ácidos grasos, el glicerol y el β -caroteno. En el presente trabajo se pretende conocer el recambio de β -caroteno en el tejido adiposo del bovino utilizando para ello técnicas de incubación *in vitro*.

3. Objetivo General

Evaluar el recambio de β -caroteno en el tejido adiposo de bovinos *in vitro*.

3.1 Objetivos Específicos

1. Establecer la concentración de β -caroteno en el medio de cultivo y las horas de incubación adecuadas para evaluar su incorporación en explantes de tejido adiposo de bovinos.
2. Cuantificar la incorporación y la movilización de β -caroteno en el tejido adiposo del bovino *in vitro*.
3. Evaluar el efecto de la adición de insulina y de epinefrina en el medio de cultivo, sobre el recambio de β -caroteno y de triglicéridos en explantes de tejido adiposo de bovino.
4. Conocer la expresión del gen que codifica la enzima β -caroteno 15,15'-oxigenasa y la actividad de ésta en el tejido adiposo de bovinos.

4. Hipótesis

En el tejido adiposo del bovino el recambio de β -caroteno está relacionado con el de los triglicéridos y es afectado por la insulina y la epinefrina.

5. Incorporación y movilización de β -Caroteno en Tejido Adiposo de Bovino *in vitro* *

E. Arias ¹, A. González ², A. Shimada ², A. Varela ³ y O. Mora ²

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

² Laboratorio de Rumiología y Metabolismo Nutricional (RuMeN). Coordinación General de Estudios de Posgrado e Investigación. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM.

³ Instituto de Neurobiología, UNAM.

Resumen

El depósito más importante de β -caroteno (β C) en bovinos, es el tejido adiposo. Se desconocen los factores que influyen en la incorporación y movilización de éste. Con el objeto de conocer algunos de esos factores, se realizaron dos experimentos. En el experimento 1, explantes de tejido adiposo de tres bovinos fueron incubados con diferentes concentraciones (0, 1, 5 y 20 μ M) de β C. La actividad de la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH) fue cuantificada como indicadora de la viabilidad de células adiposas. El β C fue determinado por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). La mejor incorporación de β C fue obtenida con la concentración 20 μ M y la actividad de G3PDH mostraron un efecto cuadrático ($P < 0.05$) sobre el tiempo de incubación. En el segundo experimento, explantes de tejido adiposo de seis bovinos fueron incubados. Se evaluó el efecto de la insulina y de la epinefrina sobre la incorporación y movilización de β C y de triglicéridos. La incorporación de triglicéridos y de β C en los explantes fue mayor en presencia de insulina, por el contrario, la epinefrina movilizó el β C y los triglicéridos. Se encontró relación en la movilización de triglicéridos: β C de $1:6 \times 10^{-4}$ y $1:28 \times 10^{-4}$ en presencia de 0 y 20 μ M de β C, respectivamente. Los resultados de este estudio sugieren que la movilización de β C del tejido adiposo de los bovinos es dependiente de la concentración intracelular y que su movilización es similar a la de los triglicéridos.

Palabras clave: Recambio de β -caroteno, insulina, epinefrina, tejido adiposo, bovinos.

* Financiado por Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Proyecto: J31295-B

* Para su envío a British Journal of Nutrition.

Introducción

Los forrajes verdes son fuentes ricas de carotenoides, principalmente β -caroteno (β C), por lo cual los bovinos en pastoreo pueden consumir grandes cantidades de este compuesto en la dieta. No todo el β C ingerido y absorbido es transformado en vitamina A, el excedente pasa a circulación sanguínea y es depositado fundamentalmente en tejido adiposo; el cúmulo de este compuesto da como resultado el amarillamiento de la grasa [36]. La intensidad del color de la grasa está correlacionada positivamente con su contenido de carotenoides en tejido adiposo y con la concentración de β C en el plasma de bovinos [17]. A pesar de que la coloración de la grasa no afecta el sabor ni el valor nutrimental de la carne [3, 21, 33], la presencia de estos pigmentos en la grasa ocasiona un castigo en su precio, ocasionado por el rechazo del producto por parte del consumidor [42]. En México, los ingresos del ganadero se reducen del 10 al 15% del valor de la canal cuando es clasificada como amarilla. Se estimó que para el año 1999, 54 mil toneladas de carne de bovinos en canal presentaron este problema [1].

Bovinos que estuvieron en pastoreo y posteriormente fueron estabulados y alimentados con dietas basadas en granos y forrajes secos durante algunos meses previos al sacrificio, mostraron una disminución en la concentración de β C en la grasa de 0.28 a 0.17 μ g/g [14]. Sin embargo, se desconoce si el descenso de la coloración amarillenta de la grasa se debe a la movilización y oxidación de los carotenoides depositados en tejido graso, a la dilución de la pigmentación por el incremento de grasa en el tejido adiposo durante la engorda o a ambos [36].

Los depósitos de β C en el tejido adiposo de bovino pueden estar en constante recambio, esto podría ser semejante a la movilización de ácidos grasos. Para dilucidar lo anterior, es necesario conocer los factores que influyen la incorporación y movilización de este compuesto en el tejido de estudio. En el presente trabajo se realizaron dos experimentos, el primero con el objeto de determinar la concentración adecuada de adición de β C al medio de cultivo que

nos permita cuantificar su incorporación en explantes de tejido adiposo, el segundo con el objeto de conocer el efecto de la insulina y de la epinefrina sobre la incorporación o movilización de β C en el tejido adiposo de bovino, mediante el uso de sistemas de incubación *in vitro* de explantes de tejido adiposo.

TFESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Material y Métodos

Experimento 1

Animales y Muestras

Se utilizaron tres bovinos machos finalizados, encastados de razas europeas, aproximadamente de la misma edad y peso; los animales fueron sacrificados en el rastro Municipal de Querétaro por insensibilización con pistola de émbolo oculto seguido por degüello. Todos los procedimientos fueron de acuerdo a las leyes de protección a los animales del Estado de Querétaro [12]. Dentro de los primeros 15 min después del sacrificio, se recolectó la muestra (15 g aproximadamente) de tejido adiposo perirrenal de cada animal. Para trasladar las muestras al laboratorio, éstas se colocaron en una mezcla 1:1 de medio de cultivo de Eagle modificado por Dulbecco: Mezcla de nutrientes F-12 (D-MEM:F-12) adicionado con 100 UI/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomycinina.

Condiciones en la incubación de los explantes

En el laboratorio, el tejido fue lavado tres veces con solución salina amortiguada con fosfatos (PBS, 2.68 mM de KCl, 0.137 M de NaCl, 4.3 mM de NaHPO₄, 1.47 mM de KH₂PO₄) adicionado con antibióticos (100 UI/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomycinina); el tejido se fragmentó en explantes de 100 ±10 mg [7]. Todas las incubaciones se realizaron en placas de 24 pozos (15 mm de diámetro), que contuvieron 1.0 mL/pozo de medio de cultivo D-MEM/F-12 (1:1 vol/vol) adicionado con 10 µg/mL de transferrina, 50 µM de β-mercaptoetanol, 100 µM de ascorbato, 100 UI/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomycinina [4]. Los explantes se colocaron dentro de los insertos (Nunc 10 mm de diámetro, con membrana de policarbonato de 8.0 µm) previamente colocados en los pozos de la placa (Figura 1). Las incubaciones se realizaron dentro de un tiempo no mayor de 60 min después del sacrificio de los animales [13], a 37°C en una atmósfera de 95% de O₂ y 5% de CO₂ [31].

Tratamientos

El medio de cultivo fue adicionado con diferentes concentraciones de β C (0, 1, 5 ó 20 μ M). Las incubaciones se realizaron por duplicado para cada uno de los tratamientos. Las concentraciones de β C empleados en este trabajo se basaron en los reportados por Daring *et al* [10,11], los cuales recomiendan emplear de 1 a 5 μ M de β C para estudiar su incorporación en algunas líneas celulares. La concentración 20 μ M aquí utilizada fue basada en lo encontrado por Knight *et al* [17], ellos reportan esta concentración en plasma de novillos en pastoreo.

Adición de β C al medio de cultivo

En viales de color ámbar se adicionaron de manera independiente cada una de las concentraciones (0, 1, 5 ó 20 μ M) de β C y una concentración igual de α -tocoferol (como antioxidante), previamente disueltos en hexano y etanol, respectivamente. Ambos compuestos una vez mezclados fueron evaporados a sequedad en una atmósfera de N_2 , el residuo obtenido fue disuelto en 1% de tetrahidrofurano. La adición del β C al medio de cultivo se efectuó al momento de realizarse las incubaciones [10]. Todas las placas de cultivo fueron cubiertas para evitar la oxidación de β C por la luz.

Extracción y análisis de β C del medio de cultivo y de los explantes

El β C fue extraído del medio de cultivo y de los explantes a las 0, 5, 10, 15, 20 y 25 h de incubación de acuerdo a lo recomendado por Barua y Furr [2]. Para este propósito, el medio de cultivo (500 μ L) y los explantes se retiraron de la placa de incubación. Los explantes se lavaron tres veces con PBS para eliminar los residuos de β C suplementado en el medio de cultivo. De manera individual, tanto a las muestras del medio como a las de los explantes se les adicionó etanol (200 μ L) y acetato de etilo (500 μ L). La mezcla fue agitada y centrifugada a 16,770 x g durante 30 s. El sobrenadante fue obtenido y depositado en un vial, el cual se

colocó sobre hielo para su conservación. Se realizaron dos extracciones adicionales, una con acetato de etilo (500 μL) y la otra con hexano (500 μL). Las tres extracciones realizadas a cada una de las muestras fueron mezcladas y evaporadas a sequedad con N_2 [2]. El residuo obtenido después de evaporar las muestras fue disuelto en 300 μL de hexano, las muestras obtenidas de los explantes se filtraron (filtro 13 mm de diámetro, 0.45 μm). Veinte microlitros de cada muestra fueron analizados en HPLC (cromatografía líquida de alta resolución). El βC fue detectado en una columna C18 Prodigy 5 μ ODS (2) 150 x 4.60 mm, como fase móvil se utilizó acetonitrilo (75%), tetrahidrofurano (20%) y agua (5%) con un flujo 1.0 mL/min. El βC se cuantificó comparando el área bajo la curva de la muestra con un estándar. Para establecer el estándar se utilizaron diferentes cantidades de βC purificado (de 0.5 a 20 μM disuelto en hexano). El βC fue detectado a una longitud de onda de 445 nm con un tiempo de retención de 21.8 min [27].

Cuantificación de la incorporación de βC *in vitro*

La incorporación de βC fue calculada como la concentración de este compuesto que ingresa en los explantes. Para ello, a la concentración de βC determinada en los explantes a las 0, 5, 10, 15, 20 y 25 h de incubación se le restó la concentración inicial (cero horas) de este compuesto.

$$\text{Incorporación} = [\beta\text{C}]_{0, 5, 10, 15, 20 \text{ y } 25 \text{ h}} - [\beta\text{C}]_{0 \text{ h}}$$

Actividad de la enzima glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH, E.C.1.1.1.8)

La actividad de G3PDH es sensitiva y específica para los adipocitos, y se utilizó como indicadora cuantitativa de la viabilidad de las células adiposas contenidas en los explantes incubados [19]. El ensayo de G3PDH en los explantes de tejido adiposo fue determinada a las 0, 5, 10, 15, 20, 25, 48 y 120 h de incubación y se evaluó en incubaciones paralelas (simultáneas) a las utilizadas para cuantificar la

incorporación de β C. En cada uno de los muestreos, los explantes se lavaron dos veces con PBS para retirar el excedente del medio de cultivo. Estos fueron homogeneizados en 1.5 mL de una solución amortiguadora de extracción (50 mM de tris/HCL pH 7.4, 1 mM de EDTA, 1 mM de β -mercaptoetanol y 0.5% (v/v) de Triton X-100). Los homogeneizados tisulares se centrifugaron a 12000 x g, durante 5 minutos a 4°C y los sobrenadantes (extracto citosólico) se conservaron a -70°C para su posterior ensayo enzimático. Se determinó la concentración proteica del sobrenadante por el método de Bradford [5], empleando la albúmina sérica de bovino como estándar.

La actividad de la enzima G3PDH fue cuantificada por espectrofotometría, determinando la desaparición de NADH durante la reducción de DHAP catalizada por G3PDH de acuerdo a Wise y Green [39] modificada por Castro-Muñozledo *et al* [6]. Para medir la actividad enzimática, se utilizó un mililitro de la mezcla de reacción conteniendo 100 mM de trietanolamina/HCl pH 7.5, 2.5 mM de EDTA, 0.12 mM de NADH, 0.2 mM de DHAP, 0.1 mM de β -mercaptoetanol y 5 μ g de proteína del extracto citosólico. La mezcla de reacción fue atemperada a 37°C por dos minutos antes de adicionar el sustrato (DHAP). El cambio en la absorbancia fue registrado a 340 nm (espectrofotómetro Hewlett Packard 8453) a los 5 minutos a partir de que se adicionó el sustrato. La actividad enzimática se expresó en nM de NAD/mg de proteína/min.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Análisis estadístico

Los resultados de la incorporación de βC (μM) y de la actividad de G3PDH (nM de NAD/mg/min) de los tres animales se sometieron a un análisis de covarianza, utilizando el paquete estadístico SAS [35]. El modelo general empleado fue:

$$Y_{ij} = \beta_0 + \text{nivel}_i + \beta_{1i} (\text{hora}_j) + \beta_{2i} (\text{hora}_j^2) + \beta_{3i} (\text{hora}_j^3) + \varepsilon_{ij}$$

donde:

Y_{ij} = Es la variable de respuesta (μM y nM de NAD/mg/min del i-ésimo nivel de βC , con el j-ésimo coeficiente de regresión);

β_0 = Es el intercepto sobre el eje de la y;

nivel_i = Efecto del i-ésimo nivel de βC (0, 1, 5 y 20 μM);

$\beta_{1i} (\text{hora}_j)$ = Es el coeficiente de regresión lineal del tiempo con el i-ésimo nivel de βC ;

$\beta_{2i} (\text{hora}_j^2)$ = Es el coeficiente de regresión cuadrático del tiempo con el i-ésimo nivel de βC ;

$\beta_{3i} (\text{hora}_j^3)$ = Es el coeficiente de regresión cúbico del tiempo con el i-ésimo nivel de βC ;

ε_{ij} = Es el error experimental;

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Experimento 2

Seis bovinos machos finalizados encastados de razas europeas, fueron usados como fuente de tejido adiposo para este estudio, se buscó que el tejido adiposo de estos animales fuera de color blanco. Una alícuota del tejido adiposo perirrenal de cada animal se conservó a -70°C para cuantificar la concentración de DNA genómico. En este estudio se realizaron algunas metodologías ya descritas en el anterior experimento, éstas son: los procedimientos de sacrificio de los animales, la recolección de las muestras, de las condiciones de incubación, de la adición de βC al medio de cultivo, de la determinación de la actividad de la G3PDH, de extracción y análisis de βC del medio de cultivo y de los explantes. Se realizaron incubaciones paralelas (simultáneas) de explantes de tejido adiposo de los animales de estudio para analizar el βC , retinal, triglicéridos y la actividad de la G3PDH.

Tratamientos

El medio de cultivo fue suplementado con dos concentraciones de βC (0 ó $20\ \mu\text{M}$). Para estimular actividades lipogénicas o lipolíticas, fue adicionado con $10\ \mu\text{g}/\text{mL}$ de insulina [40] o con $1\ \mu\text{M}$ de epinefrina, [23], respectivamente, mas un control, para cada una de las dos concentraciones de βC utilizadas. Las incubaciones (0, 5, 10, 15 y 20 h) se realizaron por duplicado para cada uno de los tratamientos.

Cuadro 1. Tratamientos

	βC (μM)	
	0	20
Control (C)	0/C	20/C
Insulina (I)	0/I	20/I
Epinefrina (E)	0/E	20/E

0/C = $0\ \mu\text{M}$ βC , control

0/I = $0\ \mu\text{M}$ βC , con insulina

0/E = $0\ \mu\text{M}$ βC , con epinefrina

20/C = $20\ \mu\text{M}$ βC , control

20/I = $20\ \mu\text{M}$ βC , con insulina

20/E = $20\ \mu\text{M}$ βC , con epinefrina

Medición de recambio de β C

El recambio de β C fue determinado basado en la cantidad de incorporación y de movilización de este compuesto en los explantes de tejido adiposo [34]

Cuantificación de la incorporación de β C e incremento de triglicéridos (TG)

La incorporación fue estimada por la concentración que ingresó (β C) y que aumentó (TG) en los explantes. Para ello, a la concentración de β C y de TG determinada en los explantes a las 0, 5, 10, 15 y 20 h de incubación se le restó la concentración inicial (cero horas) de ambos compuestos. En el presente estudio la incorporación β C y TG se normalizó por μ g de DNA genómico (μ M/ μ g de DNA).

$$\text{Incorporación} = [\beta\text{C y TG}]_{0, 5, 10, 15 \text{ y } 20 \text{ h}} - [\beta\text{C y TG}]_{0 \text{ h}}$$

Cuantificación de la movilización de β C y de TG

La movilización fue determinada por diferencia en la concentración de β C y de triglicéridos entre el tratamiento control y el de epinefrina en los explantes a los diferentes tiempos de incubación (0, 5, 10, 15 y 20 h). La movilización de ambos compuestos fue normalizada por μ g de DNA genómico (μ M/ μ g de DNA).

$$\text{Movilización} = [\beta\text{C y TG}]_{0, 5, 10, 15 \text{ y } 20 \text{ h control}} - [\beta\text{C y TG}]_{0, 5, 10, 15 \text{ y } 20 \text{ h epinefrina}}$$

La tasa de movilización de β C y de triglicéridos se calculó a partir del coeficiente de regresión lineal de las ecuaciones correspondientes (μ M/h).

Determinación de DNA genómico en tejido adiposo

Una muestra por duplicado de tejido adiposo de cada animal fue analizada para cuantificar la concentración de DNA genómico utilizando para ello Genomic Prep Cells and Tissue DNA Isolation Kit (Amersham Pharmacia, USA), ésto como indicador del número de células en los explantes.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Extracción y determinación de triglicéridos

Los explantes se lavaron tres veces con PBS. Los lípidos se extrajeron utilizando 0.6 mL de cloroformo/metanol (1:2 v/v) con 0.2 mL de NaCl (1 M). Después de 10 min de extracción se adicionó 0.2 mL de cloroformo y 0.2 mL de NaCl (1 M), las fases se separaron por centrifugación (1100 x g, 4 °C, 10 min). La porción acuosa fue eliminada y el sobrenadante se conservó en otro vial. Al remanente interfases se le hizo otra extracción adicional con 0.5 mL de cloroformo/metanol (2:1, v/v) por 5 min y se filtró (13 mm de diámetro, 0.45 µm) [38]. Se mezclaron las dos extracciones y se evaporaron con N₂. Los lípidos se resuspendieron en acetona y la determinación enzimática de triglicéridos se realizó usando SERA-PAK PLUS (Bayer, Francia), bajo el siguiente principio: la lipoproteína lipasa hidroliza los triglicéridos, el glicerol liberado es convertido por la acción de la glicerol cinasa en glicerol-3-fosfato, éste se oxida por la glicerol fosfato oxidasa en fosfato de dihidroxiacetona y en peróxido de hidrógeno. En presencia de peroxidasa, el peróxido de hidrógeno oxida el cromógeno en un compuesto de color rojo. Este último se evaluó por espectrofotometría.

Extracción de RNA y RT-PCR

La expresión del gen de la enzima β-caroteno 15,15'-oxigenasa (E.C. 1.13.11.21) en el tejido adiposo de bovino no ha sido reportada. Para probar ésta posibilidad, se realizó una transcripción reversa (RT) para obtener un cDNA correspondiente a la 15,15'-oxigenasa, la amplificación del fragmento del cDNA se realizó mediante una reacción en cadena de polimerasa (PCR). El RNA total de tejido adiposo fue extraído usando el Trizol-reagent (No. Cat. 15596-026 Life Technologies, USA). A la misma muestra se le realizó una segunda extracción (purificación) del RNA utilizando RNeasy Mini kit (No. Cat. 74104 QUIAGEN, USA). La producción total de RNA fue determinada por absorbancia a 260 nm. Los oligonucleótidos específicos de la enzima β-caroteno 15,15'-oxigenasa utilizados fueron diseñados en nuestro laboratorio. Se realizó una transcripción reversa para obtener un cDNA, para ello se utilizó el oligonucleótido 5'-TTTGCTGCTGGAGTCCAGTGGAG-3'

(antisentido) con RNase H Reverse Transcriptase (No. Cat 18064-014 Life Technologies, USA). La amplificación del cDNA se realizó con DNA Taq Polymerase recombinant (No. Cat 11615-010 Life Technologies, USA) utilizando para ello el mismo antisentido y los sentidos 5'-TTGAGAAGACTTCTACGCGACCC-3' y 5'-CGGAAGCCCGTGCCGAC-3' que codifica para 800 y 400 pb, respectivamente [32].

Determinación de retinal

Para conocer la actividad de la enzima β -caroteno 15,15'-oxigenasa en tejido adiposo se determinó la presencia de retinal tanto en el medio de cultivo como en los explantes cultivados. Las extracciones de retinal se realizaron bajo la misma metodología que para el β C. Todos los procedimientos fueron realizados dentro de condiciones protegidas de la luz. El retinal fue detectado por HPLC con una columna 250 x 4.6 mm 5 μ Hypersil® silica, de acuerdo a los procedimientos reportados por Miyagi *et al* [25].

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Análisis estadístico

Las determinaciones en tejido adiposo a las 0 h de incubación (concentración de β C, de DNA, de triglicéridos y la actividad de la enzima G3PDH) fueron comparados entre animales usando el modelo lineal general del SAS [35]. Las medias fueron comparadas usando el método de mínimos cuadrados medios.

Los resultados de la actividad de G3PDH (nM de NAD/mg/min), de la incorporación y de la movilización de β C y de triglicéridos (μ M/ μ g de DNA) se sometieron a un análisis de covarianza, utilizando el paquete estadístico SAS [35].

El modelo general utilizado fue:

$$Y_{ij} = \beta_0 + \text{tratamiento}_i + \beta_{1i} (\text{hora}_j) + \beta_{2i} (\text{hora}^2_j) + \beta_{3i} (\text{hora}^3_j) + \varepsilon_{ij}$$

donde:

- Y_{ij} = Es la variable de respuesta (nM de NAD/mg/min y μ M/ μ g de DNA del i-ésimo tratamiento, con el j-ésimo coeficiente de regresión);
- β_0 = Es el intercepto sobre el eje de la y;
- tratamiento_i = Efecto del i-ésimo tratamiento (0/C, 0/I, 0/E, 20/C, 20/I y 20/E);
- $\beta_{1i} (\text{hora}_j)$ = Es el coeficiente de regresión lineal del tiempo con el i-ésimo tratamiento;
- $\beta_{2i} (\text{hora}^2_j)$ = Es el coeficiente de regresión cuadrático del tiempo con el i-ésimo tratamiento;
- $\beta_{3i} (\text{hora}^3_j)$ = Es el coeficiente de regresión cúbico del tiempo con el i-ésimo tratamiento;
- ε_{ij} = Es el error experimental;

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Resultados

Experimento 1

La incorporación de β C normalizada por cada 100 mg de tejido ($n=3$) se muestra en la Figura 2. Los análisis mostraron que la incorporación de β C a las concentraciones de 0, 1 y 5 μ M no fue diferente de cero a través del tiempo de incubación ($P>0.05$), no mostraron ningún efecto (lineal, cuadrático o cúbico). Únicamente con la concentración 20 μ M de β C, la incorporación de este compuesto fue diferente de cero, mostrando un efecto cuadrático ($P< 0.01$), la ecuación obtenida $y = 0.046 + 0.203x - 0.005x^2$. El punto de inflexión para la curva, calculado por la primera derivada de la ecuación correspondiente fue a las 16.6 h, logrando una incorporación a este tiempo de 2.04 μ M (10.19% de la concentración inicial adicionada de β C al medio de cultivo). La incorporación de β C (con la concentración 20 μ M) en explantes de tejido adiposo de bovino tendió a disminuir después de las 20 h de incubación.

Por otro lado, la actividad de la enzima G3PDH (como indicadora de la viabilidad de las células adiposas) mostró un efecto cuadrático durante el tiempo de incubación con las diferentes concentraciones de β C utilizadas. El análisis mostró que la concentración de β C no influyó sobre la actividad de la G3PDH ($P > 0.05$). La actividad promedio de G3PDH a la hora cero de incubación fue de 162.32 ± 38.12 nM de NAD/mg de proteína/min. A las 25 h de incubación la actividad de la enzima disminuyó entre el 53 y el 61 % (Figura 3).

Experimento 2

La concentración de β C por cada 100 mg tejido adiposo a las 0 horas de incubación fue diferente entre animales ($P < 0.05$), en un animal no se detectó β C. La actividad enzimática de G3PDH al inicio de las incubaciones y las concentraciones de DNA genómico no fueron diferentes entre animales ($P > 0.05$), mostrando una media de 277.08 ± 28.53 nM de NAD/mg de proteína/min y 1.068 ± 0.072 μ g de DNA/100 mg de tejido adiposo, respectivamente (Cuadro 2).

La Figura 4 muestra la incorporación de β C normalizada por μ g de DNA (μ M de β C/ μ g de DNA) por efecto de la adición de insulina (10 μ g/mL) o de epinefrina (1 μ M) en el medio de cultivo. El análisis mostró que la incorporación de β C en los tratamientos 0/C, 0/I y 0/E no fue diferente ($P > 0.05$) de cero a través del tiempo de incubación, ningún efecto (lineal, cuadrático, cúbico) fue mostrado. Sin embargo, la incorporación de β C para los tratamientos 20/C, 20/I y 20/E mostró un efecto cuadrático ($P < 0.01$); las ecuaciones fueron $y = 0.080 + 0.2141x - 0.006x^2$, $y = 0.080 + 0.3458x - 0.010x^2$, $y = 0.080 + 0.1007x - 0.002x^2$, respectivamente. Se observó una mayor incorporación de β C en los explantes tratados con insulina y una incorporación menor para el tratamiento con epinefrina, en relación al tratamiento control, el análisis mostró que el tipo de hormona influyó ($P < 0.05$) sobre la incorporación de β C en los explantes (Figura 4). El punto de inflexión para cada curva, calculado por la primera derivada de la ecuación correspondiente, fue a las 17.84, 16.46 y 17.98 h de incubación, logrando una incorporación de 1.99 (9.95%), 2.79 (13.96%) y 1.24 (6.22%) μ M de β C/ μ g de DNA, para los tratamientos 20/C, 20/I y 20/E, respectivamente.

La actividad enzimática de G3PDH (Figura 5) en los explantes incubados no fue influenciada por el tipo de tratamiento ($P > 0.05$). La actividad media a la hora cero de incubación fue de 277.08 ± 28.53 nM de NAD/mg de proteína/min. La actividad de la enzima mostró un efecto lineal negativo en todos los tratamientos, a las 20 h de incubación la actividad disminuyó a un 52, 50, 50, 46, 48 y 48% para los tratamientos 0/C, 0/I, 0/E, 20/C, 20/I y 20/E, respectivamente.

El efecto de la insulina y de la epinefrina sobre la concentración de triglicéridos ($\mu\text{M}/\mu\text{g}$ de DNA) en explantes de tejido adiposo de bovino se muestra en la Figura 6. Los resultados del análisis mostraron que la concentración de triglicéridos en los explantes de los tratamientos 0/C y 20/C no fue diferente ($P > 0.05$) de cero a través del tiempo del tiempo de incubación. Para los tratamientos adicionados con insulina, la concentración de triglicéridos en los explantes de tejido aumentó mostrando un efecto cuadrático ($P < 0.05$). Las ecuaciones obtenidas fueron $y = -7.488 + 16.981x - 0.313x^2$, $y = 1.843 + 22.384x - 0.626x^2$ para los tratamientos 0/I y 20/I, respectivamente. Por el contrario, la concentración de triglicéridos en los explantes disminuyó en los tratamientos adicionados con epinefrina mostrando un efecto lineal ($P < 0.01$), las ecuaciones estimadas fueron $y = -80.889 - 16.321x$, $y = -68.644 - 18.827x$, para los tratamientos 0/E y 20/E, respectivamente.

Los resultados de la incorporación y de la movilización de triglicéridos ($\mu\text{M}/\mu\text{g}$ DNA) y de βC ($\mu\text{M}/\mu\text{g}$ DNA) de los explantes de tejido adiposo se muestran en el Cuadro 3. La incorporación de βC en los explantes del tratamiento 0/C fue inexistente (como era de esperarse), debido a la ausencia de βC en el medio de cultivo. Los resultados mostraron que la incorporación de βC en el tratamiento 20/C tuvo un efecto cuadrático ($P < 0.01$), su ecuación fue $y = 0.080 + 0.2141x - 0.006x^2$. La concentración de triglicéridos en los explantes del tejido adiposo se incrementó en los tratamientos adicionados con insulina, mostrando un efecto cuadrático ($P < 0.05$), las ecuaciones obtenidas fueron $y = -7.488 + 16.981x - 0.313x^2$, $y = 1.843 + 22.384x - 0.626x^2$ para los tratamientos 0/I y 20/I, respectivamente. El análisis mostró que la movilización de triglicéridos y de βC es lineal ($P < 0.01$) para las dos concentraciones de βC , las ecuaciones obtenidas fueron $y = 59.162 + 14.278x$, $y = 94.334 + 15.033x$ y $y = 0.0055 + 0.004x$, $y = 0.1994 + 0.042x$, para triglicéridos y βC con la concentración 0 y 20 μM , respectivamente. El análisis mostró que la concentración de βC en el medio de cultivo (0 ó 20 μM) influyó sobre la movilización ($P < 0.05$) de este compuesto en los explantes; por el contrario, la concentración de βC no influyó ($P > 0.05$) sobre la

movilización de triglicéridos. Se observó que la movilización fue mayor que la incorporación de triglicéridos. En relación con el β C, se observó movilización de éste durante el tiempo de incubación de los explantes, aún cuando no hubo incorporación *in vitro* (0 μ M), esto último debido a que el tejido adiposo contenía β C ($0.211 \pm 0.002 \mu\text{M}/100 \text{ mg}$ de tejido) que se incorporó durante la vida del animal.

La tasa de movilización de triglicéridos y de β C se calculó a partir de la pendiente de las ecuaciones de movilización de ambos compuestos (Cuadro 4). Bajo las condiciones de este estudio se observó que la tasa de movilización ($\mu\text{M}/\text{h}$) de triglicéridos fue mayor que la de β C. Sin embargo, la tasa de movilización de β C con la concentración 20 μM en el medio de cultivo fue 4.5 veces mayor que cuando no se adicionó. Las relaciones triglicéridos: β C observadas fueron $1:6 \times 10^{-4}$ y $1:28 \times 10^{-4}$.

Para conocer la actividad de la enzima β -caroteno 15,15'-oxigenasa en el tejido adiposo, se estimó la formación de retinal (producto de la ruptura de β C) el cual fue cuantificado por HPLC tanto en el medio de cultivo como en los explantes. Bajo las condiciones experimentales de este trabajo no se encontraron cantidades detectables de retinal a partir del β C que fue adicionado al medio de cultivo.

La expresión de los fragmentos del gen que codifica para la enzima β -caroteno 15,15'-oxigenasa en el tejido adiposo se muestra en la Figura 7. Los resultados de RT-PCR utilizando cDNA de mucosa intestinal de bovino como control positivo, indicaron que los fragmentos del gen se expresaron en el tejido adiposo tanto con el fragmento de 400 pb como con el de 800 pb, sin embargo, se observó una expresión relativamente menor en el tejido adiposo en relación a la de la mucosa intestinal.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Discusión

Experimento 1

El propósito de este experimento fue valorar la actividad de la enzima G3PDH y la incorporación de β C en explantes incubados de tejido adiposo de bovino probando para ello diferentes concentraciones (0, 1, 5 y 20 μ M) de β C en el medio de cultivo, con la finalidad de establecer una concentración adecuada en el medio de cultivo y determinar las horas de incubación óptimas que nos permitieran su uso en ulteriores trabajos para conocer algunos de los factores involucrados en la incorporación y movilización de este compuesto en el tejido adiposo de bovinos. Es un paso obligado de los compuestos lipofílicos tales como los carotenoides cruzar la membrana citoplasmática y ser incorporados dentro de los adipocitos. Estudios con células CaCo-2 sugieren que la incorporación de β C es a través de un proceso facilitado con la participación de un transportador epitelial específico [11]. Recientemente, se demostró que los receptores scavenger clase B tipo I (SR-BI) median la incorporación celular de los carotenoides en *Drosophila melanogaster* [16].

En los primeros ensayos realizados y bajo las mismas condiciones de cultivo de adipocitos disgregados (cultivos primarios) y de explantes de tejido adiposo, se encontró que el β C es capaz de incorporarse en ambos, sin embargo, la incorporación de β C en los explantes tuvo un coeficiente de variación menor (4.6 vs 15.7%) que en las células adiposas disgregadas. A este respecto, DiFrancesco y Bickel [7] no obtuvieron diferencias en la incorporación de compuestos lipofílicos entre adipocitos disgregados y explantes de tejido adiposo. No obstante, las grandes variaciones que se observaron en este estudio al evaluar la incorporación de β C en los adipocitos disgregados pudo deberse a que estas células flotan sobre el medio de cultivo, por lo que son difíciles de separarlas de medios acuosos y obtener el número total de éstas [8]. Por lo anterior, los trabajos aquí reportados se realizaron con explantes de tejido adiposo de bovino.

En el presente estudio, se encontró que solamente la incorporación de β C a la concentración 20 μ M fue diferente de cero, mostrando un efecto cuadrático ($P < 0.01$) en su incorporación (Figura 2). Thuahnai *et al* [37] mencionan que la unión entre partículas lipídicas y los receptores (SR-BI) es crucial para la incorporación intracelular de lípidos. Las diferencias observadas en la incorporación entre las concentraciones de β C (0, 1, 5 y 20 μ M) utilizadas en este trabajo, probablemente se deban a que con la concentración de 20 μ M hubo una mayor exposición del β C sobre los SR-BI, lográndose un mayor número de uniones entre el β C y los SR-BI y por ende una mayor incorporación.

Con la concentración 20 μ M de β C en el medio de cultivo se obtuvo una incorporación en los explantes del 10.07% a las 16 h de incubación. Existe el reporte de que las células CaCO-2 fueron capaces de incorporar el 11% de β C (7 μ M) a las 16 h [11]. Posiblemente la diferencia en la incorporación real de β C entre estos dos tipos de células, pudo deberse a una diferencia entre la cantidad de células expuestas al β C y/o a un número diferente de receptores SR-BI que pudieran tener ambos tipos celulares.

Por otro lado, la actividad de la enzima G3PDH en las células adiposas de los explantes incubados no fue afectada por la concentración de β C en el medio de cultivo ($P > 0.05$), sin embargo, la actividad enzimática descendió rápidamente durante el tiempo de incubación (Figura 3). La disminución en la actividad de la enzima (G3PDH) a través del tiempo de incubación representa de forma cuantitativa la pérdida de la viabilidad de las células adiposas [19]. Este trabajo mostró que a las 25 h de incubación la actividad de la enzima disminuyó entre el 53 y el 61%, ésto indica que del total de las células vivas (en los explantes) al inicio de las incubaciones, de un 39 a un 47% de éstas han muerto a las 25 h de incubación.

Los resultados de este estudio mostraron que cerca de la mitad del número de las células contenidas en los explantes murieron a las 25 h de incubación, esto puede explicar el porqué la incorporación de β C (20 μ M) en explantes de tejido adiposo

de bovino se estabilizó entre las 16-20 h y porqué la incorporación disminuyó posteriormente. Con base en los resultados obtenidos en este trabajo, se decidió utilizar para el siguiente estudio una concentración de 20 μM de βC en el medio de cultivo e incubar los explantes hasta las 20 h.

Experimento 2

La incorporación de $\beta\text{C}/\mu\text{g}$ de DNA en los explantes de tejido adiposo de bovino fue afectada por el tipo de hormona que se adicionó al medio de cultivo, es decir, se obtuvo una mayor incorporación de βC en el tratamiento 20/I y una incorporación menor en el tratamiento 20/E, en relación al tratamiento 20/C (Figura 4). La incorporación de βC en el tratamiento 20/C fue similar a los resultados del primer experimento cuando se empleó la concentración 20 μM (en ambos se adicionó 20 μM de βC en el medio de cultivo y sin hormonas), los puntos de inflexión obtenidos fueron a las 17.84 y 16.60 h, incorporando 9.95 y 10.19% de βC a estos tiempos en el tratamiento 20/C y en el primer experimento (20 μM), respectivamente.

Los carotenoides son compuestos lipídicos, por su naturaleza, es probable que las diferencias observadas en la incorporación de βC puedan ser debidas a las diferentes respuestas que desencadenan las hormonas utilizadas. La epinefrina incrementa la lipólisis, por el contrario la insulina contrarresta la lipólisis y estimula actividades lipogénicas [15]. Se ha demostrado que la adición de insulina en el medio de cultivo de los adipocitos incrementa la actividad de enzimas lipogénicas, esto es debido a que ejerce un mayor efecto sobre la síntesis *de novo* de éstas, aumenta la incorporación de la glucosa, de aminoácidos e incrementa la captación de los ácidos grasos externos [18, 29].

Por otro lado, una clase de proteínas identificadas en la membrana plasmática de varios tipos de células (receptores scavenger clase B tipo I), son los responsables de la incorporación de carotenoides dentro de las células [16]. Por lo tanto, otra posibilidad es que la insulina tenga un efecto sobre estos receptores, permitiendo una mayor incorporación intracelular del βC .

Por el contrario, la menor cantidad de βC incorporado en los explantes del tratamiento 20/E en relación al tratamiento 20/C (6.22 vs 9.78% del βC , al punto de inflexión de cada uno) puede ser debido a la movilización de este compuesto

de las células (contenidas en los explantes) durante el tiempo de incubación. El estímulo lipolítico de la epinefrina causó una disminución sobre la cantidad de β C encontrada en los explantes, a las diferentes horas de incubación. Lo anterior, puede deberse a que esta hormona desencadenó una cascada de señalización lipolítica [20], permitiendo de esta manera la movilización de los ácidos grasos y de β C de las células.

En los tratamientos 0/C, 0/I y 0/E no hubo incorporación de β C (como era de esperarse), es decir no hubo cambios en la concentración inicial de β C en los explantes durante el tiempo de incubación, puesto que no había β C disponible en el medio de cultivo, sin embargo, estos tratamientos fueron empleados para evaluar los efectos de éstos sobre la movilización de β C y de triglicéridos.

El tejido adiposo de los bovinos posee gran capacidad para almacenar β C proveniente de la dieta, sin embargo, no existen datos respecto a cómo los carotenoides son movilizados de este tejido o de cuales son los factores que regulan la movilización. Se sabe que la concentración de β C en tejido adiposo de bovino disminuye cuando se privan de fuentes ricas en carotenoides (forrajes verdes) [14], debido a la naturaleza lipídica del β C es probable que este compuesto se movilice a través de procesos similares a la movilización de ácidos grasos. La epinefrina es una hormona utilizada ampliamente para estimular actividades lipolíticas en tejido adiposo de bovinos *in vitro* [22, 23, 24].

Los datos de este trabajo mostraron que la adición de epinefrina al medio de cultivo estimuló la movilización de triglicéridos y de β C de los explantes de tejido adiposo (Cuadro 3). Las relaciones triglicéridos: β C obtenidas fueron $1:6 \times 10^{-4}$ y $1:28 \times 10^{-4}$, esto significa que por cada μ M de triglicéridos movilizados por hora de β C se movilizan 6×10^{-4} y 28×10^{-4} μ M cuando se adicionó 0 ó 20 μ M de β C en el medio de cultivo. Esto sugiere que la movilización de β C es dependiente de su concentración intracelular y que es similar a la movilización de los triglicéridos. Este estudio demuestra bajo condiciones *in vitro* que el β C se incorpora y moviliza

en explantes de tejido adiposo, y dicho recambio está relacionado con la movilización de triglicéridos.

Por otro lado, la actividad promedio de G3PDH (nM NAD/mg de proteína/min) a las cero horas de incubación del segundo experimento (277.08 ± 28.53) fue mayor que la actividad promedio del primero (162.32 ± 38.12), probablemente debido a las diferencias metabólicas entre grupos de animales. Sin embargo, en ambos experimentos la actividad disminuyó en relación con el tiempo de incubación, a las 20 h se observó un descenso en la actividad entre el 47 y 63% (Figura 3 y 5). La disminución en la actividad de la enzima (G3PDH) durante el tiempo de incubación indica de manera objetiva el aumento del número de adipocitos muertos [19]. Lo anterior podría explicar el porqué la incorporación de β C en los explantes disminuyó a las 20 h de incubación. Por el contrario, la movilización de β C y de triglicéridos no disminuyó a las 20 h de incubación, lo que quizá pudo ser debido a un incremento del número de células muertas en los explantes, lo que permitió a su vez la salida de estos compuestos de las células al romperse la membrana plasmática.

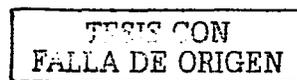
La expresión de la enzima β -caroteno 15,15'-oxigenasa se ha identificado en algunos tejidos de varias especies. En pollo y ratón (duodeno, hígado, pulmón, riñón) [30, 41]; en embriones de pollo [26] y en ovarios de bovinos [32]. During *et al* [9] encontraron que la enzima se encuentra activa en intestino, hígado, cerebro, pulmón y riñón de la rata. En los bovinos se estudió la actividad de la enzima en duodeno, yeyuno e ileon [28]. A la fecha no hay reportes sobre la expresión y actividad de esta enzima en tejido adiposo del bovino. Los resultados obtenidos de RT-PCR indican que el gen que codifica para la enzima β -caroteno 15,15'-oxigenasa se expresa en tejido adiposo de bovinos (Figura 7), no obstante, bajo estas condiciones experimentales no se observó actividad de la enzima, es decir, no se encontraron cantidades detectables de retinal a partir del β C adicionado al medio de cultivo. Quizá la actividad de dicha enzima no fue detectada por las condiciones y por el corto tiempo de incubación. Es necesario realizar más

estudios para dilucidar la actividad de la enzima β -caroteno 15,15'-oxigenasa en el tejido adiposo de los bovinos.

En este estudio se muestra que existe una mayor incorporación de β C en explantes de tejido adiposo de bovino en presencia de la insulina, contrario a ésto, la epinefrina desencadenó la movilización de β C y de triglicéridos. Esto sugiere que el β C se moviliza del tejido adiposo de forma similar a los triglicéridos. Se concluye que bajo condiciones *in vitro* el β C se incorpora y se moviliza de los explantes de tejido adiposo de bovinos.

Agradecimientos

Los autores agradecen a el Dr. Felipe Ruiz por su apoyo en los análisis estadísticos en este trabajo. Así también, se agradece a las autoridades del rastro municipal de Querétaro por permitirnos coleccionar muestras. La investigación fue soportada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, proyecto J31295-B) y es parte de la tesis del primer autor como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México.



Literatura Citada

1. Barrón, S., Mora, O., García-Bojalil, C. y Shimada, A. (2003) Impacto económico de la pigmentación del tejido adiposo bovino en la ganadería tropical. Enviado a agrociencia.
2. Barua, A. B. and Furr, H. C. (1992) Extraction and analysis by high-performance liquid chromatography of carotenoids in human serum. *Methods Enzymol.* 213, 273-281.
3. Bidner, T. D., Schupp, A. R., Mohamad, A. B., Rumore, N. C., Montegory, R. E., Bagley, C. P. and McMillin, K. W. (1986) Acceptability of beef from Angus-Hereford or Angus-Hereford-Brahman steers finished on all-forage or a high-energy diet. *J. Anim. Sci.* 62, 381-387.
4. Boone, C., Grégoire, F. and Remacle, C. (2000) Culture of porcine stromal-vascular cells in serum-free medium: Differential action of various hormonal agents on adipose conversion. *J. Anim. Sci.* 78, 885-895.
5. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248 – 254.
6. Castro-Muñozledo, F., Marsh-Moreno, M., Beltrán-Langarica, A. and Kuri-Harcuh, W. (1987) Commitment of adipocyte differentiation in 3T3 cells is inhibited by retinoic acid and expression of lipogenic enzymes is modulated through cytoskeleton stabilization. *Differentiation* 36, 211-219.
7. DiFrancesco, B. C., and Bickel, M. H. (1985) Uptake in vitro of lipophilic model compounds into adipose tissue preparations and lipids. *Biochem. Pharmacol.* 34, 3683-3688.
8. DiGirolamo, M. F. and Fried, S. K. (1987) *In vitro* metabolism of adipocytes. In *Biology of the adipocyte: Research approaches* (Hausman, G. and Martin, R. J. Eds.) pp 120-147 Van Nostrand Reinhold Co. New York.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

9. During, A., Nagao, A., Hoshino, C. and Terao, J. (1996) Assay of β -carotene 15,15'-dioxygenase activity by reverse-phase high-pressure liquid chromatography. *Anal. Biochem.* 241, 199-205.
10. During, A., Albaugh, G. and Smith, C. (1998) Characterization of β -carotene 15,15'-dioxygenase activity in TC7 clone of human intestinal cell line Caco-2. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 249, 467-474.
11. During, A., Hussain, M. M., Morel, D. W. and Harrison E. H. (2002) Carotenoid uptake and secretion by CaCo-2 cells: β -carotene isomer selectivity and carotenoid interaction. *J. Lipid Res.* 43, 1086-1095.
12. Estado de Querétaro (1966) Ley estatal de protección a los animales (1996). Periodo Oficial del Estado de Querétaro, 15 de Agosto.
13. Etherton, T. D. and Evock, C. M. (1986) Stimulation of lipogenesis in bovine adipose tissue by insulin and insulin-like growth factor. *J. Anim. Sci.* 62, 357-362.
14. Forrest, J. R. (1981) Effect of high concentrate feeding on the carcass quality and fat coloration of grass-reared steers. *Can. J. Anim. Sci.* 61, 575-580.
15. Holm, C., Osterlund, T., Laurell, H. and Contreras, J. C. (2000) Molecular mechanisms regulating hormone-sensitive lipase and lipolysis. *Annu. Rev. Nutr.* 20, 365-393.
16. Kiefer, C., Sumser, E., Wernet, M. and Lintig, J. (2002) A class B scavenger receptor mediates the cellular uptake of carotenoids in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 10581-10586.
17. Knight, T., Ridland, M., Hill, F., Death, A. and Wyeth, T. (1993) Effects of stress and nutritional changes on the ranking of cattle on plasma carotene concentrations. *Proc. N. Z. Soc. Anim. Prod.* 53, 455-456.
18. Kuri-Harcuch, W. y Castro-Muñozledo, F. (1984). Diferenciación adipocítica de las células 3T3. *Rev. Invest. Clin. (Mexico)*. 36, 377-388.

19. Lalikos, J. F., Ya-Qi, L., Timothy, P. R., James, W. D., Matory, W. E. and Lawrence, T. (1997). Biochemical assessment of cellular damage after adipocyte harvest. *J. Surgical Res.* 70, 95-100.
20. Lehninger, A. L; Nelson, D. L. y Cox M. M. (1995) *Principios de Bioquímica*. Pp 479-505. Segunda Ed. Omega S. A. Barcelona España.
21. McCaughey, W. P. and Cliplef, R. L. (1996) Carcass and organoleptic characteristics of meat from steers grazed on alfalfa/grass pastures and finished on grain. *Can. J. Anim. Sci.* 76, 149-152.
22. McNamara, J. P. and Hillers, J. K. (1986) Regulation of adipose tissue metabolism during lactation. 2 Lipolysis response to milk production and energy intake. *J. Dairy Sci.* 69, 3042-3050.
23. McNamara, J. P. (1988) Regulation of adipose tissue metabolism during lactation. 4. Dose-responsiveness to epinephrine as altered by stage of lactation. *J. Dairy Sci.* 71, 643-649.
24. McNamara, J. P. (1989) Regulation of bovine adipose tissue metabolism during lactation. 5. Relationships of lipid synthesis and lipolysis with energy intake and utilization. *J. Dairy Sci.* 72, 407-418.
25. Miyagi, M., Yokoyama, H., Shiraishi, H., Matsumoto, M. and Ishii, H. (2001) Simultaneous quantification of retinol, retinal, and retinoic acid isomers by high-performance liquid chromatography with a simple gradient. *J. Chromatogr. B*, 757, 365-368.
26. Mora-Izaguirre, O., Kuri-Melo, L., González-Gallardo, A., Meléndez-Herrera, E., Morales-Trejo, A., Shimada, A. and Varela-Echavarría, A. (2002) Expression and activity of 15,15'-dioxygenase in chick embryos. 13th International Carotenoid Symposium. Honolulu, Hawaii, U.S.A.
27. Mora, O., Romano, J. L., González, E., Ruiz, F., Gómez, R. and Shimada, A. (2001) Presence of fed β -carotene in digesta, excreta, blood, and hepatic and adipose tissues of Holstein steers. *Can. J. Anim. Sci.* 81, 133 -139.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

28. Mora, O., Romano, J., González, E., Ruiz, F. and Shimada, A. (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.
29. Moustaid, N., Jones B. H. and Taylor, J. W. (1996) Insulin increases lipogenic enzyme activity in human adipocytes in primary culture. *J. Nutr.* 126, 865-870.
30. Paik, J., During, A., Harrison, E., Mendelsohn, C., Lai, K. and Blaner, W. (2001) Expression and characterization of a murine enzyme able to cleave β -carotene. *J. Biol. Chem.* 276, 32160-32168.
31. Plaas, H. and Cryer, A. (1980) The isolation and characterization of a proposed adipocyte precursor cell type from bovine subcutaneous white adipose tissue. *J. Dev. Physiol.* 2, 275.
32. Rosas, A., Morales, A., González, A., Shimada, A., Mejia, C., Varela, A. and Mora, O. (2003) Expression of 15,15'dioxygenase in bovine ovarian tissue. Enviado a: *Experimental Biology*. San Diego, California, USA.
33. Simonne, H. A., Green, N. R. and Bransby, D. I. 1996. Consumer Acceptability and β -carotene content of beef as related to cattle finishing diets. *J. Food Sci.* 61: 1254-1256.
34. Skjaerlund, D. M., Mulvaney, D. R., Mars, R. H. and Schroeder, A. L. (1988) Measurement of protein turnover in skeletal strips. *J. Anim. Sci.* 66, 687-698.
35. Statistical Analysis System (1988) SAS/STAT User's Guide. Release 6.03 Edition. Cary, NC: SAS Institute.
36. Strachan, D., Yang, A., and Dillon, R. (1993) Effect of grain feeding on fat colour and other carcass characteristics in previously grass-fed *Bos indicus* steers. *Austr. J. Exp. Agric.* 33, 269-273.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

37. Thuahnai, S. T., Lund-Katz, S., Williams, D. L. and Phillips, M. C. (2001) Scavenger receptor class B, type I-mediated uptake of various lipids into cells: Influence of the nature of the donor particle interaction with the receptor. *J. Biol. Chem.* 276, 43801-43808.
38. Turinsky, J. O'Sullivan, D. M and Bayly, B. P. (1990) 1,2 Diacylglycerol and ceramide levels in insulin-resistant tissue of the rat *in vivo*. *J. Biol. Chem.* 265, 16880-16885.
39. Wise, L. and Green, H. (1979) Participation of one isozyme of cytosolic glycerophosphate dehydrogenase of 3T3 cells. *J. Biol. Chem.* 254, 273-275.
40. Wu, P., Sato, K., Suzuta, F., Hikasa, Y. and Kagota, K. (2000) Effects of lipid-related factors on adipocyte differentiation of bovine stromal-vascular cells in primary culture. *J. Vet. Med. Sci.* 62, 933-939.
41. Wyss, A., Wirtz, G. M., Woggon, W., Brugger, R., Wyss, M., Friedlein, A., Riss, G. Bachmann, H. and Hunziker, W. (2001) Expression pattern and localization of β -carotene 15,15'-dioxygenase in different tissues. *Biochem. J.* 354, 521-529.
42. Yang, A., McLennan, S., Armstrong, J., Larsen, T., Shaw, F. and Tume, K. (1993) Effect of short-term grain feeding on bovine body-fat colour: a cautionary note. *Aust. J. Agric. Res.* 44, 215-220.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Cuadro 2. Concentración de β C, actividad de la enzima G3PDH a las 0 horas de incubación y concentración de DNA genómico en tejido adiposo¹

Animal	Concentración de β C ^s	Actividad de G3PDH [†]	Concentración de DNA [‡]
1	0.2635 ^{ab}	312.86	0.9225
2	0.2807 ^a	350.90	1.6855
3	ND	283.63	0.7635
4	0.2247 ^c	206.75	0.9445
5	0.2457 ^{bc}	228.68	0.9525
6	0.2540 ^{ab}	279.65	1.1445
Media	0.2114	277.08	1.0688
EEM	0.0025	28.53	0.0722

[†] Los valores son medias, n=6. ^s μ M de β C/100 mg de tejido; [†] nM de NAD/mg proteína/min; [‡] μ g de DNA genómico/100 mg de tejido. Dentro de cada columna, valores con diferente superíndice son significativamente diferentes (P< 0.05). ND = No detectable. EEM= error estándar de la media. El límite de detección de β C fue de 0.15 nM.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Cuadro 3. Incorporación y movilización de triglicéridos y de β -caroteno en explantes de tejido adiposo de bovino incubados con 0 ó 20 μ M de β -caroteno¹

Tiempo de incubación (horas)	Incorporación				Movilización			
	β C ²		TG ³		β C		TG	
	0	20	0	20	0	20	0	20
0	0.000	0.084	-7.488	1.844	0.006	0.199	59.162	94.335
5	0.000	0.995	69.591	98.114	0.027	0.409	130.554	169.504
10	0.000	1.585	131.019	163.081	0.048	0.618	201.947	244.673
15	0.000	1.856	176.793	196.744	0.069	0.828	273.339	319.842
20	0.000	1.806	206.915	199.105	0.090	1.037	344.731	395.011

TG = Triglicéridos, β C = β -caroteno.

¹ La determinación de la incorporación y de la movilización de β C y de TG se refiere en material y métodos.

² Incorporación de β C con el tratamiento control.

³ Incorporación de TG con el tratamiento adicionado con insulina.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Cuadro 4. Tasa de movilización de triglicéridos (TG's) y β -caroteno (β C) en explantes de tejido adiposo de bovino incubados con 0 ó 20 μ M de β -caroteno

Concentración de β C en el medio de cultivo (μ M)	Triglicéridos μ M/h	β -caroteno μ M/h	Relación TG's: β C
0	14.278	0.0092	$1:6 \times 10^{-4}$
20	15.033	0.0419	$1:28 \times 10^{-4}$

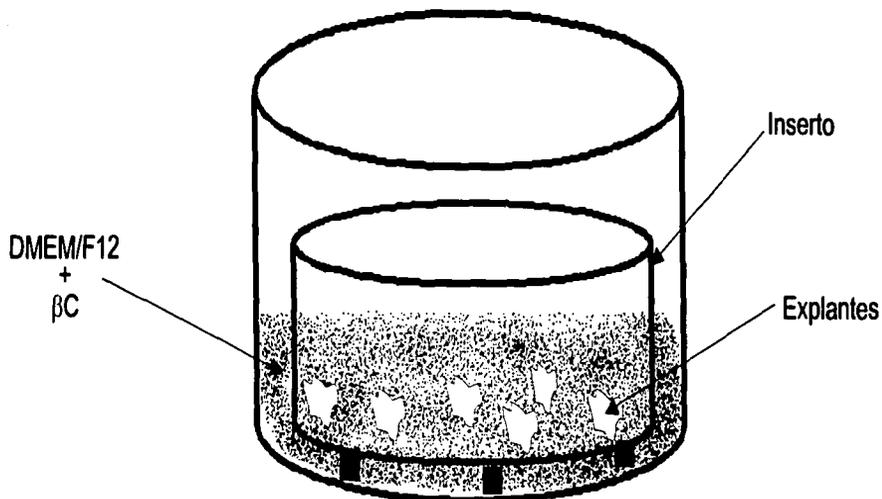


Figura 1. Incubación de explantes de tejido adiposo de bovino.

El DMEM/F12 (1:1 vol/vol) fue adicionado con 10 $\mu\text{g/mL}$ de transferrina, 50 μM de β -mercaptoetanol, 100 μM de ascorbato, 100 U/mL de penicilina y 100 $\mu\text{g/mL}$ de estreptomycin. Los explantes se colocaron dentro de los insertos (Nunc 10 mm \varnothing , con membrana de policarbonato de 8.0 μm). En cada tiempo de incubación, a los explantes y al medio de cultivo (500 μL) se les extrajo el βC y se analizó en HPLC.

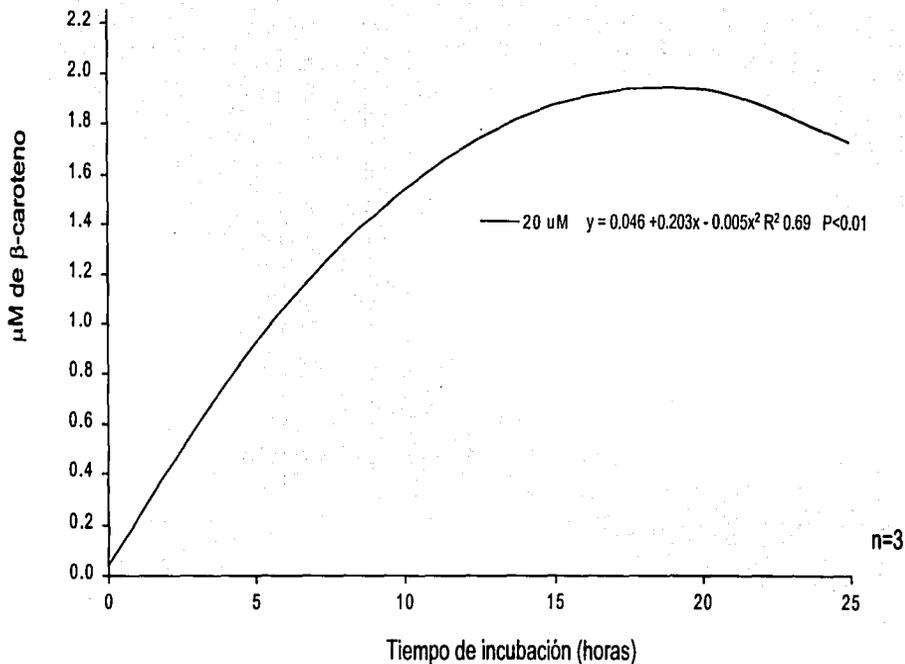


Figura 2. Efecto de la concentración (0, 1, 5 y 20 μM) de βC sobre su incorporación en explantes de tejido adiposo de bovino incubado durante 25 h.

Los datos de incorporación en explantes a la concentración de 0, 1 y 5 μM de βC no se muestran debido a que no fueron diferentes de cero ($P > 0.05$), no ajustándose ningún modelo (lineal, cuadrático o cúbico) a los datos.

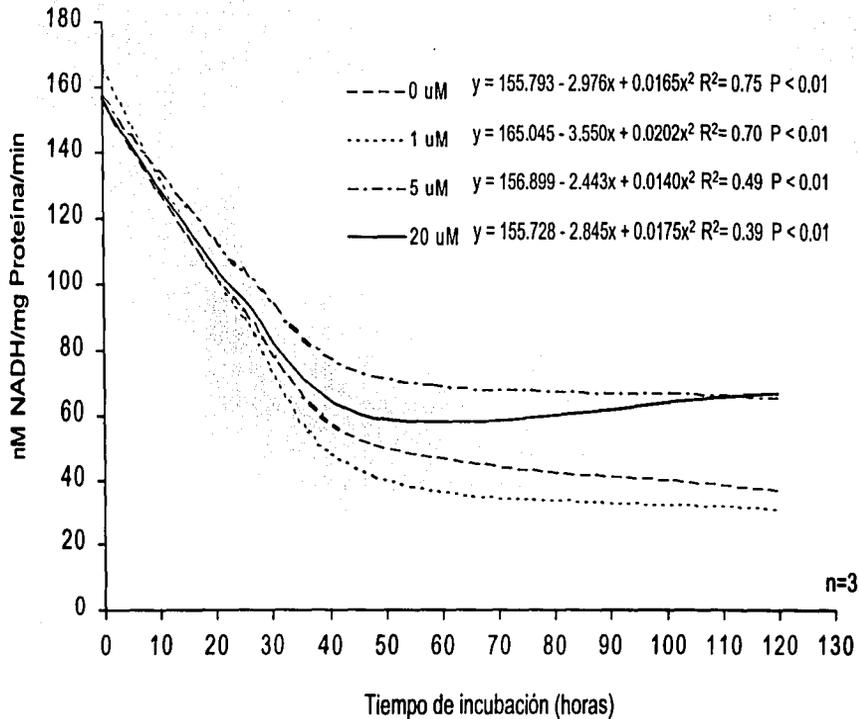


Figura 3. Actividad de la enzima G3PDH en explantes de tejido adiposo de bovino incubado durante 120 h con diferente concentración (0, 1, 5 y 20 μM) de βC .

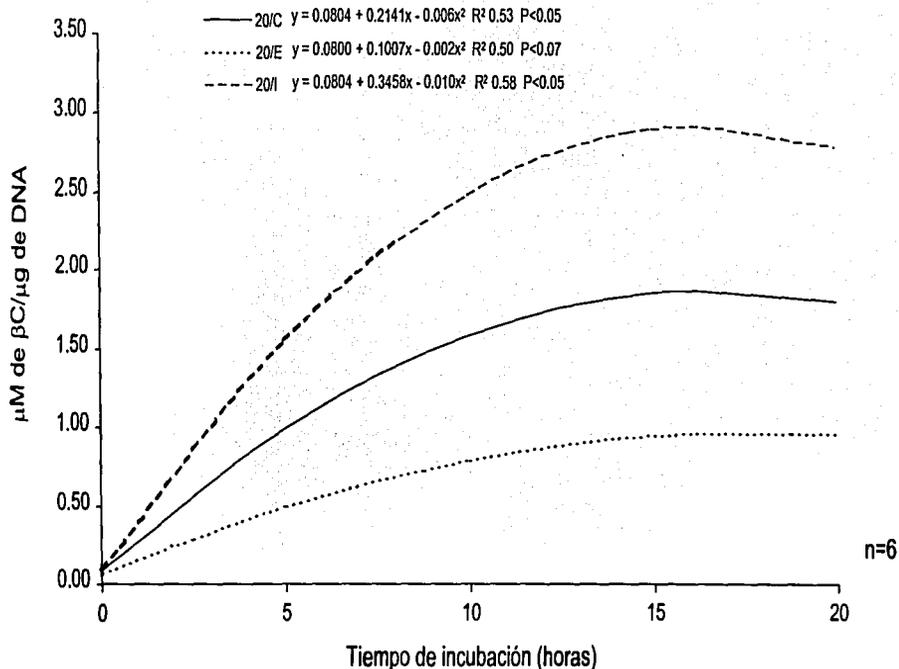


Figura 4. Efecto del tipo de hormona sobre la incorporación de $\beta C/\mu g$ de DNA en explantes de tejido adiposo de bovino incubado durante 20 h.

Tratamientos: 0/C, 0 μM βC /Control; 0/I, 0 μM $\beta C/10 \mu g/ml$ de Insulina; 0/E, 0 μM $\beta C/1 \mu M$ de Epinefrina; 20/C 20 μM βC /Control; 20/I, 20 μM $\beta C/10 \mu g/ml$ de Insulina; 20/E, 20 μM $\beta C/1 \mu M$ de Epinefrina. Los valores de los tratamientos 0/C, 0/I y 0/E no se muestran debido a que no fueron diferentes de cero ($P > 0.05$) a través del tiempo de incubación.

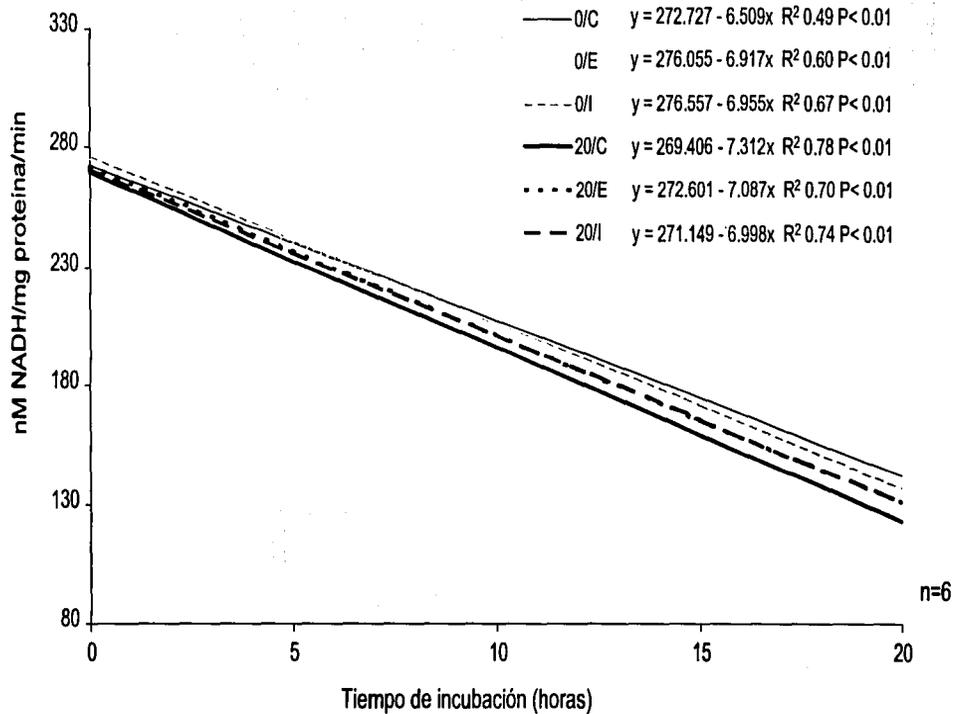


Figura 5. Efecto de la concentración de β C y tipo de hormona adicionados al medio de cultivo sobre la actividad de la enzima G3PDH en explantes de tejido adiposo de bovino en cultivo durante 20 h.

Tratamientos: 0/C, 0 μ M β C/Control; 0/I, 0 μ M β C/10 μ g/ml de Insulina; 0/E, 0 μ M β C/1 μ M de Epinefrina; 20/C 20 μ M β C/Control; 20/I, 20 μ M β C/10 μ g/ml de Insulina; 20/E, 20 μ M β C/1 μ M de Epinefrina.

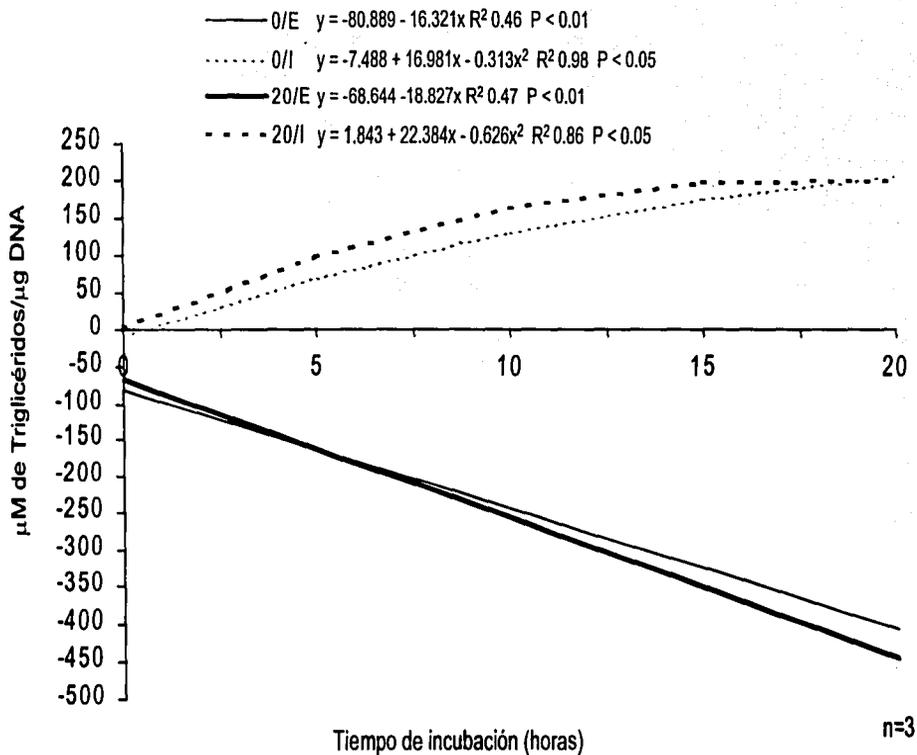


Figura 6. Efecto del tipo de hormona adicionada en el medio de cultivo sobre la concentración de triglicéridos por µg de DNA en explantes de tejido adiposo de bovino incubados durante 20 h.

Tratamientos: 0/C, 0 µM βC/Control; 0/I, 0 µM βC/10 µg/ml de Insulina; 0/E, 0 µM βC/1 µM de Epinefrina; 20/C 20 µM βC/Control; 20/I, 20 µM βC/10 µg/ml de Insulina; 20/E, 20 µM βC/1 µM de Epinefrina. Los valores de los tratamientos 0/C y 20/C no se muestran debido a que no fueron diferentes de cero ($P > 0.05$).

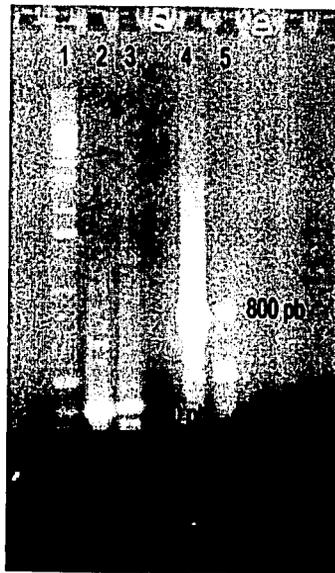


Figura 7. Expresión de fragmentos del gen que codifica para la enzima β -caroteno 15,15'-oxigenasa en tejido adiposo de bovino.

Número de carril: 1 Marcador de peso Molecular, 2 Mucosa intestinal de bovino (400 pb), 3 Tejido adiposo de bovino (400 pb), 4 Mucosa intestinal de bovino (800 pb) y 5 Tejido adiposo de bovino (800 pb)

6. Discusión General

En el primer experimento se evaluó la incorporación de β C y la actividad de la enzima glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH) en explantes de tejido adiposo de bovino, para ello se utilizaron diferentes concentraciones de β C (0, 1, 5 y 20 μ M) en el medio de cultivo, con el propósito de establecer una concentración adecuada de β C y determinar las horas de incubación que nos permitan en ulteriores trabajos conocer algunos factores involucrados sobre la incorporación y movilización de este compuesto en tejido adiposo del bovino. Es un paso obligado de compuestos lipofílicos tales como los carotenoides cruzar la membrana citoplasmática y ser incorporados dentro de los adipocitos. Estudios con células CaCo-2 sugieren que la incorporación de β C es a través de un proceso facilitado con la participación de un transportador epitelial específico (During *et al.* 2002). Recientemente, se corroboró lo anterior, al demostrar que receptores scavenger clase B tipo I (SR-BI) median la incorporación celular de carotenoides en *Drosophila melanogaster* (Kiefer *et al.* 2002).

En este estudio, únicamente la incorporación de β C con el nivel 20 μ M fue diferente ($P < 0.01$) de cero (Figura 2). Las diferencias observadas en la incorporación entre las concentraciones utilizadas de β C (0, 1, 5 y 20 μ M), probablemente se deban a que con la concentración 20 μ M exista una mayor exposición de este compuesto a los receptores (SR-BI), lo que produce un mayor número de uniones entre el β C y los SR-BI (Thuahnai *et al.* 2001) y que en consecuencia exista una mayor incorporación de β C en las células adiposas.

Por otro parte, la actividad de la enzima G3PDH en las células adiposas de los explantes disminuyó rápidamente durante el tiempo de incubación (Figura 3). La disminución en la actividad enzimática (G3PDH) a través del tiempo de incubación representa de forma cuantitativa la pérdida de la viabilidad de las células adiposas (Lalikos *et al.* 1997). Este trabajo mostró que a las 25 h de incubación la actividad de la enzima disminuyó entre el 53 y el 61%. Esto significa que del total de las

células vivas (en los explantes) al inicio de las incubaciones, de un 39 a un 47 % de éstas murieron a las 25 h de incubación. Lo anterior puede explicar el porqué la incorporación de β C (20 μ M) en los explantes se estabilizó entre las 16 - 20 h y posteriormente tendió a disminuir.

El tratamiento 20/C (segundo experimento) y los resultados del primer estudio (concentración 20 μ M) fueron similares en la incorporación de β C, esto corrobora la capacidad de las células adiposas para captar el β C a esta concentración de β C en el medio de cultivo.

En el segundo estudio, se observó que la incorporación de β C en los explantes de tejido adiposo de bovino fue afectada por el tipo de hormona. Se obtuvo una incorporación mayor en el tratamiento 20/I y una menor incorporación de β C en los explantes en el tratamiento 20/E, en relación al tratamiento 20/C (Figura 4). Los carotenoides son compuestos lipídicos, y por su naturaleza, es probable que las diferencias observadas en la incorporación puedan ser debidas a las respuestas diferentes que desencadenan las hormonas. La epinefrina incrementó la lipólisis, por el contrario la insulina estimuló actividades lipogénicas (Holm *et al.* 2000). Otra posibilidad es que la insulina tenga un efecto sobre los receptores scavenger clase B tipo I permitiéndose una mayor incorporación intracelular del β C.

Por el contrario, el estímulo lipolítico de la epinefrina provocó una disminución en la cantidad de β C encontrado en los explantes a las diferentes horas de incubación, lo anterior, pudo ser debido a que la hormona desencadenó una cascada lipolítica (Lehninger 1995), lo que permitió la movilización de ácidos grasos y β C de las células.

Los datos de este trabajo mostraron que la adición de epinefrina al medio de cultivo estimuló la movilización de triglicéridos y β C de los explantes de tejido adiposo. Las relaciones triglicéridos: β C obtenidas fueron 1.6×10^{-4} y 1.28×10^{-4} esto significa que por cada μ M de triglicéridos movilizados por hora, de β C se movilizan 0.0006 y 0.0028 μ M cuando se adicionó 0 ó 20 μ M de β C en el medio de cultivo. Esto sugiere que la movilización de β C del tejido adiposo es dependiente de la

concentración intracelular de este compuesto, y que su movilización es afín a la movilización de los triglicéridos. Este estudio mostró, bajo condiciones *in vitro*, que es posible la incorporación y la movilización de β C de los explantes, esto puede indicar que el β C se recambia en el tejido adiposo de bovino.

En ambos experimentos la actividad (G3PDH) disminuyó en relación con el tiempo de incubación, a las 20 horas mostró un descenso en la actividad entre el 47 y el 63% (Figuras 3 y 5). Esta disminución en la actividad enzimática se reflejó en la estabilización en la captación de β C por los explantes. Por el contrario, la movilización de β C y triglicéridos no disminuyó a las 20 h de incubación, esto pudo ser debido al incremento de células muertas en los explantes, lo que permitió que estos compuestos hallan sido liberados de las células al dañarse la membrana plasmática (Lalikos *et al.* 1997).

Los resultados de RT-PCR indican que el gen que codifica para la enzima β -caroteno 15,15'-oxigenasa se expresa en tejido adiposo, no obstante, bajo estas condiciones experimentales no se observó actividad de la enzima, es decir, no se encontraron cantidades detectables de retinal a partir del β C adicionado al medio de cultivo.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

7. Conclusión

La incorporación de β C en los explantes de tejido adiposo del bovino se estabilizó entre las 16 - 20 h cuando se utilizó una concentración de 20 μ M en el medio de cultivo. Cerca de la mitad las células adiposas contenidas en los explantes murieron a las 25 h de incubación.

En presencia de insulina se mostró un efecto mayor en la incorporación de β C en explantes de tejido adiposo de bovino, contrario a éste, la epinefrina estimuló la movilización de triglicéridos y de β C.

La movilización de β C del tejido adiposo de los bovinos es dependiente de la concentración intracelular de éste, y su movilización está relacionada con la remoción de los triglicéridos. Esto sugiere que el β C se recambia en el tejido adiposo de los bovinos.

Los resultados de RT-PCR indican que el gen que codifica la enzima β -caroteno 15,15'-oxigenasa se expresa en tejido adiposo de bovinos. Bajo las condiciones experimentales de este estudio no se observó actividad de la enzima en los explantes incubados.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

8. Literatura Citada

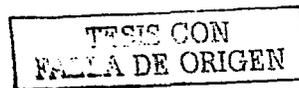
- Barrón, S., Mora, O., García-Bojalil, C. y Shimada, A. 2003. Impacto económico de la pigmentación del tejido adiposo bovino en la ganadería tropical. Enviado a agrociencia.
- Barrón, S., Mora, O., Castaño, V. and Shimada A. 2003. Yellow pigmentation of adipose tissue of pasture-fed tropical cattle as related to its carotenoid concentration and fatty acid profile. Enviado a feed Science and technology.
- Bartness, T. J. and Bamshad, M. 1998. Innervation of mammalian white adipose tissue: implications for the regulation of total body fat. *Am. J. Physiol.* 275 (Regulatory Integrative Comp. Physiol. 44): R1399-R1411.
- Barton, R. A. and Pleasants, A. B. 1993. Fat colour and meat colour in different breeds of steers in five consecutive years raised on pasture and slaughtered at 30 months of age. *Proc. N. Z. Soc. Anim. Prod.* 53: 389-391.
- Bendich, A. and Olson, J. 1989. Biological actions of carotenoids. *FASEB J.* 3:1927-1932.
- Bidner, T. D., Schupp, A. R., Mohamad, A. B., Rumore, N. C., Montegory, R. E., Bagley, C. P. and McMillin, K. W. 1986. Acceptability of beef from Angus-Hereford or Angus-Hereford-Brahman steers finished on all-forage or a high-energy diet. *J. Anim. Sci.* 62:381-387.
- Byers, F. M. y Schelling, G. T. 1993. Los Lípidos en la Nutrición de los Rumiantes. En Church D.C. (editor) *El Rumiente. Fisiología Digestiva y Nutrición*. Acriba, S.A. Zaragoza España.
- Centro de Estadística Agropecuaria 1999. Indicadores de producción de carne en canal 1998-1999. SAGAR. México D. F.
- Centro de Estadística Agropecuaria 2000. Indicadores de producción de carne en canal 1998-1999. SAGAR. México D. F.
- Chilliar, Y. 1993. Dietary fat and adipose tissue metabolism in ruminants, pigs and rodents: a review. *J. Dairy Sci.* 76:3897-3931.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

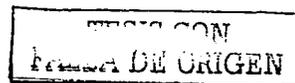
- Chilliar, Y., Ferlay, A., Faulconnier, Y., Bonnet, M., Roul, J., and Bocquier, F. 2000. Adipose tissue metabolism and its role in adaptations to undernutrition in ruminants. *Proc. Nut. Soc.* 59 :127-134.
- Cinti, S. 2001. The adipose organ: morphological perspectives of adipose tissues. *Proc. Nut. Soc.* 60:319-328.
- During, A., Hussain, M. M., Morel, D. W. and Harrison E. H. 2002. Carotenoid uptake and secretion by CaCo-2 cells: β -carotene isomer selectivity and carotenoid interaction. *J. Lipid Res.* 43:1086-1095.
- Emery, R. S. 1979. Mobilization, turnover and disposition of adipose tissue lipids. In: Digestive physiology and metabolism in ruminants. Proceedings of the 5th International Symposium on Ruminant Physiology. Clermont-Ferrand, France.
- Fawcett, D. W. 1995. Tratado de Histología. Interamericana•McGraw-Hill. Duodécima ed. Madrid España.
- Forrest, J. R. 1981. Effect of high concentrate feeding on the carcass quality and fat coloration of grass-reared steers. *Can. J. Anim. Sci.* 61:575-580.
- Frühbeck, G., Gómez-Ambrosi, J., Muruzábal, F. J. and Burrell, M. A. 2001. The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 280:827-847.
- Gregoire, F. M., Smas, C. M. and Sook, S. H. 1998. Understanding adipocyte differentiation. *Physiol. Rev.* 78 (3) :783-809.
- Gross, J. 1991. Pigments in vegetables. Avi Publishing.
- Holm, C., Osterlund, T., Laurell, H. and Contreras, J. C. 2000. Molecular mechanisms regulating hormone-sensitive lipase and lipolysis. *Annu. Rev. Nutr.* 20:365-393.
- Kiefer, C., Sumser, E., Wernet, M. and Lintig, J. 2002. A class B scavenger receptor mediates the cellular uptake of carotenoids in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99:10581-10586.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- Knight, T., Ridland, M., Hill, F., Death, A. and Wyeth, T. 1993. Effects of stress and nutritional changes on the ranking of cattle on plasma carotene concentrations. Proc. N. Z. Soc. Anim. Prod. 53: 455-456.
- Krogh, J. S., Bjørnbak, J. A. and Hermansen, J. 1999. Quantitative secretion and maximal secretion capacity of retinol, β -carotene and α -tocoferol into cow's milk. J. Dairy Res. 66:511-522.
- Lalikos, J. F., Ya-Qi, L., Timothy, P. R., James, W. D., Matory, W. E. and Lawrence, T. 1997. Biochemical assessment of cellular damage after adipocyte harvest. J. Surgical Res. 70:95-100.
- Lehninger, A. L; Nelson, D. L. y Cox, M. M. 1995. Principios de Bioquímica. Segunda Ed. Omega S. A. Barcelona España.
- McCaughey, W. P. and Cliplef, R. L. 1996. Carcass and organoleptic characteristics of meat from steers grazed on alfalfa/grass pastures and finished on grain. Can. J. Anim. Sci. 76:149-152.
- Mora, I. O. 1998. Estudios Sobre el Metabolismo de los Carotenoides en Bovinos para Prevenir la Pigmentación de la Grasa. Universidad Nacional Autónoma de México. Tesis Doctoral. México, D. F.
- Mora, O., Romano, J. L., González, E., Ruiz, F., Gómez, R. and Shimada, A. 2001 Presence of fed β -carotene in digesta, excreta, blood, and hepatic and adipose tissues of Holstein steers. Can. J. Anim. Sci. 81: 133 -139.
- Mora, O., Romano, J., González, E., Ruiz, F. and Shimada, A. 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., Romano, J., González, E., Ruiz, F. and Shimada, A. 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.
- Morgan, J. H. L., Pickering, F. S. and Everitt, G. C. 1969. Factors affecting yellow fat colour in cattle. Proc. New Zealand Soc. Anim. Prod. 29:164-175.



- Parker, R. S. 1996. Absorption, metabolism, and transport of carotenoids. *FASEB J.* 10:542-551.
- Pollack, J., Campbell, J., Potter, S. and Erdman, J. 1994. Mongolian Gerbils (*Meriones unguiculatus*) absorb β -Carotene intact from a test meal. *J. Nutr.* 124:869-873.
- Serrano, G. and Lepak, N. 1996. Endocrine and paracrine negative regulators of adipose differentiation. *Int. J. Obes* 20, Suppl. 3:S58-S64.
- Simonne, H. A, Green, N. R and Bransby, D. I. 1996. Consumer acceptability and β -carotene content of beef as related to cattle finishing diets. *J. Food Sci.* 61: 1254-1256.
- Smith, S. B. and Crouse, J. D. 1984. Relative contributions of acetate, lactate and glucose to lipogenesis in bovine intramuscular and subcutaneous adipose tissue. *J. Nutr.* 114:792-800.
- Strachan, D., Yang, A., and Dillon, R. 1993. Effect of grain feeding on fat colour and other carcass characteristics in previously grass-fed *Bos indicus* steers. *Austr. J. Exp. Agric.* 33: 269-273.
- Tee, S. E. 1992. Carotenoids and retinoids in human nutrition. *Critical Rev. Food Sci. Nut.* 31(1/2): 103-163.
- Thuahnai, S. T., Lund-Katz, S., Williams, D. L. and Phillips, M. C. 2001. Scavenger receptor class B, type I-mediated uptake of various lipids into cells: Influence of the nature of the donor particle interaction with the receptor. *J. Biol. Chem.* 276 (47):43801-43808.
- Trayhurn, P. and Beattie, J. H. 2001. Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. *Proc. Nut. Soc.* 60:329-339.
- Van Soest, P. J. 1994. *Nutritional Ecology of the Ruminant*. Second ed. Comstock Publishing. New York, USA.
- Yang, A., Larsen, T. W and Tume, R. K. 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.



- Yang, A., McLennan, S., Armstrong, J., Larsen, T., Shaw, F. and Tume, K. 1993. Effect of short-term grain feeding on bovine body-fat colour: a cautionary note. *Aust. J. Agric. Res.* 44: 215-220.
- Zhou, G. H., Yang, A. and Tume, R. K. 1993. A relationship between bovine fat colour and fatty acid composition. *Meat Sci.* 35:205-212.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN