

**Acknowledgments: We are indebted to the “Mitr solutions”
company, Spain, for this support.**



**INFLUENCIA DE UNA MUESTRA DE PECTINA MODIFICADA
SOBRE EL PROCESO DE ADIPOGENESIS EN ADIPOCITOS
MURINOS**

(La pectina modificada MPC – Galina Ignatyeva)

INFORME 28-11-20

El objetivo principal de este trabajo fue estudiar el efecto de una muestra de pectina modificada sobre la diferenciación de preadipocitos de ratón 3T3-L1 a adipocitos maduros, a través del análisis de la formación de depósitos de triglicéridos en gotas lipídicas.

Para estudiar el proceso de adipogénesis el modelo mejor caracterizado *in vitro* es la línea celular 3T3-L1 de embrión de ratón. Esta es una sublínea de 3T3 (albino suizo) se desarrolló a través del aislamiento de un clon caracterizado por la diferenciación que sufren de preadipocitos a adipocitos cuando pasan de un estado proliferativo a uno de confluencia e inhibición por contacto.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Materiales

La línea celular 3T3-L1 fue adquirida a American Type Culture Collection (Manassas, VA, EE.UU.). Dexametasona (DEX), 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX), insulina, cristal violeta y etanol se obtuvieron de Sigma-Aldrich (Europa). El medio de cultivo (DMEM), suero de ternero (CS), suero fetal bovino (FBS), y la mezcla de antibióticos (penicilina-estreptomicina) fueron adquiridos a laboratorios PAA (GmbH, Linz, Austria). Piruvato de sodio y EDTA-tripsina se obtuvieron de la compañía Invitrogen (Carlsbad, CA). Los filtros de 0,22µm de polivinildifluoride (PVDF) fueron adquiridos a Millipore (Bedford, MA). El reactivo AdipoRed™ se obtuvo de Lonza (Walkersville, MD, EE.UU.). En este trabajo se empleó agua bidestilada y desionizada. Como muestras se emplearon: pectina modificada (PM) realizada por la empresa Mitra Solutions SL en la fecha: 28.06.2011 (**suministrada por G. Ignatieva**). La muestra de pectina constaba de las siguientes características: peso molecular de 20 KDa y un 5% de grado de esterificación. En la **Figura 2** se muestra un esquema del proceso de obtención. Las otras muestras que se emplearon como referencia fueron: Acido poligalacturónico, Pectina (**Extractos de Citricos, S.L.**; Sigma Aldrich, EEUU) y Extracto de chitosano (Monteoleder SL, Elche).

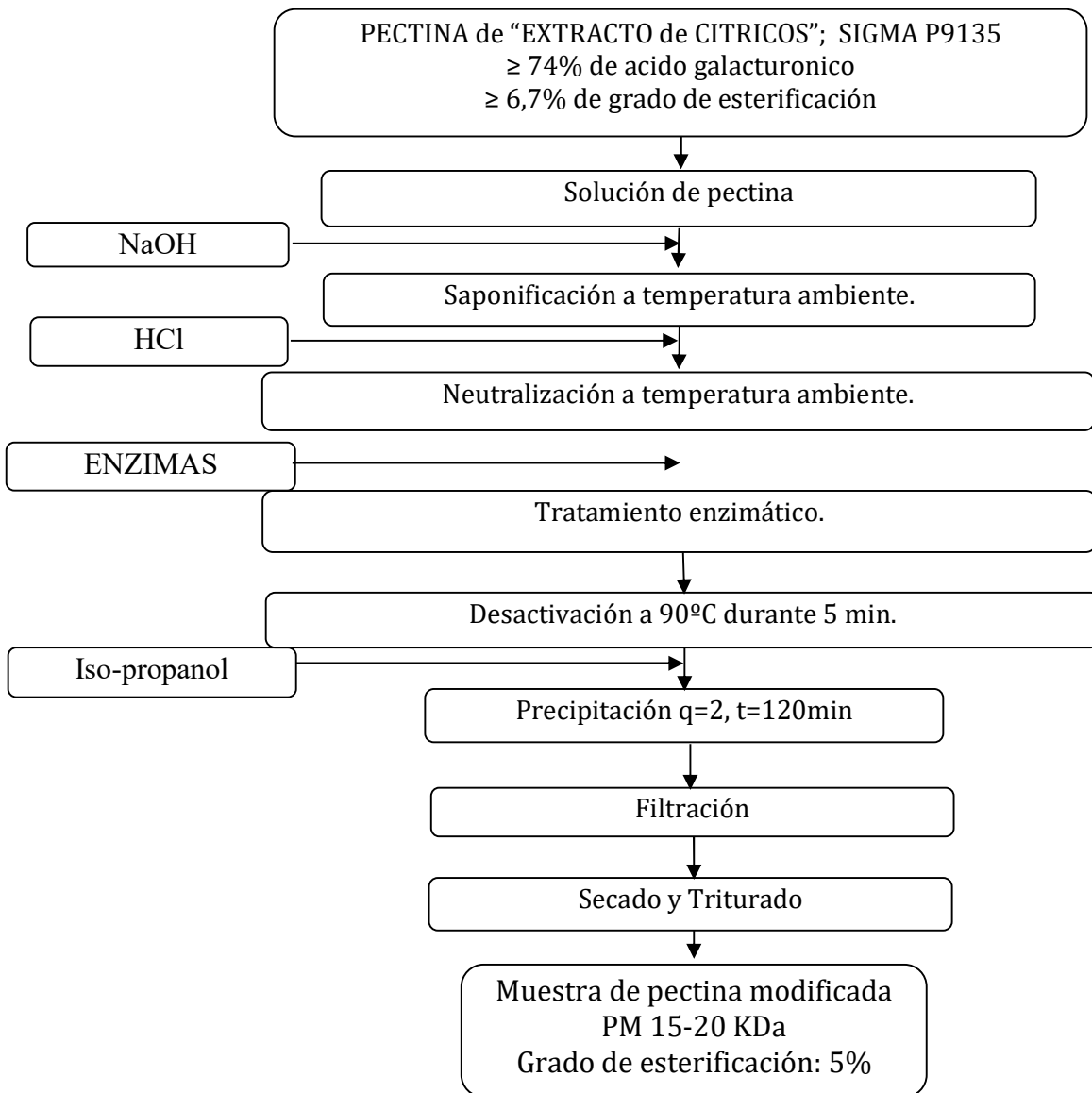


Figura 2. Esquema de obtención de la pectina modificada

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para investigar los posibles efectos de la muestra de pectina modificada (PM) en comparación con los controles (pectina sin modificar, ácido poligalacturónico y quitosano) en la diferenciación de adipocitos, se añadieron dos concentraciones de la muestra de PM (1000 y 500 mg/l) a células 3T3-L1 confluentes durante la inducción de la diferenciación. A intervalos de 48 horas se reemplazó el medio por medio fresco y se añadieron las muestras en las mismas condiciones. En los

controles (adipocitos diferenciados), se observó como el proceso de adipogénesis inducido *in vitro* provocó profundos cambios morfológicos y funcionales: las células adquirieron una morfología redondeada y comenzaron a acumular lípidos en su interior los cuales se observaron al microscopio como gotas citoplasmáticas teñidas de rojo mediante el colorante adipored. Estos resultados nos permitieron confirmar que nuestro cultivo respondió al estímulo de diferenciación y que efectivamente las células se transformaron en adipocitos maduros.

Observaciones microscópicas de las células tratadas en condiciones óptimas de diferenciación, revelaron que las muestras de quitosano, pectina y pectina modificada produjeron una inducción significativa del proceso de diferenciación (Figura 3 C, D y E).

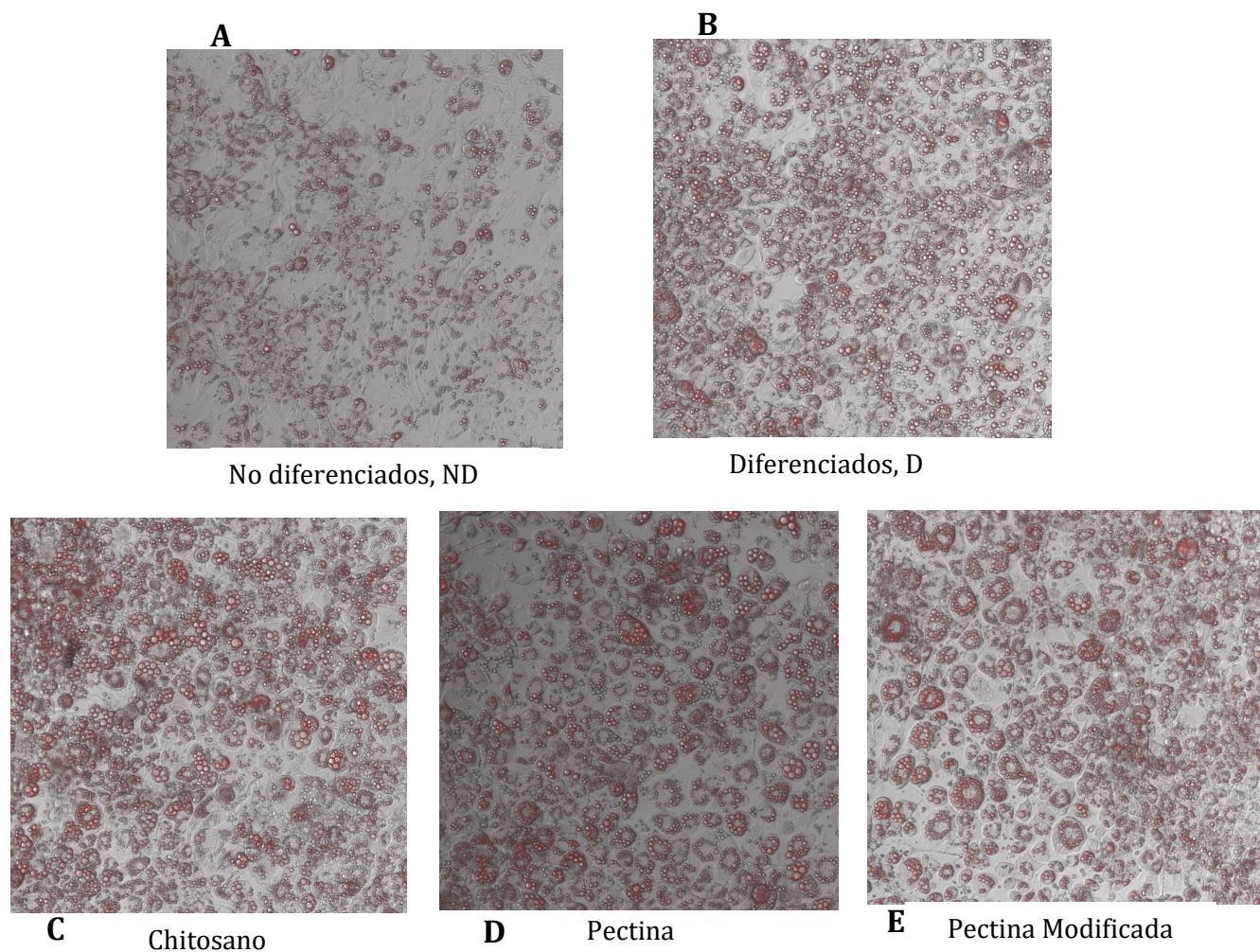


Figura 3. Fotografías de observaciones microscópicas de las células tratadas en condiciones óptimas de diferenciación

Las células tratadas con agentes adipogénicos y que contenían además 1000 $\mu\text{g/ml}$ de la pectina modificada acumularon un $120 \pm 2 \%$ de triglicéridos intracelulares respecto al control positivo tratado con los mismos agentes, como lo demuestra la Figura 4. Para excluir posibles efectos citotóxicos o antiproliferativos de los polisacaridos, se midió la viabilidad celular en las mismas condiciones. Solamente la muestra de ácido poligalácturónico a 500 mg/l mostro efectos citotóxicos en los adipocitos.

4. CONCLUSIONES

Los resultados indican una estimulación del proceso de adipogénesis por parte de las muestras empleadas, lo cual indicaría que los compuestos son capaces de interaccionar con las células e incluso atravesar la membrana. Sin embargo este ensayo debe repetirse para confirmar los resultados obtenidos. En el próximo ensayo también se realizara una determinación de la cantidad de compuesto que se incorpora a la célula (cell uptake).