



Efecto de la restricción calórico-proteica sobre la adipogénesis

Diana Rojas Negrete¹, Luis Salazar Olivo², José Romo Yáñez¹, y Rosalio Mercado Camargo^{*1}

¹Laboratorio de Neurobiología, Facultad de Químico Farmacobiología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Mich. 58240. ros421@hotmail.com. ²Instituto Potosino de Biotecnología Médica y Pecuaría del Instituto de Investigación Ciencia y Tecnología (IPICYT). olivo@ipicyt.edu.mx, jose.romo@ipicyt.edu.mx, San Luis Potosí

PALABRAS CLAVE

Desnutrición;
adipogénesis;
cultivos primarios;
diferenciación

RESUMEN

Estudios en animales muestran que la manipulación *in vitro* y agresiones nutricionales durante etapas embrionarias y fetales pueden favorecer el desarrollo de obesidad en la vida adulta. Se piensa que los estímulos o agresiones en estas etapas tempranas de vida originan consecuencias permanentes en el metabolismo, crecimiento, neuro-desarrollo y procesos patológicos como hipertensión, diabetes, aterosclerosis, entre otras. En este trabajo se estudió la proliferación, diferenciación y capacidad de acumulación lipídica *in vitro* de adipocitos procedentes de tejido muscular y tejido adiposo subcutáneo de ratas neonatas de la cepa Wistar para investigar si el modelo de restricción calórico proteica (RCP) al 50% en etapas tempranas de desarrollo puede ser una causa de programación que afecte el crecimiento y desarrollo celular. Los resultados muestran que efectivamente los adipocitos cultivados a partir de ratas neonatas desnutridas de dos días de edad, tienen una mayor capacidad de acumulación lipídica en comparación con cultivos control, no se encontraron cambios en la proliferación pero si en la diferenciación celular. Esto sugiere que la RCP durante la etapa de gestación es causa de cambios en el proceso de adipogénesis, probablemente debido a cambios hormonales.

ABSTRACT

Animal studies showed that embryo manipulation *in vitro* or nutritional insults during the embryonic and foetal stages of development may lead to obesity in the adult life. It is suggested that external stimuli in early life stages could be the origin of permanent changes in the metabolism, neuro-development and pathological process, such as hypertension, diabetes, and atherosclerosis. We studied the *in vitro* proliferation, differentiation and lipidic accumulation of adipocytes, isolated from muscular and subcutaneous adipose tissue of Wistar offspring to investigate whether the 50% caloric-proteic restriction model applied during gestation stage could be a possible cause of cell programming that might affect the cell grown and development. Our results showed that the adipocytes cultured from two days old malnourished rats have a higher capacity of lipidic accumulation in contrast to the control cultures. However, we did not find changes on the cell proliferation and differentiation process. Our results suggest that calorie-protein restriction during early life stages causes changes on the adipogenesis, probably due to hormonal changes.

KEYWORDS

Undernutrition;
adipogenesis;
primary cultures;
differentiation

INTRODUCCIÓN

Desnutrición calórico-proteica

Es definida como un estado clínico-patológico que se presenta cuando una dieta no es capaz de

satisfacer las necesidades corporales de proteínas, energía o ambas. Incluye una amplia variedad de manifestaciones clínicas, condicionadas por la intensidad relativa de la deficiencia de proteínas o de energía, la severidad y duración de las deficiencias, edad del paciente, causas de la deficiencia y asociación

con otras enfermedades nutricionales o infecciosas. La severidad de la desnutrición va desde la pérdida de peso o retardo del crecimiento, hasta distintos síndromes clínicos frecuentemente asociados con deficiencias de vitaminas o minerales (Olson *et al.* 2005). Las deficiencias dietéticas de fuentes calóricas y de proteínas suelen presentarse al mismo tiempo generando la desnutrición calórico-proteica (DCP), pero a veces una predomina y, si tiene la suficiente gravedad, puede conducir al síndrome clínico del *kwashiorkor* (predomina la deficiencia de proteínas) o de *marasmo* (predomina la deficiencia de calorías). La DCP puede clasificarse como *primaria*, los casos en que ocurre como consecuencia de una ingesta inadecuada de alimentos, o *secundaria*, cuando es el resultado de otras enfermedades que conducen a ingesta baja de alimentos, absorción o aprovechamiento inadecuados de nutrimentos, incremento de los requerimientos nutricionales, mayor pérdida de nutrimentos o ambos. Su inicio puede ser rápido, como en el caso de la inanición que se debe a la suspensión abrupta o gradual de la alimentación (Jiménez-Guerra, 2003). Debido a que los efectos adversos de la restricción proteico-calórica materna durante el embarazo en las madres y sus descendientes constituyen un gran problema de la salud pública, especialmente entre los países en desarrollo, con variado resultado en el crecimiento fetal, morbilidad, mortalidad y en el desarrollo inmediato y a largo plazo de los niños, se ha propuesto estudiar la restricción inducida en modelos de ratas durante el periodo prenatal, en donde se reportan disminuciones en el peso corporal y en la talla de las crías al nacer. Confirmando la posibilidad de que estas crías en la vida adulta puedan desarrollar enfermedades relacionadas con el Síndrome Metabólico.

Tejido adiposo

La obesidad es actualmente un problema que se ha extendido a nivel mundial y es asociado a una serie de alteraciones metabólicas y al desarrollo de enfermedades crónicas como diabetes mellitus tipo-2, en enfermedades cardiovasculares, hipertensión y otras (Douketis and Sharma, 2005; Uscategui *et al.* 2003). El tejido adiposo blanco está directamente implicado en obesidad y en cuadros patológicos asociados

(Alessis *et al.* 2003; Dwyer, 2005). Por tal motivo, el conocimiento de la biología del adipocitos es crucial para la comprensión de las bases moleculares de la obesidad y las patologías asociadas (Haque *et al.* 2004; Rosen and MacDougall, 2006). Se ha reportado que en animales obesos se produce un enorme aumento de los depósitos grasos blancos debido a la hiperplasia e hipertrofia de sus adipocitos. Estos fenómenos afectan de forma diferente a las diversas reservas grasas, siendo el depósito subcutáneo el que presenta un mayor incremento del contenido graso. Al igual que lo que ocurre en los animales aclimatados al calor, los depósitos grasos pardos aparecen menos coloreados, e histológicamente son más uniloculares y reactivos tanto para UCP1 como para leptina. (Cinti, 1997).

En animales obesos se produce un enorme aumento de los depósitos grasos blancos debido a la hiperplasia e hipertrofia de sus adipocitos. Estos fenómenos afectan de forma diferente a las diversas reservas grasas, siendo el depósito subcutáneo el que presenta un mayor incremento del contenido graso. Al igual que lo que ocurre en los animales aclimatados al calor, los depósitos grasos pardos aparecen menos coloreados e histológicamente son más uniloculares y reactivos tanto para UCP1 como para leptina (Cinti, 1997).

La restricción calórica durante el desarrollo gestacional puede tener un impacto significativo en los procesos de adipogénesis en la vida adulta, aunque los mecanismos responsables se desconocen. Por tal motivo en el presente trabajo se determinó la capacidad de diferenciación adiposa en tejidos de ratas neonatas desnutridas y controles.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron ratas hembras de 2 meses de edad de la cepa Wistar. Se mantuvieron a temperatura de 25 °C con un ciclo de 12 horas de luz y oscuridad. Las ratas hembras fueron sometidas a restricción alimenticia al 50% del alimento consumido por las ratas del grupo control Purina Chow por dos semanas.

*Dirección del Autor principal: Tzintzuntzan No. 173 Col. Matamoros. C. P. 58240, Morelia, Mich. Email: ros421@hotmail.com

Posteriormente, fueron cruzadas con machos de la misma especie. Las ratas madre continuaron con dietas de restricción alimenticia al 50% durante todo el proceso de la gestación. Al término de la gestación, las madres fueron sometidas a dieta *ad libitum*. Las ratas crías control y desnutridas fueron sacrificadas al segundo día de nacimiento de las cuales se aisló tejido muscular femoral y al décimo día el tejido adiposo subcutáneo. Para llevar a cabo la metodología se establecieron cultivos *in vitro* en donde las muestras de tejido muscular y adiposo subcutáneo obtenidas tanto del grupo control como del grupo experimental, se lavaron varias veces con solución PBS estéril que contenía albúmina de suero bovino (1 mg/ml) y antibióticos (estreptomina, 100 µg/ml, penicilina 100 U/ml y gentamicina 50 µg/ml), en condiciones asépticas. Los tejidos lavados se cortaron finamente y se digirieron con un solución de colagenasa (3 mg./ml) preparada en medio L15 durante 2 h a 37 °C en agitación continua. Las muestras digeridas se filtraron a través de una membrana de nylon con poro de 40 µm. Los filtrados se centrifugaron a 3,000 rpm. durante 7 min. y los sedimentos resultantes (precipitado celular) se resuspendieron, cada uno, en 5 ml. de medio de cultivo L15 adicionado con 10% de suero fetal bovino y antibióticos y se sembraron en cajas de cultivo. Los cultivos se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera convencional saturada de humedad. Al día siguiente se observó, el grado de crecimiento celular. Se procedió a lavar nuevamente con solución PBS para eliminar residuos celulares (eritrocitos) y purificar la muestra. Se resembró e incubó un día más. Se cuantificó la densidad celular inicial en los distintos tipos de células tanto procedente de ratas control y desnutridas mediante cuantificación microscópica.

Se cuantificaron los preadipocitos en *cámara de Neubauer* en 8 campos obteniendo una densidad celular inicial. Para estimar el número de preadipocitos, se contó el número de células con mayor refringencia en los 8 campos. Para obtener un número considerable de células, estas se transfirieron 5 veces. La técnica de transferencia nos permite expandir la población celular cuantas veces sea necesario, resembrarlas y llevar un control en la cinética de crecimiento o el grado de proliferación de las células. Brevemente, partiendo de los cultivos primarios, se retira el medio, se agrega 5 ml. de solución

“A” agitando suavemente y retirar inmediatamente. Adicionar de 1.5-2 ml. de EDTA y tripsina con la finalidad de desprender las células adheridas a la base de la caja de petri. Dejar reposar a 37 °C durante 6 min. Una vez verificado el desprendimiento celular en el microscopio, agregar medio L15 c.b.p 10 ml. transferir solución a tubo Falcon, centrifugar a 3000 r.m.p durante 6 min. Eliminar sobrenadante y la pastilla obtenida se resuspende en un volumen de 8 ml. y finalmente se cuantifica la población celular en hematímetro.

Cultivos de Células Musculares:

Se sembraron 2 cajas de petri de 32 mm. por duplicado con una densidad de 5×10^4 células/caja correspondientes a células musculares de rata neonata procedente de madre desnutridas y su respectivo control. Una vez proliferantes los cultivos se probaron dos tipos de medios de cultivo:

Medio Adipogénico para preadipocitos de rata.

L15, Insulina 5 µg/ml, Dexametasona 0.1 µM/L , Isobutilmetilxantina 10mM, Biotina 100 µM. SFB al 10%, solución de antibióticos (estreptomina 100 µg/ml y penicilina 100 U/ml.) y Gentamicina al 50 µg/ml.

Medio Basal para preadipocitos de rata.

L15, SFB al 10%, solución de antibióticos (estreptomina 100 µg/ml y penicilina 100 U/ml.) y Gentamicina al 50 µg/ml.

Cultivos de Células de Tejido Adiposo:

Se sembraron 2 cajas de petri de 32 mm. por duplicado con una densidad de 5×10^4 células/caja correspondientes a células de tejido adiposo subcutáneo de rata neonata procedente de madre desnutridas con su respectivo control. Se probaron los mismos medios de cultivo, tanto el adipogénico como basal en ratas desnutridas como control. Al tercer día de haber sido adicionados los respectivos medios, se cambió a un medio de mantenimiento. Se dejaron incubar durante 2 semanas a 37 °C hasta observar cambios de diferenciación.

Medio de Mantenimiento para preadipocitos de rata.

L15, Insulina 5 µg/ml, Dexametasona 0.1 µM/L , Biotina 100 µM. SFB al 10%, solución de antibióticos (estreptomina 100µg/ml y penicilina 100 U/ml.) y

Gentamicina al 50 µg/ml.

Tinción Rojo-Oleoso.

Una vez culminado los experimentos, se fijaron los cultivos de adipocitos con formaldehído al 3.7%, se dejó reposar por 30 min. Después se lavó suavemente con agua, se secaron y finalmente se tiñó con Rojo Oleoso O durante 5 hrs. Para cuantificar la acumulación lipídica de los adipocitos, se extrajo el colorante con Isopropanol absoluto y se tomaron lecturas de la Absorbancia a 510 nm.

Análisis Estadístico.

Para dicho análisis se obtuvo la media aritmética y la desviación estándar de los datos experimentales. Se aplicó el análisis de la "t" de student para comparar el grupo control contra el grupo experimental. El programa Graph Pad Prism ver 3.0., fue empleado para obtener los gráficos.

RESULTADOS

En la figura 1 se muestra el peso corporal de las ratas del grupo control y del grupo con RCP, en la cuál se puede apreciar disminución del peso corporal estadísticamente significativo del grupo con RCP en toda la etapa de la lactancia hasta el periodo de destete.

La figura 2 muestra la acumulación lipídica y la proliferación celular, se puede apreciar mayor diferenciación de las células musculares del grupo

control (2A) comparadas con las células del grupo con RCP (2B) en el medio basal, en la figura 2 C se muestra la acumulación lipídica de las células musculares del grupo control la cuál es mayor que la de las células del grupo con RCP cultivadas en un medio adipogénico (2D). En la Figura 3 se muestra el porcentaje de acumulación lipídica en el tejido muscular en los medios de cultivo basal y adipogénico, en la cuál se observa que la acumulación lipídica fue muy similar entre ambos grupos en el medio adipogénico.

En la figura 4 se observa la acumulación lipídica de las células de tejido subcutáneo adiposo de ratas neonatas del grupo control (4A) y del grupo con RCP (4B) en medio de cultivo adipogénico, el porcentaje de acumulación se observa en la figura 5, en la cuál se puede apreciar que la acumulación lipídica fue muy similar en ambos grupos a diferencia del medio basal en la cuál disminuye el porcentaje de acumulación lipídica en las células provenientes de ratas con RCP.

DISCUSIÓN

La aplicación de modelos experimentales de restricción calórico-proteica, ha sido hasta hoy en día, punto clave en el estudio de mecanismos relacionados con diversos síndromes metabólicos. El modelo experimental de este trabajo consiste en una restricción calórica-proteico (RCP) al 50% en etapas críticas de desarrollo prenatal. El hecho de que la nutrición materna pueda ser una causa de programación temprana de enfermedades en adultos, fue demostrado por Winick y Noble (1966), quienes por medio de modelos experimentales en animales observaron que una nutrición pobre durante la gestación deja una reducción irreversible del número de células en tejidos tales como el páncreas. Lo anterior fue demostrado mediante dos diferentes estrategias dietarias: restricción global nutricional y manipulación isocalórica baja en proteína, en donde la baja proteína materna se relaciona con cambios en el crecimiento fetal y enfermedades cardiovasculares tardías y diabetes.

De acuerdo a Bieswal *et al.* (2004) ha sido con comprobado que los cambios en procesos de adipogénesis en crías procedentes de madres con

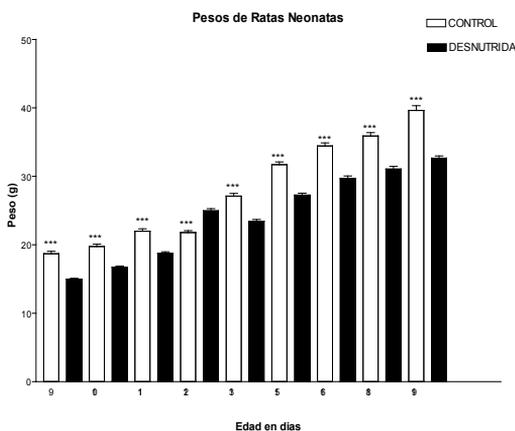


FIGURA 1. Peso corporal de ratas neonatas. $X \pm D.E$ 6 ratas de cada grupo. *** $P < 0.0001$.

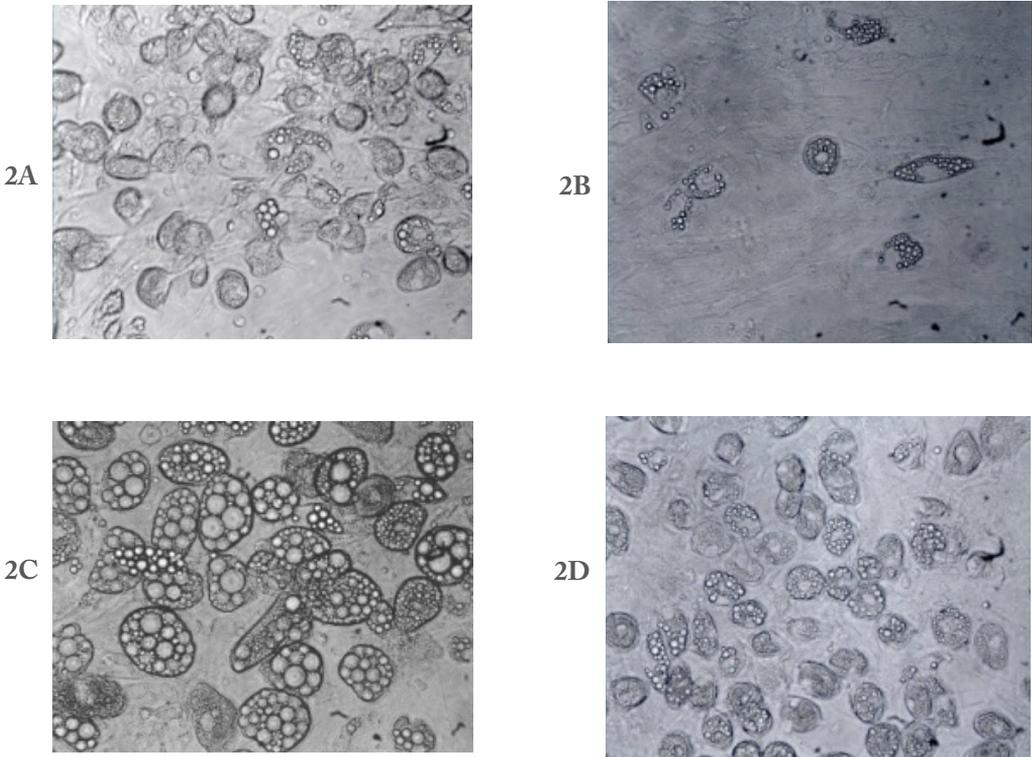


FIGURA 2. Cultivo de adipocitos de tejido muscular de ratas control (2A) y ratas con DCP (2B) en medio basal y en medio adipogénico (2C y 2D respectivamente).

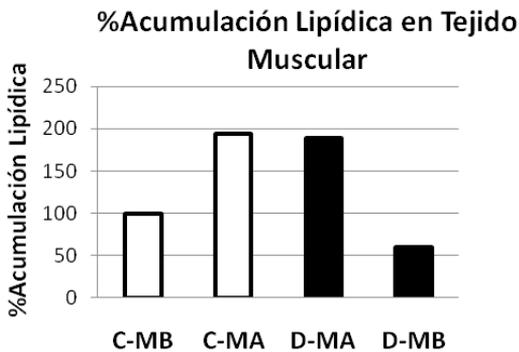


FIGURA 3. Acumulación lipídica en adipocitos procedentes de tejido adiposo subcutáneo. Comparación entre ratas control en medio adipogénico C-MA y ratas desnutridas en medio adipogénico D-MA.

dietas bajas en proteína durante etapas de gestación no resultan como efecto directo de una deficiencia nutricional sobre líneas de adipocitos, pero sí, como consecuencia de alteraciones en el ambiente hormonal.

Una de las herramientas actuales para analizar la proliferación y diferenciación de preadipocitos *in vitro* es el aislamiento de células estromales de tejido adiposo (Gregoire, 2001; Rosen and Spiegelman, 2000). Estudios en donde se ha realizado manipulación *in vitro* o agresión nutricional durante etapas embrionarias y fetales indican que esto favorece al desarrollo de obesidad a la vida adulta (Ravelli *et al.* 1999; Tamashiro *et al.* 2002). El modelo de RCP aplicado en este trabajo confirma la disminución de peso en el grupo de ratas desnutridas. Así mismo, en los cultivos de adipocitos procedentes de células musculares y de tejido adiposo subcutáneo, se observó una mayor acumulación lipídica en células de ratas

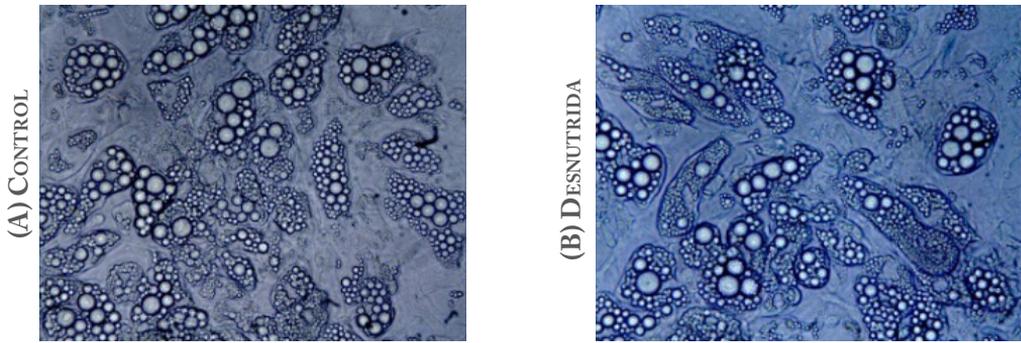


FIGURA 4. Acumulación lipídica de preadipocitos aislado tejido adiposo subcutáneo de ratas control (C) y desnutridas (D) tratadas con medio adipogénico (M.A). Las células fueron teñidas con Rojo Oleoso y se cuantificó la Absorbencia a 510 nm. Entre C-MB y D-MB el valor de $X \pm D.E$ es $**P < 0.01$. Entre D-MA y D-MB $**P < 0.01$.

desnutridas.

Lo que sugiere que por algún mecanismo hasta ahora desconocido, la rata madre debido a las agresiones externas tales como la RCP, programa a los embriones a través de señales bioquímicas u hormonales a que incrementen capacidad de acumulación lipídica en los adipocitos. Lo anterior se cree que es una estrategia energética en donde la rata madre prepara a sus crías para sobrevivir a periodos de escasas alimenticia, usando la grasa como la mejor forma de almacenamiento energético. Así mismo, incrementa la probabilidad de desarrollar obesidad en la vida adulta y por ende el desarrollo de una serie de trastornos metabólicos como lo son las enfermedades cardiovasculares y la enfermedad de la diabetes, entre otras.

Una de los puntos importantes a tratar, es que aún cuando se observa una mayor capacidad de acumulación lipídica en cultivos de ratas neonatas desnutridas, el peso se mantiene bajo con comparación con las ratas control. Sin embargo de acuerdo a previos análisis donde se evalúa el índice de masa corporal (IMC) este se ve afectado por la desnutrición y presenta cifras bajas.

Algunos autores (Langley-Evans, 2000, Langley-Evans *et al.* 2005, Langley-Evans y Sculley 2006) concluyen que diferentes manipulaciones en una dieta baja en proteína (de 8-9%) durante el embarazo en ratas provoca diferentes efectos de programación, y que el balance de proteína con otros nutrientes puede ser una determinante crítica en los efectos a largo plazo en la salud de la desnutrición materna durante el embarazo, sin embargo, no está claro como la restricción proteica materna perturba el crecimiento fetal.

Finalmente puede sugerirse que factores ambientales como la desnutrición, (considerados como posibles factores epigenéticos) en etapas de desarrollo embrionario, modulan de manera indirecta cambios en la capacidad de acumulación lipídica en adipocitos de ratas.

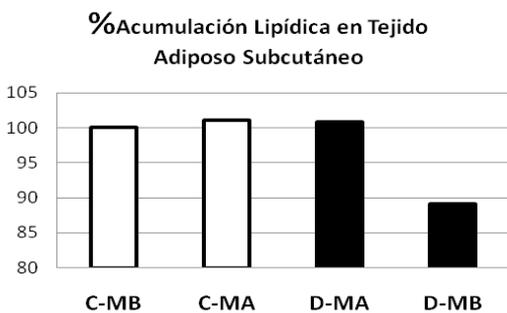


FIGURA 5. Porcentaje de acumulación lipídica en adipocitos de tejido adiposo subcutáneo de ratas control y ratas con RCP.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue apoyado, parcialmente, por: CIC-

U.M.S.N.H.26.2 (2009), COECyT-U.M.S.N.H. CONACyT-2004-C01-45804.

REFERENCIAS

- Alessis, M. C., Lijnen, H. R., Bastelica, D., and Juhan, V. (2003). Adipose tissue and atherothrombosis. *Pathology Haemost. Thromb.* 20: 290-297.
- Bieswal, Hay, McKinnon, Reusens, Cuignet, Rees, Remacle. (2004). Prenatal Protein Restriction Does Not Affect the proliferation and Differentiation of Rat Preadipocytes. *J. Nutr.* 134: 1493-1499.
- Cinti, S. (1997). Adipose tissue morphology: basic concepts and insights. En: Guy-Grand B, Ailhaud G, editores. *Progress in Obesity Research.* 8. London: John Libbey & Company Ltd, 3-12.
- Douketis, J. D., and Sharma, A. M. (2005). Obesity and cardiovascular disease: pathogenic mechanisms and potential benefits of weight reduction. *Semin. Vasc. Med. Fed.* 5: 25-33.
- Dwyer, J. (2006). Necesidades de nutrientes y valoración de la alimentación. En *Principios de Medicina interna* (Kasper, Braunwald, Fauci, Hauser, Longo, Harrison eds.), Edit. Mc Graw-Hill. Capítulo IV: 447486.
- Gregoire, F. M. (2001). Adipocyte differentiation: from fibroblast to endocrine cell. *Exp. Biol. Med.* 11: 997-1002.
- Haque, W. A., and Gard, A. (2004). Adipocyte biology and adipocytokines. *Clin. Lab. Med.* 25: 217-234.
- Jiménez-Guerra, S. D. (2003). Indicadores de desnutrición proteico-calórica. *Rev. Cub. Med. Int. Emerg.* 2: 29-34.
- Langley-Evans, S. C. (2000). Critical differences between two low protein diet protocols in the programming of hypertension in the rat. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 51:11-17.
- Langley-Evans, S. C. and Sculley, D. V. (2006). The association between birth weight and longevity in the rat is complex and modulated by maternal protein intake during fetal life. *FEBS Lett.* 580: 4150-4153.
- Langley-Evans, S. C., Bellinger, L., y McMullen, S. (2005). Animal models of programming: early life influences on appetite and feeding behaviour. *Matern. Child. Nutr.* 1:142-148.
- Olson, R.E. (2005). Trastornos de la Nutrición y el Metabolismo. *Alteraciones de la nutrición.* Manual Merck de Información Médica. Edit. Océano. Capítulo 133.
- Ravelli, A. C. J., van der Meulen, J. H. P., Osmond, C., Barker, D. J. P. and Bleker, O. P. (1999). Obesity at the age of 50 y in men and women exposed to famine prenatally. *Am. J. Clin. Nutr.* 70: 811-816.
- Rosen, E. D., and Spiegelman, B. M. (2000). Molecular regulation of adipogenesis. *Ann. Rev. Cell. Dev. Biol.* 16: 145-171.
- Rosen, E. D., MacDougall, O. A. (2006). Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12:885-896.
- Tamashiro, K. L., Wakayama, T., Akutsu, H., Yamazaki, Y., Lachey, J. L., Wortman, M. D., Seeley, R. J., D'Alessio, D. A., Woods, S. C., Yanagimachi, R. and Sakai, R. R. (2002). Cloned mice have an obese phenotype not transmitted to their offspring. *Nat. Med.* 8: 262-267.
- Uscategui, P. R., Pérez, G. J. Ristizabal, R. J., Camacho, P. J. (2003). Excess of weight and their relationship with high blood pressure in school children and adolescents of Medellin, Colombia. *Arch. Latinoam. Nutr.* 53: 376-82.
- Winick, M., and Noble, A. (1966). Cellular response in rats during maturation at various ages. *J. Nutr.* 89: 300-306.