



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR

**El Neuropeptido AF es un Inhibidor irreversible
de la adipogénesis**

Tesis que presenta

Mireya Liliana Herrera Herrera

Para obtener el grado de

Maestra en Ciencias en Biología Molecular

Director de la Tesis:

Dr. Luis Antonio Salazar Olivo

San Luis Potosí, S.L.P., Agosto de 2004.



Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

COPIA CERTIFICADA

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 005 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 12 días del mes de agosto del año 2004, se reunió a las 10:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

| | | |
|---|-------------------|---------------|
| Dr. Rubén Hipólito López Revilla | Presidente | IPICYT |
| Dr. Carlos Barajas López | Secretario | IPICYT |
| Dr. Luis Antonio Salazar Olivo | Sinodal | IPICYT |

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó la C.

Mireya Liliana Herrera Herrera

sobre la Tesis intitulada:

El Neuropeptido AF es un Inhibidor irreversible de la adipogénesis

que se desarrolló bajo la dirección de

Dr. Luis Antonio Salazar Olivo

El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 12:00 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fé el Secretario Académico del Instituto.

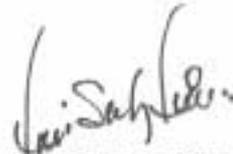
A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 12 días del mes agosto de 2004.


Dr. Marcial Bonilla Marm
Secretario Académico


Mtra. Ma. Elisa Lucio Aguilar
Jefa del Departamento de Asuntos Escolares



La presente tesis de maestría en ciencias en la especialidad de biología molecular fue elaborada por Mireya Liliana Herrera Herrera y aprobada el 03 de agosto de 2004 por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores del Departamento de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.



Dr. Luis Salazar Olivo



Dr. Rubén López Revilla



Dr. Carlos Barajas López

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Biotecnología Médica y Pecuaria del Departamento de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección del Dr. Luis Salazar Olivo. Durante la realización del trabajo la autora recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (no. de registro 172319).

DEDICATORIAS

A mis papás Juan y Lupita: por su apoyo, comprensión y confianza en cada uno de los pasos que he dado.

A mis hermanos Verónica, Roxana y Juan por su tiempo para escuchar y por todo el apoyo que me han brindado.

A mi novio Hugo: por apoyarme, acompañarme, y por confiar en mí y por estar conmigo siempre.

Gracias por todo.

AGRADECIMIENTOS

**A mi asesor el Dr. Luis Salazar por cada una de sus enseñanzas y consejos.
A Rebeca a Claudia y a Cytllalic por su apoyo y colaboración en el
laboratorio.**

Gracias.

ÍNDICE

| | |
|-------------------------------------|----|
| Hoja de aprobación de la tesis..... | 2 |
| Dedicatorias..... | 4 |
| Agradecimientos..... | 5 |
| | |
| Lista de tablas..... | 7 |
| Lista de figuras..... | 8 |
| Resumen..... | 9 |
| Abstract..... | 10 |
| | |
| Introducción..... | 11 |
| Material y Métodos..... | 13 |
| Resultados..... | 15 |
| Discusión..... | 19 |
| Referencias..... | 22 |

LISTA DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Oligonucleótidos empleados en el análisis de la expresión de genes involucrados en la diferenciación adiposa y productos de RT-PCR esperados..... | 25 |
| Tabla 2. Condiciones para el análisis de la expresión génica mediante RT-PCR semicuantitativa | 26 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Efecto de los neuropéptidos NPAF, NPFF y NPSF sobre la diferenciación de preadipocitos..... | 27 |
| Figura 2. Efecto de la concentración de los neuropéptidos NPAF, NPFF y NPSF sobre la inhibición de la adipogénesis de células 3T3-F442A..... | 28 |
| Figura 3. Efecto antiadipogénico irreversible del neuropéptido NPAF | 29 |
| Figura 4. Análisis semicuantitativo de la expresión de diversos genes que participan en la diferenciación adiposa..... | 30 |
| Figura 5. Efecto de NPAF sobre la expresión de Id3..... | 32 |

RESUMEN

Los neuropéptidos FF (NPFF) y AF (NPAF), los cuales participan en la modulación del dolor, en la analgesia por opioides y el desarrollo de la tolerancia a estos compuestos, también modulan las funciones cardíaca y vascular, la secreción de insulina y somatostatina, así como el consumo de alimento y la temperatura corporal. En adipocitos 3T3-L1 terminalmente diferenciados NPFF y NPAF alteran la expresión de genes que inducen o inhiben la adipogénesis, pero se ignora el papel que estos neuropéptidos pudieran tener sobre el proceso mismo de la diferenciación adiposa. Para determinar si NPAF y otros dos neuropéptidos, NPFF y NPSF, afectan la adipogénesis evaluamos su efecto sobre la diferenciación de los preadipocitos 3T3-F442A. La acumulación intracitoplásmica de triglicéridos, un rasgo principal de la adipogénesis terminal, fue inhibida por cada neuropéptido en función de la concentración. A la concentración de 1 nM NPFF indujo un 8% de inhibición, NPAF un 33% y NPSF un 68%, mientras que a la concentración de 1 μ M NPFF indujo un 52% de inhibición de la diferenciación, NPAF un 78% y NPSF un 81%. El efecto antiadipogénico NPAF no revirtió cuando el neuropéptido se retiró del medio de cultivo y las células se realimentaron con medio adipogénico, sugiriendo que NPAF inhibe la adipogénesis en forma irreversible, previniendo el establecimiento del compromiso a la diferenciación. El tratamiento de los preadipocitos 3T3-F442A con NPAF durante las primeras 48 h de confluencia duplicó la expresión de Id3, un factor de transcripción cuya sobreexpresión previene la adipogénesis. Nuestros resultados muestran que los neuropéptidos NPFF, NPAF y NPSF inhiben la diferenciación adiposa de las células 3T3-F442A y que el efecto de NPAF es irreversible y parece ser mediado por la sobreexpresión de Id3.

Palabras clave: 3T3-F442A, adipogénesis, neuropéptidos amidados, Id3

ABSTRACT

Neuropeptides FF (NPFF) and AF (NPAF), which participate in pain modulation opioid analgesia and tolerance development, also modulate cardiac and vascular function, insulin and somatostatin secretion, food intake and body temperature. In terminally differentiated 3T3-L1 adipocytes, NPFF and NPAF modulate the expression of transcription factors that both induce or inhibit adipogenesis, but it is unknown the role that these neuropeptides could have on the adipogenic process itself. To determine whether NPAF or related neuropeptides NPFF and NPSF affect adipogenesis we assayed their effect on differentiation of 3T3-F442A preadipocytes. The intracytoplasmic triglyceride accumulation, a main trait of 3T3 adipogenesis, was inhibited by each neuropeptide in a concentration-dependent manner. At concentration of 1 nM NPFF reduced triglyceride accumulation by 8%, NPAF by 33%, and NPSF by 68%, whereas at 1 μ M NPFF inhibited differentiation by 52%, NPAF reduced the process by 78%, and NPSF by 81%. The antiadipogenic effect of NPAF was not reverted when the neuropeptide was removed from the culture medium and cells were refed with adipogenic medium, suggesting that NPAF inhibits adipogenesis in an irreversible manner by preventing the establishment of cell commitment to adipogenic differentiation. Treatment of 3T3-F442A preadipocytes with NPAF during the first 48 h in confluence duplicate the expression of Id3, a transcription factor whose overexpression prevents adipogenesis. Our results show that the neuropeptides NPFF, NPAF and NPSF inhibit adipose differentiation of 3T3-F442A cells and that NPAF effect is irreversible and seems to be mediated by the overexpression of Id3.

Key words: 3T3-F442A, adipogenesis, neuropeptides, Id3

INTRODUCCIÓN

El metabolismo energético y el desarrollo del tejido adiposo son fuertemente influidos por el sistema nervioso. Además de la inervación simpática (Bowers y cols., 2004) y parasimpática (Fliers y cols., 2003) del tejido adiposo, el sistema nervioso central produce múltiples señales que afectan diversas funciones de este tejido. Si bien muchas de estas señales y sus mecanismos de acción son conocidos, otras no se han estudiado en detalle, y los avances en este campo probablemente ampliarán nuestra visión de enfermedades como hiperlipidemia, lipodistrofia y diabetes mellitus tipo 2.

El octapéptido NPF y otros péptidos similares al péptido FMRFamida, descrito inicialmente en moluscos (Price y Greenberg, 1977) constituyen una familia numerosa de neuropéptidos amidos ampliamente distribuidos en invertebrados (Greenberg y Price, 1992) y en vertebrados (Panula y cols., 1996; Roumy y Zajac, 1998). Estos neuropéptidos participan en la modulación del dolor, en la analgesia por opioides y el desarrollo de la tolerancia a éstos, pero tienen también diversos efectos periféricos. NPF y NPAF participan en la modulación de la función cardíaca y vascular (Allard y cols., 1995; Laguzzi y cols., 1996), la secreción de insulina y somatostatina (Sorenson y cols., 1984; Fehmann y cols., 1990), la producción de aldosterona suprarrenal (Labrousche y cols., 1998), así como del consumo de alimento (Murase y cols., 1996) y la temperatura corporal (Desprat y Zajac, 1997).

El gen que codifica estos neuropéptidos se ha descrito recientemente en humanos, ratas, ratones y bovinos (Perry y cols., 1997; Vilim y cols., 1999). NPF, NPAF y NPSF se generan a partir de un propéptido común codificado por un gen cuya expresión está limitada a regiones discretas del sistema nervioso central que incluyen el hipotálamo, la médula y la cresta dorsal de la medula espinal (Elshourbagy y cols., 2000). La detección de secreción pulsátil de NPF en plasma humano sugiere que los péptidos podrían actuar como hormonas (Sundblom y cols., 1998). Esta sugerencia es reforzada por los diversos efectos de estos neuropéptidos sobre funciones no neurales, así como por la expresión en órganos periféricos de los receptores que median su acción. Los neuropéptidos

amidados ejercen sus efectos a través de dos receptores membranales denominados NPFF-R1 y NPFF-R2, los cuales están acoplados a proteína G (Elshourbagy y cols., 2000). Si bien estos receptores muestran una amplia expresión en diversas áreas de los sistemas nerviosos central y periférico, NPFF-R2 es fuertemente expresado en tejido adiposo y placenta. La expresión de NPFF-R2 en el tejido adiposo sugiere que los neuropéptidos amidados podrían desempeñar algún papel en el metabolismo y el desarrollo de este tejido.

Los adipocitos 3T3-L1 terminalmente diferenciados expresan el receptor NPFF-R2 y la expresión de diversos genes en estas células es afectada por los neuropéptidos NPFF y NPAF (Lefrère y cols., 2002). NPFF induce en estas células la sobreexpresión de C/EBP β , un factor de transcripción que participa en la inducción de la adipogénesis, y de Id1 e Id2 (Lefrère y cols., 2002), dos factores de transcripción que previenen la diferenciación adiposa. Por su parte NPAF induce la sobreexpresión de C/EBP α y C/EBP β , y de Id1, Id2 e Id3. Ambos neuropéptidos inducen también una ligera subexpresión de PPAR γ (Lefrère y cols., 2002), otro factor de transcripción que participa en la inducción de la diferenciación adiposa. Puesto que los resultados anteriores se obtuvieron con adipocitos terminalmente diferenciados, se ignora el efecto que éstos neuropéptidos pudieran tener sobre el proceso mismo de la diferenciación adiposa.

El objetivo central de este estudio fue evaluar los efectos de los neuropéptidos amidados NPFF, NPAF y NPSF sobre la diferenciación de los preadipocitos 3T3-F442A, una línea celular extensamente usada como modelo de estudio de la diferenciación adiposa (Gregoire y cols., 1998; Ntambi y Kim, 2000). En este modelo evaluamos el efecto de los neuropéptidos sobre la diferenciación adiposa terminal, medida por la acumulación intracitoplásmica de triglicéridos, así como la expresión de factores de transcripción que participan en los eventos tempranos de la diferenciación adiposa.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo celular

Cultivos preconfluentes de preadipocitos 3T3-F442A se indujeron a diferenciación con medio adipogénico (MA) consistente en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; Gibco BRL; Grand Island, NY) adicionado con 7% de suero de ternera (Gibco, BRL), insulina 5 µg/ml y biotina 1 µM en presencia de distintas concentraciones de NPAF, NPFF o NPSF (Sigma Chemical Co.; St. Louis, MO) durante siete días de postconfluencia. Cultivos paralelos usados como control recibieron MA adicionado con ácido retinoico (Sigma Chemical Co.), un inhibidor conocido de la adipogénesis en células 3T3 (Kuri-Harcuch, 1982; Salazar-Olivo y cols., 1994), o medio no adipogénico (MNA) consistente en DMEM adicionado con 2% de suero de gato adulto, insulina 5 µg/ml y biotina 1 µM, una condición de cultivo que no promueve la diferenciación de los preadipocitos 3T3 ni previene la manifestación fenotípica de preadipocitos comprometidos a la diferenciación terminal (Kuri-Harcuch y Green, 1978).

Cuantificación de la diferenciación adiposa

Las monocapas celulares de los distintos tratamientos se fijaron con formaldehído al 4% en PBS y se tiñeron con una solución saturada de rojo oleoso O (Sigma Chemical Co.) durante 4 h. La acumulación de triglicéridos se cuantificó espectrofotométricamente (Ramírez-Zacarías y cols., 1992). El 100% de diferenciación adiposa se estimó restando la absorbencia obtenida en el tratamiento con MNA (acumulación lipídica de fondo) a la absorbencia del tratamiento con MA. El porcentaje de diferenciación en los tratamientos restantes se estimó mediante la fórmula:

$$\% \text{ de diferenciación} = \frac{AbsT - AbsMNA}{AbsMA - AbsMNA} \times 100$$

donde $AbsT$ es la absorbencia del tratamiento respectivo, $AbsMNA$ es la absorbencia del tratamiento en medio no adipogénico, y $AbsMA$ es la absorbencia del tratamiento con medio adipogénico.

RT-PCR

El RNA total de preadipocitos y adipocitos 3T3-F442A bajo diferentes condiciones de cultivo y a diferentes tiempos del proceso de diferenciación se extrajo por el método de isotiocianato de guanidina (Chomczynski y Sacchi, 1987). El cDNA se sintetizó a partir de 2 µg de RNA total usando transcriptasa reversa (Promega; Madison, WI) en presencia de oligo dT durante 1 h a 42°C. La PCR se realizó en mezclas de reacción (25 µl) con 1 µl de la mezcla de la reacción de transcriptasa reversa (cDNA), dNTP 200 µM, MgCl₂ 2 mM, una unidad de *Taq* DNA polimerasa y 20 pmoles de oligonucleótidos específicos para los factores de transcripción C/EBPβ, y PPARγ, Id1, Id2, Id3, para aP2, una proteína de unión a ácidos grasos específica de adipocitos, o para la enzima gliceraldehido fosfato deshidrogenasa (GAPDH), codificada por un gen constitutivo empleado como control (Tabla 1).

Las condiciones para la PCR fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 94°C durante 5 min, desnaturalización secundaria 30 s a 94°C, 30 s a la temperatura de alineación para cada pareja de oligonucleótidos específicos de cada gen, y 1 min a 72°C, de 17 a 30 ciclos y extensión final a 72°C durante 5 min. Los productos de amplificación se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 2% y se tiñeron con bromuro de etidio. Las imágenes de los geles se obtuvieron con un documentador ChemicDoc EQ (Bio-Rad; Hercules, CA). La expresión de los mRNAs para GAPDH, C/EBPβ, PPARγ, Id1, Id2, Id3, y aP2 se cuantificó por densitometría de los productos de amplificación obtenidos con oligonucleótidos específicos a lo largo de un número variable de ciclos de PCR y los resultados se graficaron en unidades relativas a la expresión de GAPDH en cada tratamiento (Tabla 2).

Análisis Estadístico

Todos los datos son expresados como la media ± desviación estándar de tres experimentos. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA, con un nivel de significancia de 0.05.

RESULTADOS

Los neuropéptidos NPAF, NPFF y NPSF inhiben la adipogénesis terminal de los preadipocitos 3T3-F442A

El neuropéptido AF se une a la membrana plasmática de adipocitos 3T3-L1 terminalmente diferenciados con afinidad nanomolar y altera la expresión de diversos genes en estas células (Lefrère y cols., 2002). Aunque NPAF afecta la expresión de factores de transcripción que inducen o inhiben la adipogénesis en adipocitos terminales, se ignora si también afecta la diferenciación de los preadipocitos 3T3.

Para determinar si NPAF y otros neuropéptidos relacionados afectan la diferenciación adiposa, tratamos cultivos preconfluentes de preadipocitos 3T3-F442A con medio adipogénico en ausencia o en presencia de una concentración 1 μ M de NPAF, NPFF o NPSF. Cultivos paralelos se mantuvieron con medio adipogénico adicionado con ácido retinoico 1 μ M, un inhibidor adipogénico conocido (Kuri-Harcuch, 1982; Salazar-Olivo y cols., 1994), o con medio no adipogénico, una condición de cultivo que no induce la diferenciación de estas células (Kuri-Harcuch y Green, 1978). El grado de diferenciación alcanzado en cada tratamiento se cuantificó al séptimo día de cultivo en las monocapas celulares teñidas con rojo oleoso O (Ramírez-Zacarías y cols., 1992). Los tres neuropéptidos inhibieron la acumulación lipídica, el rasgo principal de la adipogénesis terminal de las células 3T3 (fig. 1), aunque con diferente potencia (NPFF<NPAF<NPSF). NPFF indujo un 63% de inhibición de la diferenciación, en tanto que NPAF redujo el proceso en un 78% y NPSF en un 81%.

El efecto antiadipogénico de los neuropéptidos NPAF, NPFF y NPSF depende de su concentración

Para determinar si el efecto inhibitorio de los neuropéptidos depende de la concentración, tratamos cultivos preconfluentes de preadipocitos 3T3-F442A con medio adipogénico y diferentes concentraciones de NPAF, NPFF o NPSF. Al cabo de siete días de cultivo, la acumulación intracitoplásmica de triglicéridos se cuantificó en las monocapas celulares teñidas con rojo oleoso O. En los tres casos

el efecto inhibitorio de la diferenciación dependió de la concentración del neuropéptido, aunque éstos mostraron diferente potencia (fig. 2). NPFF 1 nM inhibió la adipogénesis en sólo un 8%, en tanto que 1 μ M redujo la diferenciación en un 52% y 10 μ M en un 60%. Por su parte, NPAF 1 nM dio lugar a un 33% de inhibición, 1 μ M de NPAF a un 78% y 10 μ M a un 79%. Asimismo, distintas concentraciones de NPSF indujeron diferente grado de inhibición de la adipogénesis: 1 nM un 68%, 1 μ M 81% y 10 μ M un 83%. De los tres neuropéptidos NPFF tuvo la menor potencia antiadipogénica, con una concentración inhibitoria media (CI_{50}) de 1.2 μ M. NPAF mostró mayor capacidad inhibitoria que NPFF y su CI_{50} pudo calcularse en 0.04 μ M. La CI_{50} de NPSF no pudo ser calculada a partir de las concentraciones ensayadas.

El neuropéptido NPAF inhibe de manera irreversible el compromiso a la diferenciación adiposa de las células 3T3-F442A

Todos los compuestos que inhiben la diferenciación de los preadipocitos 3T3 y otros modelos in vitro de la diferenciación adiposa reportados hasta ahora actúan de manera reversible y solamente mientras están presentes en el medio de cultivo. Cuando los inhibidores se retiran del medio y los cultivos se alimentan con medio fresco con factores adipogénicos, la diferenciación adiposa procede. Asimismo, la mayoría de estos inhibidores parecen actuar durante la etapa de compromiso; esto es, durante las primeras 48 h de quiescencia proliferativa durante las cuales las células experimentan cambios marcados en la expresión génica.

Para determinar si el efecto antiadipogénico del neuropéptido NPAF es reversible o permanente, y la etapa del proceso en la que actúa, tratamos cultivos de preadipocitos 3T3-F442A con medio adipogénico y 1 μ M de NPAF durante siete días. Luego de este periodo, algunos de los cultivos se alimentaron con medio adipogénico o con medio no adipogénico durante siete días adicionales al cabo de los cuales cuantificamos la acumulación lipídica de cada tratamiento. Como control de la inhibición reversible, tratamos de manera similar cultivos paralelos mantenidos con medio adipogénico y ácido retinoico. Los cultivos

tratados con NPAF durante 14 días de confluencia (fig. 3; MA+1 μ M NPAF) alcanzaron sólo un 29% de diferenciación respecto al control mantenido en medio adipogénico durante el mismo periodo (fig. 3; MA), confirmando el efecto inhibitorio del neuropéptido. La inhibición inducida por NPAF no revirtió cuando los cultivos tratados por siete días con NPAF se alimentaron con medio adipogénico (fig. 3; MA+1 μ M NPAF \rightarrow MA) o con medio no adipogénico (fig.3; MA+1 μ M NPAF \rightarrow MNA). Por el contrario, el alto grado de inhibición de la diferenciación adiposa en cultivos mantenidos en medio adipogénico adicionado con ácido retinoico (fig. 3; MA+1 μ M AR), pudo revertirse cuando estos cultivos se realimentaron con medio adipogénico (fig. 3; MA+1 μ M AR \rightarrow MA), pero no cuando se realimentaron con medio no adipogénico (fig. 3; MA+1 μ M AR \rightarrow MNA).

El neuropéptido NPAF inhibe la diferenciación adiposa de las células 3T3-F442A induciendo la sobreexpresión de Id3

En adipocitos 3T3-L1 terminalmente diferenciados, NPAF induce sobreexpresión de C/EBP α y C/EBP β así como subexpresión de PPAR γ (Lefrère y cols., 2002), tres factores de transcripción que actúan tempranamente en la inducción de la diferenciación adiposa (Gregoire y cols., 1998; Ntambi y Kim, 2000). En estas células terminales NPAF induce también sobreexpresión de Id1, Id2 e Id3 (Lefrère y cols, 2002), factores de transcripción que previenen la diferenciación adiposa de las células 3T3 (MacDougald y Lane 1995; Moldes y cols., 1997; Rangwala y Lazar, 2000).

Para conocer el mecanismo antiadipogénico de NPAF, resultará útil analizar los niveles de expresión de diversos genes que participan en el establecimiento del compromiso a la diferenciación en los preadipocitos 3T3-F442A, o en la manifestación fenotípica de su diferenciación terminal. Para analizar la expresión de algunos de estos genes, realizamos ensayos semicuantitativos de RT-PCR de los factores de transcripción C/EBP β , y PPAR γ , Id1, Id2, e Id3, así como de aP2, un marcador adipogénico tardío, y de GAPDH, un gen constitutivo empleado como control, bajo diferentes condiciones del proceso de diferenciación (fig. 4). Los

resultados de este análisis nos permitirán evaluar los efectos de los neuropéptidos sobre la expresión génica de estos marcadores.

Como primer paso en este sentido analizamos el efecto de NPAF sobre la expresión de Id3. Este gen codifica una proteína HLH (helix-loop-helix) que funciona como un factor de transcripción que inhibe la adipogénesis (Moldes y cols., 1997). Id3 se expresa constitutivamente en preadipocitos 3T3 y su expresión decae luego de 48 horas de confluencia (Moldes y cols., 1997; Hollnagel y cols., 1999), cuando se ha establecido el compromiso a la diferenciación terminal. Cultivos preconfluentes de preadipocitos 3T3-F442A expresaron el mRNA para Id3 con un nivel que se mantuvo durante las primeras 48 h de tratamiento con medio adipogénico. En contraste, la presencia de NPAF 1 μ M durante la incubación duplicó la expresión de Id3 respecto al control con medio adipogénico (fig. 5).

DISCUSIÓN

Los neuropéptidos amidados NPPF y NPAF, conocidos principalmente por su papel en la modulación del dolor y la tolerancia a opioides (Panula y cols., 1996; Roumy y Zajac, 1998), inducen cambios en la expresión génica de adipocitos 3T3-L1 terminalmente diferenciados (Lefrère y cols., 2002). Se ignora si estos neuropéptidos u otros relacionados afectan el proceso de la diferenciación adiposa.

Para contestar esta pregunta indujimos la diferenciación de preadipocitos 3T3-F442A en presencia de los neuropéptidos NPPF, NPAF y NPSF. Los tres inhibieron la adipogénesis, medida por la acumulación intracitoplásmica de triglicéridos, en función de la concentración y con diferente potencia. De los tres neuropéptidos, NPPF mostró la menor capacidad de antiadipogénica, con una concentración inhibitoria media (CI_{50}) de 1.2 μ M. NPAF mostró una mayor capacidad inhibitoria y su CI_{50} pudo calcularse en 0.04 μ M. El neuropéptido con la mayor capacidad antiadipogénica fue NPSF, el cual redujo la adipogénesis en casi un 70% a la menor concentración ensayada, 1 nM. Concentraciones de NPSF mayores a 1 nM no dieron lugar a incrementos sustantivos adicionales en su capacidad inhibitoria por lo que la estimación de su CI_{50} requiere el ensayo de concentraciones menores.

Ninguno de los tres neuropéptidos indujo el 100% de inhibición cuando se ensayaron a la concentración de 10 μ M: NPPF produjo un 60% de inhibición; NPAF inhibió en un 79%, NPSF inhibió la diferenciación adiposa en un 83%. La incapacidad de las altas concentraciones de neuropéptidos ensayadas para inhibir totalmente la adipogénesis en este modelo puede deberse a que las moléculas probadas no sean la forma activa del neurotransmisor. Un trabajo reciente muestra que los neuropéptidos NPA-NPPF y EFW-NPSF, putativamente producidos a partir del mismo gen que los neuropéptidos ensayados en este trabajo, poseen mayor afinidad por su receptor en neuronas de la médula espinal (Roumy y cols., 2000). Investigaciones futuras analizarán el efecto de los neuropéptidos NPA-NPPF y EFW-NPSF sobre la diferenciación adiposa de las células 3T3-F442A.

Por otro lado, encontramos que la inhibición de la adipogénesis por NPAF en los preadipocitos 3T3 es irreversible. Cultivos tratados con el neuropéptido durante siete días y luego mantenidos en medio adipogénico fresco durante siete días adicionales al retiro del neuropéptido no mostraron un mayor grado de diferenciación que los cultivos mantenidos durante todo el tratamiento con NPAF. Este resultado sugiere que el efecto inhibitorio de NPAF es cualitativamente diferente de los efectos reportados para otros inhibidores de la adipogénesis como el ácido retinoico (Kuri-Harcuch, 1982), los ésteres de forbol (Yun y Scott, 1983), o el factor de crecimiento transformante tipo β (Ignotz y Massague, 1985). Todos estos compuestos inhiben la diferenciación adiposa mientras están presentes en el medio de cultivo; cuando se retiran del medio y los cultivos se alimentan con medio conteniendo factores adipogénicos, la inhibición se revierte y la diferenciación adiposa procede. Nuestro hallazgo de la irreversibilidad del efecto inhibitorio del neuropéptido NPAF lo convierte en una herramienta de utilidad para el estudio de los eventos moleculares que median el establecimiento del compromiso a la diferenciación adiposa terminal.

Nuestros resultados sugieren también que NPAF inhibe la diferenciación de los preadipocitos 3T3-F442A previniendo el establecimiento del compromiso a la diferenciación adiposa terminal. El compromiso es un evento que implica cambios en la expresión de numerosos genes y ocurre en la primeras 48 h de quiescencia proliferativa en cultivos mantenidos en condiciones adipogénicas (Ntambi y Kim, 2000). El efecto antiadipogénico de NPAF podría resultar de la subexpresión de CEBP β , C/EBP α y PPAR γ , factores de transcripción que se expresan tempranamente durante la diferenciación adiposa y están implicados en la inducción de la misma (Lin y Lane, 1992; MacDougald y Lane, 1995; Rangwala y Lazar, 2000). Alternativamente, la inhibición de la adipogénesis por NPAF podría ser mediada por la sobreexpresión de las proteínas Id1, Id2 o Id3, factores de transcripción que inhiben la diferenciación adiposa de las células 3T3 (Lasorella y cols., 2001). La sobreexpresión de Id3 inducida por el tratamiento con NPAF sugiere que este factor de transcripción participa en la inhibición de la adipogénesis provocada por el neuropéptido. Experimentos adicionales que

evalúen otros factores de transcripción cuya expresión temprana contribuye o previene la diferenciación adiposa, permitirán establecer si Id3 es un mediador exclusivo o parcial del efecto inhibitorio del neuropéptido NPAF, así como de su carácter irreversible.

En conclusión, nuestro trabajo muestra que los neuropéptidos amidados NPDF, NPAF y NPSF inhiben la diferenciación adiposa y que el neuropéptido NPAF inhibe de manera irreversible la aparición de nuevos adipocitos a partir de las células precursoras. La irreversibilidad del efecto antiadipogénico de NPAF nos provee de una herramienta de gran utilidad para estudiar los eventos moleculares que median el establecimiento del compromiso a la diferenciación adiposa terminal.

REFERENCIAS

- Allard M, Labrousche S, Nosjean A, Laguzzi R. 1995. Mechanisms underlying the cardiovascular responses to peripheral administration of NPF in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 274:577–583
- Bowers RR, Festuccia WT, Song CK, Shi H, Migliorini RH, Bartness TJ. 2004. Sympathetic innervation of white adipose tissue and its regulation of fat cell number. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 286:R1167-1175
- Chomczynski P, Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-159
- Desprat C, Zajac JM. 1997. Hypothermic effects of neuropeptide FF analogues in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 58:559-563
- Elshourbagy NA, Ames RS, Fitzgerald LR, Foley JJ, Chambers JK, Szekeres, PG, Evans NA, Schmidt DB, Buckley PT, Dytko GM, Murdock PR, Tan, K. B., Shabon U, Nuthulaganti P, Wang DY, Wilson S, Bergsma DJ, Sarau HM. 2000. Receptor for the pain modulatory neuropeptides FF and AF is an orphan G protein-coupled receptor. *J Biol Chem* 275:25965–25971
- Fehmann HC, McGregor G, Weber V, Eissele R, Goke R, Goke B, Arnold R. 1990. The effects of two FMRFamide related peptides (A-18-F-amide and F-8-F-amide; 'morphine modulating peptides') on the endocrine and exocrine rat pancreas. *Neuropeptides* 17:87-92
- Fliers E, Kreier F, Voshol PJ, Havekes LM, Sauerwein HP, Kalsbeek A, Buijs RM, Romijn JA. 2003. White adipose tissue: getting nervous. *J Neuroendocrinol* 15:1005-1010
- Greenberg MJ, Price DA. 1992. Relationships among the FMRFamide-like peptides. *Prog Brain Res* 92:25-37
- Gregoire FM, Smas CM, Sul HS. 1998. Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev* 78:783-809
- Hollnagel A, Oehlmann V, Heymer J, Rütther U, Nordheim A. 1999. Id genes are directed targets of bone morphogenetic protein induction in embryonic stem cells. *J Biol Chem* 274:19838-19844

- Ignotz RA, Massague J. 1985. Type β transforming growth factor controls the adipogenic differentiation of 3T3 fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:8530-8534
- Kuri-Harcuch W, Green H. 1978. Adipose conversion of 3T3 cells depends on a serum factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 75:6107-6109
- Kuri-Harcuch W. 1982. Differentiation of 3T3-F442A cells into adipocytes is inhibited by retinoic acid. *Differentiation* 23:164-169
- Labrousche S, Laulin JP, Le Moal M, Tramu G, Simonnet G. 1998. Neuropeptide FF in the rat adrenal gland: presence, distribution and pharmacological effects. *J Neuroendocrinol* 10:559-565
- Laguzzi R, Nosjean A, Mazarguil H, Allard M. 1996. Cardiovascular effects induced by the stimulation of neuropeptide FF receptors in the dorsal vagal complex: an autoradiographic and pharmacological study in the rat. *Brain Res* 711:193–202
- Lasorella A, Uo T, Lavarone A. 2001. Id proteins at the cross-road of developed and cancer. *Oncogene* 20:8326-8333
- Lefrère I, Coppet P, Camelin JC, Le Lay S, Mercier N, Elshourbagy N, Bril A, Berrebi-Bertrand I, Fève B, Krief S. 2002. Neuropeptide AF and FF modulation of adipocyte metabolism. *J Biol Chem* 277:39169–39178
- Lin FT, Lane MD. 1992. Antisense CCAAT/enhancer-binding protein RNA suppresses coordinated gene expression and triglyceride accumulation during differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *Genes Dev* 6:533-544
- MacDougald OA, Lane MD. 1995. Transcriptional regulation of gene expression during adipocyte differentiation. *Annu Rev Biochem* 64:345-373
- Moldes M, Lasnier F, Fève B, Pairault J, Djian P. 1997. Id3 prevents differentiation of preadipose cells. *Mol Cell Biol* 17:1796-1804
- Murase T, Arima H, Kondo K, Oiso Y. 1996. Neuropeptide FF reduces food intake in rats. *Peptides* 17:353-354
- Ntambi JM, Kim Y-Ch. 2000. Adipocyte differentiation and gene expression. *J Nutr* 130:3122S-3126S

- Panula P, Aarnisalo AA, Wasowicz K. 1996. Neuropeptide FF, a mammalian neuropeptide with multiple functions. *Prog Neurobiol* 48:461-487
- Perry SJ, Yi-Kung Huang E, Cronk D, Bagust J, Sharma R, Walker RJ, Wilson S, Burke JF. 1997. A human gene encoding morphine modulating peptides related to NPFF and FMRFamide. *FEBS Lett* 409:426-30
- Price DA, Greenberg MJ. 1977. Structure of a molluscan cardioexcitatory neuropeptide. *Science* 197:670-671
- Ramírez-Zacarias JL, Castro-Muñozledo F, Kuri-Harcuch W. 1992. Quantitation of adipose conversion and triglycerides by staining intracytoplasmic lipids with Oil red O. *Histochemistry* 197:493-497
- Rangwala SM, Lazar MA. 2000. Transcriptional control of adipogenesis, *Annu Rev Nutr* 20:535-559
- Roumy M, Gouarderes C, Mazarguil H, Zajac JM. 2000. Are neuropeptides FF and SF neurotransmitters in the rat? *Biochem Biophys Res Commun* 275:821-8244
- Roumy M, Zajac JM. 1998. Neuropeptide FF, pain and analgesia. *Eur J Pharmacol* 12:1-11
- Salazar-Olivo LA, Castro-Muñozledo F, de la Garza M, Kuri-Harcuch W. 1994. Inhibition of 3T3 adipogenesis by retinoic acid is not mediated by cytoplasmic retinoic acid-binding protein. *Biochem Biophys Res Commun* 204:257-263
- Sorenson RL, Sasek CA, Elde RP. 1984. Phe-met-arg-phe-amide (FMRF-NH₂) inhibits insulin and somatostatin secretion and anti-FMRF-NH₂ sera detects pancreatic polypeptide cells in the rat islet. *Peptides* 5:777-782
- Sundblom DM, Hyrkko A, Fyhrquist F. 1998. Pulsatile secretion of neuropeptide FF into human blood. *Peptides* 19:1165-1170
- Vilim FS, Aarnisalo AA, Nieminen ML, Lintunen M, Karlstedt K, Kontinen VK, Kalso E, States B, Panula P, Ziff E. 1999. Gene for pain modulatory neuropeptide NPFF: induction in spinal cord by noxious stimuli. *Mol Pharmacol* 55:804-811
- Yun K, Scott RE. 1983. Biological mechanisms of phorbol myristate acetate-induced inhibition of proadipocyte differentiation. *Cancer Res* 43:88-96

Tabla 1. Oligonucleótidos empleados en el análisis de la expresión de genes involucrados en la diferenciación adiposa y productos de RT-PCR esperados.

| Gen¹ | Secuencia (5'→3') | Producto de amplificación |
|------------------------|------------------------------|----------------------------------|
| C/EBPβ | s GCAAGAGCCGCGACAAG | 156 pb |
| | as GGCTCGGGCAGCTGCTT | |
| aP2 | s AACACCGAGATTTCTT | 181 pb |
| | as ACACATTCCACCACCAG | |
| PPARγ1+2 | s AGGCCGAGAAGGAGAAGCTGTTG | 278 pb |
| | as TGGCCACCTCTTTGCTCTGCTC | |
| Id1 | s GCTGCTACTCACGCCTCAAG | 194 pb |
| | as GCCGTTCCAGGGTGCTG | |
| Id2 | s GAAAAACAGCCTGTCCGACCA | 208 pb |
| | as CCAGGGCGATCTGCAGGT | |
| Id3 | s CTGCTACGAGGCGGTGTG | 177 pb |
| | as CACCTGGCTAAGCTGAGTGC | |
| GAPDH | s GGCCATCCACAGTCTTCTGG | 986 pb |
| | as ACCACAGTCCATGCCATCACTGCCA | |

¹Nombre y número de acceso (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) de los genes involucrados en la diferenciación: C/EBPβ: CAAT/ enhancer binding protein beta (X62600 737/ 738); aP2: Fatty-acid binding protein (MUSLBP 733/ 734); PPARγ1+2: Peroxisome proliferator-activated receptor (U01664 855/ 856); Id1: Inhibitor of differentiation 1 (MMU43884 991/ 992); Id2: Inhibitor of differentiation 2 (NM_010496 995/ 996); Id3: Inhibitor of differentiation 3 (NM_008321 999/ 1000); GAPDH: Glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase (MUSGAPDH). Las secuencias de oligonucleótidos fueron tomadas de Léfriere y cols., 2002.

Tabla 2. Condiciones para el análisis de la expresión génica mediante RT-PCR semicuantitativa¹

| Gen | Número de ciclos |
|-------------------|-------------------------|
| C/EBP β | 26 |
| PPAR γ 1+2 | 28 |
| Id1 | 24 |
| Id2 | 30 |
| Id3 | 24 |
| aP2 | 18 |
| GAPDH | 17 |

¹ Para cada ciclo las condiciones fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 94°C durante 5 min, desnaturalización secundaria 30 s a 94°C, 30 s a la temperatura de alineación de 60°C para los genes C/EBP β , PPAR γ 1+2, Id-1, Id-2, Id-3, y GAPDH, y 52°C para aP2; 1 min a 72°C, y temperatura de extensión final de 72°C 5 min. El número de ciclos para PCR se determinó por densitometría de los productos de amplificación obtenidos con los oligonucleótidos específicos. El RNA total que sirvió de molde se extrajo por el método de isotiocianato de guanidina de preadipocitos y adipocitos 3T3-F442A bajo diferentes condiciones de cultivo y a diferentes tiempos de proceso de diferenciación.

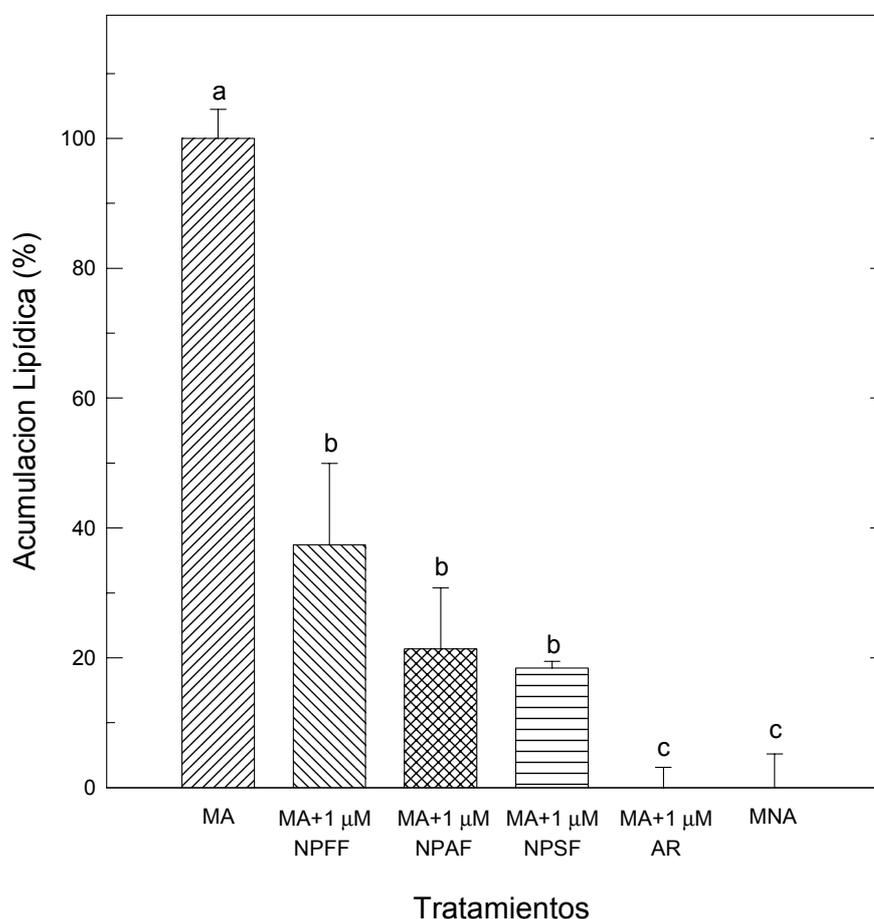


Figura 1. Efecto de los neuropéptidos NPAF, NPF y NPSF sobre la diferenciación de preadipocitos. Preadipocitos 3T3-F442A se indujeron a diferenciación con medio adipogénico (MA) o con MA adicionado con 1 μ M de los neuropéptidos NPAF, NPF o NPSF. Cultivos control recibieron MA adicionado con ácido retinoico (AR), o medio no adipogénico (MNA). La acumulación lipídica se cuantificó al cabo de siete días de incubación en monocapas teñidas con rojo oleoso O. Las barras representan la media de tres experimentos \pm desviación estándar. Las letras minúsculas denotan diferencias significativas en los valores de las barras ($P \leq 0.05$).

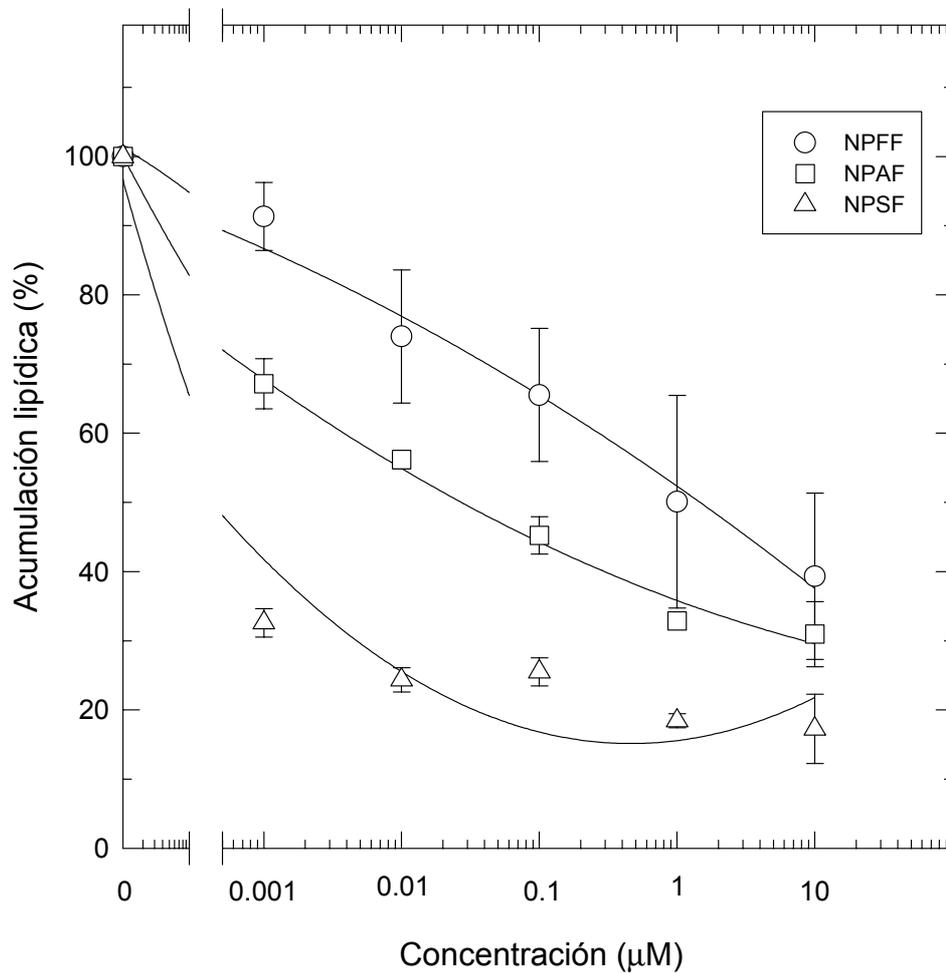


Figura 2. Efecto de la concentración de los neuropéptidos NPAF, NPFF y NPSF sobre la inhibición de la adipogénesis de células 3T3-F442A.

Preadipocitos 3T3-F442A se indujeron a diferenciación con medio adipogénico en presencia de NPAF, NPFF o NPSF a las concentraciones señaladas. La acumulación lipídica se cuantificó al cabo de siete días de incubación en las monocapas teñidas con rojo oleoso O.

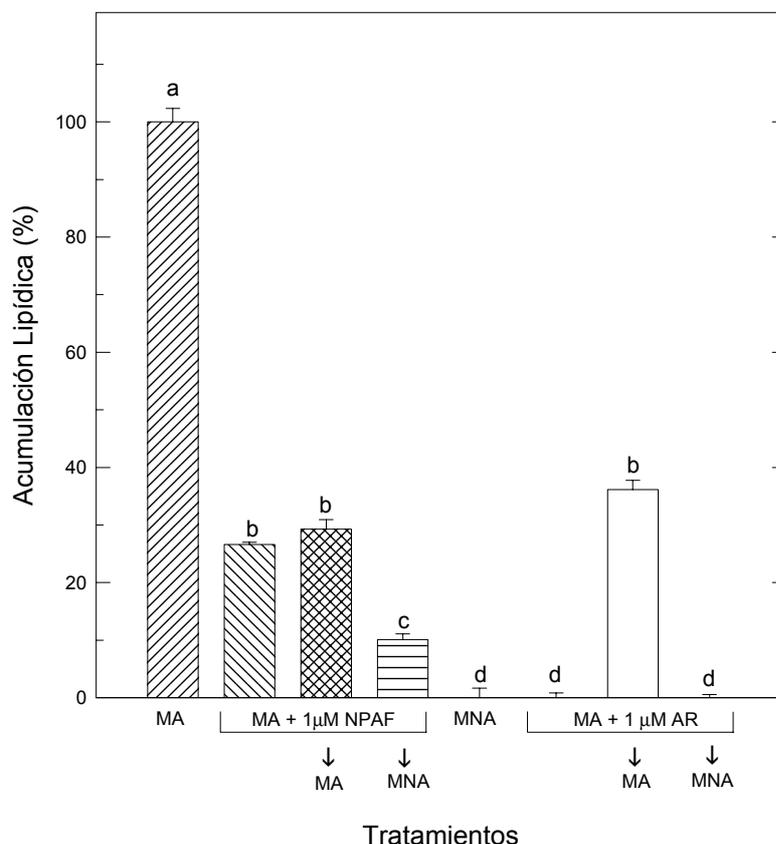


Figura 3. Efecto antiadipogénico irreversible del neuropéptido NPAF.

Preadipocitos 3T3-F442A se indujeron a diferenciación con medio adipogénico (MA) o con MA adicionado con NPAF 1 µM durante siete días. Al cabo de este periodo algunos cultivos se mantuvieron por siete días adicionales en presencia del neuropéptido en tanto que otros se alimentaron con MA o medio no adipogénico (MNA). Cultivos paralelos usados como control recibieron MA adicionado con ácido retinoico (AR) o medio no adipogénico (MNA). Los cultivos mantenidos en AR se sometieron a un protocolo de reversibilidad similar al descrito para NPAF. La acumulación lipídica se cuantificó en monocapas teñidas con rojo oleoso O. Las letras minúsculas denotan diferencias significativas en los valores de las barras ($P \leq 0.05$).

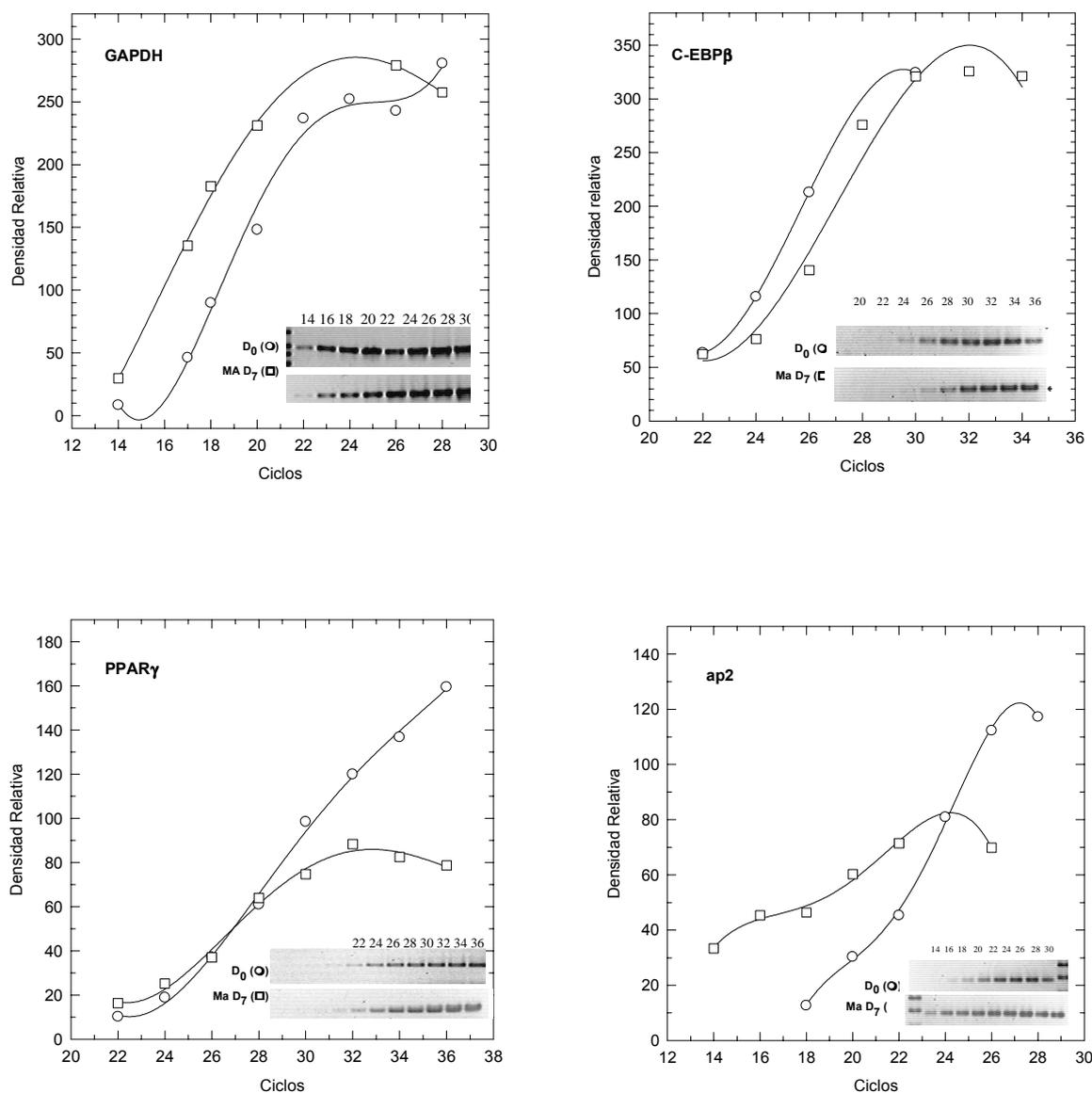


Figura 4. Análisis semicuantitativo de la expresión de diversos genes que participan en la diferenciación adiposa. El RNA total de preadipocitos (D₀) o de adipocitos 3T3-F442A (Ma D₇) se aisló por el método de isotiocianato de guanidina. La expresión de los mRNAs para GAPDH, C/EBPβ, PPARγ, Id1, Id2, Id3, y aP2 se cuantificó por densitometría de los productos de amplificación obtenidos con oligonucleótidos específicos a lo largo de un número variable de ciclos de RT-PCR.

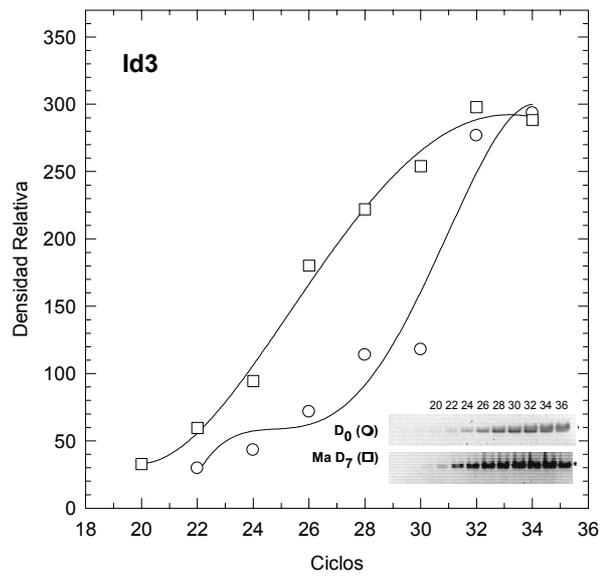
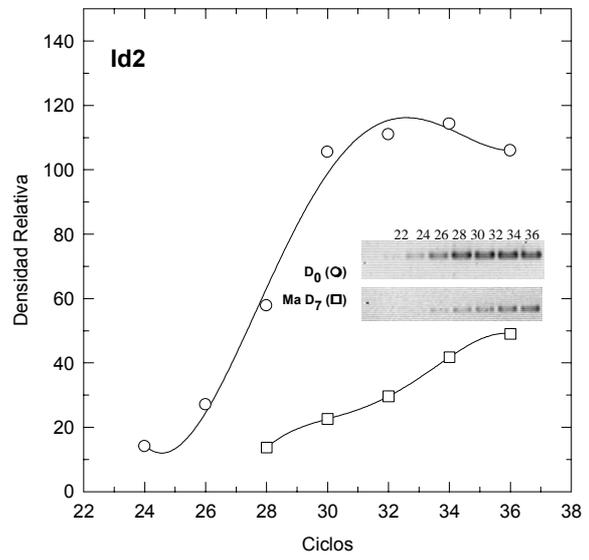
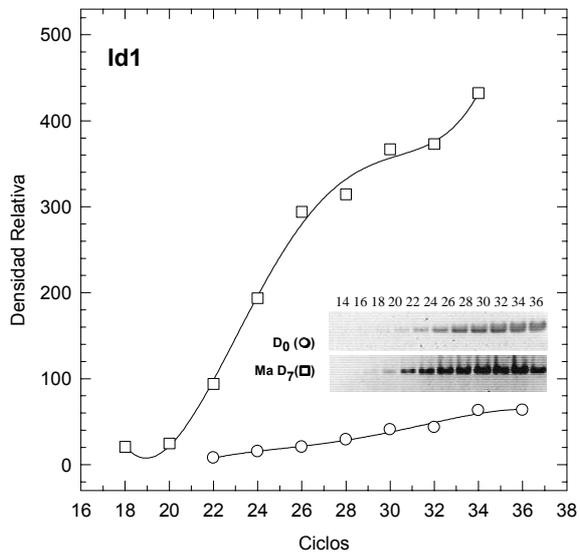


Figura 4. Continuación.

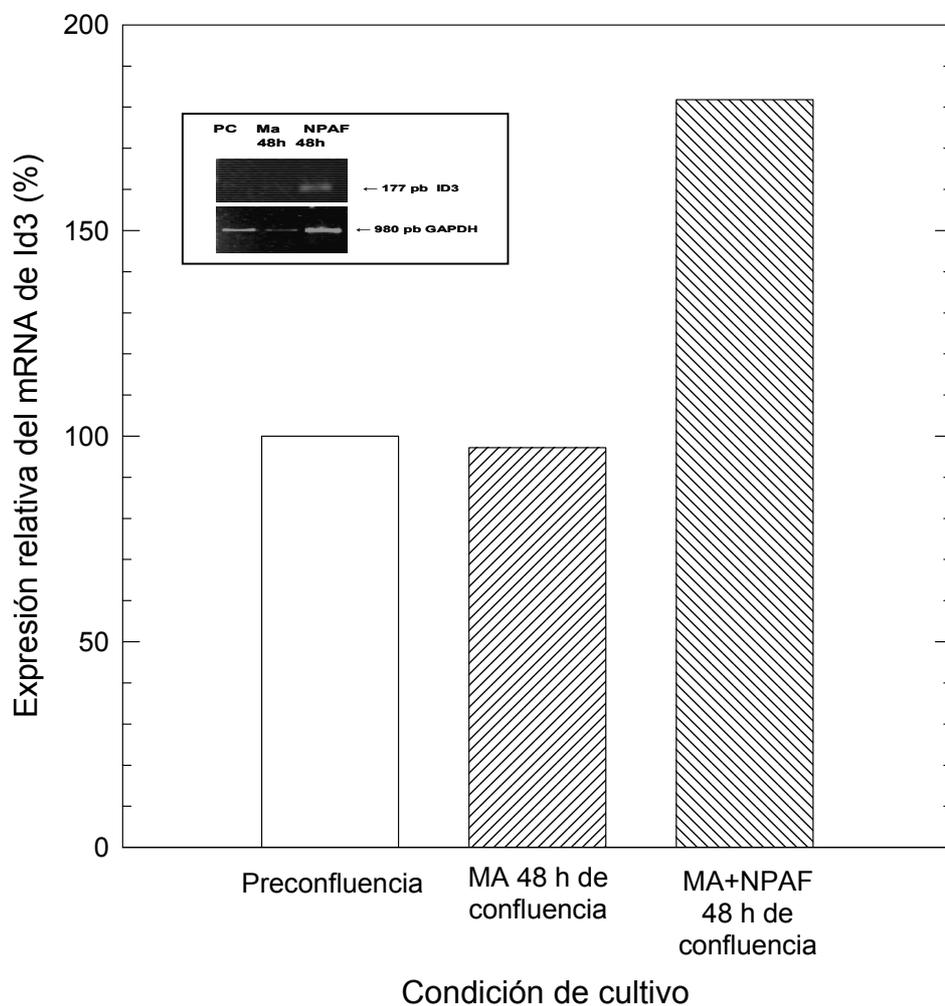


Figura 5. Efecto de NPAF sobre la expresión de Id3. El RNA total aislado de preadipocitos 3T3-F442A (preconfluencia) o de células mantenidas 48 h en confluencia en medio adipogénico (MA 48 h), o en medio adipogénico adicionado con 1 μ M de NPAF, se analizó por RT-PCR empleando oligonucleótidos específicos para Id3 y para GAPDH como control (inserto). Los productos de amplificación de mRNA Id3 se cuantificaron por densitometría relativa respecto a los de GAPDH de cada tratamiento.